



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

TESIS DOCTORAL

**INTERACCIÓN ENTRE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA Y
METABÓLICA: CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE FACTORES
NEUROENDOCRINOS Y EL SENSOR ENERGÉTICO, PROTEÍNA
QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK)**

Alexia Barroso Romero

Córdoba, Noviembre de 2019

TITULO: *Interacción entre la función reproductiva y metabólica: caracterización del papel de factores neuroendocrinos y el sensor energético, proteína quinasa activada por AMP (AMPK)*

AUTOR: *Alexia Barroso Romero*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

INTERACCIÓN ENTRE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA Y METABÓLICA: CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE FACTORES NEUROENDOCRINOS Y EL SENSOR ENERGÉTICO, PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK)

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Alexia Barroso Romero**, licenciada en Biología por la Universidad de Córdoba, para optar al grado de **Doctora** en Biomedicina por la Universidad de Córdoba.

Los Directores:

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

Dr. Juan Roa Rivas
Profesor Ayudante Doctor
de la Universidad de Córdoba



TÍTULO DE LA TESIS: INTERACCIÓN ENTRE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA Y METABÓLICA: CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE FACTORES NEUROENDOCRINOS Y EL SENSOR ENERGÉTICO, PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK)

DOCTORANDO/A: ALEXIA BARROSO ROMERO

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

El trabajo de Tesis Doctoral titulado “Interacción entre la función reproductiva y metabólica: Caracterización del papel de factores neuroendocrinos y el sensor energético, proteína quinasa activada por AMP (AMPK)” ha sido realizado satisfactoriamente por la doctoranda Alexia Barroso Romero, Licenciada en Biología, entre los años 2014 y 2019 en la Sección de Fisiología del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo nuestra dirección. El objetivo general de este trabajo fue profundizar en la caracterización de las interacciones dinámicas entre el estado metabólico del organismo y aspectos clave de la maduración y la función reproductora. En esta Tesis, se ha prestado especial atención al estudio del impacto de cambios en la función gonadal y la exposición a factores obesogénicos sobre el perfil endocrino-metabólico en la edad adulta y a la evaluación del posible papel del sensor energético celular, AMPK, actuando en las neuronas GnRH y Kiss1, en el control metabólico de la función reproductora.

Durante el periodo pre-doctoral, la doctoranda ha adquirido una considerable destreza en el uso de diversos modelos animales y desarrollo de modelos transgénicos, así como en el manejo de diferentes técnicas de biología molecular y neuroendocrinología experimental, lo que le ha permitido cumplir ampliamente con el objetivo general propuesto para este proyecto de Tesis.

Adicionalmente, 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 publicación de un trabajo científico (directamente relacionado con la temática de esta Tesis Doctoral), aparecido en *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA*, una de las revistas de mayor índice de

impacto y ubicada en el primer decil en el campo de las Ciencias Multidisciplinares, así como otros 3 trabajos que van a ser enviados próximamente a revistas de primer cuartil en el Área de Endocrinología y Metabolismo. Además, la doctoranda ha participado de forma relevante, durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral, en otras líneas de investigación relacionadas con su propia línea de Tesis llevados a cabo por nuestro grupo. Gracias a ello, la doctoranda ha conseguido ser co-autora en 6 publicaciones en revistas de reconocido prestigio internacional, estando estas en primer decil (*Metabolism -Clinical and Experimental-* dos artículos), o primer cuartil (*Scientific Reports* y *Endocrinology*). Además, las actividades de investigación de la doctoranda han resultado en 22 comunicaciones a reuniones científicas y congresos nacionales, como el “VII Simposio Científico de CIBEROBN”, e internacionales, entre los que incluyen “*Annual Meeting of the Endocrine Society*” (Orlando, USA 2017), “*International Congress of Neuroendocrinology*” (Toronto, Canadá 2018) y el “*European Congress of Endocrinology*”, en sus ediciones de 2018 y 2019. Esto se complementa con varios premios recibidos por las comunicaciones orales tituladas “*Involvement of a novel AMPK-Kisspeptin pathway in the metabolic control of puberty*” y “*Ablation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in GnRH neurons produces reproductive and metabolic alterations: Implications for the metabolic control of reproduction*”, en las VIII y X Jornadas de jóvenes investigadores del IMIBIC, celebradas en el año 2017 y 2019, respectivamente, logrando además en este último año el premio honorífico a la mejor comunicación de las Jornadas.

Por todas las razones expuestas anteriormente, se autoriza la presentación de la presente Tesis Doctoral.

Córdoba, 18 de NOVIEMBRE de 2019

Firma del/de los director/es

Fdo.: MANUEL TENA SEMPERE

Fdo.: JUAN ROA RIVAS

---ÍNDICE---

ÍNDICE

RESUMEN

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN	23
1. FUNCIÓN REPRODUCTORA	23
1.1. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL.....	23
1.2. REGULACIÓN DEL EJE HHG.....	30
1.3. PAPEL DE LAS KISSPEPTINAS EN EL CONTROL DEL EJE HHG	36
1.4. PUBERTAD	40
2. FUNCIÓN METABÓLICA: MECANISMOS DE REGULACIÓN.....	43
2.1. CONTROL NEUROENDOCRINO DEL BALANCE ENERGÉTICO	44
3. CONTROL METABÓLICO DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA	56
3.1. FACTORES CENTRALES Y SENSORES ENERGÉTICOS IMPLICADOS EN EL CONTROL METABÓLICO DE LA REPRODUCCIÓN.....	57
3.2. FACTORES PERIFÉRICOS IMPLICADOS EN EL CONTROL METABÓLICO DE LA REPRODUCCIÓN: LEPTINA, INSULINA, GHRELINA.....	62
4. AMPK.....	64
4.1. AMPK EN EL CONTROL DE LA HOMEOSTASIS METABÓLICA.....	65
4.2. PAPEL DE AMPK EN EL CONTROL INTEGRADO DEL BALANCE ENERGETICO Y LA REPRODUCCIÓN	68
5. PROGRAMACIÓN TEMPRANA DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA Y METABÓLICA .	69
OBJETIVOS	72
MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	75
1.1. GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA LÍNEA DE RATÓN CON ABLACIÓN SELECTIVA DE AMPK α 1 EN NEURONAS KISS1: EL MODELO KAMKO.....	75
1.2. GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MODELO DE RATÓN CON AUSENCIA SELECTIVA DE AMPK α 1 EN NEURONAS GNRH: EL MODELO GAMKO	77
1.3. GENOTIPADO.....	78
2. DROGAS.....	80
3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES	81
4. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS GENERALES.....	83
4.1. CANULACIÓN Y ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (I.C.V.).....	83

4.2. GONADECTOMÍA	83
5. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS GENERALES	83
6. DISEÑOS EXPERIMENTALES	86
6.1. IMPACTO METABÓLICO Y REPRODUCTIVO DE LA MANIPULACIÓN DEL AMBIENTE ESTEROIDEO NEONATAL Y DE LA SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL	86
6.2. IMPACTO METABÓLICO Y GONADOTRÓPICO DE LA SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL Y/O LA ABLACIÓN GONADAL EN RATAS MACHO Y HEMBRA ADULTAS.....	90
6.3. ANÁLISIS DEL PAPEL DE AMPK EN NEURONAS GNRH Y KISS1 EN EL CONTROL INTEGRADO DEL METABÓLICO Y LA FUNCIÓN REPRODUCTORA	91
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	98
RESULTADOS.....	100
1. IMPACTO METABÓLICO Y REPRODUCTIVO DE LA MANIPULACIÓN DEL AMBIENTE ESTEROIDEO NEONATAL Y DE LA SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL	100
2. IMPACTO METABÓLICO Y GONADOTRÓPICO DE LA SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL Y/O LA ABLACIÓN GONADAL EN RATAS MACHO Y HEMBRA ADULTAS	111
3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA ACTIVACIÓN PUBERAL EN LOS MODELOS GAMKO Y KAMKO	119
3.1. ESTUDIOS DE PUBERTAD EN EL RATÓN GAMKO	119
3.2. ESTUDIOS DE PUBERTAD EN EL RATÓN KAMKO.....	120
4. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN LA EDAD ADULTA EN LOS MODELOS GAMKO Y KAMKO.....	123
4.1. ESTUDIOS DE FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL RATÓN GAMKO	123
4.2. ESTUDIOS DE FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL RATÓN KAMKO.....	126
5. IMPACTO DEL ESTRÉS METABÓLICO SOBRE LA FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN LA EDAD ADULTA EN LOS MODELOS GAMKO Y KAMKO	128
5.1. ESTUDIOS DE ESTRÉS METABÓLICO Y FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL RATÓN GAMKO	128
5.2. ESTUDIOS DE ESTRÉS METABÓLICO Y FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL RATÓN KAMKO.....	132
6. FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL MODELO GAMKO TRAS MANIPULACIÓN DEL ESTADO GONADAL: INTERACCIÓN CON EL ESTADO NUTRICIONAL	134
DISCUSIÓN	138
CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA	158

---RESUMEN---

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso costoso en términos de consumo energético que, si bien es esencial para la supervivencia de las especies, es prescindible a nivel individual. Por lo tanto, la maduración y la función del eje reproductor están estrechamente conectadas con el estado energético del organismo y se encuentran bajo el control de una red sofisticada de factores reguladores, donde señales neuronales, hormonales y ambientales cooperan para garantizar su correcta maduración, durante distintas etapas del desarrollo, y su mantenimiento funcional en la edad adulta, siempre que las condiciones nutricionales y metabólicas sean adecuadas. El éxito de este proceso está dirigido por la acción integrada de las señales del denominado eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal (HHG), en el que las neuronas GnRH ocupan una posición destacada controlando la reproducción y su modulación mediante señales metabólicas (1, 2). Las neuronas Kiss1, por su parte, son elementos clave en el control de la reproducción, ya que regulan la liberación de GnRH y, por ende, de las gonadotropinas, y además son capaces de transmitir información metabólica a las neuronas GnRH, estimulando o inhibiendo su síntesis (3).

En este contexto, en las últimas décadas se han descubierto un gran número de señales de origen central y periférico, responsables de la adecuación de la función reproductora a la disponibilidad de recursos energéticos del organismo. En líneas generales, puede asumirse que las señales de suficiencia energética (anorexigénicas) estimulan la puesta en marcha y funcionamiento del eje reproductor, mientras que las señales que informan de la escasez de recursos energéticos (orexigénicas) inhiben el funcionamiento del eje reproductor. De esta forma, se han desarrollado mecanismos sofisticados durante la evolución para permitir una inhibición específica del eje reproductor en condiciones energéticas desfavorables (3).

Dichas condiciones metabólicas adversas pueden concurrir en situaciones tanto de déficit como de exceso de los depósitos energéticos del organismo. Así, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, la prevalencia de la obesidad y las patologías asociadas está aumentando a un ritmo de proporciones epidémicas. Las razones se deben a una combinación entre la predisposición genética y los factores sociales y ambientales, que conducen a un desequilibrio en el balance energético, y se asocia con la hipertensión, la diabetes tipo 2, el hígado graso y una variedad de trastornos conocidos como síndrome metabólico. De otra parte, diversas condiciones, algunas de prevalencia creciente, se asocian a un déficit energético severo, tales como la anorexia nerviosa, la caquexia tumoral y otras patologías consuntivas, o incluso

programas de entrenamiento físico intensivo, tales como los propios de deportistas profesionales. En unas y otras condiciones, dependiendo del momento en el que concurran, tanto la pubertad como la fertilidad y la función gonadal pueden verse severamente afectadas (4).

A su vez, la propia función gonadal puede influenciar el estado metabólico del organismo, de suerte que las secreciones gonadales, como los andrógenos y los estrógenos, son potentes moduladores de la homeostasis metabólica y del peso corporal. Por todo ello, diversas evidencias experimentales apuntan que no sólo cambios nutricionales y otras situaciones de estrés metabólico, sino también niveles inapropiados de hormonas sexuales en determinados periodos del desarrollo, pueden contribuir a desencadenar alteraciones metabólicas y a modificar de manera permanente la función reproductora (5, 6). Sin embargo, los mecanismos neurohormonales que subyacen a esta interacción bidireccional entre el metabolismo y el eje reproductor permanecen aún en gran medida desconocidos.

Por otro lado, además de distintas señales centrales y periféricas, evidencias recientes sugieren la participación de sensores energéticos celulares en el control metabólico de la función reproductora. Entre ellos, destaca la proteína quinasa activada por AMP, denominada AMPK, un sensor energético clave que se activa en condiciones de déficit energético y está implicado en la homeostasis energética del organismo, principalmente a través de la regulación de la ingesta y el gasto energético, ejerciendo su acción en los núcleos hipotalámicos, arcuato (ARC) y ventromedial (VMN), respectivamente (7). Además, estudios recientes han sugerido que AMPK opera como una vía clave que informa y modula al eje HHG en situaciones de insuficiencia energética, si bien las evidencias que apoyan dicho papel son aun fragmentarias y no concluyentes, sin una caracterización clara del papel de la señalización de AMPK en poblaciones neuronales clave para el control metabólico de la función reproductora (1).

En suma, aun cuando es evidente que existe un claro acoplamiento entre el estado energético y metabólico del organismo, y la maduración y función del eje reproductor, aún no se conocen en profundidad las redes neuronales y las bases hormonales y moleculares de los mecanismos que intervienen en este fenómeno fisiológico. Todo ello hace necesario un mejor conocimiento de las complejas interacciones bidireccionales entre el estado metabólico y la función reproductiva, las bases neuroendocrinas de dichas interacciones, y los mecanismos moleculares que conectan ambos sistemas corporales relevantes.

Teniendo en cuenta lo expuesto previamente, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en la caracterización de las interacciones dinámicas entre el estado metabólico del organismo y aspectos clave de la maduración y la función reproductora. En este contexto, en esta Tesis se ha prestado especial atención a la definición del impacto de cambios en la función gonadal y la exposición a factores obesogénicos sobre el perfil endocrino-metabólico en la edad adulta y a la evaluación del posible papel del sensor energético celular, AMPK, actuando en las neuronas GnRH y Kiss1, en el control metabólico de la función reproductora.

2. CONTENIDO DE LA INVESTIGACIÓN

Esta Tesis Doctoral se ha dividido en dos bloques experimentales principales.

En el **bloque experimental 1**, se evaluó, en ratas macho y hembra, en la edad adulta temprana (PND50) y en periodo adulto (PND150), el impacto de la manipulación nutricional postnatal y del ambiente esteroideo neonatal sobre la función metabólica y gonadotrópica.

Nuestros resultados muestran, en primer lugar, que la sobrenutrición aplicada desde el periodo neonatal, consistente en una sobrealimentación durante la lactancia (SL) seguida de una dieta alta en grasa tras el destete (HFD), indujo alteraciones detectables en diversos parámetros metabólicos y gonadotrópicos en ratas de ambos sexos, aunque estos efectos fueron mucho más evidentes en los machos que en las hembras.

Así, las ratas macho SL/HFD, sobrenutridas desde el periodo neonatal, mostraron no solo una marcada ganancia de peso corporal frente a los controles normonutridos (NL/CD), sino que presentaron indicadores evidentes de hipogonadismo central y desregulación de la homeostasis glucídica. Destacablemente, la obesidad indujo en machos una supresión de los niveles séricos de gonadotropinas, detectables a los 50 y 150 días de edad, que condujo a una disminución significativa de los principales andrógenos testiculares, testosterona, DHT y androstendiona, sin alteraciones detectables en los niveles de progesterona, en el día postnatal 150 (PND150). En cuanto a la homeostasis metabólica, los machos obesos mostraron, en el PND150, niveles claramente elevados de glucemia basal, así como perfiles alterados en los test de tolerancia a la sobrecarga de glucosa (GTT) e insulina (ITT).

Por el contrario, la sensibilidad al impacto metabólico y gonadotrópico de estas manipulaciones obesogénicas fue sustancialmente menor en las ratas hembra. Así, y a pesar de la marcada ganancia ponderal frente a ratas hembra normonutridas (NL/CD),

las hembras adultas obesas no presentaron cambios significativos en los niveles de LH y FSH circulantes, ni mostraron una supresión en las concentraciones séricas de andrógenos gonadales, aunque sí presentaron un incremento en los niveles de androstendiona y estradiol, sin cambios significativos en los niveles de progesterona y estrona. En cuanto a los parámetros metabólicos, las hembras obesas solo presentaron una disminución transitoria de las concentraciones séricas de insulina, selectivamente en el PND50, y una alteración muy puntual y moderada (circunscrita al minuto 20 del GTT) de la tolerancia a un bolo de glucosa en el PND150, sin modificaciones detectables ni en la glucemia basal ni en los valores de glucemia global durante el GTT o ITT.

Adicionalmente, a fin de analizar las causas de este claro dimorfismo sexual, analizamos el impacto de la manipulación del ambiente esteroideo neonatal sobre las respuestas metabólicas y gonadotrópicas a las manipulaciones obesogénicas indicadas (sobrenutrición persistente: SL/HFD). En concreto, estudiamos el efecto de la androgenización neonatal en la rata hembra, que es sabido causa una masculinización de la diferenciación sexual del cerebro, que se asocia a disfunción ovárica y anovulación. Nuestros resultados evidencian que la androgenización neonatal resulta en una clara *masculinización* de los perfiles de respuesta a las manipulaciones obesogénicas, de tal forma que las ratas hembra androgenizadas presentaron un conjunto de alteraciones endocrino-metabólicas globalmente similares a las mostradas por los machos, pero no por las hembras no-androgenizadas sometidas a manipulaciones obesogénicas análogas. De esta forma, las ratas androgenizadas mostraron una mayor ganancia ponderal, así como alteraciones en los niveles basales de glucemia y en los perfiles de glucemia en el GTT y el ITT, que fueron análogas a las de machos obesos. Igualmente, de manera análoga a lo observado en machos obesos, las hembras androgenizadas sometidas a sobrenutrición durante la lactancia seguida de HFD mostraron una supresión de los niveles de LH y de FSH (esta última, solo en el PND50), que no se detectó en las hembras obesas control. Llamativamente, las hembras androgenizadas presentaron alteraciones tempranas (en PND50) en parámetros, tales como la supresión de LH o los perfiles de glucemia en GTT e ITT, que fueron superiores a las detectadas en machos obesos de la misma edad, lo que podría evidenciar un impacto más marcado de la combinación de manipulaciones obesogénicas y la androgenización neonatal sobre dichos indicadores de función gonadotrópica y metabólica. En todo caso, las hembras androgenizadas no presentaron una supresión análoga a la de los machos obesos en la secreción de andrógenos gonadales, posiblemente debido a las diferencias intrínsecas entre la esteroidogénesis testicular y ovárica.

Finalmente, en este bloque experimental, analizamos igualmente el impacto, sobre la función gonadotrópica y metabólica en ratas adultas (PND150) de ambos sexos, de la eliminación completa de esteroides sexuales mediante gonadectomía (GNX), combinada o no con sobrealimentación postnatal y dieta rica en grasas.

La eliminación de los ovarios mediante ovariectomía (OVX) en la edad adulta (PND90) causó un cierto incremento del impacto de las manipulaciones obesogénicas en ratas hembra en ciertos parámetros endocrino-metabólicos. Sin embargo, la magnitud de dichos cambios fue en general muy modesto, salvo en lo que respecta a la ganancia ponderal y los niveles de leptina, que se vieron muy marcadamente aumentados por la combinación de OVX con la sobrenutrición persistente (SL/HFD). En todo caso, y a diferencia de las hembras intactas, las hembras OVX obesas mostraron unos niveles de LH parcialmente suprimidos (respecto a las hembras OVX no obesas), y una tendencia a la elevación de los niveles basales de glucemia, junto a una moderada elevación en la resistencia a las acciones de la insulina, sin que se observaran cambios en los perfiles del GTT entre ratas obesas intactas y OVX.

Finalmente, la orquidectomía (ORX) de las ratas macho en la edad adulta, como maniobra para la eliminación completa de las secreciones testiculares, no indujo en líneas generales un agravamiento evidente de los perfiles metabólicos, ni en los animales normonutridos ni en los obesos, salvo por una elevación en los niveles basales de insulina en machos ORX obesos, que sin embargo no se asoció a alteraciones evidentes en los perfiles de GTT e ITT. En todo caso, es destacable que en los machos normonutridos, la ORX resultó en una disminución del peso corporal, mientras que la ORX no agravó el cuadro de obesidad causado por la sobrenutrición sostenida (SL/HFD) desde la lactancia.

En el **bloque experimental 2**, empleamos modelos murinos genéticamente modificados, generados en nuestro laboratorio, denominados GAMKO y KAMKO, deficientes en la subunidad $\alpha 1$ de AMPK específicamente en las células GnRH y Kiss1, respectivamente, para caracterizar el papel de sensor metabólico, AMPK, actuando selectivamente en estas poblaciones neuronales, en el control metabólico de la pubertad y la función gonadotrópica adulta.

En condiciones de normonutrición, los ratones GAMKO hembra presentaron un adelanto de la edad de apertura vaginal, como signo externo de inicio de la pubertad, que se tradujo en una edad media de inicio puberal significativamente menor que en los ratones control. Este fenómeno no se detectó en ratones GAMKO machos, ni en ratones KAMKO de ambos sexos. En la misma línea, los ratones GAMKO hembra

peripuberales presentaron un aumento de las respuestas secretoras de LH (como marcador subrogado de secreción de GnRH) a la administración de kisspeptina.

A pesar de la ausencia de cambios fenotípicos de marcadores puberales en condiciones de normonutrición, los ratones hembra KAMKO presentaron una resistencia parcial al impacto deletéreo, en términos de retraso de inicio de la pubertad, de condiciones de balance energético negativo, en las que la actividad hipotalámica aumenta sustancialmente en condiciones fisiológicas. Así, mientras que en ratones hembra control, la subnutrición crónica tras el destete causó una disminución significativa del peso corporal, un retraso en la edad de apertura vaginal y una disminución del peso de ovario, la eliminación de la señalización de AMPK en células Kiss1, si bien no previno la caída del peso corporal causada por la subnutrición, de magnitud similar a la observada en ratones control subnutridos, sí evitó el retraso global en la edad de apertura vaginal inducido por dicha subnutrición, provocando además una marcada tendencia a la elevación de los niveles de LH y el peso de ovario en ratonas KAMKO subnutridas vs. controles sometidos a un protocolo similar de subnutrición.

En la edad adulta, los perfiles de secreción pulsátil de LH no mostraron cambios detectables en ratones macho y hembra GAMKO, ni en hembras KAMKO. A pesar de la ausencia de alteraciones en los perfiles secretores de LH, selectivamente las hembras GAMKO mostraron un incremento de las respuestas secretoras de GnRH (evidenciada por las respuestas de LH) ante la aplicación de diversos estímulos del eje gonadotrópico, que incluyen la kisspeptina-10, el agonista de NKB (Senktide) y GnRH.

De manera adicional, aplicamos distintos protocolos de déficit energético en ratones hembra GAMKO y KAMKO, a fin de evaluar si la ausencia de señalización de AMPK en neuronas GnRH o Kiss1 modifica las respuestas del eje gonadotrópico ante estas situaciones de estrés metabólico en la edad adulta. Nuestros estudios muestran que las ratonas GAMKO presentan un periodo de recuperación de la ciclicidad estral, como marcador de función ovárica, menor que el de ratones control tras la aplicación de dos protocolos diferentes de realimentación tras un periodo de subnutrición. De la misma forma, la supresión de diversos parámetros de secreción de LH (niveles medios, totales y basales) causada por el ayuno de 18 horas en ratones hembra control no se produjo en ratonas GAMKO sometidas a un protocolo similar de ayuno. En la misma línea, en hembras GAMKO sometidas a ayuno, las respuestas secretoras a kisspeptina fueron significativamente superiores a las que se detectaron en ratones control. Estos patrones de respuestas alteradas, observados en los ratones GAMKO ante la aplicación de protocolos de subnutrición o ayuno, contrastan con los detectados en las ratonas KAMKO, cuyos periodos de recuperación de la ciclicidad estral tras la realimentación en

ratones subnutridos fueron similares que en los controles. De la misma forma, la supresión de los distintos parámetros de secreción pulsátil de LH que se observó tras el ayuno de 18 horas fue similar entre los genotipos control y KAMKO, con una disminución análoga de los niveles de LH media, total y basal tras el ayuno. Este conjunto de observaciones parecen evidenciar un papel más predominante de AMPK en neuronas GnRH en el control metabólico del eje gonadotrópico en la edad adulta, mientras que la función de AMPK en neuronas Kiss1 en el periodo adulto parece mucho más moderada.

3. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de nuestro trabajo son:

1. Las alteraciones metabólicas y gonadotrópicas inducidas por la sobrenutrición mantenida desde la lactancia hasta la edad adulta presentan un marcado dimorfismo sexual, con una afectación mucho más notable en ratas macho que en hembras. Esta mayor sensibilidad de los machos a las manipulaciones obesogénicas se traduce no solo en una desregulación de la homeostasis glucídica en la edad adulta, sino también en la aparición de un cuadro de hipogonadismo hipogonadotropo asociado a obesidad, definido por una supresión incipiente de la secreción de gonadotropinas, detectable ya en la edad adulta temprana, que antecede a una profunda supresión de la secreción de andrógenos testiculares, que se asocia a hiperleptinemia, intolerancia a la sobrecarga de glucosa y resistencia a la insulina.
2. El estado de resiliencia de la rata hembra al impacto de manipulaciones obesogénicas sobre parámetros metabólicos y de función gonadotrópica se debe en gran medida a un correcto proceso de diferenciación sexual en etapas tempranas del desarrollo y la propia función ovárica, de suerte que la masculinización de los procesos de diferenciación sexual temprana, mediante androgenización neonatal, y, en menor medida, la eliminación de la función ovárica en la edad adulta, sensibilizan los sistemas metabólico y gonadotrópico a las acciones deletéreas de la sobrenutrición mantenida desde la lactancia hasta la edad adulta.
3. Específicamente en las hembras, el sensor energético celular, AMPK, actuando en neuronas GnRH, juega un papel relevante en el control metabólico de la pubertad y de la función gonadotrópica en la edad adulta, operando como una señal inhibitoria de la actividad neuronal GnRH, con un papel detectable tanto en condiciones de normonutrición como, especialmente, de balance energético negativo, en una acción dependiente de las secreciones ováricas.

4. En hembras, la señalización de AMPK en neuronas Kiss1 participa en el control metabólico de la pubertad, pero no parece intervenir de manera reseñable en la modulación de la función gonadotrópica en la edad adulta. En términos de regulación puberal, la actividad AMPK en neuronas Kiss1 contribuye a mediar el efecto inhibitorio de condiciones de subnutrición sobre la activación puberal del eje reproductor.

5. Junto con evidencias procedentes de estudios de expresión y farmacológicos previos, nuestros resultados en los modelos murinos, GAMKO y KAMKO, con ablación selectiva de la subunidad $\alpha 1$ de AMPK en células GnRH y Kiss1, respectivamente, han contribuido a caracterizar la naturaleza y relevancia fisiológica de la señalización hipotalámica AMPK en el control metabólico del eje reproductor, con un papel variable dependiendo del tipo neuronal en el que opere, el sexo, el momento del desarrollo y el estado nutricional.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. M. S. Avendaño, M. J. Vazquez, M. Tena-Sempere, Disentangling puberty: novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty. *Hum Reprod Update* **23**, 737-763 (2017).
2. J. Roa, M. Tena-Sempere, Connecting metabolism and reproduction: roles of central energy sensors and key molecular mediators. *Mol Cell Endocrinol* **397**, 4-14 (2014).
3. M. Manfredi-Lozano, J. Roa, M. Tena-Sempere, Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility. *Front Neuroendocrinol* **48**, 37-49 (2018).
4. F. R. Day, C. E. Elks, A. Murray, K. K. Ong, J. R. Perry, Puberty timing associated with diabetes, cardiovascular disease and also diverse health outcomes in men and women: the UK Biobank study. *Sci Rep* **5**, 11208 (2015).
5. M. A. Sánchez-Garrido *et al.*, Metabolic and Gonadotropic Impact of Sequential Obesogenic Insults in the Female: Influence of the Loss of Ovarian Secretion. *Endocrinology* **156**, 2984-2998 (2015).
6. M. G. Novelle *et al.*, Neonatal events, such as androgenization and postnatal overfeeding, modify the response to ghrelin. *Sci Rep* **4**, 4855 (2014).
7. M. López, M. Tena-Sempere, Estradiol effects on hypothalamic AMPK and BAT thermogenesis: A gateway for obesity treatment? *Pharmacol Ther* **178**, 109-122 (2017).

---ABREVIATURAS---

ABREVIATURAS

3V: Tercer ventrículo cerebral

aa: Aminoácidos

ABP: Proteína fijadora de andrógenos intratesticular

AC: Adenilato ciclasa

ACC1 y ACC2: Acetil-CoA carboxilasa 1 y 2

ACTH: Hormona estimulante de la corteza adrenal

ADP: Adenosín difosfato

AgRP: Péptido relacionado con Agutí

AMP: Adenosín monofosfato

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

AR: Receptor de andrógenos

ARC: Núcleo Arcuato

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

AUC: Área bajo la curva

AV: Apertura vaginal

AVPV: Área anteroventral periventricular

BAT: Tejido adiposo pardo o marrón

BBB: Barrera hematoencefálica

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BMP8B: Proteína morfogenética ósea 8B

CaMKK β : Quinasa dependiente de calmodulina

CART: Transcrito relacionado con cocaína y anfetamina

CCK: Colecistoquinina

CD: Dieta control

CPT1A: Carnitina palmitoiltransferasa 1A

D-1 y D-2: Diestro 1 y 2

DHT: Dihidrotestosterona

DMN: Núcleo ventromedial

Dyn: Dinorfina

E: Estro

E2: Estradiol

EEAA: Aminoácidos excitatorios

EM: eminencia media

EOPs: Péptidos opioides endógenos

ER α y ER β : Receptor de estrógenos α y β

FFA: Ácidos grasos libres

FGF-21: Factor de crecimiento fibroblástico 21

FGFR: Receptor de la familia del factor de crecimiento fibroblástico

FSH: Hormona folículo estimulante

FSH-R: Receptor de FSH

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GABA_A y GABA_C: Receptores ionotrópicos de GABA

GABA_B: Receptores metabotrópicos de GABA

GAL: Galanina

GAL-R1, -R2, -R3: receptores de Galanina

GALP: Péptido similar a Galanina

GH: Hormona del crecimiento

GHS-R: Receptor secretagogo de GH

GLP-1: Péptido similar al glucagón tipo 1

GLP-1R: Receptor de GLP-1

Glu: Glutamato

GnIH: Hormona inhibidora de gonadotropinas

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GnRH-R: Receptor de GnRH

GNX: Gonadectomía

GPCR: Receptor de superficie acoplado a proteína G

Gpr54: Receptor de kisspeptina

GTT: Test de tolerancia a la glucosa

HFD: Dieta alta en grasa

HH: Hipogonadismo hipogonadotropo

HHG: Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal

icv: Intracerebroventricular

ip: Intraperitoneal

IR: Receptor de insulina

ITT: Test de tolerancia a la insulina

Kcal: Kilocalorías

KLB: Proteína β -Klotho

KO: *Knockout*

KOR: κ -receptor de opioides endógenos

Kp: Kisspeptina

LH: Hormona luteinizante

LHA: Área hipotalámica lateral

LH-R: receptor de LH

LKB1: Quinasa hepática B1

MC3-R y 4-R: Receptores de melanocortinas 3 y 4

MCH: Hormona concentradora de melanina

MO25: Proteína-25 de andamiaje de ratón

mPOA: Área preóptica medial

MSH: hormona estimuladora de melanocitos

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

NA: Noradrenalina

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada

NIRKO: *Knockout* neuronal del receptor de insulina

NK3R: Receptor de Neuroquinina B 3

NKA y NKB: Neuroquinina A y B

NL: *Normal Litter*/ normonutrición durante la lactancia

NO: Óxido nítrico

NPFF1R: Receptor de GnIH/RFRPs

NPY: Neuropeptido Y

NTS: Núcleo del tracto solitario

ob/ob: Ratones deficientes en leptina

Ob-R: Receptor de leptina	RIA: Radioinmunoensayo
ORX: Orquidectomía	SBP: Separación balano prepucial
OVX: Ovariectomía	SEM: Error estándar de la media
OX: Oxitocina	SF1: Factor esteroideogénico 1
OXR-1 y -2: Receptores de orexinas 1 y 2	SHBG: Globulina de unión a hormonas sexuales
OXM: Oxintomodulina	SIRT1: Sirtuina 1
P: Progesterona	SL: <i>Small Litter</i> / Sobrenutrición durante la lactancia
pb: Pares de bases	SNC: Sistema nervioso central
PCOS: Síndrome de ovario poliquístico	SNS: Sistema nervioso simpático
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	SON: Núcleo supraóptico
PFA: Área perifornical	T: Testosterona
PND: Día postnatal	T2DM: Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
POA: Área preóptica	TSH: Hormona estimulante del tiroides
POMC: Pro-opiomelanocortina	UCP-1: Proteína desacoplante 1 o termogenina
PP2C α : Proteína fosfatasa 2C α	U.I.: Unidad internacional
PR-A, PR-B: Receptores de progesterona A y B	VMN: Núcleo ventromedial
PSNS: Sistema nervioso parasimpático	Y1, Y2, Y4, Y5: receptores de NPY 1, 2, 4 y 5
PT: Propionato de testosterona	WAT: Tejido adiposo blanco
PVN: Núcleo paraventricular	WT: <i>Wild type</i>
RFRPs: Péptidos relacionados RF-amida	β 3-AR: Receptor β -adrenérgico
RFRP-1 y RFRP-3: Péptido relacionado con los RF-amida tipo 1 y 3	β -END: β -endorfina

---INTRODUCCIÓN---

INTRODUCCIÓN

1. FUNCIÓN REPRODUCTORA

La reproducción es una función indispensable para la supervivencia de las especies, y está bajo el control de una red sofisticada de señales reguladoras, donde las señales neuronales, hormonales y ambientales cooperan para garantizar el correcto desarrollo del sistema reproductor durante las etapas tempranas de maduración y el mantenimiento de la función reproductora en la edad adulta. El control hormonal de la reproducción está dirigido por la acción integrada de las señales del llamado eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal (HHG) o eje gonadotrópico (8).

1.1. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL

La actividad de este sistema endocrino se basa en la interacción dinámica de tres elementos principales: 1) el hipotálamo, donde se localiza un grupo de neuronas que sintetizan y liberan, de manera pulsátil, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), 2) la hipófisis, donde se sintetizan y secretan gonadotropinas; hormona luteinizante (LH) y hormona folículo-estimulante (FSH), y 3) las gónadas; testículos y ovarios, responsables de la producción de gametos y la liberación de esteroides sexuales y distintas hormonas de naturaleza peptídica (9). Estos tres componentes del eje HHG están conectados mediante circuitos de retroalimentación (o *feedback*), tanto positiva como negativa (**Figura 1**). Además, otros factores, tanto endógenos como ambientales, participan en el control de este eje, lo que facilita su regulación

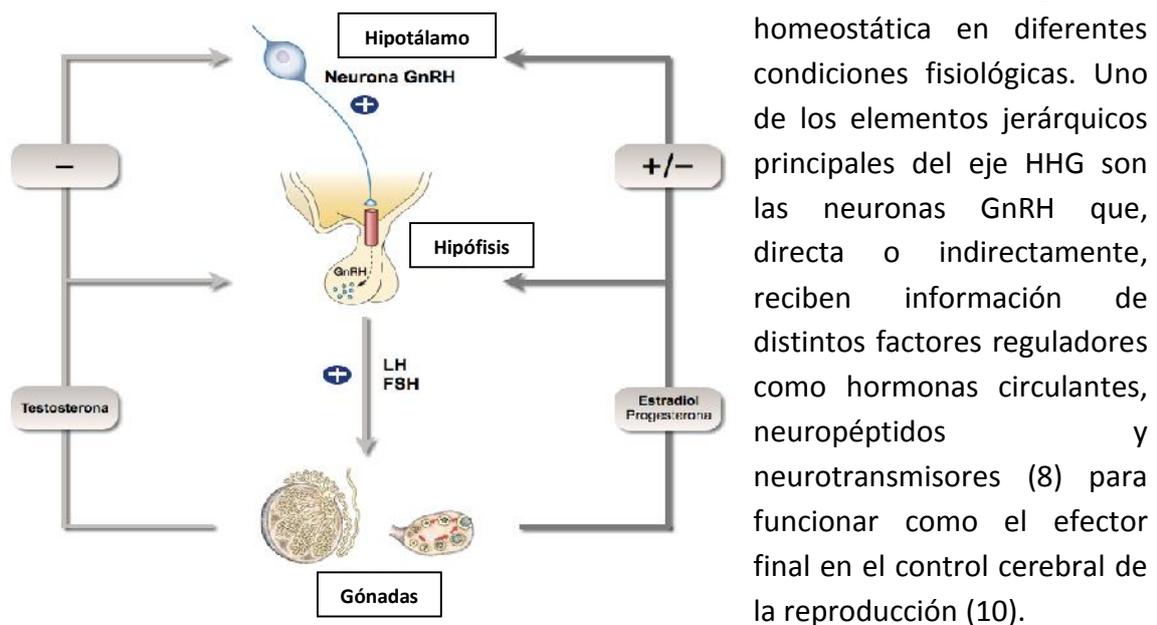


Figura 1: Representación esquemática del eje HHG. Modificado de Pinilla L. et al. *Physiological Reviews*, 2012 (11).

1.1.1. GnRH

GnRH es un decapeptido, compuesto por la secuencia aminoacídica pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, que fue identificado por primera vez en hipotálamos ovinos y porcinos en la década de los 70 (12, 13). Este neuropéptido se considera el regulador central de la cascada hormonal que controla la reproducción en un gran número de especies, incluidos los mamíferos (12).

Se han identificado tres variantes estructurales de GnRH en diversas especies de vertebrados: GnRH1, GnRH2 y GnRH3, las dos primeras variantes se encuentran en la mayoría de los vertebrados, mientras que GnRH3 ha sido identificada únicamente en peces teleósteos. GnRH1 es considerada como la variante hipotalámica en mamíferos capaz de estimular la secreción de gonadotropinas (10, 14). Para mayor simplicidad, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral nos referiremos a esta variante como GnRH.

Las acciones biológicas de GnRH se llevan a cabo tras su unión con el GnRH-R, un receptor de superficie acoplado a proteína G (GPCR), cuya expresión en la hipófisis está regulada por la propia GnRH o los esteroides gonadales, que aumentan antes del pico pre-ovulatorio de gonadotropinas (15).

Las neuronas GnRH son las únicas neuronas del sistema nervioso de mamíferos que se originan en la cresta neural a partir de las células progenitoras ubicadas en la placoda olfativa durante la embriogénesis temprana. Guiadas por el órgano vomeronasal, las neuronas GnRH migran desde la placoda olfatoria hasta el hipotálamo (16, 17). Este proceso justifica la distribución postnatal tan dispersa de las neuronas GnRH, que forman un continuo que se extiende a lo largo del hipotálamo anterior, especialmente en el área preóptica (POA), donde se localiza la población más abundante de estas neuronas en roedores. Desde allí, las neuronas GnRH proyectan sus axones a la eminencia media (EM) para liberar GnRH, en forma de pulsos altamente sincronizados, a la circulación portal hipofisaria y así controlar la liberación de gonadotropinas (**Figura 2**) (17, 18).

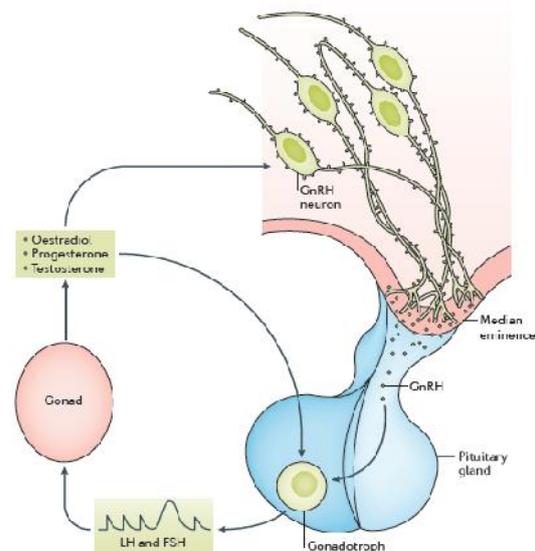


Figura 2: Representación esquemática de la distribución neuroanatómica y la función de las neuronas GnRH. Tomado de Herbison, A.E. Nat Rev Endocrinol, 2016 (10).

La secreción episódica de GnRH, que es necesaria para la estimulación adecuada de la liberación de gonadotropinas y, por lo tanto, para el correcto funcionamiento de la función gonadal, es el resultado de la interacción entre la naturaleza oscilatoria intrínseca de las propias neuronas GnRH y una gama amplia de excitadores e inhibidores aferentes que se integran en el denominado generador de pulsos de GnRH (19).

1.1.2. HIPÓFISIS

La hipófisis es una pequeña glándula alojada en la silla turca del hueso esfenoides y conectada con el hipotálamo a través del tallo hipofisario, mediante una zona de unión denominada EM. Desde una perspectiva fisiológica, se divide en dos partes bien diferenciadas: el lóbulo anterior o adenohipófisis y el lóbulo posterior o neurohipófisis (20).

La **neurohipófisis** está compuesta por la *pars nervosa*, la *pars infundibularis* y la EM. Las dos primeras partes comprenden el lóbulo posterior de la hipófisis. En esta región de la hipófisis se almacena y libera oxitocina (OX) y vasopresina (u hormona antiurética), ambas sintetizadas por neuronas hipotalámicas cuyos cuerpos celulares se localizan en los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN) del hipotálamo (20, 21).

La **adenohipófisis** está compuesta por la *pars distalis*, la *pars tuberalis* -estas dos partes en conjunto constituyen el lóbulo anterior-, y la *pars intermedia* (lóbulo intermedio), localizada entre el lóbulo anterior y posterior (20). Esta glándula está compuesta por varios tipos celulares, cuya actividad secretora está controlada por hormonas hipotalámicas. Entre estos, podemos destacar a la células gonadotropas, que sintetizan y liberan LH y FSH (ver sección "1.1.2.1. GONADOTROPINAS: LH Y FSH"); las células lactotropas, que secretan prolactina; las células somatotropas, que producen la hormona del crecimiento (GH); las células tirotropas, que sintetizan la hormona estimulante del tiroides (TSH); y las células corticotropas, que sintetizan una proteína precursora llamada pro-opiomelanocortina (POMC) para dar lugar, por ruptura proteolítica de esta proteína, a varios péptidos biológicamente activos, entre los que destaca la hormona estimulante de la corteza adrenal (ACTH), la β -endorfina (β -END) y la hormona estimuladora de melanocitos (MSH) (20).

1.1.2.1. GONADOTROPINAS: LH Y FSH

Las gonadotropinas, LH y FSH, son hormonas glicoproteicas constituidas por dos subunidades asociadas de manera no covalente. Una subunidad α , que posee un tamaño de 92 aminoácidos (aa) y es común a ambas gonadotropinas, y una subunidad

β , con un tamaño de 121 aa para el caso de LH y 118 aa en FSH, siendo esta última la subunidad que le confiere su actividad biológica específica (22).

Ambas ejercen sus efectos mediante su unión a receptores de superficie acoplados a la proteína G, denominados receptor de LH (LH-R) y receptor de FSH (FSH-R), los cuales se expresan fundamentalmente en las gónadas. En el ovario, el LH-R se expresa en células de la teca, células lúteas y células intersticiales, regulando acciones como la síntesis de hormonas esteroideas, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. En el testículo, LH-R se expresa en las células de Leydig donde estimula la síntesis de testosterona (T) (22). Por su parte, el FSH-R se expresa en el ovario, exclusivamente en las células de la granulosa. Su activación estimula la síntesis de hormonas de naturaleza proteica y contribuye al desarrollo folicular. Además, la FSH induce la expresión de aromatasa y, por ello, modula la síntesis de estrógenos ováricos. Por otro lado, en el testículo, FSH-R se expresa en las células de Sertoli, resultando imprescindible para la síntesis de hormonas de naturaleza proteica, como la proteína fijadora de andrógenos (ABP) (22).

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 de naturaleza proteica y esteroidea (hormonogénesis), las cuales regulan la producción de dichos gametos, el crecimiento de los genitales internos y externos, y la expresión de los caracteres sexuales secundarios.

1.1.3.1. TESTÍCULOS

Los testículos producen gametos mediante un proceso denominado espermatogénesis y hormonas sexuales masculinas (principalmente, andrógenos). Ambas funciones tienen lugar en dos compartimentos (**Figura 3**), morfológicamente y funcionalmente separados entre sí. Estos son el compartimento tubular, que es el espacio ocupado por los túbulos seminíferos, y el espacio intersticial, localizado entre los túbulos seminíferos (23)

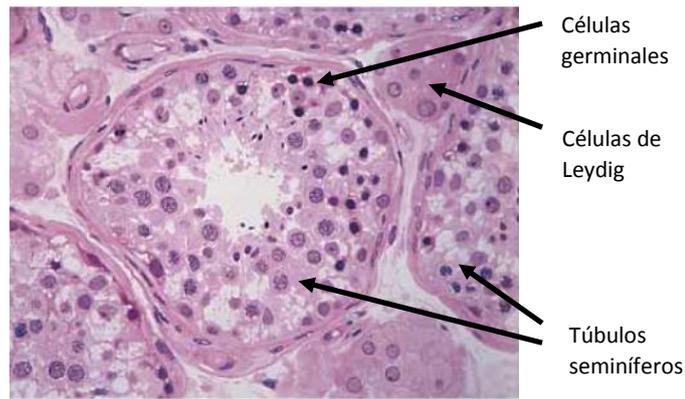


Figura 3: Corte histológico testicular donde se aprecian los compartimentos tubular e intersticial Modificado de Saladin, S. Anatomía y Fisiología, 2013 (24).

El espacio intersticial contiene células de Leydig, macrófagos, linfocitos, células fibroblásticas del estroma y células endoteliales (23). El principal tipo celular presente en este compartimento son las células de Leydig (**Figura 3**) que poseen LH-Rs, cuya función principal es la síntesis de T (25). La T actúa sobre el propio testículo, estimulando la espermatogénesis, mientras que una fracción sustancial se secreta a la circulación sistémica, donde se transporta de forma libre o unida a proteínas, como albúmina o globulinas del tipo globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) (26). El efecto androgénico de la T en los tejidos periféricos diana requiere su metabolización a dihidrotestosterona (DHT), forma biológicamente activa de la T en estas estructuras. Sin embargo, las acciones a nivel central se llevan a cabo como tal o tras su aromatización a estradiol (E2).

El compartimento tubular es donde tiene lugar la espermatogénesis y está formado por los túbulos seminíferos constituidos fundamentalmente por células germinales y células de Sertoli (**Figura 3**). Las células germinales son convertidas en espermatozoides maduros gracias a las acciones de la FSH y la T. Las células de Sertoli proporcionan soporte celular a las células germinales y son estimuladas por la FSH, promoviendo su proliferación e induciendo la síntesis de numerosas proteínas (como ABP, activinas e inhibinas) que afectan a la regulación de la espermatogénesis y a la síntesis de la propia FSH (23, 27).

1.1.3.2. OVARIOS

Los ovarios producen gametos femeninos, mediante un proceso denominado oogénesis, y sintetizan y secretan hormonas de naturaleza esteroidea y peptídica esenciales para la regulación del eje reproductor en la hembra (28). En el proceso de la oogénesis, se producen oocitos secundarios tras completar la meiosis-1, a partir de células germinales indiferenciadas (llamadas oogonias). Posteriormente, y una vez son

ovulados, éstos se convierten en óvulos si ocurre la fecundación, tras completar la meiosis-2 (**Figura 4**) (29).

El proceso de maduración de los oocitos ocurre dentro de unas estructuras denominadas folículos. Al comienzo del desarrollo folicular, el oocito está rodeado por una capa de células de la granulosa, constituyendo el folículo primordial. Las células de la granulosa de este folículo comienzan a dividirse para dar lugar al folículo primario. A continuación, se forma el folículo secundario, caracterizado por una proliferación de células de la granulosa que se acumulan en capas concéntricas, rodeando al oocito y que inician la producción de estrógenos, principalmente 17β -estradiol. Adicionalmente, rodeando a esta estructura aparece una capa de células de origen mesodérmico que constituyen la teca interna. Posteriormente, el crecimiento del folículo da lugar al folículo terciario o antral, donde aparece una capa adicional de células de la teca que recibe el nombre de la teca externa, y tiene lugar la aparición de una cavidad central denominada antro folicular. Finalmente, el folículo terciario se transforma en un folículo preovulatorio o folículo De Graaf, donde el oocito ocupa una posición excéntrica rodeado de dos o tres capas de células granulosas que dan lugar a la corona radiada. Tras la ruptura de este folículo, se produce la liberación del oocito junto con la corona radiada, en un proceso denominado ovulación. Tras la ovulación, las células foliculares experimentan cambios morfológicos, y junto con los vasos y las células tecales dan lugar al cuerpo lúteo, responsable de la secreción principalmente de progesterona (P) y E2 (29-31).

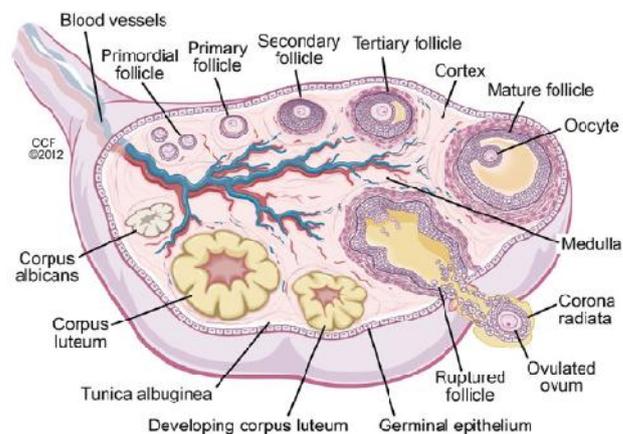


Figura 4: Representación anatómica de la estructura del ovario, donde se aprecia todo el proceso de oogénesis. Tomado de Falcone T. & Hurd W. Clinical reproductive medicine and survey, 2013 (30).

El proceso de ovulación se repite en la mujer de forma cíclica durante su periodo fértil, cada 28 días aproximadamente, mientras que en la rata hembra, presenta una duración de 4-5 días. Los cambios cíclicos en los niveles de esteroides gonadales circulantes determinan cambios cíclicos en el epitelio vaginal. De este modo, el ciclo

estral de las ratas se caracteriza por las siguientes fases: diestro 1 o metestro, diestro 2, proestro y estro. La ovulación se produce en fase de estro y es desencadenada por el pico preovulatorio de liberación de gonadotropinas que tiene lugar en la tarde del proestro. En ratonas, la duración de los ciclos estrales varía de 4 a 6 días (32, 33).

La función ovárica está controlada principalmente por las hormonas LH y FSH, aunque también intervienen en el proceso de crecimiento folicular, de forma paracrina, los estrógenos y la P. Éstos, además, ejercen efectos de retroalimentación negativa y positiva en la adenohipófisis y en el hipotálamo según la fase del ciclo ovárico. Además, existen otras hormonas, como la activina y la inhibina, secretadas por las células de la granulosa del cuerpo lúteo, que también ejercen efectos de retroalimentación positiva y negativa, respectivamente, sobre la liberación de FSH por la adenohipófisis (29, 33, 34).

1.1.3.3. ESTEROIDES GONADALES

El proceso bioquímico mediante el cual se sintetizan las hormonas de naturaleza esteroidea se denomina esteroidogénesis. En el testículo, la esteroidogénesis se inicia en las células de Leydig, por la activación del receptor de LH, induciendo la síntesis de andrógenos -principalmente T y, en menor medida, DHT y androstendiona-. Posteriormente, esta T puede ser convertida a estrógenos por las células de Sertoli, gracias a la acción de la FSH, probablemente, proceso que se piensa que tiene un papel potencial en el proceso de conversión de espermátidas en espermatozoides. En el ovario, los lugares de producción de esteroides son, fundamentalmente, las células de la granulosa, las células de la teca y las células del cuerpo lúteo. Las células de la teca producen andrógenos, principalmente T y androstendiona, así como P. Las células de la granulosa, durante la fase folicular del ciclo ovárico, aromatizan los andrógenos a estrógenos (E2 y estrona), y las células del cuerpo lúteo sintetizan progesterona tras la luteinización del folículo que ocurre en respuesta a la ovulación y del que es responsable la LH. El más importante y potente de los estrógenos secretados por el ovario es el 17 β -estradiol, aunque también se secretan pequeñas cantidades de estrona. Ésta última, si bien no juega un papel importante durante el ciclo ovárico, se convierte, sin embargo, en el estrógeno dominante a partir de la menopausia. Al igual que sucede en machos, el proceso de síntesis de esteroides gonadales femeninos, es dependiente de la presencia de LH y FSH (29, 34).

Los esteroides gonadales se sintetizan a partir del colesterol, que puede derivar fundamentalmente de tres fuentes: el colesterol de lipoproteínas plasmáticas, de la síntesis *de novo* que se produce en el interior de las gónadas y del que se libera a partir de ésteres de colesterol que se almacenan en gotas lipídicas (34).

Los esteroides gonadales ejercen sus acciones en los tejidos diana mediante su unión a receptores específicos intracelulares ya que, gracias a su naturaleza lipofílica penetran y difunden con facilidad dentro de la célula (34). No obstante, también existen evidencias sólidas sobre la existencia de receptores de membrana para algunas de estas hormonas gonadales de naturaleza esteroidea (35).

Todas estas hormonas son sintetizadas y secretadas en respuesta a estímulos hormonales que llegan desde la hipófisis, cerrando el eje HHG mediante circuitos de retroalimentación negativa (en machos y hembras), y positiva (sólo en hembras), que influirán en la síntesis y secreción de las hormonas hipotalámicas e hipofisarias implicadas en la regulación del eje reproductor.

1.2. REGULACIÓN DEL EJE HHG

Sobre el eje reproductor intervienen distintas señales de origen central y periférico que van a actuar modulando la actividad de las neuronas GnRH, que son consideradas el elemento jerárquico clave en el control neuroendocrino de la reproducción y efector final en el control cerebral de la función reproductora.

1.2.1. REGULADORES CENTRALES DEL EJE HHG

A nivel central, existe una red compleja de neurotransmisores y neuropéptidos con capacidad para estimular o inhibir la actividad secretora de las neuronas GnRH. Entre estas señales, destacamos las siguientes (11):

1.2.1.1. SEÑALES EXCITATORIAS

✓ **Kisspeptinas:** debido a que las kisspeptinas han demostrado ser especialmente relevantes en el control central de la función reproductora, y por su especial interés en el desarrollo de esta Tesis, éstas se describen con más detalle en la sección 1.3. (PAPEL DE LAS KISSPEPTINAS EN EL CONTROL DEL EJE HHG).

✓ **Glutamato:** es el aa excitatorio más relevante en el control de la reproducción a nivel hipotalámico, debido, en parte, a que las neuronas GnRH reciben múltiples proyecciones de neuronas glutamatérgicas. Sus acciones se llevan a cabo gracias a la unión del glutamato a dos tipos de receptores: ionotrópicos (canales iónicos específicos) y, en menor grado, metabotrópicos (acoplados a proteínas G), ambos ampliamente distribuidos por el hipotálamo. El glutamato está ligado a la secreción de GnRH mediante su unión a receptores de tipo ionotrópico, cuya expresión se ha descrito en las terminaciones axónicas de las neuronas GnRH localizadas en la EM (36, 37). Además, datos obtenidos *in vivo* indican que agonistas y antagonistas de los

receptores ionotrópicos son capaces de aumentar o reducir, respectivamente, la secreción pulsátil de GnRH/LH, tanto en ratas macho como hembra (38, 39).

Adicionalmente, que este aa podría actuar como mediador de los efectos que ejercen los esteroides gonadales sobre la secreción de GnRH. En este sentido, se han identificado poblaciones neuronales que expresan receptores ionotrópicos y receptores de hormonas esteroideas en varios núcleos hipotalámicos implicados en el control de la secreción de GnRH (40).

✓ **Neuroquinina B (NKB):** es un miembro de la familia de las taquiquininas que se co-expresa, junto con kisspeptinas y dinorfina, en una subpoblación de neuronas Kiss1 localizadas en el núcleo arcuato (ARC), denominadas neuronas KNDy (ver en detalle en la sección 1.3. KISSPEPTINAS) (41).

