



# **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Departamento de Biología Celular, Fisiología e inmunología

## **TESIS DOCTORAL**

### **ANÁLISIS DEL PAPEL DEL SISTEMA KISS1/KISSPEPTINAS EN EL CONTROL DE LA FUNCIÓN METABÓLICA: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y DE GENÓMICA FUNCIONAL**

**Inmaculada Velasco Aguayo**

Córdoba, junio de 2019

TITULO: ANÁLISIS DEL PAPEL DEL SISTEMA KISS1/KISSPEPTINAS EN EL CONTROL DE LA FUNCIÓN METABÓLICA: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y DE GENÓMICA FUNCIONAL

AUTOR: *Inmaculada Velasco Aguayo*

---

© Edita: UCOPress. 2019  
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

## ANÁLISIS DEL PAPEL DEL SISTEMA KISS1/KISSPEPTINAS EN EL CONTROL DE LA FUNCIÓN METABÓLICA: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y DE GENÓMICA FUNCIONAL

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Inmaculada Velasco Aguayo**, 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

Dra. María Jesús Vázquez Villar  
Profesora Ayudante Doctora de  
la Universidad de Córdoba





## **TÍTULO DE LA TESIS: ANÁLISIS DEL PAPEL DEL SISTEMA KISS1/KISSPEPTINAS EN EL CONTROL DE LA FUNCIÓN METABÓLICA: ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y DE GENÓMICA FUNCIONAL**

**DOCTORANDO/A:** Inmaculada Velasco Aguayo

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

El trabajo de Tesis Doctoral titulado “*Análisis del papel del sistema kiss1/kisspeptinas en el control de la función metabólica: estudios farmacológicos y de genómica funcional*” ha sido completado de forma muy satisfactoria por la doctoranda Inmaculada Velasco Aguayo en la Sección de Fisiología del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, entre los años 2014 y 2019, bajo nuestra dirección. El objetivo general de este trabajo ha sido el estudio del papel del sistema Kiss1 en la regulación de parámetros básicos relacionados con la homeostasis energética y metabólica del organismo, en ambos sexos, mediante el empleo, en primer lugar, de herramientas farmacológicas y, además, mediante la caracterización fenotípica de indicadores de función metabólica de dos modelos murinos novedosos, genéticamente modificados, con diferentes alteraciones en la señalización de kisspeptinas (estudios de genómica funcional).

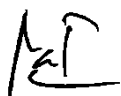
Durante el periodo predoctoral, la doctoranda ha adquirido una considerable destreza en el manejo de diferentes técnicas de biología molecular y neuroendocrinología experimental, lo que le ha permitido cumplir ampliamente con el objetivo general propuesto para este proyecto de Tesis. Asimismo, la doctoranda ha aprovechado esta etapa formativa para reforzar sus conocimientos en el área de estudio y colaborar activamente en otras líneas de investigación estrechamente relacionadas con su línea de Tesis Doctoral, que han incluido tanto proyectos básicos como aplicados.

La excelente labor investigadora de la doctoranda durante este periodo se ha traducido hasta ahora en: (i) 1 artículo como primera autora aceptado en la revista *Metabolism*, del primer cuartil de área de Endocrinología y Metabolismo, (ii) 5 artículos científicos como co-autora, que incluyen 1 un artículo en primer decil (*Nature Communications*), 3 artículos en primer cuartil (*Scientific Reports*, *Metabolism* y *Journal of Endocrinology*; en estos dos últimos con posiciones relevantes como segunda autora) y 1 artículo en segundo cuartil (*Endocrinology*, con índice de impacto de 5 años >4); y (iii) 1 artículo adicional como coautora que se encuentra actualmente en revisión en la revista de primer decil, *Diabetes*. Adicionalmente, las actividades de investigación de la doctoranda han resultado en (iv) 14 comunicaciones a reuniones científicas y congresos nacionales e internacionales, entre los que se incluyen “*Kisspeptin 2017- Brain and beyond*” (Orlando, USA 2017) y el “*European Congress of Endocrinology*”, en sus ediciones de 2016 y 2019; y (v) un premio recibido por la comunicación oral titulada “Efectos de la acción directa de las kisspeptinas sobre neuronas GnRH en el control del metabolismo energético” en el VI Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba.

Por todo lo anteriormente expuesto, se **AUTORIZA** la presentación de la presente Tesis Doctoral.

Córdoba, 12 de junio de 2019

Firma del/de los director/es



Fdo.: Manuel Tena Sempere



Fdo.: María Jesús Vázquez Villar







# ÍNDICE

---



# ÍNDICE

Resumen

Abreviaturas

Introducción.....	1
1. Balance energético .....	2
1.1. El sistema nervioso central y el control del balance energético.....	3
1.1.1. El Hipotálamo .....	3
1.1.1.1. Núcleo ARC.....	5
1.1.1.2. VMN .....	7
1.1.1.3. PVN.....	8
1.1.1.4. DMN.....	8
1.1.1.5. LHA.....	9
1.1.2. Tronco cerebral .....	9
1.1.3. Cerebelo.....	10
1.1.4. Hipocampo.....	10
1.1.5. Amígdala.....	10
1.2. Factores periféricos implicados en el control del balance energético .....	11
1.2.1. Leptina .....	11
1.2.2. Insulina.....	13
1.2.3. Ghrelina.....	14
1.2.4. Colecistoquinina (CCK).....	15
1.2.5. Péptido YY (PYY).....	16
1.2.6. Péptido similar al glucagón 1 (GLP1) .....	16
1.2.7. Esteroides Gonadales.....	18
1.2.7.1. Efectos de los estrógenos en el balance energético .....	19
1.2.7.2. Efectos de los andrógenos en el balance energético .....	20
1.2.7.3. Efectos de los progestágenos en el balance energético .....	21
2. Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG) .....	21
2.1. GnRH.....	23
2.1.1. Secreción de GnRH y pubertad.....	23
2.1.2. GnRH y control metabólico de la reproducción.....	25
2.2. Gonadotropinas: LH y FSH .....	26
2.3. Esteroides gonadales.....	29
2.3.1. Gónadas.....	29

2.3.1.1.	Testículos .....	29
2.3.1.2.	Ovarios .....	30
3.	Control metabólico de la reproducción .....	32
3.1.	Factores centrales implicados en el control metabólico de la reproducción .....	33
3.1.1.	POMC.....	33
3.1.2.	NPY/AgRP .....	34
3.1.3.	KISS1 .....	34
3.1.4.	Neuronas PMV, neuronas GABA y neuronas NO.....	35
3.1.5.	Mediadores moleculares: AMPK, SIRT1 y mTOR .....	36
3.2.	Factores periféricos implicados en el control metabólico de la reproducción .....	38
3.2.1.	Leptina .....	38
3.2.2.	Insulina.....	39
3.2.3.	Ghrelin.....	40
4.	Sistema KISS 1 / kisspeptinas / Gpr54.....	41
4.1.	El receptor de kisspeptinas, Gpr54 .....	42
4.2.	Neuronas KNDy.....	44
4.3.	Papel de las kisspeptinas en la regulación del eje reproductor .....	46
4.4.	Papel de las kisspeptinas en la regulación del metabolismo .....	48
	Objetivos.....	55
	Materiales y Métodos.....	59
1.	Animales de experimentación .....	59
1.1.	Generación del modelo GPR54 <sup>-/-</sup> Tg .....	59
1.2.	Generación del modelo TaKKO .....	61
2.	Drogas y reactivos .....	64
3.	Procedimientos generales .....	64
3.1.	Canulación y administración intracerebroventricular de drogas ..	64
3.2.	Gonadectomía y reemplazamiento hormonal.....	65
3.3.	Análisis de composición corporal y parámetros metabólicos.....	65
3.4.	Procesamiento de muestras .....	65
3.5.	Genotipado .....	66
3.6.	Extracción de ARN y retrotranscripción (RT) .....	66
3.7.	PCR cuantitativa a tiempo real .....	67
3.8.	Determinaciones hormonales.....	68
3.9.	Hibridación in situ .....	69

4.	Diseños experimentales.....	71
	Bloque experimental I. Estudios farmacológicos del impacto de la Kisspeptina-10 en la regulación de la homeostasis metabólica. ....	71
	Estudio I - 1. Análisis de los efectos de la administración central de kisspeptina en control de la homeostasis metabólica.....	71
	Estudio I - 2. Análisis de los efectos de la administración periférica de kisspeptina en control de la homeostasis metabólica.....	74
	Bloque experimental II. Efectos de la señalización de Kisspeptinas frente a los efectos de los esteroides gonadales en el control de la homeostasis energética. Estudios en el modelo Gpr54 <sup>-/-</sup> Tg. ....	75
	Estudio II - 1. Evaluación de parámetros metabólicos en ratones Gpr54 <sup>-/-</sup> y Gpr54 <sup>-/-</sup> T con dieta control.....	75
	Estudio II - 2. Evaluación de parámetros metabólicos en ratones Gpr54 <sup>-/-</sup> y Gpr54 <sup>-/-</sup> Tg en diferentes condiciones obesogénicas. ....	78
	Bloque experimental III. Implicación de las neuronas Kiss1 del ARC en el control de la homeostasis metabólica. Estudios en el modelo TaKKO. ....	79
	Estudio III – 1. Implicación de la señalización de kisspeptinas del ARC en la regulación de parámetros metabólicos.....	79
5.	Presentación de datos y estadística.....	81
	Resultados .....	85
	Bloque experimental I. Estudios farmacológicos del impacto de la Kisspeptina-10 en la regulación de la homeostasis metabólica. ....	85
	Estudio I - 1: Análisis de los efectos de la administración central de kisspeptina en control de la homeostasis metabólica.....	85
	Estudio I - 2: Análisis de los efectos de la administración periférica de kisspeptina en el control de la homeostasis metabólica. ....	92
	Bloque experimental II. Efectos de la señalización de Kisspeptinas frente a los efectos de los esteroides gonadales en el control de la homeostasis energética: Estudios en el modelo Gpr54Tg.....	97
	Estudio II - 1. Evaluación de parámetros metabólicos en ratones Gpr54 <sup>-/-</sup> y Gpr54 <sup>-/-</sup> T con dieta control. ....	97
	Estudio II - 2. Evaluación de parámetros metabólicos en ratones Gpr54 <sup>-/-</sup> y Gpr54 <sup>-/-</sup> Tg en diferentes condiciones obesogénicas. ....	107
	Bloque experimental III. Implicación de las neuronas Kiss1 del ARC en el control de la homeostasis metabólica: Estudios en el modelo TaKKO. ....	115
	Estudio III – 1. Implicación de la señalización de kisspeptinas del ARC en la regulación de parámetros metabólicos.....	115
	Discusión .....	129
	Conclusiones.....	149
	Bibliografía .....	153



# RESUMEN

---





# Resumen

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la obesidad y las enfermedades asociadas ésta, están alcanzando proporciones epidémicas en todo el mundo, y esto se debe a la incapacidad del individuo para preservar la homeostasis energética debido a la continua exposición a condiciones obesogénicas que le rodean. Un balance energético adecuado depende del equilibrio entre el gasto energético y la ingesta de alimentos [1, 2]. La regulación de estos procesos biológicos depende de un complejo sistema de señalización que, a nivel periférico, informa de manera precisa de la disponibilidad de recursos con los que el individuo cuenta en todo momento, y que a nivel central incorpora multitud de circuitos neuronales y hormonales, que integran toda la información y responden de manera adecuada a los cambios energéticos del organismo.

La reproducción, aun cuando no es fundamental para la supervivencia del individuo, es una función vital para la supervivencia de las especies, y dada su importancia, los organismos se han dotado de numerosos sistemas de control que aseguran que ésta se lleve a cabo de manera adecuada. Además, la activación del eje reproductor depende en gran medida del grado de reservas energéticas del individuo, de manera que solo en caso de suficiencia energética la función reproductora se pone en marcha durante la pubertad y se mantiene durante la edad adulta [3, 4]. Sin embargo, en situaciones de exceso o déficit de reservas energéticas, como es el caso de la obesidad extrema y la subnutrición, respectivamente, la función reproductora puede verse severamente afectada. Asimismo, las alteraciones en la edad de adquisición de la capacidad reproductora, ya sea porque la pubertad tenga lugar a edades muy tempranas o tardías, predispone al desarrollo de numerosos problemas de salud durante el período adulto, tales como cardiopatías, diabetes tipo II, cáncer o trastornos neuromusculares, disminuyendo ostensiblemente la esperanza de vida.

El correcto funcionamiento del eje reproductor depende de la integración de las señales metabólicas periféricas que convergen a nivel central y actúan sobre los distintos centros hipotalámicos responsables de la reproducción. Estos mecanismos reguladores implican a un gran número de, por un lado, hormonas metabólicas, entre las que cabe destacar la leptina (señal de suficiencia energética sintetizada en el tejido adiposo) [6, 7] y la ghrelina (señal

de déficit energético) [8, 9] y por otro lado neuropéptidos como, entre otros, las Kisspeptinas.

Las kisspeptinas (codificadas por el gen *Kiss1*) y su receptor Gpr54 (o KISS1R), son elementos clave en la regulación del eje reproductor [10]. Tanto es así, que se ha documentado de manera concluyente que mutaciones en los genes *Kiss1* o *Gpr54*, tanto en humano como en ratón, causan ausencia de pubertad y desordenes reproductores tales como el hipogonadismo hipogonadotropo [11, 12]. Las kisspeptinas actúan a través de Gpr54 estimulando la secreción de las neuronas GnRH en el hipotálamo y activando así el eje reproductor (eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal). Además, las kisspeptinas tienen un papel fundamental en la integración de la información metabólica a nivel central [13]. Así, cambios en el estatus metabólico afectan a los niveles de kisspeptinas en el hipotálamo, lo que sugiere que las neuronas *Kiss1* intervienen en el control metabólico de la reproducción [14].

Sin embargo, la distribución del receptor de las kisspeptinas no se circunscribe al área hipotalámica, sino que puede encontrarse en otras áreas del cerebro y en diversos tejidos periféricos, incluyendo tejidos metabólicos como la grasa o el páncreas [15]. Todas estas evidencias previas sugieren que las kisspeptinas podrían tener también un papel directo en el control de determinados parámetros metabólicos, más allá de su papel en la función reproductora. En este sentido, estudios recientes han sugerido la posible implicación de las kisspeptinas en el control de parámetros metabólicos tales como el peso corporal [16, 17], la ingesta o la actividad locomotora [18, 19]. Sin embargo, la evidencia acerca de una función metabólica genuina de las kisspeptinas sigue siendo, en muchos casos, inconclusa, lo que hace obligatorio el uso de enfoques adicionales más incisivos, para exponer plenamente las acciones fisiológicas, y el posible papel patogénico, de la señalización de las kisspeptinas en el control de las facetas clave del metabolismo.

Teniendo en cuenta lo expuesto previamente, el objetivo general de esta Tesis Doctoral es el estudio del papel del sistema *Kiss1* en la regulación de aspectos básicos de la función metabólica en ambos sexos, mediante el empleo de herramientas farmacológicas y modelos murinos genéticamente modificados (genómica funcional).

## 2. CONTENIDO DE LA INVESTIGACIÓN

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

En el **bloque experimental 1**, se ha evaluado las respuestas de parámetros metabólicos básicos a la administración central o periférica de Kp-10 en ratones silvestres.

Nuestros resultados mostraron, en primer lugar, que la administración repetida intracerebroventricular de Kp-10 indujo alteraciones detectables de diversos parámetros metabólicos, con un perfil claramente diferenciado en función del sexo. Así, en machos, la inyección repetida central de Kp-10 produjo una caída conjunta de la ingesta de alimentos, así como del gasto energético y la actividad locomotora, con una moderada elevación del RQ, indicativa de un cambio al uso predominante de carbohidratos como sustrato energético. Sin embargo, estas alteraciones no se tradujeron en cambios detectables en el peso y composición corporal, posiblemente por la supresión paralela de ingesta y consumo energético, ni en alteraciones de la homeostasis glucídica, con niveles de glucemia basal y respuestas en los test de tolerancia a la glucosa (GTT) y a la insulina (ITT) similares a las de ratones macho tratados con vehículo. Por el contrario, en ratones hembra, la inyección central repetida de Kp-10 no produjo cambios significativos en la ingesta de alimentos y causó un incremento del gasto energético y la actividad locomotora, que se asociaron a una tendencia a la disminución del peso corporal, principalmente a expensas de una modesta reducción de la masa magra. Adicionalmente, el tratamiento central con Kp-10 provocó una disminución de los niveles de glucemia basal, sin cambios detectables en las respuestas a GTT e ITT. Por otra parte, la administración periférica de Kp-10 no provocó cambios en ninguno de los parámetros analizados tanto en ratones macho como en hembras, a excepción de una ligera mejor en la resistencia a insulina.

En el **bloque experimental 2**, a fin de profundizar en la definición de los efectos directos de las kisspeptinas sobre el metabolismo, diferenciándolos frente a aquellos derivados de sus acciones sobre la función gonadal, se ha llevado a cabo el análisis metabólico de un modelo de ratón con inactivación genética global del receptor de kisspeptinas, Gpr54, y con re inserción selectiva del receptor solo en neuronas GnRH, permitiendo así un rescate completo de la maduración puberal y de la función del eje gonadal. Nuestros resultados en

ratones alimentados con dieta control detectaron una bajada consistente de peso corporal en los machos  $Gpr54^{-/-}$ , posiblemente debido a la ausencia del efecto anabolizante de los andrógenos, mientras que las hembras  $Gpr54^{-/-}$  mostraron un incremento del peso corporal, principalmente durante la etapa adulta, que a su vez está relacionado con un aumento en la adiposidad, que se manifiesta en un incremento de los niveles de leptina, así como con una disminución de la expresión génica de factores termogénicos, tales como UCP1 en el tejido adiposo marrón. Por su parte, los ratones  $Gpr54^{-/-}Tg$  (rescatados, y por tanto con función gonadal preservada) mostraron un fenotipo similar a los controles en peso corporal a tiempo final. Sin embargo, en machos se detectó un perfil de peso intermedio que se hizo evidente en las primeras etapas del desarrollo. Igualmente, se analizaron los patrones de ingesta y se observó que, en machos, solo los ratones  $Gpr54^{-/-}$  mostraron una supresión significativa de la ingesta, tanto en la fase de luz como en la fase oscura, mientras que los ratones  $Gpr54^{-/-}Tg$  presentaron unos patrones de ingesta iguales a los controles.

En hembras, la ingesta de las ratonas  $Gpr54^{-/-}$  presentó una disminución significativa, tanto en la fase de luz como en oscuridad, al igual que en machos con KO global de  $Gpr54$ . Sin embargo, la ingesta también fue parcialmente suprimida solo en las hembras  $Gpr54^{-/-}Tg$ , y no en los ratones macho rescatados. En cuanto al metabolismo de la glucosa, observamos un deterioro en la tolerancia a glucosa que fue detectable sólo en las hembras, siendo las hembras KO las que mostraron un mayor empeoramiento en el manejo de la glucosa, mientras que las hembras rescatadas presentaron un fenotipo intermedio entre las hembras KO y control. Además, nuestro estudio ha sido el primero en explorar el impacto de la manipulación de la señalización de kisspeptinas sobre el peso corporal y la respuesta metabólica en animales sometidos a diferentes insultos obesogénicos, como el HFD y la gonadectomía, este último en ratones hembra. Nuestros datos indican que la ausencia de la señalización de kisspeptinas a nivel global causa un deterioro exagerado de parámetros metabólicos clave tras la exposición a estas condiciones obesogénicas, con un aumento de la ganancia de peso corporal y de la masa grasa, una disminución de la masa magra y un empeoramiento de la tolerancia a la glucosa.

Por último, en el **bloque experimental 3** de esta Tesis, empleamos un modelo murino novedoso, generado por nuestro grupo, el ratón TaKKO, que presenta eliminación selectiva de la expresión del gen *Kiss1* en células que expresan *Tac2*, y por ello en las neuronas KNDy del ARC, con el fin de dilucidar

las posibles acciones metabólicas de las kisspeptinas producidas por esta población neuronal clave. Los ratones TaKKO mostraron un aumento significativo de la adiposidad a distintas edades del crecimiento, tanto en ratones macho como hembra, siendo más evidente dicho efecto en estas últimas. Por otra parte, la eliminación de la producción de kisspeptinas en neuronas KNDy del ARC no provocó cambios significativos en los patrones de ingesta en machos o hembras, si bien los ratones TaKKO de ambos sexos presentaron una tendencia (que no alcanzó la significación estadística) a una reducción de la ingesta, especialmente en la fase de oscuridad en hembras y en la ingesta acumulada en 24h en machos. Además, nuestros resultados evidencian una supresión del gasto energético en los ratones TaKKO, que fue significativa en machos, y que se asoció a una disminución del peso de BAT en ambos sexos, así como una disminución de la actividad locomotora selectivamente en las hembras TaKKO. Por último, nuestros análisis detectaron alteraciones sutiles en los perfiles de glucemia tras la sobrecarga de glucosa o insulina en ratones TaKKO, especialmente en machos, donde la ablación selectiva de kisspeptinas de las neuronas KNDy indujo una mejora moderada del manejo de glucosa tras la sobrecarga e incluso aumentó ligeramente la sensibilidad a insulina, al menos a determinados tiempos durante el GTT y el ITT.

### **3. CONCLUSIONES**

Las principales conclusiones de nuestro trabajo son:

- 1- La administración farmacológica central, pero no periférica, de kisspeptina-10, causó una supresión concurrente de la ingesta, el gasto energético y la actividad locomotora en ratones macho, mientras que indujo un aumento del gasto energético y la actividad locomotora, junto a una moderada disminución del peso corporal, en ratones hembra, de manera independiente de cambios en los niveles de esteroides sexuales.
- 2- La ablación congénita del receptor de kisspeptinas indujo cambios en el peso y la composición corporal, la ingesta y la homeostasis glucídica, y agravó el impacto metabólico de manipulaciones obesogénicas, como la dieta alta en grasa y la ovariectomía. Aunque una parte notable de esos efectos parece derivar del estado de hipogonadismo asociado a la eliminación de la señalización de kisspeptinas, nuestros estudios en modelos con ablación condicional de Gpr54 ponen de manifiesto un

papel primario de este sistema en el control del peso corporal en periodos pre/peri-puberales, el control de la ingesta y la homeostasis glucídica, especialmente en hembras, así como en la adaptación a insultos obesogénicos, especialmente en machos.

- 3- La eliminación selectiva de las kisspeptinas procedentes de neuronas KNDy produjo alteraciones en la composición corporal, con aumento de la adiposidad y descenso del gasto energético en ambos sexos, y una alteración sexualmente dimórfica de la actividad locomotora (disminuida en hembras) y de la homeostasis glucídica (con mejoras moderadas de los perfiles de tolerancia a glucosa e insulina en machos).
- 4- Globalmente, nuestros resultados documentan un papel fisiológico de la señalización de kisspeptinas en la regulación del peso y composición corporal, la ingesta de alimentos, el gasto energético, la actividad locomotora, la homeostasis glucídica y las respuestas metabólicas a los insultos obesogénicos. Estos efectos, sin embargo, dependen del sitio de acción y, en algunos casos, se presentan de manera sexualmente dimórfica.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] M.A. Rossi, G.D. Stuber, Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding, *Cell Metab* 27(1) (2018) 42-56.
- [2] H. Münzberg, E. Qualls-Creekmore, H.R. Berthoud, C.D. Morrison, S. Yu, Neural Control of Energy Expenditure, *Handb Exp Pharmacol* 233 (2016) 173-94.
- [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 (2018) 37-49.
- [4] 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(6) (2017) 737-763.
- [6] 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(1) (2015) 79-91.

- [7] J. Roa, M. Tena-Sempere, Connecting metabolism and reproduction: roles of central energy sensors and key molecular mediators, *Mol Cell Endocrinol* 397(1-2) (2014) 4-14.
- [8] R. Fernández-Fernández, M. Tena-Sempere, V.M. Navarro, M.L. Barreiro, J.M. Castellano, E. Aguilar, L. Pinilla, Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies, *Neuroendocrinology* 82(5-6) (2005) 245-55.
- [9] M.C. Lebrethon, A. Aganina, M. Fournier, A. Gérard, A.S. Parent, J.P. Bourguignon, Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty, *J Neuroendocrinol* 19(3) (2007) 181-8.
- [10] L. Pinilla, E. Aguilar, C. Dieguez, R.P. Millar, M. Tena-Sempere, Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms, *Physiol Rev* 92(3) (2012) 1235-316.
- [11] N. de Roux, E. Genin, J.C. Carel, F. Matsuda, J.L. Chaussain, E. Milgrom, Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19) (2003) 10972-6.
- [12] S.B. Seminara, S. Messager, E.E. Chatzidaki, R.R. Thresher, J.S. Acierno, J.K. Shagoury, Y. Bo-Abbas, W. Kuohung, K.M. Schwinof, A.G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, U.B. Kaiser, S.A. Slaugenhaupt, J.F. Gusella, S. O'Rahilly, M.B. Carlton, W.F. Crowley, S.A. Aparicio, W.H. Colledge, The GPR54 gene as a regulator of puberty, *N Engl J Med* 349(17) (2003) 1614-27.
- [13] F. Wahab, B. Atika, F. Ullah, M. Shahab, R. Behr, Metabolic Impact on the Hypothalamic Kisspeptin-Kiss1r Signaling Pathway, *Front Endocrinol (Lausanne)* 9 (2018) 123.
- [14] J.M. Castellano, V.M. Navarro, R. Fernández-Fernández, J. Roa, E. Vigo, R. Pineda, C. Dieguez, E. Aguilar, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats, *Diabetes* 55(9) (2006) 2602-10.
- [15] A. Wolfe, M.A. Hussain, The Emerging Role(s) for Kisspeptin in Metabolism in Mammals, *Front Endocrinol (Lausanne)* 9 (2018) 184.
- [16] K.P. Tolson, C. Garcia, S. Yen, S. Simonds, A. Stefanidis, A. Lawrence, J.T. Smith, A.S. Kauffman, Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity, *J Clin Invest* 124(7) (2014) 3075-9.

- [17] K.P. Tolson, C. Garcia, I. Delgado, N. Marooki, A.S. Kauffman, Metabolism and Energy Expenditure, But Not Feeding or Glucose Tolerance, Are Impaired in Young Kiss1r KO Female Mice, *Endocrinology* 157(11) (2016) 4192-4199.
- [18] R. Saito, K. Tanaka, H. Nishimura, K. Nishimura, S. Sonoda, H. Ueno, Y. Motojima, M. Yoshimura, T. Maruyama, Y. Yamamoto, K. Kusuhara, Y. Ueta, Centrally administered kisspeptin suppresses feeding via nesfatin-1 and oxytocin in male rats, *Peptides* 112 (2019) 114-124.
- [19] S.L. Padilla, J.G. Perez, M. Ben-Hamo, C.W. Johnson, R.E.A. Sanchez, I.L. Bussi, R.D. Palmiter, H.O. de la Iglesia, Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus Orchestrate Circadian Rhythms and Metabolism, *Curr Biol* 29(4) (2019) 592-604.e4.







# ABREVIATURAS

---



## Abreviaturas

3V: Tercer ventrículo	GLP1: Péptido similar al glucagón 1
ACTH: Hormona adrenocorticotropa	GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
AgRP: Péptido relacionado con agouti	GPCR: Receptor acoplado a la proteína G
AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-d-ribonucleosido	GTT: Test de tolerancia a la glucosa
ARC: Núcleo arcuato	HFD: Dieta alta en grasa
AUC: Área bajo la curva	HHG: Hipotálamo hipofiso gonadal
AVPV: Núcleo anteroventral periventricular	icv: Intracerebroventricular
BAT: Tejido adiposo marrón	IGF-I: Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro	ip: Intraperitoneal
CART: Tránsito relacionado con cocaína y anfetamina	IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato
CCK: Colecistoquinina	IRS: Sustrato del receptor de insulina
CPT1: Carnitina palmitoiltransferasa 1	ISH: Hibridación in situ
CRH: Receptor de citoquinas	ITT: Test de tolerancia a la insulina
DAG: Diacilglicerol	KOR: receptor opioide-kappa
DHA: Área hipotalámica dorsal	LEPR: Receptor de leptina
DHT: Dihidrotestosterona	LH: Hormona luteinizante
DMN: Núcleo dorsomedial	LHA: Área hipotalámica lateral
DREADD: Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs	LR: Receptores de leptina
ER: Receptor de estrógeno	MBH: Hipotálamo medio basal
FoxO1: Factor de transcripción de la proteína O1	MC3R: Receptor de melanocortinas 3
FSH: Hormona folículo estimulante	MC4R: receptores de melanocortinas 4
GABA: Ácido γ-aminobutírico	MCH: Hormona concentradora de melanina
GDX: Gonadectomía	mTOR: Mechanistic target of rapamycin
GH: Hormona de crecimiento	Nac: Núcleo accumbens
GHSR: Receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento	NaCl: Cloruro Sódico

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleótido  
NKB: Neurokinina B  
NO: Óxido nítrico  
NOS: Óxido nítrico sintasa  
NPY: Neuropeptido Y  
NTS: Núcleo del tracto solitario  
OVX: Ovariectomía  
PCOS: Síndrome de ovario poliquístico  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PFA: Área perifornical  
PHA: Área hipotalámica posterior  
PIP2: Fosfatidilinositol bifosfato  
PKC: Proteína quinasa C  
PLC: Fosfolipasa C  
PMV: Núcleo premamilar ventral  
POA: Área preóptica  
POMC: Proopiomelanocortina  
PrRP: Péptido liberador de prolactina  
PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B

PVN: Núcleo paraventricular  
PYY: Péptido YY  
RIA: Radioinmunoensayo  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RQ: Coeficiente respiratorio  
RT: Retrotranscripción  
SIRT1: Sirtuina 1  
SNC: Sistema nervioso central  
SOCS3: Supresor de la señalización de citoquinas 3  
SON: Núcleo supraóptico  
T: Testosterona  
TH: Tirosina hidroxilasa  
TSH: Hormona estimulante de tiroides  
VMN: Núcleo ventromedial  
VTA: Área tegmental ventral  
Y1R: Receptor de neuropeptido Y1  
WATsc: Tejido adiposo blanco subcutáneo  
 $\alpha$ -MSH: Hormona estimuladora de melanocitos  $\alpha$







# INTRODUCCIÓN

---



## Introducción

La capacidad de mantener un balance energético adecuado es un requerimiento fundamental para la supervivencia del individuo. En tiempos de escasez, es necesario que las reservas energéticas, que el organismo ha almacenado durante periodos de suficiencia, puedan ser utilizadas para cubrir tanto las funciones fisiológicas básicas como las costosas demandas adicionales de energía, tales como la búsqueda de alimento, la huida de los depredadores y la reproducción.

Para garantizar que, al menos, las funciones vitales se lleven a cabo, el individuo posee un complejo sistema de señalización que informa de manera precisa de la disponibilidad de recursos con los que cuenta en todo momento. La integración de dichas señales, que pueden ser de suficiencia o insuficiencia energética, tanto centrales como periféricas, tiene lugar en el sistema nervioso central (SNC).

En este sentido, si bien la función reproductora no es indispensable para la supervivencia del individuo, sí lo es para la perpetuación de las especies, y dada su importancia, los organismos se han dotado de numerosos sistemas de control que aseguran que ésta se lleve a cabo. La reproducción está completamente supeditada al grado de reservas energéticas del individuo, de manera que solo en caso de suficiencia energética la función reproductora se pone en marcha durante la pubertad y se mantiene durante la edad adulta. Sin embargo, en situaciones de exceso o déficit de reservas energéticas como es el caso de la obesidad extrema y la subnutrición, respectivamente, los organismos pueden experimentar dificultades para reproducirse. Por otro lado, las alteraciones en la adquisición de la capacidad reproductora, ya sea porque la pubertad tenga lugar a edades muy tempranas o tardías, predispone al desarrollo de numerosos problemas de salud durante el período adulto, tales como cardiopatías, diabetes tipo II, cáncer o trastornos neuromusculares, disminuyendo ostensiblemente la esperanza de vida.

En los últimos años numerosos estudios han contribuido a mejorar nuestro conocimiento sobre los mecanismos implicados en el control de la reproducción y la influencia del estado metabólico sobre esta. Sin embargo, la repercusión de las alteraciones reproductoras sobre el balance energético ha sido menos estudiada. Un claro ejemplo de ello son las kisspeptinas,

neuropéptidos cuya implicación en el control de la reproducción y en la transmisión de la disponibilidad de energía al eje reproductor está ampliamente documentada, mientras que su posible influencia directa sobre el estado metabólico apenas se ha explorado.

## **1. Balance energético**

El balance energético se compone de dos factores fundamentales: la ingesta y el gasto energético. Ambos componentes han de estar en equilibrio para que el balance energético del individuo sea el adecuado. Sin embargo, hoy en día, la continua exposición a ambientes obesogénicos desafía la capacidad de los individuos para preservar la homeostasis energética, lo que conduce a un aumento de peso y al desarrollo de obesidad y de multitud de enfermedades asociadas a esta.

La regulación central de la ingesta de alimentos es un mecanismo clave que contribuye a la homeostasis energética. Multitud de circuitos neuronales y hormonales están encargados de controlar los procesos homeostáticos y hedónicos que regulan la alimentación [1]. Aunque se considera alimentación homeostática aquella que es necesaria para los procesos metabólicos básicos y la supervivencia, y se entiende por alimentación hedónica a aquella que está impulsada por la percepción sensorial o el placer, los circuitos implicados en ambos no son independientes, si no que interaccionan desde un punto de vista anatómico y funcional.

Cuando se produce una alteración/interrupción en los neurocircuitos que controlan el comportamiento alimenticio, surgen patologías relacionadas con hipofagia, como el caso de la anorexia nerviosa, o hiperfagia, que provocan obesidad.

Por tanto, el sistema nervioso tiene que ser capaz de regular y coordinar las funciones corporales y el comportamiento en un entorno dinámico e integrar las señales externas e internas para elaborar una respuesta adecuada. Así, el control a nivel central del metabolismo incluye la producción, almacenamiento, movilización, conversión y utilización de la energía según se obtiene, mediante las acciones coordinadas de diversos tejidos periféricos como el tracto gastrointestinal, el hígado, el páncreas, el músculo, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo [2].

En general, el gasto energético está determinado por: 1) el *metabolismo basal*, correspondiente a la energía consumida por un individuo en reposo, en ayunas y en condiciones de termo-neutralidad; 2) la *actividad física*, derivada de realizar cualquier actividad que implique movimiento corporal y 3) la *termogénesis facultativa o adaptativa*, que incluye el calor producido en el músculo, termogénesis por escalofrío, y en el tejido adiposo pardo como respuesta a la exposición al frío o a una dieta hipercalórica.

En el siguiente apartado, se describirán los principales factores implicados en la regulación tanto a nivel central como a nivel periférico del control del balance energético.

## **1.1. El sistema nervioso central y el control del balance energético.**

### **1.1.1. El Hipotálamo**

El hipotálamo neuroendocrino es el encargado a nivel central de regular un amplio rango de procesos fisiológicos, como son los ritmos circadianos (sueño/vigilia), la respuesta al estrés, el crecimiento, la homeostasis del balance energético e hídrico y la función reproductora [3].

En 1942, *Hetherington, et al*, observaron que lesiones bilaterales en el hipotálamo ventromedial de rata causaban alteraciones en la ingesta y en la actividad locomotora [4]. En la actualidad, sabemos que el hipotálamo actúa como regulador central de la homeostasis energética controlando multitud de procesos metabólicos como la ingesta, la sed, la temperatura y el peso corporal [5]. Este mantenimiento homeostático se debe a que el hipotálamo es capaz de integrar tanto estímulos sensoriales como señales internas periféricas y efectuar una respuesta vía autonómica, endocrina o comportamental a través de neurotransmisores y neuropéptidos sintetizados por diferentes poblaciones neuronales [3, 6].

El hipotálamo se encuentra en la base del diencefalo, entre el tálamo y el tercer ventrículo (3V). La parte frontal está delimitada por la lámina terminalis y la región caudal por los cuerpos mamilares. Desde un punto de vista funcional, las neuronas hipotalámicas se distribuyen en diferentes núcleos agrupados en tres regiones principales: 1) región anterior, rostral o supraóptica, 2) región medial o tuberal y 3) región posterior, caudal o mamilar (**Figura 1**).

El hipotálamo anterior incluye diferentes núcleos como el área preóptica (POA) medial y lateral, el área hipotalámica anterior, el núcleo supraóptico (SON), el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo supraquiasmático y el núcleo parvocelular periventricular. Las neuronas de los SON y PVN constituyen los componentes esenciales del hipotálamo rostral y sus axones se proyectan, fundamentalmente, hacia la neurohipófisis. En el POA, se encuentran las neuronas GnRH esenciales para el control de la función reproductora.

El hipotálamo medial está formado por el área hipotalámica lateral (LHA), el área hipotalámica dorsal (DHA), el núcleo arcuato (ARC), el núcleo ventromedial (VMN) y el núcleo dorsomedial (DMN). Las neuronas constituyentes de estos núcleos proyectan sus axones hacia la eminencia media.

El hipotálamo posterior lo constituyen neuronas que se agrupan en el área hipotalámica posterior (PHA), los cuerpos mamilares, el núcleo mamilar y el núcleo intercalado [7].

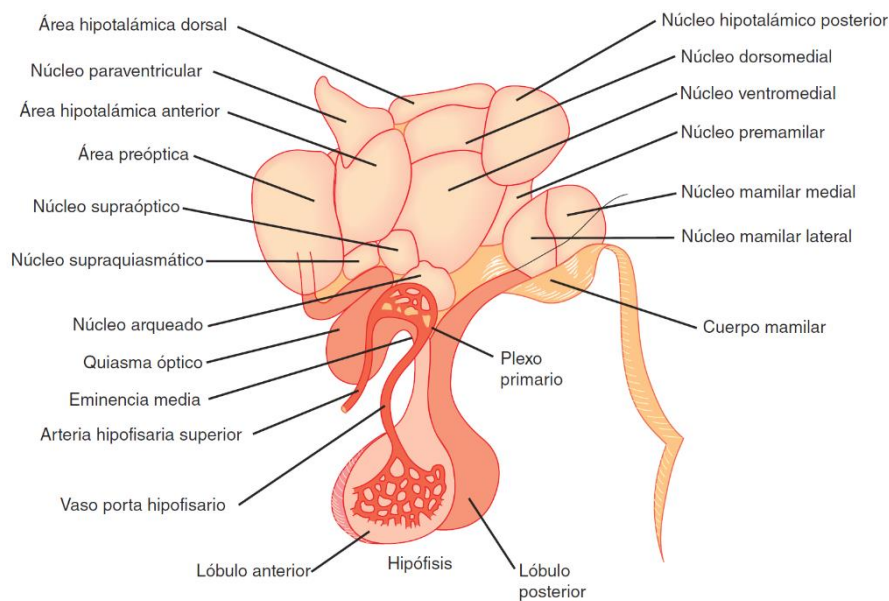


Figura 1. Representación esquemática de los núcleos hipotalámicos, la eminencia media y la hipófisis [8].

En la eminencia media, justo por debajo del hipotálamo, multitud de capilares sanguíneos forman el denominado plexo primario de la cara ventral del hipotálamo, que recibe los neuropéptidos hipotalámicos secretados por los terminales nerviosos y se envían a los vasos sinusoides porta hipofisarios que

llevan sangre a través del infundíbulo a los capilares de la glándula pituitaria o hipófisis, en concreto a la adenohipófisis [8].

A continuación, se describen los principales núcleos hipotalámicos implicados en el control del balance energético.

#### **1.1.1.1. Núcleo ARC**

El ARC se localiza en la base del 3V justo por encima de la eminencia media, situación que le confiere la capacidad de poder intercambiar péptidos y proteínas circulantes y factores neuroendocrinos gracias a la alta permeabilidad de la barrera hematoencefálica en esta zona [9-11].