NKB es un neuropéptido de 10 aa codificado por el gen *TAC3* en humanos y *Tac2* en roedores y que ejerce sus acciones a través de la interacción con su receptor, denominado NK3R. NK3R es codificado por el gen *TACR3* en humanos y *Tacr3* en roedores (41). Dada la amplia distribución cerebral del sistema NKB/NK3R, se ha sugerido la participación de este sistema en el control nervioso de múltiples funciones, como la modulación de la corteza motora y la regulación de la función reproductora (42). En este sentido, se ha detectado expresión de NK3R en los axones de neuronas GnRH, apoyando la hipótesis de un posible efecto directo de NKB sobre estas neuronas (43). Sin embargo, datos recientes sugieren que las acciones de NKB sobre la actividad secretora de las neuronas GnRH están mediadas a través de otros intermediarios (44). A pesar de los efectos variables de NKB sobre la secreción de LH, datos obtenidos en diferentes especies, como rata y oveja, señalan un efecto estimulador de NKB sobre la secreción de GnRH/LH (44, 45). Además, otro estudio ha sugerido la participación del sistema NKB/NK3R en la regulación del eje reproductor en humanos tras la identificación de mutaciones inactivantes en los genes *TAC3/TACR3* en casos de hipogonadismo hipogonadotropo (HH) (46). Además de NKB, evidencias recientes sugieren que otros miembros la familia de las taquiquininas, como sustancia P y Neuroquinina A (NKA), participan igualmente en la regulación de la secreción de GnRH (41).

✓ **Catecolaminas:** la señalización catecolaminérgica, a través de los receptores adrenérgicos α_1 y β , desempeña un papel relevante en la activación directa de las neuronas GnRH y en la modulación de la liberación pulsátil de GnRH/LH (47, 48). La primera evidencia que sugirió el control catecolaminérgico de la secreción de GnRH se obtuvo al observar que la eliminación de las neuronas noradrenérgicas en el tronco encefálico, así como el bloqueo de los receptores α -adrenérgicos, provocaba la disminución de la secreción pulsátil de LH. Además, se identificó que estas neuronas emitían proyecciones hacia las neuronas GnRH, sugiriendo un efecto directo (49).

Asimismo, se demostró la presencia de receptores α -adrenérgicos en las neuronas GnRH y en una línea celular neuronal de GnRH, denominada GT1-7 (50). Concretamente, los datos publicados en la literatura sugieren que la adrenalina parece estar implicada en la estimulación de la liberación pulsátil y preovulatoria de GnRH, mientras que la noradrenalina (NA) podría estar más relacionada con la frecuencia de pulsos de LH (51).

✓ **Galanina (GAL):** es un neuropéptido de 29 aa que media sus efectos a través de 3 tipos de receptores acoplados a proteínas G, GAL-R1, -R2 y -R3 y se ha descrito que juega un papel importante en la regulación de la liberación de GnRH (52). En este sentido, estudios *in vivo* y análisis de hibridación *in situ* han confirmado que GAL estimula la secreción de GnRH (53, 54). En varias especies (que incluyen rata, ratón y oveja), se ha descrito que GAL puede actuar en una pequeña población de neuronas GnRH a través del receptor GAL-R1, estando sus acciones influenciadas por los niveles circulantes de esteroides gonadales (55, 56).

✓ **Péptido similar a Galanina (GALP):** es un péptido hipotalámico de acción similar a GAL. A pesar de la secuencia común de aa compartida por GAL y GALP, ambos derivan de distintos genes (57). En mamíferos, GALP se expresa en el ARC y se ha descrito que su administración a nivel central incrementa la liberación de LH en ratas macho (58, 59). Adicionalmente, este péptido está regulado positivamente por diversos factores relacionados con el metabolismo energético, como leptina e insulina, datos que sugieren la implicación de GALP en el control integrado del metabolismo y la reproducción (57, 60).

✓ **Óxido nítrico (NO):** es un neurotransmisor gaseoso sintetizado en el organismo por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Estudios farmacológicos demuestran que el NO actúa como modulador en el control neuroendocrino de la reproducción y en la regulación de la actividad de las neuronas GnRH (61, 62). Se ha demostrado que las neuronas Kiss1 actúan directamente sobre las neuronas productoras de NO en el POA para promover la secreción preovulatoria de LH mediante el incremento en la síntesis de NOS (63). Además, la infusión de un inhibidor de esta enzima, en POA o EM, provoca la disrupción de la ciclicidad estral en ratas (64). Particularmente, el efecto de NO en la neurosecreción de GnRH y la función reproductora parece ser doble, con influencias excitatorias e inhibitorias (3). En este contexto, también se ha demostrado que NO suprime la activación neuronal de GnRH y frena la secreción de LH basal y la inducida por kisspeptina *in vivo* (63, 65). Para explicar esta contradicción se ha sugerido que el NO podría tener efectos inhibitorios sobre la secreción de GnRH en las fases del ciclo ovárico dominadas por la retroalimentación negativa del E2, mientras que, al mismo tiempo, el NO desempeñaría un papel estimulador sobre los

mecanismos que conducen a la generación del pico preovulatorio de GnRH/gonadotropinas (63).

✓ **Hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH):** es un neuropéptido derivado del procesamiento proteolítico del gen *POMC* que pertenece a la familia de las melanocortinas, junto con ACTH y β y γ -MSH (66, 67). *POMC* se expresa principalmente en las células corticotropas y melanotropas de la hipófisis, así como en distintas partes del hipotálamo, y en tejidos periféricos, como en la piel. En el cerebro, α -MSH actúa principalmente a través de los receptores de melanocortinas 3 y 4 (MC3-R y MC4-R, respectivamente) (68, 69). En detalle, la localización de MC3-R se limita principalmente al hipotálamo, y se expresa de manera abundante en el núcleo ARC, lugar donde se encuentra también la principal población de neuronas POMC (70). En cuanto al MC4-R, sólo se expresa en el sistema nervioso central (SNC), donde está ampliamente distribuido (71). Este neuropéptido está implicado en el control del eje reproductor, como avalan datos que demuestran que las neuronas GnRH expresan *MC3-R/MC4-R*, sugiriendo un efecto directo en el control de la secreción de GnRH. Esto se ha visto igualmente demostrado en estudios electrofisiológicos que muestran un incremento en la actividad eléctrica de neuronas GnRH tras la activación postsináptica de MC3-R y MC4-R (72). Adicionalmente, estudios farmacológicos mostraron que la administración de α -MSH induce un incremento en la secreción de LH en diferentes especies de mamíferos (73). Además se ha demostrado que tanto la administración central del agonista de MC3-/4-R como de agonistas específicos de estos receptores imita el efecto estimulador de α -MSH en la liberación de LH, logrando un incremento en la secreción de esta gonadotropina, siendo este efecto más prominente en el caso de la activación de MC4-R (72, 74, 75).

1.2.1.2. SEÑALES INHIBIDORAS

✓ **Ácido γ -aminobutírico (GABA):** es el neurotransmisor inhibitorio más abundante del cerebro de mamíferos y media sus acciones a través de su interacción con dos tipos de receptores, ionotrópicos (GABA_A y GABA_C) y metabotrópicos (GABA_B) (76). Estudios electrofisiológicos han demostrado que las neuronas GnRH de ratones expresan receptores funcionales GABA_A y GABA_B, lo que subraya la importancia de este neurotransmisor en el control de la actividad de estas neuronas GnRH (77, 78). En este sentido, se han descrito tanto acciones directas como indirectas de este neurotransmisor sobre la secreción de GnRH (79, 80). Mientras que estudios *in vivo* han mostrado efectos inhibitorios consistentes de GABA sobre la secreción de GnRH/LH, estudios *in vitro* han documentado tanto efectos inhibitorios como excitatorios (65, 81).

✓ **Opioides endógenos (EOPs):** estos péptidos son inhibidores fisiológicos de la secreción de GnRH/LH y se clasifican en tres grupos: encefalinas, β -END y dinorfinas (Dyn). Estos ejercen sus acciones sobre el SNC interactuando con tres tipos de receptores, μ , κ y δ . En línea con esto, β -END y Dyn actúan a través del μ -receptor y κ -receptor (KOR), respectivamente (82), mientras que las encefalinas activan el receptor δ (83). En este contexto, el sistema β -END/ μ -receptor tiene un papel importante en el control del pico de GnRH/LH, mientras que el sistema Dyn/ κ -receptor ha demostrado tener un efecto inhibitorio sobre la secreción de GnRH, mediando los efectos de la retroalimentación negativa ejercida por la P sobre la frecuencia de pulsos de LH (84, 85). Por otro lado, se ha detectado expresión de KOR tanto en las neuronas KNDy como en las neuronas GnRH, lo cual sugiere que los efectos inhibitorios de la Dyn sobre la secreción pulsátil de GnRH pueden ocurrir tanto de manera directa, como de forma indirecta, a través de la inhibición de las neuronas KNDy (86). El papel de estas neuronas KNDy será descrito con más detalle en las secciones 1.3. KISSPEPTINAS y 1.4. PUBERTAD.

✓ **NPY:** es un péptido de 36 aa altamente conservado entre especies y uno de los neuropéptidos más abundantes del SCN de mamíferos. Está considerado como un modulador esencial en el control de la función reproductora. Se expresa mayoritariamente en el núcleo ARC y en el tronco encefálico (donde co-localiza con NA (49)) y su expresión está regulada, en parte, por los estrógenos. Los efectos de NPY están mediados a través de cinco tipos de receptores acoplados a proteínas G. Entre estos, se ha descrito que los receptores Y1 e Y5 podrían estar implicados en las acciones de NPY sobre el eje HHG (72, 87). El efecto inhibitorio de NPY en la secreción de GnRH/LH se ha demostrado tanto en machos como en hembras. La administración central de NPY en animales con bajos niveles de esteroides circulantes inhibe la secreción pulsátil de LH, probablemente a través de la supresión hipotalámica de GnRH (88). En machos, el tratamiento crónico con NPY en el ventrículo lateral inhibe el eje HHG (89). NPY también tiene un papel crucial en los mecanismos implicados en la regulación de la actividad neuronal de GnRH por factores metabólicos. Esta función se describirá con más detalle en la sección 2.1.1. REGULADORES CENTRALES DEL BALANCE ENERGÉTICO.

✓ **RFRP (Péptidos relacionados RF-amida):** la familia de péptidos hipotalámicos GnIH (hormona inhibidora de gonadotropinas)/RFRPs tiene la capacidad de inhibir directa o indirectamente la liberación de gonadotropinas hipofisarias. Las neuronas RFRP producen dos tipos de péptidos, RFRP1 y RFRP3, que ejercen sus acciones mediante su unión a un único receptor de membrana acoplado a proteínas G, denominado NPFF1R, y que se expresa en neuronas GnRH (90, 91). La administración central de RFRP3 reduce los niveles de LH en rata (92). Sin embargo, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la ausencia de NPFF1R no

condiciona la fertilidad en ratones. En este sentido, las hembras con deficiencia congénita de NPFF1R mantienen conservada tanto la ciclicidad estral como la amplitud del pico preovulatorio 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 preovulatoria de LH desencadenante de la ovulación, sugiriendo la existencia de otros mecanismos de compensación en respuesta a la eliminación selectiva de NPFF1R (93).

1.2.2. REGULADORES PERIFÉRICOS DEL EJE HHG

El eje reproductor también se encuentra regulado de manera precisa por la acción de diversas señales de tipo periférico que van a actuar, de manera coordinada, con las señales de origen central para modular la función reproductora.

1.2.2.1. FACTORES GONADALES

1.2.2.1.1. ESTEROIDES GONADALES

Los esteroides gonadales (andrógenos, estrógenos y progesterona) son producidos principalmente en las gónadas, e interactúan con sus receptores específicos en el SNC para llevar a cabo numerosas acciones, destacando su papel en el control de eje HHG. Participan, entre otras funciones, en la regulación de múltiples circuitos neuronales, la regulación de la expresión de un gran número de neurotransmisores, la modulación de la plasticidad neuronal y el desarrollo cerebral (94, 95).

La mayoría de las acciones de los esteroides gonadales están mediadas por su interacción con receptores intranucleares, como en el caso de los receptores de andrógenos (AR), los receptores progesterona A y B (PR-A y PR-B) y los receptores de estrógenos α y β (ER α y ER β). Adicionalmente, otra parte de los efectos de los estrógenos se llevan a cabo tras su interacción con canales iónicos y receptores acoplados a proteínas G localizados en la membrana plasmática, activando cascadas de señalización intracelular (35, 96). Los ERs están ampliamente distribuidos en el SNC y la hipófisis, concretamente en el núcleo ARC y el área anteroventral periventricular (AVPV), ambos implicados en el control de la función reproductora y en el control de la homeostasis energética (35, 96, 97).

Se ha descrito que tanto los andrógenos y como estrógenos median sus efectos de retroalimentación negativa sobre la secreción de LH y FSH a través de su interacción con ARs y ERs en el núcleo ARC. Por el contrario, los estrógenos participan en la retroalimentación positiva que éstos ejercen sobre la liberación de gonadotropinas en hembras, mediante su interacción con ERs en el AVPV (98, 99). Los estrógenos actúan

directamente sobre las neuronas GnRH a través de receptores ER β , único subtipo de ER expresado en estas neuronas, mientras que la mayor parte de los efectos de los estrógenos sobre las neuronas GnRH parecen llevarse a cabo a través de interneuronas que expresan tanto receptores ER α como ER β (97, 99). Evidencias genéticas y farmacológicas han demostrado que los efectos de retroalimentación tanto positiva como negativa de los estrógenos sobre la liberación de LH son mediados, principalmente, por ER α (99, 100).

1.2.2.1.2. PÉPTIDOS GONADALES

Los péptidos gonadales son hormonas que modulan la secreción de gonadotropinas a nivel hipofisario, además de ejercer acciones paracrinas sobre las gónadas. Se conoce la existencia de tres tipos de péptidos: activinas, inhibinas y folistatinas.

Las activinas son péptidos producidos en diversos tejidos pero, especialmente, en el ovario y la hipófisis. Se han identificado tres tipos de activinas: A, B y AB, y todas son capaces de estimular directamente la secreción hipofisaria de FSH, siendo especialmente destacable la función de las activinas producidas en la hipófisis, que actúan de forma paracrina sobre las células gonadotropas (101, 102).

Las inhibinas son proteínas producidas por las células de Sertoli en los testículos y por las células de la granulosa en los ovarios. Se han identificado dos tipos de inhibinas: A y B, ambas son proteínas herodiméricas que pueden inhibir selectivamente la secreción de FSH en las células gonadotropas hipofisarias (102, 103).

La folistatina es un péptido sintetizado en varios tejidos, incluyendo las gónadas y la hipófisis, que produce la inhibición de la secreción de FSH de manera indirecta debido a su capacidad para unirse a las activinas, bloqueando el efecto estimulador de éstas sobre las células gonadotropas (102, 104).

1.2.2.2. FACTORES METABÓLICOS

El eje reproductor es altamente sensible al estado metabólico y energético del organismo. Los diferentes factores metabólicos que van a interactuar con el eje HHG modulando la capacidad reproductora se describirán con detalle en la sección 3. CONTROL METABÓLICO DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA.

1.3. PAPEL DE LAS KISSPEPTINAS EN EL CONTROL DEL EJE HHG

Las kisspeptinas (Kp) son una familia de péptidos relacionados estructuralmente, y codificados por el gen *KISS1* en humanos y *Kiss1* en ratones (11, 105). Estas son

derivadas del procesamiento proteolítico diferencial de un único precursor constituido por 145 aa, la prepro-kisspeptina, que genera las Kp biológicamente activas: Kp-54 en humanos o Kp-52 en roedores, Kp-14, Kp-13 y Kp-10, siendo este último el fragmento más pequeño con actividad biológica (106, 107). Todas comparten una misma región C-terminal que contiene un motivo Arg-Phe-NH₂ característico de la familia peptídica de las RF-amidas (108). Las Kp actúan a través de la activación de su receptor acoplado a proteínas G, denominado Gpr54, también llamado receptor de kisspeptina o Kiss1R (11, 109, 110).

Pese a que los elementos del sistema Kiss1/Gpr54 fueron identificados entre los años 1996 y 2001, la participación de este sistema en el control de la función reproductora no se puso de manifiesto hasta finales de 2003, cuando se documentaron la presencia de deleciones y mutaciones inactivantes para el gen *GPR54* en pacientes con HH, una condición de impuberismo e infertilidad de origen central (111, 112). Esta forma de hipogonadismo central se observó igualmente en ratones con inactivación del gen *Gpr54* o *Kiss1* (111, 113, 114). Esta combinación de estudios genéticos (humanos) y genómicos funcionales (ratones) ponía de manifiesto la relevancia fisiológica y los mecanismos subyacentes de las acciones reproductivas de las Kp.

La distribución del sistema Kiss1/Gpr54 se ha estudiado en gran diversidad de especies y se encuentra íntimamente relacionada con los centros neuroendocrinos reguladores de la función reproductora. Estudios neuroanatómicos realizados en roedores han identificado dos poblaciones prominentes de neuronas Kiss1 en el hipotálamo (115, 116), una localizada en el núcleo ARC y otra en el núcleo AVPV (116, 117). Ambas poblaciones son sexualmente dimórficas y funcionalmente diferentes. Este dimorfismo sexual es especialmente evidente en el AVPV, donde el número de neuronas Kiss1 es marcadamente superior en hembras que en machos (118). Dentro del núcleo ARC la mayoría de neuronas Kiss1 co-expresan *NKB* y *Dyn*, motivo por el que se han denominado neuronas KNDy (41).

Aunque la localización hipotalámica de las neuronas Kiss1 es coherente con su papel como regulador neuroendocrino de la función reproductora, las poblaciones de neuronas Kiss1 de los núcleos ARC y AVPV muestran diferencias neuroanatómicas en sus proyecciones hacia las neuronas GnRH. En este sentido, los datos publicados hasta la fecha demuestran que la mayor parte de las neuronas Kiss1 del núcleo AVPV proyectan sus axones hacia el POA, donde están localizados la mayor parte de los cuerpos celulares de las neuronas GnRH (119), mientras que solo una pequeña proporción de neuronas Kiss1 del núcleo ARC parece proyectar directamente hacia las somas de las neuronas GnRH localizadas en el POA (120). No obstante, estudios posteriores han identificado proyecciones directas de las neuronas Kiss1 del ARC hacia los terminales axónicos de las neuronas GnRH localizados en la EM (121, 122). En línea con esto, se ha

demostrado la presencia de expresión del ARNm de *Gpr54* en el POA rostral así como en las neuronas GnRH (123), lo cual sugiere un efecto directo de ambas poblaciones de neuronas Kiss1 sobre el control de la actividad de las neuronas GnRH.

Poco después de la descripción del cuadro de HH como consecuencia de mutaciones inactivantes en *Gpr54* en humanos y ratones, se demostró el potente efecto estimulador de Kp-10 y Kp-54 sobre la secreción de LH en roedores de ambos sexos (124, 125). Asimismo, la administración a nivel central y sistémica de Kp induce un potente incremento en la secreción de gonadotropinas en mamíferos en diferentes etapas del desarrollo y estados fisiológicos (126-128). Estudios farmacológicos han demostrado que los patrones de respuesta de las gonadotropinas a Kp-10 son diferentes en términos de duración y sensibilidad. Así, mientras que en machos se detecta una respuesta rápida y potente en la secreción de LH en respuesta a la administración de Kp-10, el efecto de Kp-10 sobre FSH es más lento y de menor magnitud que en el caso de LH (129-131). Igualmente la sensibilidad a la administración de dosis bajas de Kp-10 es mucho mayor en el caso de la LH. Estas diferencias podrían estar justificadas por el hecho de que el patrón de secreción de FSH es más constitutivo que el de LH y que la secreción de FSH está regulada por las inhibinas (102).

Resultados experimentales obtenidos principalmente en roedores, ovejas y primates, han demostrado que las acciones estimuladoras de las Kp se llevan a cabo, fundamentalmente, a través de la activación de las neuronas GnRH en el hipotálamo. Se ha demostrado en roedores y monos, que los efectos de Kp sobre la secreción de LH desaparecen completamente tras el tratamiento con antagonistas de GnRH (129, 131, 132). En esta línea, la evidencia de un efecto directo de Kp sobre las neuronas GnRH proviene de la observación de que la administración de Kp induce la expresión de c-fos, como marcador de activación celular temprana, en neuronas GnRH de roedores (132, 133). Además, estudios en células GT1-7, donde se ha documentado la expresión del gen *Gpr54*, han demostrado un aumento en la secreción de GnRH tras la administración de Kp (134, 135). De otra parte, estudios en rata han demostrado que la infusión continua de antagonistas de Kp en el núcleo ARC suprime significativamente los pulsos de GnRH (136).

Como se describió previamente, esta población de neuronas del ARC co-expresan, además de Kisspeptinas, NKB y Dyn, planteándose la posibilidad de que estos tres péptidos puedan participar de manera conjunta en el control de la secreción pulsátil de GnRH. La hipótesis más aceptada, avalada por datos funcionales y de expresión, sugiere que NKB y Dyn podrían operar como modificadores positivos y negativos, respectivamente, de la liberación pulsátil de Kp en estas neuronas KNDy (**Figura 5**) (11, 117, 137).

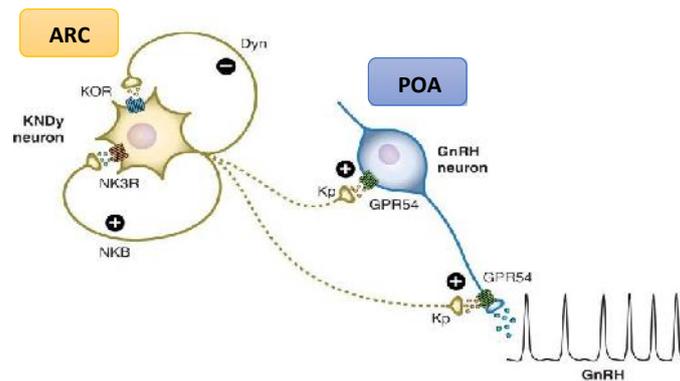


Figura 5: Modelo esquemático del papel de las neuronas KNDy en el control de la secreción pulsátil de GnRH. KOR (receptor- κ de opioides), receptor de Dyn; NK3R, receptor de NKB; GPR54, receptor de Kp. Tomado de Pinilla, L et al. *Physiological Reviews*, 2012 (11).

Distintos estudios han sugerido la participación de las neuronas *Kiss1* del núcleo ARC y el AVPV como mediadores de los efectos del *feedback* negativo y positivo, respectivamente, de los esteroides gonadales sobre la liberación de gonadotropinas (**Figura 6**). Esto se basa, en parte, en la capacidad de ambas poblaciones hipotálamicas para responder a los estrógenos de manera contrapuesta. En este sentido, estudios llevados a cabo en diferentes especies de mamíferos demostraron un incremento en los niveles de expresión de *Kiss1* en el núcleo ARC, acompañado de un aumento de los niveles circulantes de gonadotropinas, tras gonadectomía en ambos sexos (138-140) y estos niveles se normalizaron al suplementar a los animales con esteroides sexuales (124). Estudios posteriores demostraron que $ER\alpha$ es el principal mediador de los efectos de retroalimentación negativa que los estrógenos ejercen sobre la expresión de *Kiss1* en el núcleo ARC (99, 138). Análisis comparativos han demostrado que el control que ejerce la T sobre la expresión de *Kiss1* en el núcleo ARC es mediado a través del AR y del $ER\alpha$, tras la aromatización de T a E2 (138).

De igual modo, se ha propuesto al sistema *Kiss1* como mediador de los efectos del *feedback* positivo de los estrógenos sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas. Se ha demostrado en roedores de ambos sexos, que la población de neuronas *Kiss1* del núcleo AVPV, responde a la eliminación de los esteroides gonadales disminuyendo los niveles de ARNm de *Kiss1*, los cuales vuelven a normalizarse tras el reemplazamiento con esteroides (138, 140). Estos hallazgos se ven reforzados tras la observación en ratas adultas cíclicas un aumento de la expresión del ARNm de *Kiss1* en el núcleo AVPV en la tarde del proestro, coincidiendo con el pico preovulatorio de LH (98, 141), proponiendo así que las neuronas *Kiss1* del núcleo AVPV están implicadas en la generación de pico preovulatorio de GnRH/LH a través mecanismos de retroalimentación positiva (**Figura 6**). Al igual que ocurría con la población de neuronas *Kiss1* de núcleo ARC, los estrógenos parecen ejercer su función sobre esta población del AVPV a través del $ER\alpha$. En este contexto, estudios farmacológicos en los que usaron

antagonistas del ER α produjeron un bloqueo del pico preovulatorio de LH y de la ovulación (142).

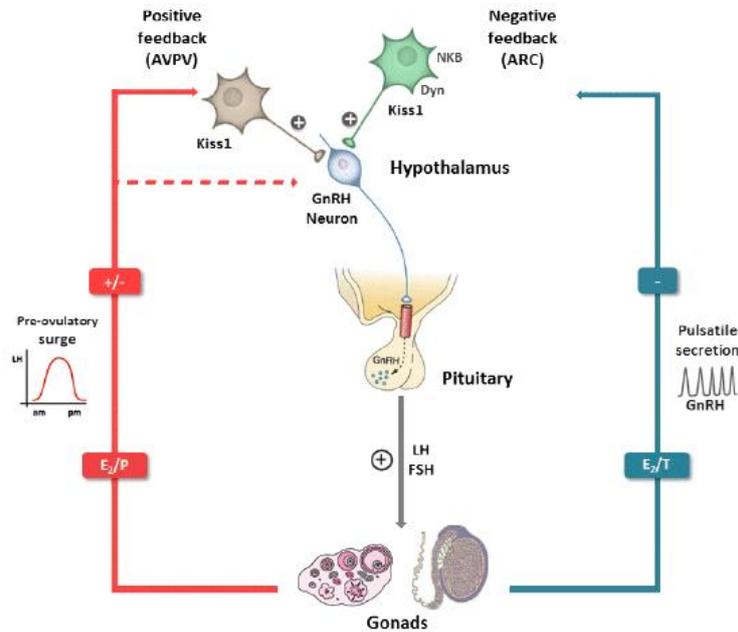


Figura 6: Representación esquemática de los efectos reguladores de los esteroides gonadales (E2, T y P) sobre el control de la actividad de las neuronas *Kiss1* en roedores. Los estrógenos (E2) ejercen una acción inhibitoria predominante en las neuronas KNDy del núcleo ARC, lo que contribuye al control del *feedback* negativo de GnRH. Por el contrario, los efectos estimuladores del E2 en la generación del pico preovulatorio de gonadotropinas (*feedback* positivo) están mediados por las neuronas *Kiss1* del núcleo AVPV. Tomado de Pinilla, L et al. *Physiological Reviews*, 2012 (11).

1.4. PUBERTAD

En mamíferos y otras especies, la pubertad se define como el periodo de transición clave de la etapa juvenil a la edad adulta durante el cual se alcanza la madurez sexual y, por lo tanto, la capacidad reproductiva (19, 143). Adicionalmente, en la pubertad se producen importantes cambios somáticos (crecimiento), de comportamiento y psicológicos.

El momento de llegada a la pubertad se encuentra bajo una fuerte determinación genética, pero está estrechamente controlado también por una gran cantidad de factores ambientales (144, 145). El éxito de este proceso del desarrollo se basa en la correcta sucesión de una secuencia de eventos que llevan a la activación del eje reproductor, completándose así la maduración gonadal y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios.

Durante las etapas infantil, juvenil y prepuberal, el eje HHG permanece parcialmente silente, especialmente en humanos, donde se detectan niveles circulantes muy bajos

de gonadotropinas y esteroides gonadales. Esto se debe a que la actividad secretora de las neuronas GnRH es baja e insuficiente para permitir el desarrollo gonadal. La maduración del eje HHG y el inicio posterior de la pubertad se caracterizan por un aumento en la actividad neuro-secretora de las neuronas GnRH que se traduce en un incremento gradual en la frecuencia y amplitud de pulsos de secreción de GnRH (10). Esto es debido, en parte, a una disminución en la sensibilidad al *feedback* negativo que hasta este momento estaban ejerciendo los esteroides gonadales. Tales cambios en el patrón de secreción de GnRH son el resultado de modificaciones en los *inputs* transinápticos y gliales de la red neuronal de GnRH, así como cambios plásticos en las propias neuronas GnRH (10, 146) (**Figura 7**).

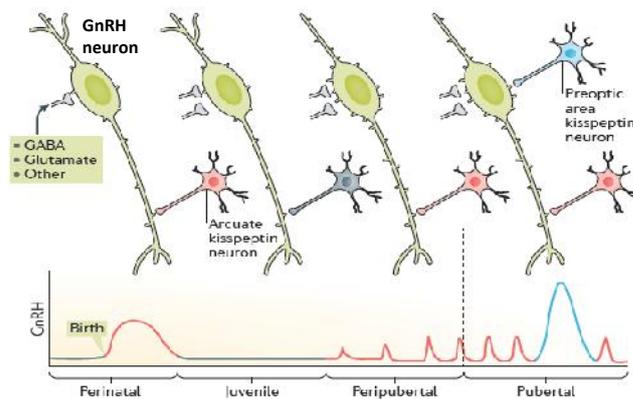


Figura 7: Desarrollo postnatal de la red neuronal de GnRH. Tomado de Herbison, A.E. Nat Rev Endocrinol, 2016 (10).

Todos estos cambios funcionales y estructurales de las neuronas GnRH parecen ser cruciales para el inicio y culminación de la pubertad y parecen responder al aumento combinado de *inputs* excitatorios y a la disminución en los *inputs* inhibitorios sobre las neuronas GnRH (143). El resultado final es una activación neta de la neurosecreción de GnRH, como factor inductor de la pubertad; lo que se conoce como hipótesis del “impulso central” (**Figura 8**) (147).

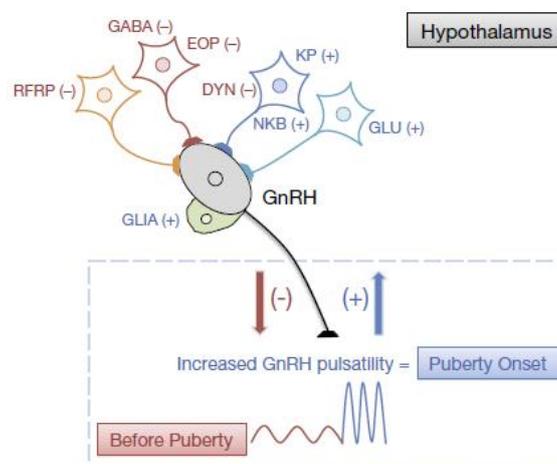


Figura 8: Representación esquemática de la hipótesis del “impulso central” de la pubertad. Tomado de Castellano, JM. Enciclopedia de la Reproducción, 2018 (147).

Una parte relevante del control excitatorio de la pubertad es proporcionada por neuronas que producen glutamato, kisspeptinas y NKB, principalmente. Mientras que el circuito inhibitorio que mantiene el freno para que la pubertad no ocurra antes de tiempo, depende, en gran medida, de neuronas que producen GABA, opioides endógenos (β -END y DYN, principalmente) y, eventualmente, péptidos RFRP. Además de los *inputs* neuronales, las células gliales, como los astrocitos y tanicitos, también participan en la regulación de las neuronas GnRH y la pubertad a través de dos mecanismos: la producción de factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas, y los cambios plásticos en los contactos y la adhesividad de las neuronas gliales a GnRH (148).

En relación al comportamiento durante el desarrollo puberal de las neuronas hipotalámicas Kiss1, estudios en roedores y primates han demostrado que durante este periodo, se incrementa el número de estas neuronas tanto el núcleo AVPV como en ARC, aumento que parece ser mayor en el núcleo AVPV de las hembras (11). Partiendo de observaciones iniciales, diferentes estudios han revelado la existencia de un patrón complejo responsable de la activación del sistema neuronal Kiss1 durante la transición puberal que parece involucrar los siguientes componentes principales: 1) un aumento en el tono de kisspeptina endógeno en el hipotálamo, suficiente *per se* para activar completamente el eje HHG; 2) una mejora de la eficiencia de señalización de Gpr54 en las neuronas GnRH; 3) una elevación en la sensibilidad a los efectos estimulantes de las kisspeptinas en la liberación de GnRH/LH; y 4) un incremento en el número de neuronas Kiss1 y sus proyecciones a las neuronas GnRH (149).

No obstante lo anterior, datos obtenidos en 2011 en ratones hembra, sugirieron que se puede lograr la maduración puberal incluso tras la eliminación congénita de las neuronas que expresan Kiss1 o Gpr54. Aunque estos resultados iniciales necesitarían ser confirmados, estas observaciones podrían ser indicativas de la activación de mecanismos compensatorios y/o la participación de otras poblaciones neuronales con un papel importante en la activación del eje HHG durante la pubertad (150). Estos hallazgos respaldan aún más la existencia de una red de mecanismos complejos, entre los cuales se encuentra el sistema Kiss1/Gpr54, que aseguran la activación sincronizada del eje HHG que conduce a la pubertad. En todo caso, se ha demostrado que la ablación durante el periodo juvenil de las neuronas Kiss1 inhibe la maduración puberal (150), mientras que la ablación selectiva de Gpr54 en neuronas GnRH produce igualmente una marcada supresión de la pubertad (151).

Por otro lado, está bien establecido que la activación del eje HHG durante la pubertad y su mantenimiento en edad adulta son muy sensibles a la acción de factores periféricos, que interactúan junto con los reguladores centrales para controlar el inicio de la pubertad (19). En este contexto, es necesario alcanzar unas ciertas reservas

energéticas para que la pubertad se produzca con normalidad, lo que evidencia la importancia de señales metabólicas que transmiten la información sobre el grado de reservas energéticas del organismo al SNC en la puesta en marcha y posterior mantenimiento de la función reproductora en la edad adulta (11). Estas señales serán analizadas en detalle en la sección 3. CONTROL METABÓLICO DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA.

A modo de resumen, en la **Figura 9** se muestra una representación esquemática de los elementos principales, comentados anteriormente, implicados en el control de la pubertad.

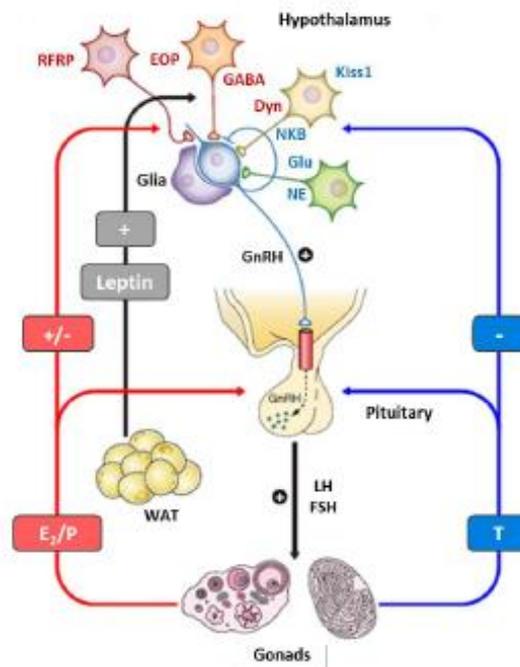


Figura 9: Representación esquemática de los elementos principales implicados en el control de la pubertad. Se muestran en rojo algunos de los reguladores centrales inhibidores del eje HHG mientras que los factores excitatorios se representan en azul. Tomado de Pinilla, L et al. *Physiological Reviews*, 2012 (11).

2. FUNCIÓN METABÓLICA: MECANISMOS DE REGULACIÓN

Todas las funciones que realizan los seres vivos requieren un gasto de energía que está supeditado a la disponibilidad de recursos energéticos. Dada la necesidad de conocer, de manera precisa y continuada, la disponibilidad de recursos energéticos con los que cuenta el organismo en cada momento, existen multitud de señales, de origen central y periférico, que informan al SNC de la necesidad de poner en marcha mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis energética. Desde un punto de vista evolutivo, nuestro organismo está preparado para aprovechar al máximo los recursos

en tiempos de escasez y por ello ha desarrollado complejos mecanismos que aseguren su éxito.

2.1. CONTROL NEUROENDOCRINO DEL BALANCE ENERGÉTICO

La homeostasis energética, como función clave para la supervivencia, está sometida a mecanismos de control muy precisos, que modulan tanto la incorporación de nutrientes a través de la ingesta como su consumo. Entre los factores implicados en este control preciso destacan las señales hormonales y distintos factores centrales, que cooperan de manera dinámica a fin de asegurar un correcto equilibrio entre la incorporación y el gasto energético. Alteraciones persistentes en de dicho equilibrio conducen a perturbaciones del peso corporal, cuyo principal exponente es la obesidad, pero que puede manifestarse igualmente en situaciones de adelgazamiento extremo, como las que se observan en condiciones de anorexia, caquexia tumoral y otras patologías consuntivas, así como en individuos que llevan a cabo ejercicio físico de manera extrema.

La obesidad se define como un estado metabólico donde se produce un exceso de acumulación de grasa en el tejido adiposo, lo cual puede conducir al desarrollo de diversos problemas de salud. Tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, la prevalencia de la obesidad y las patologías asociadas están aumentando a un ritmo que puede considerarse de proporciones epidémicas. Las razones del aumento de la prevalencia de la obesidad se deben a una combinación entre la predisposición genética y los factores sociales y ambientales, que conducen a un desbalance energético. El principal riesgo de la obesidad es su asociación con la hipertensión, la diabetes tipo 2, el hígado graso y una variedad de trastornos conocidos como “Síndrome metabólico”.

A pesar de que el balance energético se ve afectado por muchos factores moduladores, la obesidad es, en última instancia, el resultado de un desequilibrio positivo entre la adquisición de energía y el gasto energético. Cuando la cantidad de energía incorporada (ingesta) por un animal es igual a su gasto energético (metabolismo, efectos del ejercicio y termogénesis), el resultado es un balance energético neutral que permite la estabilidad del peso corporal. Un desequilibrio en la ingesta de alimentos o en el gasto energético conduce a un peso corporal elevado cuando la energía asimilada es mayor que la utilizada, o, a la inversa, se reduce el peso corporal cuando el gasto de energía es superior a la ingesta calórica (**Figura 10**) (152).

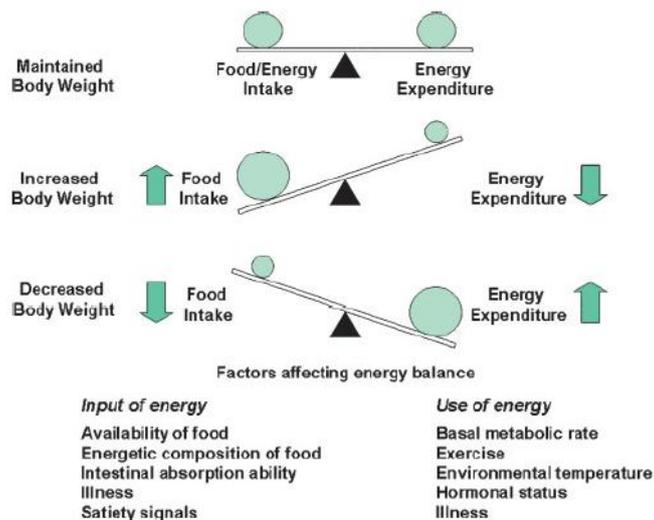


Figura 10: Diagrama esquemático que muestra los componentes de la ecuación del balance energético. Tomado de López, M. Bioessays, 2007 (152).

De forma esquemática, los mecanismos homeostáticos que regulan el balance energético incluyen la integración de señales procedentes de dos niveles distintos, el SNC, especialmente el hipotálamo, y las señales periféricas, que se describirán en el siguiente apartado.

2.1.1. REGULADORES CENTRALES DEL BALANCE ENERGÉTICO

En el siglo pasado, se observó que lesiones específicas en determinadas zonas del hipotálamo de roedores causaban alteraciones en la ingesta (153). Las neuronas hipotalámicas se agrupan en una serie de núcleos que se disponen, de manera bilateral, en torno al tercer ventrículo (3V), algunos de los cuales se describirán en el siguiente apartado por su participación en el control del balance energético.

Hoy día, sabemos que estos núcleos forman circuitos neuronales interconectados entre sí que responden a cambios en el estado energético del organismo, produciendo modificaciones en la expresión y secreción de neurotransmisores y neuropéptidos específicos que desencadenan cambios en la ingesta y el gasto energético (154). Además del hipotálamo, existen también otras áreas cerebrales que también intervienen en la integración de señales centrales y periféricas, colaborando en la regulación de la homeostasis energética.

2.1.1.1. CONTROL INTEGRADO DE LA INGESTA CALÓRICA

El **núcleo ARC** está considerado como el principal centro regulador de la ingesta a nivel hipotalámico. Se sitúa en la base del 3V y se encuentra inmediatamente por encima de

la EM, donde la barrera hematoencefálica (BBB) permite la entrada de péptidos y proteínas desde la circulación periférica, tales como leptina, ghrelina e insulina (155).

Este núcleo incluye, entre otras, dos poblaciones neuronales distintas que constituyen el primer orden de neuronas encargadas de integrar señales implicadas en la homeostasis energética y el control de la ingesta. Una población de estas neuronas contiene las denominadas neuronas NPY/AgRP (neuropéptido Y/ péptido relacionado con aguti) de carácter orexigénico (su activación induce la ingesta), la mayoría de las cuales proyectan sus axones hacia otros núcleos hipotalámicos, principalmente hacia el núcleo paraventricular (PVN), y hacia otras neuronas del propio núcleo ARC. Una segunda población de neuronas de primer orden contiene las denominadas neuronas POMC/CART (pro-opiomelanocortina/ transcrito relacionado con cocaína y anfetamina), de carácter anorexigénico (inhiben la ingesta). Esta población neuronal proyecta sus axones hacia otros núcleos hipotalámicos como el núcleo dorsomedial (DMN), el área hipotalámica lateral (LHA), el área perifornical (PFA) y el PVN (155-157) (Figura 11).

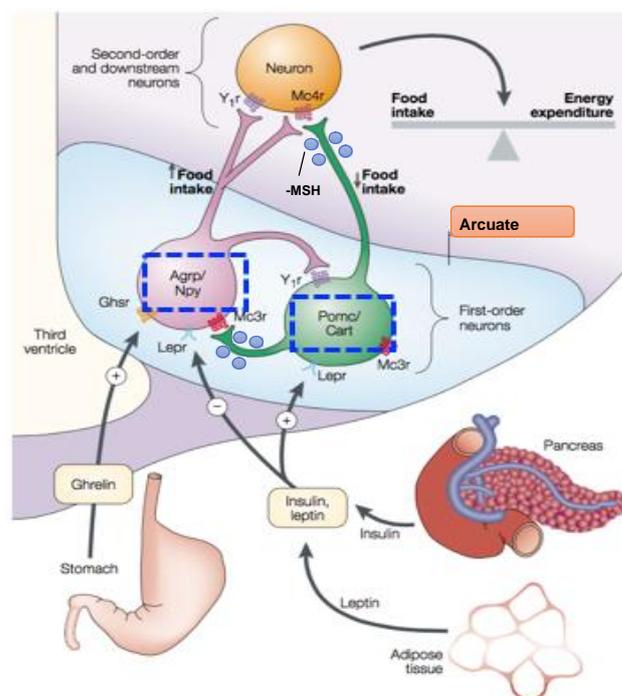


Figura 11: Principales poblaciones neuronales que regulan la ingesta en el núcleo ARC estableciendo una sofisticada red de proyecciones neuronales intra y extrahipotalámicas. Las neuronas POMC/CART disminuyen la ingesta de alimentos e incrementan el gasto energético, y las neuronas NPY/AgRP estimulan la ingesta y reducen el gasto energético. Ghr, Receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento; Lepr, receptor de leptina; Mc3r/Mc4r, receptores de melanocortinas 3 y 4; Y1r, receptor de neuropéptido Y1. Tomado con ligeras modificaciones de Barsh GS, Schwartz MW. Nature Reviews Genetics, 2002 (157).

Las neuronas NPY/AgRP reciben su nombre por su participación en la síntesis y secreción de dos neuropéptidos orexigénicos, NPY y AgRP, claves en el control del balance energético y que serán descritos en detalle a continuación:

NPY es un péptido que se expresa principalmente en el núcleo ARC, pero que está ampliamente distribuido por el SNC (158). Está considerado como uno de los péptidos estimuladores más potentes de la ingesta. En este sentido, su administración central en ratas estimula la ingesta y reduce el gasto energético a través de la disminución de la termogénesis (159). De acuerdo con su papel fisiológico en el control de la ingesta, los niveles de ARNm de *NPY*, así como del péptido, aumentan de forma significativa durante el ayuno y disminuyen después de éste (160). Como se describía en secciones anteriores, NPY ejerce sus acciones mediante la unión a receptores YR. No obstante, los mecanismos de acción de NPY a través de la activación de sus distintos receptores parecen ser bastante complejos (87, 161).

AgRP es un neuropéptido perteneciente a la familia de péptidos agouti que se expresa en el núcleo ARC (162). Este neuropéptido estimula la ingesta a través de la inhibición de las acciones de α -MSH al antagonizar sus receptores MC3-R y MC4-R (163). La inhibición de estos receptores provoca un fenotipo obeso que está asociado con hiperfagia, disminución de la termogénesis y de la eficiencia calórica (164). Al igual que ocurre con NPY, situaciones de ayuno causan un incremento en la expresión de *AgRP* (165), y la administración crónica de este péptido en roedores produce un incremento significativo y continuado de la ingesta (166).

Adicionalmente, se ha demostrado que existen subpoblaciones de neuronas NPY/AgRP que liberan **GABA**, actuando de forma paracrina para inhibir la función de las neuronas POMC/CART adyacentes.

Del mismo modo que las neuronas NPY/AgRP, las neuronas POMC/CART actúan como elementos clave en el control de la ingesta y el gasto energético para mantener el peso corporal, y sintetizan distintos neuropéptidos, entre los que destacan los neuropéptidos anorexigénicos, α -MSH y CART que se describen a continuación:

POMC es el precursor de α -MSH, péptido más representativo en la regulación de la ingesta, que ejerce su efecto anorexigénico a través de su unión con los receptores MC3-R y MC4-R. Además de disminuir la ingesta, α -MSH aumenta el gasto energético aumentando también la termogénesis (167, 168). En este sentido, se ha demostrado que tanto la administración central de α -MSH como la de agonistas de MC3-R y MC4-R, inhibe la ingesta y reduce el peso corporal (158). Por el contrario, mutaciones producidas en el gen *POMC* o anomalías en su procesamiento, así como la administración de antagonistas de MC3-R y MC4-R dan lugar a obesidad temprana (169, 170).

CART está considerado como el tercer transcrito más abundante en el hipotálamo. Además de su expresión en el núcleo ARC, también se expresa en el PVN, DMN, LHA y PFA (171). Diferentes estudios en modelos animales han demostrado que la expresión de *CART* disminuye en el núcleo ARC en situaciones de ayuno (171, 172), y la administración de este péptido ocasiona una reducción de la ingesta (173).

Además del núcleo ARC, el cerebro contiene otros núcleos hipotalámicos que están implicados en la regulación de la homeostasis energética.

El **PVN** está situado en la parte anterior del hipotálamo, y se ha descrito que la lesión de este núcleo produce hiperfagia (174). Es una de las áreas en las que se alojan neuronas de segundo orden que procesan la información para la regulación de la homeostasis energética. La actividad de las neuronas del PVN se encuentra modulada, fundamentalmente, por neuropéptidos procedentes del núcleo ARC. Las neuronas POMC/*CART* liberan α -MSH en el PVN, potenciando la liberación de GABA por parte de las neuronas GABAérgicas que se localizan en este núcleo, reduciendo así la ingesta. Por su parte, las neuronas NPY/AgRP estimulan la ingesta a través de la inhibición de la señalización GABAérgica en este núcleo (175).

El **DMN** también está involucrado en la regulación de la ingesta, ya que recibe proyecciones de las neuronas NPY/AgRP del núcleo ARC, y se ha observado que la lesión de este núcleo produce hiperfagia y obesidad (176). La administración de péptidos orexigénicos, como NPY, GAL y GABA en este núcleo, así como la sobreexpresión de NPY, produce un incremento de la ingesta y del peso corporal, evidencias que han apoyado la implicación de este núcleo en la regulación de la ingesta (176).

En cuanto al **VMN**, fue identificado como uno de los principales centros de la saciedad al comprobar que su lesión induce un cuadro grave de hiperfagia y obesidad (176). Las neuronas del núcleo VMN proyectan hacia los núcleos ARC, DMN, LHA y hacia el núcleo del tracto solitario (NTS), y reciben proyecciones de neuronas NPY/AgRP y POMC/*CART* del núcleo ARC (177, 178). Se ha demostrado que sus neuronas expresan receptores para señales centrales y periféricas que intervienen en el control de la homeostasis energética (179). Adicionalmente se ha descrito que las neuronas de este núcleo sintetizan el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), un inhibidor de la ingesta cuya actividad está modulada por el estado nutricional, reduciéndose en situaciones de ayuno (176, 180).

El **LHA**, se considera como un centro del hambre al describirse que su lesión produce hipofagia. Las neuronas de este núcleo proyectan sus axones hacia diversos núcleos

hipotalámicos, como el ARC y el PVN, y hacia otras zonas del SNC, como el NTS y el núcleo dorsal motor del vago (176, 181). Las neuronas del LHA sintetizan dos tipos de péptidos orexigénicos, orexinas o hipocretinas y hormona concentradora de melanina (MCH). Las orexinas ejercen su acción uniéndose a sus receptores específicos OXR-1 y OXR-2 y su administración central ocasiona un potente efecto estimulador de la ingesta. En cuanto a MCH, es un péptido orexigénico que ejerce su efecto sobre la ingesta de forma independiente de las orexinas. Así, la administración central repetida de MCH incrementa la ingesta y produce obesidad moderada en ratas (176).

Además del hipotálamo, existen otras zonas del SNC implicadas en el control del balance energético, como el tronco cerebral, el cerebelo y el hipocampo, que presentan receptores tanto para señales metabólicas centrales como periféricas y cuyas neuronas forman conexiones bidireccionales con neuronas hipotalámicas que participan en la regulación central del balance energético (176, 182-184).

2.1.1.2. CONTROL INTEGRADO DEL GASTO ENERGÉTICO

El gasto energético viene determinado por la energía consumida en: 1) las funciones metabólicas esenciales del organismo o metabolismo basal, 2) la actividad física y 3) el mantenimiento de la temperatura corporal o termogénesis. La termogénesis obligatoria es la producción de calor originada para el mantenimiento de la temperatura corporal. Sin embargo, cuando la temperatura ambiente desciende por debajo de este nivel, se activa la termogénesis facultativa o adaptativa. En mamíferos, incluidos los humanos, la termogénesis adaptativa está mediada principalmente por el tejido adiposo pardo o marrón (BAT) (185).

El cerebro integra señales periféricas que informan sobre los cambios en la temperatura ambiental, lo que proporciona una respuesta coordinada para la regulación de la termogénesis que se lleva a cabo en varias regiones del cerebro, donde el hipotálamo juega un papel importante (186). En concreto, evidencias experimentales sugieren que neuronas del VMN reciben información de diversas señales hormonales, como el E2, la leptina, la inulina, las hormonas tiroideas, y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) para regular la termogénesis en el BAT (187-190). La mayoría de señales periféricas descritas comparten un mecanismo de acción común dentro del núcleo VMN, concretamente, la regulación del metabolismo lipídico y de la proteína quinasa activada por AMP, denominada AMPK (191), un sensor energético que se describirá detalladamente en el apartado 4. AMPK.

2.1.2. REGULADORES PERIFÉRICOS DEL BALANCE ENERGÉTICO

Además de los factores centrales, existen señales de origen periférico que van a intervenir en la regulación de la homeostasis energética del organismo. En este

sentido, existe una serie de hormonas, cuyos niveles circulantes fluctúan dependiendo del estado metabólico de los individuos. En línea con esto, los niveles circulantes de hormonas como la leptina incrementan en condiciones de balance energético positivo, mientras que otras, como la ghrelina, aumentan en situaciones de déficit energético. En hecho, hace que estas hormonas periféricas sean excelentes marcadores del nivel de reservas energéticas del organismo, informando a los centros encargados del control del metabolismo para el mantenimiento de la homeostasis energética.

En el siguiente apartado, se describirán los principales factores periféricos implicados en la regulación del control del balance energético, que clasificaremos en hormonas metabólicas y exteriores gonadales.

2.1.2.1. HORMONAS METABÓLICAS

En esta sección destacaremos las hormonas metabólicas fisiológicamente más relevantes implicadas en la regulación del balance energético:

INSULINA

Es una hormona peptídica de 51 aa producida por las células β pancreáticas que actúa como regulador a largo plazo de la ingesta, el balance energético y la adiposidad corporal. Tras la ingesta, ejerce un efecto anorexigénico a través de sus acciones a diferentes niveles del SNC mediante la activación de su receptor IR, que se encuentra distribuido de manera abundante por el SNC. En el hipotálamo, el IR se expresa principalmente en núcleos implicados en el control de la ingesta, como el ARC, el DMN y el PVN (192).

Se ha demostrado que la administración central de insulina, en monos y roedores, reduce la ingesta y el peso corporal, mediando estas acciones a través de la inhibición de las neuronas NPY/AgRP del núcleo ARC (193, 194). Además, se ha demostrado que la insulina puede ejercer su acción anorexigénica interaccionando con el sistema de melanocortinas ya que los receptores de insulina están presentes en las neuronas POMC del núcleo ARC y la administración de insulina a nivel central aumenta la expresión de ARNm de *POMC* en este núcleo. Además, la disminución selectiva de la expresión de IRs en determinados núcleos hipotalámicos produce hiperfagia y un aumento de los depósitos grasos (195).

GLUCAGÓN

Es un péptido de 29 aa producido por las células α -pancreáticas que se origina tras el procesamiento proteolítico del proglucagón, el cual además da lugar otros péptidos

como la oxintomodulina (OXM) y el GLP-1, este último se describirá más adelante. Su principal función es estimular la producción de glucosa a partir de glucógeno, de modo que bajos niveles de glucosa estimulan la secreción de glucagón, acción que se ve inhibida de forma paracrina por la presencia de insulina, ya que inhibe la expresión de proglucagón en las células α pancreáticas (196).

Además de participar en la homeostasis de la glucosa, el glucagón también regula la ingesta y el gasto energético (196). La administración de glucagón disminuye la sensación de hambre y reduce la ingesta en humanos y ratas (197, 198). Además, estudios *in vivo* e *in vitro* mostraron que la infusión de glucagón incrementa el gasto energético mediante la estimulación del consumo de oxígeno y el incremento de la actividad termogénica del BAT (199). En el mismo sentido, se ha demostrado que la exposición al frío aumenta los niveles de glucagón en plasma (200).

LEPTINA

Es un péptido de 167 aa secretado por el tejido adiposo que está codificado por el gen *ob*. Los niveles circulantes de leptina están directamente relacionados con la cantidad de depósitos de grasa corporal (201). La leptina ejerce sus acciones a través de receptores de los que existen varias isoformas, que van desde Ob-Ra a Ob-Rf, siendo Ob-Rb la isoforma que va a mediar las acciones de la leptina en la regulación de la ingesta. Esta isoforma se expresa especialmente en los núcleos ARC, DMN, VMN, LHA, en el área preóptica medial (mPOA), el NTS y el hipocampo (201).

La leptina actúa como un factor anorexigénico y termogénico en el hipotálamo para ajustar la ingesta y el gasto calórico a los requerimientos energéticos. Así, la administración de leptina disminuye la ingesta y el peso corporal, mientras que la ausencia de esta hormona o de su receptor, en humanos y en ratones, produce hiperfagia y obesidad severa (202). Sin embargo, grandes cantidades de tejido adiposo, que resultan en niveles elevados de leptina, conducen al desarrollo de resistencia a la leptina y, por lo tanto, a la ausencia de su efecto anorexigénico (203).

Tras atravesar la BBB, la leptina activa las neuronas anorexigénicas POMC/CART, estimulando la liberación de α -MSH, inhibe la actividad de las neuronas orexigénicas NPY/AgRP y produce un incremento de la actividad simpática, que aumenta el metabolismo basal y el consumo energético (201, 204). Además de los efectos centrales predominantes, se han documentado acciones periféricas directas de la leptina en tejidos metabólicos, como músculo, hígado, páncreas y tejido adiposo (205).

ADIPONECTINA

Es una proteína de 247 aa que se sintetiza en el tejido adiposo y, a diferencia de la leptina, sus niveles plasmáticos son inversamente proporcionales a cantidad de tejido adiposo, tanto en humano como en ratón (206). La adiponectina puede presentarse en forma monomérica o trimérica y, a su vez, varios trímeros pueden unirse para formar oligómeros. En plasma se encuentra mayoritariamente en su forma trimérica (207). Su mecanismo de acción se lleva a cabo a través de receptores, de los cuales existen dos isoformas denominadas Adipo R1 y Adipo R2. La forma monomérica se une a Adipo R1 y produce una estimulación de la β -oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético, mientras que la forma trimérica de la adiponectina se une a Adipo R2 en el hígado produciendo una disminución de la liberación de glucosa hepática. Adicionalmente, ambos receptores se expresan en las células β -pancreáticas (208, 209).