El ARC es considerado un núcleo clave en la regulación de la ingesta y del gasto energético a nivel hipotalámico actuando a través de las dos principales poblaciones de neuronas que lo conforman: las neuronas NPY/AgRP (neuropéptido Y/péptido relacionado con agouti) de carácter oréxigenico (su activación induce la ingesta de alimento), y las neuronas POMC/CART (proopiomelanocortina/tránsito relacionado con cocaína y anfetamina) de carácter anorexigénico, es decir que inhiben la ingesta [12]. Estas poblaciones constituyen el primer orden de neuronas implicadas en la regulación de la ingesta. Las neuronas NPY/AgRP proyectan sus axones hacia otros núcleos hipotalámicos, mayoritariamente hacia el PVN y hacia otras neuronas del propio núcleo ARC [13], mientras que las neuronas POMC/CART proyectan sus axones hacia otros núcleos hipotalámicos como el DMN, LHA, el área perifornical (PFA) y el PVN [14] (**Figura 2**).

NPY es un neuropéptido compuesto por 36 aminoácidos que se encuentra ampliamente distribuido por el sistema nervioso central [15] y periférico [16]. NPY ejerce sus funciones a través 6 tipos de receptores denominados Y1-Y6 [17]. El potente papel estimulador de la ingesta de NPY fue documentado por primera vez en roedores tras su administración central en modelos de rata con reproducción alterada [18]. Asimismo, se ha demostrado que la administración central de NPY promueve el almacenamiento de lípidos, al tiempo que disminuye el gasto energético y modula la temperatura corporal [19-21].

AgRP es un neuropéptido capaz de estimular la ingesta por inhibir las acciones de la hormona estimuladora de melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH) al antagonizar

sus receptores tipo 4 [22]. A diferencia de NPY, su distribución se circunscribe al núcleo arcuato.

Además de la liberación de estos neuropéptidos, las neuronas NPY/AgRP liberan ácido y aminobutírico (GABA), que actúa de forma paracrina inhibiendo las neuronas POMC/CART adyacentes.

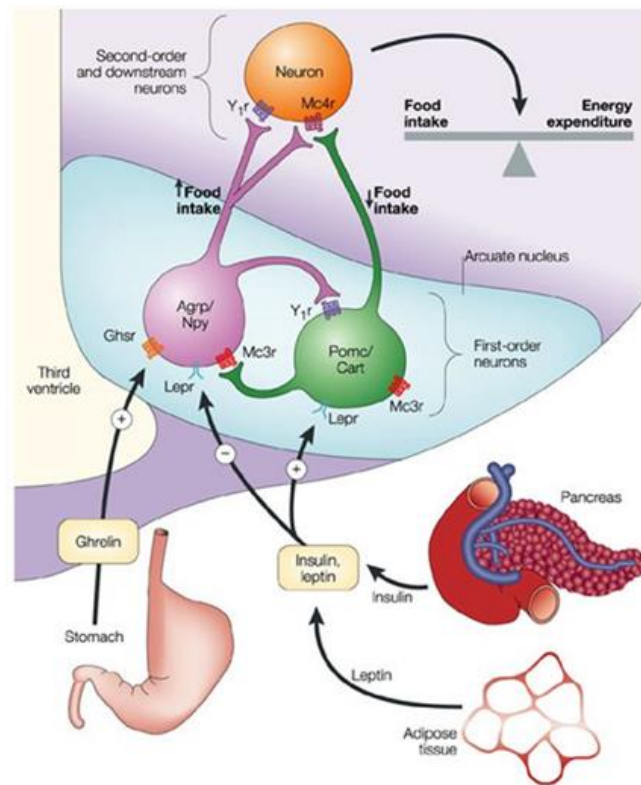


Figura 2. Las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART en el arcuato establecen de forma coordinada una compleja red de proyecciones neuronales intra- y extra-hipotalámicas. En la figura se representan los principales receptores de algunas de las numerosas hormonas y neurotransmisores que regulan este sistema. Ghsr, 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 de [13].

POMC es el precursor de, entre otros péptidos,  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -endorfinas, y de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) [23]. Se han descrito cinco tipos de receptores para los derivados de POMC (MCR1-MCR5), siendo MCR4 a través del cual  $\alpha$ -MSH ejerce principalmente su acción [24, 25]. Las neuronas POMC se activan en situaciones de suficiencia energética, disminuyendo la ingesta e



incrementando el gasto energético y la pérdida de peso [26-28]. Mutaciones inactivantes del neuropéptido POMC o del receptor MCR4 dan lugar a, entre otros, severos problemas de obesidad temprana [29-31]

CART, está considerado como el tercer transcrito más abundante en el hipotálamo. Además de su expresión en el núcleo ARC, también se ha descrito la expresión de CART en el DMN, LHA y PVN [32]. Estudios en modelos animales y farmacológicos han demostrado que CART es un péptido anorexigénico cuya expresión en el núcleo ARC disminuye en situaciones de ayuno [32, 33].

Las neuronas del núcleo arcuato responden a una amplia gama de hormonas y nutrientes, incluyendo leptina, insulina, ghrelina, esteroides gonadales y glucosa [34, 35]. La leptina es una hormona sintetizada en el tejido adiposo, cuyos niveles circulantes son directamente proporcionales a la cantidad de depósito de grasa. Altos niveles de leptina, que podrían indicar un exceso en las reservas energéticas, activan a las neuronas POMC/CART para inhibir la ingesta, y a su vez inhiben las neuronas NPY/AgRP. Por el contrario, la ghrelina, una hormona que es sintetizada en el estómago en situaciones de ayuno, activa las neuronas NPY/AgRP y por tanto estimula la ingesta. Estos mecanismos moleculares constituyen un sistema de regulación de los patrones de ingesta a largo y corto plazo [13, 36].

#### **1.1.1.2. VMN**

El VMN fue conocido clásicamente como el centro de saciedad del hipotálamo. Las neuronas del VMN activan las vías de señalización anorexigénicas en el ARC a través de proyecciones sinápticas excitatorias hacia las neuronas POMC e inhibitorias, en menor grado, hacia las neuronas NPY. Esta señalización está regulada por el estado nutricional del organismo ya que en condiciones de ayuno, las señales excitatorias hacia POMC disminuyen [37]. También ha sido descrito que las neuronas del VMN secretan el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y responden a otros péptidos como la oxitocina, todos ellos factores inhibidores de la ingesta [38, 39].

Sin embargo, las neuronas del VMN presentan multitud de receptores diferentes capaces de responder tanto a señales centrales como periféricas [40, 41], por lo que además de en la ingesta interviene en otras funciones. Un reciente estudio en el que se han empleado herramientas optogenéticas, ha mostrado que el VMN está implicado en funciones metabólicas tales como el

control autónomo de los niveles de glucosa en sangre y funciones comportamentales como el miedo y la agresividad [42]. Adicionalmente, evidencias experimentales recientes sugieren que neuronas del VMN que expresan AMPK (quinasa activada por AMP) juegan un papel fundamental en la regulación de la termogénesis por señales hormonales diversas, que incluyen desde las hormonas tiroideas hasta los estrógenos y el péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1) [43].

#### **1.1.1.3. PVN**

El PVN es una región del cerebro altamente conservada en la evolución. Lesiones en el PVN se han asociado con hiperfagia y obesidad como consecuencia de la disminución del gasto energético [44].

El PVN integra las señales procedentes de numerosas zonas del SNC, incluyendo el tronco cerebral, aunque la actividad de sus neuronas se encuentra modulada, fundamentalmente, por neuropéptidos procedentes del núcleo ARC. En este sentido, las neuronas POMC/CART que proyectan desde el núcleo ARC van a liberar  $\alpha$ -MSH en el PVN, lo que va a potenciar la liberación de GABA (neuropéptido inhibitorio) por parte de las interneuronas GABAérgicas que se encuentran en este núcleo reduciendo, a través de este mecanismo, la ingesta de alimentos. Por otro lado, las neuronas NPY/AgRP que proyectan desde el núcleo ARC van a liberar sus neuropéptidos en el PVN provocando una inhibición de esta señalización GABAérgica, actuando sobre segundos mensajeros y sobre el receptor MCR4, estimulando así la ingesta de alimentos [26, 45].

#### **1.1.1.4. DMN**

El DMN es considerado como un núcleo orexigénico, dado que lesiones en esta región del hipotálamo reducían la ingesta y el peso corporal [46]. El DMN presenta neuropéptidos reguladores de la ingesta como NPY y CART, y también expresan varios receptores, que incluyen MCR3, MCR4, Y1, Y5, receptores de leptina y receptores de colecistoquinina (CCK) [41, 47, 48].

La administración de leptina en el DMN en roedores incrementa la temperatura corporal y la presión sanguínea [49]. Por otra parte, mediante optogenética y electrofisiología se ha observado que las neuronas GABAérgicas

del DMN son reguladas por señales metabólicas como la leptina y la glucosa y una vez que son activadas promueven la ingesta mediante la inhibición de la transmisión sináptica al PVN donde se localizan las neuronas anorexigénicas [50].

#### **1.1.1.5. LHA**

El LHA es un área heterogénea donde confluyen distintos tipos neuronales, lo que permite a este núcleo responder a una gran variedad de señales y modular funciones cognitivas, motoras y endocrinas. Principalmente, en el LHA podemos distinguir dos poblaciones neuronales, las que expresan orexinas o hipocretinas y aquellas que expresan hormona concentradora de melanina (MCH) [51]. Estas neuronas, proyectan sus axones hacia diversos núcleos hipotalámicos como el ARC y el PVN, y extra-hipotalámicas, como el núcleo del tracto solitario (NTS) y el núcleo dorsal motor del vago.

Desde los años 40 hasta los 80, multitud de estudios han descrito cómo lesiones producidas en el LHA dan lugar a alteraciones en la ingesta y la sed. En todos estos estudios se ha observado la importancia del LHA como centro orexigénico en el control de la ingesta, ejerciendo su función a través del sistema de melanocortinas del ARC. Además de la regulación de la ingesta, el LHA está involucrado en otras funciones comportamentales, como el aprendizaje motivado por recompensa [52].

#### **1.1.2. Tronco cerebral**

El tronco cerebral es otra área importante del cerebro involucrada en el control de la ingesta de alimentos. Las señales gastrointestinales que se generan tras la ingesta, como CCK, GLP-1 y el péptido YY, liberadas por las células enteroendocrinas, se unen a sus receptores en los terminales nerviosos del nervio vago e inducen la activación neuronal en el tronco cerebral caudal. Se ha observado que la denervación vagal, ya sea quirúrgica o químicamente, da lugar a una disminución en el tamaño y la duración de las comidas [53]. Estas señales de ingesta de alimentos se envían al hipotálamo a través del NTS y de este modo, se induce la saciedad. Existen numerosas conexiones neuronales recíprocas entre el hipotálamo y el tronco cerebral, y la cantidad de alimento ingerido se determina en función de la información metabólica suministrada a ambas regiones del cerebro. Las poblaciones neuronales que constituyen esta región

son muy heterogéneas y expresan factores moduladores del apetito, como las catecolaminas producidas por neuronas que expresan tirosina hidroxilasa (TH), CART, GABA, NPY, BDNF y POMC entre otros. Estas neuronas, además, expresan una gran variedad de receptores tanto para los neuropéptidos mencionados, como para hormonas periféricas como la leptina, ghrelina, GLP1 y CCK [54, 55].

### **1.1.3. Cerebelo**

Los mecanismos exactos por los cuales el cerebelo regula la ingesta no se conocen bien; sin embargo, en numerosos estudios funcionales se ha observado que lesiones en el cerebelo producen alteraciones en los patrones de ingesta y disminución del peso corporal. Se ha demostrado que existen conexiones neuronales que conectan de forma directa o indirecta el cerebelo con centros de vital importancia para el control de la ingesta como el hipotálamo.

Además, en el cerebelo convergen multitud de señales periféricas, tanto nutricionales (niveles de glucosa) como hormonales (CCK), que son transferidas a las neuronas de los núcleos VMN y DMN y el LHA en el hipotálamo [56].

### **1.1.4. Hipocampo**

El hipocampo está implicado en procesos como la memoria y el aprendizaje y la regulación de la ingesta. Las neuronas del hipocampo presentan receptores para señales metabólicas periféricas como la insulina y la leptina, y son capaces de sintetizar BDNF [57]. Adicionalmente, se ha comprobado en modelos animales con deficiencias en la síntesis de BDNF, que este déficit produce hiperfagia y obesidad como consecuencia de un aumento de la frecuencia de ingesta [58].

### **1.1.5. Amígdala**

La amígdala es una compleja estructura implicada en la regulación de funciones tanto comportamentales como emocionales. En este sentido es importante tener en cuenta que las necesidades energéticas no sólo están determinadas por la ingesta, sino que también pueden estar influenciadas por los cambios emocionales del individuo. La amígdala está compuesta por una red

altamente interconectada de neuronas GABAérgicas que se clasifican en función de la expresión de diferentes marcadores moleculares, varios de los cuales están implicados en el miedo, la ansiedad y la supresión del apetito [59]. Se ha observado que, en la rata, lesiones en la amígdala, en concreto en la región posterodorsal, cursan con obesidad. Además un reciente estudio apunta que la señalización insulínica en la amígdala en ratón participa en funciones como el metabolismo de la glucosa, la termogénesis en el tejido adiposo pardo y la ansiedad [60].

## **1.2. Factores periféricos implicados en el control del balance energético**

### **1.2.1. Leptina**

Los efectos producidos por la leptina se observaron por primera vez en ratones mutantes obesos que surgieron de forma espontánea dentro de una colonia de los laboratorios Jackson [61]. Sin embargo, no fue hasta 1994 cuando se descubrió la leptina como el producto del gen Ob [62], y fue entonces cuando se abrió una nueva dimensión en el campo de la regulación del balance energético.

El tejido adiposo es considerado actualmente un tejido endocrino donde se sintetiza una gran variedad de moléculas que están involucradas en multitud de funciones tanto metabólicas (por ejemplo, metabolismo lipídico y de carbohidratos, apetito y termogénesis), como respuesta inmune, función reproductora, osteogénesis, condrogénesis, hematopoyesis, presión sanguínea y angiogénesis.

La leptina es un polipéptido no glicosilado de 146 aminoácidos (16kDa) que es sintetizado en el tejido adiposo. Las concentraciones plasmáticas de leptina son un reflejo del nivel de reservas energéticas del organismo de manera que, a mayor cantidad de tejido graso, mayor tamaño del adipocito y mayor contenido en triglicéridos y por consiguiente mayor cantidad de leptina circulante. No obstante, la leptina no solo se sintetiza en el tejido adiposo, sino que también es secretada por la placenta, las glándulas mamarias, la mucosa gástrica, el músculo esquelético o el cerebro entre otros tejidos [63-65]. Una vez secretada al torrente sanguíneo, la leptina puede aparecer libre, siendo la forma

biológicamente activa, o unida a proteínas, forma no activa y que impide su aclaramiento renal [66].

La leptina es además una hormona de carácter anorexigénico que llega al SNC a través de un sistema de transporte saturable y transmite la información a éste sobre el estado energético del organismo [35]. La falta de leptina o de su receptor, tanto en roedores como en humanos, causa un fenotipo caracterizado por hiperfagia, menor gasto energético y obesidad severa [67-69]. La mayoría de los pacientes obesos presentan un estado de resistencia a la leptina, que consiste en la incapacidad de la leptina de ejercer su acción anorexigénica a través de su receptor aun cuando los niveles de leptina circulantes sean muy altos, lo que impide el uso de la leptina como método terapéutico en la mayor parte de las formas clínicas de obesidad.

Existen múltiples isoformas de receptores de leptina (LR). Estructuralmente, el LR puede clasificarse como receptor de citoquinas clase I. Esta familia incluye receptores que presentan un solo dominio transmembrana y se caracterizan por la presencia de uno o más dominios de homología de receptor de citoquinas (CRH). Todos los receptores están desprovistos de actividad quinasa intrínseca y utilizan la ruta de señalización intracelular de las JAK quinazas.

Hasta ahora, se han identificado seis isoformas del LR, denominados de LRA a LRf. Todas estas isoformas, excepto la forma LRe, tienen un dominio extracelular y transmembrana idéntico, pero difieren en la longitud de su cola intracelular. LRb, o también conocido como LR de forma larga, es una isoforma altamente expresada en diferentes núcleos hipotalámicos y otras regiones del SNC involucradas en el control del balance energético [41, 70]. En el ARC, las neuronas POMC y AgRP son las dianas directas de la leptina [71, 72]. La ablación de LRb en neuronas POMC, neuronas AgRP, o ambas poblaciones de neuronas causa un aumento del peso corporal, enfatizando la importancia de la señalización de la leptina a nivel central [55].

La leptina ejerce su acción sobre ingesta al unirse al receptor LRb. La principal vía de acción es la JAK2/STAT3. Cuando la leptina se une a LRb, se activa JAK2, que a su vez, fosforila varios residuos de tirosina en el dominio intracelular de LRb y desencadena la ruta de señalización intracelular de la hormona. La activación de JAK2 resulta en la activación, dimerización y translocación nuclear de STAT3. En el núcleo, STAT3 estimula la expresión del gen *Pomc* e inhibe la expresión del gen *Agrp*. Por consiguiente, la deficiencia de

*Stat3* en las neuronas POMC resulta en sobrepeso [73]. Esta cascada de señalización está regulada negativamente por el supresor de la señalización de citoquinas 3 (SOCS3), cuya expresión también está regulada por STAT3 y la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) [74, 75].

Además, la leptina también puede actuar activando la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). La unión de la leptina a su receptor en este caso desencadena una cascada de señalización que termina con la fosforilación del factor de transcripción de la proteína O1 (FoxO1). Tras la fosforilación, FoxO1 se transloca del núcleo, permitiendo que STAT3 se una a los promotores de *Pomc* y *Agrp*, estimulando e inhibiendo así respectivamente la expresión de estos neuropéptidos. La señalización PI3K es contrarrestada por la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), que específicamente desfosforila PIP3. La pérdida de *Pten* en las neuronas POMC resulta en un aumento de la señalización de PIP3 y también un aumento de la tendencia a obesidad sensible a la dieta a través de la modulación del canal KATP, lo que sugiere un papel de la vía PI3K en la regulación de la actividad de este canal [74].

En general, la leptina estimula la transcripción de POMC, despolariza las neuronas de POMC, y también aumenta el procesamiento y la secreción de  $\alpha$ -MSH al tiempo que atenúa la expresión y liberación de los neuropéptidos orexigénicos, NPY y AgRP.

### **1.2.2. Insulina**

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos producida por las células  $\beta$ -pancreáticas en el páncreas. Clásicamente, la insulina se asoció principalmente con el metabolismo de la glucosa a nivel periférico. Sin embargo, numerosas evidencias acumuladas en las últimas décadas han documentado de forma convincente que la insulina también actúa como una señal anorexigénica dentro del SNC. Tras la ingesta de alimentos, el páncreas secreta insulina al torrente sanguíneo y ésta accede al SNC a través de la barrera hematoencefálica, de manera similar a la leptina, ejerciendo allí su efecto anorexigénico [76]. Además, los niveles de insulina en plasma se correlacionan positivamente con el peso corporal, en particular con la cantidad de tejido graso, y se ha observado que la administración intracerebroventricular (icv) o intrahipotalámica de insulina en roedores reduce la ingesta de alimentos [77].

El receptor de insulina (IR) se expresa en diversas áreas hipotalámicas involucradas en el control del apetito y se localiza en neuronas AgRP y POMC. Sorprendentemente, la pérdida de IR en las neuronas POMC o AgRP no conduce a alteraciones en el equilibrio energético, aunque se ha observado una disminución en la producción de glucosa hepática en ratones con ausencia de IR en las neuronas AgRP [55]. Los receptores de insulina pertenecen a la subfamilia de receptores tirosin-quinasa, que incluyen a los receptores de IGF-I (Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I) y los IR. Existen dos isoformas del IR, IR-A e IR-B. Los efectos metabólicos de la insulina están mediados por el IR-A [78]. Los receptores de insulina están constituidos por una glicoproteína tetramérica compuesta por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ , unidas entre sí por puentes disulfuro. Las subunidades  $\alpha$  se sitúan en la parte exterior de la membrana plasmática y contienen el sitio de unión a la insulina. Las subunidades  $\beta$  atraviesan la membrana y se caracterizan por poseer actividad tirosina-quinasa intrínseca, lo que confiere al IR un papel destacado como señalizador intracelular de la hormona [79].

La unión de la insulina a su receptor conduce a la autofosforilación de éste y a la catálisis de proteínas de la familia del sustrato del receptor de insulina (IRS), que finalmente convergen con la vía de la leptina a nivel de PI3K. Los reguladores negativos del LR, como SOCS3, también inhiben directamente el IR y su cascada de señalización actuando sobre el IRS1.

La activación de la vía de señalización IR resulta en una reducción de la expresión de NPY y un aumento de los niveles de POMC en el ARC, induciendo así un efecto anorexigénico.

### **1.2.3. Ghrelina**

La ghrelina es una hormona acilada de 28 aminoácidos, producida principalmente por el estómago [80]. Los niveles de ghrelina circulante se incrementan en condiciones de ayuno y se reducen después de las comidas. Se ha demostrado que la administración central y periférica de ghrelina en roedores promueve poderosamente la ingesta de alimento, la adiposidad y el aumento de peso corporal [81]. Asimismo, la ghrelina participa en multitud de funciones, entre las que se incluyen los procesos de recompensa, estado de ánimo, memoria, aprendizaje y respuesta al estrés, mientras que a nivel periférico



regula la motilidad gástrica, la homeostasis glucídica, respuesta inmune y cardiaca y osteogénesis [82].

La ghrelina ejerce su acción biológica sobre el equilibrio energético a través del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHSR). Este receptor se expresa en las neuronas AgRP/NPY del ARC, esenciales en la mediación de los efectos orexigénicos de la ghrelina, a la vez que inhibe a las neuronas POMC [55]. Existen dos isoformas del GHSR: GHS-R1a y GHS-R1b. El GHS-R1a está formado por 366 aminoácidos con 7 dominios transmembrana, presentando el extremo C-terminal intracelular y el N-terminal extracelular. El GHSR1b consta de 289 aminoácidos y 5 dominios transmembrana. El GHS-R1a se activa por los secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS), incluyendo la ghrelina, mientras que la función del GHS-R1b permanece en gran medida desconocida [83]. El efecto orexigénico de la ghrelina a nivel hipotalámico tiene lugar a través de la inhibición de la síntesis de ácidos grasos inducida por la activación de la AMP-quinasa (proteína quinasa activada por AMP o AMPK), que da lugar a un descenso de los niveles de malonil-CoA y a un aumento en la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) [84]. Este incremento de actividad se relaciona además con una supresión de radicales libres (especies reactivas de oxígeno -ROS) debido al aumento de la expresión de la proteína desacoplante mitocondrial UCP2 [85]. AMPK es un sensor energético que se activa en condiciones de insuficiencia energética, y que tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis energética del organismo [86]. Estos cambios en la respiración mitocondrial hipotalámica inducidos por ghrelina son claves para la activación de las neuronas NPY/AgRP.

Por otra parte, la señalización de la ghrelina a nivel central está implicada en la programación neonatal del metabolismo, de manera que en diversos estudios en los que se ha realizado una manipulación postnatal temprana con sobrealimentación de las crías, se produce una resistencia central a la ghrelina periférica durante periodos importantes del desarrollo hipotalámico, lo que puede contribuir a defectos metabólicos posteriores [87, 88].

#### **1.2.4. Colecistoquininica (CCK)**

La CCK es una hormona sintetizada por las células I del intestino delgado tras la ingesta de alimentos. Su administración sistémica suprime la ingesta de alimentos tanto en modelos animales como en humanos [89, 90]. La CCK lleva

a cabo su función a través de dos tipos de receptores, CCK1 y CCK2, que se expresan en el tronco encefálico y el hipotálamo. En este sentido, se ha observado que la señalización a través del MC4R en el tronco encefálico es necesaria para la supresión del apetito inducida por la CCK [91]. También se ha descrito que la ghrelina atenúa los efectos de la CCK sobre el apetito mientras que la leptina los potencia [92].

Por otra parte, la liberación CCK a la circulación sanguínea provoca una estimulación de la liberación de enzimas pancreáticas, la contracción de la vesícula biliar, un aumento de la motilidad intestinal y la inhibición del vaciamiento gástrico [93].

#### **1.2.5. Péptido YY (PYY)**

El PYY es un polipéptido de 36 aminoácidos que se sintetiza principalmente en el epitelio intestinal en respuesta a la ingestión de nutrientes, de tal forma que los niveles circulantes de PYY son proporcionales a la ingesta de calorías y se reducen en condiciones de ayuno [94].

En las células L del tracto gastrointestinal distal, se sintetizan y se secretan dos formas endógenas de este péptido, PYY<sub>1-36</sub> y PYY<sub>3-36</sub>. El PYY<sub>1-36</sub> ejerce sus acciones uniéndose a los receptores Y1, Y2, Y4 e Y5, mientras que PYY<sub>3-36</sub> tiene mayor afinidad por el receptor Y2, que se encuentra presente, sobre todo, a nivel del núcleo ARC, el hipocampo, el intestino y el nervio vago. La administración periférica de PYY<sub>3-36</sub> en rata inhibe la ingesta y reduce la ganancia de peso. Este efecto inhibitorio de la ingesta se ha observado en ratones silvestres (WT), pero no en aquellos con ausencia del Y2, por lo que este receptor parece ser totalmente necesario para mediar los efectos anorexigénicos de PYY [95].

Además de su efecto en ingesta, PYY<sub>3-36</sub> contribuye al vaciado gástrico y a la regulación de la glicemia derivada de la ingesta [93].

#### **1.2.6. Péptido similar al glucagón 1 (GLP1)**

El GLP1 es una hormona peptídica secretada por las células L del intestino. Los niveles de GLP1 circulante son altos tras la ingesta de alimentos y bajos en condiciones de ayuno. De hecho, GLP1 es secretado en respuesta a la ingesta de nutrientes y en particular en respuesta a comidas con alto

contenido en grasas y carbohidratos. Las funciones de GLP1 son retrasar el vaciado gástrico, estimular la secreción de insulina y generar una respuesta de saciedad en el SNC; acciones que en su conjunto son beneficiosas en individuos con obesidad y diabetes tipo 2, por lo que la utilización de co-agonistas del receptor de GLP1 en el tratamiento de estas enfermedades ha cobrado gran interés recientemente [96]. Asimismo, a nivel central, varios estudios han demostrado que la administración central de GLP1 o análogos de GLP1 inhibe la ingesta de alimentos en roedores [97, 98].

GLP1 actúa a través del receptor GLP1R, el cual se expresa en el tracto gastrointestinal, páncreas, hipotálamo y tronco encefálico [99].

A nivel central GLP-1 actúa como neurotransmisor. Este neuropéptido se produce en distintas poblaciones neuronales dentro del NTS e influye centralmente no sólo en la ingesta de alimentos, el peso corporal y la homeostasis de la glucosa a nivel del ARC, sino que también parece tener un impacto importante en el comportamiento hedónico de la ingesta, actuando directamente sobre el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens (NAc) [100]. De este modo, GLP-1 reduce el componente hedónico y, si se ofrece la posibilidad de elección de alimentos, reduce selectivamente la ingesta de alimentos con un alto contenido en grasas, al tiempo que aumenta la ingesta de alimentos con un bajo contenido en grasas [101]. Un reciente estudio refuerza el papel de GLP1 en el comportamiento hedónico de la ingesta, y apuntan a la señalización en el LHA como principal centro regulador [102].

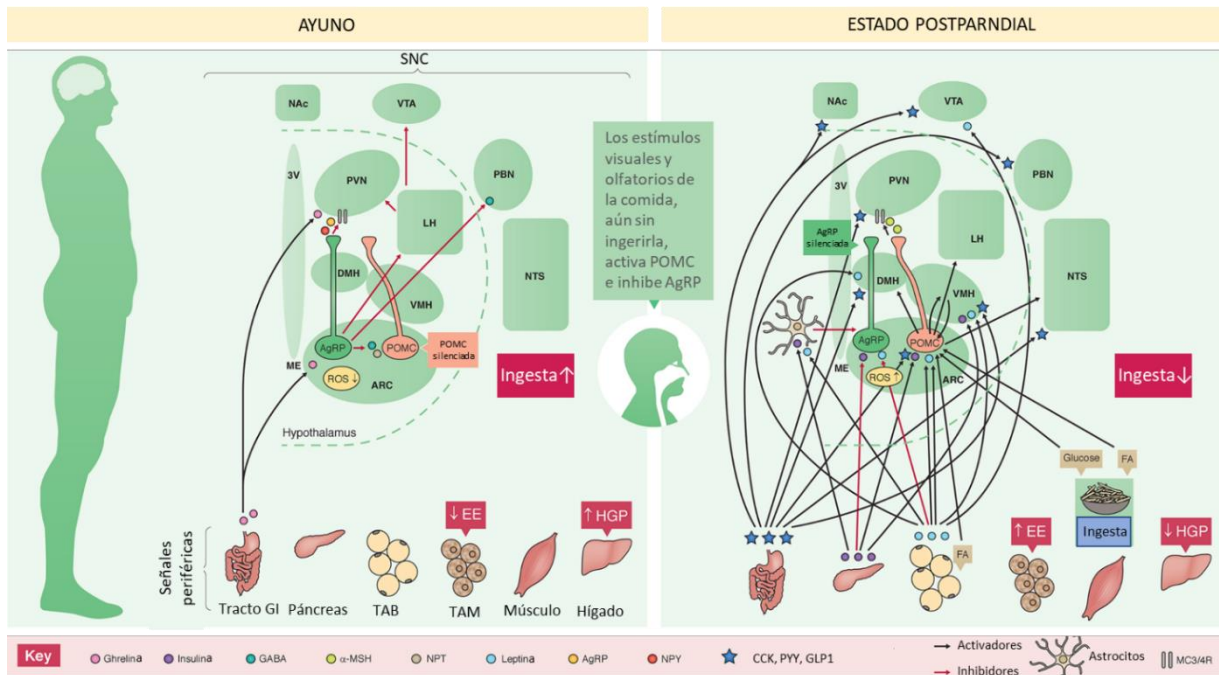


Figura 3. Esquema de los factores centrales y periféricos implicados en el control de la ingesta. Las neuronas POMC/CART (anoréxicas) y NPY/AgRP (orexigénicas) están reguladas por multitud de factores que dependiendo del estado metabólico del organismo las activan o inhiben conformando el comportamiento que regula la ingesta. Tomado y modificado de [103].

### 1.2.7. Esteroides Gonadales

Los esteroides gonadales, es decir, los estrógenos, los andrógenos y los progestágenos, que son producidos principalmente por las gónadas y en pequeñas cantidades por las glándulas suprarrenales y otros tejidos, tienen un papel fundamental en la función reproductora, pero además juegan un papel clave en el metabolismo energético. Gracias a su estructura hidrofóbica, las hormonas esteroideas pueden penetrar fácilmente a través de las membranas celulares e interactuar con sus receptores intracelulares específicos, ya sea en el citosol o en el núcleo de las células diana [8].

En roedores, se ha observado que estas hormonas pueden actuar sobre el peso corporal y la adiposidad, así como producir alteraciones en el gasto energético. También en humanos, las hormonas sexuales influyen en el equilibrio energético de manera evidente, en procesos como la variación de ingesta durante las diferentes fases del ciclo menstrual, el aumento de la ingesta

característico de las gestantes, o la acumulación de grasa tras la menarquia o la menopausia.

#### **1.2.7.1. Efectos de los estrógenos en el balance energético**

En los años 70, aparecieron los primeros estudios sobre el papel de los estrógenos en el metabolismo energético, en los cuales se utilizó una metodología clásica en endocrinología, como es la eliminación quirúrgica de los ovarios. La ovariectomía (OVX) en ratas adultas provoca un aumento de la ingesta y una disminución de la actividad física seguida de un incremento en el peso corporal y en la adiposidad [104]. Mientras que el incremento de la ingesta se mantiene generalmente durante un mes tras la OVX, el aumento de la adiposidad persiste indefinidamente. Sin embargo, tras la administración exógena de estrógenos, estos efectos desaparecen, y se consigue restablecer la cantidad de alimento normal y el número de ingestas [105].

Los efectos de los estrógenos se producen a través de su acción a nivel central y su interacción con señales orexigénicas y anorexigénicas periféricas [106]. En este sentido, las acciones de los estrógenos están esencialmente mediadas por dos dianas moleculares, los receptores de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y beta (ER $\beta$ ), que, aunque se expresan en la mayoría de los tipos de células en los mamíferos, son especialmente abundantes en el hipotálamo. El ER $\alpha$  se expresa en gran medida en núcleos hipotalámicos como el VMN, ARC, POA y PVN, mientras el ER $\beta$  se encuentra en los mismos núcleos hipotalámicos, pero su expresión es significativamente menor [107]. ER $\alpha$  es reconocido como un regulador clave de la homeostasis energética y del metabolismo de la glucosa y actúa como mediador de los efectos protectores de los estrógenos contra la obesidad y la diabetes tipo 2 [108].

En el hipotálamo, la acción de los estrógenos a través de ER $\alpha$  en las neuronas POMC del ARC suprime la ingesta de alimentos. De hecho, la eliminación de ER $\alpha$  en las neuronas POMC en ratones conduce a hiperfagia sin influir directamente en el gasto de energía o en la distribución del tejido adiposo. Pero por otro lado, las acciones de los estrógenos a través de ER $\alpha$  en las neuronas del VMN estimulan la actividad física y el gasto de energía y regulan la distribución de la grasa corporal [107]. De hecho, estudios recientes han documentado un papel esencial de la actividad AMPK en el VMN como mediador del efecto de los estrógenos sobre la activación de la termogénesis en el tejido

adiposo marrón [109]. Por otro lado, es bien conocido el dimorfismo sexual existente en cuanto a la distribución de grasa corporal, mientras que en el sexo masculino en general el porcentaje de grasa total es menor y el tejido adiposo se concentra en los depósitos viscerales, las hembras presentan un mayor porcentaje de grasa total que se distribuye en el tejido adiposo subcutáneo. Esto tiene un sentido evolutivo, ya que el embarazo y la lactancia suponen un enorme gasto energético para el sexo femenino, por lo que las reservas han de ser mayores.

#### **1.2.7.2. Efectos de los andrógenos en el balance energético**

Los andrógenos, en concreto la testosterona (T), ejercen un papel importante en la regulación de la homeostasis energética, debido a su efecto orexigénico.

La testosterona es una hormona que juega un papel fundamental en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas y, además, tiene una gran influencia en la acumulación de grasa corporal y de masa muscular en el sexo masculino. La ausencia de testosterona está asociada con un incremento de la adiposidad y una reducción de la sensibilidad a insulina, alteraciones a la tolerancia a glucosa, y elevados niveles de triglicéridos y colesterol. Todos estos factores son comunes en enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico [110].

En situaciones de déficit de T, como es el caso del hipogonadismo hipogonadotropo, se ha observado que los bajos niveles de T afectan a la función sexual, así como a otros parámetros metabólicos, como la masa muscular, la masa grasa, la composición corporal y la densidad y la fuerza ósea afectando a la calidad de vida del individuo. Estudios clínicos han probado que terapias de reemplazamiento con testosterona a largo plazo en pacientes con diabetes tipo 2 inducen mejoras significativas y sostenidas del control glucémico con reducciones paralelas en el peso corporal y reducción de la grasa corporal [111].

En la mujer, el síndrome de ovario poliquístico (del inglés polycystic ovarian syndrome, PCOS) es un trastorno endocrino muy común que se caracteriza por anovulación crónica, ovario poliquístico e hiperandrogenismo. El exceso de andrógenos se debe principalmente a la elevada producción de éstos en el ovario y en las glándulas adrenales debido a alteraciones en P450c17, enzima clave en la síntesis de andrógenos durante la esteroidogénesis

[112]. Además, el hiperandrogenismo característico de PCOS puede cursar con resistencia a insulina, obesidad, dislipemia, diabetes de tipo 2 y alteraciones cardiovasculares [113, 114]. Por otra parte, se ha sugerido que la leptina contribuye al estado de resistencia a la insulina y al hiper-androgenismo observado en la mayoría de las pacientes con PCOS, aunque la contribución patógena de la leptina por sí sola a la consolidación del PCOS aún no ha sido dilucidada [115].

### **1.2.7.3. Efectos de los progestágenos en el balance energético**

La progesterona también regula la homeostasis energética; de hecho, tiene un papel importante durante la gestación, cuando los niveles de progesterona aumentan progresivamente y provocan un aumento de la ingesta y del tejido adiposo [116].

En este sentido, la progesterona actúa a través de los receptores nucleares PR $\alpha$  y PR $\beta$ , que se ha observado que se encuentran en los núcleos hipotalámicos que regulan la ingesta [117]. Así, la administración de progesterona en ratas ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol aumenta la ingesta, el peso corporal y la adiposidad [118].

Por otra parte, el tratamiento con progesterona inhibe el efecto de los niveles circulantes de leptina, independientemente de los niveles de depósitos grasos del individuo. Estudios en ratas pseudogestantes con administración crónica de progesterona, muestran una supresión del efecto anorexigénico de la leptina y por tanto un aumento de la ingesta. También, estos estudios muestran una disminución de la expresión del receptor de leptina en el ARC y VMN, así como una disminución de los receptores de prolactina en ARC [116].

## **2. Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG)**

La reproducción es imprescindible para la supervivencia de las especies y, dada su importancia, está regulada por un complejo sistema neuro-hormonal. que en mamíferos se denomina eje hipotálamo-hipofiso-gonadal (HHG) o eje neuroendocrino de la reproducción. Este eje se organiza en torno a tres componentes fundamentales y sus señales reguladoras correspondientes: 1) las neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo; 2) las gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona

foliculo estimulante (FSH) en la hipófisis; y por último 3) los esteroides sexuales y diferentes péptidos sintetizados en las gónadas, testículo en los machos y ovarios en las hembras [119]. Estos elementos están conectados mediante circuitos de retroalimentación positivos y negativos que regulan el eje de forma dinámica durante toda la vida del individuo (**Figura 4**).

Además, la reproducción está totalmente supeditada al nivel de reservas energéticas del organismo, de manera que la puesta en marcha de la función reproductora y su mantenimiento en la etapa adulta pueden verse suprimidas en condiciones de déficit energético como es el caso de la anorexia nerviosa, o en condiciones de persistente exceso energético, como por ejemplo en el caso de la obesidad mórbida. En este sentido, el eje HHG está modulado por numerosos factores endógenos, por ejemplo hormonas metabólicas como la leptina, la insulina o la ghrelina, y factores exógenos, como por ejemplo la nutrición y los ritmos de luz/oscuridad [120]. Todo esto contribuye también a un control más preciso del eje y por tanto de la función reproductora.

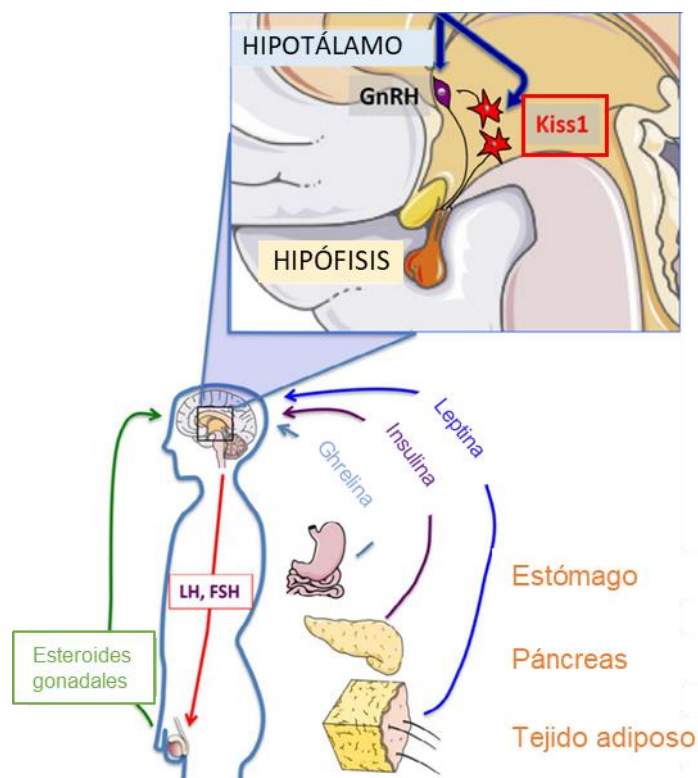


Figura 4. Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG). El eje HHG está regulado por señales centrales y periféricas que regulan su correcto funcionamiento. Tomado y modificado de [121].