La administración de adiponectina a nivel periférico produce una disminución del peso corporal, mediada por una mayor oxidación de ácidos grasos en el músculo, sin que la ingesta se vea afectada (209). El mismo efecto tiene lugar tras la administración a nivel central, pero en este caso parece estar mediado por el sistema de melanocortinas hipotalámicas (210).

GHRELINA

Es un péptido de 28 aa producido, en su mayor parte, por el estómago, pero también por el intestino, el hipotálamo y las gónadas (211, 212), y sus niveles circulantes se correlacionan inversamente con el índice de masa corporal. La ghrelina sufre un proceso de acilación, el cual es fundamental para llevar a cabo sus acciones a través de la unión a su receptor, el receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (GHS-R) (213).

Los niveles circulantes de ghrelina se correlacionan inversamente con el índice de masa corporal, lo cual sugiere que esta hormona podría actuar como señal de insuficiencia energética. En línea con esto, la ghrelina es una potente señal orexigénica que ejerce sus acciones interaccionando con las neuronas POMC/CART y NPY/AgRP del núcleo ARC, regulando así la liberación de los péptidos anorexigénicos y orexigénicos que estas producen (214, 215). Por otra parte, algunos de los efectos de esta hormona sobre ingesta también parecen ir mediados a través de neuronas del PVN, VMN y LHA (216, 217).

En situaciones de ayuno existen niveles de ghrelina elevados en el plasma que disminuyen tras la ingesta (218). Su administración central y periférica induce, en

roedores, un incremento de la ingesta y de la expresión del ARNm de *NPY* hipotalámico, y este incremento es suprimido por la administración de antagonistas de *NPY* y *AgRP* en ratas y en ratones *knockout* (KO) para *NPY* y *AgRP* (219, 220). Diversos estudios han demostrado que el efecto orexigénico de la ghrelina puede verse alterado por la manipulación de la ingesta postnatal temprana (sobrenutrición neonatal) y en edad adulta (dieta alta en grasa), produciéndose un cuadro de resistencia central a la ghrelina periférica (6, 221).

PÉPTIDO SIMILAR AL GLUCAGÓN (GLP-1)

Es una hormona sintetizada por las células L del intestino. Esta se libera al torrente sanguíneo, tras la ingesta de alimentos, en proporción a las calorías ingeridas, y va a llevar a cabo sus acciones mediante la interacción con el receptor GLP-1R (176).

El GLP-1 reduce la ingesta, estimula la secreción de insulina y retrasa el vaciado gástrico, acciones que podrían estar mediadas a través de la activación de neuronas localizadas en el PVN, el NTS, el tronco encefálico y la amígdala, como sugieren distintos datos neuroanatómicos (222-224). Adicionalmente, la administración central y periférica de GLP-1 inhibe la ingesta en roedores (225).

FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF-21)

Es una proteína de 209 y 210 aa en humanos y roedores, respectivamente, que se secreta principalmente en hígado, y en menor cantidad en otros órganos como páncreas, músculo esquelético, tejido adiposo y testículo, y que ejerce su función mediante la unión y activación de los receptores de la familia de FGF (FGF-R) (226-228). La activación estos receptores por FGF-21 es dependiente de una proteína transmembrana, denominada β -Klotho (KLB), cuya expresión está incrementada durante la adipogénesis, y cuyo déficit produce defectos metabólicos, según se ha confirmado en pacientes con mutaciones inactivantes de esta proteína (229).

Esta hormona tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis glucídica y en el metabolismo de los lípidos en humanos y en roedores. De manera que, situaciones de ayuno extremo aumentan tanto la expresión hepática como los niveles séricos de FGF-21, inducidos por el cambio en la utilización de carbohidratos a lípidos (230). Por el contrario, durante la ingesta, FGF-21 estimula la lipólisis del tejido adiposo (231). Paradójicamente, numerosos estudios han mostrado niveles séricos y de expresión del ARNm de *FGF-21* en hígado y tejido adiposo más elevados en sujetos obesos, lo que podría deberse a una respuesta compensatoria o resistencia a FGF-21. De hecho, los niveles séricos de FGF-21 muestran una correlación positiva con la

adiposidad, los niveles circulantes de insulina y leptina, y la cantidad de triglicéridos (232).

2.1.2.2. ESTEROIDES GONADALES

ESTRÓGENOS

Además de intervenir en la regulación del eje HHG, los esteroides gonadales también son reguladores metabólicos clave en diferentes tejidos, con un papel demostrado en el control de ingesta y la homeostasis energética, cuya desregulación está frecuentemente asociada a la pérdida de plasticidad fenotípica y manifestación de enfermedad (233). La incidencia de enfermedades metabólicas y sus comorbilidades es sexualmente dimórfica, y varía dependiendo del estado gonadal; por ejemplo, aumenta tras la menopausia. Los niveles reducidos de E2 después de la menopausia u ovariectomía (OVX) están asociados con hiperfagia y descenso en el gasto energético, permitiendo la ganancia de peso corporal. El reemplazamiento con E2 reduce o revierte los efectos inducidos por OVX. Además, los cambios hormonales que ocurren durante el ciclo estral de ratas se han correlacionado con variaciones en la ingesta y en el peso corporal, así como ocurre durante el embarazo y la lactancia en rata (234, 235).

Los efectos de los estrógenos en la homeostasis energética están esencialmente mediados por ER α (234). Así, datos farmacológicos han demostrado que la administración central y periférica de un agonista específico de ER α promueve la pérdida de peso, mientras que un antagonista de este receptor induce el efecto contrario (236). Además, ratones de ambos sexos con ablación global en ER α , muestran hiperfagia, hipo-metabolismo, aumento de adiposidad (debido a hipertrofia e hiperplasia), hiperleptinemia y resistencia a insulina (237). De manera similar, ratones de ambos sexos con alteración genética de la enzima aromatasa, responsable de la síntesis final de estrógenos, desarrollan obesidad (238). Asimismo, humanos con la misma alteración muestran un fenotipo similar (239). El E2 regula casi todos los aspectos del metabolismo al actuar sobre tejidos y órganos periféricos. En este sentido, regula la sensibilidad a insulina, actuando sobre el páncreas, hígado y músculo esquelético, la función de la célula β -pancreática y el metabolismo de los lípidos (233). La acción del E2 sobre la grasa es especialmente relevante, ya que regula su patrón de distribución, diferenciación, inflamación y fibrosis. Es necesario destacar que la mayoría de estos efectos contribuyen de forma marcada al dimorfismo sexual en el control de la homeostasis energética (233).

El E2 actúa a nivel del SNC para modular el balance energético. Los ERs se encuentran expresados en núcleos hipotalámicos clave en la regulación del balance energético, tales como ARC, LHA, PVN, VMN y POA (187). La relevancia funcional de tal expresión

está apoyada por el hecho de que la administración central de E2 induce un potente efecto anorexigénico (236). Además, ratones de ambos sexos deficientes en ER α , específicamente en el cerebro, muestran mayor adiposidad visceral e hiperfagia, que se asocia a un menor gasto energético y actividad locomotora (237). Además, ratones de ambos sexos deficientes en ER α , específicamente en el cerebro, muestran mayor adiposidad visceral e hiperfagia, que se asocia a un menor gasto energético y actividad locomotora (237).

Evidencias actuales han mostrado que el E2 tiene una acción específica en el hipotálamo para modular la homeostasis energética, particularmente dentro del ARC y VMN (**Figura 12**). En este sentido, la mayoría de acciones de los estrógenos sobre la ingesta tienen lugar en el núcleo ARC, concretamente en las neuronas POMC, que presentan altos niveles de expresión de ER α (235). La eliminación específica de ER α en neuronas POMC estimula el apetito, sin tener efectos en el gasto energético ni en la distribución de la grasa (237). El E2 también altera la interacción entre neuronas POMC en el núcleo ARC y las neuronas MCH en el LHA, lo que induce anorexia y pérdida de peso (240).

De otra parte, se ha identificado que cambios en los niveles de E2 producen modificaciones en la expresión de *NPY* que podrían estar asociadas con su efecto anorexigénico (236, 241). Sin embargo, la ausencia de expresión de ER α en neuronas NPY/AgRP sugiere la intervención de mecanismos indirectos en la mediación de los efectos del E2 sobre las neuronas NPY/AgRP (241).

Las acciones de los estrógenos sobre la termogénesis en las neuronas del VMN se describirán con más detalle en la sección 4.1.2. AMPK HIPOTALÁMICO Y REGULACIÓN DE LA TERMOGÉNESIS.

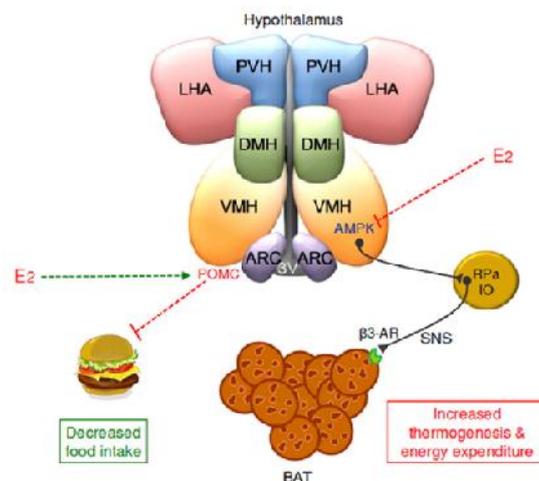


Figura 12. Acciones centrales de E2 sobre la ingesta y la termogénesis. El E2 central inhibe la ingesta a través de las neuronas POMC del núcleo ARC y estimula la termogénesis en el BAT a través de AMPK en el núcleo VMN y el SNS. Tomado de López M. y Tena, M. 2017. *Pharmacology & Therapeutics* (7).

TESTOSTERONA

Los andrógenos, concretamente la T, también desempeñan funciones importantes en la regulación de la homeostasis energética, con un efecto orexigénico. Se ha demostrado que un exceso de andrógenos en etapas tempranas del desarrollo produce en ratas hembra resistencia a insulina y obesidad en la edad adulta (242, 243). En la misma línea, el hiper-androgenismo que se produce en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) se ha asociado a resistencia a insulina y desordenes metabólicos como obesidad, diabetes *Mellitus* tipo 2 (T2DM), dislipemia y alteraciones cardiovasculares (244). En todo caso, no se conocen aún en detalle las interacciones y la contribución específica del hiper-androgenismo temprano y otras manipulaciones obesogénicas en el deterioro del perfil metabólico, tal y como se produce en trastornos como el PCOS, en el que muchas de las pacientes presentan igualmente sobrepeso.

Por otro lado, el hipogonadismo masculino se considera un factor de riesgo para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares asociadas a la T2DM, sugiriendo que la disminución de testosterona en hombres adultos es perjudicial para la homeostasis metabólica y cardiovascular (245). Es de destacar, que los hombres obesos y con T2DM desarrollan frecuentemente un estado central de hipogonadismo. Un IMC>30 está asociado a 8 veces más riesgo de presentar bajos niveles de testosterona (246). Esto define un círculo vicioso donde la obesidad favorece el desarrollo del hipogonadismo y, a su vez, la baja testosterona aumenta la resistencia a insulina y contribuye a la instauración de la T2DM. De nuevo, los mecanismos subyacentes y las implicaciones fisiopatológicas de esta compleja interacción entre obesidad e hipogonadismo permanecen en gran medida desconocidos.

3. CONTROL METABÓLICO DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA

La reproducción es un proceso costoso en términos de consumo energético que, si bien es esencial para la supervivencia de la especie, es prescindible a nivel individual. Por lo tanto, la maduración y la función del eje reproductor están estrechamente conectadas y son muy sensibles al estado energético del organismo. De esta forma, se han desarrollado mecanismos sofisticados durante la evolución para permitir una inhibición específica del eje reproductor en condiciones energéticas desfavorables.

En este contexto, se han realizado numerosos análisis de las vías responsables de transmitir la información metabólica a los centros neuronales que gobiernan la función reproductora y se han descubierto un gran número de señales de origen central y periférico responsables de la adecuación de la función reproductora a la disponibilidad de recursos energéticos (247). En líneas generales, puede asumirse que las señales de

suficiencia energética (anorexigénicas) estimulan la puesta en marcha y funcionamiento de la función reproductora, mientras que las señales que informan de la escasez de recursos energéticos (orexigénicas) inhiben el funcionamiento del eje reproductor.

3.1. FACTORES CENTRALES Y SENSORES ENERGÉTICOS IMPLICADOS EN EL CONTROL METABÓLICO DE LA REPRODUCCIÓN

Los factores centrales que participan en el control del balance energético modulan la actividad de las neuronas GnRH directamente o a través de interneuronas hipotalámicas que proyectan sobre las neuronas GnRH. Las principales señales implicadas en el control metabólico de la reproducción se describirán a continuación:

✓ NEURONAS KISS1 Y KISSPEPTINAS

Las evidencias experimentales que apoyan el control metabólico de las neuronas Kiss1 son muy sólidas. Por un lado, se ha demostrado que las condiciones de estrés metabólico, principalmente relacionadas con el balance energético negativo, suprimen el sistema hipotalámico Kiss1, ya que disminuyen la expresión de ARNm de Kiss1, el contenido de kisspeptina en el hipotálamo y los niveles de LH circulantes en varios modelos de ayuno (247). En el mismo sentido, los bajos niveles de leptina que se observan en situaciones de déficit energético están relacionados con la expresión suprimida de Kiss1 en roedores y ovejas, mientras que la administración de esta hormona aumenta la expresión de ARNm de *Kiss1* en varias especies *in vivo* y en líneas celulares humanas y murinas (248-252). De manera similar, se ha demostrado que la administración central de Kp-10 en ratas sometidas a ayuno revierte la supresión de gonadotropinas inducida por el estado de balance energético negativo. Además, en ratas hembra sometidas a subnutrición crónica durante el periodo peri-puberal, la administración repetida de Kp-10 rescata los efectos negativos de la subnutrición sobre el inicio de la pubertad y la secreción de LH (253).

Hace varios años, se demostró que las neuronas Kiss1 del núcleo ARC (y el POA en ovejas) expresan Ob-Rs. Dado que estos receptores no están presentes en neuronas GnRH, estas observaciones llevaron a pensar que las neuronas Kiss1 pueden ser unos excelentes mediadores de los efectos de la leptina sobre las neuronas GnRH (250, 254). Sin embargo, más recientemente se ha documentado que la ablación específica de Ob-R en las neuronas Kiss1 no tiene efectos aparentes sobre el eje reproductor, lo que sugiere que la leptina puede actuar de manera indirecta sobre las neuronas Kiss1 para controlar el inicio de la pubertad y la función reproductora (255).

En el mismo sentido, las condiciones de exceso de energía persistente, tales como la obesidad, también han demostrado tener un impacto significativo en el sistema Kiss1. Así, se ha demostrado que la sobrealimentación postnatal en ratas hembra induce un adelanto en el inicio de la pubertad asociado a un aumento en los niveles circulantes de leptina y un aumento de los niveles de ARNm de *Kiss1* hipotalámico durante el periodo puberal (256). Por otro lado, el sobrepeso persistente en la edad adulta, que comúnmente se asocia con grados variables de HH, causa una supresión en la expresión de *Kiss1* hipotalámico y en el contenido de kisspeptina en ratas y ratones (257).

También se ha sugerido que las neuronas KNDy participan a nivel central en la transmisión, no sólo de los efectos reproductivos, sino también de los efectos metabólicos de los esteroides sexuales. En este sentido, se sabe que la OVX, como modelo de eliminación de los esteroides sexuales circulantes, provoca un aumento en el peso corporal, mientras que el reemplazo con estrógenos previene este efecto (236). En este contexto, se ha demostrado que la ablación de las neuronas KNDy del núcleo ARC evita el aumento de peso corporal inducido por la OVX (258). De manera similar, la eliminación de neuronas KNDy mitigó la respuesta de pérdida de peso corporal tras la administración de estradiol (258). Estas observaciones han sido confirmadas posteriormente por otro estudio que muestra que, a pesar de un estado claro de hipogonadismo (una menor secreción de estrógenos), la ablación de neuronas KNDy en ratas hembra bloqueó los cambios en el peso corporal provocados por tal condición (259). En general, estos hallazgos sugieren que la integridad de las neuronas KNDy del núcleo ARC es indispensable para llevar a cabo las acciones del E2 sobre la homeostasis energética.

✓ NEURONAS POMC

Las neuronas que co-expresan POMC y CART en el núcleo ARC también parecen estar involucradas en el control integrado del metabolismo y la reproducción. Los productos derivados del procesamiento proteolítico de *POMC*, α -MSH y β -END, ejercen diferentes efectos sobre el control de la homeostasis energética y la liberación de gonadotropinas. Por un lado, α -MSH reduce la ingesta y estimula la liberación de LH, mientras que, por otro lado, β -END estimula la ingesta e inhibe la secreción de LH (3).

Como se mencionó anteriormente, aunque las neuronas GnRH no expresan receptores para algunos factores metabólicos periféricos clave, como la leptina, sí expresan receptores de melanocortinas. Así pues, se ha sugerido que las neuronas POMC podrían transmitir la información metabólica de distintas hormonas metabólicas a las neuronas GnRH para modular su actividad secretora.

Aunque estudios iniciales documentaron que la ablación independiente de Ob-Rs o IRs en las neuronas POMC no altera la fertilidad, estudios realizados en ratones carentes de ambos receptores en las neuronas POMC han demostrado que estos animales presentan deficiencias reproductivas (260, 261). Además, los ratones *ob/ob* (deficientes en leptina) presentan una expresión reducida de ARNm de POMC en el núcleo ARC, que aumenta tras la administración de leptina (262).

Las neuronas POMC establecen conexiones sinápticas con el soma y los terminales nerviosos de las neuronas GnRH y estas expresan además de Ob-Rs e IRs, receptores de NPY, Kiss1 y melanocortinas (72). En la misma línea, análisis electrofisiológicos han demostrado que, en respuesta al tratamiento con agonistas específicos de MC4-R y MC3-R, se produce una activación postsináptica de neuronas GnRH (72). Además, se ha documentado que la infusión de leptina en el POA y la EM produce un aumento de la secreción de α -MSH seguida de una liberación de GnRH/LH, lo que demuestra que las neuronas POMC median el efecto de la leptina sobre la estimulación de las neuronas GnRH (263).

Se ha señalado que parte de los efectos de α -MSH en la secreción de GnRH/LH están mediados por las neuronas Kiss1, como indican datos neuroanatómicos obtenidos en ratas peri-puberales y otras especies que muestran contactos entre fibras de neuronas POMC y somas de neuronas Kiss1 del núcleo ARC (74).

✓ NEURONAS NPY/AgRP

Las neuronas NPY/AgRP también son elementos clave en el control metabólico del eje reproductor. Dado que estas neuronas emiten proyecciones a los somas y a los terminales axónicos de las neuronas GnRH, se ha sugerido que podrían participar en la transmisión de señales de insuficiencia energética al eje gonadotrópico (264). En este sentido, se ha documentado, mediante estudios electrofisiológicos en ratón, que NPY y AgRP pueden llevar a cabo tanto acciones estimuladoras como inhibitoras sobre la actividad de GnRH a través de los receptores Y4 e Y1, respectivamente, en el caso de NPY (72).

Los resultados de análisis genómicos funcionales, revelan que la señal inhibitoria que transmiten las neuronas NPY/AgRP sobre el eje reproductor parece ser más relevante en condiciones metabólicas adversas, detectando cambios en los niveles de leptina (3). En este sentido, se ha demostrado que, tanto la restricción calórica como la administración central de NPY y AgRP, aumenta la expresión de ambos neuropéptidos e inhibe la secreción de LH (265) (89, 266-269). Además, aunque la ablación congénita

de NPY en ratones no tiene ningún impacto sobre el eje reproductor, sí bloquea la disminución de LH inducida por el ayuno (270).

También se ha descrito una interacción potencial entre neuronas NPY/AgRP y Kiss1 en el control del eje reproductor y el metabolismo. En este sentido, se ha demostrado la existencia de conexiones recíprocas entre estas dos poblaciones neuronales (254). Además, estudios muy recientes han propuesto que el aumento de la transmisión GABAérgica por parte de las neuronas AgRP hacia las neuronas Kiss1, tras estimulación optogenética y farmacogenética, sería un mecanismo relevante para la supresión de *Kiss1*, y por lo tanto, la neurosecreción de GnRH, en condiciones de balance energético negativo (3, 271).

✓ NEURONAS GABA

Las neuronas GABAérgicas son elementos importantes en la transmisión de la información metabólica al eje reproductor. Se ha demostrado que ratones deficientes en receptores de leptina en neuronas GABA, muestran retraso puberal y problemas de fertilidad, y estas alteraciones podrían estar debidas a una disminución en la actividad de las neuronas Kiss1, lo que sugiere la participación de las neuronas Kiss1 en la transmisión de, al menos, parte de las acciones de leptina/GABA sobre el eje HHG (3).

✓ NO

El NO es un transmisor producido por neuronas localizadas en el POA que participa en el control integrado del metabolismo y la reproducción mediando los efectos estimuladores de la leptina en el eje reproductor. En este sentido, se ha demostrado que la ablación genética de la enzima productora de NO o su bloqueo farmacológico en el POA disminuye la capacidad estimuladora de la leptina exógena sobre la liberación de LH. Asimismo, el tratamiento con leptina impide la restauración de la fertilidad en ratones hembra deficientes en leptina endógena (3, 272).

Además, las neuronas Kiss1 emiten proyecciones a las neuronas productoras de NO, promoviendo una parte de las acciones de leptina/NO en el control metabólico del eje reproductor, concretamente en la secreción pre-ovulatoria de LH. Además de los efectos estimuladores, el NO inhibe la secreción de GnRH/LH durante las fases del ciclo ovárico en las que el estradiol ejerce un efecto negativo (56).

En la **figura 13** se representa un resumen esquemático de las neuronas implicadas en el control metabólico de la reproducción.

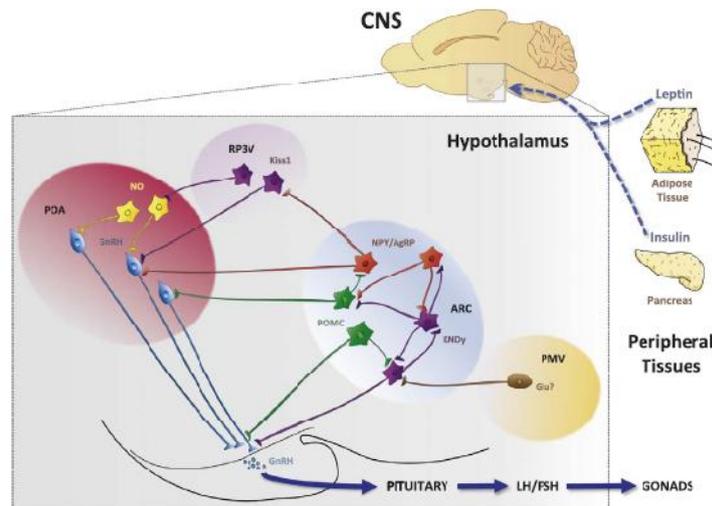


Figura 13: Representación esquemática de los transmisores centrales clave y las vías neuronales que intervienen en el control integrado del metabolismo y la reproducción. Tomado de Manfredi-Lozano, M, Roa, J y Tena-Sempere, M. 2018. *Frontiers in Neuroendocrinology* (3).

Además de los factores centrales descritos anteriormente, nuestro grupo ha investigado de manera muy activa en los últimos años la participación potencial de sensores moleculares centrales en el control metabólico de la función reproductora. Estos incluyen los sensores energéticos celulares, mTOR, AMPK y Sirt1, descritos a continuación.

➤ mTOR

mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*), es un sensor metabólico celular que opera como una serina/treonina quinasa, y tiene un papel relevante en la homeostasis energética del organismo (2).

La señalización de mTOR en el núcleo ARC juega un papel importante en la detección de la disponibilidad de nutrientes y media los efectos anorexigénicos de la leptina en el control de la ingesta. De manera que, el bloqueo de mTOR, inhibe los efectos anorexigénicos de la leptina exógena sobre la ingesta (273).

La señalización de mTOR a nivel central también está implicada en la regulación metabólica del eje reproductor, y específicamente en la transmisión de, al menos en parte, los efectos moduladores de leptina al sistema Kiss1 (3, 274). El bloqueo central de la señalización de mTOR, inhibe el inicio de la pubertad, produciéndose apertura vaginal retrasada, disminución del peso de ovario y útero, alteración del desarrollo folicular y supresión de la ovulación, además de una inhibición muy marcada de los niveles de ARNm de *Kiss1* en el núcleo ARC y de los niveles circulantes de LH (275). Por el contrario, la activación aguda de mTOR aumenta la secreción de LH y revierte

parcialmente la caída en los niveles de gonadotropinas asociada a subnutrición crónica (3, 276).

➤ **AMPK**

Un sensor energético esencial que juega un papel relevante en el control metabólico de la reproducción es la proteína quinasa activada por AMP, AMPK. Por su importancia en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, esta será descrita con mayor detalle en la sección 4. AMPK.

➤ **SIRT1**

La sirtuina 1 (SIRT1) funciona como una desacetilasa dependiente de NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada) que actúa sobre las histonas y otras dianas celulares para llevar a cabo una gran variedad de funciones biológicas, incluido el control epigenético, la modulación del envejecimiento y el control del metabolismo (277).

Estudios muy recientes de nuestro grupo llevados a cabo en ratas hembra, muestran que SIRT1 modula el inicio de la pubertad al transmitir información nutricional a las neuronas Kiss1 del núcleo ARC (278). A medida que se aproxima la pubertad, SIRT1 se desprende del promotor de Kiss1, lo que facilita un cambio en la configuración de la cromatina permitiendo la expresión de *Kiss1* favoreciendo el inicio de la pubertad. En condiciones de sobrealimentación temprana, estos cambios se aceleran inducidos por una disminución en los niveles de SIRT1, mientras que la subnutrición aumenta los niveles de SIRT1 produciendo un retraso del inicio de la pubertad. Asimismo, la sobreexpresión de SIRT1, ya sea globalmente o dirigida al núcleo ARC, reproduce el retraso puberal provocado por la subnutrición (276).

3.2. FACTORES PERIFÉRICOS IMPLICADOS EN EL CONTROL METABÓLICO DE LA REPRODUCCIÓN: LEPTINA, INSULINA, GHRELINA

Como se ha comentado en epígrafes previos, diversas señales periféricas van a transmitir la información metabólica a los centros del SNC implicados en el control de la reproducción y la homeostasis energética del organismo. Estas señales periféricas proceden fundamentalmente del tejido adiposo, del páncreas y del tracto gastrointestinal.

○ LEPTINA

Como se ha descrito en apartados anteriores, la leptina es una señal de suficiencia energética con un papel clave en el control metabólico de la reproducción. En humanos y roedores, mutaciones inactivantes que afectan a la señalización de leptina producen bajos niveles de gonadotropinas y esteroides gonadales, además de ausencia o retraso de maduración puberal e infertilidad. Además, condiciones de insuficiencia de leptina, como anorexia o desnutrición, se relacionan con retraso o ausencia del inicio de la pubertad y fertilidad alterada (276, 279). Sin embargo, situaciones que cursan con niveles supra-fisiológicos de esta hormona, como la obesidad mórbida, también afectan negativamente al correcto funcionamiento del eje reproductor. En este sentido, se ha demostrado en pacientes obesos una correlación inversa entre los niveles circulantes de leptina y T, ya que la leptina induce una disminución de la síntesis de T a través de la inhibición de la esteroidogénesis gonadal (2).

A pesar la controversia inicial sobre la naturaleza real de las acciones de leptina en el eje HHG, actualmente se asume que la leptina desempeña un papel permisivo importante en la activación metabólica de la pubertad y la fertilidad. En este sentido, se requieren unos niveles umbrales de leptina para la adquisición y mantenimiento de la capacidad reproductiva (247, 276). Este papel permisivo se documentó en estudios que muestran que el reemplazo de leptina en roedores y humanos que sufren deficiencia de leptina revierte el estado de impuberismo, sin adelantar sustancialmente la edad de llegada de la pubertad (280).

Debido a la ausencia de receptores funcionales de leptina en las neuronas GnRH, la leptina transmite la información metabólica a estas neuronas a través de receptores localizados en neuronas Kiss1, NPY/AgRP, POMC/CART y neuronas productoras de GALP Y NO (276, 281). Este aspecto ha sido desarrollado en más detalle en la Sección 2.2.1. de esta Tesis Doctoral.

○ INSULINA

La insulina es una señal anorexigénica que tiene un papel estimulador del eje gonadotrópico. En este sentido, se ha demostrado que los ratones con ablación neuronal de receptores de insulina (ratones NIRKO) son obesos y muestran un profundo hipogonadismo debido a la deficiencia de GnRH (192). Igualmente, niveles bajos o nulos de insulina, se asocian con niveles suprimidos de gonadotropinas, recuperándose esta secreción tras la administración de insulina a nivel central (281).

Tras estos hallazgos, se propuso que esta hormona podría desempeñar sus acciones en el control de la función reproductora interaccionando directamente con sus receptores

localizados en las neuronas GnRH. No obstante, tras ablación selectiva de los receptores de insulina específicamente en estas neuronas, la función reproductora no se vio alterada en ratones macho y hembra (282). De modo que, la insulina modula la actividad neuro-secretora de GnRH principalmente de manera indirecta, interaccionando con sus receptores localizados en neuronas Kiss1, NPY/AgRP, POMC/CART y GABA (281).

○ **GHRELINA**

La ghrelina es una señal anorexigénica que ejerce un efecto inhibitor del eje reproductor tanto a nivel central como periférico (211). En este sentido, se ha demostrado que la administración central de ghrelina en roedores de ambos sexos produce un retraso de diferentes índices de maduración puberal, siendo este efecto menos sensible en hembras (2, 283). Además, la administración central o periférica de esta hormona produce una supresión de los niveles de gonadotropinas en diferentes especies de ambos sexos y en ratas OVX (284-286).

A nivel periférico, la ghrelina además es capaz de inhibir la síntesis de esteroides gonadales suprimiendo parcialmente la expresión de genes implicados en este proceso (287, 288).

4. AMPK

La proteína quinasa activada por AMP, denominada AMPK, se considera el principal sensor energético a nivel celular y está implicado en la regulación de numerosos procesos metabólicos y fisiológicos, entre los que destaca la homeostasis energética (289). Es una serina/treonina quinasa con una subunidad catalítica α (con dos isoformas, $\alpha 1$ y $\alpha 2$) y dos subunidades reguladoras, llamadas β y γ (290). AMPK se activa mediante la fosforilación en Thr172 de la subunidad α , un proceso que puede estar regulado de manera alostérica por AMP y también catalizado por varias quinasas, como la quinasa hepática B1 (LKB1) y las quinasas dependientes de calmodulina, especialmente CaMKK β , o puede inhibir la defosforilación por proteínas fosfatasa, como 2C α (PP2Ca) (291).

El proceso de activación se produce en respuesta a un incremento en los ratios intracelulares de AMP:-ATP y ADP:-ATP. El efecto principal de la activación de AMPK es generar ATP para el mantenimiento de la homeostasis energética celular. En este sentido, tras la fosforilación de AMPK, los procesos catabólicos (que producen ATP) se activan, como la oxidación de ácidos grasos libres, la biogénesis mitocondrial y la autofagia, mientras que las rutas anabólicas, que consumen ATP, se inhiben, como la síntesis de ácidos grasos, carbohidratos y proteínas (**Figura 14**) (292).

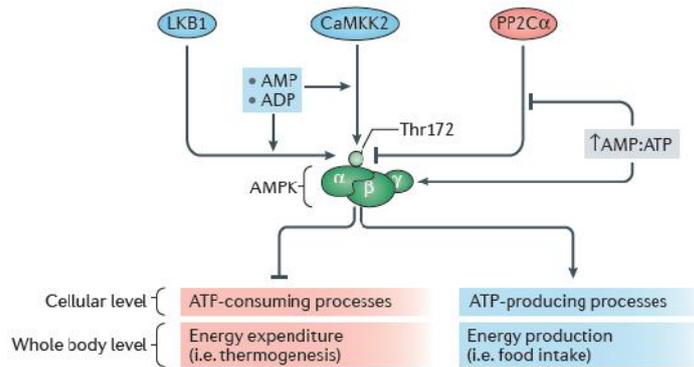


Figura 14. Estructura y regulación de AMPK. Tomado de López, M, Nogueiras, R, Tena-Sempere, M y Diéguez, C. 2016. Nature Review Endocrinology (191).

En cuanto al metabolismo de los ácidos grasos, AMPK fosforila a la proteína acetil-CoA carboxilasa (ACC), lo que inhibe la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA, siendo este último metabolito el sustrato de la sintasa de ácidos grasos y, por lo tanto, un precursor de la síntesis de estos. Además, la malonil-CoA es un inhibidor de la enzima CPT1 que transporta los ácidos grasos a las mitocondrias para su oxidación (289).

4.1. AMPK EN EL CONTROL DE LA HOMEOSTASIS METABÓLICA

A nivel hipotalámico, AMPK está implicado en la homeostasis energética del organismo, principalmente a través de la regulación de la ingesta y el gasto energético, que se desarrollarán en detalle en los siguientes apartados.

4.1.1 AMPK HIPOTALÁMICO Y REGULACIÓN DE LA INGESTA

Los primeros trabajos que describieron el papel de AMPK en la regulación central del balance energético mostraron que hormonas clave implicadas en el control de la ingesta, como la leptina y la ghrelina, pueden modular la actividad de AMPK, a nivel hipotalámico, regulando el apetito. Así, la leptina inhibe la actividad de AMPK, mientras que la ghrelina la estimula (289). Además, estudios adicionales demostraron que el ayuno produce un incremento de la actividad de AMPK en numerosas regiones hipotalámicas, así como un aumento en la ingesta y el peso corporal, mientras que el cese del ayuno disminuye la actividad de AMPK en estas regiones hipotalámicas y se reduce la ingesta y el peso corporal (293).

En la misma línea, se ha demostrado que la inhibición del AMPK hipotalámico, produce una disminución de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos AgRP y NPY en el núcleo ARC. Por el contrario, la sobreexpresión AMPK produce el aumento de la expresión de AgRP y NPY en éste núcleo y de MCH en el LHA (294). Estudios adicionales en ratones con eliminación específica de AMPKα2 en neuronas POMC o AgRP del núcleo ARC, mostraron que mientras que la eliminación de AMPKα2 en las neuronas POMC produce obesidad asociada a hiperfagia, los ratones AgRP AMPKα2 KO

desarrollan un fenotipo delgado. Además, aunque ambas líneas mantenían su capacidad de responder a leptina e insulina, éstas perdieron su capacidad de respuesta a las alteraciones en las concentraciones extracelulares de glucosa, revelando un papel fundamental de AMPK como sensor de glucosa (293).

Además de los factores anteriormente indicados, AMPK responde en el hipotálamo a distintos estímulos y señales hormonales implicadas en el control de la ingesta. Así, factores anorexigénicos, como leptina (a través de las neuronas POMC), insulina, glucagón, GLP-1, E2 (a través de su interacción con ER α en las neuronas POMC) y colecistoquinina, inhiben la actividad de AMPK en el hipotálamo. Por el contrario, señales orexigénicas como ghrelina (a través de la inhibición de la síntesis de ácidos grasos), adiponectina, glucocorticoides, endocannabinoides y AgRP, incrementan su actividad (**Figura 15**) (191).

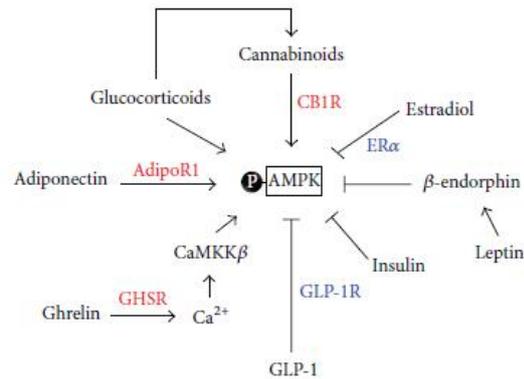


Figura 15. Factores moduladores de la actividad de AMPK en la ingesta. AdipoR1, receptor de adiponectina; GHSR, receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento; CaMKK β , quinasa dependiente de calmodulina; CB1R, receptor cannabinoide tipo 1; ER α , receptor de estrógenos α ; GLP-1R, receptor del péptido similar al glucagón tipo 1. Tomado de Huynh, MK *et al.* 2016, Neural Plast (295).

Además de actuar en el núcleo ARC, evidencias recientes han demostrado que AMPK modula la preferencia en el consumo de carbohidratos en el PVN (296). Sin embargo, a pesar del innegable papel de AMPK en la modulación de la ingesta, varios estudios sugieren que los efectos del AMPK hipotalámico en los cambios de peso corporal probablemente están más asociados con cambios en el gasto energético que con una modificación de la ingesta, aspecto que será desarrollado en el siguiente epígrafe.

4.1.2. AMPK HIPOTALÁMICO Y REGULACIÓN DE LA TERMOGÉNESIS

Numerosos estudios recientes sugieren que el AMPK hipotalámico tiene un papel clave en la modulación de la termogénesis del BAT a través de su acción reguladora sobre el SNS. En este sentido, se ha demostrado que la administración de la hormona tiroidea, T3, en el núcleo VMN, produce una disminución de la actividad de AMPK induciendo una respuesta termogénica en el BAT. Y la activación de AMPK en este núcleo reduce la activación del BAT y evita la pérdida de peso asociada con la acción central de T3 (297).

Asimismo, los estrógenos son capaces de activar la termogénesis del BAT induciendo cambios en la actividad de las neuronas que expresan el factor esteroideogénico 1 (SF1) en el núcleo VMN (289). De manera que, la activación virogenética de AMPK, selectivamente en el núcleo VMN, bloquea el aumento de la actividad termogénica del BAT y la pérdida de peso corporal asociados a la administración central de E2 (236). Además, es importante destacar que las fluctuaciones en los niveles de E2 durante el ciclo ovárico y el embarazo también modulan esta vía (235, 236).

Por tanto, dependiendo del estado de activación de AMPK, este va a responder en el hipotálamo a distintos estímulos y señales hormonales para regular gasto energético a través la termogénesis del BAT. De manera que, distintas señales como hormonas tiroideas, E2, proteínas morfogenéticas óseas (BMP8B), GLP-1, glucosa, leptina, insulina y ghrelina modulando la actividad termogénica del BAT en el VMN, y más específicamente en las neuronas que expresan SF1, a través de la modulación del tono simpático (**Figura 16**) (293).

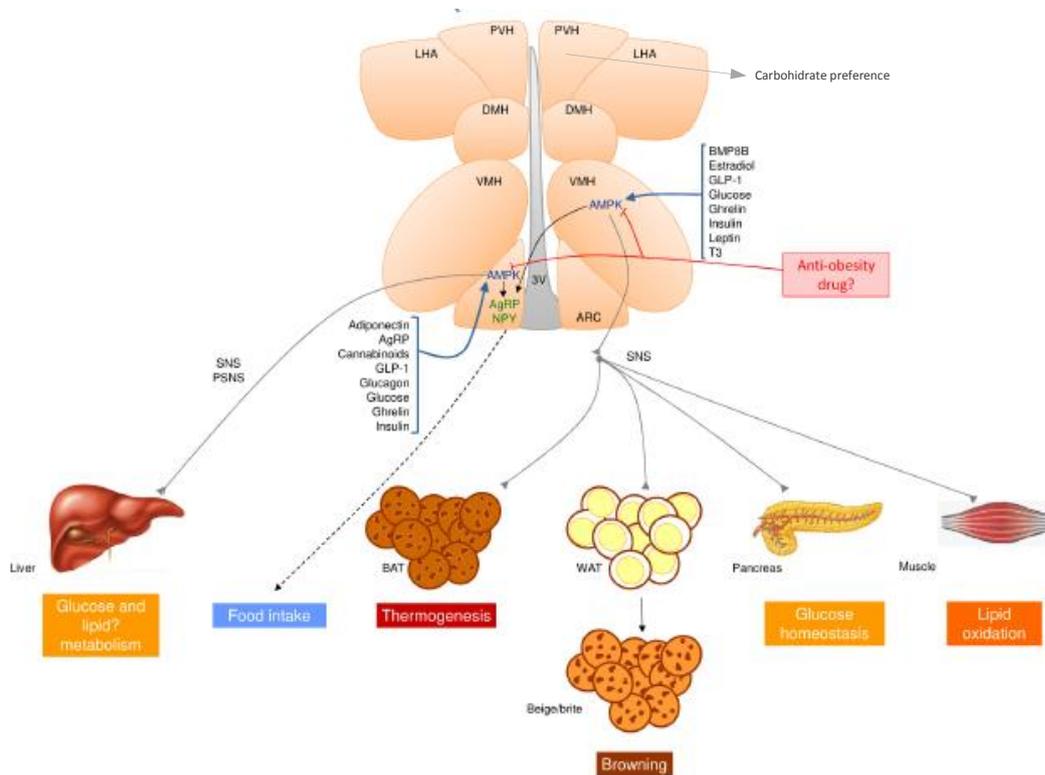


Figura 16. Señalización de AMPK hipotalámico en la regulación de la ingesta y el gasto energético. AMPK detecta varios estímulos nutricionales y hormonales para regular la ingesta, el metabolismo, la termogénesis del BAT, el *browning* del WAT, la homeostasis de la glucosa y la síntesis de lípidos y glucógeno en el músculo esquelético. Las acciones del AMPK hipotalámico en tejidos y órganos, como el BAT, WAT e hígado, están mediadas por la regulación específica de SNS y parasimpático (PSNS). Tomado de López, M. Eur J Endocrinol. 2018. (298).

4.2. PAPEL DE AMPK EN EL CONTROL INTEGRADO DEL BALANCE ENERGÉTICO Y LA REPRODUCCIÓN

Debido a la existencia de numerosas señales reguladoras de AMPK hipotalámico en el balance energético, es lógico asumir que este sensor podría actuar como elemento de conexión entre el metabolismo y la reproducción, ya que, como se ha apuntado previamente en esta Tesis esta última función corporal es altamente sensible al estado energético del organismo y está controlada activamente por hormonas metabólicas, como la leptina y la ghrelina (247).

En este sentido, estudios recientes han sugerido que AMPK opera como una vía clave que informa al eje HHG en situaciones de insuficiencia energética (2). Como se indicó previamente en esta Tesis, cuando las reservas energéticas disminuyen, se produce una inhibición temporal y reversible del eje reproductor, lo que favorece la supervivencia individual al evitar condiciones altamente demandantes desde punto de vista energético (299). Sin embargo, aún no se conocen en profundidad las redes neuronales y las bases moleculares de los mecanismos que intervienen en este fenómeno fisiológico. A la luz de evidencias recientes, en situaciones de déficit energético, AMPK podría actuar como un regulador negativo del eje reproductor a nivel central. Así, estudios *in vitro* en la línea celular murina de GnRH, GT1-7, mostraron que la activación farmacológica de AMPK es capaz de inhibir la secreción de GnRH y la expresión de *Kiss1*, esta última tras activación de AMPK mediante adiponectina (300, 301).

Además, estudios electrofisiológicos han documentado que AMPK podría actuar en neuronas GnRH como un sensor de glucosa. Así pues, la activación de AMPK en condiciones de déficit de glucosa parece desempeñar un papel relevante en la disminución de la actividad secretora de GnRH en situaciones de glucoprivación (302). Por otro lado, experimentos *in vivo* en ratas adultas demostraron que la activación de AMPK, mediante el uso de agonistas, altera la ciclicidad ovárica disminuyendo el intervalo entre ciclos estrales (300). Todo ello apunta a un papel de AMPK hipotalámico en el control metabólico del eje reproductor, cuya naturaleza, importancia fisiológica y principales sitios de acción permanecen en gran medida desconocidos. Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral viene a abordar el estudio del posible papel de la señalización de AMPK hipotalámica en el control de la función del eje gonadotrópico, así como su modulación por señales metabólicas, mediante la manipulación de su señalización en neuronas *Kiss1* y GnRH. Adaptar este párrafo al final de este apartado.

5. PROGRAMACIÓN TEMPRANA DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA Y METABÓLICA

La salud de un individuo adulto puede verse influenciada por procesos que acontecen en etapas tempranas del desarrollo. En este sentido, es preciso destacar un proceso clave denominado fenómeno de programación temprana, mediante el cual el individuo está expuesto durante etapas tempranas del desarrollo a numerosos factores medioambientales que pueden “programar” el sistema regulador de energía induciendo cambios permanentes que aumentarán la susceptibilidad del individuo al desarrollo de algunas enfermedades durante la edad adulta. Este fenómeno puede darse en las etapas intrauterina y postnatal y produce efectos perjudiciales como hiperfagia, obesidad y/o resistencia a insulina, entre otros (303).

Las implicaciones de este proceso de programación temprana se demostraron mediante estudios realizados en humanos, en los que se asociaba un peso corporal bajo al nacimiento con el riesgo de padecer enfermedades cardíacas y desórdenes metabólicos en la edad adulta, efectos mediados por una programación fetal alterada (304).

Entre otros factores, diversas formas de estrés nutricional durante etapas iniciales del desarrollo pueden dar lugar a este proceso de programación temprana alterada. En este sentido, la desnutrición materna, inducida por dieta baja en proteínas o por restricción calórica durante la gestación y la lactancia, provoca también cambios importantes en la estructura y función de distintos órganos de la descendencia, presentando alteraciones en el tamaño de los islotes pancreáticos, la vascularización de éstos, la capacidad de proliferación celular y alteraciones en la sensibilidad a insulina en el músculo, así como concentraciones elevadas de insulina durante los periodos críticos de desarrollo (305).

De forma análoga, en ratas neonatales de madres con diabetes gestacional se detectan alteraciones en la formación de los núcleos hipotalámicos seguidos de hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa, tanto en el periodo juvenil como en edad adulta (306). En conjunto, los resultados en modelos animales indican que incluso las intervenciones breves en la dieta durante los primeros periodos del desarrollo posnatal tienen implicaciones en la salud, que se hacen evidentes en la edad adulta.

Ha sido muy importante el uso de modelos animales para determinar los mecanismos relacionados con la programación postnatal temprana. En concreto, la rata, es una especie inmadura en el momento del nacimiento, por lo que habrá una maduración de la mayoría de los órganos y sistemas tras el mismo y se va a extender desde la etapa prenatal hasta la etapa postnatal temprana (307). De esta forma, se ha demostrado que la cantidad de alimento ingerido durante el periodo de lactancia condiciona el

patrón de ingesta en etapas posteriores del desarrollo (308). Además, experimentos en modelos de sobrenutrición posnatal llevados a cabo en ratas en las cuales se ha incrementado la ingesta calórica durante la lactancia mediante la reducción en el tamaño de la camada (4 crías/madre), han demostrado el desarrollo de alteraciones a largo plazo, como dislipemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia o un incremento del peso y adiposidad (303). Asimismo, datos de estudios en humanos, han demostrado que se produce un mayor riesgo de presentar sobrepeso en edad adulta asociado al incremento de peso corporal mostrado durante los primeros meses de vida (309). Además de estas alteraciones metabólicas presentadas en la edad adulta, resultados recientes de nuestro grupo, han demostrado que la sobrenutrición posnatal en ratas de ambos sexos también provoca una inhibición del eje gonadotrópico que se asocia a una supresión de la expresión de *Kiss1* en el núcleo ARC (5, 257).

Adicionalmente, diversas evidencias experimentales sugieren que cambios en la programación temprana, en respuesta a modificaciones en la cantidad de esteroides sexuales circulantes durante etapas críticas del desarrollo, contribuyen también a un incremento en el riesgo de desarrollo posterior de enfermedad metabólica, debido a la alta sensibilidad que presenta el eje gonadotrópico a los efectos de los esteroides sexuales durante los primeros periodos de maduración. Estos esteroides exógenos pueden afectar a nivel central y/o periférico para interferir en el proceso de diferenciación sexual y la posterior maduración del eje reproductor, que entre las alteraciones endocrinas que se producen en humanos y otras especies, pueden ocasionar cambios en la llegada a la pubertad y algunas formas de infertilidad, debido a una alteración de la función central (a nivel hipotalámica) que controla el eje reproductor (303).

Así, exposiciones inadecuadas a esteroides sexuales durante los periodos de maduración temprana, por ejemplo, una androgenización excesiva en durante la vida intrauterina en humanos, se han relacionado con el desarrollo de resistencia a insulina y PCOS (310). Estas observaciones se ampliaron en modelos de roedores, mediante estudios que sugieren que la administración prenatal o posnatal temprana de andrógenos induce el desarrollo de resistencia a insulina y obesidad en la edad adulta (242). Por lo tanto, las hormonas gonadales probablemente influyen en la homeostasis metabólica a través de múltiples vías, y pueden considerarse como auténticos modificadores de la homeostasis metabólica y la flexibilidad fenotípica, pudiendo contribuir a generar diferencias en la susceptibilidad al desarrollo de diabetes y alteraciones asociadas. Sin embargo, el curso temporal de las alteraciones metabólicas inducidas por fenómenos de programación temprana, alterada por exposiciones inadecuadas a esteroides gonadales, así como su interacción con otros factores obesogénicos, permanece en gran medida desconocido; aspecto que centra algunos de los objetivos de la presente Tesis Doctoral.

---OBJETIVOS---

OBJETIVOS

La reproducción está regulada de manera muy precisa por sistemas de control específicos, que integran señales tanto de origen central como periférico, que incluyen a los factores gonadales y a distintas hormonas que informan del estado metabólico del organismo. En este sentido, cambios nutricionales, como situaciones de estrés metabólico, y niveles inapropiados de hormonas sexuales en determinados periodos del desarrollo, pueden contribuir a desencadenar alteraciones metabólicas y a modificar de manera permanente la función reproductora.

El conocimiento de los mecanismos que subyacen a la estrecha interrelación entre el estado metabólico del organismo y la función del eje reproductor, incluyendo tanto la pubertad como la función gonadal en la edad adulta, tiene un considerable interés fisiológico y fisiopatológico. De hecho, en las últimas décadas se han venido detectando cambios en la edad de pubertad y perturbaciones de la fertilidad en humanos, que se están produciendo a través de mecanismos desconocidos, pero en los que las alteraciones metabólicas parecen ser un factor contribuyente importante. Destacablemente, las perturbaciones de la edad puberal conllevan un mayor riesgo de desarrollo de enfermedades diversas en etapas posteriores de la vida, incluyendo patologías cardiometabólicas, y se asocian incluso a una menor esperanza de vida. Por otro lado, la obesidad puede asociarse a hipogonadismo, especialmente en el sexo masculino, lo que a su vez parece contribuir a consolidar o agravar las co-morbilidades del sobrepeso. Todo ello hace necesario un mejor conocimiento de las complejas interacciones bidireccionales entre el estado metabólico y la función reproductiva, las bases neuroendocrinas de dichas interacciones, y los mecanismos moleculares que conectan ambos sistemas corporales relevantes.

En este contexto, el **OBJETIVO GENERAL** de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en la caracterización de las interacciones dinámicas entre el estado metabólico del organismo y aspectos clave de la maduración y la función reproductora. En este contexto, en esta Tesis se ha prestado especial atención a la definición del impacto de cambios en la función gonadal y la exposición a factores obesogénicos sobre el perfil endocrino-metabólico en la edad adulta y a la evaluación del posible papel del sensor energético celular, AMPK, actuando en las neuronas GnRH y Kiss1, en el control metabólico de la función reproductora.

Para la consecución de este objetivo general, se fijaron los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

- ✓ Explorar el impacto sobre la función metabólica y gonadotrópica de la sobrenutrición postnatal, a fin de definir el curso temporal de los efectos

endocrino-metabólico de dicha manipulación obesogénica, en modelos preclínicos de ambos sexos.

- ✓ Analizar, en ratas hembra, el impacto sobre la homeostasis energética y la función gonadotrópica adulta del efecto combinado de la alteración del ambiente esteroideo neonatal y la sobrenutrición postnatal.
- ✓ Estudiar, en modelos preclínicos (rata) de ambos sexos, las consecuencias metabólicas y gonadotrópicas del efecto de la ausencia de esteroides gonadales, combinada o no con sobrealimentación postnatal y dieta rica en grasas.
- ✓ Caracterizar el papel de sensor metabólico AMPK en neuronas GnRH, en el control metabólico de la función reproductora, empleando un modelo murino de ablación selectiva de la señalización de AMPK específicamente en esta población neuronal.
- ✓ Evaluar si la señalización por AMPK en las neuronas Kiss1 participa en el control metabólico de la pubertad y la función gonadotrópica adulta, empleando un modelo murino genéticamente modificado, deficiente en AMPK específicamente en las neuronas Kiss1.

--- MATERIALES Y ---
MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han utilizado ratas macho y hembra de la cepa Wistar criadas en el animalario de la Universidad de Córdoba. Adicionalmente, se emplearon dos líneas de ratones genéticamente modificados, generados en el animalario de la Universidad de Córdoba, con ablación específica de la subunidad catalítica $\alpha 1$ de AMPK específicamente en neuronas Kiss1 o GnRH, cuya generación se detalla en el apartado 1.1. y 1.2.

El día del nacimiento de los animales se consideró como día 1 de vida. En algunos casos, el tamaño de la camada (número de crías/madre) se modificó de acuerdo al diseño experimental, usándose un tamaño estándar de camada de 12 crías/madre (NL; *Normal Litter*) en condiciones normales y de 4 crías/madre (SL; *Small Litter*) en los modelos de sobrenutrición posnatal. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de luz constante (14 h. de luz, desde las 7:00 a.m. /10 h. de oscuridad) y temperatura (22°C). Los animales se destetaron el día 23 de vida postnatal (PND 23), teniendo acceso libre al agua y siendo alimentados con una dieta control (CD) o una dieta alta en grasas (HFD), ambas suministradas por Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ). La CD (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. Todos los protocolos de experimentación realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Córdoba y llevados a cabo de acuerdo a la Normativa de la Unión Europea para el uso y cuidado de animales de experimentación (Directiva 2013/53/UE en febrero de 2013).

Por último, es preciso destacar, que en esta Tesis Doctoral se realizaron todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales empleados.

1.1. GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA LÍNEA DE RATÓN CON ABLACIÓN SELECTIVA DE AMPK $\alpha 1$ EN NEURONAS KISS1: EL MODELO KAMKO

Para la generación de esta línea de ratones se cruzaron ratones transgénicos que expresaban la proteína Cre recombinasa bajo el promotor del gen Kiss1 (el ratón Kiss1-Cre/GFP; (311)), con ratones que presentaban secuencias loxP flaqueando al exón 3 de la subunidad catalítica $\alpha 1$ de la proteína AMPK (el ratón AMPK $\alpha 1$ loxP/loxP ; (312)).

El cruce de ambas líneas, produce el reconocimiento y recombinación de las secuencias LoxP que flanquean al exón 3 de AMPK $\alpha 1$, por parte de la Cre recombinasa,

lo cual determina la pérdida de la señalización por AMPK α 1 específicamente en las neuronas Kiss1. Esta estrategia Cre-LoxP se presenta en la **Figura 17**.

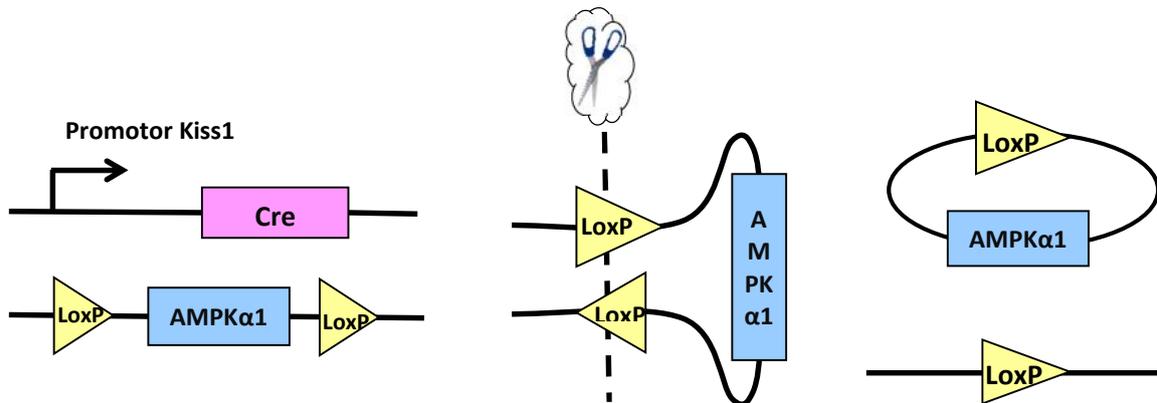


Figura 17. Esquema representativo de la estrategia utilizada para la generación de ratones KAMKO.