## **2.1. GnRH**

En la organización jerárquica del eje HHG, las neuronas GnRH se consideran un elemento clave como integradores finales (directos o indirectos) de diferentes señales reguladoras centrales y periféricas, y la principal vía de señalización a nivel central hacia el resto de componentes de este eje [119, 120].

En los 70, se identificó la secuencia aminoacídica del GnRH, (pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, en el hipotálamo porcino [122]. Este decapeptido es sintetizado por las neuronas GnRH, producto del gen GnRH-I, en el hipotálamo y estimula la secreción de LH y FSH en un gran número de especies de mamíferos, incluyendo roedores, chimpancés y humanos [123].

Las neuronas GnRH se originan en la placoda olfativa medial y migran hacia el hipotálamo durante el período gestacional. La ubicación de las neuronas GnRH hipotalámicas depende de la especie. En roedores, las neuronas GnRH hipotalámicas se encuentran en el área rostral, incluyendo el área preóptica media, la banda diagonal de Broca, las áreas septales y el hipotálamo anterior. En humanos y primates no humanos, una gran parte de las neuronas GnRH hipotalámicas están localizadas en la parte dorsal del hipotálamo medio basal (MBH), el infundíbulo y la región periventricular [124]. Estas neuronas proyectan sus axones hacia la eminencia media, donde se libera GnRH hacia la circulación portal, que permite su transporte hacia la hipófisis anterior, en concreto a la adenohipófisis. A continuación, GnRH actúa a través de su receptor, GnRH-R, en las células gonadotropas de la adenohipófisis estimulando la secreción de FSH y LH, las cuales van a regular la función gonadal. A su vez, las neuronas GnRH integran la información de los circuitos de retroalimentación positiva o negativa ejercidos por los esteroides gonadales, y de esta manera regulan el funcionamiento del eje [125].

### **2.1.1. Secreción de GnRH y pubertad**

Se han descrito dos tipos de secreción de GnRH: secreción pulsátil y secreción en oleada (representado por el pico preovulatorio). Por un lado, tiene lugar la secreción pulsátil, donde hay distintos pulsos de secreción de GnRH hacia la circulación portal, con concentraciones indetectables de GnRH durante los intervalos entre pulsos; y por otro lado se produce una secreción en forma pico masivo (en oleada), que ocurre en el sexo femenino durante la fase preovulatoria, y se caracteriza por la presencia de una concentración

persistentemente elevada de GnRH en la circulación portal. De hecho, el inicio de la pubertad está impulsado por el aumento de la actividad neurosecretora de las neuronas GnRH que se traduce en un aumento de la secreción pulsátil de LH, que conduce a la generación inicial de mini-picos de LH, que finalmente conducen al denominado pico preovulatorio [126]. Además, la frecuencia en los pulsos de GnRH influye en el ratio de secreción LH/FSH, de manera que si la frecuencia de los pulsos es baja, se incrementa la secreción de FSH y disminuye la de LH [127].

Aunque en todos los mamíferos se produce un aumento de LH previo a la ovulación, los mecanismos subyacentes a la generación de este pulso presentan diferencias entre especies. En roedores hembras, los niveles hipotalámicos de GnRH aumentan durante el periodo neonatal, y permanece constante durante la primera etapa del periodo infantil para volver a aumentar posteriormente en el periodo juvenil y alcanzar un máximo durante el periodo prepuberal. Además, el pico de LH depende de los ritmos circadianos y de los niveles de estradiol circulantes dependiendo de la fase del ciclo. Sin embargo, en los machos, el contenido de GnRH no llega a su punto máximo durante la pubertad, sino que continúa aumentando durante la edad adulta. En humanos y primates no humanos, la secreción de GnRH se mantiene en niveles muy bajos durante la etapa infantil y juvenil, y se incrementa esta secreción pulsátil durante la pubertad [125, 128].

La activación puberal debido a los patrones de pulsatilidad de GnRH requiere tanto de un aumento de las señales excitatorias de las neuronas GnRH, como de una disminución de las señales aferentes inhibitorias. Sin embargo, la importancia relativa de las entradas inhibitorias frente a las excitadoras, y cómo interactúan realmente para definir el momento preciso de la pubertad, sigue siendo una cuestión abierta. Estas señales reguladoras, pueden ser trans-sinápticas o gliales, y son esenciales para que se generen los pulsos de GnRH [129].

Cabe destacar el papel de las neuronas Kiss1 como principales reguladores de la actividad de las neuronas GnRH. Por su importancia para el desarrollo de esta Tesis, los detalles del sistema Kiss1 serán desarrollado en la sección 4. Sistema Kiss1 / kisspeptinas / Gpr54 de esta Introducción.

Por otra parte, muchos trastornos reproductivos están asociados con la alteración de las vías de señalización de GnRH, FSH y/o LH. Un ejemplo es el PCOS, en el cual se han observado que los pulsos de GnRH se producen de

manera acelerada y constante dando lugar a un aumento en la secreción pulsátil de LH y de la ratio LH/FSH circulantes que, como consecuencia final, da lugar a una producción excesiva de andrógenos en el ovario y a la disfuncionalidad de este. El caso contrario ocurre en la amenorrea hipotalámica, donde los pulsos de GnRH se producen a baja frecuencia y dan lugar a niveles anormales de gonadotropinas. Estos ejemplos destacan la importancia del buen funcionamiento del eje HHG y del control diferencial de la secreción de FSH y LH para la normalidad de la función reproductora [130, 131].

### **2.1.2. GnRH y control metabólico de la reproducción**

La posición central de las neuronas GnRH en el cerebro reproductivo hace que éstas sean consideradas elementos clave para transmitir información metabólica a los elementos posteriores del eje HHG, ya que estas neuronas son el último elemento a nivel central en el control del eje y además envían múltiples proyecciones al organum vasculosum de la lámina terminalis y la eminencia media donde la permeabilidad de la barrera hematoencefálica es muy alta y son capaces de detectar señales periféricas metabólicas y nutricionales. Por otra parte, se han observado modificaciones en los patrones de expresión de ARNm y en la secreción de GnRH debido a cambios en el nivel de reservas energéticas en situaciones de estrés metabólico [132].

La leptina estimula el eje HHG a través de un incremento de la expresión de GnRH en el hipotálamo y estimulando la pulsatilidad de LH. Niveles anormalmente bajos de leptina se han asociado con hipogonadismo hipogonadotropo y problemas de fertilidad tanto en roedores como en humanos. Aunque las neuronas GnRH poseen receptores para otras señales periféricas metabólicas, como la insulina, no parece que este sea el caso de los receptores para leptina. De hecho, procedimientos experimentales en los cuales se elimina selectivamente estos receptores en neuronas GnRH demuestran que esta manipulación no tiene un impacto sobre la llegada de la pubertad y la fertilidad [133]. Sin embargo, si eliminamos la señalización de estas hormonas por completo a nivel central (por ej., eliminación neuronal de receptores de leptina o insulina), se producen alteraciones graves en la función reproductora e infertilidad [134]. Esto nos permite concluir, que aun cuando estas señales de suficiencia energética son necesarias para activar el eje reproductor, su acción no está mediada directamente por las neuronas GnRH [76]. En este sentido, se ha propuesto a las neuronas Kiss1 como posibles intermediarias en la

integración de los efectos de la leptina sobre GnRH y la puesta en marcha de la función reproductora. Estudios funcionales y virogenéticos muestran que los efectos permisivos de la leptina sobre la llegada de la pubertad podrían estar mediados por la interacción  $\alpha$ -MSH- Kisspetinas- GnRH [135]. Por otro lado, numerosos estudios sugieren efectos de la leptina en otras poblaciones neuronal, por ejemplo en las neuronas del núcleo premamilar ventral (PVM) donde se ha observado que lesiones en éste núcleo impiden la secreción de LH estimulada por leptina en ayuno [136]. Otro ejemplo es la señalización de leptina a través de neuronas GABAérgicas, dónde la eliminación del receptor de leptina en éstas neuronas provoca retraso o ausencia de la llegada de la pubertad, al menos en parte, a través de los efectos moduladores sobre las neuronas Kiss1 [137].

En cuanto a señales de insuficiencia energética, se ha observado que la ghrelina tiene un efecto inhibitorio a diferentes niveles del eje reproductor. En todo caso, aunque se ha demostrado la expresión de ARNm del receptor de Ghrelina en diferentes áreas del cerebro, su expresión en las neuronas GnRH se desconoce hasta el momento. No obstante, la administración crónica de ghrelina a ratas peripuberales inhibe la liberación de gonadotropinas e imita el retraso en el inicio de la pubertad producido por situaciones de déficit energético, como la desnutrición crónica; condiciones en las que se espera que los niveles de ghrelina endógena sean elevados [138]. Además, se ha observado en ratas cómo el efecto inhibitorio de la ghrelina sobre la secreción pulsátil de GnRH es bloqueado por un antagonista del receptor de NPY, Y5 [139]. Esto sugiere que el efecto de la ghrelina sobre las neuronas GnRH puede estar mediado por neuronas aferentes como NPY.

Por tanto, todas estas evidencias indican que, aunque parece ser que las señales metabólicas periféricas no tienen un efecto directo sobre GnRH, sí modulan sus efectos resaltando el importante papel de estas neuronas en la integración del balance energético y la función reproductora.

## **2.2. Gonadotropinas: LH y FSH**

Las gonadotropinas, son sintetizadas en la hipófisis. La hipófisis, o glándula pituitaria, se halla alojada en una concavidad del hueso esfenoides en la base del cerebro. Está dividida en zonas bien diferenciadas: la anterior o adenohipófisis, la pars intermedia y la posterior o neurohipófisis.

La neurohipófisis, está constituida por el lóbulo neural (pars nervosa), el tallo pituitario y la eminencia media. El tallo neural está compuesto por los axones provenientes de los núcleos SON y PVN en el hipotálamo y que terminan por ramificarse en numerosas dendritas en el lóbulo neural, una zona rica en vasculatura y células gliales. Estos terminales nerviosos almacenan y secretan principalmente vasopresina y oxitocina.

La adenohipófisis está constituida por el lóbulo anterior (pars distalis), el lóbulo intermedio (pars intermedia) y la pars tuberalis [8]. El lóbulo anterior está compuesto por varios tipos celulares secretores de hormonas y está conectado con la eminencia media a través del sistema porta hipofisiario. A través de este sistema vascular, las células de la adenohipófisis reciben los factores estimuladores e inhibidores secretados por el hipotálamo, que controlan de manera precisa la actividad secretora de las células adenohipofisarias. Entre las hormonas secretadas por la adenohipófisis encontramos: la hormona estimulante de tiroides (TSH, tirotropina); la ACTH; la prolactina; la hormona del crecimiento (GH, somatotropina) y las gonadotropinas (LH y FSH). Por otra parte, las células del lóbulo intermedio sintetizan hormonas derivadas de POMC, entre ellas la  $\beta$  endorfina, péptido opioide; y las melanotropinas  $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -MSH [8].

Las gonadotropinas, LH y FSH, junto con la gonadotropina coriónica humana (hCG), pertenecen a la familia de hormonas glicoprotéicas y poseen una estructura peptídica similar. Las hormonas LH y FSH son producidas por las células gonadotropas de la adenohipófisis; mientras que la hCG se sintetiza en la placenta. Los miembros de esta familia de proteínas poseen una subunidad  $\alpha$  común, unida mediante enlaces no-covalentes a una subunidad  $\beta$  específica. La subunidad  $\alpha$  está codificada por un solo gen que da lugar a una estructura formada por 92 aminoácidos, dispuestos en 4 exones, mientras que la subunidad  $\beta$  es la que confiere la funcionalidad específica a la hormona [140]. En humanos, las subunidades  $\beta$  poseen entre 118 y 145 aminoácidos; mientras que en roedores las gonadotropinas presentan características estructurales similares a las humanas, aunque no hay producción de hCG.

Las gonadotropinas ejercen su función a través de sus receptores específicos, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR). Tanto LH como hCG comparten el mismo receptor (receptor LH/hCG, o LH-R), mientras que FSH posee un receptor propio (FSH-R). Estos

receptores están localizados principalmente en la gónadas, donde tanto LH como FSH van a desempeñar sus acciones biológicas [141].

El LH-R se expresa en las células de la teca que recubren el folículo en desarrollo en el ovario, donde la LH induce la producción de andrógenos aromatizables, que posteriormente se convierten en estrógenos en la capa celular de la granulosa. En el testículo, LH-R se expresa en las células de Leydig donde estimula la secreción de andrógenos, principalmente T, y estimula así las espermatogénesis y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios [142].

El FSH-R se expresa en células de la granulosa en el ovario y en células de Sertoli en los túbulos seminíferos en el testículo. En el ovario, la FSH estimula la maduración de los folículos y la síntesis de estrógenos y progesterona por las células de la granulosa. En el testículo, la activación del receptor de FSH estimula el crecimiento y la proliferación prepuberal de las células de Sertoli en primer lugar, determinando así el tamaño de los testículos y la cantidad de espermatogénesis. Además, en las etapas adultas, la FSH actúa como un factor de supervivencia anti-apoptótico para las espermatogonias, espermátocitos y espermátidas, y apoya la meiosis y espermiogénesis [142, 143].

El estudio de mutaciones en los receptores de gonadotropinas ha ayudado a comprender mejor la función de estos receptores. Las que presentan más graves consecuencias fenotípicas son aquellas que afectan al LH-R. Mutaciones inactivantes del LH-R en hombres cursan, dependiendo del grado de inactivación del receptor, con fenotipos que van desde la falta completa de masculinización, pudiendo presentar incluso genitales externos femeninos, hasta una hipo-masculinización leve, presentando micropene. Por el contrario, mutaciones activantes del receptor de LH provocan pubertad precoz asociada a un aumento de testosterona. En el caso de mujeres con inactivación del LH-R, aparece un fenotipo más leve, con desarrollo normal de los caracteres sexuales secundarios asociados a la maduración puberal, amenorrea primaria o secundaria y bajos niveles de estrógenos, mientras que las mutaciones activantes no parecen tener efectos detectables, tal vez debido a que la maduración del ovario requiere de niveles normalizados de FSH, además de LH [144].

### **2.3. Esteroides gonadales**

Los esteroides gonadales, testosterona, estradiol y progesterona, son sintetizados en las gónadas, y ejercen un papel clave en la autorregulación del eje HHG. De este modo, la testosterona producida en el testículo ejerce una retroalimentación negativa sobre las neuronas GnRH y por ende en la secreción de gonadotropinas, mientras que el estradiol y la progesterona sintetizados en el ovario generan circuitos de retroalimentación negativos y positivos, estos últimos involucrados en la secreción del pico de LH, dependiendo de la fase del ciclo ovárico.

Las hormonas esteroideas, como son los esteroides gonadales, tienen un precursor común, el colesterol. El proceso por el cual se sintetizan estas hormonas se denomina esteroidogénesis. Durante la esteroidogénesis, el colesterol da lugar a diferentes hormonas, que son sintetizadas tanto en las gónadas como en las glándulas suprarrenales [145]. Existen tres fuentes de las que se puede derivar el colesterol para su uso como precursor de esteroides: la síntesis de novo a partir de acetato en la célula, la hidrólisis a partir de ésteres de colesterol que se almacenan en pequeñas gotas lipídicas intracelulares, y la absorción de colesterol a partir de lipoproteínas plasmáticas [146].

En el testículo, la esteroidogénesis se lleva a cabo en las células de Leydig dando como producto principal la T y la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona [145]. En el ovario, este proceso tiene lugar en células de teca, donde se sintetizan andrógenos, principalmente androstenediona; en las células de la granulosa donde se aromatizan los andrógenos a estrógenos; y en las células lúteas donde se sintetizan progesterona y estrógenos [147].

#### **2.3.1. Gónadas**

Las gónadas, testículos y ovarios, desempeñan una doble función: producir y liberar gametos maduros a partir de células germinales (gametogénesis) y sintetizar y secretar hormonas de naturaleza esteroidea y proteica (hormonogénesis).

##### **2.3.1.1. Testículos**

Los testículos son órganos pares y ovalados cuyas funciones principales son la espermatogénesis y la producción de hormonas sexuales masculinas,

principalmente andrógenos. Ambas funciones se realizan en compartimentos diferentes; mientras que la espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos (compartimento tubular), la esteroidogénesis tiene lugar en el espacio intersticial (compartimento intersticial). Como se ha indicado en epígrafes previos, la función de los testículos y de sus compartimentos depende de la regulación neuroendocrina por parte del hipotálamo y la hipófisis.

El compartimento tubular está constituido por los túbulos seminíferos compuestos fundamentalmente por las células germinales y las células de Sertoli [8], que conforman el epitelio seminífero, con los elementos integrados en la espermatogénesis. Las espermatogonias son células germinales inmaduras que se encuentran en el perímetro de los túbulos seminíferos [5, 148]. Durante la pubertad y en adelante, las espermatogonias experimentan cambios madurativos que conducen a la generación de espermátocitos primarios, los cuales se dividen por meiosis para dar lugar a los espermátocitos secundarios y, tras una segunda división meiótica, a las espermátidas. Las espermátidas maduran hasta formar finalmente los espermatozoides que salen a la luz del túbulo.

En el compartimento intersticial se encuentran varios tipos celulares, como células de Leydig, macrófagos, linfocitos, células fibroblásticas del estroma y células endoteliales. El principal tipo celular presente en este compartimento es la célula de Leydig, cuya función principal es la síntesis de T, proceso estimulado por la LH [149]. La T secretada por estas células tiene una acción paracrina indispensable para que se lleve a cabo la espermatogénesis, y una acción exocrina, liberando T al torrente sanguíneo alcanzando el hipotálamo y la hipófisis, y regulando el eje HHG.

### **2.3.1.2. Ovarios**

Los ovarios son los encargados de producir los gametos femeninos (oogénesis), y sintetizar y secretar las hormonas esteroideas y proteicas sexuales.

La oogénesis es el proceso por el cuál un oocito inmaduro da lugar a un óvulo maduro (**Figura 5**). Durante el desarrollo embrionario temprano, las células germinales primordiales migran hacia la superficie externa del ovario, dando lugar al epitelio germinal [5]. Las células germinales dan lugar a las oogonias, los cuales se organizan en folículos en diferentes estadios. En el



primer grado de desarrollo se encuentra el folículo primordial, que está constituido por un oocito primario rodeado de una monocapa de células de la granulosa. Mediante sucesivas divisiones de las células de la granulosa, se forma un folículo primario, donde además comienza a acumularse polisacáridos entre el oocito y las células de la granulosa. El siguiente estadio es el folículo secundario, en el cual aparece una capa de células de origen mesodérmico que constituyen la teca interna. Las células de la granulosa en este punto inician la producción de estrógenos, principalmente el  $17\beta$ -estradiol. A continuación, el folículo terciario o antral muestra un gran desarrollo de las células de la teca formando una capa externa, y aparece el antro folicular. Finalmente, el folículo terciario se transforma en el folículo preovulatorio o folículo de Graaf, donde las células de la granulosa más cercanas al oocito dan lugar a la corona radiada que saldrán del folículo al exterior del ovario junto con el oocito secundario en la ovulación [150]. Tras la ovulación las células foliculares dan lugar al cuerpo lúteo que secreta estrógenos y progesterona, encargada de la regulación del ciclo, del crecimiento del endometrio en el útero y del mantenimiento del embarazo [147].

La LH y FSH secretadas por la hipófisis son las principales hormonas encargadas de regular el ciclo ovárico favoreciendo la maduración de los folículos y estimulando la síntesis de estrógenos y progesterona.

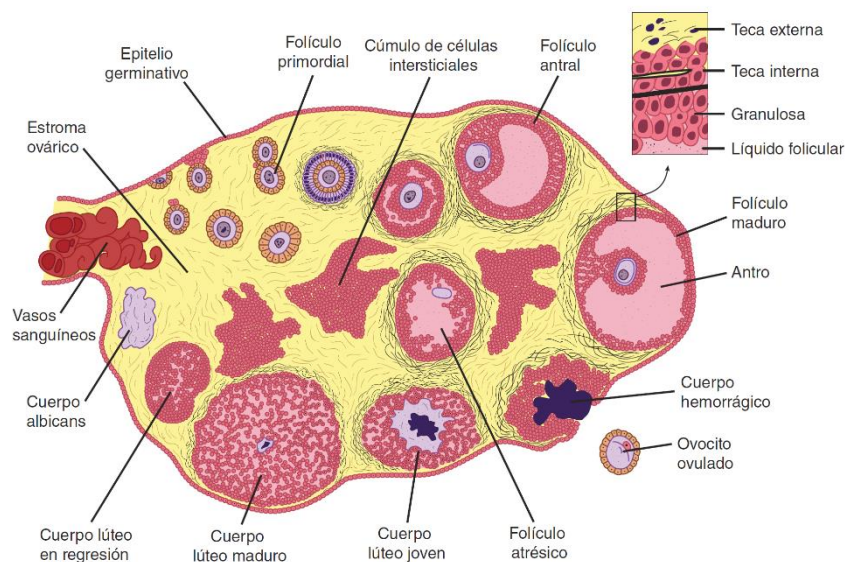


Figura 5. Representación esquemática del ciclo ovárico. Tomada de [8].