Para la obtención de los ratones utilizados en los experimentos descritos en esta Tesis Doctoral, se cruzaron animales homocigotos portadores de dos alelos con el exón 3 de AMPK α 1 flanqueados por sitios loxP (AMPK α 1 *loxP/loxP*) con ratones con una copia de Cre bajo el promotor de Kiss1 y un solo alelo del exón 3 de AMPK α 1 flanqueado por sitios loxP (Kiss1-Cre^{+/+}; AMPK α 1 *loxP/-*). De la descendencia resultante de este cruce, se utilizaron para los experimentos ratones AMPK α 1 *loxP/loxP* que fueron considerados como Control y ratones con ablación selectiva de la señalización por AMPK α 1 en células Kiss1 (Kiss1-Cre^{+/+}; AMPK α 1 *loxP/loxP*) que para mayor simplicidad se denominarán KAMKO en adelante. La identificación de los animales control y KAMKO se realizó mediante el genotipado de los ratones generados, como se describe en el apartado 1.3.

Con el objetivo de validar la delección específica de AMPK α 1 en nuestro modelo, se realizaron análisis de PCR en diferentes áreas hipotalámicas (POA y ARC) que contienen poblaciones de neuronas Kiss1, y en áreas donde no se ha descrito la presencia de expresión del gen Kiss1, concretamente en el córtex. La ocurrencia de recombinación, y con ello, la delección efectiva del exón 3 de AMPK α 1 se detecta por la presencia de una banda de 530 pb, mientras que la ausencia de recombinación resulta en la amplificación de un fragmento de 1300 pb. Como nota aclaratoria, esta última banda se amplifica en todas las muestras analizadas ya que existen células con ausencia de Cre, y por tanto de recombinación, en todos los casos. Los resultados de PCR detectaron la presencia recombinación en el POA y el ARC, pero no en el córtex, de dos ratones KAMKO independientes. Por el contrario, los ratones controles no presentaron evidencias de recombinación en ninguna de las áreas cerebrales analizadas. (**Figura 18**).

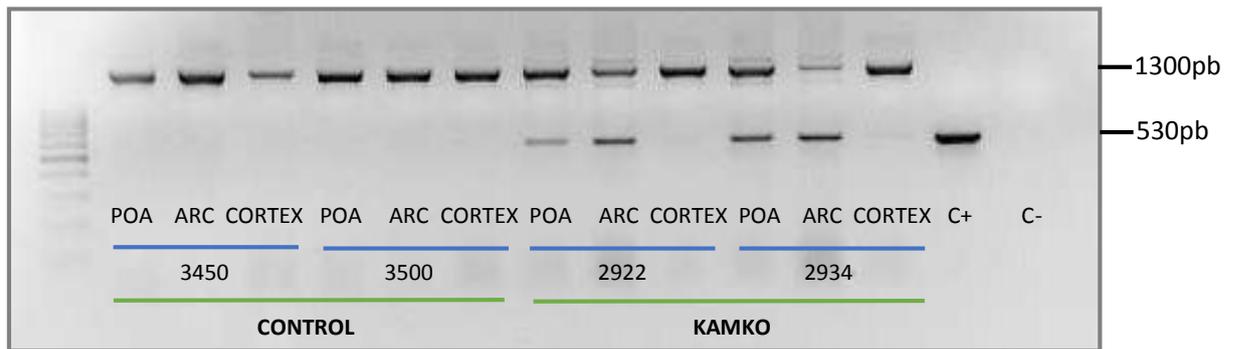


Figura 18. Imagen de un gel de agarosa que muestra la validación de una línea de ratón con ablación selectiva de AMPK específicamente en neuronas Kiss1. La imagen muestra el fragmento recombinante (530 pb), obtenido mediante PCR, que demuestra la presencia de células en el POA y el ARC de ratones KAMKO en las que se ha producido la delección del exón 3 de AMPK α 1.

1.2. GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MODELO DE RATÓN CON AUSENCIA SELECTIVA DE AMPK α 1 EN NEURONAS GnRH: EL MODELO GAMKO

Adicionalmente generamos una línea de ratones transgénicos con ablación congénita de actividad AMPK α 1 específicamente en neuronas GnRH, mediante el cruce de ratones transgénicos que expresaban la proteína Cre recombinasa bajo el promotor del gen GnRH, el cual había sido introducido en el genoma con un cromosoma bacteriano (el ratón GnRH-Cre; (313)), con ratones que presentaban secuencias loxP flaqueando al exón 3 de la subunidad catalítica α 1 de la proteína AMPK (el ratón AMPK α 1 *loxP/loxP*; (312)). La estrategia usada es la misma que en el caso del ratón KAMKO y que aparece en la **Figura 17**.

Para la generación de los ratones empleados en los ensayos descritos en esta Tesis Doctoral, se cruzaron ratones homocigotos portadores de dos alelos con el exón 3 de AMPK α 1 flanqueados por sitios loxP (AMPK α 1 *loxP/loxP*), con ratones que expresan Cre bajo el promotor de GnRH y dos alelos del exón 3 de AMPK α 1 flanqueados por sitios loxP (GnRH-Cre; AMPK α 1 *loxP/loxP*). De la descendencia obtenida de este cruce, se emplearon para los ensayos ratones AMPK α 1 *loxP/loxP* que fueron considerados como control, y ratones con ausencia de señalización por AMPK α 1 específicamente en neuronas GnRH (GnRH-Cre; AMPK α 1 *loxP/loxP*), que se nombrarán como ratones GAMKO en adelante. La identificación de los animales control y GAMKO se realizó mediante el genotipado de los ratones generados, como se describe en el apartado 1.3.

Con el fin de validar la eliminación específica de AMPK α 1 en nuestro modelo, se realizaron análisis de PCR en la región hipotalámica donde se localiza la población principal de neuronas GnRH, el POA, y en el córtex, donde no se encuentra ninguna población de neuronas GnRH. Los análisis de PCR detectaron la presencia de la banda

recombinante de 530 pb exclusivamente en el POA ratones GAMKO, mientras que ésta no aparecía ni en el córtex de los ratones GAMKO ni en ninguna de las muestras analizadas en los ratones control. Sin embargo, en todos los casos apareció un amplicón de 1300 pb que demuestra la presencia de neuronas Cre-negativas en todas las muestras y que sirve como control de carga (**Figura 19**).

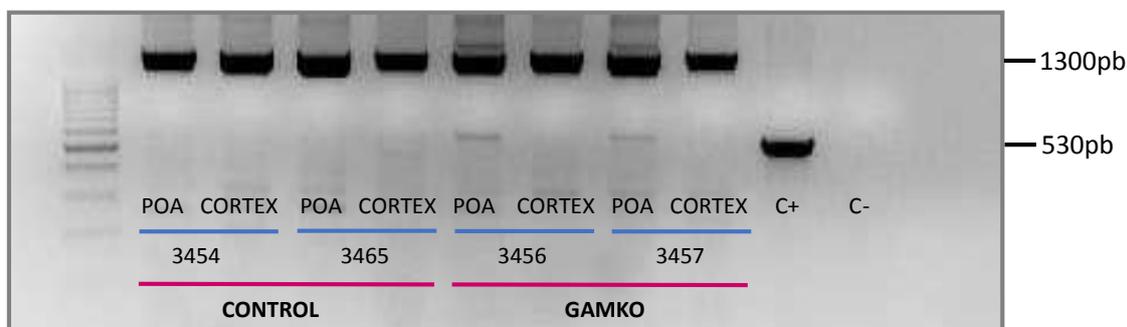


Figura 19. Imagen de un gel de agarosa donde se muestra la validación de una línea de ratón con ablación selectiva de AMPK en neuronas GnRH. La figura ilustra, mediante detección por PCR, la banda recombinante (530 pb) que demuestra la presencia de células en el POA de ratones GAMKO en las que se ha producido la delección del exón 3 de AMPK α 1.

1.3. GENOTIPADO

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico se aisló de una biopsia de tejido procedente de la oreja de los ratones. El tejido obtenido se sometió a un proceso de digestión en buffer de lisis [1M Tris HCl pH= 8,5; 0,5M EDTA pH=8; SDS al 10% y 1M NaCl y proteinasa K 20 mg/ml (Promega, Madison, WI, USA)] a 55°C para la ruptura de las membranas celulares y la degradación de proteínas agitándose durante cada 20-30 minutos hasta la completa digestión del tejido. Seguidamente, se centrifugó y se recogió el sobrenadante que contiene el ADN. Una vez aislado, el ADN genómico se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Finalmente, se dejó secar el pellet de ADN y se reconstituyó con agua libre de nucleasas en un volumen de 50 μ l, conservándose a -20°C hasta su uso posterior.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para el genotipado de los ratones, mediante amplificación por PCR de secuencias específicas, se tomaron 4 μ l de la dilución final de ADN genómico sobre los que se llevaron a cabo reacciones de PCR mediante el uso de cebadores específicos. Para detectar la presencia o ausencia de sitios LoxP flanqueando el exón 3 de AMPK α 1 se emplearon los cebadores **11528** y **11529**, validados por el Servicio de Genotipado de Transgénicos de *The Jackson Laboratory*. En combinación con el cebador 11528, se

utilizó un cebador adicional llamado **allele nule**, para detectar la presencia del alelo deleciónado tras la recombinación (ver apartado 1.1. y 1.2.).

En caso de los ratones transgénicos con expresión específica de Cre recombinasa en neuronas Kiss1, se utilizaron los primers **1614 new**, **1326** y **WTRP** cuya combinación detecta la presencia de Cre recombinasa o del alelo wild type para el Kiss1. En el caso del modelo GnRH-Cre, se usaron los cebadores **CreF1** y **CreR1** para detectar la presencia o ausencia de Cre recombinasa en neuronas GnRH.

Para la reacción de PCR 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 8 mM dNTPs (CANVAX).
- 1 µl de cada primer específico 10 mM (IDT).
- 2.5 unidades (0.25 µl) de ADN polimerasa (GoTaq G2 flexi DNA Polymerase, Promega).
- 4µl de ADN genómico molde.
- Agua libre de nucleasas.

El volumen final de la reacción fue de 50 µl y las secuencias de los cebadores utilizados para el genotipado fueron las siguientes:

	Primer	Secuencia 5' → 3'	Tamaño amplicón
AMPKα1	11528	CCC ACC ATC ACT CCA TCT CT	334 pb
	11529	AGC CTG CTT GGC ACA CTT AT	450 pb
	<i>Allele nule</i>	CCC ACA TAG GAA AGC GTG TT	530 pb
Kiss1-Cre	1614 new	GAC CTA GGC TCT GGT GAA G	Alelo WT= 337 pb Alelo Cre= 250 pb
	1326	GGC AAA TTT TGG TGT ACG GTC AG	
	WTRP	GAG CCT CCA GTG CTC ACA GC	
GnRH-Cre	CreF1	CCT GGA AAA TGC TTC TGT CCG	400 pb
	CreR1	CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC	

La reacción de PCR se realizó en un termociclador iCycler iQ[®]5 (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) y consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos 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 62°C para AMPK *loxP/loxP*, 60°C para Kiss-Cre y 55°C para GnRH, durante 30 segundos en los dos primeros casos y 45 segundos para GnRH-Cre, y una extensión

a 72°C durante 40 segundos. A continuación, se aplicó un ciclo final de extensión a 72°C durante 5 min.

Los productos generados tras la PCR fueron cargados 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 se representan en la **figura 20**.

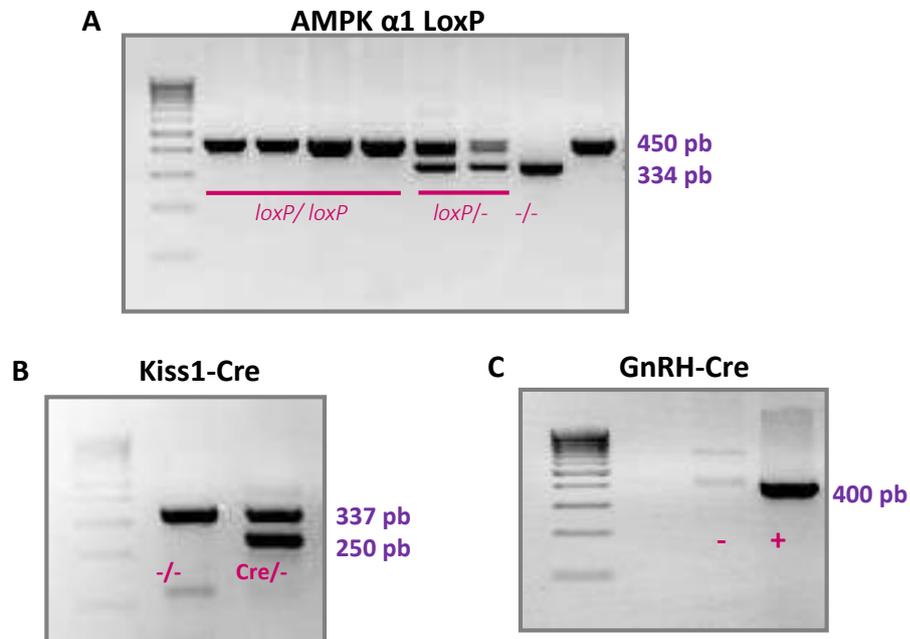


Figura 20. Imagen de un gel de agarosa en el que se muestran los amplicones obtenidos mediante PCR para **(A)** AMPK α 1 *loxP/loxP*, AMPK α 1 *loxP/-* y AMPK α 1 *-/-*, **(B)** Kiss-Cre $^{-/-}$ y Kiss-Cre $^{Cre/-}$ y **(C)** GnRH-Cre $^{-}$ y GnRH-Cre $^{+}$.

2. DROGAS

Para los estudios farmacológicos llevados a cabo en esta Tesis se utilizaron distintas drogas que se detallan a continuación. La Kp-10 (kisspeptina $_{110-119}$ -NH $_2$) de ratón/rata fue obtenida de Phoenix Pharmaceuticals Inc. (Burlingame, CA, Estados Unidos). El propionato de testosterona (PT), el GnRH y la insulina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO). El agonista de los receptores de NK3R (Senktide) fue obtenido de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). La glucosa fue suministrada por Scharlau Chemie S.A. (Sentmenat, España).

Kp-10, GnRH, Senktide e insulina fueron disueltos, inmediatamente antes de su uso, en solución salina (NaCl 0,9%). La glucosa fue disuelta en agua previamente a su administración. El PT se disolvió en aceite de oliva.

3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES

AVITUALLAMIENTO Y TOMAS DE SANGRE PARA LA EVALUACIÓN DE LA PULSATILIDAD DE LH

Los niveles de LH en ratón se midieron tras un periodo de avituallamiento, procedimiento bien desarrollado y validado en el laboratorio de A. E. Herbison (314). Para ello, el día previo al inicio del avituallamiento, se distribuyeron los ratones en un número de 2-3 ratones por jaula y se colocaron elementos de enriquecimiento ambiental en cada caso, que en este caso fueron tubos de cartón. Durante las tres semanas previas a las tomas de sangre, los ratones fueron manipulados diariamente por el mismo personal que iba a realizar el procedimiento de toma de sangre, para su avituallamiento.

Una vez que se encontraron los ratones habituados, se procedió a realizar la toma de muestras, como se ilustra en la **figura 21**, colocando al ratón dentro del tubo de cartón y realizando una pequeña incisión (de 1 mm aproximadamente) con un bisturí, gracias a la cual se tomaron 4 μ l de sangre de la punta de la cola cada 5 minutos durante 3 horas (de 10.00h a 13.00h), recogiendo un total de 36 muestras. Tras la recolección de sangre de la cola se limpió el exterior de la punta de la pipeta para eliminar el exceso de sangre, se diluyó la muestra (4 μ l de sangre) en 46 μ l de buffer PBS-Tween 0,05% y se congeló en hielo seco. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la realización de las determinaciones hormonales empleando la técnica ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) con el objetivo de estudiar la pulsatilidad de LH.

Tras la medición de los niveles de LH por ELISA se registraron los principales parámetros de secreción de LH: nivel basal, medio y total de liberación de LH, así como el número de pulsos de LH en 3 horas. El nivel basal de LH para cada ratón fue determinado como la media de los 5 valores más bajos registrados en 3 horas. Los pulsos de LH se definieron, en animales intactos, como un incremento del 125% desde el valor más bajo hasta el pico de LH. En el caso de los animales gonadectomizados, los pulsos se consideraron como un aumento del 10% sobre el punto anterior. Este criterio hace referencia a la demostración reciente del laboratorio de A.E. Herbison, donde indicaron la existencia de una correlación entre episodios sincronizados de actividad de calcio en las neuronas Kiss1 del ARC con la secreción pulsátil de LH en animales intactos y gonadectomizados (315, 316). Adicionalmente, se calcularon la masa total neta secretada de LH como área bajo la curva (AUC) durante el periodo de estudio (3 h; donde $y=0$) y los valores de delta AUC (ΔAUC), correspondiente al área sobre los niveles basales de LH para cada muestra ($y=$ nivel basal para cada muestra).



Figura 21: Procedimiento experimental de recogida de muestras de sangre de la punta de la cola de un ratón experimental.

ÍNDICES FENOTÍPICOS

Los índices somáticos y reproductivos evaluados incluyeron el peso corporal, la edad de apertura vaginal (AV) y separación balano prepucial (SBP), como marcadores externos de inicio de pubertad de roedores, la edad del primer estro, como marcador de la primera ovulación en roedores, el porcentaje de hembras preñadas, el número de crías por parto, los pesos de ovario y testículo, y los niveles séricos de distintos marcadores hormonales de tipo reproductivo y metabólico. La AV y la SBP se controlaron a diario desde el inicio de los experimentos mediante la observación, en hembras, de la canalización completa de la vagina y de la separación entre el tejido del prepucio y la parte final del pene, en machos. Una vez que se produjo la AV en hembras, se llevó a cabo una monitorización diaria mediante un frotis vaginal para identificar la aparición del primer estro, que en roedores se caracteriza por un predominio de células cornificadas, así como el análisis de la ciclicidad de los animales. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para la evaluación de la ciclicidad ovárica mediante la observación al microscopio de los distintos tipos celulares provenientes del frotis vaginal.

4. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS GENERALES

4.1. CANULACIÓN Y ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR (I.C.V.)

Para inyecciones intracerebrales, a los ratones se les implantaron cánulas para permitir la administración de distintos compuestos en el ventrículo lateral. Los animales fueron canulados 48 horas antes del inicio de los diferentes estudios farmacológicos. Para este fin, 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 (253). Una vez canulados, los animales se mantuvieron en jaulas individuales hasta la finalización de los experimentos y se revisaron diariamente las cánulas de cada animal con el fin de excluir aquellos que mostraran un desplazamiento o pérdida parcial de la cánula. Las dosis de los diferentes compuestos se administraron en un volumen final de 5 μ l.

4.2. GONADECTOMÍA

Ratas adultas de ambos sexos del bloque temático 1 y ratones hembra adultas pertenecientes al bloque temático 2, fueron sometidos a gonadectomía (GNX) bilateral, ovariectomía (OVX) en caso de las hembras y orquidectomía (ORX) en caso de los machos tras anestesia general con ketamina-xilacina. En el caso de hembras, se realizaron incisiones lumbares bilaterales para acceder a la cavidad peritoneal. Tras la localización de los ovarios, se realizó una ligadura del paquete vascular que conecta con las gónadas y se extirparon los dos ovarios. Posteriormente se suturó la capa muscular seguida de una sutura de la piel con hilo quirúrgico. En el caso de machos, la ORX se llevó a cabo por vía abdominal mediante una única incisión en la pared del abdomen. Posteriormente, se desplazaron los testículos desde la cavidad escrotal hacia el abdomen tras tirar con unas pinzas del epidídimo y el tejido adiposo que lo rodea. Seguidamente, se ligó el paquete vascular y se procedió a una extirpación completa de ambos testículo. Finalmente, se suturó la capa muscular y la capa de piel con hilo quirúrgico.

5. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS GENERALES

DETERMINACIONES HORMONALES

RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

Los niveles séricos circulantes de LH y FSH de rata se determinaron usando un método de doble anticuerpo y kits de RIA proporcionados por el National Institutes of Health, NIH (Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA). Las

hormonas LH-I-10 y FSH-I-9 de rata fueron marcadas con I^{125} mediante el método de cloramina-T y las concentraciones de gonadotropinas fueron expresadas usando como referencia curvas de concentración de los estándares LH-RP-3 y FSH-RP-2. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo de ambas hormonas, fueron menores del 8 y 10% para LH y 6% y 9% para FSH, respectivamente. La sensibilidad del ensayo fue de 5 pg/tubo y 20 pg/tubo para LH y FSH, respectivamente. La fiabilidad de las determinaciones hormonales fue confirmada mediante la medida de muestras de suero de rata con concentraciones conocidas de las hormonas de interés. Todas las determinaciones hormonales se hicieron por duplicado en cada muestra.

Los niveles circulantes de leptina e insulina se determinaron mediante el uso de kits comerciales proporcionados por EMD MILLIPORE (St. Charles, MO, USA), procediendo según las indicaciones del fabricante. La sensibilidad de los ensayos fue de 0,801 ng/mL para la leptina y de 0,081 ng/mL para la insulina. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores del 4 y 9%, para la leptina y menores del 5 y 10%, para la insulina.

La lectura de los resultados de LH, FSH, insulina y leptina se realizó en un contador gamma (PerkinElmer 2470 Automatic Gamma Counter WIZARD®).

INMUNOENSAYOS EN SISTEMA BIO-PLEX®

Para algunas de las determinaciones de hormonas metabólicas, como GLP-1 y ghrelina, se utilizó un kit de ensayo de diabetes (Bio-Plex Pro™ Rat Diabetes Assay, Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA), el cual posee una alta sensibilidad y permite la detección de varios marcadores metabólicos en volúmenes pequeños de muestra (15 µl). Estas determinaciones se llevaron a cabo en un lector Bio-Plex® 200 (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA).

En resumen, antes del inicio del ensayo se descongelaron los sueros en hielo y se añadieron las microesferas magnéticas marcadas con el primer anticuerpo específico (ghrelina y GLP-1) a cada pocillo. Posteriormente, se lavó la placa con tampón de lavado y se añadieron las muestras correspondientes a la curva estándar, los controles de calidad internos y las muestras de suero problema, en una dilución 1:4, las cuales se incubaron en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente se lavó la placa y se añadió a cada pocillo el segundo anticuerpo de detección biotinilado, incubándose la placa en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó la placa y se añadió el conjugado estreptavidina-ficoeritrina, actuando la ficoeritrina como un marcador fluorescente. La placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad. Tras el lavado, se añadieron 125 µl del líquido del sistema Bio-Plex y se agitó durante 30 segundos para resuspender la microesferas y asegurar una distribución homogénea de éstas en el

pocillo, antes de su medida en el lector. La sensibilidad del ensayo fue de 0,3 pg/mL para la ghrelina y 3 pg/mL para GLP-1. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron del 4 y 4% para la ghrelina, y del 8 y 6% para GLP-1, respectivamente.

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS (ELISA)

Para las medidas de pulsatilidad de LH en ratones se llevó a cabo un ensayo de ELISA ultrasensible recientemente desarrollado para medir LH en pequeñas fracciones de sangre total (314). Este ensayo es capaz de detectar de manera fiable las concentraciones de LH en una fracción de 4 µl de sangre total.

En resumen, para la realización del ensayo se usaron microplacas de unión de alta afinidad cuyos pocillos fueron cubiertos con 50 µl de anticuerpo de captura (anticuerpo monoclonal bovino, LH β 518B7; L. Sibley; Universidad de California, UC Davis) a una dilución final de 1: 1000 (en 1x PBS, 1,09g de Na₂HPO₄, 0,32g de NaH₂PO₄, y 9g de NaCl en 1000mL de agua destilada) y se incubó durante la noche a 4°C. Para minimizar las uniones no específicas del anticuerpo de captura, los pocillos se incubaron con 200 µl de tampón de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo en 1x PBS con 0,05% de detergente Tween 20) durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Se generó una curva estándar utilizando diluciones seriadas de rLH-RP3 proporcionado por National Institutes of Health, NIH (Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program) en PBS-Tween 20, cubriendo un rango desde 1ng/mL hasta 0,0078125 ng/mL. Esta curva estándar fue cargada en la placa, junto con los controles internos y las muestras de sangre de concentración desconocida que se incubaron durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó la microplaca con 50 µl de anticuerpo de detección primario (anticuerpo policlonal, antisuero de LH de conejo, AFP240580Rb, suministrado por National Institutes of Health, NIH (Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program) a una dilución final de 1: 10 000 durante 90 minutos en agitación a temperatura ambiente. Cada pocillo se incubó con 50 µl de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo, P 0448, Dako Cytomation) a una dilución final de 1: 1000 en 50% de tampón de bloqueo y 50% PBS, en agitación y a temperatura ambiente durante 90 minutos. Tras la incubación, se agregaron 100 µl de o-fenilendiamina (o-Phenylenediamine-tablet, Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO)), sustrato diluido en 30% de H₂O₂ y tampón citrato (monohidrato de ácido cítrico 0,1 M y fosfato de sodio 0,2M a pH 6), y se dejó incubar en oscuridad durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 3M a cada pocillo e inmediatamente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490nm y 650nm utilizando un lector de placas (Bio-Rad iMARK™ microplate reader). La concentración de LH se determinó mediante la interpolación de los valores de densidad óptica frente a una regresión no lineal de la

curva estándar de LH. La sensibilidad del ensayo fue de 0,002 ng/mL. Los controles internos se prepararon usando rLH-RP3 a una concentración de 0,25 ng/mL. Estos se alicuotaron y almacenaron a -20°C y se incluyeron como muestras control entre ensayos para los ELISAS posteriores.

Los niveles de FGF-21 en suero de rata se midieron usando un ensayo de ELISA comercial (MF2100, Mouse/Rat FGF-21 Inmunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA) procediendo según las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 3,81 pg/mL, y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores del 7 y 8%, respetivamente.

PERFIL DE ESTEROIDES SEXUALES

La evaluación del perfil completo de esteroides sexuales en suero de roedores se determinó mediante un método altamente sensible y específico de espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía de gases (GC-MS/MS), llevado a cabo en el Departamento de Medicina Interna y Nutrición Clínica, Academia Sahlgrenska de la Universidad de Gotemburgo, Suecia (317).

La sensibilidad del ensayo fue de 0,3 pg/mL para estradiol, 0,5 pg/mL para estrona, 4 pg/mL para T, 1,6 pg/mL para DHT, 8 pg/mL para P y 4 pg/mL para androstendiona. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron del 2,2 y 4,3% para estradiol, 1,3 y 5,5% para estrona, 1,6 y 2,8% para T, 3 y 4% para DHT, 1,9 y 6,5% para P, y 1,9 y 12,4% para androstendiona.

MEDIDA DE GLUCOSA EN PLASMA

La glucemia basal y tras la sobrecarga de glucosa o insulina se analizó mediante un glucómetro ACCU-CHEK® (Aviva, Roche Diagnostics) en sangre extraída de la cola de los animales. Los valores se expresan en mg/dL.

6. DISEÑOS EXPERIMENTALES

SET EXPERIMENTAL 1

6.1. IMPACTO METABÓLICO Y REPRODUCTIVO DE LA MANIPULACIÓN DEL AMBIENTE ESTEROIDEO NEONATAL Y DE LA SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL

Los cambios nutricionales y la exposición inadecuada a las hormonas sexuales durante los primeros años de vida pueden contribuir al desarrollo de trastornos metabólicos y endocrinos, como resistencia a insulina, alteraciones del peso corporal, aparición en etapas posteriores del desarrollo de síndrome de ovario poliquístico (PCOS), entre

otras patologías que se manifiestan durante la edad adulta (5). Sin embargo, el curso temporal de las alteraciones metabólicas inducidas por fenómenos de programación temprana, como las que se producen como consecuencia de una exposición inadecuada a esteroides gonadales, así como su interacción con otras condiciones obesogénicas, aún no se ha establecido y permanece, en gran medida, desconocido.

Con el fin de estudiar el curso temporal de la instauración de este tipo de patologías, en este primer bloque de experimentos, nos propusimos evaluar en ratas macho y hembra, en la edad adulta temprana (PND50) y el periodo adulto (PND150), el impacto de la manipulación nutricional postnatal y del ambiente esteroideo neonatal sobre la función metabólica y gonadotrópica.

Para tal fin, en el **experimento 1** se analizó el impacto de la sobrenutrición postnatal continuada sobre parámetros reproductivos y metabólicos, en ratas macho y hembra, en los dos periodos adultos anteriormente referidos. Para evitar los efectos indeseados de una posible sobre o subnutrición intrauterina, el día del nacimiento se seleccionaron las crías nacidas en camadas de un número estándar (8 y 13 crías). Las crías macho y hembra fueron separadas y mezcladas con crías del mismo sexo procedentes de otras madres (*cross-fostered*) y agrupadas en dos tamaños de camada diferentes: 4 crías por madre (SL, camada pequeña, como modelo de sobrenutrición postnatal) y 12 crías por madre (NL, camada estándar como modelo de normonutrición postnatal, grupo control). Esta organización de las camadas se mantuvo hasta el día del destete (PND23). Tras el mismo, las crías de camadas SL se alimentaron *ad libitum* con una HFD, mientras que las crías de camada NL fueron alimentadas con una CD.

Paralelamente, se generó un modelo de androgenización neonatal mediante la inyección de propionato de T (PT), a una dosis de 1.25 mg/100 μ l /rata (318). En este modelo se aplicaron las mismas manipulaciones nutricionales indicadas anteriormente. Esto es, sobrealimentación postnatal y HFD tras el destete (SL/HFD) o normonutrición postnatal y dieta control tras el destete (NL/CD) (ver representación esquemática del experimento en la **figura 22**).

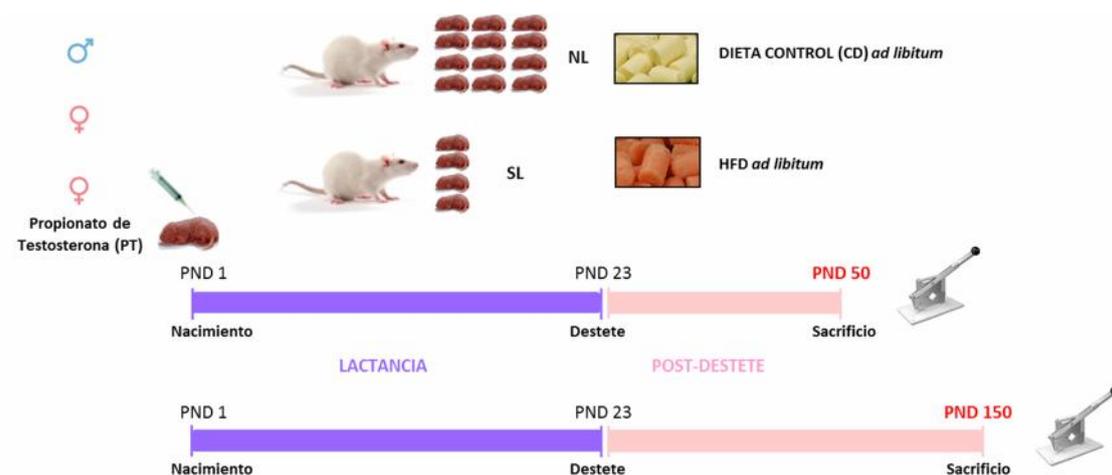


Figura 22. Representación esquemática del protocolo seguido en el **experimento 1**.

Los grupos experimentales generados en este experimento y los tamaños de muestra (N) fueron los siguientes:

Grupo	Descripción	N
MACHOS NL/CD	12 crías/madre + CD	24
MACHOS SL/HFD	4 crías/madre + HFD	22
HEMBRAS NL/CD	12 crías/madre + CD	23
HEMBRAS SL/HFD	4 crías/madre + HFD	19
HEMBRAS PT/NL/CD	Propionato de testosterona + 12 crías/madre + CD	22
HEMBRAS PT/SL/HFD	Propionato de testosterona + 4 crías/madre + HFD	19

En todos estos grupos, se monitorizó el peso corporal cada 10 días hasta la finalización del experimento.

A los 50 días de vida postnatal, un subgrupo de animales de cada grupo experimental fue sacrificado por decapitación, recogiendo muestras de sangre troncal para las posteriores determinaciones de parámetros metabólicos y reproductores. Todas las hembras fueron sacrificadas en la misma fase del ciclo estral (diestro 1) para evitar las variaciones hormonales que tienen lugar en a lo largo del ciclo. El subgrupo restante de animales de cada grupo experimental, fue sacrificado a los 150 días de vida postnatal (ver representación esquemática del diseño experimental en **figura 22**), siguiendo el mismo protocolo experimental descrito para los animales sacrificados a los 50 días de edad.

En el **experimento 2** se evaluó la tolerancia a la sobrecarga de glucosa en los diferentes grupos experimentales a ambas edades estudiadas. El día anterior al experimento, los animales se pesaron y fueron sometidos a ayuno durante toda la noche. A la mañana siguiente, se determinaron los niveles basales de glucosa circulante (B) mediante la extracción de una pequeña gota de sangre obtenida de la cola del animal, y con la ayuda de un glucómetro (ACCU-CHEK® Aviva; Roche Diagnostics). A continuación, los

animales recibieron un bolo de glucosa (1 g/Kg de peso corporal) por vía intraperitoneal (ip), tras lo cual se procedió a la extracción de sangre a los 20, 60 y 120 minutos para la determinación de los niveles de glucosa circulantes (**Figura 23**).

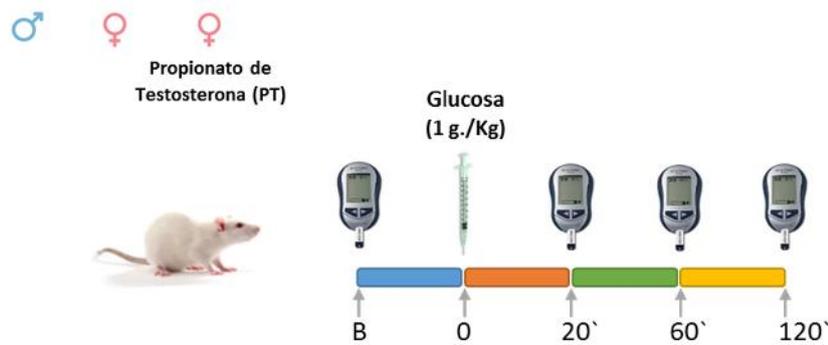


Figura 23. Representación esquemática del diseño seguido en el **experimento 2**.

En línea con el experimento anterior y con el objetivo de determinar si las manipulaciones nutricionales y del ambiente esteroideo temprano producen cambios en la sensibilidad a insulina durante la etapa adulta, en el **experimento 3** se analizó la tolerancia a la sobrecarga de insulina en animales de 50 y 150 días de edad en todos los grupos experimentales. Como en el experimento 2, los animales se pesaron el día previo al ensayo y se sometieron a ayuno durante toda la noche. A la mañana siguiente, se midió en todos los animales el nivel de glucosa basal (B), mediante la extracción de sangre de la cola y posteriormente se administró i.p. una dosis de 1 U.I./Kg de peso corporal de insulina. Seguidamente se hicieron tomas de sangre para conocer las concentraciones circulantes de glucosa a los 20, 60 y 120 minutos (**Figura 24**).

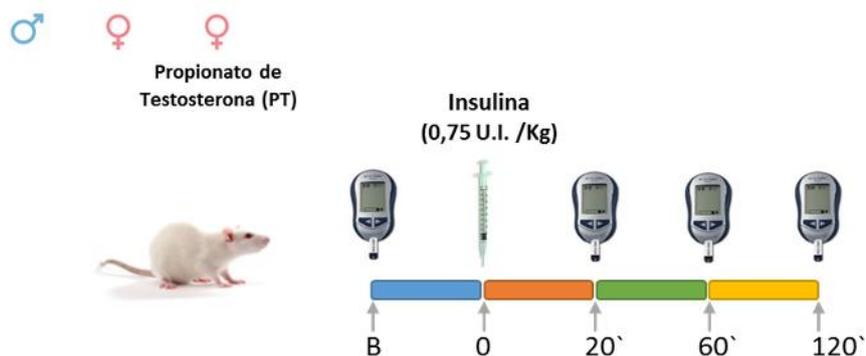


Figura 24. Representación esquemática del protocolo aplicado en el **experimento 3**.

6.2. IMPACTO METABÓLICO Y GONADOTRÓPICO DE LA SOBRENUTRICIÓN POST-NATAL Y/O LA ABLACIÓN GONADAL EN RATAS MACHO Y HEMBRA ADULTAS

Tal y como ya se avanzó en la introducción, el déficit de esteroides sexuales, como el que ocurre en situaciones de hipogonadismo, en hombres, o tras la menopausia, en mujeres, está asociado a un mayor riesgo en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la T2DM. A su vez, los trastornos metabólicos como la obesidad y la T2DM, conducen al desarrollo de cuadros de hipogonadismo de origen central, sobre todo en hombres (319, 320). En este contexto, la suma de todas estas condiciones nos transporta a un escenario potencial donde es predecible que el riesgo de padecer alteraciones metabólicas y reproductoras se multiplique exponencialmente. Sin embargo, el número de estudios enfocados en caracterizar las consecuencias metabólicas y gonadotrópicas del efecto combinado de las manipulaciones nutricionales tempranas y el déficit de esteroides gonadales en la etapa adulta, es muy limitado.

En este contexto, en este bloque de experimentos se analizó el impacto, en ratas macho y hembra de 5 meses de edad (PND150), de la combinación de distintos protocolos de manipulación de estado nutricional (NL/CD y SL/HFD) y el déficit de esteroides sexuales, mediante la eliminación de las gónadas (GNX).

Para tal fin, y en la misma línea de los experimentos anteriores, en el **experimento 7**, se generaron grupos sometidos a distintas condiciones nutricionales durante la etapa postnatal. Más concretamente, los animales se dividieron en dos grupos, un primer grupo sometido a sobrenutrición postnatal y dieta alta en grasa tras el destete (SL/HFD), y un segundo normonutrido durante todo el periodo que fue utilizado como control (NL/CD). A los 90 días de edad, la mitad los animales de ambos grupos fueron sometidos a GNX y, posteriormente, todos los animales fueron sacrificados a los 5 meses de edad (día 150 PN). En el caso de las hembras intactas el día del sacrificio se hizo coincidir con la fase de diestro del ciclo estral (**Figura 25**).

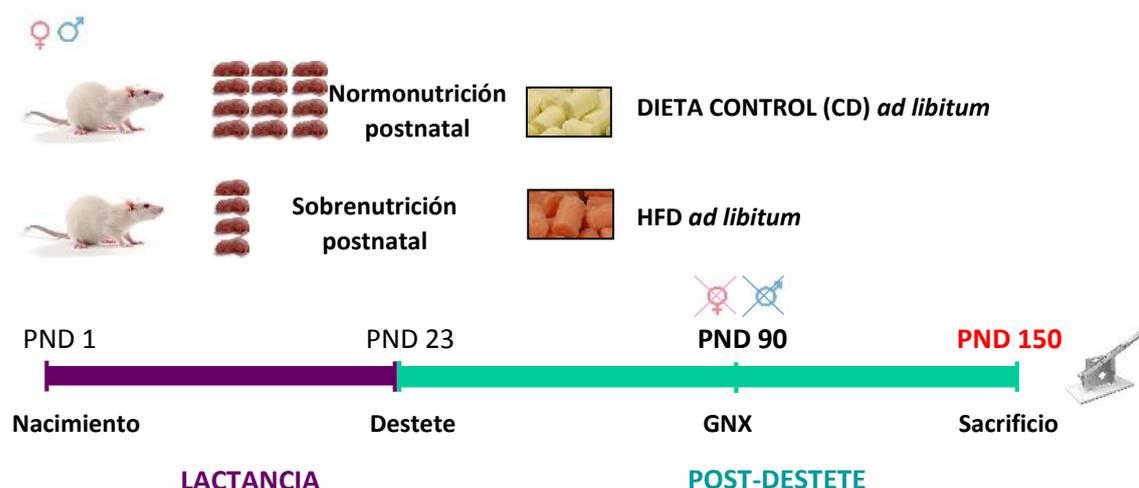


Figura 25. Representación esquemática del protocolo seguido en el **experimento 7**.

En el **experimento 7** se generaron los siguientes grupos experimentales:

Grupo	Descripción	Hembras (N)	Machos (N)
NL/CD intactos	12 crías/madre + CD	11	12
SL/HFD intactos	4 crías/madre + HFD	10	12
NL/CD GNX	12 crías/madre + CD + GNX	12	12
SL/HFD GNX	4 crías/madre + HFD + GNX	10	8

La evolución del peso fue monitorizada en todos los grupos a intervalos de 10 días desde el momento de la castración (PND90). Posteriormente, el PND150 todos los animales fueron sacrificados por decapitación recogiendo muestras de sangre troncal para los análisis de parámetros metabólicos y reproductores.

Adicionalmente, y siguiendo los mismos protocolos mencionados en el apartado anterior, en los **experimentos 8 y 9** se evaluó la tolerancia a glucosa y a insulina, respectivamente, en estos grupos experimentales.

SET EXPERIMENTAL 2

6.3. ANÁLISIS DEL PAPEL DE AMPK EN NEURONAS GnRH Y KISS1 EN EL CONTROL INTEGRADO DEL METABÓLICO Y LA FUNCIÓN REPRODUCTORA

Como se ha descrito, el eje gonadotrópico es un sistema jerárquico, en el que las neuronas GnRH y sus principales activadores aferentes, las neuronas Kiss1, ocupan una posición destacada. Estas neuronas juegan un papel esencial en la adquisición y el mantenimiento de la función reproductora y están reguladas por múltiples factores, entre los cuales se encuentran las señales metabólicas. En los últimos años, se ha publicado un número elevado de artículos demostrando el papel esencial del sensor metabólico AMPK en el control de la homeostasis energética. Además, han aparecido de forma fragmentaria ciertas evidencias que sugieren un posible papel para este sensor en el control integrado del metabolismo y la función reproductora (2). En este sentido, y para tratar de ahondar en los posibles mecanismos funcionales en los que interviene este sensor para la regulación integrada de la función reproductora y el metabolismo, evaluamos el impacto de la eliminación selectiva de AMPK α 1 en neuronas GnRH y Kiss1 sobre distintos parámetros metabólicos y reproductores.

6.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA ACTIVACIÓN PUBERAL EN LOS MODELOS GAMKO Y KAMKO

En relación a lo anteriormente descrito, en el **experimento 10** evaluamos el efecto de la eliminación selectiva de AMPK α 1 en neuronas GnRH y Kiss1 (los ratones GAMKO y

KAMKO, respectivamente) y sus correspondientes controles, sobre la maduración puberal. Para ello, se analizaron marcadores externos de llegada a la pubertad, como apertura vaginal (AV) en caso de las hembras y separación balano prepucial (SBP) en caso de los machos. Adicionalmente, se monitorizó en hembras la ciclicidad estral mediante citología vaginal diaria, durante un periodo de 5 semanas, que permitió la identificación de la edad del primer estro, como marcador de la primera ovulación en roedores.

En base a los datos obtenidos y dada la importancia de las aferencias kisspeptidérgicas sobre la funcionalidad de las neuronas GnRH, en el **experimento 11** se analizó, específicamente en animales GAMKO pre-puberales, la respuesta de estos ratones a la inyección central de Kp-10, en términos de secreción de LH. Con ello, se pretendía evaluar el impacto de la eliminación de la señalización de AMPK sobre la funcionalidad de las neuronas GnRH.

Para ello, los animales fueron canulados y el día 23 de vida postnatal (PND23) se administró i.c.v. una dosis de Kp-10 (50 pmol/ratón en 5µl) y se tomaron muestras de sangre de la cola antes (0) y a los 15, 30, 60 y 90 minutos tras la inyección (**Figura 26**).

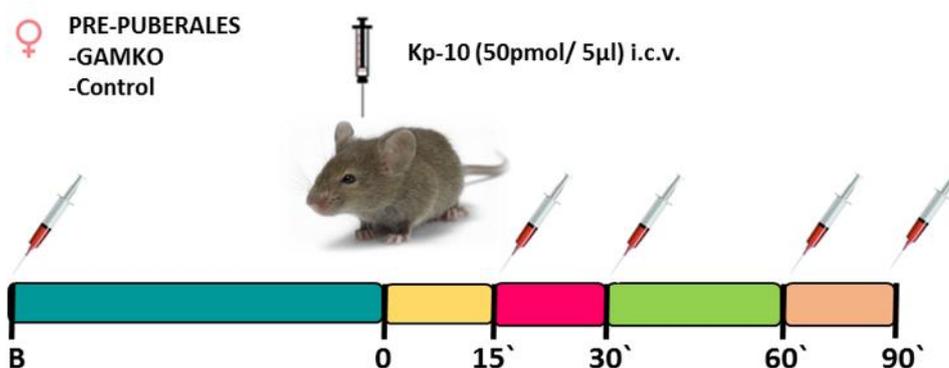


Figura 26. Representación esquemática del diseño implementado en el **experimento 11**.

Por otro lado, y dada la ausencia de manifestaciones fenotípicas en los ratones KAMKO en condiciones de normonutrición, nos propusimos la caracterización de este modelo en condiciones de balance energético negativo, las cuales, está bien caracterizado, producen la activación selectiva de AMPK.

Con este objetivo, en el **experimento 12**, se sometieron ratones KAMKO y sus correspondientes controles a una restricción calórica del 20% desde el día 22 hasta el día 44 de vida y se monitorizaron distintos parámetros relacionados con la maduración puberal. Por motivos comparativos, se incluyeron adicionalmente en el mismo estudio ratones KAMKO y controles alimentados *ad libitum* (**figura 27**). En todos los animales se monitorizó diariamente el peso corporal y la apertura vaginal. Al finalizar el experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación para la toma de sangre

troncal con el fin de determinar los niveles de LH circulante y se registraron los pesos de ovario.

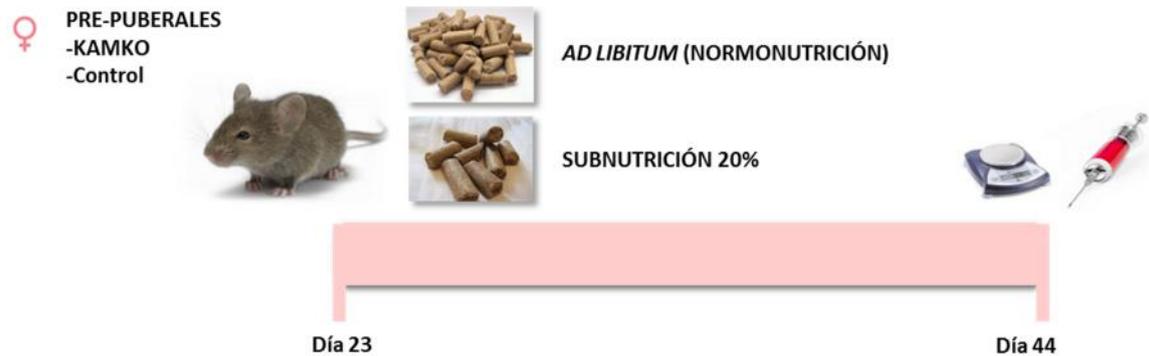


Figura 27. Representación esquemática del diseño seguido en el **experimento 12**.

6.3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA EN LA EDAD ADULTA EN LOS MODELOS GAMKO Y KAMKO

Tras la caracterización del efecto de la eliminación de la señalización a través de AMPK en neuronas GnRH y Kiss1 sobre el proceso de maduración puberal, nos centramos en la caracterización de las implicaciones de dicha eliminación sobre aspectos relacionados con el mantenimiento de la función reproductora durante la etapa adulta. Para ello, en el **experimento 13**, se evaluó la pulsatilidad de LH en hembras de ambos genotipos y machos GAMKO durante un periodo de 3 horas, de acuerdo con los protocolos indicados en esta sección de Materiales y Métodos. Los principales parámetros de secreción de LH estudiados fueron el nivel medio y basal de LH, así como la frecuencia de pulsos de LH en un periodo de 3 horas.

Adicionalmente, en el **experimento 14**, se estudiaron distintos parámetros relacionados con el funcionamiento de la función reproductora en la etapa adulta. En este sentido, se monitorizó la ciclicidad estral en hembras mediante frotis vaginal diario, durante un periodo superior a 30 días (que corresponde a 7-8 ciclos estrales completos), lo que permitió el estudio de la regularidad del ciclo estral. Por otro lado, se estudió la capacidad reproductiva en hembras mediante la evaluación de la fertilidad, tras su cruce con ratones macho de fertilidad probada, y el análisis del tamaño de la camada. Asimismo, se llevaron a cabo análisis en machos y hembras adultos del peso de ovarios y testículos, como parámetros indicativos del estado de la función gonadal.

Por otro lado, y con el objetivo de caracterizar de una forma más detallada el impacto de la pérdida de AMPK en ratones GAMKO y KAMKO sobre su respuesta, en términos de secreción de LH, a distintos activadores centrales del eje reproductor, en el **experimento 15** se administró i.c.v. una dosis de Kp-10 (50 pmol/ 5µl) en ratones

hembra de ambos genotipos y machos GAMKO, así como un bolo del agonista de los receptores tipo 3 de taquiquininas (NK3R), Senktide (600 pmol/5 μ l) en hembras GAMKO y KAMKO. Adicionalmente, se testó una dosis i.p. de GnRH (0,25 μ g/ratón en 100 μ l) en machos y hembras del modelo GAMKO (**figura 28**).

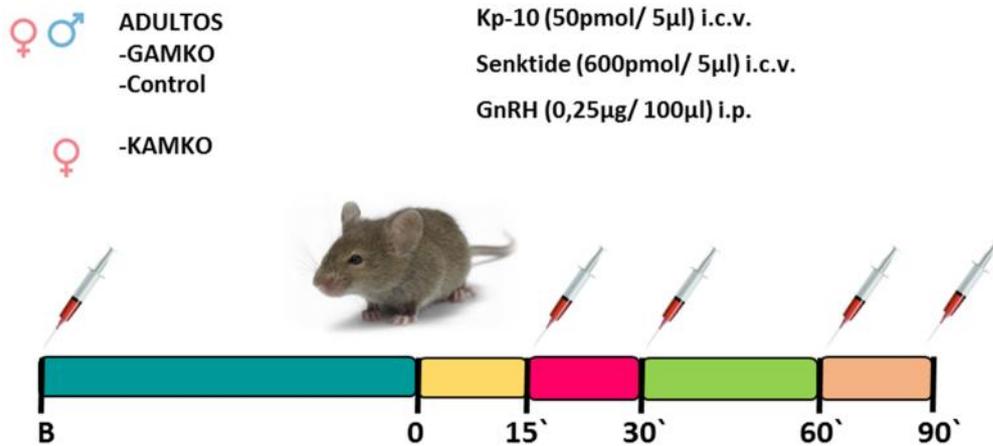


Figura 28. Representación esquemática del diseño implementado en el **experimento 15**.

6.3.3. IMPACTO DEL ESTRÉS METABÓLICO SOBRE LA FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN LA EDAD ADULTA EN LOS MODELOS GAMKO Y KAMKO

Tras una caracterización exhaustiva del fenotipo reproductor de los ratones GAMKO y KAMKO en la edad adulta, y dado el efecto positivo que tiene el déficit energético sobre la activación de AMPK, en un segundo set de experimentos nos propusimos evaluar el impacto de distintos protocolos de restricción calórica sobre diferentes parámetros indicadores del funcionamiento del eje reproductor, la secreción pulsátil de LH, la ciclicidad ovárica o la respuesta a activadores centrales del eje reproductor como la Kp-10. Para completar estos estudios se evaluó, además, el papel de los esteroides gonadales en la respuesta de estos parámetros a la restricción calórica mediante la eliminación de la gónadas.

En este sentido, en el **experimento 16** se evaluó el impacto de la restricción calórica, seguida de un periodo de *re-feeding*, sobre la ciclicidad estral. Para ello, se usaron dos protocolos diferentes, tal y como se muestra en la **figura 29**. En el primer ensayo, se aplicó un grado de subnutrición del 15% (es decir, la ración diaria fue del 85% de la ingesta de alimentos *ad libitum*) seguido de un *re-feeding ad libitum*, mientras que en el segundo protocolo los animales fueron sometidas a una subnutrición más intensa del 35%, seguida de un *re-feeding* parcial al 85% de la ingesta diaria *ad libitum*. El periodo de subnutrición comenzó durante fase de diestro y se detuvo cuando todas las ratonas de ambos genotipos (KOs y controles) interrumpieron su ciclicidad estral, momento en el que se inició la fase de *re-feeding*. Posteriormente, el experimento se

continuó con este periodo de *re-feeding* hasta que todos los animales mostraron un estro en su ciclo ovárico, hecho que se correlaciona con la recuperación de la ciclicidad. Durante todo el experimento se controlaron el peso corporal y la ciclicidad estral, y se determinó el número de días transcurridos hasta la recuperación de la ciclicidad tras el periodo de *re-feeding*.

En el modelo de ratones KAMKO tan sólo se llevó a cabo el protocolo consistente en una subnutrición del 35%, seguida de *re-feeding* al 85% dada la ausencia de diferencias, con respecto a los ratones control, en los parámetros analizados, las cuales sí fueron significativas en el modelo GAMKO.

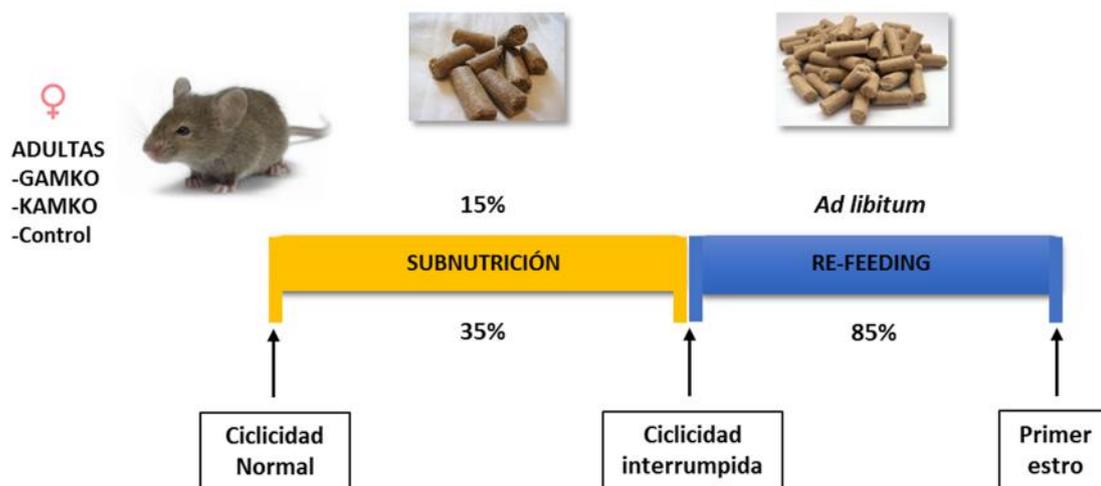


Figura 29. Representación esquemática del **experimento 16**.

Posteriormente, en el **experimento 17** se evaluó, en ratones hembra adultas GAMKO y KAMKO, y sus correspondientes controles, los perfiles de pulsatilidad de LH durante 3 horas en condiciones de normonutrición y después de un protocolo de 18 horas de ayuno, como se ilustra en la **figura 30**. Para la realización de los ensayos, se monitorizó el ciclo estral de los animales y éstos se realizaron coincidiendo con el día de diestro, con el objeto de evitar las fluctuaciones hormonales que tienen lugar en las diferentes fases del ciclo. Los experimentos se realizaron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente de avituallamiento y toma de muestras de sangre para monitorización de la pulsatilidad de LH.

En base a los niveles de LH esperados, según nuestra propia experiencia, el volumen de sangre recogido en cada toma fue de 4µl, en el caso los animales normonutridos, y de 7 µl tras el ayuno de 18 h. Tras la medida de los niveles de LH por ELISA, se calcularon los valores basales y medios de LH, la frecuencia de pulsos en las 3 horas que duró la recogida de muestras y la masa total de LH liberada en sangre a lo largo del periodo de estudio, calculada como área bajo la curva ((AUC) (y=0)) y delta AUC (y= nivel basal

para cada muestra), donde esta última corresponde al área sobre el nivel basal. La comparación entre AUC y delta AUC permite apreciar, más fácilmente, diferencias en la masa secretora de LH entre condiciones experimentales que implican cambios en los niveles basales de LH, como el ayuno vs. la normonutrición. Adicionalmente, en la sección de resultados se muestran también los perfiles individuales de secreción de LH a lo largo de las 3 horas que duró el experimento.

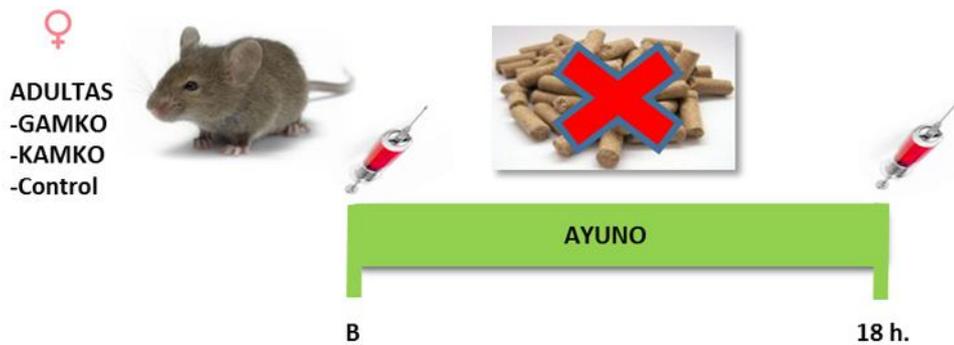


Figura 30. Representación esquemática del diseño implementado en el **experimento 17**.

Adicionalmente, y atendiendo a la respuesta diferencial de LH a la administración central de Kp-10 mostrada por los ratones GAMKO normonutridos, en el **experimento 18** nos propusimos evaluar en hembras GAMKO esta misma respuesta en condiciones de balance energético negativo (ayuno). En este contexto, datos publicados en la literatura han demostrado un incremento en la sensibilidad del eje gonadotrópico, en términos de secreción de LH, a la administración central de Kp-10 (253). Para tal fin, se monitorizó diariamente la ciclicidad estral mediante citología vaginal, con el objetivo de comenzar el periodo de ayuno en fase de diestro y así evitar las variaciones hormonales del ciclo estral. Tras 18 horas de ayuno, se les tomó a todos los animales muestras de sangre de la cola antes (B) y a los 15, 30, 60 y 90 minutos tras la administración i.c.v. con una dosis de Kp-10 (50 pmol/ratón en 5µl) (**Figura 31**).

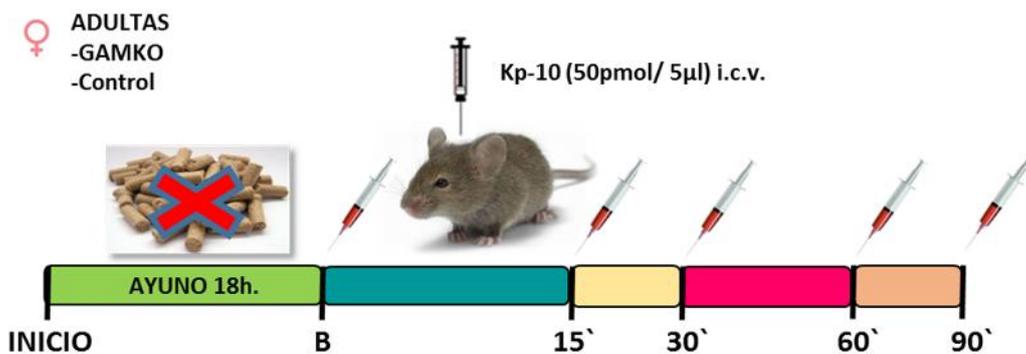


Figura 31. Representación esquemática del **experimento 18**.

6.3.4. FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL MODELO GAMKO TRAS MANIPULACIÓN DEL ESTADO GONADAL: INTERACCIÓN CON EL ESTADO NUTRICIONAL

Datos recientes han demostrado una potente relación entre los esteroides gonadales, y más concretamente el estradiol, y la actividad del sensor metabólico AMPK (293). Igualmente, existen datos que sugieren una intervención de los esteroides sexuales en la capacidad de las neuronas GnRH para interactuar con el estado nutricional a través de cambios en la actividad de AMPK (302). En base a esto, en un nuevo set de experimentos nos propusimos estudiar la intervención de las hormonas gonadales en la actividad del eje gonadotrópico en ratones hembra adultos GAMKO y controles, en condiciones de normonutrición y sometidos a dos condiciones distintas de déficit energético (ayuno y restricción calórica del 35%). Para ello, se estudiaron cambios en los patrones de pulsatilidad de LH en las condiciones anteriormente mencionadas. En línea con esto, en el **experimento 19** se compararon los perfiles de secreción de LH en animales intactos y tras ovariectomía (OVX) bilateral en ambos genotipos. En el caso del grupo de animales ovariectomizados, la ovariectomía se realizó un mes antes de comenzar las 3 semanas de avituallamiento, momento tras el cual comenzaron los análisis de pulsatilidad del LH en condiciones de normonutrición. Seguidamente, y tras la recuperación completa de los animales, en el **experimento 20** los ratones fueron sometidos a ayuno de 18 horas, tras el cual se realizó un nuevo test de pulsatilidad de LH aplicando los procedimientos descritos en apartados anteriores. De nuevo, tras la recuperación total de los animales, en el **experimento 21** éstos fueron sometidos adicionalmente a un protocolo de reducción del 35% de la ingesta diaria durante una semana, tras el cual se estudiaron nuevamente los patrones de pulsatilidad de LH (Figura 32).

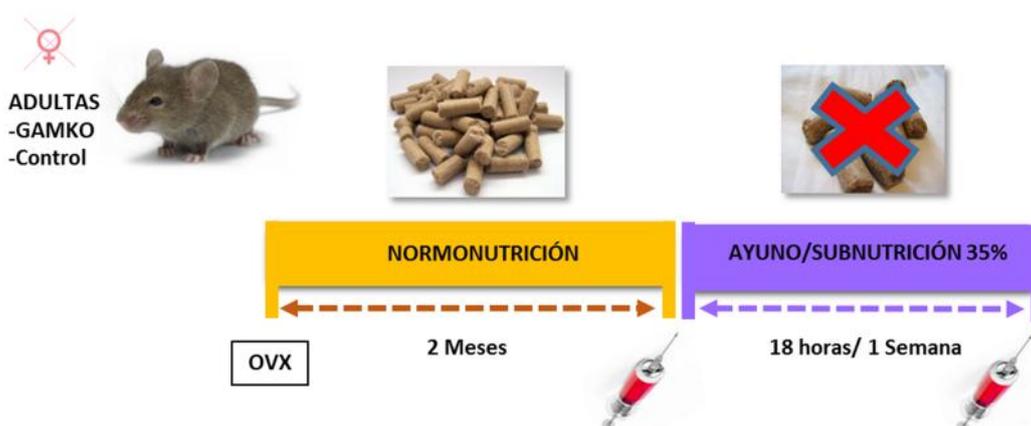


Figura 32. Representación esquemática del **experimento 20 y 21**.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos son presentados como la media \pm SEM (error estándar de la media). Las respuestas integradas de secreción de LH y niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo en los diferentes grupos experimentales fueron expresadas como área bajo la curva (AUC), calculada siguiendo la regla del área trapezoidal. Adicionalmente, en algunos experimentos se incluye el valor del Δ AUC, el cual representa la masa secretora neta sobre los niveles basales. El número de muestras incluidas por grupo para los distintos estudios se indica en la sección de Resultados. El Software Prism GraphPad 5.03 (GraphPad Software Inc.; La Jolla, CA, USA) se utilizó para los análisis estadísticos con el fin de determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Para comparar las comparaciones entre grupos distintos se realizó la prueba *t-Student*. En el caso de comparaciones múltiples, se aplicó ANOVA de dos vías seguido de un test de rango múltiple de Newman-Keuls. El nivel de significancia se estableció en $P \leq 0.05$ y los asteriscos o letras diferentes indican significación estadística.

---RESULTADOS---

RESULTADOS

BLOQUE TEMÁTICO 1. Alteraciones endocrino-metabólicas en modelos de manipulación del balance energético y la función gonadal

A fin de cubrir parte de los objetivos específicos de esta Tesis, llevamos a cabo una serie de estudios experimentales, utilizando como modelo la rata Wistar de ambos sexos, dirigidos a caracterizar la naturaleza y curso temporal de las alteraciones metabólicas y gonadotrópicas inducidas por diferentes manipulaciones obesogénicas y de la función gonadal, de potencial relevancia traslacional, tales como la androgenización neonatal, la sobrealimentación postnatal y la dieta alta en grasa, o la eliminación de esteroides gonadales.

1. IMPACTO METABÓLICO Y REPRODUCTIVO DE LA MANIPULACIÓN DEL AMBIENTE ESTEROIDEO NEONATAL Y DE LA SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL

En un primer bloque de experimentos, nos propusimos estudiar el curso temporal del impacto sobre la función metabólica y reproductiva de la manipulación del ambiente esteroideo neonatal, mediante análisis realizados en la edad adulta temprana (post-puberal; PND50) y el periodo adulto (PND150). Adicionalmente, valoramos a estas edades el posible efecto sumatorio de la alteración de la diferenciación sexual hipotalámica y la manipulación de la ingesta calórica durante el periodo postnatal sobre estas mismas funciones.

Así, en una primera aproximación, analizamos en ratas hembra y macho, el impacto de manipulaciones nutricionales tempranas sobre distintos marcadores reproductivos y metabólicos. Como se describe en la Sección de Materiales y Métodos, debido a su mayor valor traslacional, centramos nuestros análisis en las consecuencias de la sobrenutrición durante la lactancia, mediante la cría en camadas pequeñas (SL), seguido del consumo de una dieta rica en grasas (HFD) tras el destete, generando de esta forma un modelo de sobrealimentación temprana continuada (SL/HFD). El correspondiente grupo normonutrido durante todo el periodo de estudio (NL/CD) fue empleado como control. En paralelo, a fin de evaluar el impacto de una exposición inapropiada a andrógenos durante periodos críticos del desarrollo, se generó un modelo en hembra de androgenización neonatal, seguido de una sobrealimentación postnatal y del consumo de una HFD desde el destete (PT/SL/HFD), así como un modelo control, androgenizado neonatalmente y no sobrealimentado durante todo el periodo de estudio (PT/NL/CD).

El análisis de la evolución del peso corporal, realizado a intervalos de 10 días durante el periodo de estudio, puso de manifiesto, en ambos sexos, que en relación a los controles normonutridos (NL/CD), los animales con una mayor disponibilidad de recursos energéticos (SL/HFD) mostraron un incremento significativo del peso

corporal, que ya fue significativo desde el día 14 de vida hasta el final del experimento (PND150; **Figura 33**). De igual modo, la androgenización neonatal de ratas hembra (PT/NL/CD) incrementó significativamente el peso corporal a lo largo del estudio; efecto que se vio magnificado por la sobrealimentación postnatal (PT/SL/HFD; **Figura 33**).

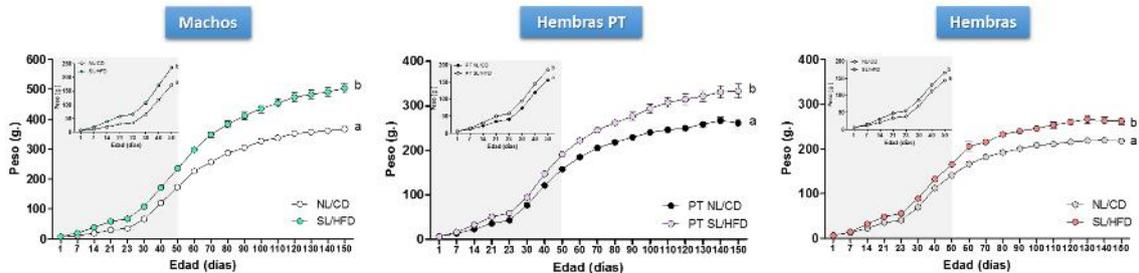


Figura 33. Evolución del peso corporal (g) en ratas macho y hembra de 50 y 150 días edad sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) durante el periodo de lactancia y alimentadas con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD) tras el destete. En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con diferentes letras son estadísticamente diferentes, $P < 0.05$.

De otra parte, nuestros análisis de los niveles séricos de hormonas implicadas en la función reproductora evidenciaron que las ratas macho sobrealimentadas durante el periodo de lactancia y alimentadas con una dieta rica en grasas (SL/HFD) mostraron, en las edades PND50 y PND150, unos niveles de LH inferiores a los presentados por animales normonutridos (NL/CD) durante todo el periodo de estudio, si bien esta disminución solo alcanzó significación estadística en edad adulta intermedia (PND150; **Figura 34**).

Por su parte, las hembras sobrealimentadas (SL/HFD) no mostraron modificaciones en los niveles séricos de LH a ninguna de las dos edades estudiadas en comparación con el grupo control (**Figura 34**). Por el contrario, en hembras sometidas a androgenización neonatal, la sobrealimentación postnatal (PT/SL/HFD) cursó con un descenso significativo de los niveles basales de LH en las dos edades estudiadas (**Figura 34**). Además, todos los animales androgenizados presentaron un cuadro anovulatorio y, por tanto, eran infértiles.

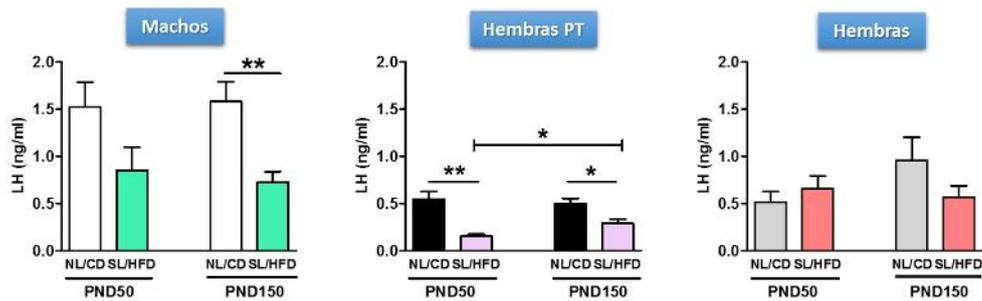


Figura 34. Niveles séricos de LH (ng/mL) en ratas macho y hembra a los días 50 y 150 de edad (PND50 y PND150), sometidas o no a sobrenutrición postnatal (SL) y alimentadas con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD) tras el destete. En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

De forma análoga a la LH, los niveles séricos de FSH, a los 50 y 150 días de edad, en ratas macho sobrealimentadas durante todo el periodo de estudio (SL/HFD) fueron inferiores a los de los correspondientes grupos normonutridos (NL/CD); cambio que fue estadísticamente significativo a las dos edades (PND50 y PND150) estudiadas. Adicionalmente, los niveles circulantes de FSH de machos controles y obesos a los 150 días de edad, fueron significativamente inferiores a los detectados en el PND50 (**Figura 35**).

En hembras, la sobrenutrición postnatal (SL/HFD) no provocó ninguna modificación en los niveles séricos de FSH, a ninguna de las dos edades analizadas, en comparación con el correspondiente grupo control (NL/CD) a dicha edad. Sin embargo, las hembras obesas (SL/HFD) de 150 días de vida mostraron una disminución significativa de los niveles circulantes de FSH, comparado con los niveles mostrados a los 50 días por este mismo grupo (**Figura 35**).

Por otro lado, las hembras androgenizadas neonatalmente y sobrealimentadas durante la lactancia y tras el destete (PT/SL/HFD) mostraron una reducción significativa de los niveles de FSH a los 50 días de vida, con respecto a los animales androgenizados neonatalmente y normonutridos durante todo el periodo de estudio (PT/NL/CD). En cambio, esta tendencia se invirtió a los 150 días de edad, en el que los niveles de FSH fueron significativamente superiores en el grupo PT/SL/HFD, en comparación con el grupo androgenizado y normonutrido. Asimismo, las hembras PT/NL/CD evidenciaron una reducción significativa de los niveles séricos de FSH en el PND150 comparados con los niveles en el PND50 (**Figura 35**).

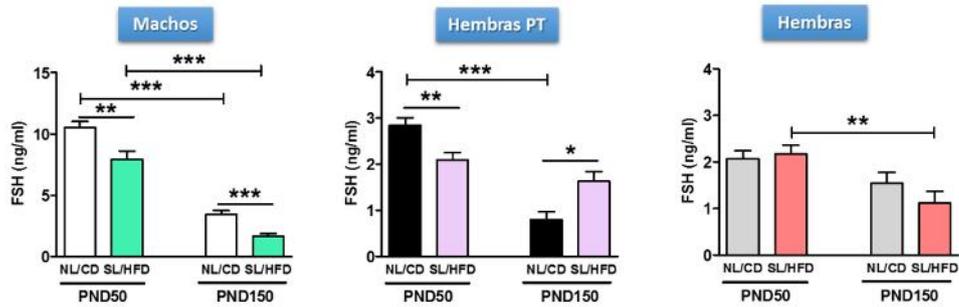


Figura 35. Niveles séricos de FSH (ng/mL) en ratas macho y hembra a los días 50 y 150 de edad sometidas o no a sobrenutrición postnatal (SL) y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Adicionalmente, los análisis de los perfiles de esteroides sexuales circulantes en los grupos experimentales indicados mostraron que, en machos de 50 días, la obesidad (SL/HFD) no alteró significativamente los niveles circulantes de T, DHT, androstendiona ni P. Por el contrario, los machos obesos (SL/HFD) de 150 días presentaron una reducción significativa de estos niveles de esteroides, salvo en el caso de P. Además, los machos del grupo control (NL/CD) mostraron en el PND150 niveles de T, androstendiona y P significativamente superiores a los del grupo de machos control en PND50. Por su parte, los niveles de DHT a los 150 días fueron significativamente suprimidos en los machos obesos (SL/HFD), en comparación con los machos sobrealimentados al PND50 (**Figura 36**). Destacablemente, en machos, los niveles de estradiol y estrona no fueron detectables mediante nuestro sistema ultrasensible de análisis.

En el caso de las hembras, nuestros resultados indican que el incremento de la disponibilidad de recursos energéticos desde la lactancia hasta la edad adulta (SL/HFD) cursó, a las edades PND50 y PND150, sin modificaciones significativas de los niveles circulantes de T, DHT, P y estrona, si bien detectamos tendencias a un incremento en los niveles de DHT, que quedó muy próximo a la significación estadística a ambas edades. De la misma forma, se detectó una tendencia al incremento en los niveles de estrona en las ratas hembra obesas en el PND150, que no alcanzó significación estadística debido a la considerable dispersión de los datos. De otra parte, sobrenutrición postnatal en las hembras (SL/HFD) produjo un aumento significativo en los niveles de androstendiona y E2, únicamente en el PND150 (**Figura 36**).

Por otro lado, la androgenización neonatal de ratas hembra, junto a la exposición combinada de la SL y la HFD, no provocó alteraciones significativas en los niveles séricos de T, DHT, P ni E2 a ninguna de las dos edades estudiadas, respecto del grupo control (NL/CD). Por el contrario, las hembras PT/SL/HFD mostraron un aumento

significativo de los niveles de androstendiona y estrona, únicamente a los 150 días de vida. A esta edad, los grupos control (PT/NL/CD) y obeso (PT/SL/HFD) mostraron una reducción significativa de los niveles de DHT y E2, y un aumento significativo de los niveles de estrona circulantes, manifestado únicamente en ratas obesas (PT/SL/HFD) (Figura 36).

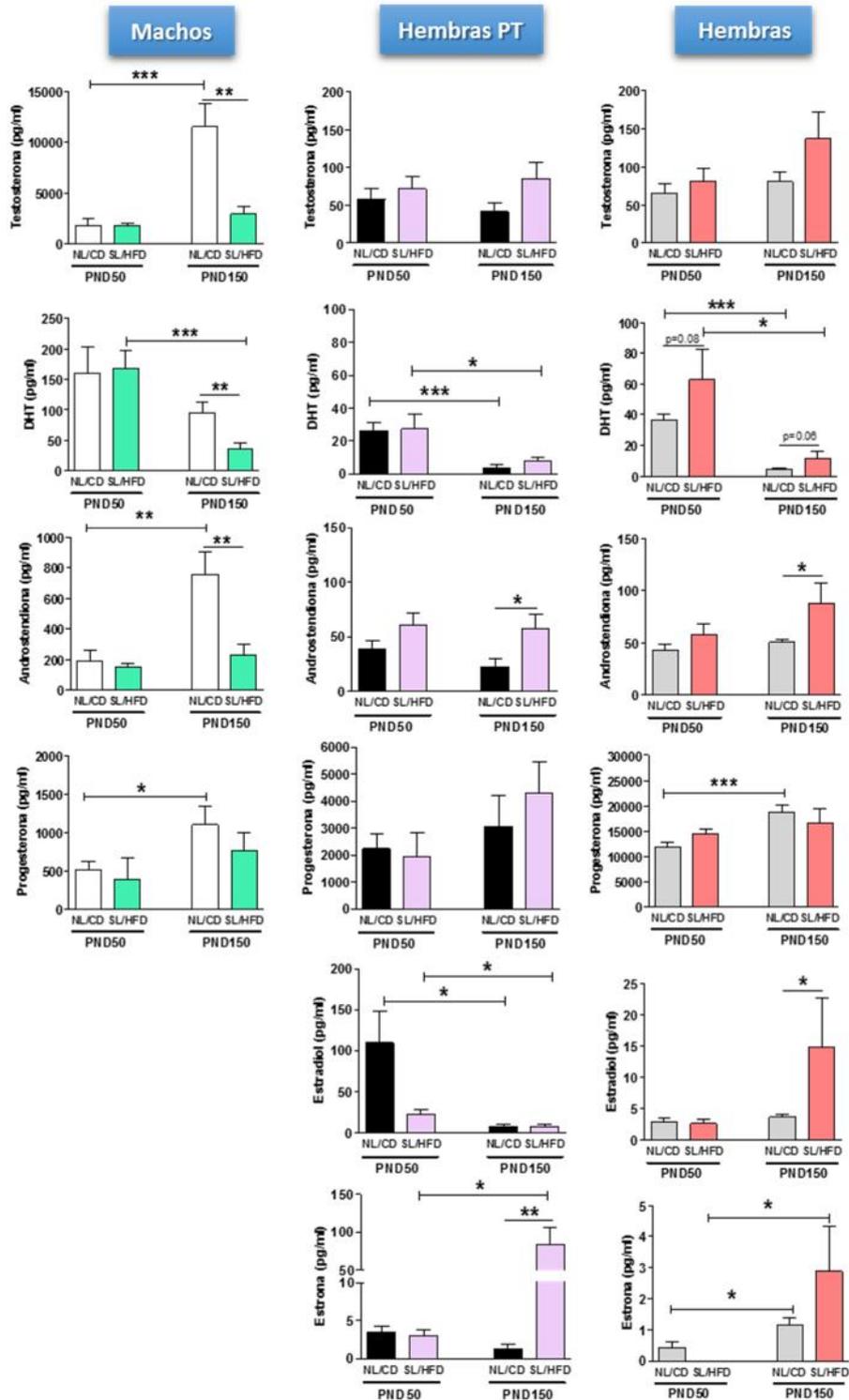


Figura 36. Niveles séricos de T, DHT, androstendiona y P, en ratas macho y hembra, y niveles circulantes de E2 y estrona (pg/mL) en ratas hembra a los días 50 y 150 de edad sometidas a

no a sobrenutrición postnatal (SL) y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

En paralelo, implementamos análisis de parámetros metabólicos relevantes, en ratas de ambos sexos, en los grupos experimentales antes indicados, a las edades de PND50 y PND150. En línea con lo observado en los análisis longitudinales, nuestros resultados mostraron que, aunque los animales de ambos grupos (NL/CD y SL/HFD) experimentaron un incremento significativo del peso corporal entre los 50 y los 150 días de edad, la sobrenutrición durante la lactancia y la alimentación con una HFD tras el destete (SL/HFD) indujeron una mayor ganancia en el peso corporal en relación a sus correspondientes controles (NL/CD) en ambas edades. Destacablemente, la androgenización neonatal en ratas hembra indujo una ganancia ponderal superior a la observada en ratas hembra no androgenizadas, que fue máxima en el PND150 y tras la combinación con las otras manipulaciones obesogénicas (PT/SL/HFD) (**Figura 37**).

Además de un incremento del peso corporal, nuestros análisis evidenciaron que, en los machos, la sobrenutrición durante la lactancia seguida del consumo de una dieta HFD (SL/HFD) produjo un aumento de los niveles basales de glucosa, a los PND50 y PND150. Por el contrario, en las ratas hembra, la combinación de estas manipulaciones obesogénicas no modificó significativamente los niveles de glucemia basal, en comparación con el grupo control (NL/CD). Por otro lado, en ratas hembra androgenizadas neonatalmente, se detectó una elevación moderada pero significativa de la glucemia basal causada por la combinación de manipulaciones obesogénicas (PT/SL/HFD), exclusivamente a los 50 días de edad (**Figura 37**).

Por otro lado, en nuestro modelo experimental, la sobrenutrición postnatal seguida de HFD no indujo modificaciones significativas en los niveles circulantes de insulina en ratas macho a ninguna de las dos edades estudiadas, mientras que en hembras se observó una disminución de las concentraciones séricas de insulina en el grupo SL/HFD, selectivamente en el PND50. Este fenómeno no se detectó en las ratas hembra sometidas a androgenización neonatal (PT/SL/HFD), en las que los niveles de insulina en el PND50 fueron superiores a los de los correspondientes controles (PT/NL/CD) (**Figura 37**). En los grupos normonutridos (NL/CD) de ambos sexos se produjo una disminución significativa de los niveles de circulantes de insulina entre el PND50 y PND150, que no se observó en los grupos obesos (**Figura 37**).

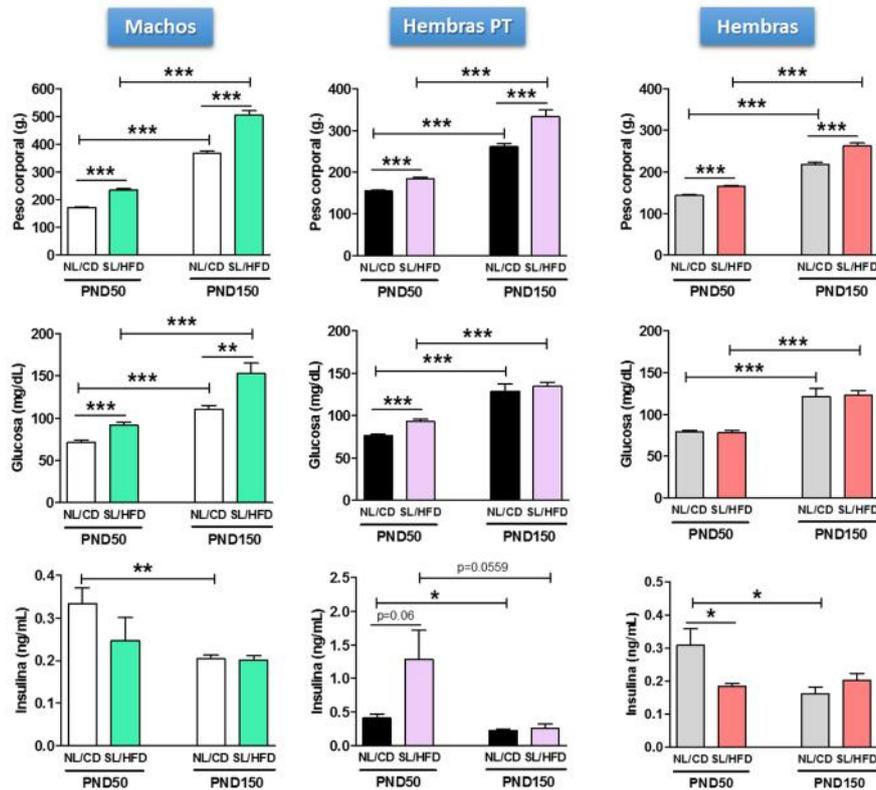


Figura 37. Peso corporal (g) y niveles séricos de glucosa (mg/dL) e insulina (ng/mL) en ratas macho y hembra a los días 50 y 150 de edad sometidas o no a sobrenutrición postnatal (SL) y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Adicionalmente, en los distintos grupos experimentales se exploraron posibles alteraciones en la homeostasis de la glucosa mediante un test de tolerancia a glucosa (GTT) vía ip. Los resultados obtenidos indican que los animales sobrenutridos durante el periodo de lactancia y alimentados con una dieta rica en grasas tras el destete (SL/HFD) muestran una intolerancia a la sobrecarga de glucosa respecto a sus controles (NL/CD), siendo este efecto estadísticamente significativo ya a 50 días de edad en ratas macho y hembras sometidas a androgenización neonatal. Esta intolerancia al manejo de la sobrecarga de glucosa fue aún más marcada en el PND150; fenómeno que fue detectado en ambos sexos (**Figura 38**, panel superior), y que se manifestó con una elevación de la masa total de glucosa circulante tras la sobrecarga, expresado como área bajo la curva (AUC), así como un incremento neto de los niveles globales de glucosa tras la inyección ip del bolo, expresado como delta AUC (Δ AUC) (**Figura 38**, panel inferior).

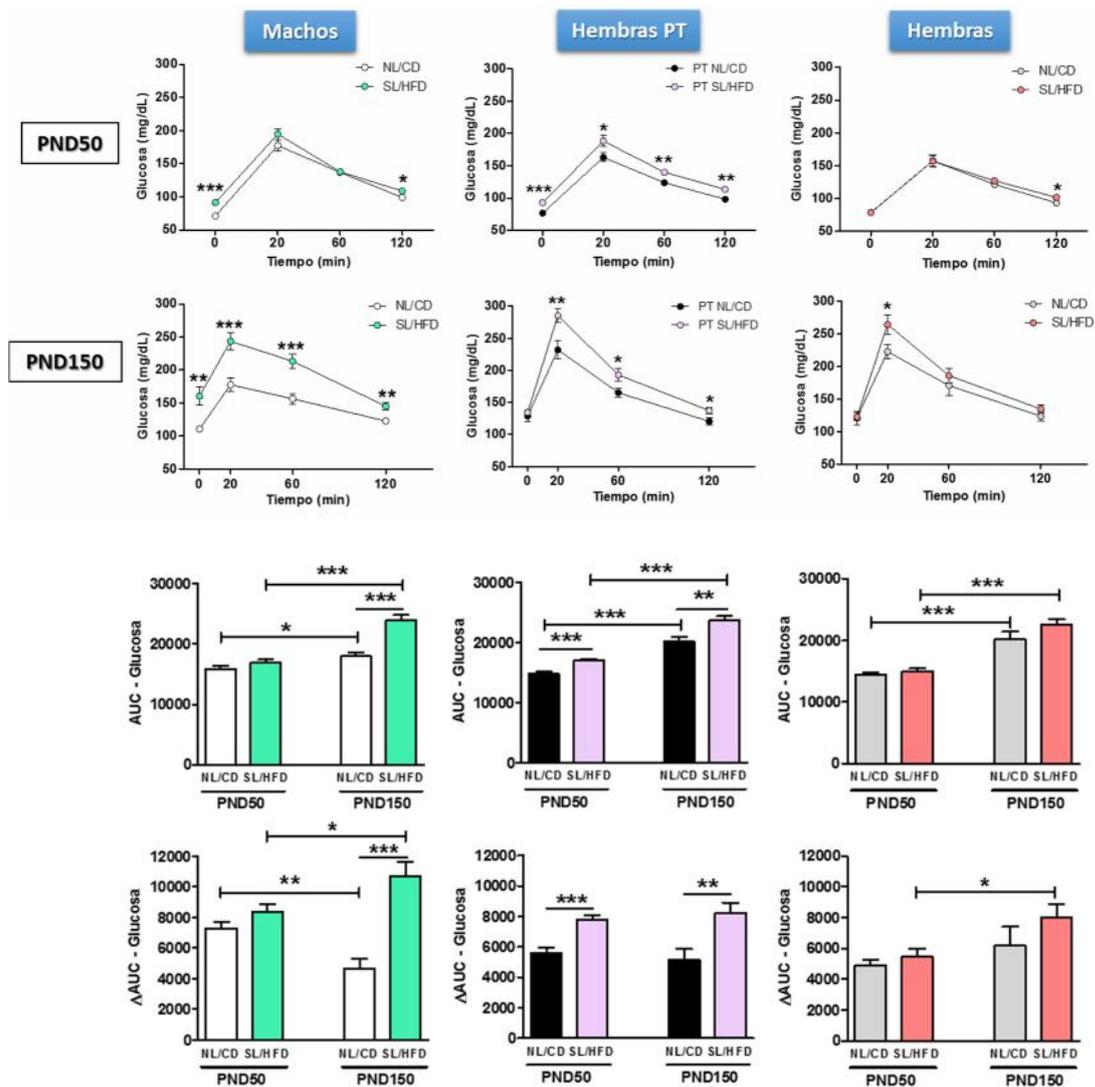


Figura 38. Niveles séricos de glucosa (mg/dL), antes y 20, 60 y 120 min después de la administración ip de glucosa (1 g/Kg), en ratas macho y hembra de 50 y 150 días de edad sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) postnatal y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). En el caso de las hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). En el panel inferior, se muestran los niveles integrados de glucosa, estimados como área bajo la curva (AUC) por la regla trapezoidal, así como delta AUC (incremento sobre niveles basales) a lo largo del periodo de estudio. Los datos se representan como media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Por otro lado, en ratas macho de 50 días, la obesidad (SL/HFD) no modificó la respuesta de los animales a la sobrecarga ip de insulina, a pesar de que los niveles de glucosa previos a su administración se encontraban significativamente aumentados. Por el contrario, en el PND150, los machos SL/HFD mostraron una clara resistencia a insulina, ya que tras la sobrecarga, los niveles circulantes de glucosa permanecieron

incrementados significativamente en comparación con los niveles del grupo control (NL/CD) (Figura 39).

En ratas hembra, la combinación de manipulaciones obesogénicas (SL/HFD) no modificó la respuesta en términos de niveles circulantes de glucosa tras la sobrecarga ip de insulina, que fue similar a la de ratas control (NL/CD) a los 50 y 150 días de edad (Figura 39). Por el contrario, en ratas hembra androgenizadas, la sobrenutrición postnatal (PT/SL/HFD) causó tanto una elevación de la glucemia basal como una menor disminución de los niveles circulantes de glucosa tras la inyección ip del bolo de insulina en comparación con las ratas androgenizadas normonutridas (PT/NL/CD) en el PND50 y PND150, si bien a los 150 días de edad las diferencias entre ambos grupos fueron menos acusadas (Figura 39).

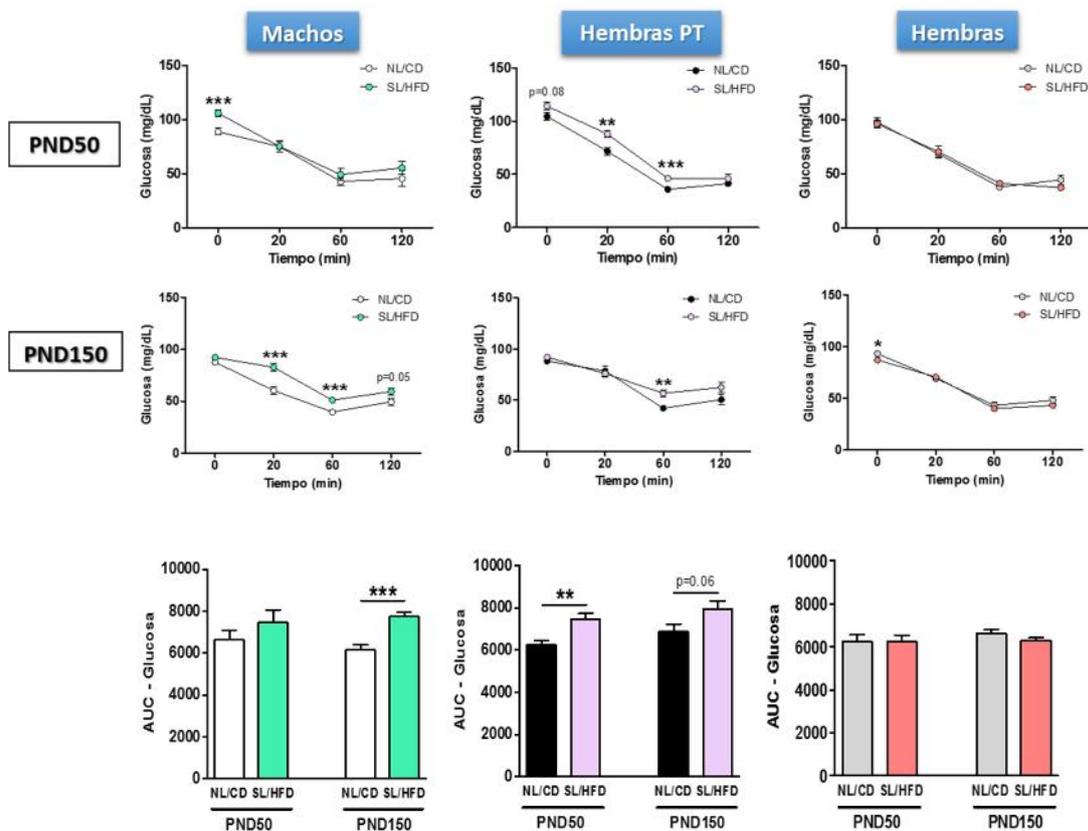


Figura 39. Niveles séricos de glucosa (mg/dL), antes y 20, 60 y 120 min después de la administración ip de insulina (0.75 UI/Kg), en ratas macho y hembra de 50 y 150 días de edad sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) postnatal y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). En el panel inferior, se muestran los niveles integrados de glucosa, estimados como área bajo la curva (AUC) por la regla trapezoidal a lo largo del periodo de estudio. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

El análisis de diversos marcadores hormonales en los grupos experimentales indicados mostró que la sobrealimentación durante la lactancia en combinación con una HFD tras el destete provocó un aumento muy marcado de los niveles circulantes de leptina, que fue altamente significativo en machos (SL/HFD) y hembras androgenizadas (PT/SL/HFD), a los 50 y 150 días de edad. En el caso de las hembras obesas (SL/HFD), el incremento de los niveles circulantes de leptina se produjo únicamente en el PND150 (**Figura 40**).

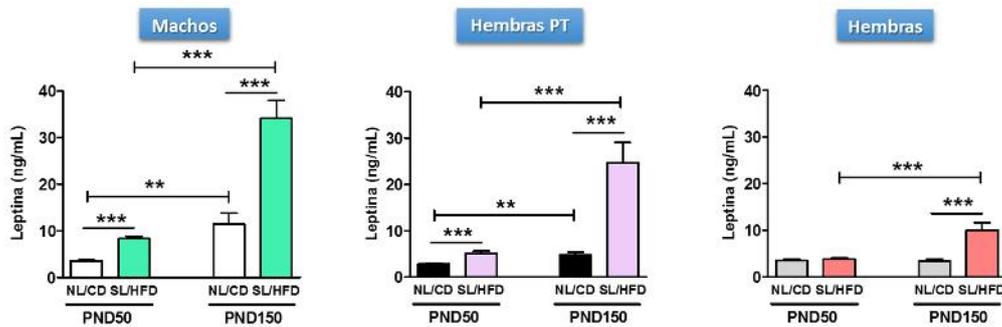


Figura 40. Niveles séricos de leptina (ng/mL) en ratas macho y hembra a los días 50 y 150 de edad sometidas o no a sobrenutrición postnatal (SL) y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes,* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Nuestros resultados muestran igualmente que la exposición a condiciones obesogénicas (SL/HFD) no produjo alteraciones significativas de los niveles circulantes de ghrelina, en ratas macho o hembra a ningunas de los dos edades estudiadas, si bien, en las ratas hembra SL/HFD se observó un tendencia a la disminución de los niveles circulantes de ghrelina en el PND50 (**Figura 41**). Por otro lado, mientras los grupos controles de machos y hembras (NL/CD) experimentaron un descenso de los niveles séricos de ghrelina entre el PND50 y PND150, que fue significativo en machos y próximo a la significación estadística en hembras, este descenso no se observó en las ratas hembra androgenizadas neonatalmente (**Figura 41**).

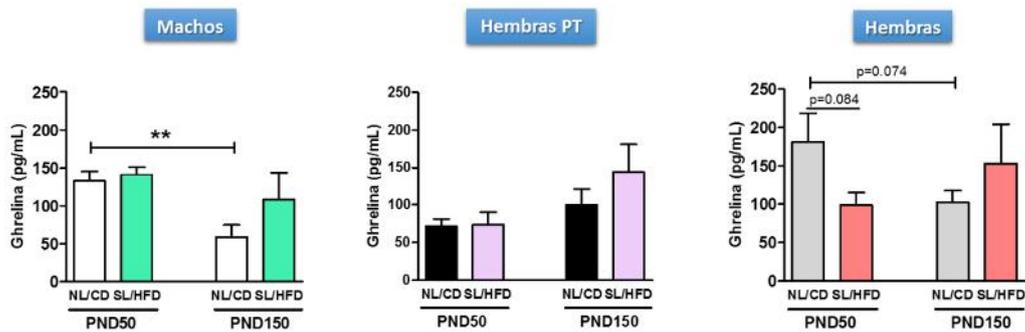


Figura 41. Niveles séricos de ghrelina (pg/mL) en ratas macho y hembra a los días 50 y 150 de edad sometidas o no a sobrenutrición postnatal (SL) y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

De otra parte, la sobrenutrición (SL/HFD) no indujo alteraciones significativas en los niveles séricos de FGF-21 en el PND50 en ninguno de los grupos experimentales estudiados, mientras que en el PND150, los machos SL/HFD, pero no las hembras obesas (androgenizadas o no), presentaron niveles de FGF-21 significativamente superiores a los de sus correspondientes controles (NL/CD). Por otro lado, tanto las hembras obesas como las controles mostraron una elevación de los niveles de FGF-21 en el PND150 en relación al PND50 (**Figura 42**).

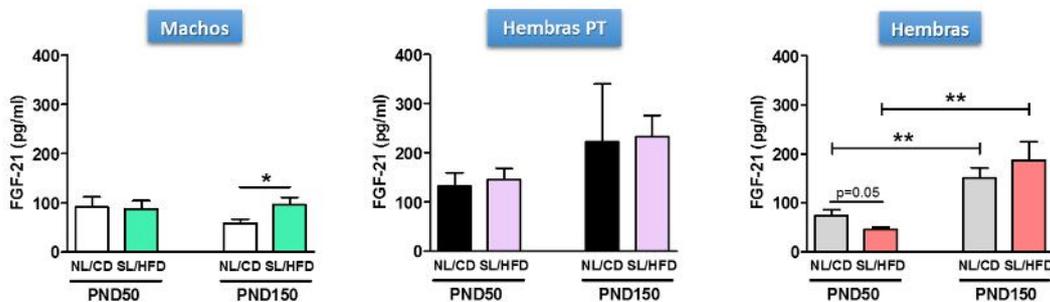


Figura 42. Niveles séricos de FGF-21 (pg/mL) en ratas macho y hembra a los días 50 y 150 de edad sometidas o no a sobrenutrición postnatal (SL) y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Finalmente, el análisis de los niveles séricos de GLP-1 mostró que en machos obesos (SL/HFD) no se produjeron modificaciones significativas, a ninguna de las dos edades estudiadas (PND50 y PND150) en comparación con sus respectivos grupos control (NL/CD), si bien se detectó una caída significativa en las concentraciones de GLP-1 en

los machos normonutridos entre los 50 y los 150 días de edad (**Figura 43**). Esta disminución también fue observada en ratas hembra normonutridas entre el PND50 y el PND150. Por otro lado, en las ratas hembra, la exposición a las manipulaciones obesogénicas (SL/HFD) resultó en un descenso significativo de los niveles séricos de GLP-1 en el PND50, pero no en el PND150. Por último, la androgenización neonatal de ratas hembra cambió sustancialmente los perfiles de GLP-1 frente a los de las hembras no androgenizadas. De una parte, las hembras androgenizadas normonutridas (PT/NL/CD) no presentaron una caída de los niveles de GLP-1 con la edad. De otra parte, la exposición a manipulaciones obesogénicas en las ratas androgenizadas (PT/SL/HFD) resultó en un incremento de los niveles circulantes de GLP-1 en ambas edades estudiadas, que fue altamente significativo en el PND50 (**Figura 43**).

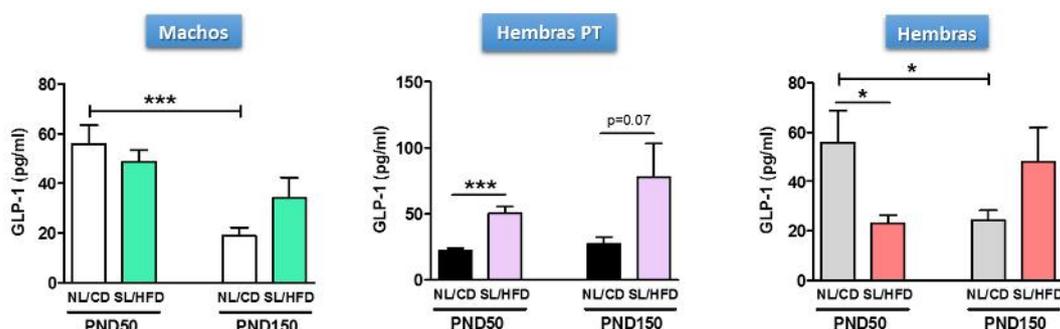


Figura 43. Niveles séricos de GLP-1 (pg/mL) en ratas macho y hembra a los días 50 y 150 de edad sometidas o no a sobrenutrición postnatal (SL) y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). En el caso de hembras androgenizadas, las ratas fueron tratadas s.c. el primer día de vida con propionato de testosterona (PT; 1.25 mg/rata). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, *, $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

2. IMPACTO METABÓLICO Y GONADOTRÓPICO DE LA SOBRENUTRICIÓN POSTNATAL Y/O LA ABLACIÓN GONADAL EN RATAS MACHO Y HEMBRA ADULTAS

De manera complementaria, nos planteamos evaluar en ratas macho y hembra el impacto sobre la función metabólica y gonadotrópica de la eliminación de la función gonadal (y con ello de la secreción de esteroides gonadales) en la edad adulta, así como su interacción con las manipulaciones obesogénicas (SL/HFD) ya mencionadas.

Para analizar el impacto del déficit de esteroides sexuales sobre la función metabólica y gonadotrópica en edad adulta, y su posible efecto sumatorio con las manipulaciones nutricionales postnatales, grupos de ratas macho y hembra de cada modelo experimental (NL/CD y SL/HFD) fueron sometidas a gonadectomía (GNX) bilateral a los 3 meses de edad (PND90) y posteriormente a eutanasia, para obtención de muestras y análisis, 60 días más tarde (PND150).

El análisis de la ganancia de peso tras la GNX mostró un mayor impacto de la ablación de la función gonadal en las hembras, toda vez que la ovariectomía (OVX) produjo un incremento persistente y significativo del peso corporal tanto en animales normonutridos como en obesos, si bien el efecto fue de mayor magnitud en las ratas hembra sometidas a las manipulaciones obesogénicas, SL/HFD (**Figura 44**). Por el contrario, en los machos normonutridos (NL/CD), la orquidectomía (ORX) indujo una disminución significativa del peso corporal, que se evidenció ya a los 10 días tras la intervención. Por su parte, la exposición a manipulaciones obesogénicas en las ratas macho (SL/HFD) evitó la caída del peso corporal tras la ORX, si bien inicialmente ésta produjo una reducción transitoria del peso corporal (**Figura 44**).

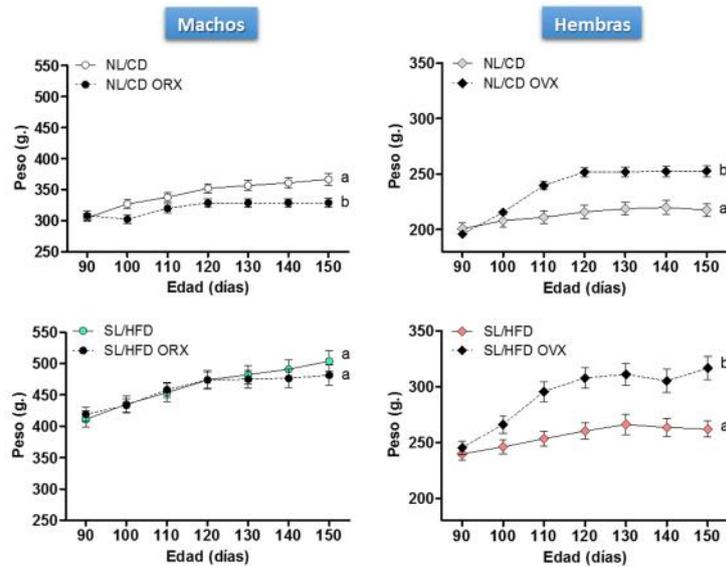


Figura 44. Evolución del peso corporal (g) durante los 60 días que siguen a la gonadectomía (GNX) en ratas macho y hembra de 150 días edad sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) postnatal y alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD). Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con diferentes letras son estadísticamente diferentes, $P \leq 0.05$.

Adicionalmente, y como es esperable tras la eliminación del *feedback* negativo de los esteroides sexuales, la eliminación de las gónadas mediante GNX indujo una elevación muy significativa de los niveles séricos de LH, tanto en el grupo control como en el obeso. Destacablemente, mientras en los machos intactos la exposición a manipulaciones obesogénicas (SL/HFD) redujo los niveles circulantes de LH, esta disminución causada por la obesidad no fue detectada en ratas macho ORX sometidas a ambas manipulaciones obesogénicas. Por el contrario, aunque los niveles basales de LH no se vieron modificados por la exposición a SL y HFD en las hembras intactas, la obesidad indujo una disminución significativa en el incremento de LH tras OVX, en comparación a la observada en ratas hembra OVX normonutridas (**Figura 45**).

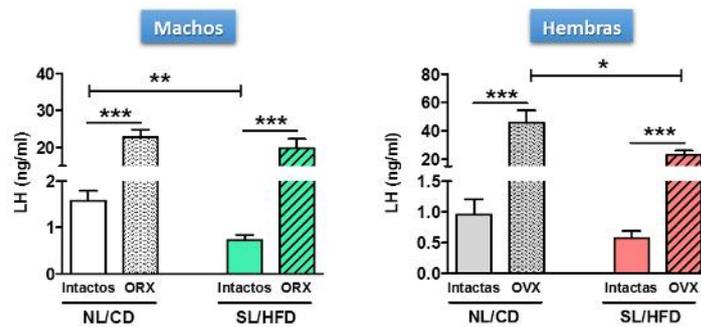


Figura 45. Niveles séricos de LH (ng/mL) en ratas macho y hembra de 150 días de edad sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) postnatal, alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD) y gonadectomizadas (ORX en machos; OVX en hembras) en el PND90. Los datos se representan como la media \pm SEM de, al menos, 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Nuestros resultados también revelaron que, tanto en machos como en hembras, la ausencia gonadal aumentó muy significativamente los niveles séricos de FSH. El incremento de los niveles circulantes de FSH fue similar en magnitud tanto en animales normonutridos (NL/CD) como en obesos (SL/HFD) de ambos sexos (**Figura 46**).

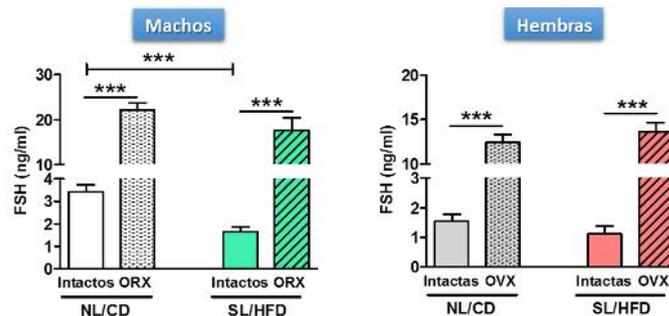


Figura 46. Niveles séricos de FSH (ng/mL) en ratas macho y hembra de 150 días de edad sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) postnatal, alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD) y gonadectomizadas (ORX en machos; OVX en hembras) en el PND90. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes, $P \leq 0.05$; ***, $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Al igual que en el set experimental previo, implementamos análisis de parámetros metabólicos relevantes, en ratas de ambos sexos, en los grupos de animales sometidos a GNX, con o sin sobrenutrición postnatal, en el PND150. En línea con lo observado en los análisis longitudinales, las ratas macho normonutridas (NL/CD) sometidas a ORX presentaron una reducción significativa del peso corporal en el PND150 frente a los animales intactos, mientras que la ORX no modificó el peso corporal en los animales obesos, SL/HFD (**Figura 47**). Por el contrario, la OVX aumentó significativamente el

peso corporal en el PND150, tanto en las hembras normonutridas (NL/CD) como en las sometidas a sobrealimentación postnatal (SL/HFD), siendo la magnitud del incremento significativamente superior en las ratas obesas (**Figura 47**).

Nuestros resultados ponen igualmente de manifiesto que la GNX no modificó los niveles séricos de glucosa en ninguno de los grupos experimentales de ambos sexos, respecto a los correspondientes grupos intactos, si bien se detectó una tendencia próxima a la significación estadística en ratas OVX obesas. Por otro lado, el nivel de glucemia en este grupo OVX+SL/HFD fue significativamente superior al detectado en las correspondientes ratas normonutridas (NL/CD) sometidas a OVX (**Figura 47**). Por otro lado, la ORX en ratas macho obesas (SL/HFD) indujo una elevación significativa de los niveles basales de insulina, que no se detectó en ratas macho normonutridas. En ratas hembra, no se observó este efecto de la ORX en el grupo de obesidad (SL/HFD), si bien encontramos un incremento no significativo de los niveles circulantes de insulina en hembras normonutridas sometidas a OVX (**Figura 47**).

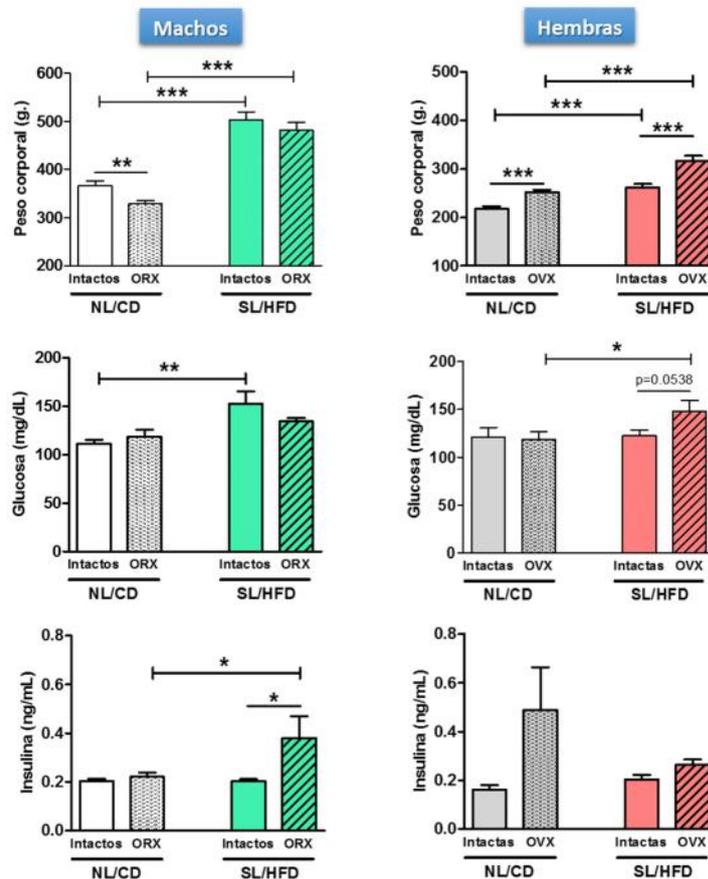


Figura 47. Peso corporal (g) y niveles séricos de glucosa (mg/dL) e insulina (ng/mL) en ratas macho y hembra de 150 días de edad sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) postnatal, alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD) y gonadectomizadas (ORX en machos; OVX en hembras) en el PND90. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos

con asteriscos son estadísticamente diferentes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Adicionalmente, la realización de un test de tolerancia a glucosa en los diferentes grupos experimentales evidenció que la ausencia de hormonas gonadales no indujo alteraciones significativas en la tolerancia a la glucosa con independencia de que los animales fueran o no obesos (**Figura 48**). Sin embargo, únicamente en machos, tanto intactos como ORX, la obesidad produjo un incremento significativo de la masa total de glucosa circulante tras la sobrecarga, expresado como área bajo la curva (AUC) y un aumento neto significativo de los niveles integrales de glucemia tras la inyección ip del bolo de glucosa, expresado como delta AUC (ΔAUC) (**Figura 48**).