El ciclo ovárico se repite mensualmente cada 28 días en la mujer en edad fértil, mientras que en roedores el ciclo dura entre 4-5 días, distinguiéndose cuatro fases diferenciadas en base a los cambios en la citología vaginal: proestro, estro, diestro 1 y diestro 2. En la fase de estro se produce la ovulación. La corta duración del ciclo estral en los roedores hace de estos un modelo animal ideal para investigar los cambios que ocurren durante el ciclo reproductivo [151].

### **3. Control metabólico de la reproducción**

La función reproductora supone un alto coste energético para los individuos, de manera que en situaciones en las que se puede ver comprometida la supervivencia del individuo, como por ejemplo en situaciones de déficit energético, el organismo tiene que establecer prioridades en cuanto al uso de las reservas energéticas, siendo la reproducción una función prescindible.

Existe por tanto, una estrecha relación entre balance energético y control de la reproducción. En este sentido, y en líneas generales, podemos afirmar que las señales de suficiencia energética (anorexigénicas) tienden a favorecer la puesta en marcha de la función reproductora y su mantenimiento en la etapa adulta a través de la estimulación de GnRH y la consecuente liberación de gonadotropinas, mientras que las señales de insuficiencia energética (orexigénicas) tienden a inhibir el eje HHG, y por tanto impiden que la función reproductora se lleve a cabo.

En las últimas décadas, en los países desarrollados, se ha producido un considerable aumento en la prevalencia de enfermedades metabólicas como la obesidad, la anorexia o el síndrome metabólico, que además está estrechamente relacionada con un aumento de problemas reproductivos y de fertilidad, siendo por tanto fundamental el estudio de los mecanismos implicados en el control metabólico de la reproducción.

### **3.1. Factores centrales implicados en el control metabólico de la reproducción**

#### **3.1.1. POMC**

Las neuronas POMC se encuentran divididas en dos subpoblaciones a nivel central. La principal se encuentra en el núcleo ARC, donde tienen un papel fundamental en el control de la homeostasis energética, el peso corporal y la ingesta. El segundo grupo de neuronas POMC se encuentra en el NTS, y participa en la regulación de la ingesta, aunque su función en la homeostasis energética no parece tener un impacto tan relevante como el de la población del ARC. Las neuronas POMC del ARC sintetizan diferentes neuropéptidos, como  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -endorfinas, CART y neurotransmisores como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y glutamato. Además, estas neuronas expresan una amplia variedad de receptores como el de leptina, insulina, Y1 y el receptor de las kisspeptinas, Gpr54 [152]. Estas características de las neuronas POMC les confieren la capacidad de responder a señales metabólicas, tanto periféricas como centrales y, por su posición en el hipotálamo, estimular a otras neuronas.

En este sentido, se ha observado que las proyecciones de las neuronas POMC establecen conexiones sinápticas con el soma y los terminales nerviosos de las neuronas GnRH, lo que sugiere una acción directa de los neuropéptidos derivados de POMC sobre la excitabilidad de GnRH [153]. En concreto,  $\alpha$ -MSH, una señal de suficiencia energética, tiene un potente papel activador de las neuronas GnRH a través de la activación postsináptica de los receptores MCR3 y MCR4. Además, estudios farmacológicos muestran que  $\alpha$ -MSH produce un incremento en la secreción de LH, y que favorece la receptividad sexual y el comportamiento de lordosis en ratas hembras. Por el contrario, la  $\beta$ -endorfina, aun cuando también deriva de POMC, tiene funciones opuestas a  $\alpha$ -MSH, y actúa como señal de insuficiencia energética [132] e inhibe la activación de GnRH.

Por otra parte, las neuronas POMC actúan como mediadores de los efectos estimuladores de la leptina sobre el eje HHG, dado que la infusión de leptina en el POA y la eminencia media provoca un incremento en la secreción de  $\alpha$ -MSH seguido de una secreción de LH por estimulación de GnRH [154].

### **3.1.2. NPY/AgRP**

Las neuronas NPY/AgRP se encuentran en el ARC y tienen un importante papel en el control de la ingesta y el metabolismo energético, siendo señales de carácter orexigénico. Ambos neuropéptidos responden de manera similar a las fluctuaciones energéticas del organismo, incrementando su expresión en condiciones de ayuno [152].

Las neuronas NPY/AgRP proyectan sus axones hacia las neuronas GnRH y hacia sus terminales nerviosos. Mediante electrofisiología se ha comprobado que NPY y AgRP inducen en roedores tanto estímulos excitatorios como inhibitorios sobre la actividad de GnRH, en el caso de NPY a través de los receptores Y1 (excitatorios) e Y4 (inhibitorios) [153].

El papel inhibitorio de NPY sobre la secreción de LH parece ser relevante en situaciones de estrés metabólico. Por ejemplo, la restricción calórica aumenta la expresión de NPY y reduce la secreción de LH en rata. También se ha observado que aunque la ablación total de NPY no produce alteraciones reproductivas severas, sí evita la reducción de los niveles de LH durante el ayuno [155]. Sin embargo, también se ha documentado el efecto contrario, siendo NPY estimulante de la secreción pulsátil y basal de LH en varias especies, dependiendo de los niveles de estrógenos circulantes [156].

### **3.1.3. KISS1**

Las kisspeptinas y su receptor, Gpr54, son indispensables para la reproducción y la fertilidad en mamíferos. Las neuronas Kiss1 son reguladores clave del eje HHG mediante su papel estimulador de las neuronas GnRH, proyectando sus axones hacia GnRH para dirigir la secreción pulsátil de LH. Pero también, las neuronas Kiss1 tienen un papel importante como regulador central capaz de transmitir información metabólica a los centros que gobiernan la función reproductiva [157]. En este sentido, se ha observado que la expresión del neuropéptido Kiss1 y/o su receptor se ve modificada en condiciones de balance energético alterado, y que tanto su expresión como su función están reguladas por hormonas implicadas en el control metabólico. Además, la administración exógena de kisspeptina en situaciones de estrés metabólico, como puede ser la subnutrición, restablece la función gonadotrópica del eje reproductor y rescata la función reproductora [158].

Dada la importancia del papel del sistema Kiss1/Gpr54 para esta tesis, se describirá con más detalle en el apartado “Sistema KISS1 / kisspeptinas / Gpr54”.

#### **3.1.4. Neuronas PMV, neuronas GABA y neuronas NO**

Las neuronas del núcleo PMV, las neuronas GABAérgicas y las neuronas secretoras de óxido nítrico (NO), tienen un importante papel como mediadores en la transmisión de las acciones metabólicas de la leptina hacia los centros reguladores de la reproducción del cerebro.

En ratones con deficiencia de leptina se ha documentado que lesiones bilaterales en PMV bloquean la inducción de la llegada a la pubertad mediada por la leptina exógena, y que la re-expresión unilateral del receptor en las neuronas del PMV es suficiente para revertir la alteración reproductora observada en el ratón deficiente de leptina. Estas evidencias implican a las neuronas del PMV como mediadoras del efecto de la leptina sobre la reproducción [159].

Las vías neuronales por las que las neuronas GABA participan en la transmisión de información metabólica a las neuronas GnRH también han sido investigadas recientemente. Así, ratones con deficiencia del receptor de leptina en neuronas GABA presentan un retraso en la llegada de la pubertad y problemas de fertilidad [134], y ha sido documentada la contribución de las neuronas Kiss1 como intermediarios de al menos una parte de las acciones de leptina/GABA sobre el eje reproductor [137].

En último lugar, las neuronas NO del POA tienen un papel dual en la estimulación de las neuronas GnRH, las cuales reciben una señal inhibitoria durante las fases del ciclo ovárico en las que el estradiol ejerce un efecto negativo sobre el eje, y señales estimuladoras para que se produzca la generación del pico preovulatorio de LH [152]. Además, se ha observado que la ablación genética de NOS (óxido nítrico sintasa) o su bloqueo farmacológico en el POA atenúa la acción estimulante de la leptina exógena sobre la secreción de LH e impide la restauración de la fertilidad mediante el tratamiento con leptina exógena en ratones hembra con deficiencia de leptina endógena [160].

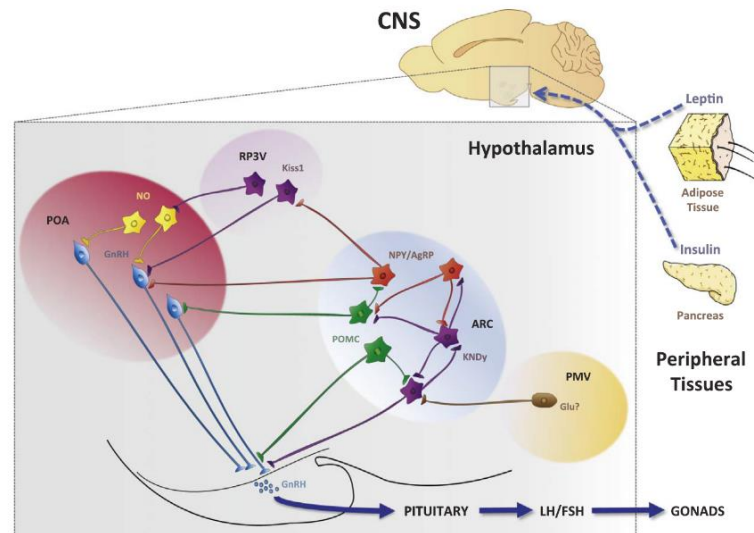


Figura 6. Representación esquemática de las poblaciones implicadas en la regulación de la secreción de las neuronas GnRH. Tomada de [152].

### 3.1.5. Mediadores moleculares: AMPK, SIRT1 y mTOR

AMPK es uno de los principales sensores energéticos a nivel celular. Su actividad quinasa es dependiente de la ratio AMP/ATP, activándose en condiciones de insuficiencia energética, en las que se consume ATP y se acumula AMP, detectando por tanto el estado metabólico de la célula.

La forma activa de AMPK (p-AMPK) provoca la inactivación de diversas vías de consumo de ATP [161], siendo la señalización por AMPK clave en el control central del balance energético y la ingesta [162]. Recientemente, se ha demostrado también su implicación en el control de la pubertad y la función reproductora. Mediante estudios electrofisiológicos se ha documentado que en condiciones de bajos niveles de glucosa, se produce una activación de AMPK que tiene un papel relevante en la inhibición de la actividad secretora de GnRH [163]. Adicionalmente, la activación de AMPK altera la ciclicidad en ratas hembras adultas, donde la administración del activador de AMPK, AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-d-ribonucleosido), da lugar a irregularidades del ciclo estral [164].

En este sentido, un estudio reciente documenta la relevancia de la señalización de AMPK/Kiss1 a nivel hipotalámico en el control metabólico de la función reproductora, y particularmente de la pubertad. En concreto, se ha observado en roedores que, en condiciones de balance energético negativo,

AMPK regula la llegada de la pubertad a través de la inhibición de la expresión de las neuronas *Kiss1* en el ARC [165]. Así, durante la subnutrición crónica, se produce un aumento de los niveles de pAMPK, asociados a un descenso de la expresión de *Kiss1* en el ARC y a un sustancial retraso de la pubertad. En el mismo sentido, la sobreexpresión constitutiva de AMPK en el núcleo ARC, donde se co-expresa con *Kiss1*, mediante técnicas virogenéticas provoca un retraso de la llegada de la pubertad en ratas hembra, así como una reducción de los niveles de LH. [165].

SIRT1 (Sirtuina 1) es una deacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleótido), que actúa sobre numerosas dianas, entre las que se encuentran las histonas, para llevar a cabo una amplia gama de funciones biológicas, incluyendo longevidad, regulación epigenética y control metabólico. SIRT1 se activa en condiciones de restricción calórica y escasez de nutrientes, de manera que induce los procesos catabólicos e inhibe los anabólicos, incrementando los depósitos energéticos celulares, y manteniendo así la homeostasis energética [166]. Entre sus numerosas funciones, se ha descrito recientemente que SIRT1 está implicado en el control metabólico de la pubertad a través de la regulación epigenética de la expresión de *Kiss1*. SIRT1 se expresa en las neuronas *Kiss1* hipotalámicas y regula su expresión en base al estado energético. Así, un reciente estudio de nuestro grupo desvela que, en situaciones de sobrealimentación temprana o subnutrición, los niveles de SIRT1 disminuyen o aumentan provocando un adelanto o un retraso de la llegada de la pubertad, respectivamente. Además, aproximaciones virogenéticas en las cuales se sobre-expresa SIRT1 en el ARC producen un retraso de la pubertad, similar al obtenido por déficit energético, confirmando su papel restrictivo sobre esta etapa en la función reproductora [167].

Por último, mTOR (del inglés mechanistic target of rapamycin) es una serina/treonina quinasa que opera como sensor del estatus energético celular y es esencial para mantener el balance energético, ya que actúa como mediador del efecto anorexigénico de la leptina, interviniendo así en el control de la ingesta [161]. Además, mTOR ha sido propuesto recientemente como regulador del control metabólico del inicio de la pubertad en hembras regulando las neuronas *Kiss1* hipotalámicas [168]. Cuando la señalización de mTOR es bloqueada a nivel central se produce un retraso de la apertura vaginal, una reducción del peso de útero y ovario, un desarrollo folicular alterado con supresión de la

ovulación, lo que en su conjunto conlleva a un retraso en la llegada de la pubertad en ratas hembra. Además, se ha observado que el bloqueo de mTOR provoca una disminución significativa de los niveles de expresión de Kiss1 en el ARC. Por el contrario, la activación central de mTOR estimula la secreción de LH y rescata parcialmente los bajos niveles de gonadotropinas causados por una subnutrición crónica en ratas prepuberales [168].

### **3.2. Factores periféricos implicados en el control metabólico de la reproducción**

La integración del balance energético y el eje reproductor no se debe solo a la acción de señales de carácter central, sino que también son de vital importancia las señales hormonales periféricas que convergen a nivel central y que indican el nivel de reservas energéticas del organismo e influyen sobre el funcionamiento del eje reproductor.

Estas señales provienen principalmente del tejido adiposo, el páncreas y el tracto gastrointestinal. De forma resumida, se describen a continuación las principales facetas de la leptina, la insulina y la ghrelina en este ámbito.

#### **3.2.1. Leptina**

Para que se lleve a cabo la función reproductora, es imprescindible que el organismo disponga de unos requerimientos energéticos mínimos para asegurar su correcto funcionamiento. La leptina es una señal de suficiencia energética secretada por el tejido adiposo en proporción al nivel de depósitos grasos que éste posee. En este contexto, la leptina es un factor indispensable para el control metabólico de la función reproductora. Tanto en modelos animales como en humanos, se ha documentado que la ausencia total de la señalización por leptina compromete la fertilidad del individuo y provoca retraso o ausencia de llegada de la pubertad. Los ratones con deficiencia de leptina (ob/ob) presentan un fenotipo obeso y muestran alteraciones reproductoras, definidos por bajos niveles de gonadotropinas y esteroides gonadales circulantes, además de un incompleto desarrollo de los órganos reproductores, ausencia de maduración sexual e infertilidad. Sin embargo, la administración de leptina exógena basta para normalizar los niveles de gonadotropinas y esteroides gonadales y así poner en marcha la función reproductora [115].



Aunque el papel específico y la naturaleza de las acciones de la leptina sobre la función reproductora han sido objeto de cierto debate, actualmente está globalmente aceptado que la leptina presenta una acción permisiva sobre los componentes del eje reproductor, siendo el hipotálamo su principal centro de acción a nivel central [121]. La leptina traslada la información sobre cambios tanto agudos (en el estado nutricional y el gasto energético), como crónicos, sobre la acumulación de depósitos grasos producida en la obesidad, y actúa vía POMC, NPY/AgRP y Kiss1, entre otros, para regular la secreción de GnRH [135, 169]. Además la leptina estimula de forma directa las células gonadotropas de la hipófisis para producir y secretar LH y FSH, con o sin la intervención de GnRH [170], aunque la magnitud de este efecto es en general moderada. De esta manera, la leptina contribuye a nivel central y periférico tanto en la estimulación del eje HHG cuando las condiciones nutricionales y energéticas son las adecuadas, como a su inhibición producida tanto por la pérdida excesiva como por el exceso de grasa corporal. En esta última condición, se ha documentado que el exceso de leptina ejerce igualmente un efecto inhibitorio directo sobre la secreción testicular de testosterona.

### **3.2.2. Insulina**

Otra hormona implicada en la regulación del eje HHG es la insulina. Cabe destacar que la insulina es uno de los principales reguladores de la síntesis de leptina; por ello, a menudo, tanto los niveles de ambas hormonas como sus acciones biológicas están íntimamente ligadas.

En este sentido, la insulina, al igual que la leptina, es una señal de suficiencia energética que tiene un papel predominantemente estimulador del eje reproductor, y cuyas acciones son principalmente a nivel central. De hecho, bajos o nulos niveles de insulina o la inactivación génica del receptor de insulina en el cerebro están asociados con la supresión de la síntesis de gonadotropinas e hipogonadismo hipogonadotropo [76], mientras, por el contrario, altos niveles circulantes de insulina, como los definidos en estudios de hiperinsulinemia, se corresponden con altos niveles de LH [171, 172].

Estos efectos estimuladores de la insulina no son directos sobre las neuronas GnRH, ya que la eliminación selectiva de su receptor en estas neuronas no afecta a la llegada de pubertad ni la fertilidad en la etapa adulta [173]. En este caso la acción de la insulina está mediada por las neuronas NPY

y, eventualmente, las neuronas Kiss1[171]. Sobre estas últimas se ha descrito que la ausencia del receptor de insulina en las neuronas Kiss1 retrasa la llegada de la pubertad, aunque la fertilidad no se ve afectada en la etapa adulta [174].

### **3.2.3. Ghrelina**

La ghrelina es una hormona periférica que también participa en el control metabólico de la reproducción. Al contrario que la leptina y la insulina, la ghrelina es una señal de insuficiencia energética que se sintetiza principalmente en el estómago, y cuya secreción aumenta en condiciones de ayuno o déficit energético.

La ghrelina principalmente actúa como señal inhibidora del eje HHG, función que ha sido descrita en diferentes especies, incluyendo roedores y humanos [121]. Este efecto inhibidor tiene lugar tanto a nivel central, como periférico, afectando a la unidad hipotálamo-hipofisaria y a las gónadas. En este contexto, se ha observado que la administración central de ghrelina en rata, provoca una significativa inhibición de la secreción de LH en machos y en hembras durante todas las fases del ciclo estral, así como en hembras ovariectomizadas, inhibiendo además, en estas últimas, la secreción LH estimulada por GnRH [138]. A nivel gonadal, la ghrelina ejerce una inhibición directa sobre la esteroidogénesis testicular y la proliferación de la células de Leydig, disminuyendo la secreción de testosterona; efecto que podría ser relevante en situaciones de déficit energético ya que supone un ahorro energético [175]. También se ha observado que la administración crónica de ghrelina durante la primera mitad del embarazo en ratas reduce el tamaño de las camadas [176].

Sin embargo, la ghrelina no tiene un papel tan esencial como el de la leptina en el control de la función reproductora. De hecho, las mutaciones en el gen de la ghrelina no presentan trastornos severos de la fertilidad [177]. Este hecho se debe muy posiblemente a la naturaleza de sus acciones (predominantemente inhibitorias), de tal forma que la ausencia de las acciones de la ghrelina no compromete la función reproductora, si bien su aumento (por ej., en condiciones de insuficiencia energética) causa una inhibición de diversos aspectos de la reproducción.