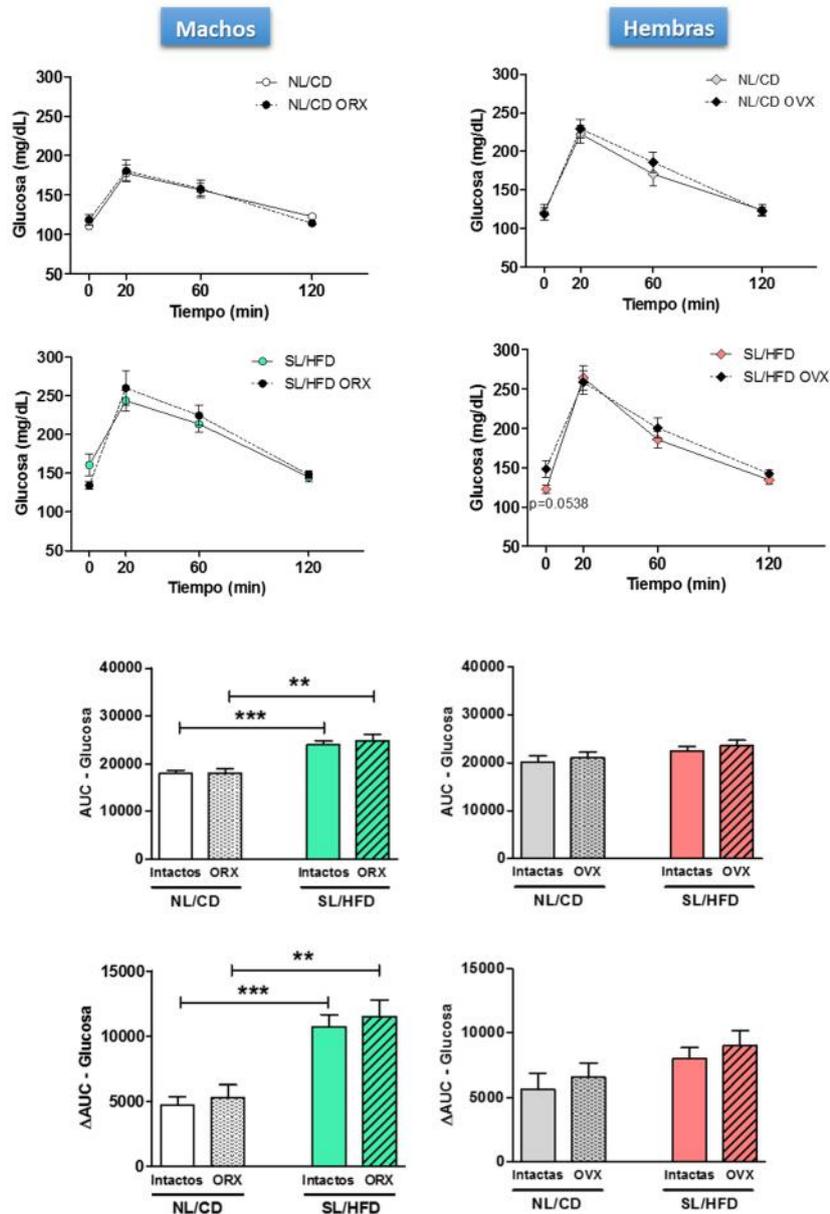


Figura 48. Niveles séricos de glucosa (mg/dL) antes, y 20, 60 y 120 min después de la administración ip de glucosa (1 g/Kg), en ratas macho y hembra de 150 días de edad sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) postnatal, alimentadas tras el destete con una

dieta control (CD) o alta en grasas (HFD) y gonadectomizadas 60 días antes. En el panel inferior, se muestran los niveles integrados de glucosa estimados como área bajo la curva (AUC) por la regla trapezoidal y delta AUC a lo largo del periodo de estudio en los diferentes grupos experimentales. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

De manera complementaria, la realización de un test de tolerancia a insulina (ITT) nos permitió evaluar cambios inducidos por la GNX sobre la sensibilidad a la insulina. Nuestros resultados indican que en ratas macho normonutridas (NL/CD), la ORX provocó un estado de resistencia parcial a las acciones de la insulina, que se manifestó tanto en una menor caída de los niveles circulantes de glucosa durante el ITT, como en niveles integrados de glucosa superiores tras el bolo de insulina, expresados como AUC (**Figura 49**). Por el contrario, debido al empeoramiento de la sensibilidad a insulina inducida por la obesidad (SL/HFD), la ORX en este grupo no produjo cambios adicionales en los perfiles de glucemia durante el ITT (**Figura 49**).

Por su parte, a diferencia de los machos, en hembras normonutridas (NL/CD), la ausencia de esteroides ováricos no empeoró los perfiles de tolerancia a insulina, y de hecho, la caída de los niveles de glucemia fue superior en ratas NL/CD OVX que en ratas normonutridas intactas a los 20-min del ITT (**Figura 49**). Por el contrario, la OVX en ratas hembra obesas indujo una moderada reducción de la sensibilidad a la insulina, que se manifestó en niveles significativamente superiores de glucemia a los 120-min del ITT, así como unos niveles de glucemia integrada (AUC) significativamente superiores en ratas SL/HFD OVX frente a los valores obtenidos en ratas OVX normonutridas (**Figura 49, panel inferior**).

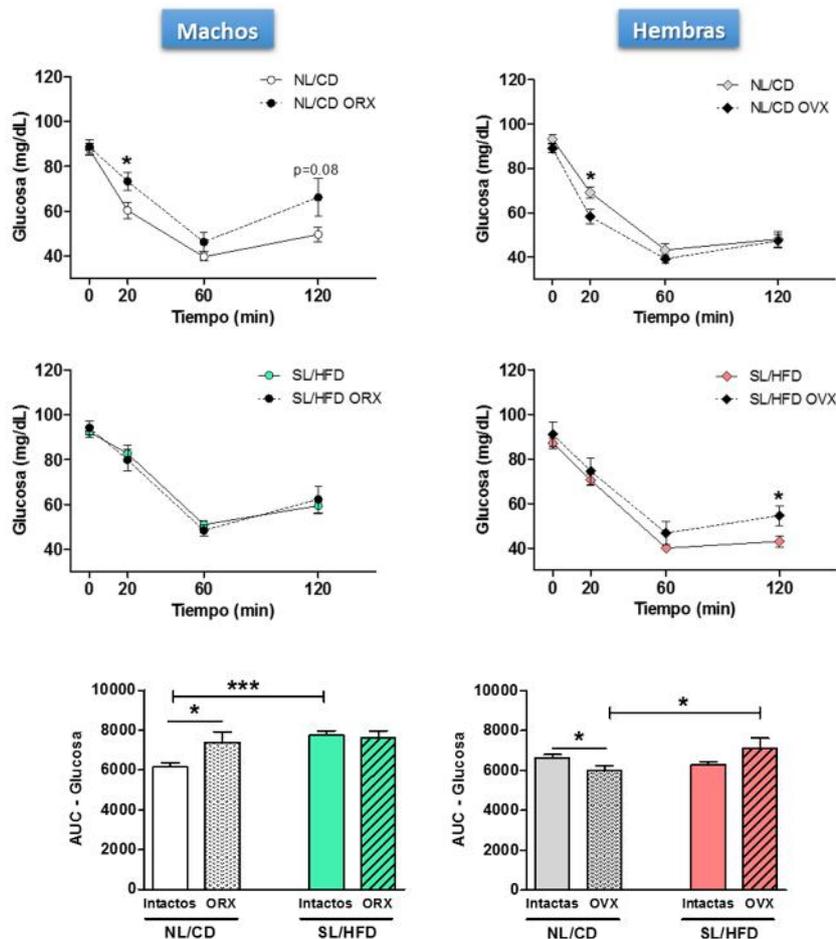


Figura 49. Niveles séricos de glucosa (mg/dL) antes, y 20, 60 y 120 min después de la administración ip de insulina (0.75 UI/Kg), en ratas macho y hembra de 150 días de edad, sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) postnatal, alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD) y gonadectomizadas en el PND90. En el panel inferior, se muestran los niveles integrados de glucosa, estimados como área bajo la curva (AUC) por la regla trapezoidal a lo largo del periodo de ITT en los diferentes grupos experimentales. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son significativamente diferentes, * $P \leq 0.05$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Por último, nuestros análisis de parámetros metabólicos mostraron que la ausencia de hormonas gonadales en ratas macho no modificó los niveles séricos de leptina en ninguno de los grupos experimentales respecto a los machos intactos (**Figura 50**), mientras que la obesidad (SL/HFD) produjo un aumento marcadamente significativo de los niveles séricos de leptina con respecto a sus correspondientes grupos control normonutridos, tanto intactos (NL/CD) como gonadectomizados (NL/CD ORX) (**Figura 50**). Por el contrario, en ratas hembra, la eliminación de las hormonas ováricas indujo un aumento muy significativo de los niveles circulantes de leptina, tanto en animales normonutridos (NL/CD) como sobrenutridos postnatalmente (SL/HFD) (**Figura 50**). Al

igual que en machos, la obesidad (SL/HFD) per se, tanto en hembras intactas como OVX, provocó un incremento significativo de los niveles séricos de leptina en comparación con sus respectivos grupos normonutridos en el PND150 (**Figura 50**).

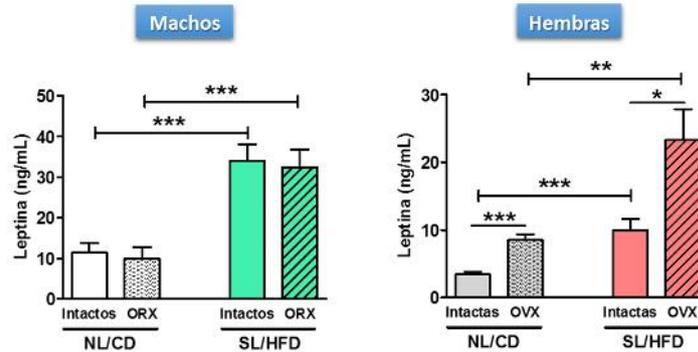


Figura 50. Niveles séricos de leptina (ng/mL) en ratas macho y hembra de 150 días de edad sometidas a normonutrición (NL) o sobrenutrición (SL) postnatal, alimentadas tras el destete con una dieta control (CD) o alta en grasas (HFD) y gonadectomizadas 60 días antes. Los datos se representan como la media \pm SEM de al menos 10 determinaciones independientes por grupo. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

BLOQUE TEMÁTICO 2. Análisis del papel de AMPK en neuronas GnRH y Kiss1 en el control metabólico de la función reproductora mediante estudios de genómica funcional

Dado el importante papel modulador del estado metabólico y las señales nutricionales en la activación y mantenimiento del eje gonadotrópico, en este bloque temático nos propusimos evaluar el papel del sensor metabólico, AMPK, en el control de la función reproductora. Para ello, empleamos aproximaciones de genómica funcional, que nos permiten la ablación *in vivo* de la señalización de AMPK en neuronas GnRH o Kiss1.

Con este fin, generamos dos modelos murinos, las líneas de ratón GAMKO y KAMKO, deficientes en la subunidad catalítica $\alpha 1$ de AMPK específicamente en neuronas GnRH y en neuronas Kiss1, respectivamente. En estos modelos implementamos una batería de análisis, que incluyeron la evaluación de diversos parámetros de maduración puberal, función gonadotrópica y/o homeostasis metabólica, aplicados en ambos sexos y en distintos estados nutricionales.

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA ACTIVACIÓN PUBERAL EN LOS MODELOS GAMKO Y KAMKO

3.1. ESTUDIOS DE PUBERTAD EN EL RATÓN GAMKO

Para explorar el posible papel de la señalización de AMPK en neuronas GnRH en el control de la pubertad, se monitorizaron diversos marcadores de maduración puberal en ratones peri-puberales normonutridos, con ablación selectiva de α 1-AMPK en neuronas GnRH (GAMKO), y en sus correspondientes controles, de ambos sexos. Nuestros resultados mostraron que las hembras con ablación de señalización de AMPK en neuronas GnRH (GAMKO) presentan un adelanto de la edad de AV frente a las hembras control, a pesar de presentar un peso corporal similar (**Figura 51 A-C**). Por el contrario, la edad de primer estro, como marcador fenotípico de la primera ovulación, no se alteró de manera significativa en las hembras GAMKO (**Figura 51 D-E**). Como consecuencia, el intervalo de tiempo entre la edad de AV y el primer estro se prolongó significativamente en las hembras GAMKO (**Figura 51F**). Adicionalmente, las hembras GAMKO prepuberales (PND 23) mostraron un incremento de la magnitud de la respuesta de LH a la administración central de kisspeptina-10 (Kp-10; **Figura 51 G-H**). En el caso de los machos, los ratones GAMKO mostraron un peso corporal significativamente mayor que los controles en el momento de llegada a la pubertad (**Figura 51 K**), si bien la progresión puberal no pareció verse alterada por la eliminación congénita de AMPK en neuronas GnRH, como se aprecia por la similitud en el curso temporal y la edad media de aparición de la SBP (**Figura 51 J**), como signo externo de pubertad en machos.

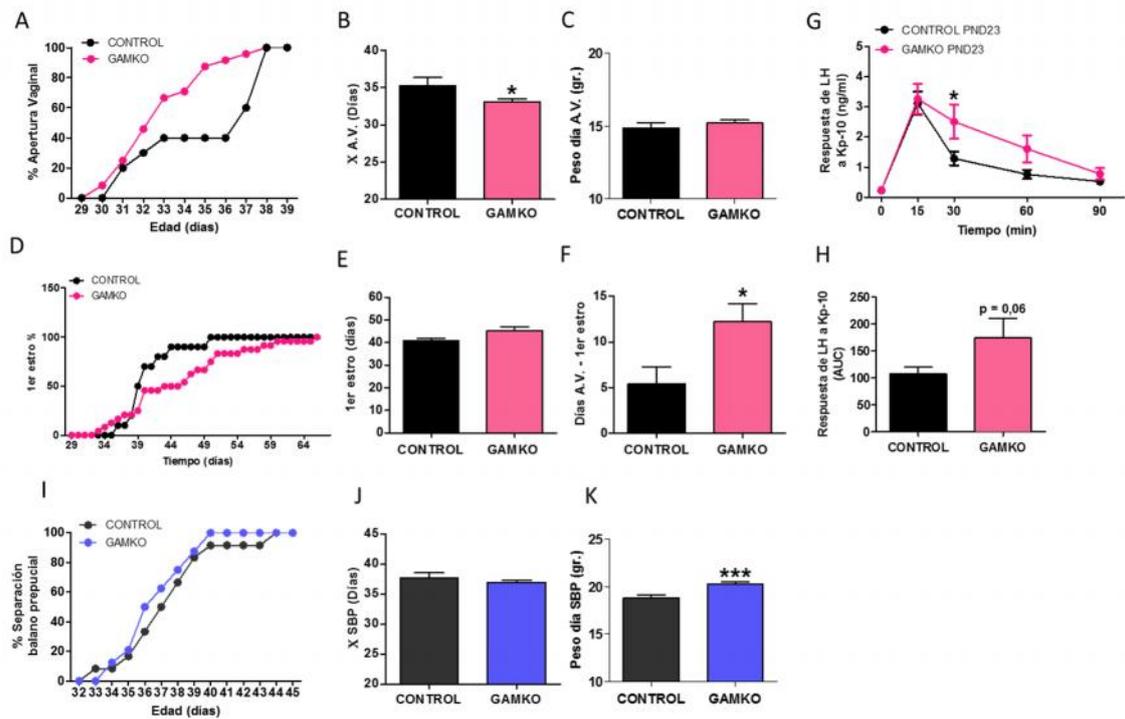


Figura 51. Marcadores fenotípicos de llegada a la pubertad en ratones hembras GAMKO y controles (paneles A-H): Porcentaje acumulativo de hembras con apertura vaginal (VO) (A); edad media de AV (B); peso corporal (g) del día de la aparición de la AV (C); porcentaje acumulativo de hembras en primer estro (D); edad media del primer estro (E); intervalo de días entre las edades de AV y primer estro (F); perfil de respuesta de LH a la inyección de Kp-10 el día postnatal 23 (PND 23) para ratones hembra control y GAMKO (G); y niveles integrados de LH, calculados como área bajo la curva (AUC) a lo largo del periodo de estudio (H). Adicionalmente, se muestran diversos parámetros en ratones macho de ambos genotipos (paneles I-K): Porcentaje acumulado de machos con separación balano prepuccial (SBP) (I); edad media de SBP (J); y peso corporal (g) de SBP (K). Tamaño de los grupos experimentales: n=10 hembras control, n=24 hembras GAMKO (paneles A-F), n=12 machos control, n=24 machos GAMKO (paneles I-K); para los paneles G y H, n=11 hembras control y n=8 hembras GAMKO. Los valores se representan como la media \pm SEM. Los grupos con asteriscos son estadísticamente diferentes, * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ vs. grupo control correspondiente (prueba t-Student).

3.2. ESTUDIOS DE PUBERTAD EN EL RATÓN KAMKO

Para explorar el posible papel de la señalización de AMPK en neuronas Kiss1 en el control de la pubertad, se monitorizaron inicialmente diversos marcadores de maduración puberal en ratones peri-puberales normonutridos, con ablación selectiva de $\alpha 1$ -AMPK en neuronas Kiss1 (KAMKO), y en sus correspondientes controles, de ambos sexos. La eliminación congénita de AMPK en las neuronas Kiss1 no alteró la progresión puberal en ratones hembras, como se deduce por el similar curso temporal (**Figura 52 A**) y la edad media de aparición de la AV (**Figura 52 B**) en ratones controles y

KAMKO. Tampoco se apreciaron diferencias en el peso corporal el día de la AV (**Figura 52 C**), en la edad de presentación del primer estro (**Figura 52 D-E**), ni en el intervalo de tiempo entre la AV y la aparición del primer estro (**Figura 52 F**). Por otro lado, en los ratones KAMKO machos, al igual que sucede en hembras, no se observaron alteraciones en la progresión puberal, como se refleja en la ausencia de diferencias en el curso temporal (**Figura 52 G**) y edad media de aparición de la SBP (**Figura 52 H**). Igualmente, tampoco se detectaron diferencias entre ambos genotipos en el peso corporal el día de la SBP (**Figura 52 I**).

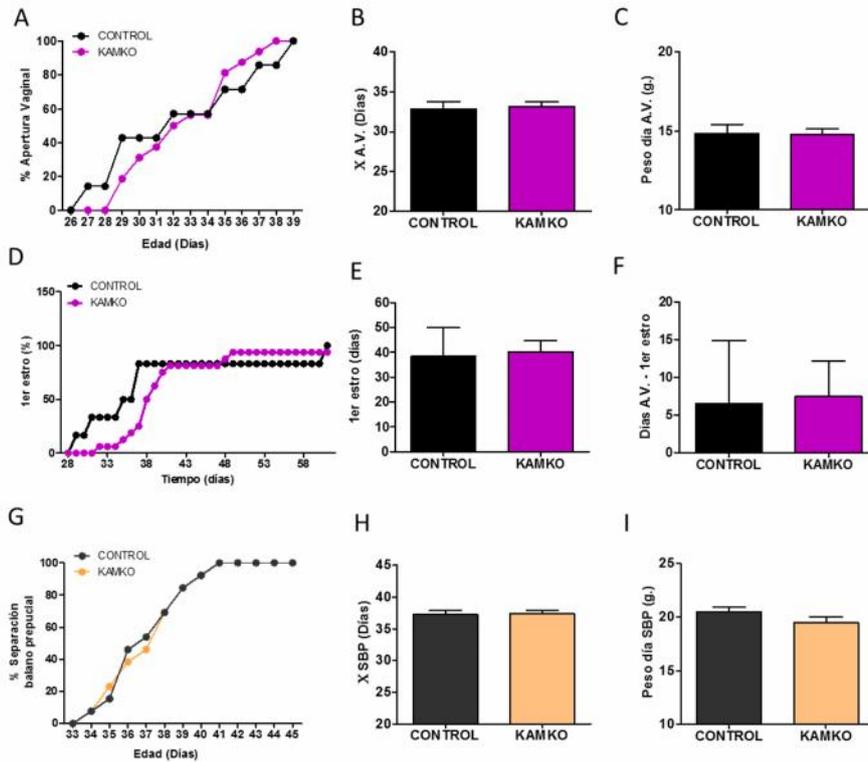


Figura 52. Marcadores fenotípicos de llegada a la pubertad en ratones hembras KAMKO y controles (paneles A-F): Porcentaje acumulativo de hembras con apertura vaginal (VO) (A); edad media de AV (B); peso corporal (g) el día de la aparición de la AV (C); porcentaje acumulativo de hembras en primer estro (D); edad media del primer estro (E); e intervalo de días entre las edades de AV y primer estro (F). Adicionalmente, se muestran diversos parámetros en ratones macho de ambos genotipos (paneles G-I): Porcentaje acumulado de separación balano preputial (SBP) (G); edad media de SBP (H); y peso corporal (g) de SBP (I). Tamaño de los grupos experimentales: n=16 hembras control, n=24 hembras KAMKO (paneles A-D), n=6 hembras control, n=15 hembras KAMKO (paneles E-F) y n=13 machos control, n=13 machos KAMKO (paneles G-I). Los valores se representan como la media \pm SEM.

Dado que, a diferencia de los ratones GAMKO, los ratones KAMKO hembra no presentaron fenotipo puberal en condiciones de normonutrición, y considerando que AMPK se activa preferencialmente en situaciones de balance energético negativo, implementamos un estudio complementario, en el que sometimos a ratones hembra peri-puberales, tanto KAMKO como controles, a un periodo de restricción calórica

crónica. Para tal fin, aplicamos un protocolo de subnutrición, consistente en una disminución del 20% de la ingesta diaria, a partir del PND23. Durante este periodo, monitorizamos la evolución del peso corporal y la aparición de la AV. Nuestros resultados muestran que la subnutrición crónica causó una disminución de aproximadamente un 20% en el peso corporal en comparación con los ratones normonutridos. Sin embargo, los perfiles de ganancia de peso de las hembras control y KAMKO tras el periodo de subnutrición fueron similares (**Figura 53 A**). Este protocolo de subnutrición produjo, en hembras control, un marcado retraso en el curso de la AV, en línea con los efectos ya conocidos de condiciones de balance energético negativo sobre la llegada de la pubertad en roedores hembra (253, 321). Por el contrario, este retraso fue parcialmente rescatado en las hembras KAMKO, a pesar de no existir diferencias, con respecto a las hembras control subnutridas, en el peso corporal el día de la AV (**Figura 53 B-C**). De hecho, todos los ratones KAMKO sometidos a subnutrición presentaron una AV completa en el día 44 de vida, mientras que únicamente el 60% de las hembras controles sometidas a subnutrición mostraron AV a esta edad (**Figura 53 D**). Es preciso destacar que la AV en ratones KAMKO subnutridos ocurrió con un peso corporal medio más bajo que el presentado por los ratones controles alimentados *ad libitum* (**Figura 53 B**). Además, los ratones KAMKO sometidos a subnutrición mostraron unos niveles de LH más elevados que el resto de grupos y un peso de ovarios similar al de los animales normonutridos. Hecho que contrasta con el reducido peso de ovarios de los animales control sometidos a restricción calórica (**Figura 53 E-F**).

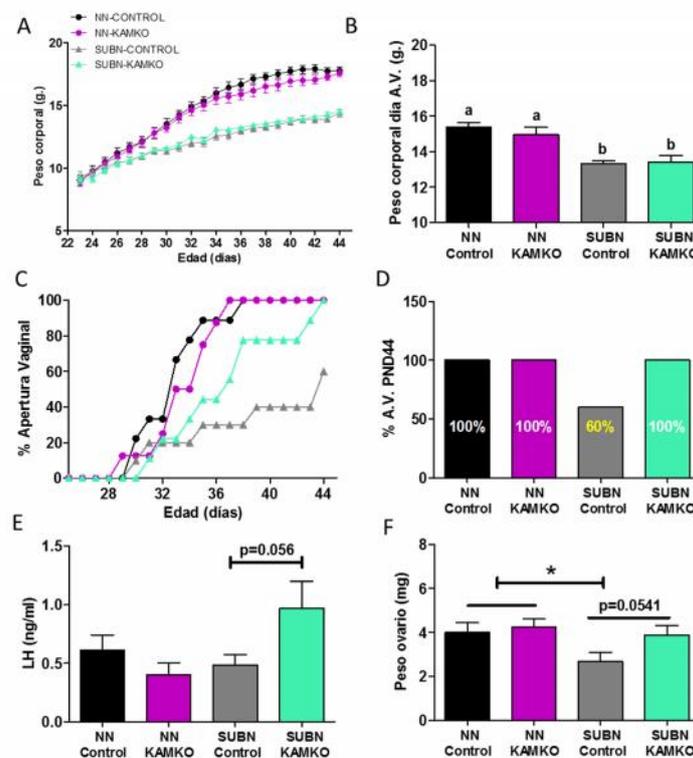


Figura 53. Diferentes marcadores de inicio puberal en ratones hembra KAMKO, y sus correspondientes controles. Se estudiaron los animales en dos condiciones metabólicas: alimentados *ad libitum* (normonutrición; NN) y tras restricción calórica (reducción del 20% de

la ingesta diaria desde el día 23 postnatal en adelante; SUBN). Evolución del peso corporal (A), peso corporal (B) y porcentaje acumulativo de hembras con AV (C), así como el porcentaje de hembras con AV el último día del experimento (PND44) (D). Adicionalmente, se muestran: niveles circulantes de LH (E); y pesos de ovario (F). Los tamaños de los grupos fueron: NN-control=9; NN-KAMKO= 8; SUBN-control=10; SUBN-KAMKO=9 animales por grupo. Los valores se representan como la media \pm SEM. Los grupos con asteriscos y distintas letras son estadísticamente diferentes, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$; a $P \leq 0.05$ y b $P \leq 0.01$. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

4. CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN LA EDAD ADULTA EN LOS MODELOS GAMKO Y KAMKO

4.1. ESTUDIOS DE FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL RATÓN GAMKO

Además de los estudios puberales, analizamos los perfiles de liberación pulsátil de LH durante un periodo de 3 horas en ratones adulto, control y GAMKO, de ambos sexos. Los principales parámetros de la secreción de LH registrados fueron: nivel medio de LH, nivel basal de LH (definido como la media de los 5 valores más bajos) y el número de pulsos de LH en 3 horas de ensayo (determinado mediante un incremento del 125% desde el punto más bajo hasta el pico de LH). Nuestros resultados no detectaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros entre los ratones control y GAMKO, independientemente del sexo (**Figura 54 A-F**).

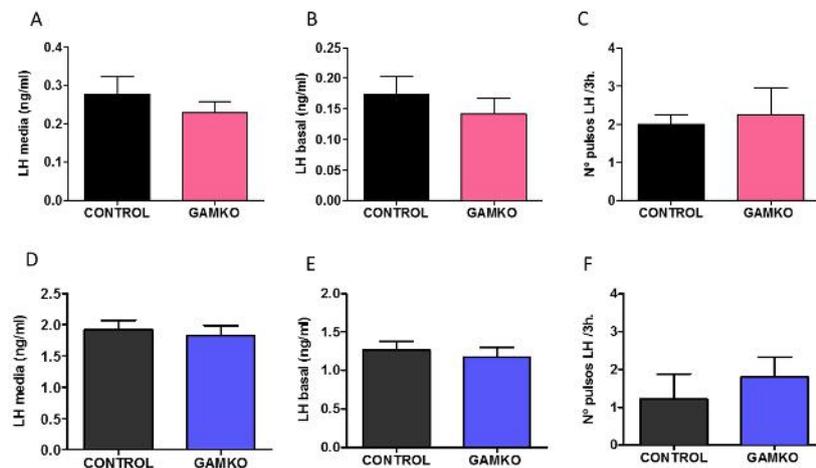


Figura 54. Indicadores de los perfiles de liberación pulsátil de LH, analizados durante un periodo de 3 horas en ratones adultos hembra (A-C) y macho (D-F) de ambos genotipos. Se registraron los principales parámetros de secreción de LH: nivel medio de LH (A, D), nivel basal de LH, definido como la media de los 5 valores de LH más bajos (B, E), y el número de pulsos de LH en 3 horas (determinado mediante un incremento del 125% desde el punto más bajo hasta el pico de LH) (C, F). Los tamaños de los grupos fueron: n=6 hembras control, n=8 hembras GAMKO (paneles A-C) y n=9 machos control, n=10 machos GAMKO (paneles D-F). Los valores se representan como la media \pm SEM.

Por otro lado, con objeto de obtener indicadores adicionales del estado de la función reproductiva en las hembras, se implementaron análisis diarios de ciclicidad estral mediante citología vaginal. Estos análisis evidenciaron que los ratones GAMKO hembra muestran una ciclicidad estral regular (**Figura 55 A**) así como una fertilidad globalmente preservada, con un 100% de las hembras control y GAMKO que alcanzaron la preñez tras su cruce con un macho control de fertilidad comprobada (**Figura 55 B**). Por otro lado, el tamaño medio de las camadas fue similar en ambos genotipos (**Figura 55 C**). Finalmente, los ratones hembras y machos GAMKO mostraron un peso gonadal similar al presentado por sus respectivos controles (**Figura 55 D-E**).

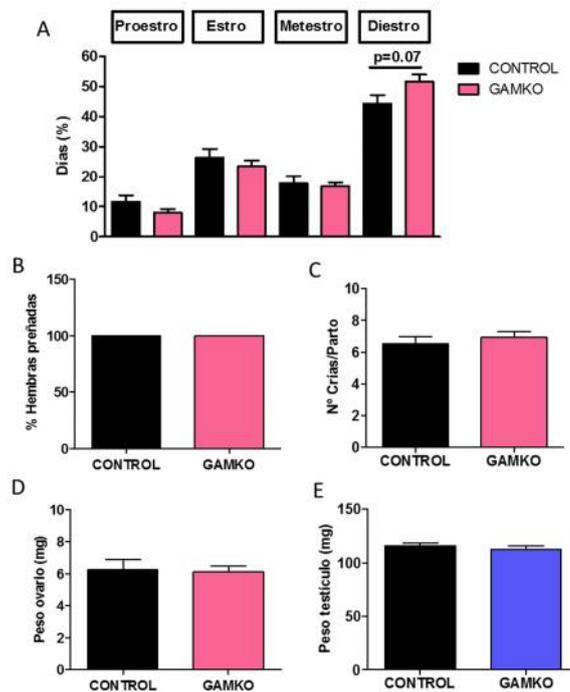


Figura 55. Indicadores de función reproductiva evaluados en ratones hembra de ambos genotipos, que incluyen los siguientes parámetros principales: ciclicidad estral (A); porcentaje de hembras que alcanzan la preñez tras su cruce con un macho de fertilidad probada (B); tamaño de las camadas (nº crías/parto) (C); y peso (mg) ovárico (D). Adicionalmente, se evaluó el peso (mg) testicular en ratones macho adultos de ambos genotipos (E). Los tamaños de los grupos fueron: n=10 hembras control, n= 24 hembras GAMKO (panel A), n=12 hembras control, n=12 hembras GAMKO (paneles B-C), n=4 hembras control, n=7 hembras GAMKO (panel D) y n=11 machos control, n=12 machos GAMKO (panel E). Los valores se representan como la media \pm SEM.

A fin de obtener una evaluación más detallada de la función gonadotrópica en nuestro modelo de ablación de AMPK en neuronas GnRH, analizamos adicionalmente las respuestas de LH tras la administración de activadores centrales del eje gonadotrópico, en ratones control y GAMKO adultos, de ambos sexos. En estos estudios, utilizamos hasta tres estimuladores de la secreción de gonadotropinas: GnRH (ip), Kp-10 (icv) y el agonista de NKB, Senktide (icv). En el caso de las hembras, tanto las ratonas control

como GAMKO presentaron respuestas secretoras de LH a la administración de los tres estímulos indicados, si bien la magnitud de la secreción de LH inducida por GnRH, Kp-10 y Senktide fue significativamente superior en las hembras GAMKO (**Figura 56**). Esta mayor capacidad de respuesta se puso de manifiesto tanto en los perfiles de curso temporal de los niveles de LH tras la administración de los estímulos (**Figura 56 A, C, E**), como en la cantidad total de LH liberada, expresada como AUC, tras la inyección de GnRH, Kp-10 o Senktide, que fue significativamente superior a la detectada en las hembras control (**Figura 56 B, D, F**). En concreto, mientras que la respuesta de LH a Kp-10 se duplicó en hembras GAMKO (**Figura 56 C**), el incremento medio de la capacidad de respuesta de LH a GnRH y Senktide fue de alrededor del 50-60% superior que en controles (**Figura 56 A, E**). Por el contrario, en ratones GAMKO macho, las respuestas de LH a GnRH y Kp-10 no presentaron diferencias significativas respecto a los animales control, ni en el perfil temporal de respuesta (**Figura 56 G, I**), ni en las respuestas integrales de LH (**Figura 56 H, J**).

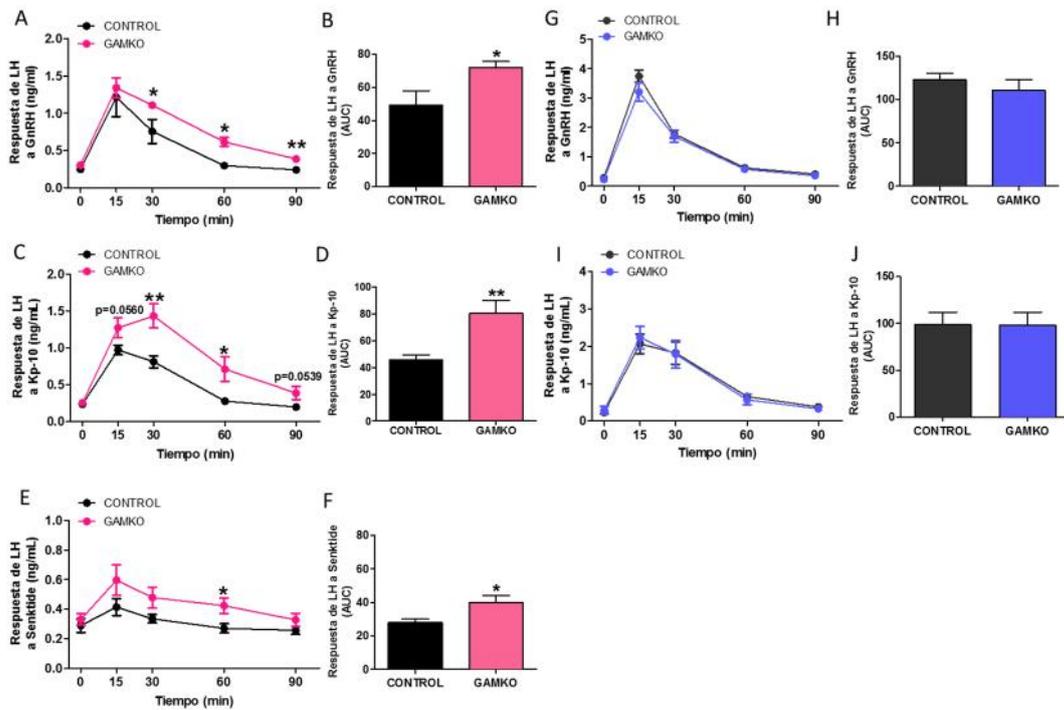


Figura 56. Niveles de LH secretados (ng/mL) tras la administración de activadores centrales del eje gonadotrópico en ratones adultos hembra (A-F) y macho (G-J), GAMKO y controles. En los paneles (A, B, G, H), se muestran las respuestas de LH tras la inyección periférica (ip) de GnRH (0,25 μ g/100ul/ratón). En los paneles (C, D, I, J), se presentan los efectos en términos de secreción de LH de la administración central de Kp-10 (50 pmol/5ul/ratón). En los paneles (E, F), se representan los niveles de LH tras la inyección central del agonista de NKB, Senktide (600pmol/5ul/ratón). Adicionalmente, se presentan datos de niveles integrados de LH, expresados como área bajo la curva (AUC), durante el periodo de estudio (B, D, F). Los tamaños de los grupos fueron: n=5 hembras control, n=9 hembras GAMKO (paneles A-B), n=9 hembras control, n=8 hembras GAMKO (paneles C-F), n=7 machos control, n=5 machos GAMKO (paneles G-J). Los valores se representan como la media \pm SEM. Los grupos con

asteriscos son estadísticamente diferentes, * $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$ vs. grupo control correspondiente (prueba t-Student).

4.2. ESTUDIOS DE FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL RATÓN KAMKO

De manera similar, analizamos los perfiles de liberación pulsátil de LH durante un periodo de 3 horas en ratones hembra adultos, control y KAMKO. Al igual que en la línea GAMKO, se registraron los principales parámetros de la secreción de LH: nivel medio de LH, nivel basal de LH y el número de pulsos de LH en 3 horas de ensayo. El análisis de la pulsatilidad de LH no reveló diferencias significativas entre los animales control y KAMKO en ninguno de los parámetros estudiados (**Figura 57 A-C**).

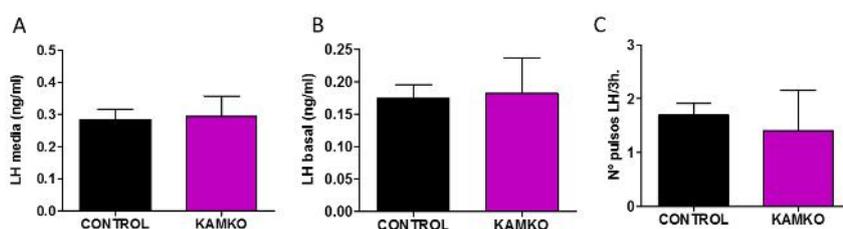


Figura 57. Indicadores de los perfiles de liberación pulsátil de LH, analizados durante un periodo de 3 horas en ratones adultos hembra (A-C) de ambos genotipos. Se registraron los principales parámetros de secreción de LH: nivel medio de LH (A), nivel basal de LH definido como la media de los 5 valores de LH más bajos (B) y el número de pulsos de LH en 3 horas (determinado mediante un incremento del 125% desde el punto más bajo hasta el pico de LH) (C). Los tamaños de los grupos fueron: $n=10$ hembras control y $n=5$ hembras KAMKO. Los valores se representan como la media \pm SEM.

De la misma forma, los análisis de indicadores adicionales del estado de la función reproductiva pusieron de manifiesto que las hembras adultas KAMKO presentan una ciclicidad estral conservada, monitorizada mediante citología vaginal diaria (**Figura 58 A**), así como una fertilidad normal, como lo demuestra el hecho que, tras el cruce con machos fértiles, el 100% de las hembras KAMKO alcanzaron la preñez (**Figura 58 B**), con un número de crías por camada similar al de las ratonas control (**Figura 58 C**). En cuanto al peso de las gónadas, los ratones KAMKO no mostraron diferencias con respecto a los animales control, independientemente del sexo (**Figura 58 D-E**).

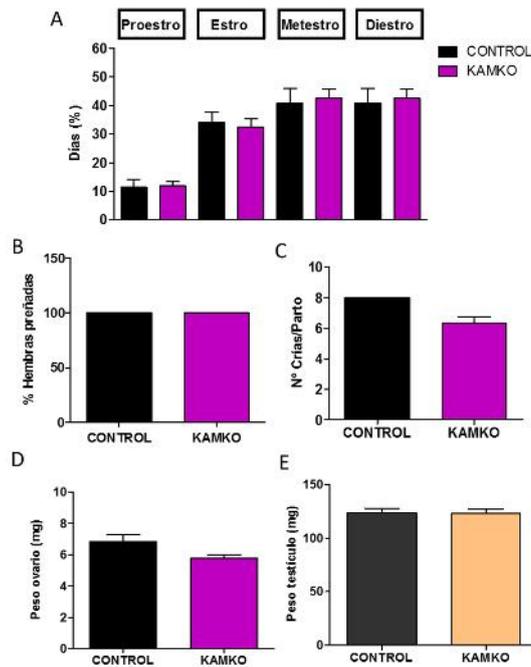


Figura 58. Indicadores de función reproductiva evaluados en ratones hembra de ambos genotipos, que incluyen los siguientes parámetros principales: ciclicidad estral (A); porcentaje de hembras preñadas en presencia de machos fértiles (B); tamaño de las camadas (nº crías/parto) (C); y peso (mg) ovárico (D). El peso (mg) testicular también se evaluó en ratones macho adultos de ambos genotipos (E). Los tamaños de los grupos fueron: n= 7 hembras control, n=16 hembras KAMKO (panel A), n=12 hembras control, n=12 hembras KAMKO (paneles B-C), n=7 hembras control, n=4 hembras KAMKO (panel D) y n=12 machos control, n=10 machos KAMKO (panel E). Los valores se representan como la media \pm SEM.

Finalmente, evaluamos en este bloque las respuestas de secreción de LH tras la administración de activadores del eje gonadotrópico en ratones KAMKO; en este caso, dado que la ablación de AMPK se lleva a cabo en neuronas Kiss1, los estimuladores analizados fueron Kp-10 y Senktide. Nuestros análisis evidenciaron que las ratonas KAMKO adultas, a diferencia de lo observado en las hembras GAMKO, no presentaron diferencias en las respuestas secretoras de LH a la activación del eje gonadotrópico. Así, las hembras KAMKO mostraron un perfil similar de respuesta secretora de LH al de hembras control, tras la inyección icv de Kp-10 (**Figura 59 A**) o del agonista de NKB, Senktide (**Figura 59 C**), lo que se vio reflejado en unos niveles integrados de LH igualmente similares entre KAMKO y controles, tras Kp-10 o Senktide (**Figura 59 B, D**).

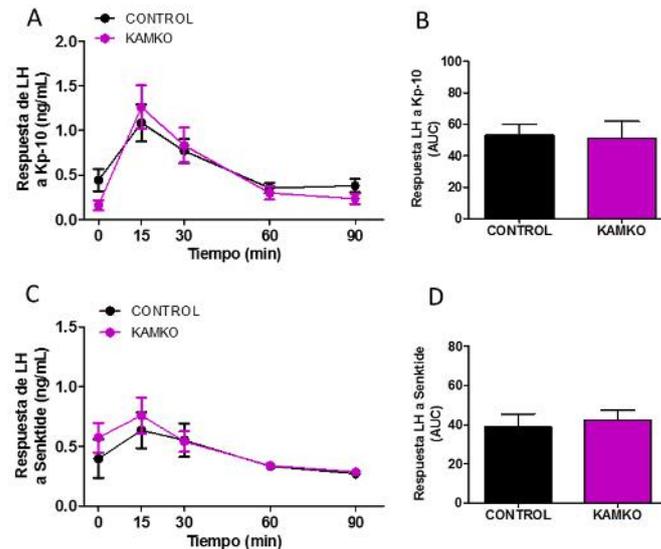


Figura 59. Niveles de LH secretados (ng/mL) tras la administración de activadores centrales del eje gonadotrópico en ratones hembra adultos, KAMKO y controles. En el panel (A), se muestran las respuestas de LH tras la inyección central (icv) de Kp-10 (50 pmol/5ul/ratón). En el panel (C), se representan los niveles de LH tras la inyección icv del agonista de NKB, Senktide (600pmol/5ul/ratón). Adicionalmente, se presentan datos de niveles integrados de LH, expresados como área bajo la curva (AUC), durante el periodo de estudio (B, D). Los tamaños de los grupos fueron: n= 6 hembras control, n=5 hembras KAMKO (paneles A-D). Los valores se representan como la media \pm SEM.

5. IMPACTO DEL ESTRÉS METABÓLICO SOBRE LA FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN LA EDAD ADULTA EN LOS MODELOS GAMKO Y KAMKO

5.1. ESTUDIOS DE ESTRÉS METABÓLICO Y FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL RATÓN GAMKO

Considerando que AMPK se activa en condiciones de insuficiencia energética, en este bloque experimental evaluamos diversos parámetros reproductivos tras la aplicación de diferentes protocolos de restricción calórica en hembras adultas control y GAMKO. De una parte, se monitorizó la ciclicidad estral durante un periodo de subnutrición seguido de un periodo de re-alimentación (o *re-feeding*). En concreto, se implementaron dos protocolos con distinto grado de subnutrición y *re-feeding*. En primer lugar, se implementó un protocolo donde se aplicó un 15% de subnutrición (es decir, 85% de la ración diaria de la ingesta *ad libitum*) y seguidamente se aplicó un *re-feeding ad libitum*. En el segundo protocolo, se aplicó una subnutrición más intensa del 35%, seguida de un *re-feeding* parcial del 85% de la ingesta diaria *ad libitum*. El periodo de *re-feeding* comenzó cuando se vio interrumpida la ciclicidad estral en todos los ratones, definida por la presencia persistente de celularidad propia de la fase de diestro en el frotis vaginal diario. Nuestros datos muestran que, en ambos protocolos de manipulación nutricional, la magnitud porcentual de pérdida (**Figura 60 A y D**) y

recuperación de peso corporal (**Figura 60 B y E**) fue similar entre hembras control y GAMKO. Sin embargo, en ambos protocolos, la recuperación de la ciclicidad estral (expresada como el número de días transcurridos desde el inicio del periodo de *re-feeding* hasta la aparición del primer estro) tuvo lugar de manera más rápida (es decir, en menor número de días) en hembras GAMKO que en el grupo control (**Figura 60 C y F**).

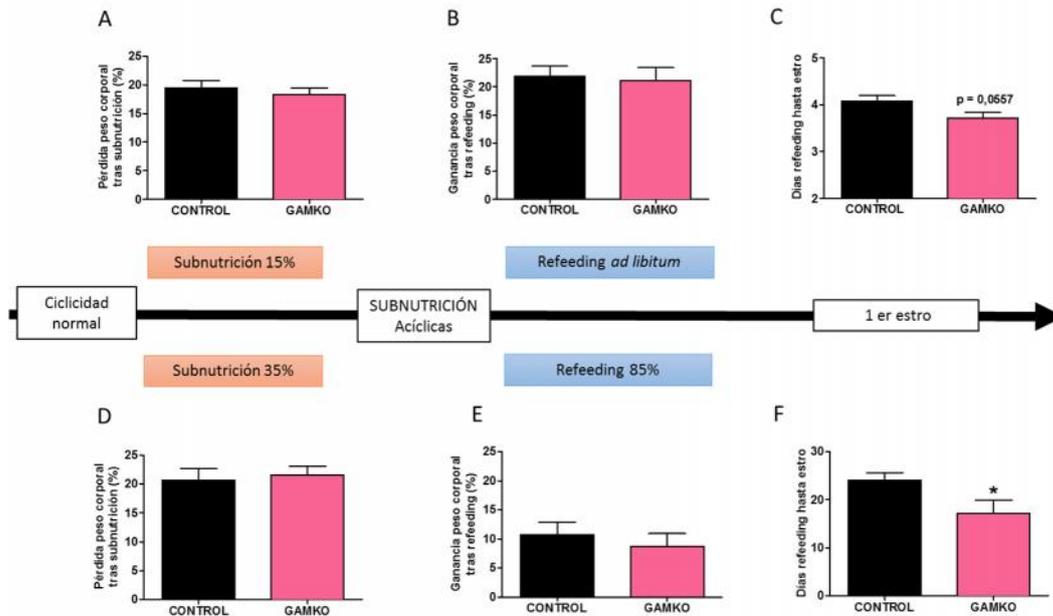


Figura 60. Magnitudes porcentuales de pérdida (A, D) y recuperación (B, E) de peso corporal y seguimiento de la ciclicidad estral (C, F), en hembras control y GAMKO, tras aplicar dos protocolos diferentes de subnutrición y *re-feeding*. En los paneles superiores (A-C), se aplicó un grado de subnutrición del 15% seguido de *re-feeding ad libitum*, mientras que en los paneles inferiores (C-F), se siguió una subnutrición del 35% continuando con un *re-feeding* parcial del 85% de la ingesta diaria *ad libitum*. El periodo de *re-feeding* comenzó cuando todos los ratones de ambos genotipos perdieron la ciclicidad estral. Se registró el número de días transcurridos desde el inicio del periodo de *re-feeding* hasta la aparición del primer estro (D, H). Los tamaños de los grupos fueron: n=14 hembras control, n=15 hembras GAMKO (paneles A, B), n=18 hembras control, n=10 hembras GAMKO (paneles C, D). Los valores se representan como la media \pm SEM.

La observación de una recuperación más rápida de la ciclicidad estral en ratones GAMKO hembra tras subnutrición y el re-feeding nos llevó a estudiar la pulsatilidad de LH en condiciones de restricción calórica. Con ese propósito, se aplicó un protocolo de ayuno de 18 horas (*fasting* 18 h; F18) y se analizaron los perfiles de pulsatilidad de LH durante 3 horas en ratones hembra adultos de ambos genotipos. Los niveles medio y total de LH secretados durante el periodo de ayuno experimentaron una disminución en ratones hembra control, muy próxima a la significación estadística (P=0.07 LH media; P=0.06 LH total). Por el contrario, estos parámetros no se vieron alterados por un protocolo similar de ayuno en las ratonas GAMKO adultas (**Figura 61 A-B**). Esta disminución inducida por el ayuno en ratonas control se tradujo en una disminución de

los niveles basales de LH (**Figura 61 C**), pero no del número de pulsos de LH o de la masa secretora global de LH (**Figura 61 D-F**). Así, mientras que los niveles basales de LH en ratones control fueron significativamente más bajos tras ayuno de 18 horas (**Figura 61 C**), los valores de delta AUC (ΔAUC), correspondiente al área sobre los niveles basales de LH para cada muestra, permanecieron sin cambios en ratones control tras el ayuno (**Figura 61 E**). Del mismo modo, el número medio de pulsos de LH durante el periodo de 3 horas no se vio modificado en ratones control tras ayuno (**Figura 61 F**). Por otro lado, y a diferencia de lo observado en los animales controles, en ratones GAMKO, no se detectaron cambios cuantitativos en el patrón de secreción de LH tras 18 horas de ayuno (**Figura 61 A-F**). Así, no sólo el número de pulsos y la masa secretora de LH permanecieron sin cambios, sino que los niveles basales de LH no disminuyeron en ratones hembra GAMKO tras ayuno (**Figura 61 C-F**).

Por otro lado, el ayuno produjo un aumento en las respuestas secretoras de LH a una dosis efectiva de Kp-10, en comparación con los animales normonutridos. Notablemente, aunque este fenómeno se detectó en ambos genotipos, tanto el curso temporal de las respuestas de LH a Kp-10, como las respuestas secretoras netas (AUC) fueron significativamente mayores en ratones hembra GAMKO sometidos a ayuno que en los correspondientes controles en fasting (**Figura 61 G, H**); fenómeno similar al observado en ratones alimentados *ad libitum* (normonutridos, NN).

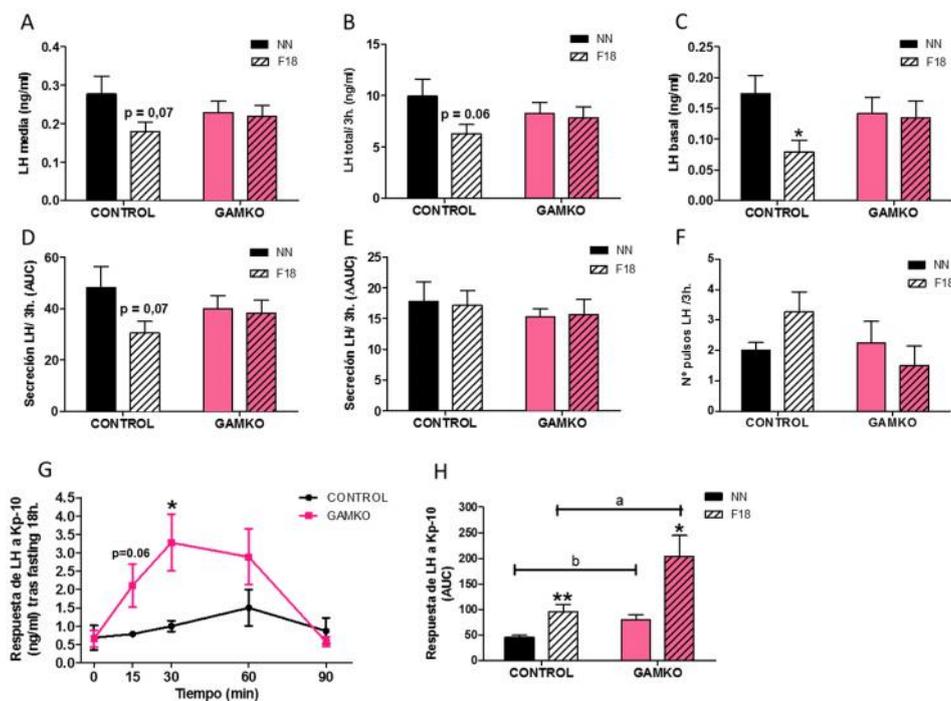


Figura 61. Cambios en la dinámica secretora de LH y la capacidad de respuesta a Kp-10 tras ayuno en ratones hembra adultas, control y GAMKO. Se analizó la secreción pulsátil de LH durante un periodo de 3 horas después de 18 horas de ayuno (F18) comparándose con los resultados obtenidos en condiciones de normonutrición (NN). Los principales parámetros de secreción de LH registrados fueron: nivel medio de LH (A); nivel total (B); nivel basal de LH,

definido como la media de los 5 valores de LH más bajos (C); masa secretora global de LH, expresada como el área bajo la curva (AUC; donde $y=0$) (D); delta AUC ($y=$ nivel basal para cada muestra) (E); y el número de pulsos de LH en 3 horas (definido mediante un incremento del 125% desde el punto más bajo hasta el pico de LH) (F). Por otra parte, se estudió la respuesta curso-temporal de LH a la inyección central de Kp-10 (50pmol/5ul/ratón) tras 18 horas de ayuno en ratones hembra adultas de ambos genotipos (G), y se compararon los niveles integrados de LH, calculados como área bajo la curva (AUC), de la respuesta de LH a Kp-10 entre las condiciones de normonutrición y tras ayuno de 18 horas (H). Los tamaños de los grupos fueron: $n=6$ hembras control, $n=8$ hembras GAMKO para NN y $n=7$ hembras control, $n=8$ hembras GAMKO para F18 (paneles A-F). Para el panel G y H, $n=9$ hembras control, $n=8$ hembras GAMKO para NN y $n=8$ hembras control, $n=10$ hembras GAMKO para F18. Los valores se representan como la media \pm SEM. Los grupos con asteriscos y letras distintas son estadísticamente diferentes; * $P\leq 0.05$; ** $P\leq 0.01$ vs. grupo normonutrido correspondiente. En el panel H, a $P\leq 0.05$; b $P\leq 0.01$ vs. correspondiente grupo control. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Adicionalmente, los análisis de los perfiles individuales de secreción de LH en hembras control y GAMKO revelaron un cambio en la morfología de los pulsos de LH impuesta por el ayuno, que se detectó en ambos genotipos, pero que fue aparentemente más evidente en los ratones GAMKO. De este modo, tras 18 horas de ayuno, los pulsos de LH aparecieron más complejos y menos agudos, algunos de los cuales parecerían ser el resultado de la agregación de varios pulsos individuales (**Figura 62**).

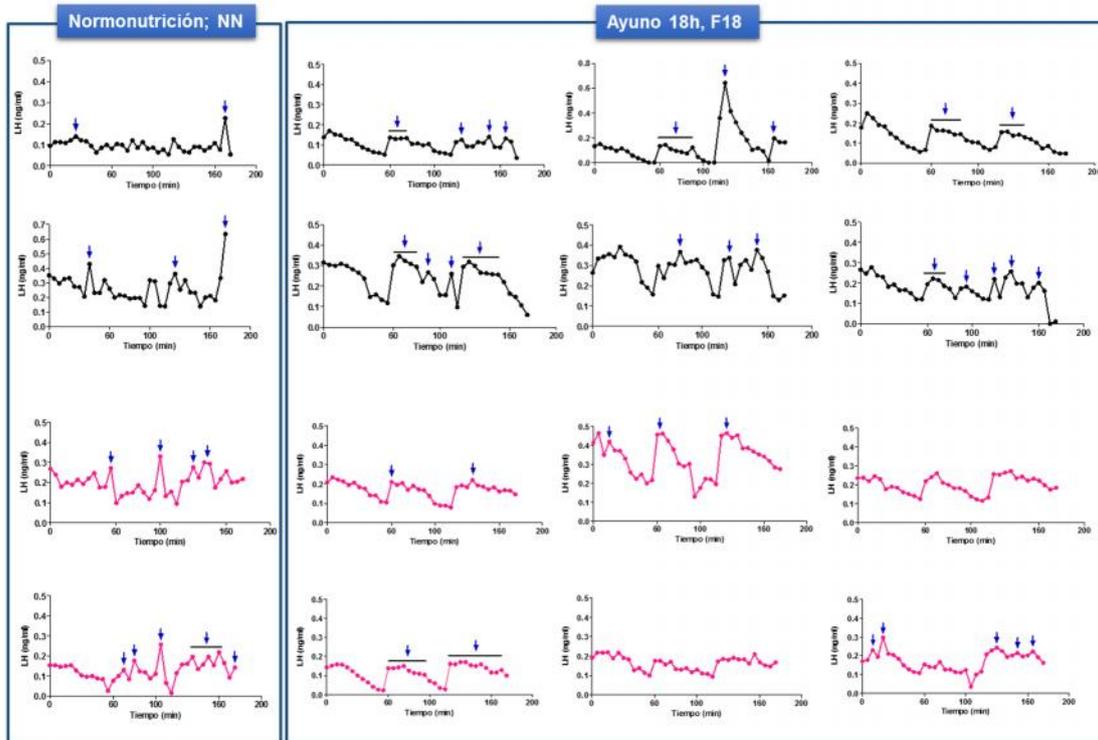


Figura 62. Cambios en los perfiles individuales de secreción pulsátil de LH en hembras control y GAMKO en condiciones de normonutrición y tras ayuno de 18-h. Las flechas indican la

aparición de picos de LH, definido por un valor de incremento del 125% desde el punto más bajo hasta el pico de LH.

5.2. ESTUDIOS DE ESTRÉS METABÓLICO Y FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL RATÓN KAMKO

Implementamos análisis similares de función gonadotrópica en el ratón KAMKO tras la aplicación de protocolos análogos de estrés metabólico por deprivación nutricional. Para tal fin, ratones hembra adultas, control y KAMKO, fueron sometidos a un protocolo de subnutrición del 35%, seguido de *re-feeding* parcial del 85% de la ingesta diaria *ad libitum*. El análisis del porcentaje de pérdida (**Figura 63 A**) y recuperación (**Figura 63 B**) del peso corporal tras el periodo de subnutrición y *re-feeding*, demostró que las proporciones de pérdida y ganancia son similares entre hembras de ambos genotipos. Además, la aparición del primer estro tras el periodo de *re-feeding* tuvo lugar a un tiempo similar en hembras de ambos genotipos (**Figura 63 C**).

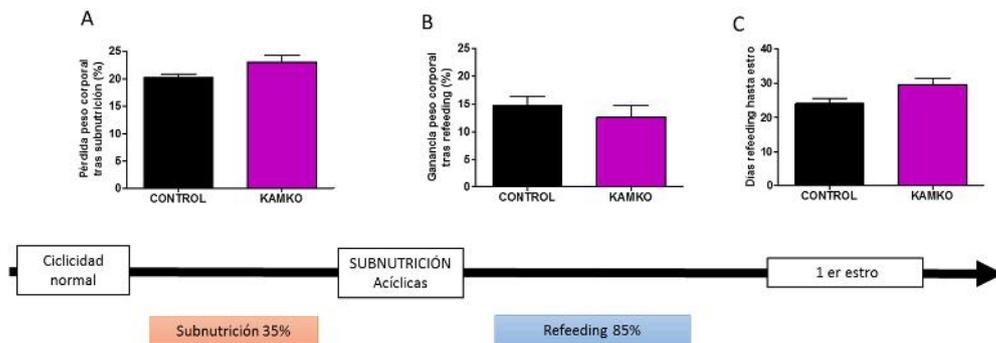


Figura 63. Magnitudes porcentuales de pérdida (A) y recuperación (B) de peso corporal y seguimiento de la ciclicidad estral (C), en hembras control y GAMKO, durante un periodo de subnutrición seguido de un periodo de *re-feeding*. Se aplicó un protocolo de restricción calórica del 35% seguido de *re-feeding* parcial del 85% de la ingesta diaria *ad libitum*. El periodo de *re-feeding* comenzó cuando todos los ratones de ambos genotipos perdieron la ciclicidad estral y se registró el número de días transcurridos desde el inicio del periodo de re-feeding hasta la aparición del primer estro (C). Los tamaños de los grupos fueron: n=15 hembras control, n=6 hembras KAMKO (paneles A-B). Los valores se representan como la media \pm SEM.

Por otra parte, y de manera análoga a los estudios llevados a cabo en ratones GAMKO, analizamos la dinámica secretora de LH en respuesta al ayuno en ratones KAMO. Con este fin, ratonas hembra adultas, control y KAMKO, fueron sometidas a un periodo de ayuno de 18 horas (*fasting* 18 h; F18). Antes y después del periodo de ayuno, se estudió la pulsatilidad de LH durante un periodo de 3 horas. Los niveles medio, total y basal de LH secretados durante el periodo de estudio disminuyeron de forma significativa, en ratones hembra control y KAMKO tras 18 horas de ayuno (**Figura 64 A-C**). Del mismo modo, la masa secretora global de LH (AUC) disminuyó en ambos genotipos de forma significativa; una tendencia similar fue detectada para los valores

de delta AUC (Δ AUC), correspondiente al área sobre los niveles basales de LH para cada muestra, aunque esta última reducción no fue estadísticamente significativa (**Figura 64 D-E**). Por otro parte, y de forma similar a lo observado en ratones control del genotipo GAMKO, el número medio de pulsos de LH a lo largo del periodo de 3 horas no se vio alterado en ratones control tras ayuno en este estudio experimental, mientras que las ratonas KAMKO mostraron una tendencia al aumento del número de pulsos de LH bajo el mismo régimen de privación nutricional, que sin embargo no alcanzó el nivel de significación estadística (**Figura 64 F**).

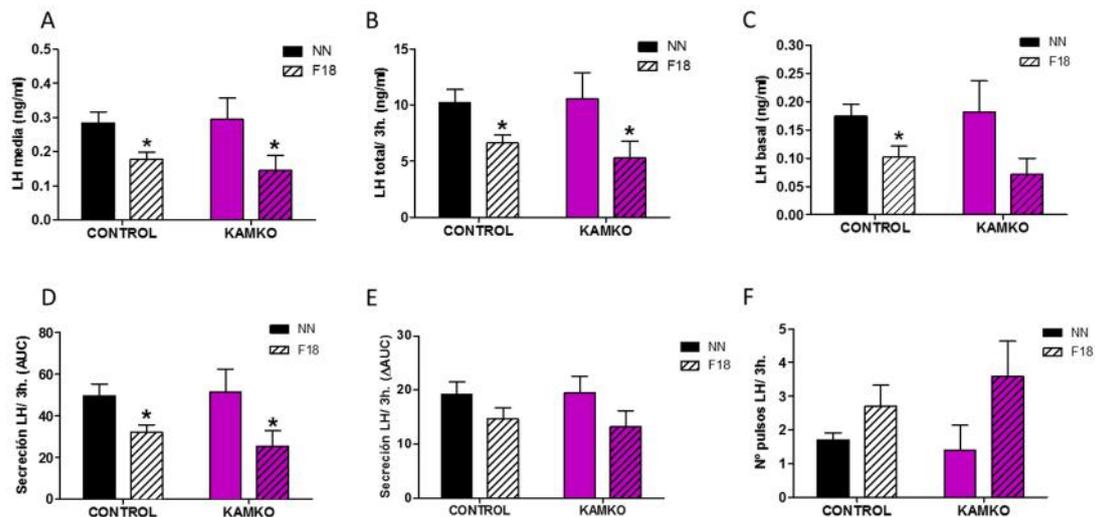


Figura 64. Dinámica secretora de LH tras ayuno en ratones hembra adultas, control y KAMKO. Se analizó la secreción pulsátil de LH durante un periodo de 3 horas después de 18 horas de ayuno (F18), comparándose con los resultados obtenidos en condiciones de normonutrición (NN). Los principales parámetros de secreción de LH registrados fueron: nivel medio de LH (A); nivel total (B); nivel basal de LH, definido como la media de los 5 valores de LH más bajos (C); masa secretora global de LH, expresada como el área bajo la curva (AUC; donde $y=0$) (D); delta AUC ($y=$ nivel basal para cada muestra) (E); y el número de pulsos de LH en 3 horas (definido mediante un incremento del 125% desde el punto más bajo hasta el pico de LH) (F). Los tamaños de los grupos fueron: $n=10$ hembras control y $n=5$ hembras KAMKO para ambas condiciones (NN y F18) (paneles A-F). Los valores se representan como la media \pm SEM. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

De manera complementaria, analizamos los perfiles individuales de secreción de LH en hembras control y KAMKO, antes y después del periodo de ayuno. Nuestros resultados revelan que las hembras KAMKO parecen presentar, tras este periodo, mayor número de pulsos de LH, que poseen una morfología más aguda que los detectados en las hembras control (**Figura 65**); dato que refuerza la tendencia mostrada en la **Figura 64 F**. Al igual que sucedía en el modelo GAMKO, algunos de los pulsos mostrados en hembras KAMKO, podrían ser el resultado de la agregación de varios pulsos individuales.

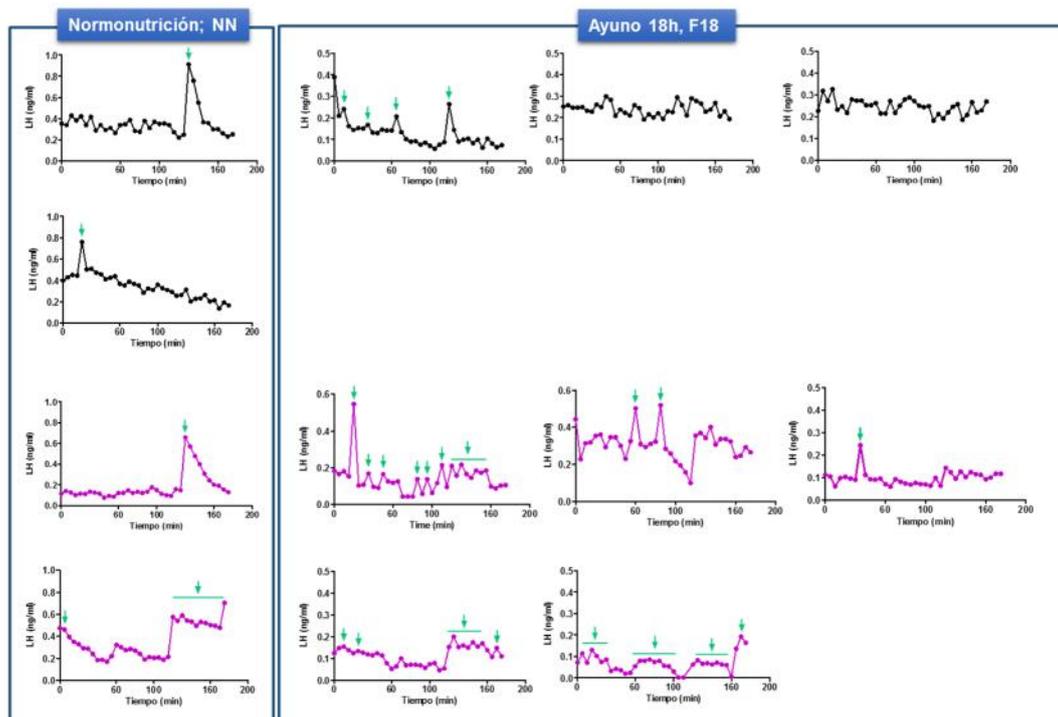


Figura 65. Cambios en los perfiles individuales de secreción pulsátil de LH en hembras control y KAMKO en condiciones de normonutrición y tras ayuno de 18-h. Las flechas indican la aparición de picos de LH, definido por un valor de incremento del 125% desde el punto más bajo hasta el pico de LH.

6. FUNCIÓN GONADOTRÓPICA EN EL MODELO GAMKO TRAS MANIPULACIÓN DEL ESTADO GONADAL: INTERACCIÓN CON EL ESTADO NUTRICIONAL

Finalmente, a fin de determinar la posible intervención de las hormonas gonadales en la modulación de la función de AMPK en el control metabólico de la función gonadotrópica, analizamos, selectivamente en ratones GAMKO, los perfiles de secreción pulsátil de LH durante un periodo de 3 horas en ratones hembra adultas, control y GAMKO, antes y tras la eliminación de las gónadas, mediante ovariectomía (OVX). Al igual que los análisis llevados a cabo en ratones intactos, los principales parámetros de secreción de LH fueron: nivel medio de LH, nivel basal de LH (definido en animales intactos como la media de los 5 valores más bajos, y en OVX, como la medida de los valores que preceden a cada pico de LH) y el número de pulsos de LH en 3 horas (determinado en animales intactos mediante un incremento del 125% desde el punto más bajo hasta el pico de LH, y en OVX, como un aumento del 10% sobre el punto anterior). La eliminación de las hormonas gonadales por OVX produjo un incremento significativo de los niveles de LH medios y basales, tanto en ratones control como GAMKO, en comparación con las hembras intactas (**Figura 66 A-B**). Además, se observó un aumento significativo en el número de pulsos de LH en ratonas de ambos genotipos tras OVX (**Figura 66 C**). Sin embargo, al comparar las respuestas secretoras entre ambos genotipos, no se detectaron diferencias en el nivel medio de

LH ni en el número de pulsos de LH tras la OVX entre ratones hembra control y GAMKO. No obstante, los niveles basales de LH tras OVX fueron significativamente menores en hembras GAMKO que en ratones hembras control sometidos a OVX (**Figura 66 B**).

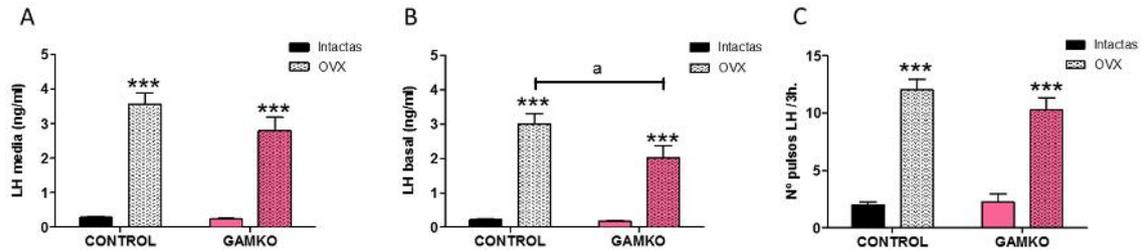


Figura 66. Parámetros de secreción de LH en ratones hembra adultas, control y GAMKO, tras la eliminación de las secreciones gonadales. Se analizó la secreción pulsátil de LH durante un periodo de 3 horas en ratones hembra de ambos genotipos tras ovariectomía (OVX), comparándose con los resultados obtenidos en hembras intactas. Los principales parámetros de secreción de LH registrados fueron: nivel medio de LH (A); nivel basal, definido como la media de los 5 valores de LH más bajos en ratones intactos, y como la medida de los valores que preceden a cada pico de LH en hembras OVX (B); así como el número de pulsos de LH en 3 horas, definido en animales intactos mediante un incremento del 125% desde el punto más bajo hasta el pico de LH, y en hembras OVX, como un aumento del 10% sobre el punto anterior (C). Los tamaños de los grupos fueron: n=6 hembras control, n=8 hembras GAMKO para ambas condiciones (paneles A-C). Los valores se representan como la media ± SEM. Los grupos con asteriscos y letras indican diferencias estadísticas, *** P≤0.001 vs. grupo intacto correspondiente; a P≤0.05 vs. grupo control correspondiente. ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Por otra parte, y dado el importante papel de AMPK en neuronas GnRH en el control metabólico de eje gonadotrópico que sugieren nuestros estudios en ratones intactos, realizamos análisis similares en ratones hembra gonadectomizadas para evaluar la posible intervención de las hormonas gonadales en dicho fenómeno. Para ello, analizamos la pulsatilidad de LH durante un periodo de 3 horas en ratones hembra OVX de ambos genotipos, antes y después de un periodo de ayuno de 18 horas. Al igual que en los estudios llevados a cabo en animales intactos, los principales parámetros de secreción de LH analizados, antes y después del ayuno, fueron: nivel medio de LH, nivel basal de LH (definido en OVX como la medida de los valores que preceden a cada pico de LH) y el número de pulsos de LH en 3 horas (definido en OVX como un aumento del 10% sobre el punto anterior). A diferencia de lo observado en ratonas control intactas, el ayuno de 18 horas (F18) en hembras OVX de ambos genotipos no indujo cambios detectables en los niveles medio y basal de LH (**Figura 67 A-B**), ni en el número de pulsos de LH (**Figura 67 C**). Por lo tanto, la caída mediada por AMPK en neuronas GnRH de los niveles basales de LH causada por el ayuno (ver **Figura 61 C**), parece requerir de la presencia permisiva del estradiol, toda vez que ésta no se detecta en ratonas hembra OVX.

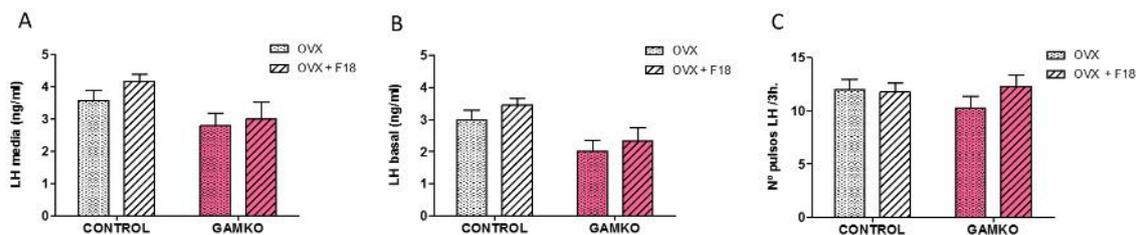


Figura 67. Cambios en la secreción de LH en ratones hembra adultas, control y GAMKO, tras gonadectomía (OVX), antes y después de privación nutricional mediante un ayuno de 18 horas. Los principales parámetros de secreción de LH registrados fueron: nivel medio de LH (A), nivel basal como la media de los valores que preceden a cada pico de LH (B), así como el número de picos de LH en 3 horas, definido en OVX como un aumento del 10% sobre el punto anterior (C). Los tamaños de los grupos fueron: n=6 hembras control, n=8 hembras GAMKO para ambas condiciones. Los valores se representan como la media \pm SEM.

En el mismo sentido, analizamos la interacción entre función ovárica y señalización de AMPK en neuronas GnRH en otro modelo de déficit nutricional, más prolongado que el del experimento anterior. Para ello, ratones hembra OVX de ambos genotipos, fueron sometidos a un periodo de subnutrición del 35% durante una semana, registrándose a continuación los principales parámetros de secreción de LH, durante un periodo de 3 horas: niveles medio y basal de LH y el número de pulsos de LH. En concordancia con los resultados del experimento anterior, el análisis de la secreción de LH no reveló diferencias entre los animales OVX sometidos a subnutrición crónica y los alimentados *ad libitum* entre los dos genotipos analizados y para ninguno de los parámetros estudiados, (Figura 68 A-C).

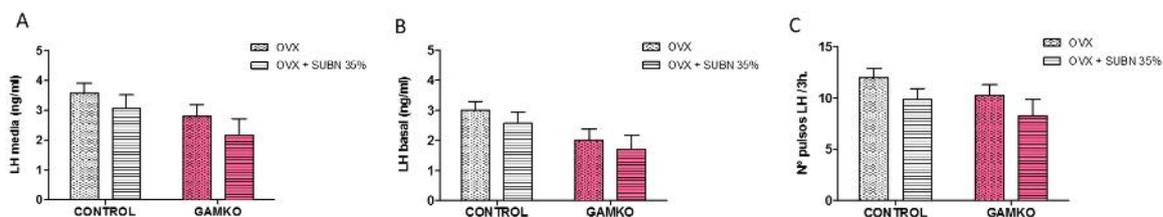


Figura 68. Cambios en la secreción de LH en ratones hembra adultas, control y GAMKO, tras gonadectomía (OVX), antes y después de aplicar una restricción calórica del 35% por un periodo de una semana. Se analizó la secreción pulsátil de LH durante un periodo de 3 horas en ratones hembra OVX de ambos genotipos, tras el protocolo de subnutrición. Los principales parámetros de secreción de LH registrados fueron: nivel medio de LH (A), nivel basal, definido como la media de los valores que preceden a cada pico de LH (B), y el número de pulsos de LH en 3 horas, definido en OVX como un aumento del 10% sobre el punto anterior (C). Los tamaños de los grupos fueron: n=6 hembras control, n=8 hembras GAMKO para ambas condiciones. Los valores se representan como la media \pm SEM.

---DISCUSIÓN---

DISCUSIÓN

Numerosas evidencias experimentales y clínicas indican la existencia de una estrecha interacción bidireccional entre los sistemas de control del balance energético y metabólico del organismo y el eje neuroendocrino de la reproducción (3). Esta interacción recíproca se pone claramente de manifiesto en situaciones de estrés nutricional y metabólico, que habitualmente cursan con alteraciones de la edad de llegada de la pubertad y se asocian a condiciones de sub- o infertilidad en la edad adulta (2, 3), pero también en situaciones de alteración de la función gonadal, que con frecuencia pueden mostrar de forma asociada perturbaciones metabólicas. Así sucede en patologías muy prevalentes, como el síndrome de ovario poliquístico, que afecta hasta el 10% de mujeres en edad fértil y que en muchos casos se asocia a obesidad y/o resistencia a la insulina (322), y el hipogonadismo asociado a obesidad, que se detecta en más del 25% de los varones con índice de masa corporal (IMC) superior a 30 (323, 324). Por otro lado, en las últimas décadas, se han venido detectando cambios en la edad de pubertad, especialmente en niñas, En este contexto, aunque los mecanismos subyacentes a las manifestaciones de estos cambios permanecen en gran medida desconocidos, las alteraciones metabólicas parecen ser un importante factor contribuyente (1). Destacablemente, las perturbaciones de la edad puberal conllevan un mayor riesgo de desarrollo de enfermedades diversas en etapas posteriores de la vida, incluyendo patologías cardiometabólicas (4), y se asocian incluso a una menor esperanza de vida (325).

Este conjunto de evidencias hacen obligado profundizar en nuestro conocimiento de las complejas interacciones bidireccionales entre el estado metabólico y la función reproductiva, las bases neuroendocrinas de dichas interacciones, y los mecanismos moleculares que conectan ambos sistemas corporales relevantes. En este contexto, en la presente Tesis Doctoral, hemos implementado, utilizando diversos modelos preclínicos, análisis detallados de la de las interacciones dinámicas entre el estado metabólico del organismo y aspectos clave de la maduración y la función reproductora, con especial atención a (i) la caracterización del impacto de cambios en la función gonadal y la exposición a factores obesogénicos sobre el perfil endocrino-metabólico en diversas etapas de la edad adulta; así como a (ii) la evaluación del posible papel del sensor energético celular, AMPK, actuando en las neuronas GnRH o Kiss1, en el control metabólico de la función reproductora.

Para mayor simplicidad, discutiremos de manera independiente los dos bloques temáticos de nuestro trabajo, para dar paso a unas conclusiones finales globales.

Alteraciones endocrino-metabólicas en modelos de manipulación del balance energético y la función gonadal

La obesidad constituye un problema de salud de primer orden en el mundo actual. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la prevalencia de la obesidad se ha duplicado desde 1980, de tal forma que en 2014, hasta un 39% de la población mundial presentaba sobrepeso, y casi un 15% padecía obesidad, definida por un IMC >30 (326). La obesidad se asocia a toda una serie de problemas de salud graves, que incluyen de forma destacada hipertensión, resistencia a insulina y diabetes tipo 2, dislipemias y enfermedades cardiovasculares (327), cuya incidencia ha crecido en paralelo con las cifras epidémicas de la obesidad. De la misma forma, la obesidad se asocia a otras patologías, igualmente muy impactantes, que van desde las enfermedades osteo-articulares hasta diversas formas de cáncer, y entre las que se incluye los problemas reproductivos (319, 320). Evidentemente, los estilos de vida y el exceso en la ingesta calórica constituyen elementos principales en la generación de obesidad y muchas de sus co-morbilidades. Sin embargo, el incremento exponencial de la obesidad en décadas recientes, y la variable susceptibilidad individual a padecerla, evidencian que otros factores, endógenos y ambientales, deben participar en la generación y curso clínico de la obesidad y sus problemas asociados de salud.

Distintos estudios preclínicos, desarrollados por nuestro grupo en los últimos años, empleando la rata como especie modelo, han puesto de manifiesto que la exposición secuencial a manipulaciones obesogénicas desde etapas tempranas del desarrollo postnatal, tales como la sobrenutrición postnatal durante la lactancia seguida de una dieta rica en grasas tras el destete, resulta en la generación de un cuadro progresivo de sobrepeso, en ambos sexos, que se asocia no solo una alteración evidente de la homeostasis glucídica y otros parámetros metabólicos, sino también a un impacto marcado sobre componentes centrales del eje gonadotrópico, tales como el sistema Kiss1, que se traducen en una supresión del eje reproductor en la edad adulta media-avanzada(5, 257). Sin embargo, esos estudios no habían llevado a cabo una caracterización neuro-endocrina precisa de las alteraciones inducidas por la obesidad, en aspectos tales como los perfiles de secreción de esteroides gonadales o los niveles de hormonas reconocidas recientemente como elementos clave en la homeostasis metabólica, tales como la ghrelina, el GLP-1 o el FGF-21. Del mismo modo, dichos estudios no habían abordado la caracterización de los posibles cambios en los perfiles endocrino-metabólicos en etapas tempranas de la vida adulta, ni habían analizado en detalle el impacto combinado de dichas manipulaciones nutricionales junto a alteraciones de la función gonadal, tales como las derivadas de una exposición temprana a andrógenos en la rata hembra o la gonadectomía en ambos sexos.

Nuestros análisis en ratas macho y hembras adultas, sometidos a un sobrenutrición sostenida desde la lactancia hasta la edad adulta, han puesto de manifiesto dos aspectos relevantes. En primer lugar, existe un marcado dimorfismo sexual en la

sensibilidad al impacto metabólico y gonadotrópico de las manipulaciones obesogénicas analizadas, de forma que los machos presentan una mayor sensibilidad que las hembras a los efectos de esta sobrenutrición mantenida desde la lactancia. Así, aunque tanto machos como hembras sometidas a las manipulaciones obesogénicas (SL/HFD) presentaron una mayor ganancia ponderal que los correspondientes controles normonutridos, en la edad adulta (PND150), solo las ratas macho mostraron indicadores evidentes de desregulación de la homeostasis glucídica e hipogonadismo central, que no se detectaron en las hembras de la misma edad (PND150), sometidas a las mismas manipulaciones obesogénicas. Este dimorfismo queda ilustrado por el hecho de que, mientras que los machos obesos en PND150 mostraron niveles elevados de glucemia basal, así como perfiles alterados en los test de tolerancia a la sobrecarga de glucosa (GTT) e insulina (ITT), las hembras obesas solo presentaron una alteración muy puntual y moderada (circunscrita al min-20 del GTT) de la tolerancia a un bolo de glucosa, sin modificaciones detectables ni en la glucemia basal ni en los valores de glucemia global durante el GTT o ITT.

En la misma línea, en el PND150, los machos obesos presentaron evidencias concluyentes de un marcado hipogonadismo central, caracterizado por una supresión significativa de los niveles de LH y FSH, que se asoció a una reducción igualmente muy significativa de los niveles circulantes de los principales andrógenos testiculares: testosterona, DHT y androstendiona, sin alteraciones detectables en los niveles de progesterona, que podrían ser indicativos de una esteroidogénesis adrenal conservada. Por el contrario, las hembras adultas obesas no presentaron, en el PND150, cambios significativos en los niveles de LH y FSH circulantes, ni sufrieron una supresión similar a la de los machos en las concentraciones séricas de andrógenos gonadales. De hecho, se detectó en estas hembras obesas un incremento en los niveles de androstendiona y estradiol, sin cambios significativos en los niveles de progesterona y estrona. Por consiguiente, mientras que la obesidad indujo un marcado hipogonadismo hipogonadotrópico en ratas macho, una combinación similar de manipulaciones obesogénicas no produjo la inhibición del eje gonadotrópico en hembras, lo que refuerza la idea de una mayor sensibilidad, no solo metabólica sino también reproductiva, al impacto de la obesidad en el sexo masculino. Estas observaciones están en línea con datos clínicos que evidencian que un porcentaje notable, que oscila según las series entre el 25 y el 70%, de varones obesos presentan hipogonadismo bioquímico (323, 324), lo que refuerza el valor traslacional de nuestro modelo, que evidencia que no solo la testosterona, sino el conjunto de andrógenos testiculares, están marcadamente suprimidos en las ratas macho obesas en el PND150.

Por otro lado, la comparación de los perfiles endocrino-metabólicos en los modelos de obesidad en ratas macho y hembra a los 50 y los 150 días de edad, nos ha permitido definir, por primera vez, el curso temporal y la secuencia en la aparición de las alteraciones metabólicas y gonadotrópicas inducidas por la obesidad, especialmente

en machos, por ser éste el sexo en el que dichas alteraciones han sido observadas principalmente. De hecho, aunque estudios previos, incluidos los de nuestro grupo, habían caracterizado el impacto de las manipulaciones obesogénicas indicadas (SL/HFD) sobre la edad de pubertad en ambos sexos (328), no tenemos constancia de la realización previa de estudios de caracterización de perfiles hormonales, metabólicos y gonadotrópicos en etapas muy tempranas de la edad adulta (PND50), similares a los aquí presentados. Nuestros resultados permiten identificar alteraciones incipientes ya en el PND50 derivadas de la sobrenutrición mantenida (SL/HFD) tanto en la secreción de gonadotropinas (principalmente FSH), como en la homeostasis glucídica, si bien éstos últimos son muy moderados en términos de magnitud y claramente inferiores a los detectados en el PND150. Así, las ratas macho SL/HFD mostraron a los 50 días de edad una reducción significativa de los niveles de FSH, junto a una tendencia a la disminución de los niveles circulantes de LH que, no obstante, no alcanzó significación estadística. Sin embargo, esta supresión de las concentraciones de gonadotropinas no se asoció a cambios detectables en los niveles circulantes de los esteroides testiculares. Esto sugiere que, si bien la obesidad produce un impacto temprano sobre los componentes centrales del eje gonadotrópico, que se manifiesta ya en el PND50 en una caída de los niveles de gonadotropinas, este hipogonadotropismo se encuentra parcialmente compensado en etapas iniciales. No obstante, este cuadro de hipogonadotropismo central temprano termina desembocando en un fracaso completo del eje gonadotrópico, con una supresión muy marcada de los niveles de gonadotropinas y esteroides sexuales, cuando la exposición a las manipulaciones obesogénicas se mantiene de forma persistente hasta la edad adulta. De hecho, la obesidad en machos bloqueó por completo en nuestro modelo la elevación en los niveles de testosterona circulante que se observan en ratas macho no obesas entre el PND50 y PND150, lo que pone de manifiesto el potente impacto hipogonadal derivado de este cuadro de sobrepeso persistente. De hecho, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que, en edades más avanzadas (PND300), dicha supresión se traduce en una marcada reducción de la fecundidad (329), cuyas bases tienen su origen, de acuerdo a los datos actuales, en etapas tempranas de la edad adulta.

El marcado dimorfismo sexual en la manifestación de las alteraciones metabólicas y gonadotrópicas asociadas a la obesidad persistente, que se manifestaron claramente en machos pero no en hembras adultas, nos llevó a analizar el posible papel de la función gonadal en este fenómeno, toda vez que nuestras observaciones son compatibles con una acción de “protección” de las secreciones ováricas, que podrían actuar en diversas etapas del desarrollo como un sistema de amortiguación sobre las alteraciones metabólicas y reproductivas inducidas por las manipulaciones obesogénicas. Nuestros datos experimentales, en dos modelos de alteración de la función ovárica, tales como la androgenización temprana y la ovariectomía en la edad

adulta, apoyan esta hipótesis, al documentar que las hembras adultas con disfunción ovárica presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de perturbaciones metabólicas y gonadotrópicas tras la exposición a patrones de nutrición obesogénicos.

Este fue claramente el caso en el modelo de rata hembra sometida a androgenización neonatal (PT). Este modelo ha sido ampliamente empleado en estudios de manipulación de los procesos de diferenciación sexual del cerebro, toda vez que actuando durante el periodo crítico neonatal, el exceso de andrógenos en la rata hembra produce un cuadro de masculinización que se traduce en alteraciones persistentes del eje reproductivo, que conducen a anovulación (330). Por otro lado, en la última década, los modelos de androgenización temprana en roedores han sido empleados para evaluar el impacto metabólico del exceso de andrógenos en periodos tempranos del desarrollo, permitiendo así modelizar condiciones de hiperandrogenismo similares a las que se detectan en el PCOS (331, 332). Nuestros análisis, comparando en paralelo ratas machos, hembras y hembras androgenizadas, en dos periodos de la edad adulta, expuestas o no a manipulaciones obesogénicas, nos permite concluir que la androgenización neonatal resulta en una clara *masculinización* de los perfiles de respuesta a las manipulaciones obesogénicas, de tal forma que las ratas hembra androgenizadas presentaron un conjunto de alteraciones endocrino-metabólicas globalmente similares a las mostradas por los machos, pero no por las hembras no-androgenizadas sometidas a manipulaciones obesogénicas similares. De esta forma, las ratas androgenizadas mostraron una mayor ganancia ponderal, así como alteraciones en los niveles basales de glucemia y en los perfiles de glucemia en el GTT y el ITT, que fueron análogas a las de machos obesos. Igualmente, de manera similar a lo observado en machos obesos, las hembras androgenizadas sometidas a sobrenutrición durante la lactancia seguida de HFD mostraron una supresión de los niveles de LH y de FSH (esta última, solo en el PND50), que no se detectó en las hembras obesas control. Llamativamente, las hembras androgenizadas presentaron alteraciones tempranas (en PND50) en parámetros, tales como la supresión de LH o los perfiles de glucemia en GTT e ITT, que fueron superiores a las detectadas en machos obesos de la misma edad, lo que podría evidenciar un impacto más marcado de la combinación de los insultos obesogénicos y la androgenización neonatal sobre dichos indicadores de función gonadotrópica y metabólica.

En todo caso, el análisis combinado de los perfiles de respuesta a insultos obesogénicos entre ambos sexos y las ratas hembra androgenizadas pone claramente de manifiesto que la mayor resiliencia del sexo femenino al impacto de dichas manipulaciones obesogénicas deriva, al menos parcialmente, de una función ovárica preservada y que perturbaciones en etapas tempranas, que afectan a la diferenciación sexual del eje gonadotrópico, tales como las derivadas de una exposición inadecuada a compuestos con actividad androgénica, resultan en una marcada sensibilización al efecto deletéreo de la exposición a dietas obesogénicas en etapas posteriores de la

vida. Estas observaciones son relevantes desde el punto de vista traslacional, máxime considerando que la rata hembra androgenizada ha sido propuesta como modelo preclínico de PCOS (331, 332). Nuestros resultados abundan en observaciones previas que demuestran alteraciones metabólicas en este modelo, similares a las observadas en pacientes con ovario poliquístico -que frecuentemente presentan obesidad y resistencia a insulina, documentando así el papel etio-patogénico del exceso de andrógenos, especialmente si se asocia a otras manipulaciones obesogénicas, en la generación de dichas alteraciones, algunas de las cuales se manifiestan ya en etapas tempranas de la edad adulta.

Destacablemente, si bien las ratas hembra androgenizadas presentaron un perfil de alteraciones endocrino-metabólicas mucho más próximo al de los machos que al de las hembras control, tras la exposición a manipulaciones obesogénicas, las hembras sometidas a androgenización neonatal mostraron ciertas diferencias respecto de los machos obesos, que se manifestaron principalmente en los perfiles de esteroides sexuales y los niveles de FSH en el PND150. Así, mientras que los machos obesos presentaron una marcada supresión de los andrógenos testiculares en la edad adulta, las hembras androgenizadas no mostraron dicha alteración, muy posiblemente debido a las diferencias intrínsecas entre la función esteroidogénica testicular y ovárica, y el hecho de que los niveles circulantes de andrógenos en las ratas androgenizadas fueron sustancialmente menores a los de ratas macho adultas. Por otro lado, mientras en ratas macho, la obesidad se tradujo en una supresión de los niveles de FSH en el PND50 y PND150, en las hembras androgenizadas esta supresión sólo se detectó en la edad adulta temprana (PND50), mientras que en el PND150 los niveles de FSH estuvieron significativamente aumentados en los animales sometidos a SL/HFD. Una posible explicación a este fenómeno, que no se detecta para LH, es que la androgenización neonatal causa una marcada disfunción folicular ovárica, que se asocia a una caída de los niveles de inhibinas, que operan como supresor específico de la secreción de FSH(333), y cuya supresión, quizás más marcada en el modelo obeso, podría ser causante de la elevación detectada en los niveles de FSH.

El análisis de los niveles de factores hormonales relevantes en el control metabólico en los modelos obesogénicos de ratas macho y hembra antes descritos evidenciaron igualmente perfiles de alteración sexualmente diferenciados, si bien los patrones de alteración no parecen explicar de manera concluyente las alteraciones gonadotrópicas y de la homeostasis glucídica detectadas en dichos modelos. Así, en ratas macho obesos observamos en el PND150 una elevación muy sustancial de los niveles de leptina, que se asoció a un incremento igualmente significativo de los niveles de FGF-21, sin cambios en las concentraciones circulantes de ghrelina y GLP-1; no obstante, en el día postnatal 50 solo se detectó un incremento, moderado pero significativo, de los niveles de leptina. Esta elevación sostenida de los niveles de leptina, como adipocina pro-inflamatoria, confirma numerosa literatura previa y previsiblemente contribuye a

definir un estado de inflamación crónica que participa en la generación de las alteraciones metabólicas vinculadas a la obesidad. De otra parte, nuestros datos confirman evidencias previas que sugieren una elevación de los niveles de FGF-21 en obesidad (334, 335); esta elevación podría contribuir a la generación del cuadro de hipogonadismo central que se observa en las ratas macho adultas obesas, toda vez que se ha descrito que FGF-21 pudiera operar con una señal inhibitoria del eje reproductor (336). Por su parte, en hembras, solo detectamos cambios significativos en los niveles de leptina, pero estos fueron moderados en magnitud y únicamente significativos en el PND150. Estas observaciones van en la línea de un menor impacto endocrino-metabólico de la obesidad por sobrealimentación sostenida en hembras. No obstante, en el PND50, las hembras SL/HFD presentaron una tendencia, próxima a la significación estadística de los niveles de FGF-21 y ghrelina, cuya significación fisiopatológica permanece desconocida. Finalmente, las hembras androgenizadas obesas presentaron, al igual que los machos, niveles persistentemente elevados de leptina, en el PND50 y PND150, si bien no exhibieron cambios en los niveles de ghrelina o FGF-21, pero sí una elevación en los niveles de GLP-1, que pudiera constituir un mecanismo de compensación, no observado en machos, ante la mayor predisposición a alteraciones glucémicas que presentan las hembras androgenizadas. En cualquier caso, y como llamada de precaución, es necesario enfatizar que los niveles hormonales presentados corresponden a determinaciones puntuales realizadas en dos momentos concretos del desarrollo postnatal (PND50 y PND150), por lo que es posible que cambios sutiles o transitorios de las concentraciones circulantes de algunas de estas hormonas no hayan podido ser captadas por nuestra aproximación experimental.

Por otro lado, la eliminación de los ovarios en la edad adulta (PND90), mediante ovariectomía bilateral (OVX), causó igualmente un aumento del impacto de las manipulaciones obesogénicas en ratas hembra en ciertos parámetros endocrino-metabólicos. Sin embargo, la magnitud de dichos cambios fue en general muy modesto, salvo en lo que respecta a la ganancia ponderal y los niveles de leptina, que se vieron muy marcadamente aumentados por la combinación de OVX con SL/HFD. De hecho, la OVX per se ya indujo un aumento significativo del peso y los niveles de leptina, que se incrementaron de manera muy notable por la combinación con una dieta obesogénica. En todo caso, y a diferencia de las hembras intactas, las hembras OVX obesas mostraron unos niveles de LH parcialmente suprimidos (respecto a las hembras OVX no obesas), y una tendencia a la elevación de los niveles basales de glucemia, junto a una moderada elevación en la resistencia a las acciones de la insulina, sin que se observaran cambios en los perfiles del GTT entre ratas obesas intactas y OVX. En su conjunto, estas observaciones avalan el papel de las secreciones ováricas durante la edad adulta en el control de parámetros metabólicos clave, tales como el peso corporal y los niveles de leptina, y confirman su función moduladora en las respuestas a manipulaciones obesogénicas.

En todo caso, la comparación entre la magnitud de las alteraciones inducidas por la androgenización neonatal vs. la OVX en la edad adulta, evidencian claramente un papel más relevante de eventos madurativos tempranos, relacionados con la diferenciación sexual y la función ovárica, en la programación de los perfiles de respuesta endocrino-metabólicos a la exposición a manipulaciones obesogénicas a lo largo de la vida. Así pues, el exceso de andrógenos en etapas tempranas del desarrollo -que se asocia a disfunción ovárica y anovulación en la edad adulta- tiene un impacto mucho más deletéreo que la ovariectomía adulta en la capacidad de las hembras de “amortiguar” los efectos indeseables de la sobrenutrición persistente. Todo ello está en línea con teorías postuladas en las últimas décadas que indican que los orígenes de la obesidad se remontan a etapas tempranas del desarrollo, en las que el estado nutricional, hormonal y/o metabólico de la madre juega un papel clave en procesos de programación madurativa de los sistemas metabólico y reproductivo (337, 338). De acuerdo con este concepto, las respuestas adaptativas inducidas por cambios nutricionales y/o las alteraciones persistentes generadas por cambios metabólicos y hormonales tempranos podrían tener un efecto persistente en la salud metabólica (y posiblemente) reproductiva de la descendencia, al inducir patrones de respuesta inapropiados a manipulaciones obesogénicas en etapas posteriores de la vida. Nuestros resultados en la rata hembra abundan en esta línea, y demuestran que una exposición temprana a un exceso de andrógenos agrava sustancialmente el impacto de la obesidad sobre diversos parámetros relacionados con la función metabólica y gonadotrófica.

Finalmente, la orquidectomía (ORX) de las ratas macho en la edad adulta, como maniobra para la eliminación completa de las secreciones testiculares, no indujo en líneas generales un empeoramiento evidente de los perfiles metabólicos, ni en los animales normonutridos ni en los obesos, salvo por una elevación en los niveles basales de insulina en machos ORX obesos, que sin embargo no se asoció a alteraciones evidentes en los perfiles de GTT e ITT. Esta observación contrasta con datos clínicos y experimentales, incluidos los de esta Tesis, que evidencian que situaciones de hipogonadismo menos extremo, como el que se asocia a obesidad, cursan con alteraciones evidentes de la homeostasis glucídica (257, 319). Más aun, datos todavía fragmentarios sugieren que el reemplazamiento fisiológico con andrógenos en pacientes hipogonadales puede contribuir a la mejora del perfil metabólico de dichos pacientes (319, 339, 340). Es posible que el modelo empleado de eliminación drástica y completa de las secreciones testiculares, ya en la edad adulta, no permita poner de manifiesto cambios más sutiles, que sí se detectarían antes cuadros, de mayor valor traslacional, de supresión gradual y más moderada de los niveles de andrógenos. De hecho, ha sido propuesto que el rango de modificaciones de andrógenos puede ser determinante en la definición de una mayor o menor propensión de padecer alteraciones metabólicas, en ambos sexos (341). En todo caso, los datos obtenidos serían compatibles con la hipótesis de que la ausencia completa de

andrógenos testiculares no agrava sustancialmente el perfil metabólico en machos obesos adultos, si bien serían necesarios estudios de reemplazamiento para valorar si la restauración de niveles fisiológicos de andrógenos pudiera contribuir a revertir los efectos adversos de la obesidad inducida por la sobrenutrición postnatal y la dieta alta en grasa.

Análisis del papel de AMPK en neuronas GnRH y Kiss1 en el control metabólico de la función reproductora mediante estudios de genómica funcional

Como se apuntó en epígrafes previos, no sólo la obesidad y el sobrepeso tienen un claro impacto sobre la función del eje reproductor. De la misma forma, tanto la maduración puberal como el mantenimiento de la fertilidad en la edad adulta pueden verse severamente comprometidas en condiciones de déficit energético persistente, especialmente en el sexo femenino, tal y como se observa en pacientes con anorexia nerviosa, patologías caquéticas y consuntivas, e individuos sometidos a programas de ejercicio y entrenamiento físico extremos (2, 3). Las bases neuroendocrinas de este fenómeno han sido parcialmente expuestas en las últimas décadas, habiéndose reconocido el papel fundamental de la leptina, como señal permisiva de suficiencia energética, cuya supresión en condiciones de balance energético negativo se asocia a una inhibición del eje reproductor. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha estado particularmente interesado en el análisis del papel de determinados sensores energéticos celulares, que actuando a nivel central, pudieran contribuir al acoplamiento entre el estado metabólico del organismo y la función del eje reproductor (274, 275, 278). Ejemplos en este sentido son el sensor de suficiencia energética, mTOR, y la sirtuina, SIRT1, que como se mencionó en la introducción, además de su papel ubicuo en el acoplamiento entre el estado metabólico y la fisiología celular, operan, actuando en poblaciones neuronales concretas, como elementos relevantes en el control de la homeostasis energética, y por extensión en la integración entre el estado de los depósitos energéticos del organismo, la pubertad y la función reproductiva en la edad adulta (274, 275, 278).

En la misma línea, diversas evidencias experimentales sugieren que la kinasa activada por AMP (AMPK), el principal sensor energético celular descrito hasta la fecha, actuando a nivel central, lleva a cabo un importante papel en el control metabólico de la función reproductora. Así, evidencias acumuladas en los últimos años indican que AMPK, que se ve activada en condiciones de balance energético negativo, participa en la detección del estado energético por parte de las neuronas GnRH (302). De la misma forma, la actividad AMPK en endodimocitos parece jugar un papel en el control metabólico de la función reproductora, participando en la transmisión del impacto negativo de condiciones metabólicas adversas sobre el eje reproductor (342). Por otro lado, la activación de AMPK mediante adiponectina se ha informado que suprime la expresión de Kiss1 (301). Sin embargo, es preciso señalar que la mayoría de estudios previos en este ámbito implicaron el uso de líneas celulares, como células GT1-7, de

relevancia fisiológica limitada y/o el empleo de agentes farmacológicos parcialmente inespecíficos (como AICAR) para manipular la actividad de AMPK (300-302, 343). En todo caso, estudios muy recientes de nuestro grupo han puesto de manifiesto que un set de neuronas Kiss1 del ARC expresan AMPK fosforilada, estando por tanto equipados con una vía de señalización de AMPK funcional, que podrían modular la actividad de esta población neuronal en condiciones de estrés metabólico. De hecho, nuestros análisis en modelos de pubertad han documentado (i) que la subnutrición crónica aumenta la expresión hipotalámica de AMPK fosforilada; (ii) que la activación central de AMPK mediante la infusión por AICAR retrasa la edad de inicio de la pubertad; (iii) que este fenómeno es parcialmente replicado por la sobre-expresión virogenética de AMPK selectivamente en el ARC; y (iv) que la activación central de AMPK mediante AICAR resulta en una supresión de la expresión de Kiss1 en el ARC in vivo (344). En su conjunto, estos datos indican que la señalización de AMPK participa, previsiblemente en interacción con los sistemas GnRH y Kiss1, en el control metabólico del eje reproductivo.

A pesar de las evidencias indicadas, la caracterización del papel fisiológico de AMPK, específicamente en las poblaciones neuronales GnRH y Kiss1, permanecía insuficientemente caracterizado. Por ello, en la presente Tesis Doctoral, hemos implementado estudios de genómica funcional con el objeto de evaluar, en modelos fisiológicos, las consecuencias de la ablación de AMPK, selectivamente en neuronas GnRH y Kiss1. Dado que la subunidad $\alpha 1$ de AMPK está ampliamente expresada en diferentes áreas hipotalámicas, y que recientemente se ha demostrado que ésta juega un papel destacado en acciones metabólicas relevantes de AMPK, tales como el control hipotalámico de la termogénesis del tejido adiposo (191), en este trabajo hemos aplicado una aproximación basada en la tecnología Cre/loxP, a fin de permitir la eliminación específica de dicha subunidad, y con ello de AMPK funcional, en las células GnRH o Kiss1. De esta forma, hemos generado dos líneas murinas genéticamente modificadas, que hemos denominado GAMKO (de *GnRH-specific AMPK KO*) y KAMKO (de *Kiss1-specific AMPK KO*). Estas líneas nos han permitido implementar estudios fisiológicos acerca de la maduración puberal y la función gonadotrópica en la edad adulta en condiciones de eliminación selectiva de actividad AMPK en estas poblaciones neuronales, clave en el control central del eje reproductor.

Los estudios de caracterización puberal en las líneas GAMKO y KAMKO nos han permitido poner de manifiesto diferencias importantes en el papel fisiológico de la señalización por AMPK entre estas poblaciones neuronales, en función del sexo y el estado nutricional. Así, en condiciones de nutrición normal (ad libitum), los ratones GAMKO hembra presentaron un adelanto de la edad de apertura vaginal, como signo externo de inicio de la pubertad, que se tradujo en una edad media de inicio puberal significativamente menor que en los ratones control. Este fenómeno no se detectó en ratones GAMKO machos, ni en ratones KAMKO de ambos sexos, lo que evidencia un

papel preponderante de AMPK en neuronas GnRH, selectivamente en hembras, en el control represivo de la pubertad, incluso en condiciones de normonutrición, de tal forma que la eliminación de dicho componente inhibitorio induce una activación más temprana del inicio de la pubertad. En la misma línea, los ratones GAMKO hembra presentaron un aumento de las respuestas secretoras de LH (como marcador subrogado de secreción de GnRH) a kisspeptina, lo que refuerza la idea de que la actividad AMPK en neuronas GnRH contribuye a suprimir su actividad secretora, incluso en respuesta a un potente estímulo. Dado que condiciones de balance energético negativo resultan en la activación de la señalización hipotalámica de AMPK, es razonable pensar que el incremento de la actividad AMPK en neuronas GnRH en dichas condiciones puede contribuir a reprimir la maduración puberal en condiciones metabólicas desfavorables, tales como situaciones de insuficiencia energética.

Sin embargo, aunque la eliminación de AMPK en neuronas GnRH en hembras adelantó el inicio de la pubertad, definido por la canalización vaginal, no hizo lo propio con la edad de aparición del primer estro vaginal, que es indicativo de la primera ovulación. Este último correspondería al momento de la adquisición de la capacidad reproductiva, mientras que la apertura vaginal refleja el aumento en los niveles circulantes de estrógenos procedentes del ovario, que tiene lugar ya desde el inicio de la activación puberal. En su conjunto, estos datos sugieren que mientras que la eliminación de la señal inhibitoria transmitida por AMPK en neuronas GnRH permite un inicio más temprano de la activación puberal, la desregulación causada por dicha eliminación debe resultar en otras modificaciones que impiden que se produzca un adelanto equivalente de la edad de primera ovulación. De hecho, esta discrepancia se traduce en un aumento significativo en el periodo entre el inicio y la culminación de la maduración reproductiva. Aunque las bases e implicaciones de este fenómeno no han sido puestas de manifiesto por este trabajo, si es interesante apuntar que estudios epidemiológicos recientes apuntan que un fenómeno similar de “alargamiento” del periodo de maduración puberal se está produciendo en poblaciones de niñas en distintos países.

Dado que en el ratón KAMKO la pubertad no se vio afectada en condiciones de normonutrición, y asumiendo que el nivel de actividad AMPK debe ser máximo en condiciones de balance energético negativo, llevamos a cabo, selectivamente en hembras KAMKO, un estudio complementario dirigido a evaluar el impacto de un protocolo subnutrición sobre parámetros de activación puberal en condiciones de presencia o ausencia de actividad AMPK en neuronas Kiss1. En línea con datos previos (328), la subnutrición crónica tras el destete no sólo indujo una disminución significativa del peso corporal, sino que causó un retraso en la edad de apertura vaginal y una disminución del peso de ovario, indicativos de una supresión de la activación puberal en este modelo de déficit energético. Por el contrario, la eliminación de la señalización de AMPK en células Kiss1, si bien produjo una caída del

peso corporal de magnitud similar a la observada en ratones control subnutridos, no causó un retraso similar en la edad de apertura vaginal, provocando además una elevación de los niveles de LH y el peso de ovario, en el límite de la significación estadística. Estos datos indican que, aunque en condiciones de normonutrición, la ablación de AMPK en neuronas Kiss1 no altera los marcadores fenotípicos de pubertad, la ausencia de la actividad AMPK en esta población neuronal si previene, al menos parcialmente, el impacto negativo sobre el inicio de la pubertad causado por la subnutrición, lo que apunta a un papel, predominantemente en condiciones de déficit energético, de la señalización de AMPK en neuronas Kiss1 en el control metabólico de la pubertad.

En la edad adulta, la ablación condicional de la subunidad $\alpha 1$ de AMPK en neuronas GnRH no indujo cambios detectables en los perfiles de secreción pulsátil de LH, determinados mediante un sistema de medición ultrasensible y un protocolo de toma seriada de muestras en animales conscientes, en ninguno de los sexos. De la misma forma, los ratones KAMKO no presentaron cambios significativos en los perfiles de secreción pulsátil de LH, si bien es necesario apuntar que por motivos operativos y de disponibilidad de animales, estos análisis solo se realizaron en ratones KAKMO hembras. En todo caso, y a pesar de la ausencia de alteraciones evidentes en los perfiles secretores de LH en ratones GAMKO, sí encontramos, selectivamente en hembras, evidencias de un incremento de las respuestas secretoras de GnRH (evidenciada por las respuestas de LH, como marcador subrogado) ante la aplicación de diversos estímulos del eje gonadotrópico, que incluyen la kisspeptina-10; fenómeno análogo al detectado en ratonas GAMKO hembras prepuberales. De la misma forma, en ratones GAMKO hembras adultas, las respuestas de LH a la administración de Senktide, agonista de NKB, estuvieron aumentadas, lo que posiblemente denota un aumento de la capacidad secretora de las neuronas GnRH tanto al estímulo de las kisspeptinas exógenas (test farmacológico) como endógenas (inducidas por el agonista de NKB). Igualmente, las respuestas de LH al estímulo con GnRH estuvieron significativamente aumentadas en ratonas GAMKO, lo que previsiblemente refleja el estado de activación de los componentes centrales del sistema gonadotrópico, derivado de la eliminación de AMPK en neuronas GnRH. Por tanto, incluso si los parámetros cuantitativos de pulsatilidad de LH no fueron significativamente diferentes en los ratones GAMKO, los datos farmacológicos sugieren que las hembras GAMKO presentan un estado de activación del sistema neuronal GnRH, derivado de la eliminación de un factor represor, como AMPK. El hecho de que el mismo fenómeno no se detecte en machos refuerza la idea de un papel predominante de AMPK en neuronas GnRH, selectivamente en el sexo femenino. De la misma forma, la ausencia de un aumento en las respuestas secretagogas de LH tras la administración de kisspeptina-10 o Senktide en ratones KAMKO evidencia que, en la edad adulta, el papel represor de AMPK a nivel de las neuronas Kiss1 es mucho más modesto o inexistente.