#### **4. Sistema KISS 1 / kisspeptinas / Gpr54**

El gen *Kiss1* fue catalogado por primera vez en los años 90 como un gen supresor de metástasis. Sin embargo, no fue hasta el año 2001 cuando tres estudios independientes llevaron a cabo la caracterización completa de las kisspeptinas basándose en el origen común de estas, el gen *Kiss1*, y en su similitud estructural [178, 179].

Con posterioridad, a partir del año 2003, una serie de evidencias clínicas y experimentales han documentado que las kisspeptinas y su receptor (Gpr54 o Kiss1R) son críticos para la función reproductora, con un papel absolutamente indispensable de las neuronas Kiss1 en el control central de la reproducción. Los primeros datos que desvelaron la dimensión reproductiva de las kisspeptinas fueron los derivados de estudios en pacientes, en los que la delección o mutación del gen GPR54 se asocia a ausencia de pubertad e hipogonadismo hipogonadotropo [180, 181]. En la línea de esas observaciones iniciales, se ha demostrado que diversas mutaciones inactivantes del gen *Kiss1/KISS1* o su receptor, en roedores y en humanos, cursan con hipogonadismo central, desvelando así la importancia de este sistema en el mantenimiento de la función reproductora [182]. Hoy en día, existe un amplio consenso en que la señalización de las kisspeptinas a nivel central es un elemento esencial en muy diversas facetas de la maduración y función del eje reproductor, actuando principalmente como un potente estímulo de las neuronas GnRH, que expresan el receptor, Gpr54.

En roedores, las neuronas Kiss1 se localizan principalmente en dos áreas del hipotálamo, el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) y el núcleo ARC. Las neuronas Kiss1 en estas dos regiones hipotalámicas están reguladas de manera diferente por la testosterona y el estradiol, tanto en el desarrollo como en la etapa adulta, y se distribuyen de manera dimórfica entre ambos sexos [129]. En roedores, existe una tercera población de neuronas Kiss1 en la amígdala, cuya función parece estar ligada a la integración de señales información ambiental olfativa y de comportamiento social con los elementos del cerebro reproductor, que a último término regulan las neuronas GnRH, permitiendo así una coordinación efectiva el eje gonadotropo [183].

Las neuronas Kiss1, sintetizan y secretan kisspeptinas que son una familia de péptidos codificados por el gen *Kiss1/KISS1*. Las kisspeptinas, que desempeñan su acción biológica a través del receptor, Gpr54, derivan del procesamiento proteolítico de un único precursor. En humanos, el precursor de

las kisspeptinas posee 145 aminoácidos, con una secuencia señal de 19 aminoácidos. La proteólisis del precursor prepro-kisspeptina da lugar a diversos péptidos con función biológica, de los cuales el más prominente es la kisspeptina-54 (péptido de 54 aminoácidos), inicialmente llamada metastina por su capacidad de inhibir la metástasis en tumores, y que ha sido considerada el principal producto de *Kiss1*. En todo caso, también se han identificado otros miembros de la familia de las kisspeptinas, como son kisspeptina-14, kisspeptina-13 y kisspeptina-10, que comparten un extremo carboxilo (-COOH) terminal con la kisspeptina-54, donde se encuentran la secuencia Arginina-Phe-NH<sub>2</sub>, característica de la familia peptídica de las RF-amidas (**Figura 7**). Esta familia está compuesta por un gran número de péptidos, los cuales en mamíferos incluyen, además de las kisspeptinas, a los neuropéptidos FF y AF, el péptido liberador de prolactina (PrRP), la QRFP43, y los RFRP-1 y RFRP-3. No solo las kisspeptinas, sino que también RFRPs, 26RFa, y PrRP se ha observado que tienen un papel en la modulación de la secreción de gonadotropinas en varias especies de mamíferos [119].

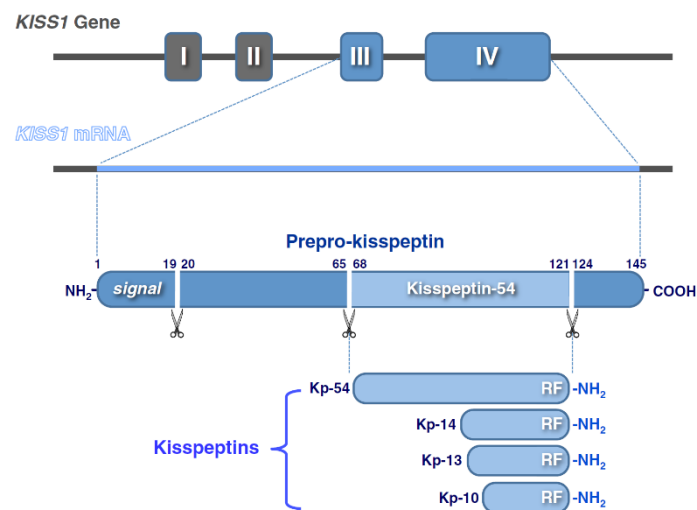


Figura 7. Representación esquemática de la obtención de las distintas kisspeptinas mediante procesamiento proteolítico de un precursor común. En humanos el gen *KISS1* está compuesto por 4 exones. Tomada de [119].

#### 4.1. El receptor de kisspeptinas, Gpr54

Las kisspeptinas llevan a cabo su acción biológica a través de su interacción con el receptor, Gpr54, también llamado KISS1R. Se trata de un receptor de siete dominios transmembrana acoplado a una proteína  $G\alpha_{q/11}$ , que

pertenece a la familia de los GPCRs. La unión del receptor a su ligando desencadena una cascada de señalización que termina con la movilización del calcio intracelular. Esto se produce por la activación de la fosfolipasa C (PLC) tras la unión de kisspeptina, que provoca la conversión del fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), el cual induce la movilización de calcio desde los depósitos intracelulares. El aumento de calcio intracelular genera cambios en la permeabilidad de los canales iónicos de la membrana lo que resulta en la despolarización de célula. Además, el incremento en la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> conlleva a la formación de diacilglicerol (DAG) y por consiguiente a la activación de la proteína quinasa C (PKC), la cual inicia la fosforilación de MAP quinasas, como ERK1, ERK2 y p38. La activación de Gpr54 también provoca el reclutamiento de las arrestinas 1 y 2, las cuales modulan la señalización del receptor de forma opuesta; así, mientras que la arrestina 1 disminuye la fosforilación de ERK, la arrestina 2 la incrementa [119, 184] (**Figura 8**).

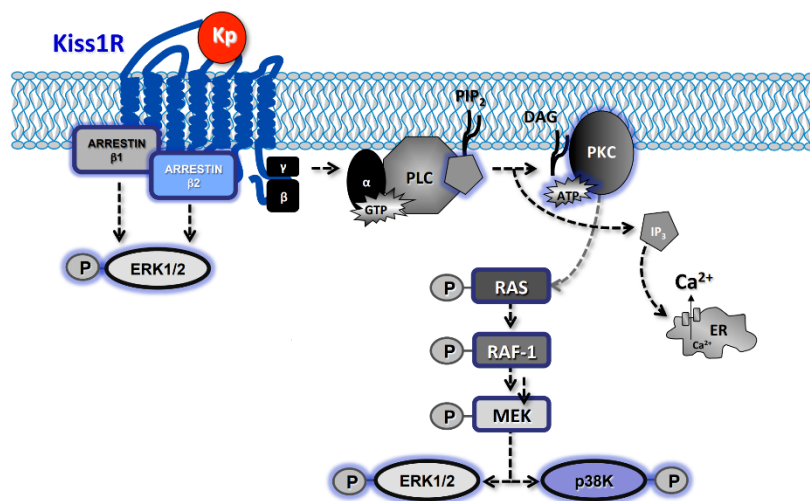


Figura 8. Representación esquemática de la cascada de señalización del receptor Gpr54. Tomada y modificada de [185].

En roedores, el tejido donde Gpr54 se expresa en mayor cantidad es en el sistema nervioso central, principalmente en el hipotálamo, donde se van a llevar a cabo las funciones reguladoras de las kisspeptinas sobre el eje reproductor; aunque también puede encontrarse en el tronco encefálico, el córtex y el cerebelo [186], entre otras áreas cerebrales. Sin embargo, el receptor de kisspeptinas y su ligando no solo se expresan a nivel central, sino que también se expresan en tejidos periféricos, como son la hipófisis, el testículo y

el ovario [187] dentro del eje HHG. Se expresa, además, en otros tejidos como el sistema cardiovascular y el riñón, o el tejido adiposo y el páncreas [188], estos dos últimos de vital importancia en la regulación metabólica del individuo.

## 4.2. Neuronas KNDy

En roedores y otras especies, las neuronas Kiss1 del ARC co-expresan, en su gran mayoría, neurokinina B (NKB) y dinorfina A y son por ello denominadas neuronas KNDy. Datos farmacológicos y genéticos han puesto de manifiesto en años recientes la importancia de la señalización de las neuronas KNDy en el control del eje reproductor.

NKB es un neuropéptido que pertenece a la familia de las taquikininas. Está codificado por el gen *TAC3* en humanos y *Tac2* en roedores y actúa a través del receptor NK3R (codificado por el *TACR3* y *Tacr3* en humanos y roedores respectivamente).

La Dinorfina A es un opiáceo endógeno codificado por el gen *PDYN* en humanos y *pDyn* en roedores, que actúa a través del receptor opioide-kappa (KOR) codificado por los genes *OPRK1* y *Oprk1* en humanos y roedores, respectivamente [189].

Diversas evidencias experimentales han documentado que las neuronas KNDy regulan de manera muy relevante la secreción de GnRH, siendo un componente esencial del llamado generador de pulsos GnRH (**Figura 9**). En este sistema, las kisspeptinas actuarían como la señal activadora de la secreción de GnRH, pero el componente oscilatorio del sistema vendría dado por la interacción entre NKB y dinorfinas, de manera que mientras NKB es un estimulador de la secreción de kisspeptinas, las dinorfinas la inhibe.

De esta forma, según el modelo más comúnmente aceptado, NKB actúa como señal auto-reguladora de las neuronas KNDy, estimulando la secreción de kisspeptinas y por tanto activando las neuronas GnRH. En este sentido, cabe destacar que las neuronas KNDy poseen receptores para NKB, NK3R, a través de los cuales NKB ejerce su papel estimulador de GnRH de manera kisspeptina-dependiente [190], gracias a una acción coordinada con otros factores neuroendocrinos, como la dinorfina, el glutamato y GABA [191]. De este modo, NKB retroalimenta a la neurona KNDy para dar lugar a la liberación pulsátil de

kisspeptina, y por lo tanto de GnRH, en un mecanismo también dependiente del nivel de esteroides sexuales.

Por otro lado, se ha demostrado que Dyn inhibe la liberación de gonadotropina después de unirse al receptor opiáceo (KOR); sin embargo, a diferencia de NK3R, el KOR se expresa en niveles bajos en las neuronas KNDy. Cabe destacar que, como en el caso de Kiss1 y NKB, la secreción de Dyn está sujeta a la retroalimentación negativa inhibitoria de los esteroides sexuales en el ARC [191].

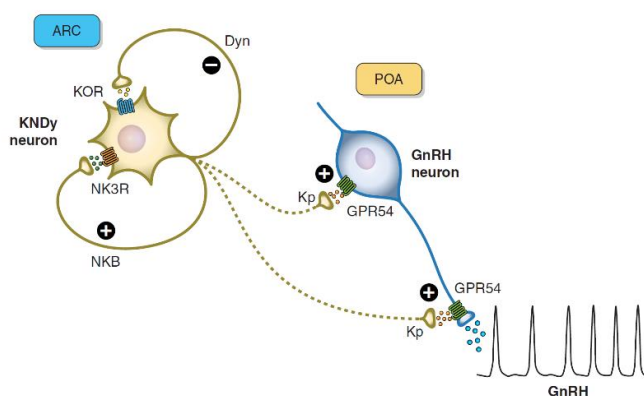


Figura 9. Representación esquemática de las neuronas KNDy. Tomada de [119].

Por otra parte, se ha observado que las neuronas KNDy no solo regulan la función reproductora, sino que también están implicadas en parte en la integración de señales metabólicas y reproductivas. En particular, las neuronas KNDy podrían participar en transmitir a nivel central el efecto metabólico de los esteroides gonadales. Estudios con modelos animales en los cuales se elimina selectivamente las neuronas KNDy en ratas hembra, se ha observado que esta eliminación previene y atenúa el aumento de los niveles circulantes de LH y FSH que provoca la ovariectomía, así como evita la ganancia de peso inducida por la eliminación de los esteroides gonadales tras la castración [192]. De forma similar, la eliminación de estas neuronas atenúa la pérdida de peso corporal tras la administración de estradiol [192, 193]. Todo ello sugiere que las neuronas KNDy en el ARC son indispensables tanto para la secreción de gonadotropinas, aumentando los niveles de LH después de la eliminación de los estrógenos, como para la integración a nivel central de los efectos de los esteroides gonadales sobre la homeostasis energética.

Asimismo, la expresión de NKB depende del estado metabólico del organismo, como se ha podido observar en ratas hembra puberales alimentadas

con dieta alta en grasa (HFD), en las cuales la expresión de *Tac2* incrementa considerablemente en el ARC [194]. Por el contrario, en condiciones de ayuno, la expresión de NKB y de su receptor en el ARC disminuye [195]. En el caso de la dinorfina, también se ha observado que los cambios metabólicos alteran su expresión, de manera que ratas con diabetes inducida muestran un incremento de la expresión del ARNm de prodinorfina (precursor) y de proteína en el hipotálamo [196].

### **4.3. Papel de las kisspeptinas en la regulación del eje reproductor**

En la regulación del eje HHG, las neuronas *Kiss1* juegan un papel fundamental ya que son sus principales estimuladores. Las kisspeptinas regulan la secreción de gonadotropinas principalmente a través de la estimulación de las neuronas GnRH, pero también pueden actuar sobre las células gonadotropas en la hipófisis.

La señalización de las kisspeptinas es esencial para el correcto funcionamiento del eje reproductor. En este sentido, como se ha mencionado anteriormente, mutaciones inactivadoras del receptor de kisspeptina, *Gpr54*, comprometen severamente la función reproductora y dan lugar a hipogonadismo hipogonadotropo [180], pero además se ha documentado que la reinsertión del receptor *Gpr54* exclusivamente en las neuronas GnRH es suficiente para preservar la capacidad reproductora [197]. También han sido descritas mutaciones inactivadoras del gen *Kiss1* que se asociaron con problemas en la maduración sexual y la fertilidad [198]. Por el contrario, las mutaciones funcionalmente activadoras de *KISS1R* están asociadas con pubertad precoz [199].

Por otra parte, los niveles hipotalámicos de ARNm de *Kiss1* y *GPR54* aumentan dramáticamente en la pubertad, sugiriendo que la señalización por kisspeptina media los eventos neuroendocrinos que desencadenan el inicio de la pubertad [129, 186].

Las neuronas GnRH expresan *Gpr54* y son activadas por kisspeptinas, las cuales estimulan la secreción de GnRH que provoca a su vez la secreción de gonadotropinas. Multitud de estudios descritos en la bibliografía ponen de manifiesto este hecho. Por ejemplo, las kisspeptinas in vitro, estimulan la



secreción de GnRH en explantes hipotalámicos, y también in vivo la administración intracerebroventricular de kisspeptinas provoca un aumento significativo de los niveles de GnRH en el fluido cerebroespinal y simultáneamente de LH en suero [200].

Además, las kisspeptinas estimulan directamente la síntesis de gonadotropinas en la hipófisis, ya que se ha observado que la administración periférica de este péptido estimulador provoca un aumento en los niveles de LH y FSH circulantes en el mismo grado que su administración central [201], aumento que también se ha observado en explantes hipofisarios tratados con kisspeptina [202].

Asimismo, cabe destacar el papel de las kisspeptinas como integradoras de las señales periféricas que los esteroides ejercen sobre el eje. En este sentido, las dos principales poblaciones de kisspeptinas que se encuentran en el hipotálamo, núcleos ARC y AVPV, tienen funciones diferentes en la regulación del eje. Tanto el estradiol como la testosterona regulan la expresión del gen *Kiss1* en el ARC y el AVPV, sin embargo, mientras que el estradiol y la testosterona inhiben el ARNm de *Kiss1* en el ARC, aumentan la expresión de *Kiss1* en el AVPV [203]. Por lo tanto, las neuronas *Kiss1* en el ARC participan en la regulación de la retroalimentación negativa que producen los esteroides gonadales sobre la secreción de gonadotropina, mientras que las neuronas *Kiss1* en el AVPV contribuyen a generar el pico preovulatorio de gonadotropinas en las hembras [199].

Más recientemente, se ha estudiado también el papel de la población de neuronas *Kiss1* de la amígdala y su implicación en la reproducción. En este caso, en roedores se ha observado que las kisspeptinas están implicadas en la regulación de diversos comportamientos sexuales asociados a la reproducción [183]. Por ejemplo, la activación selectiva de las neuronas *Kiss1* en la amígdala mediante DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs), mejora la preferencia de la pareja sexual y la interacción social al tiempo que disminuye la ansiedad, lo que sugiere que las kisspeptinas tienen un papel clave en la motivación sexual y el comportamiento social [204]. También está asociado con la excitación sexual, la audición y el miedo [205].

Además de todas estas acciones a nivel central, las kisspeptinas ejercen su acción en varios procesos biológicos relacionados con la reproducción de forma periférica, entre los que se incluyen la regulación de la función ovárica y testicular, la implantación del embrión y la formación de la placenta [187].

#### **4.4. Papel de las kisspeptinas en la regulación del metabolismo**

Como se ha mencionado en secciones previas, el papel de las kisspeptinas en la regulación del eje reproductor, y su posible papel en la mediación de las acciones de señales metabólicas sobre este eje neurohormonal, se ha documentado ampliamente en los últimos años. Sin embargo, más recientemente se ha propuesto a las kisspeptinas per se podrían ejercer un control directo del metabolismo energético. Sin embargo, son pocos los estudios en este campo y el posible papel de las kisspeptinas en el control de la regulación metabólica no está todavía suficientemente clarificado.

En primer lugar, cabe destacar que el buen funcionamiento de la señalización hipotalámica de las kisspeptinas es muy sensible al estado metabólico del individuo. Las condiciones de desequilibrio energético, tanto por exceso como por defecto, producen cambios en la expresión hipotalámica de *Kiss1* [206]. En condiciones de ayuno, la expresión de *Kiss1* y *GPR54* disminuye dramáticamente, mientras que por el contrario la administración de leptina exógena en ratones en ayuno, provoca un aumento en los niveles de expresión de *Kiss1* y *GPR54*, igualándose a los controles normonutridos, y un aumento significativo en la secreción de GnRH y LH [168, 196, 207]. Además la suma de distintos insultos obesogénicos provocan alteraciones tanto en la expresión de *Kiss1* como en la secreción de LH en ratas hembras [208]. Estas alteraciones se evidencian incluso en estudios intergeneracionales, en los que los padres son obesos [209]. Se han reportado, además, alteraciones en la expresión de *Kiss1* en otras situaciones de desequilibrio energético, como la diabetes tipo 1 no controlada [196]. Todos estos hallazgos ponen de manifiesto una alta sensibilidad de la señalización de kisspeptinas a las alteraciones en la homeostasis energética del individuo.

Las neuronas *Kiss1* hipotalámicas están por tanto influenciadas por la acción directa de diversas hormonas metabólicas periféricas, como son la leptina, la insulina o la ghrelina, que pueden aumentar o disminuir su expresión [210]. Pero, por otra parte, también pueden verse afectadas de manera indirecta por la acción de otras neuronas muy importantes en el control del balance energético como son POMC/CART o NPY/AgRP, ya que estas neuronas proyectan sus terminales nerviosos hacia las neuronas *Kiss1* [206].

En segundo lugar, varias evidencias indican que las kisspeptinas podrían tener un papel en la regulación del metabolismo actuando sobre tejidos periféricos, ya que, 1) tanto las kisspeptinas como su receptor se encuentran en tejidos periféricos que controlan el metabolismo y se ha observado que en periodos de alteración del balance energético (como por ejemplo, la subnutrición, la obesidad o la diabetes), la expresión del sistema kisspeptina/Gpr54 se ve alterado en estos tejidos [211]; 2) experimentos in vitro han indicado que las kisspeptinas actúan sobre el metabolismo lipídico [212] y la ingesta provocando un incremento de la expresión de NPY [213]; y 3) experimentos in vivo, con modelos animales Gpr54KO han mostrado una alteración de parámetros metabólicos, tales como el peso corporal o el metabolismo de la glucosa, preferencialmente en hembras.