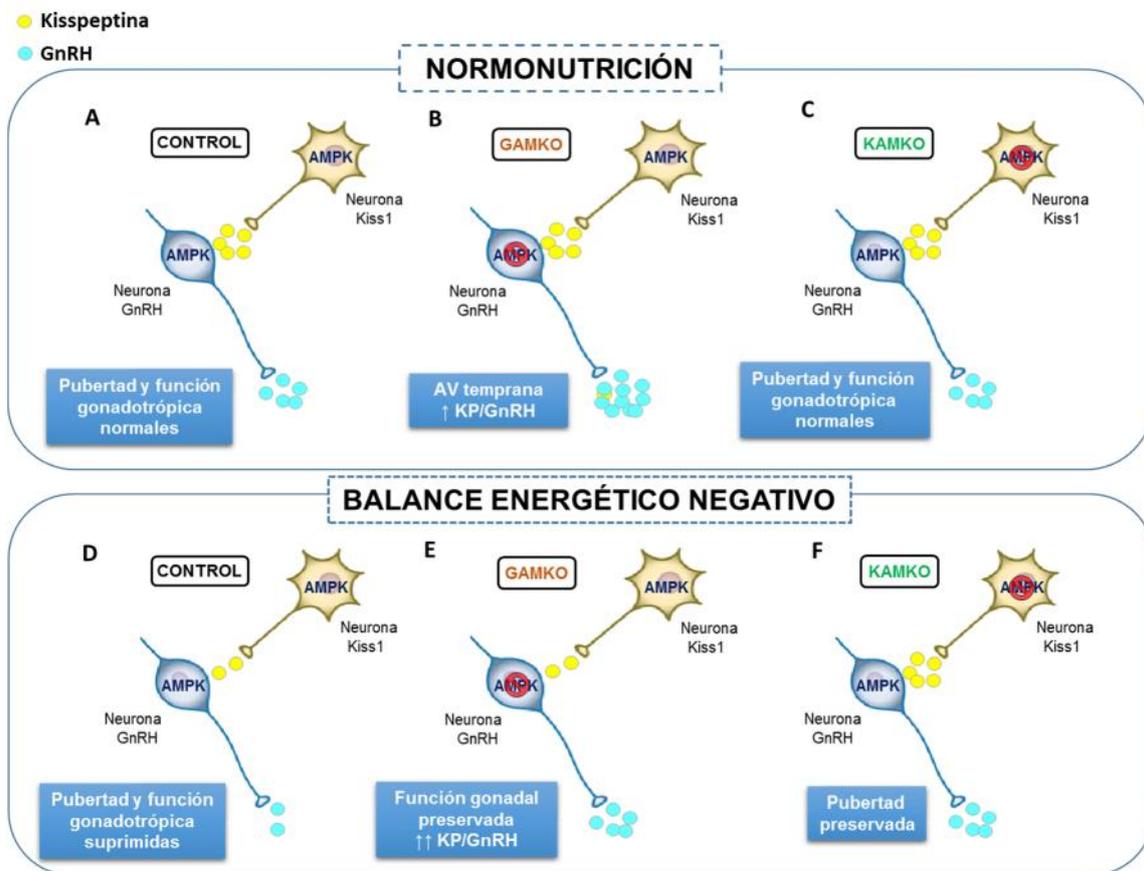
Como se ha apuntado anteriormente, se conoce que las condiciones de balance energético negativo inducen un incremento de la actividad AMPK en el hipotálamo, a fin de poner en marcha diversas respuestas adaptativas del organismo (191), incluyendo el acoplamiento entre su estado energético y la función reproductora. Este fenómeno es especialmente marcado en el sexo femenino, donde los requerimientos energéticos asociados a la reproducción (por ejemplo, en la gestación o la lactancia) son muy considerables. Por ello, aplicamos distintos protocolos de déficit energético en ratones hembra GAMKO y KAMKO, a fin de evaluar si la ausencia de AMPK en neuronas GnRH o Kiss1 modifica las respuestas del eje gonadotrópico ante estas situaciones de estrés metabólico. Nuestros estudios en ratones GAMKO pusieron de manifiesto que la ausencia de señalización de AMPK en neuronas GnRH produce un estado de resistencia parcial al efecto inhibitorio de condiciones de insuficiencia energética. Esto se puso de manifiesto por el hecho de que las ratonas GAMKO presentan un periodo de recuperación de la ciclicidad estral, como marcador de función ovárica, menor que el de ratones control tras la aplicación de dos protocolos diferentes de realimentación tras un periodo de subnutrición. De la misma forma, la supresión de diversos parámetros de secreción de LH (niveles medios, totales y basales) causada por el ayuno de 18-h en ratonas control, no se produjo en ratonas GAMKO sometidas a un protocolo similar de ayuno. Todo ello es compatible con una función inhibitoria de AMPK en las neuronas GnRH, que siendo activada en condiciones de balance energético negativo, contribuye a la supresión del eje reproductor, en dichas situaciones metabólicamente adversas. En la misma línea, en animales GAMKO sometidos a ayuno, las respuestas secretoras a kisspeptina fueron significativamente superiores a las que se detectan en ratones control, lo que refuerza la idea de un papel represivo de AMPK sobre la actividad secretora de las neuronas GnRH, en situaciones de déficit energético.

Destacablemente, las ratonas KAMKO no mostraron perfiles similares de respuesta a protocolos de subnutrición o ayuno. Así, el periodo de recuperación de la ciclicidad estral tras la realimentación en ratones subnutridos fue similar entre ratones KAMKO y controles. De la misma forma, la supresión de los distintos parámetros de secreción pulsátil de LH que se observó tras el ayuno de 18-h fue similar entre ambos genotipos, con una disminución de los niveles de LH media, total y basal detectada tanto en ratones KAMKO como en sus controles. La comparación de estos resultados con los obtenidos en ratones GAMKO evidencia un papel más predominante de AMPK en neuronas GnRH en el control metabólico del eje gonadotrópico en la edad adulta, mientras que el papel de AMPK en neuronas Kiss1 en el periodo adulto parece mucho más moderado.

Los efectos biológicos de la señalización de AMPK en el hipotálamo en el control del balance energético están fuertemente modulados por los esteroides ováricos. De hecho, estudios previos han puesto de manifiesto que los estrógenos suprimen AMPK

para inhibir la ingesta de alimentos y aumentar la termogénesis, actuando en los núcleos arcuato y ventromedial, respectivamente (191, 236). Los resultados del presente trabajo evidencian que el papel represivo que AMPK lleva a cabo en las neuronas GnRH en condiciones metabólicas adversas requiere de la presencia de secreciones ováricas. Esto se pone de manifiesto por el hecho de que la supresión de diversos parámetros de pulsatilidad de la secreción de LH inducida por el ayuno de 18-h no se observó en animales OVX del genotipo control. Por otro lado, en los ratones GAMKO los perfiles de respuesta de LH tras la OVX fueron muy similares a los de ratones control. Una posible explicación para este fenómeno es que el efecto inhibitorio ejercido por AMPK en neuronas GnRH se ve enmascarado por el potente efecto estimulador causado por la eliminación del feedback negativo de las secreciones ováricas (10). Este fenómeno tendría sentido biológico ya que sólo permitiría que se manifestase una acción supresora de la función gonadal causada por condiciones de estrés metabólico en aquellas situaciones en las que existe una adecuada actividad gonadal previa. Por otro lado, estos resultados expanden observaciones previas que apuntan que la señalización de AMPK a nivel hipotalámico no tiene un papel relevante en la mediación del efecto feedback negativo de las secreciones ováricas en términos de control de gonadotropinas, como lo sugiere el hecho de que, al igual que en las hembras GAMKO, la ablación congénita de la subunidad $\alpha 2$ de AMPK en neuronas Kiss1 no resulta en alteraciones detectables en las respuestas de LH a la gonadectomía (345).

Resumen gráfico del Bloque Temático 2: Estudios del papel de AMPK en neuronas GnRH y Kiss1 en el control metabólico de la reproducción.



Con fines comparativos, se ilustra una representación esquemática del impacto de la ablación condicional de la señalización de AMPK en neuronas GnRH (modelo GAMKO) y Kiss1 (modelo KAMKO) en el funcionamiento del eje gonadotrópico, tanto en normonutrición (paneles superiores) como en condiciones de equilibrio energético negativo (paneles inferiores).

En condiciones de normonutrición, en las que el inicio de la pubertad y la función del eje gonadotrópico proceden de manera habitual en animales control (A), la ablación de la señalización de AMPK en las neuronas GnRH provocó un avance del inicio de la pubertad y un estado de hiperreactividad de LH a diferentes estímulos, incluidas las kisspeptinas, que posiblemente sea un reflejo del aumento de la actividad neurosecretora de GnRH (mostrado por puntos azules; ver B). Por el contrario, la eliminación de la señalización de AMPK en las neuronas Kiss1 no pudo causar alteraciones en el inicio de la pubertad u otros índices de función gonadotrópica, en condiciones de normonutrición (C). En condiciones de balance energético negativo, el inicio de la pubertad y la función gonadotrópica se suprimen en los animales control (D). Por el contrario, los ratones que carecen de AMPK en neuronas GnRH muestran resistencia parcial a los efectos perjudiciales de dicho déficit energético en los índices

reproductivos y muestran una mayor capacidad de respuesta a las kisspeptinas (E). A su vez, la ablación de AMPK en las neuronas Kiss1 es suficiente para preservar la aparición de la pubertad frente a condiciones de equilibrio energético negativo (F).

---CONCLUSIONES---

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de nuestro trabajo son:

1. Las alteraciones metabólicas y gonadotrópicas inducidas por la sobrenutrición mantenida desde la lactancia hasta la edad adulta presentan un marcado dimorfismo sexual, con una afectación mucho más notable en ratas macho que en hembras. Esta mayor sensibilidad de los machos a las manipulaciones obesogénicas se traduce no solo en una desregulación de la homeostasis glucídica en la edad adulta, sino también en la aparición de un cuadro de hipogonadismo hipogonadotropo asociado a obesidad, definido por una supresión incipiente de la secreción de gonadotropinas, detectable ya en la edad adulta temprana, que antecede a una profunda supresión de la secreción de andrógenos testiculares, que se asocia a hiperleptinemia, intolerancia a la sobrecarga de glucosa y resistencia a la insulina.
2. El estado de resiliencia de la rata hembra al impacto de manipulaciones obesogénicas sobre parámetros metabólicos y de función gonadotrópica se debe en gran medida a un correcto proceso de diferenciación sexual en etapas tempranas del desarrollo y la propia función ovárica, de suerte que la masculinización de los procesos de diferenciación sexual temprana, mediante androgenización neonatal, y, en menor medida, la eliminación de la función ovárica en la edad adulta, sensibilizan los sistemas metabólico y gonadotrópico a las acciones deletéreas de la sobrenutrición mantenida desde la lactancia hasta la edad adulta.
3. Específicamente en las hembras, el sensor energético celular, AMPK, actuando en neuronas GnRH, juega un papel relevante en el control metabólico de la pubertad y de la función gonadotrópica en la edad adulta, operando como una señal inhibitoria de la actividad neuronal GnRH, con un papel detectable tanto en condiciones de normonutrición como, especialmente, de balance energético negativo, en una acción dependiente de las secreciones ováricas.
4. En hembras, la señalización de AMPK en neuronas Kiss1 participa en el control metabólico de la pubertad, pero no parece intervenir de manera reseñable en la modulación de la función gonadotrópica en la edad adulta. En términos de regulación puberal, la actividad AMPK en neuronas Kiss1 contribuye a mediar el efecto inhibitorio de condiciones de subnutrición sobre la activación puberal del eje reproductor.
5. Junto con evidencias procedentes de estudios de expresión y farmacológicos previos, nuestros resultados en los modelos murinos, GAMKO y KAMKO, con ablación selectiva de la subunidad $\alpha 1$ de AMPK en células GnRH y Kiss1, respectivamente, han contribuido a caracterizar la naturaleza y relevancia fisiológica de la señalización hipotalámica AMPK en el control metabólico del eje reproductor, con un papel variable

dependiendo del tipo neuronal en el que opere, el sexo, el momento del desarrollo y el estado nutricional.

---BIBLIOGRAFÍA---

BIBLIOGRAFÍA

1. M. S. Avendaño, M. J. Vazquez, M. Tena-Sempere, Disentangling puberty: novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty. *Hum Reprod Update* **23**, 737-763 (2017).
2. J. Roa, M. Tena-Sempere, Connecting metabolism and reproduction: roles of central energy sensors and key molecular mediators. *Mol Cell Endocrinol* **397**, 4-14 (2014).
3. M. Manfredi-Lozano, J. Roa, M. Tena-Sempere, Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility. *Front Neuroendocrinol* **48**, 37-49 (2018).
4. F. R. Day, C. E. Elks, A. Murray, K. K. Ong, J. R. Perry, Puberty timing associated with diabetes, cardiovascular disease and also diverse health outcomes in men and women: the UK Biobank study. *Sci Rep* **5**, 11208 (2015).
5. M. A. Sánchez-Garrido *et al.*, Metabolic and Gonadotropic Impact of Sequential Obesogenic Insults in the Female: Influence of the Loss of Ovarian Secretion. *Endocrinology* **156**, 2984-2998 (2015).
6. M. G. Novelle *et al.*, Neonatal events, such as androgenization and postnatal overfeeding, modify the response to ghrelin. *Sci Rep* **4**, 4855 (2014).
7. M. López, M. Tena-Sempere, Estradiol effects on hypothalamic AMPK and BAT thermogenesis: A gateway for obesity treatment? *Pharmacol Ther* **178**, 109-122 (2017).
8. P. Conn, M. Freeman, *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Springer, Ed. (Humana Press, ed. 2000, 2000).
9. M. Tena-Sempere, I. Huhtaniemi, *Reproductive Medicine-Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals*. Fauser, BCJM, Eds. (Parthenon Publishing, New York, 2003).
10. A. E. Herbison, Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 452-466 (2016).
11. L. Pinilla, E. Aguilar, C. Dieguez, R. P. Millar, M. Tena-Sempere, Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* **92**, 1235-1316 (2012).
12. A. V. Schally *et al.*, Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* **173**, 1036-1038 (1971).
13. R. Burgus *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* **69**, 278-282 (1972).
14. R. D. Fernald, R. B. White, Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front Neuroendocrinol* **20**, 224-240 (1999).
15. R. P. Millar, A. J. Pawson, K. Morgan, E. F. Rissman, Z. L. Lu, Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol* **29**, 17-35 (2008).
16. F. Casoni *et al.*, Development of the neurons controlling fertility in humans: new insights from 3D imaging and transparent fetal brains. *Development* **143**, 3969-3981 (2016).
17. P. E. Forni, S. Wray, GnRH, anosmia and hypogonadotropic hypogonadism--where are we? *Front Neuroendocrinol* **36**, 165-177 (2015).
18. J. Roa, M. Tena-Sempere, Unique Features of a Unique Cell: The Wonder World of GnRH Neurons. *Endocrinology* **159**, 3895-3896 (2018).
19. Ojeda, S.R., M. K. Skinner, "Puberty in the rat" in *The Physiology of Reproduction*, Neill, J.D., Eds. (Academic Press/Elsevier, San Diego, 2006), pp. 2061-2126.

20. Fink, C. G., F. M. PM, *Neuroendocrine regulation of pituitary function: general principles*. Springer, Ed., Neuroendocrinology in Physiology and Medicine (Humana Press, New Jersey, 2000).
21. W. E. Armstrong, "Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei" in *The Rat Nervous System*, G. Paxinos, Ed. (Elsevier, 2015).
22. T. Falcone, W. Hurd, "Hypothalamic-pituitary-ovarian axis and control of the menstrual cycle" in *Clinical reproductive medicine and surgery*. (Springer, 2013).
23. G. F. Weinbauer, Luetjens, C.M., Simoni, M., Nieschlag, E. Springer, Ed., *Andrology* (2010).
24. K. S. Saladin. M. Graw-Hill, Ed., *Anatomía y Fisiología* (ed. Sexta Edición, 2013).
25. S. G. Haider, Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria. *Endocrinology* **148**, 2581-2582 (2007).
26. P. Corvol, C. W. Bardin, Species distribution of testosterone-binding globulin. *Biol Reprod* **8**, 277-282 (1973).
27. S. M. Ruwanpura, R. I. McLachlan, S. J. Meachem, Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* **205**, 117-131 (2010).
28. Falcone T., H. W., "Ovarian Hormones: Structure, Biosynthesis, Function, Mechanism of Action, and Laboratory Diagnosis" in *Clinical reproductive medicine and surgery*, Springer, Ed. (2013), pp. 15-44.
29. H. J. E. Guyton A.C. Elsevier, Ed., *Tratado de Fisiología Médica* (ed. Décimotercera edición, 2016).
30. T. Falcone, W. Hurd, *Clinical reproductive medicine and surgery* (Springer, ed. Second edition, 2013).
31. C. Stocco, C. Telleria, G. Gibori, The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* **28**, 117-149 (2007).
32. J. W. EVERETT, C. H. SAWYER, J. E. MARKEE, A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* **44**, 234-250 (1949).
33. J. W. EVERETT, CENTRAL NEURAL CONTROL OF REPRODUCTIVE FUNCTIONS OF THE ADENOHYPHYSIS. *Physiol Rev* **44**, 373-431 (1964).
34. T. J.A.F. M. G. Hill, Ed., *Fisiología humana* (ed. Tercera edición, 2005).
35. A. Nadal, M. Díaz, M. A. Valverde, The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol Sci* **16**, 251-255 (2001).
36. S. I. Kawakami, K. Hirunagi, M. Ichikawa, H. Tsukamura, K. I. Maeda, Evidence for terminal regulation of GnRH release by excitatory amino acids in the median eminence in female rats: a dual immunoelectron microscopic study. *Endocrinology* **139**, 1458-1461 (1998).
37. K. J. Iremonger, S. Constantin, X. Liu, A. E. Herbison, Glutamate regulation of GnRH neuron excitability. *Brain Res* **1364**, 35-43 (2010).
38. L. Ping, V. B. Mahesh, G. K. Bhat, D. W. Brann, Regulation of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by AMPA receptors. Evidence for a physiological role of AMPA receptors in the steroid-induced luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology* **66**, 246-253 (1997).
39. D. W. Brann, V. B. Mahesh, Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev* **18**, 678-700 (1997).
40. T. R. Chakraborty, L. Ng, A. C. Gore, Colocalization and hormone regulation of estrogen receptor alpha and N-methyl-D-aspartate receptor in the hypothalamus of female rats. *Endocrinology* **144**, 299-305 (2003).
41. C. Fergani, V. M. Navarro, Expanding the Role of Tachykinins in the Neuroendocrine Control of Reproduction. *Reproduction* **153**, R1-R14 (2016).

42. V. M. Navarro *et al.*, Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**, E202-210 (2011).
43. S. J. Krajewski *et al.*, Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* **489**, 372-386 (2005).
44. M. Amstalden *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* **22**, 1-12 (2010).
45. F. Ruiz-Pino *et al.*, Effects and interactions of tachykinins and dynorphin on FSH and LH secretion in developing and adult rats. *Endocrinology* **156**, 576-588 (2015).
46. A. K. Topaloglu *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* **41**, 354-358 (2009).
47. M. Gearing, 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* **53**, 373-381 (1991).
48. S. P. Kalra, Neural circuits involved in the control of LHRH secretion: a model for estrous cycle regulation. *J Steroid Biochem* **23**, 733-742 (1985).
49. M. J. Smith, L. Jennes, Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* **122**, 1-10 (2001).
50. A. Lee, E. Talley, D. L. Rosin, K. R. Lynch, Characterization of alpha 2A-adrenergic receptors in GT1 neurosecretory cells. *Neuroendocrinology* **62**, 215-225 (1995).
51. R. V. Gallo, A. Bona-Gallo, D. O'Sullivan, Adrenergic and noradrenergic regulation of pulsatile luteinizing hormone release. *J Neuroendocrinol* **1**, 157-162 (1989).
52. T. A. Branchek, K. E. Smith, C. Gerald, M. W. Walker, Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 109-117 (2000).
53. A. Sahu, W. R. Crowley, K. Tatemoto, A. Balasubramaniam, S. P. Kalra, Effects of neuropeptide Y, NPY analog (norleucine4-NPY), galanin and neuropeptide K on LH release in ovariectomized (ovx) and ovx estrogen, progesterone-treated rats. *Peptides* **8**, 921-926 (1987).
54. F. J. Lopez, A. Negro-Vilar, Galanin stimulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion from arcuate nucleus-median eminence fragments in vitro: involvement of an alpha-adrenergic mechanism. *Endocrinology* **127**, 2431-2436 (1990).
55. V. Mitchell, S. Bouret, V. Prévot, L. Jennes, J. C. Beauvillain, Evidence for expression of galanin receptor Gal-R1 mRNA in certain gonadotropin releasing hormone neurones of the rostral preoptic area. *J Neuroendocrinol* **11**, 805-812 (1999).
56. L. Dufourny, D. C. Skinner, Distribution of galanin receptor 1-immunoreactive neurons in the ovine hypothalamus: colocalization with GnRH. *Brain Res* **1054**, 73-81 (2005).
57. M. J. Cunningham, Galanin-like peptide as a link between metabolism and reproduction. *J Neuroendocrinol* **16**, 717-723 (2004).
58. A. Juréus *et al.*, Distribution and regulation of galanin-like peptide (GALP) in the hypothalamus of the mouse. *Endocrinology* **142**, 5140-5144 (2001).
59. J. M. Castellano *et al.*, Effects of galanin-like peptide on luteinizing hormone secretion in the rat: sexually dimorphic responses and enhanced sensitivity at male puberty. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E1281-1289 (2006).
60. A. L. Gundlach, Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? *Eur J Pharmacol* **440**, 255-268 (2002).
61. N. Bellefontaine *et al.*, Nitric oxide as key mediator of neuron-to-neuron and endothelia-to-glia communication involved in the neuroendocrine control of reproduction. *Neuroendocrinology* **93**, 74-89 (2011).

62. J. Clasadonte, P. Poulain, J. C. Beauvillain, V. Prevot, Activation of neuronal nitric oxide release inhibits spontaneous firing in adult gonadotropin-releasing hormone neurons: a possible local synchronizing signal. *Endocrinology* **149**, 587-596 (2008).
63. N. K. Hanchate *et al.*, Kisspeptin-GPR54 signaling in mouse NO-synthesizing neurons participates in the hypothalamic control of ovulation. *J Neurosci* **32**, 932-945 (2012).
64. X. d'Anglemont de Tassigny *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* **27**, 6103-6114 (2007).
65. D. García-Galiano *et al.*, Differential modulation of gonadotropin responses to kisspeptin by aminoacidergic, peptidergic, and nitric oxide neurotransmission. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E1252-1263 (2012).
66. L. E. Pritchard, A. V. Turnbull, A. White, Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol* **172**, 411-421 (2002).
67. T. H. LEE, A. B. LERNER, Isolation of melanocyte-stimulating hormone from hog pituitary gland. *J Biol Chem* **221**, 943-959 (1956).
68. H. B. Schiöth, The physiological role of melanocortin receptors. *Vitam Horm* **63**, 195-232 (2001).
69. J. E. Wikberg, Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur J Pharmacol* **375**, 295-310 (1999).
70. K. Begriche *et al.*, Genetic dissection of the functions of the melanocortin-3 receptor, a seven-transmembrane G-protein-coupled receptor, suggests roles for central and peripheral receptors in energy homeostasis. *J Biol Chem* **286**, 40771-40781 (2011).
71. I. Gantz *et al.*, Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* **268**, 15174-15179 (1993).
72. J. Roa, A. E. Herbison, Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology* **153**, 5587-5599 (2012).
73. R. L. Reid, N. Ling, S. S. Yen, Gonadotropin-releasing activity of alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal subjects and in subjects with hypothalamic-pituitary dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* **58**, 773-777 (1984).
74. M. Manfredi-Lozano *et al.*, Defining a novel leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty. *Mol Metab* **5**, 844-857 (2016).
75. S. Matsuyama *et al.*, Activation of melanocortin receptors accelerates the gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in goats. *Neurosci Lett* **383**, 289-294 (2005).
76. E. Sigel, M. E. Steinmann, Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem* **287**, 40224-40231 (2012).
77. D. J. Spergel, U. Krüth, D. F. Hanley, R. Sprengel, P. H. Seeburg, GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* **19**, 2037-2050 (1999).
78. J. A. Sim, M. J. Skynner, J. R. Pape, A. E. Herbison, Late postnatal reorganization of GABA(A) receptor signalling in native GnRH neurons. *Eur J Neurosci* **12**, 3497-3504 (2000).
79. R. A. DeFazio, S. Heger, S. R. Ojeda, S. M. Moenter, Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol* **16**, 2872-2891 (2002).
80. S. M. Moenter, R. A. DeFazio, Endogenous gamma-aminobutyric acid can excite gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* **146**, 5374-5379 (2005).
81. S. K. Han, I. M. Abraham, A. E. Herbison, Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Endocrinology* **143**, 1459-1466 (2002).

82. R. V. Gallo, Kappa-opioid receptor involvement in the regulation of pulsatile luteinizing hormone release during early pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol* **2**, 685-691 (1990).
83. Anonymous, "StatPearls". (2019).
84. A. G. Faletti *et al.*, beta-Endorphin blocks luteinizing hormone-releasing hormone release by inhibiting the nitricoxidergic pathway controlling its release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1722-1726 (1999).
85. R. L. Goodman *et al.*, Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology* **145**, 2959-2967 (2004).
86. P. W. Weems *et al.*, κ -Opioid Receptor Is Colocalized in GnRH and KNDy Cells in the Female Ovine and Rat Brain. *Endocrinology* **157**, 2367-2379 (2016).
87. R. E. Campbell, J. M. French-Mullen, M. A. Cowley, M. S. Smith, K. L. Grove, Hypothalamic circuitry of neuropeptide Y regulation of neuroendocrine function and food intake via the Y5 receptor subtype. *Neuroendocrinology* **74**, 106-119 (2001).
88. L. Pinilla *et al.*, Selective role of neuropeptide Y receptor subtype Y2 in the control of gonadotropin secretion in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E1385-1392 (2007).
89. D. D. Pierroz, C. Catzeflis, A. C. Aebi, J. E. Rivier, M. L. Aubert, 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* **137**, 3-12 (1996).
90. E. Ducret, G. M. Anderson, A. E. Herbison, RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* **150**, 2799-2804 (2009).
91. K. Tsutsui *et al.*, Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* **31**, 284-295 (2010).
92. M. A. Johnson, K. Tsutsui, 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* **51**, 171-180 (2007).
93. S. Leon, M. Tena-Sempere, Dissecting the Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone in Mammals: Studies Using Pharmacological Tools and Genetically Modified Mouse Models. *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**, 189 (2015).
94. B. McEwen, Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* **57**, 357-384 (2002).
95. A. E. Herbison, J. R. Pape, New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* **22**, 292-308 (2001).
96. S. W. Mitra *et al.*, Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* **144**, 2055-2067 (2003).
97. S. S. Smith, C. Aoki, H. Shen, Puberty, steroids and GABA(A) receptor plasticity. *Psychoneuroendocrinology* **34 Suppl 1**, S91-S103 (2009).
98. S. Adachi *et al.*, Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* **53**, 367-378 (2007).
99. C. A. Christian, C. Glidewell-Kenney, J. L. Jameson, S. M. Moenter, Classical estrogen receptor alpha signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. *Endocrinology* **149**, 5328-5334 (2008).
100. T. M. Wintermantel *et al.*, Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* **52**, 271-280 (2006).
101. A. Z. Corrigan *et al.*, Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* **128**, 1682-1684 (1991).

102. D. M. de Kretser, M. P. Hedger, K. L. Loveland, D. J. Phillips, Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* **8**, 529-541 (2002).
103. A. J. Tilbrook, D. M. de Kretser, 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* **64**, 473-481 (2001).
104. T. Nakamura *et al.*, Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* **247**, 836-838 (1990).
105. A. E. Oakley, D. K. Clifton, R. A. Steiner, Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* **30**, 713-743 (2009).
106. M. Bilban *et al.*, Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci* **117**, 1319-1328 (2004).
107. M. Kotani *et al.*, The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* **276**, 34631-34636 (2001).
108. I. J. Clarke, Y. Qi, I. Puspita Sari, J. T. Smith, Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol* **30**, 371-378 (2009).
109. D. Franssen, M. Tena-Sempere, The kisspeptin receptor: A key G-protein-coupled receptor in the control of the reproductive axis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **32**, 107-123 (2018).
110. D. K. Lee *et al.*, Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* **446**, 103-107 (1999).
111. S. B. Seminara *et al.*, The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* **349**, 1614-1627 (2003).
112. N. de Roux *et al.*, Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10972-10976 (2003).
113. S. Funes *et al.*, The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1357-1363 (2003).
114. X. d'Anglemont de Tassigny *et al.*, Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10714-10719 (2007).
115. A. M. Rometo, S. J. Krajewski, M. L. Voytko, N. E. Rance, Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 2744-2750 (2007).
116. J. Clarkson, X. d'Anglemont de Tassigny, W. H. Colledge, A. Caraty, A. E. Herbison, Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* **21**, 673-682 (2009).
117. V. M. Navarro *et al.*, Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* **29**, 11859-11866 (2009).
118. A. S. Kauffman *et al.*, Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* **148**, 1774-1783 (2007).
119. J. Clarkson, A. E. Herbison, Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* **147**, 5817-5825 (2006).
120. S. H. Yeo, A. E. Herbison, Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology* **152**, 2387-2399 (2011).

121. M. N. Lehman, L. M. Coolen, 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* **151**, 3479-3489 (2010).
122. S. Ramaswamy *et al.*, Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* **151**, 4494-4503 (2010).
123. A. E. Herbison, X. de Tassigny, J. Doran, W. H. Colledge, Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* **151**, 312-321 (2010).
124. V. M. Navarro *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* **145**, 4565-4574 (2004).
125. E. L. Thompson *et al.*, Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* **16**, 850-858 (2004).
126. J. M. Castellano *et al.*, Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* **257-258**, 75-83 (2006).
127. S. K. Han *et al.*, Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* **25**, 11349-11356 (2005).
128. W. S. Dhillon *et al.*, Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 3958-3966 (2007).
129. V. M. Navarro *et al.*, Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **146**, 1689-1697 (2005).
130. M. Patterson *et al.*, Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinol* **18**, 349-354 (2006).
131. V. M. Navarro *et al.*, Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* **146**, 156-163 (2005).
132. H. Matsui, Y. Takatsu, S. Kumano, H. Matsumoto, T. Ohtaki, Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 383-388 (2004).
133. M. S. Irwig *et al.*, Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* **80**, 264-272 (2004).
134. H. J. Novaira, Y. Ng, A. Wolfe, S. Radovick, Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Mol Cell Endocrinol* **311**, 126-134 (2009).
135. J. S. Jacobi *et al.*, 17-Beta-estradiol directly regulates the expression of adrenergic receptors and kisspeptin/GPR54 system in GT1-7 GnRH neurons. *Neuroendocrinology* **86**, 260-269 (2007).
136. X. F. Li *et al.*, Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One* **4**, e8334 (2009).
137. Y. Wakabayashi *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* **30**, 3124-3132 (2010).
138. J. T. Smith *et al.*, Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* **146**, 2976-2984 (2005).

139. M. Shibata, R. L. Friedman, S. Ramaswamy, T. M. Plant, Evidence that down regulation of hypothalamic KiSS-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neuroendocrinol* **19**, 432-438 (2007).
140. J. T. Smith, M. J. Cunningham, E. F. Rissman, D. K. Clifton, R. A. Steiner, Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* **146**, 3686-3692 (2005).
141. J. T. Smith, S. M. Popa, D. K. Clifton, G. E. Hoffman, R. A. Steiner, Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* **26**, 6687-6694 (2006).
142. J. Roa *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* **149**, 1627-1637 (2008).
143. S. R. Ojeda, A. Lomniczi, U. Sandau, V. Matagne, New concepts on the control of the onset of puberty. *Endocr Dev* **17**, 44-51 (2010).
144. Z. K. Gajdos, K. D. Henderson, J. N. Hirschhorn, M. R. Palmert, Genetic determinants of pubertal timing in the general population. *Mol Cell Endocrinol* **324**, 21-29 (2010).
145. A. S. Parent *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* **24**, 668-693 (2003).
146. S. R. Ojeda, A. Lomniczi, U. S. Sandau, Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* **20**, 732-742 (2008).
147. J. Castellano, V. Heras, F. Ruiz-Pino, M. Tena-Sempere, "Female puberty overview" in *Encyclopedia of Reproduction*, Skinner, Ed. (Elsevier, 2018), vol. 2, pp. 227-237.
148. S. R. Ojeda, A. Lomniczi, U. Sandau, Contribution of glial-neuronal interactions to the neuroendocrine control of female puberty. *Eur J Neurosci* **32**, 2003-2010 (2010).
149. J. Roa, E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* **29**, 48-69 (2008).
150. C. Mayer, U. Boehm, Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling. *Nat Neurosci* **14**, 704-710 (2011).
151. H. J. Novaira *et al.*, Disrupted kisspeptin signaling in GnRH neurons leads to hypogonadotrophic hypogonadism. *Mol Endocrinol* **28**, 225-238 (2014).
152. M. López, C. J. Lelliott, A. Vidal-Puig, Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays* **29**, 248-261 (2007).
153. B. K. ANAND, J. R. BROBECK, Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* **77**, 323-324 (1951).
154. T. L. Horvath, S. Diano, M. Tschöp, Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist* **10**, 235-246 (2004).
155. R. D. Cone *et al.*, The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25 Suppl 5**, S63-67 (2001).
156. M. López, S. Tovar, M. J. Vázquez, L. M. Williams, C. Diéguez, Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* **66**, 131-155 (2007).
157. G. S. Barsh, M. W. Schwartz, Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet* **3**, 589-600 (2002).
158. C. Broberger, J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling, T. Hökfelt, The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15043-15048 (1998).

159. M. Egawa, H. Yoshimatsu, G. A. Bray, Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* **260**, R328-334 (1991).
160. S. P. Kalra, M. G. Dube, A. Sahu, C. P. Phelps, P. S. Kalra, Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10931-10935 (1991).
161. A. Inui, Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? *Trends Pharmacol Sci* **20**, 43-46 (1999).
162. A. P. Goldstone, U. A. Unmehopa, S. R. Bloom, D. F. Swaab, Hypothalamic NPY and agouti-related protein are increased in human illness but not in Prader-Willi syndrome and other obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 927-937 (2002).
163. Y. K. Yang *et al.*, Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors. *Mol Endocrinol* **13**, 148-155 (1999).
164. M. Rossi *et al.*, A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* **139**, 4428-4431 (1998).
165. B. D. Wilson *et al.*, Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* **140**, 2387-2397 (1999).
166. C. J. Small *et al.*, Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* **50**, 248-254 (2001).
167. D. D. Pierroz *et al.*, Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* **51**, 1337-1345 (2002).
168. T. Yasuda, T. Masaki, T. Kakuma, H. Yoshimatsu, Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**, 235-239 (2004).
169. H. Krude *et al.*, Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* **19**, 155-157 (1998).
170. C. Lubrano-Berthelie *et al.*, Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. *Ann N Y Acad Sci* **994**, 49-57 (2003).
171. P. Kristensen *et al.*, Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* **393**, 72-76 (1998).
172. H. Y. Li, H. W. Hwang, Y. H. Hu, Functional characterizations of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neurosci Lett* **323**, 203-206 (2002).
173. H. Zheng *et al.*, Neurochemical phenotype of hypothalamic neurons showing Fos expression 23 h after intracranial AgRP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R1773-1781 (2002).
174. C. Qin, J. Li, K. Tang, The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology* **159**, 3458-3472 (2018).
175. M. A. Cowley *et al.*, Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* **24**, 155-163 (1999).
176. S. Stanley, K. Wynne, B. McGowan, S. Bloom, Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* **85**, 1131-1158 (2005).
177. S. P. Kalra *et al.*, Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* **20**, 68-100 (1999).
178. S. M. Sternson, G. M. Shepherd, J. M. Friedman, Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci* **8**, 1356-1363 (2005).
179. B. G. Irani, C. Le Foll, A. Dunn-Meynell, B. E. Levin, Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology* **149**, 5146-5154 (2008).
180. B. Xu *et al.*, Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* **6**, 736-742 (2003).

181. Q. Gao, T. L. Horvath, Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett* **582**, 132-141 (2008).
182. M. J. Glass, J. Chan, V. M. Pickel, Ultrastructural localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat medial nucleus tractus solitarius: relationships with neuropeptide Y or catecholamine neurons. *J Neurosci Res* **67**, 753-765 (2002).
183. J. N. Zhu, J. J. Wang, The cerebellum in feeding control: possible function and mechanism. *Cell Mol Neurobiol* **28**, 469-478 (2008).
184. R. Lathe, Hormones and the hippocampus. *J Endocrinol* **169**, 205-231 (2001).
185. C. Contreras *et al.*, The brain and brown fat. *Ann Med* **47**, 150-168 (2015).
186. M. P. Cornejo *et al.*, Neuroendocrine Regulation of Metabolism. *J Neuroendocrinol* **28** (2016).
187. M. López, M. Tena-Sempere, Estradiol and brown fat. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **30**, 527-536 (2016).
188. M. López, C. V. Alvarez, R. Nogueiras, C. Diéguez, Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol Med* **19**, 418-427 (2013).
189. D. Beiroa *et al.*, GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* **63**, 3346-3358 (2014).
190. L. Martins *et al.*, A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Rep* **16**, 2231-2242 (2016).
191. M. López, R. Nogueiras, M. Tena-Sempere, C. Diéguez, Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 421-432 (2016).
192. J. C. Brüning *et al.*, Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **289**, 2122-2125 (2000).
193. S. C. Woods, E. C. Lotter, L. D. McKay, D. Porte, Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* **282**, 503-505 (1979).
194. S. Obici, B. B. Zhang, G. Karkanias, L. Rossetti, Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* **8**, 1376-1382 (2002).
195. S. Obici, Z. Feng, G. Karkanias, D. G. Baskin, L. Rossetti, Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* **5**, 566-572 (2002).
196. K. M. Habegger *et al.*, The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat Rev Endocrinol* **6**, 689-697 (2010).
197. M. M. Adeva-Andany, R. Funcasta-Calderón, C. Fernández-Fernández, E. Castro-Quintela, N. Carneiro-Freire, Metabolic effects of glucagon in humans. *J Clin Transl Endocrinol* **15**, 45-53 (2019).
198. J. R. Martin, D. Novin, Decreased feeding in rats following hepatic-portal infusion of glucagon. *Physiol Behav* **19**, 461-466 (1977).
199. C. J. Billington, J. E. Briggs, J. G. Link, A. S. Levine, Glucagon in physiological concentrations stimulates brown fat thermogenesis in vivo. *Am J Physiol* **261**, R501-507 (1991).
200. C. I. Edwards, R. J. Howland, Adaptive changes in insulin and glucagon secretion during cold acclimation in the rat. *Am J Physiol* **250**, E669-676 (1986).
201. H. Münzberg, C. D. Morrison, Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism* **64**, 13-23 (2015).
202. M. Faouzi *et al.*, Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology* **148**, 5414-5423 (2007).
203. P. J. Enriori, A. E. Evans, P. Sinnayah, M. A. Cowley, Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring)* **14 Suppl 5**, 254S-258S (2006).

204. A. G. Roseberry, H. Liu, A. C. Jackson, X. Cai, J. M. Friedman, Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron* **41**, 711-722 (2004).
205. D. M. Muoio, G. Lynis Dohm, Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **16**, 653-666 (2002).
206. E. E. Kershaw, J. S. Flier, Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2548-2556 (2004).
207. M. Chandran, S. A. Phillips, T. Ciaraldi, R. R. Henry, Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* **26**, 2442-2450 (2003).
208. T. Yamauchi *et al.*, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **8**, 1288-1295 (2002).
209. J. Fruebis *et al.*, Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2005-2010 (2001).
210. Y. Qi *et al.*, Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* **10**, 524-529 (2004).
211. M. Tena-Sempere, Ghrelin, the gonadal axis and the onset of puberty. *Endocr Dev* **25**, 69-82 (2013).
212. Y. Date *et al.*, Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* **141**, 4255-4261 (2000).
213. M. Kojima, H. Hosoda, H. Matsuo, K. Kangawa, Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 118-122 (2001).
214. M. A. Cowley *et al.*, The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**, 649-661 (2003).
215. M. Shintani *et al.*, Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* **50**, 227-232 (2001).
216. K. Toshinai *et al.*, Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* **144**, 1506-1512 (2003).
217. J. Rüter *et al.*, Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Brain Res* **991**, 26-33 (2003).
218. M. Tschöp *et al.*, Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* **24**, RC19-21 (2001).
219. M. Nakazato *et al.*, A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**, 194-198 (2001).
220. H. Y. Chen *et al.*, Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* **145**, 2607-2612 (2004).
221. G. Collden *et al.*, Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol Metab* **4**, 15-24 (2015).
222. C. Verdich *et al.*, A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 4382-4389 (2001).
223. I. Baumgartner *et al.*, Hepatic-portal vein infusions of glucagon-like peptide-1 reduce meal size and increase c-Fos expression in the nucleus tractus solitarius, area postrema and central nucleus of the amygdala in rats. *J Neuroendocrinol* **22**, 557-563 (2010).
224. L. L. Baggio, Q. Huang, T. J. Brown, D. J. Drucker, Oxyntomodulin and glucagon-like peptide-1 differentially regulate murine food intake and energy expenditure. *Gastroenterology* **127**, 546-558 (2004).
225. L. L. Baggio, D. J. Drucker, Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**, 2131-2157 (2007).

226. K. Fon Tacer *et al.*, Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol* **24**, 2050-2064 (2010).
227. R. Petryszak *et al.*, Expression Atlas update--an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res* **44**, D746-752 (2016).
228. H. Kurosu *et al.*, Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* **282**, 26687-26695 (2007).
229. C. Xu *et al.*, KLB, encoding β -Klotho, is mutated in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *EMBO Mol Med* **9**, 1379-1397 (2017).
230. W. Chen *et al.*, Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* **286**, 34559-34566 (2011).
231. Y. Hotta *et al.*, Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* **150**, 4625-4633 (2009).
232. X. Zhang *et al.*, Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* **57**, 1246-1253 (2008).
233. F. Mauvais-Jarvis, D. J. Clegg, A. L. Hevener, The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev* **34**, 309-338 (2013).
234. M. López, M. Tena-Sempere, Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends Endocrinol Metab* **26**, 411-421 (2015).
235. P. B. Martínez de Morentin *et al.*, Pregnancy induces resistance to the anorectic effect of hypothalamic malonyl-CoA and the thermogenic effect of hypothalamic AMPK inhibition in female rats. *Endocrinology* **156**, 947-960 (2015).
236. P. B. Martínez de Morentin *et al.*, Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab* **20**, 41-53 (2014).
237. Y. Xu *et al.*, Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab* **14**, 453-465 (2011).
238. M. E. Jones *et al.*, Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* **79**, 3-9 (2001).
239. M. M. Grumbach, R. J. Auchus, Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 4677-4694 (1999).
240. P. Mystkowski *et al.*, Hypothalamic melanin-concentrating hormone and estrogen-induced weight loss. *J Neurosci* **20**, 8637-8642 (2000).
241. L. E. Olofsson, A. A. Pierce, A. W. Xu, Functional requirement of AgRP and NPY neurons in ovarian cycle-dependent regulation of food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15932-15937 (2009).
242. M. Demissie *et al.*, Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E262-268 (2008).
243. C. Nilsson, M. Niklasson, E. Eriksson, P. Björntorp, A. Holmäng, Imprinting of female offspring with testosterone results in insulin resistance and changes in body fat distribution at adult age in rats. *J Clin Invest* **101**, 74-78 (1998).
244. S. Sam, A. Dunaif, Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab* **14**, 365-370 (2003).
245. P. M. Rao, D. M. Kelly, T. H. Jones, Testosterone and insulin resistance in the metabolic syndrome and T2DM in men. *Nat Rev Endocrinol* **9**, 479-493 (2013).
246. A. Tajar *et al.*, Characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Ageing Study. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 1810-1818 (2010).
247. J. M. Castellano, M. Tena-Sempere, Metabolic control of female puberty: potential therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* **20**, 1181-1193 (2016).

248. V. M. Navarro, M. Tena-Sempere, Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol* **8**, 40-53 (2011).
249. J. M. Castellano *et al.*, Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes* **55**, 2602-2610 (2006).
250. J. T. Smith, B. V. Acohido, D. K. Clifton, R. A. Steiner, KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* **18**, 298-303 (2006).
251. A. Morelli *et al.*, Sex steroids and leptin regulate the "first Kiss" (KiSS 1/G-protein-coupled receptor 54 system) in human gonadotropin-releasing-hormone-secreting neuroblasts. *J Sex Med* **5**, 1097-1113 (2008).
252. J. Qiu, Y. Fang, M. A. Bosch, O. K. Rønnekleiv, M. J. Kelly, Guinea pig kisspeptin neurons are depolarized by leptin via activation of TRPC channels. *Endocrinology* **152**, 1503-1514 (2011).
253. J. M. Castellano *et al.*, Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* **146**, 3917-3925 (2005).
254. K. Backholer *et al.*, Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* **151**, 2233-2243 (2010).
255. J. Donato *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* **121**, 355-368 (2011).
256. J. M. 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* **152**, 3396-3408 (2011).
257. M. A. Sánchez-Garrido *et al.*, Obesity-induced hypogonadism in the male: premature reproductive neuroendocrine senescence and contribution of Kiss1-mediated mechanisms. *Endocrinology* **155**, 1067-1079 (2014).
258. M. A. Mittelman-Smith *et al.*, Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. *Endocrinology* **153**, 2800-2812 (2012).
259. M. A. Mittelman-Smith, S. J. Krajewski-Hall, N. T. McMullen, N. E. Rance, Ablation of KNDy Neurons Results in Hypogonadotropic Hypogonadism and Amplifies the Steroid-Induced LH Surge in Female Rats. *Endocrinology* **157**, 2015-2027 (2016).
260. D. R. Ward *et al.*, Innervation of gonadotropin-releasing hormone neurons by peptidergic neurons conveying circadian or energy balance information in the mouse. *PLoS One* **4**, e5322 (2009).
261. J. W. Hill *et al.*, Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab* **11**, 286-297 (2010).
262. J. E. Thornton, C. C. Cheung, D. K. Clifton, R. A. Steiner, Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* **138**, 5063-5066 (1997).
263. H. Watanobe, Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *J Physiol* **545**, 255-268 (2002).
264. G. F. Turi, Z. Liposits, S. M. Moenter, C. Fekete, E. Hrabovszky, Origin of neuropeptide Y-containing afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice. *Endocrinology* **144**, 4967-4974 (2003).
265. L. S. Brady, M. A. Smith, P. W. Gold, M. Herkenham, Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* **52**, 441-447 (1990).

266. P. D. Raposinho *et al.*, Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol* **185**, 195-204 (2001).
267. H. B. Schioth, Y. Kakizaki, A. Kohsaka, T. Suda, H. Watanobe, Agouti-related peptide prevents steroid-induced luteinizing hormone and prolactin surges in female rats. *Neuroreport* **12**, 687-690 (2001).
268. K. M. Estrada, S. Pompolo, M. J. Morris, A. J. Tilbrook, I. J. Clarke, Neuropeptide Y (NPY) delays the oestrogen-induced luteinizing hormone (LH) surge in the ovariectomized ewe: further evidence that NPY has a predominant negative effect on LH secretion in the ewe. *J Neuroendocrinol* **15**, 1011-1020 (2003).
269. N. R. Vulliémoz, E. Xiao, L. Xia-Zhang, S. L. Wardlaw, M. Ferin, Central infusion of agouti-related peptide suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* **146**, 784-789 (2005).
270. J. W. Hill, J. E. Levine, Abnormal response of the neuropeptide Y-deficient mouse reproductive axis to food deprivation but not lactation. *Endocrinology* **144**, 1780-1786 (2003).
271. S. L. Padilla *et al.*, AgRP to Kiss1 neuron signaling links nutritional state and fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 2413-2418 (2017).
272. N. Bellefontaine *et al.*, Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J Clin Invest* **124**, 2550-2559 (2014).
273. D. Cota *et al.*, Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* **312**, 927-930 (2006).
274. J. Roa, M. Tena-Sempere, Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *Trends Endocrinol Metab* **21**, 519-528 (2010).
275. J. Roa *et al.*, The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology* **150**, 5016-5026 (2009).
276. M. J. Vazquez, I. Velasco, M. Tena-Sempere, Novel mechanisms for the metabolic control of puberty: implications for pubertal alterations in early-onset obesity and malnutrition. *J Endocrinol* (2019).
277. R. Nogueiras *et al.*, Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev* **92**, 1479-1514 (2012).
278. M. J. Vazquez *et al.*, SIRT1 mediates obesity- and nutrient-dependent perturbation of pubertal timing by epigenetically controlling Kiss1 expression. *Nat Commun* **9**, 4194 (2018).
279. M. J. Vázquez, A. Romero-Ruiz, M. Tena-Sempere, Roles of leptin in reproduction, pregnancy and polycystic ovary syndrome: consensus knowledge and recent developments. *Metabolism* **64**, 79-91 (2015).
280. I. S. Farooqi *et al.*, Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* **341**, 879-884 (1999).
281. F. P. Pralong, Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset. *Mol Cell Endocrinol* **324**, 82-86 (2010).
282. S. A. Divall *et al.*, Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. *J Clin Invest* **120**, 2900-2909 (2010).
283. R. Fernández-Fernández *et al.*, Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology* **146**, 3018-3025 (2005).
284. M. Furuta, T. Funabashi, F. Kimura, Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 780-785 (2001).

285. R. Fernández-Fernández *et al.*, Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology* **82**, 245-255 (2005).
286. J. L. Harrison, D. W. Miller, P. A. Findlay, C. L. Adam, Photoperiod influences the central effects of ghrelin on food intake, GH and LH secretion in sheep. *Neuroendocrinology* **87**, 182-192 (2008).
287. I. Viani *et al.*, Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 1476-1481 (2008).
288. F. Gaytan *et al.*, Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 879-887 (2003).
289. B. Wang, K. K. Cheng, Hypothalamic AMPK as a Mediator of Hormonal Regulation of Energy Balance. *Int J Mol Sci* **19** (2018).
290. D. Carling, B. Viollet, Beyond energy homeostasis: the expanding role of AMP-activated protein kinase in regulating metabolism. *Cell Metab* **21**, 799-804 (2015).
291. G. J. Gowans, S. A. Hawley, F. A. Ross, D. G. Hardie, AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab* **18**, 556-566 (2013).
292. D. G. Hardie, AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annu Rev Nutr* **34**, 31-55 (2014).
293. M. López, Hypothalamic AMPK and energy balance. *Eur J Clin Invest* **48**, e12996 (2018).
294. Y. Minokoshi *et al.*, AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**, 569-574 (2004).
295. M. K. Huynh, A. W. Kinyua, D. J. Yang, K. W. Kim, Hypothalamic AMPK as a Regulator of Energy Homeostasis. *Neural Plast* **2016**, 2754078 (2016).
296. S. Okamoto *et al.*, Activation of AMPK-Regulated CRH Neurons in the PVH is Sufficient and Necessary to Induce Dietary Preference for Carbohydrate over Fat. *Cell Rep* **22**, 706-721 (2018).
297. M. López *et al.*, Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* **16**, 1001-1008 (2010).
298. M. López, EJE PRIZE 2017: Hypothalamic AMPK: a golden target against obesity? *Eur J Endocrinol* **176**, R235-R246 (2017).
299. J. W. Hill, J. K. Elmquist, C. F. Elias, Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E827-832 (2008).
300. S. Coyral-Castel *et al.*, The effect of AMP-activated kinase activation on gonadotrophin-releasing hormone secretion in GT1-7 cells and its potential role in hypothalamic regulation of the oestrous cyclicity in rats. *J Neuroendocrinol* **20**, 335-346 (2008).
301. J. P. Wen *et al.*, Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons. *J Endocrinol* **214**, 177-189 (2012).
302. A. V. Roland, S. M. Moenter, Glucosensing by GnRH neurons: inhibition by androgens and involvement of AMP-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* **25**, 847-858 (2011).
303. J. M. Castellano, M. Tena-Sempere, Animal Modeling of Early Programming and Disruption of Pubertal Maturation. *Endocr Dev* **29**, 87-121 (2016).
304. D. J. Barker, C. Osmond, Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* **1**, 1077-1081 (1986).
305. M. Q. Latorraca, E. M. Carneiro, A. C. Boschero, M. A. Mello, Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. *Br J Nutr* **80**, 291-297 (1998).
306. T. Harder, A. Plagemann, W. Rohde, G. Dörner, Syndrome X-like alterations in adult female rats due to neonatal insulin treatment. *Metabolism* **47**, 855-862 (1998).

307. E. Velkoska, M. J. Morris, Mechanisms behind early life nutrition and adult disease outcome. *World J Diabetes* **2**, 127-132 (2011).
308. L. B. Oscai, J. A. McGarr, Evidence that the amount of food consumed in early life fixes appetite in the rat. *Am J Physiol* **235**, R141-144 (1978).
309. N. Stettler, B. S. Zemel, S. Kumanyika, V. A. Stallings, Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. *Pediatrics* **109**, 194-199 (2002).
310. S. F. Witchel, M. Tena-Sempere, The Kiss1 system and polycystic ovary syndrome: lessons from physiology and putative pathophysiologic implications. *Fertil Steril* **100**, 12-22 (2013).
311. M. L. Gottsch *et al.*, Molecular properties of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *Endocrinology* **152**, 4298-4309 (2011).
312. D. Nakada, T. L. Saunders, S. J. Morrison, Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* **468**, 653-658 (2010).
313. H. Yoon, L. W. Enquist, C. Dulac, Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell* **123**, 669-682 (2005).
314. F. J. Steyn *et al.*, Development of a methodology for and assessment of pulsatile luteinizing hormone secretion in juvenile and adult male mice. *Endocrinology* **154**, 4939-4945 (2013).
315. J. Clarkson *et al.*, Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E10216-E10223 (2017).
316. H. J. McQuillan, S. Y. Han, I. Cheong, A. E. Herbison, GnRH Pulse Generator Activity Across the Estrous Cycle of Female Mice. *Endocrinology* **160**, 1480-1491 (2019).
317. M. E. Nilsson *et al.*, Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Endocrinology* **156**, 2492-2502 (2015).
318. L. Pinilla, M. L. Barreiro, L. C. Gonzalez, M. Tena-Sempere, E. Aguilar, Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat. *J Endocrinol* **172**, 441-448 (2002).
319. R. Pivonello *et al.*, Metabolic Disorders and Male Hypogonadotropic Hypogonadism. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, 345 (2019).
320. N. M. Lainez, D. Coss, Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function. *Endocrinology* **160**, 2719-2736 (2019).
321. V. M. Navarro *et al.*, Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *J Neurosci* **32**, 2388-2397 (2012).
322. H. F. Escobar-Morreale, Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* **14**, 270-284 (2018).
323. M. Molina-Vega, A. Muñoz-Garach, M. Damas-Fuentes, J. C. Fernández-García, F. J. Tinahones, Secondary male hypogonadism: A prevalent but overlooked comorbidity of obesity. *Asian J Androl* **20**, 531-538 (2018).
324. M. Molina-Vega *et al.*, Cross-Sectional, Primary Care-Based Study of the Prevalence of Hypoandrogenemia in Nondiabetic Young Men with Obesity. *Obesity (Silver Spring)* **27**, 1584-1590 (2019).
325. R. Lakshman *et al.*, Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 4953-4960 (2009).
326. Anonymous (2016) World Health Organization Updates. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>), p Obesity and Overweight Fact Sheet.
327. K. R. Feingold *et al.*, "Endotext". (2000).
328. M. A. Sánchez-Garrido *et al.*, Metabolic programming of puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional challenges. *Endocrinology* **154**, 3387-3400 (2013).

329. M. A. Sanchez-Garrido *et al.*, Intergenerational Influence of Paternal Obesity on Metabolic and Reproductive Health Parameters of the Offspring: Male-Preferential Impact and Involvement of Kiss1-Mediated Pathways. *Endocrinology* **159**, 1005-1018 (2018).
330. L. Pinilla *et al.*, Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats. *J Reprod Fertil* **97**, 13-20 (1993).
331. K. A. Walters, C. M. Allan, D. J. Handelsman, Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod* **86**, 149, 141-112 (2012).
332. K. A. Walters *et al.*, New Perspectives on the Pathogenesis of PCOS: Neuroendocrine Origins. *Trends Endocrinol Metab* **29**, 841-852 (2018).
333. M. Namwanje, C. W. Brown, Activins and Inhibins: Roles in Development, Physiology, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8** (2016).
334. M. Keuper, H. U. Häring, H. Staiger, Circulating FGF21 Levels in Human Health and Metabolic Disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (2019).
335. R. Y. Gao, B. G. Hsu, D. A. Wu, J. S. Hou, M. C. Chen, Serum Fibroblast Growth Factor 21 Levels Are Positively Associated with Metabolic Syndrome in Patients with Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol* **2019**, 5163245 (2019).
336. B. M. Owen *et al.*, FGF21 contributes to neuroendocrine control of female reproduction. *Nat Med* **19**, 1153-1156 (2013).
337. E. L. Sullivan, M. S. Smith, K. L. Grove, Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* **93**, 1-8 (2011).
338. E. Navarro, A. N. Funtikova, M. Fito, H. Schröder, Prenatal nutrition and the risk of adult obesity: Long-term effects of nutrition on epigenetic mechanisms regulating gene expression. *J Nutr Biochem* **39**, 1-14 (2017).
339. M. Grossmann, M. Ng Tang Fui, A. S. Cheung, Late-onset hypogonadism: metabolic impact. *Andrology* (2019).
340. S. Dhindsa, H. Ghanim, M. Batra, P. Dandona, Hypogonadotropic Hypogonadism in Men With Diabetes. *Diabetes Care* **41**, 1516-1525 (2018).
341. H. F. Escobar-Morreale, The Role of Androgen Excess in Metabolic Dysfunction in Women : Androgen Excess and Female Metabolic Dysfunction. *Adv Exp Med Biol* **1043**, 597-608 (2017).
342. S. Minabe *et al.*, Pharmacological and Morphological Evidence of AMPK-Mediated Energy Sensing in the Lower Brain Stem Ependymocytes to Control Reproduction in Female Rodents. *Endocrinology* **156**, 2278-2287 (2015).
343. X. B. Cheng *et al.*, GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine* **39**, 6-12 (2011).
344. J. Roa *et al.*, Metabolic regulation of female puberty via hypothalamic AMPK-kisspeptin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E10758-E10767 (2018).
345. M. A. Torsoni *et al.*, AMPK α 2 in Kiss1 Neurons Is Required for Reproductive Adaptations to Acute Metabolic Challenges in Adult Female Mice. *Endocrinology* **157**, 4803-4816 (2016).