A este último respecto, se ha observado que ratones hembra con deficiencia global del receptor Gpr54 muestran un incremento significativo del peso corporal, la adiposidad y los niveles circulantes de leptina e insulina, además de presentar alteraciones en la tolerancia a glucosa y una marcada reducción del gasto energético, la actividad locomotora, y el coeficiente respiratorio. Sin embargo, el peso corporal y la tolerancia a glucosa no se ve alterada en los machos Gpr54KO [214]. La adiposidad, la hiperinsulinemia y la disminución del metabolismo ya se observan a una edad más temprana en las hembras Gpr54KO, desarrollando un deterioro de la tolerancia a la glucosa y una disminución de la ingesta más tarde en la edad adulta, cuando el peso corporal aumenta significativamente. Así, una disminución en el metabolismo y el gasto energético en los primeros meses de vida puede dar lugar al posterior fenotipo obeso de las hembras Gpr54KO adultas [215]. Por otra parte, el análisis por PCR e hibridación in situ (ISH) de la expresión de neuropéptidos hipotalámicos implicados en el control de la ingesta, como POMC y NPY, no mostraron cambios en hembras Gpr54KO ovariectomizadas (es decir, con ausencia de esteroides gonadales circulantes), lo que sugiere que el efecto obesogénico producido por la ausencia del receptor Gpr54 podría estar causado por deficiencias metabólicas periféricas en lugar de centrales [216]. En todo caso, el análisis diferencial de los componentes central y periférico de la señalización de kisspeptinas en el control del metabolismo no ha sido suficientemente clarificado hasta la fecha.

Por otra parte, el grupo de Martin J. Kelly ha demostrado que la activación optogénica de las neuronas Kiss1 del ARC estimula a las neuronas POMC e inhibe a las neuronas AgRP a través de inputs glutamatérgicos

dependientes de esteroides gonadales [217]. Esta respuesta glutamatérgica está regulada por la testosterona en ratas macho que ejerce su papel orexigénico de manera diferencial sobre POMC y AgRP dependiendo de la frecuencia de disparo neuronal de Kiss1 (altas frecuencias de foto-estimulación de Kiss1 provocan una despolarización en POMC y una hiper-polarización en AgRP). En hembras, los estrógenos aumentan la excitabilidad de las neuronas Kiss1 del ARC y la neurotransmisión glutamatérgica hacia las neuronas POMC estimulándolas, y hacia las neuronas NPY/AgRP inhibiéndolas [218]. En conjunto, estos datos proporcionan un marco neurofisiológico mediante el cual las neuronas Kiss1 podrían integrar cambios en el estado reproductivo con cambios en el estado energético y otras funciones homeostáticas.

También relacionado con el control de la ingesta, estudios farmacológicos indican que la administración central de kisspeptina-10 en roedores reduce la ingesta de alimentos y aumenta los intervalos entre comidas [219]. Además un estudio reciente apunta a que esta inhibición de la ingesta podría ser a través de la activación de la síntesis de nesfatina-1 y oxitocina (neuropéptidos anorexigénicos) [220], por lo que las kisspeptinas podrían jugar un papel en la supresión de la ingesta.

Adicionalmente, otro estudio muy reciente, sugiere que las neuronas Kiss1 del ARC controlan la sincronización diaria de la ingesta de alimentos, junto con la regulación circadiana de la actividad locomotora, el sueño y la temperatura corporal [221]. El silenciamiento de las neuronas Kiss1 inducido por toxinas desplaza la vigilia y el consumo de alimentos a la fase de luz e induce un aumento en el peso corporal. Además, estos ratones con ausencia de kisspeptinas son menos activos físicamente y tienen ritmos de temperatura atenuados.

Como se ha mencionado previamente, la expresión de *Kiss1* y *GPR54* se distribuye también en una serie de tejidos metabólicos periféricos, incluyendo la grasa, el hígado y el páncreas, lo que sugiere funciones adicionales periféricas en la homeostasis metabólica [188].

Hasta la fecha, sólo un número muy limitado de estudios han reportado la expresión de *Kiss1* en el tejido adiposo blanco [222, 223], y sugieren que las kisspeptinas producidas en los adipocitos podrían autorregular el funcionamiento del tejido adiposo, inhibiendo la proliferación y regulando la lipólisis y la lipogénesis [212]. Sin embargo, la relevancia fisiológica de este fenómeno sigue siendo desconocida.

Asimismo, estudios farmacológicos han señalado acciones potenciales de las kisspeptinas sobre la función pancreática, donde se han descrito efectos tanto estimulantes como inhibitorios sobre la secreción de insulina, dependiendo del estado glucémico del individuo [224, 225]. En este contexto, se ha sugerido que las kisspeptinas sintetizadas en el hígado operan como señales inhibitorias de la secreción de insulina pancreática [226]. Sin embargo, estudios clínicos llevados a cabo en hombres sanos han revelado que la administración de kisspeptina mejoró la secreción de insulina tras una sobrecarga intravenosa de glucosa y en consonancia con esto, estudios in vitro indican que las kisspeptinas aumentan la secreción de insulina estimulada por la glucosa de islotes pancreáticos humanos [227].

No obstante, la evidencia de una función metabólica genuina de las kisspeptinas sigue siendo, en muchos casos, inconclusa, lo que hace obligatorio el uso de enfoques adicionales más incisivos, para exponer plenamente las acciones fisiológicas, y el posible papel patogénico, de la señalización de las kisspeptinas en el control de las facetas clave del metabolismo.



# OBJETIVOS

---





## Objetivos

La función reproductora está totalmente supeditada al nivel de reservas energéticas del organismo. En este sentido, las kisspeptinas son esenciales para la puesta en marcha de función reproductora y su mantenimiento durante la etapa adulta y juegan un papel clave en la integración de la información metabólica a nivel central, de manera que la expresión de kisspeptinas en el hipotálamo se ve alterada en situaciones de exceso o déficit energético. Sin embargo, el fenómeno opuesto, es decir, el papel de las kisspeptinas en el control del metabolismo energético aún ha sido poco estudiado.

En este contexto, el **OBJETIVO GENERAL** de esta Tesis es el estudio del papel del sistema Kiss1 en la regulación de aspectos básicos de la función metabólica en ambos sexos, mediante el empleo de herramientas farmacológicas y modelos murinos genéticamente modificados (genómica funcional).

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

- 1- Estudiar el efecto de la administración central y periférica de Kp-10 sobre la homeostasis energética y el metabolismo en ratones, mediante la monitorización de diversos parámetros relacionados principalmente con la ingesta y el control de la glucemia.
- 2- Caracterizar metabólicamente un modelo murino con ablación global del receptor de kisspeptinas (Gpr54) y rescate selectivo de este receptor en neuronas GnRH, lo que permite revertir el fenotipo hipogonadal del modelo KO global, posibilitando así el estudio de la interacción entre señalización por kisspeptinas y el metabolismo.
- 3- Generar y caracterizar metabólicamente un modelo murino, denominado TaKKO, con eliminación condicional de la expresión del gen *Kiss1* en neuronas que expresan *Tac2* (propia de las neuronas KNDy ubicadas en el núcleo ARC), permitiendo así elucidar el efecto de la ausencia de kisspeptinas en esta población neuronal sobre la función metabólica.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---



# **Materiales y Métodos**

## **1. Animales de experimentación**

Para la realización de esta Tesis se utilizó como modelo de experimentación animal tres líneas de ratón: wild-type (C57BL6J; procedentes de Charles River Laboratories, Francia), y los modelos de ratón transgénicos GPR54<sup>-/-</sup>Tg y TaKKO (ambas líneas se describirán en detalle en los apartados 1.1. Generación del modelo Gpr54<sup>-/-</sup>Tg y 1.2. Generación del modelo TaKKO). En todos los casos se usaron machos y hembras para llevar a cabo los experimentos. Una vez generados, los ratones fueron criados y estabulados en el Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba (UCO/IMIBIC). El día de nacimiento se consideró día 1 de vida. Los animales fueron destetados el día postnatal 21.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes de luz (12h de luz, a partir de las 7:30 am) y temperatura (22°C), y con libre acceso a agua y comida. La alimentación administrada fue la siguiente: dieta control (denominada CD, referencia SafeA04; contenido calórico 3,33 Kcal/g de los cuales 8,4% proceden de grasa, 19,3% de proteínas y 72,4% de carbohidratos; SAFE Complete Care Competence. Francia); o dieta alta en grasa (denominada HFD; referencia D12451; contenido calórico 4,73 Kcal/g de los cuales 45% proceden de grasa, 20% de proteínas y 35% de carbohidratos; Research Diets Inc. New Brunswick, NJ).

Todos los protocolos de experimentación fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Córdoba y llevados a cabo en concordancia con la Normativa de la Unión Europea para el cuidado y uso de animales de experimentación (directiva 2013/53/UE de febrero 2013 relativa a la protección de los animales utilizados con fines científicos).

### **1.1. Generación del modelo GPR54<sup>-/-</sup>Tg**

El modelo Gpr54<sup>-/-</sup>Tg, consiste en una línea de ratón transgénico con ausencia global de Gpr54, pero con re-expresión exclusiva de Gpr54 en células GnRH, desarrollada y validada por los laboratorios de G. Schütz y M. Kirilov (German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania) y A.E. Herbison (Centre of Neuroendocrinology, University of Otago, Nueva Zelanda) [228]. Esta

línea fue transferida a nuestro laboratorio para su cría y caracterización fenotípica.

La re inserción selectiva del receptor Gpr54 en las células GnRH en ratones mutantes con ausencia global del receptor (Gpr54<sup>-/-</sup>), permite el rescate total de la función gonadal. La estrategia de cruzamiento para la generación de la línea, basándonos en consideraciones descritas en la caracterización reproductiva del modelo llevado a cabo en nuestro laboratorio [197], ha sido la siguiente: ratones macho heterocigotos (Gpr54<sup>+/-</sup>) portadores del Tg fueron cruzados con ratones hembra heterocigotas (Gpr54<sup>+/-</sup>) sin Tg. El resultado del cruzamiento da lugar a cuatro genotipos homocigotos posibles los cuales son Gpr54<sup>+/+</sup> (WT), Gpr54<sup>+/+</sup>Tg, Gpr54<sup>-/-</sup> (KO) y Gpr54<sup>-/-</sup>Tg (rescatado). Cabe destacar que la comparación de aspectos metabólicos clave como el peso corporal, la ingesta 24h y la glucosa basal, entre ratones Gpr54<sup>+/+</sup> y Gpr54<sup>+/+</sup>Tg de ambos sexos no reveló diferencias entre estas dos líneas control (**Figura 10**). Así, dadas las similitudes en las respuestas entre los grupos WT y Gpr54<sup>+/+</sup>Tg, los ratones WT fueron utilizados como genotipo control. Por tanto, para los estudios fenotípicos de la caracterización metabólica llevados a cabo en esta Tesis se han comparado tres genotipos denominados: Gpr54<sup>+/+</sup> (WT, control), Gpr54<sup>-/-</sup>Tg (rescatado) y Gpr54<sup>-/-</sup> (KO).

El genotipado de los ratones se realizó mediante análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN genómico aislado a partir de tejido procedente de oreja. Los cebadores utilizados para la detección del alelo WT fueron: T1003E: 5'-GCC TAA GTT TCT CTG GTG GAG GAT G-3' y T1003TE: 5'-CGC GTA CCT GCT GGA TGT AGT TGA C-3'; mientras que la pareja de cebadores utilizada para la detección del alelo mutante fue: NeoT 5'-GGG TGG GAT TAG ATA AAT GCC TGC TCT 3' y T1003TE: 5'-CGC GTA CCT GCT GGA TGT AGT TGA C-3'. Para evaluar la presencia del transgén Gpr54, con expresión directa en células GnRH, los cebadores utilizados fueron: GnRH\_F: 5'-GGT TTC AGG GAA CCC AAA TTA-3' y GPR54\_R: 5'-ACC AAT GAG TTT CCG ACC AG-3'. La reacción de PCR consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 min seguido de un número variable de ciclos de amplificación que incluían, una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un anillamiento a una temperatura específica de 63°C para Gpr54 y 57°C para el transgén, durante 30 segundos, y una extensión a 72°C durante 1 min. A continuación, se aplicó un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 min. El resultado de la amplificación da lugar a una banda de 253pb para el alelo WT, 455pb para el alelo mutante, y 439pb para el transgén.

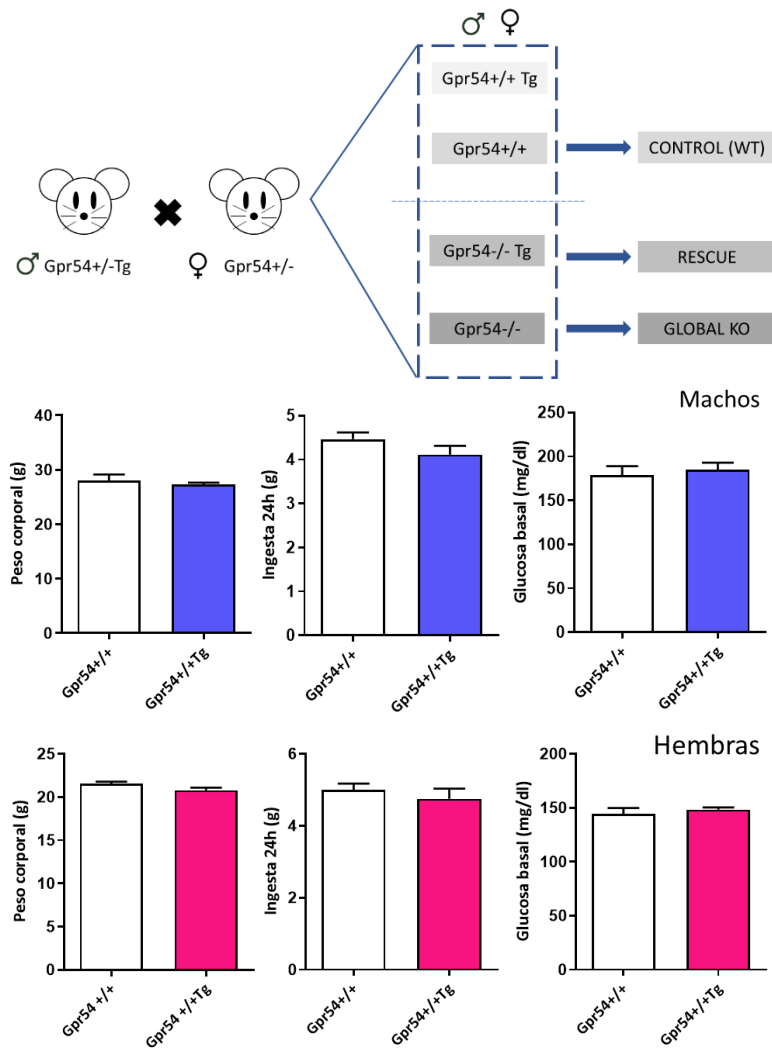


Figura 10. En el panel superior, representación esquemática de la estrategia de cruzamientos llevada a cabo. En el panel inferior, estudio comparativo previo del peso corporal, la ingesta y la glucosa basal en las dos líneas control generadas en el modelo.

## 1.2. Generación del modelo TaKKO

Como se mencionó en la Introducción, en roedores existen dos poblaciones principales de neuronas Kiss1, localizadas en el ARC y en el AVPV, que median los efectos de la retroalimentación negativa y positiva de los esteroides gonadales respectivamente, jugando un papel diferencial en el control del eje HHG. Adicionalmente, la distribución de estas poblaciones de neuronas Kiss1 presenta dimorfismo sexual: mientras que las neuronas Kiss1 del ARC están presentes en ambos sexos, la población de neuronas Kiss1 en el AVPV está especialmente desarrollada en las hembras.

Por otra parte, las neuronas Kiss1 del ARC co-expresan NKB (codificado por el gen *Tac2* en roedores) y Dinorfina A, formando las denominadas neuronas

KNDy. Sin embargo, en el ARC puede haber poblaciones neuronales expresando Kiss1 y NKB de forma independiente. En este sentido, la contribución relativa de los diferentes subconjuntos de las poblaciones de neuronas Kiss1 al control de la función reproductiva, y su modulación por factores metabólicos, permanece inexplorada. Para definir los roles de las kisspeptinas producidas en las neuronas KNDy, frente a los efectos producidos por otras subpoblaciones de neuronas Kiss1, en el ARC o el AVPV, hemos llevado a cabo la generación y caracterización inicial de una nueva línea murina, que hemos denominado TaKKO, con ablación condicional de *Kiss1* en neuronas *Tac2* en el ARC.

La línea TaKKO, con eliminación selectiva de la expresión de *Kiss1* en aquellas poblaciones neuronales que además expresan *Tac2*/NKB, se ha generado mediante el cruce de la línea de ratón *Tac2*-IRES-Cre (JAX- 021878) con la novedosa línea de ratón *Kiss1*loxP/loxP, recientemente desarrollada por nuestro grupo en colaboración con el *Turku Centre for Disease Modeling* (TCDM). En esta línea de ratón, el Exón 3 de *Kiss1*, que codifica la región de las kisspeptinas dotada de actividad biológica, está flanqueado por dos sitios lox-P, lo que permite la escisión del exón y por tanto la interrupción del gen específicamente en un tejido en concreto mediante acción de la Cre recombinasa (**Figura 11**).

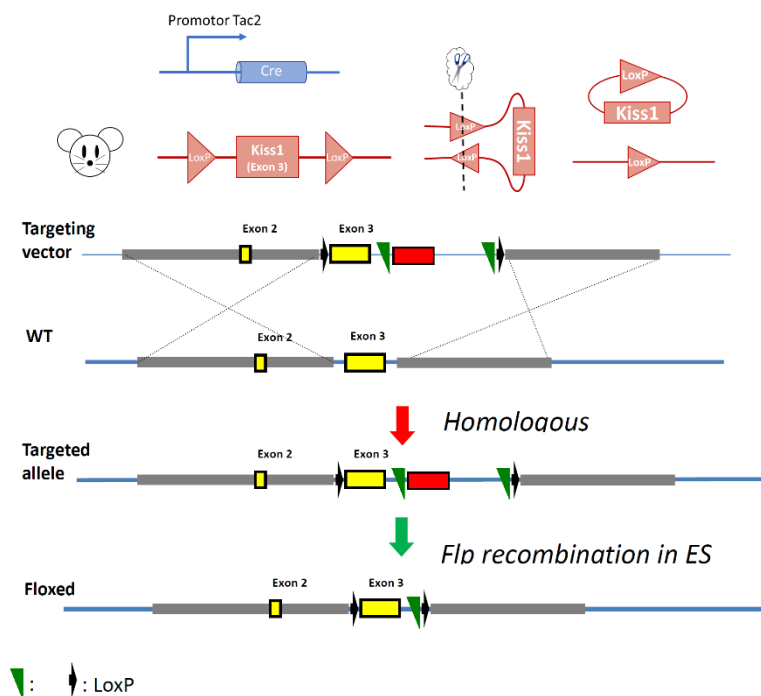


Figura 11. Esquema de la generación del modelo TaKKO, con eliminación del exón 3 del gen *Kiss1* específicamente en neuronas *Tac2* mediante el sistema Cre-LoxP. El exón 3 del gen *Kiss1* floxed en ratón puede ser eliminado cuando se cruza con la línea Cre.



Para los estudios fenotípicos llevados a cabo en esta Tesis se han comparado dos genotipos: control (WT) y TaKKO (*Tac2Kiss1* KO). De una parte, para comprobar el genotipo de los ratones se realizó un análisis por PCR del ADN genómico aislado a partir de tejido procedente de oreja. Los cebadores utilizados para la detección de Cre en *Tac2* fueron: Cre*Tac2* WT Rv: 5'-GAG ATG TGG TTC CTG GCT GT -3' y Cre*Tac2* plus: 5'-GGA TTG GGA AGA CAA TAG CAG G -3'; mientras que la pareja de cebadores utilizada para la detección del alelo WT, es decir, ausencia de Cre fueron: Cre*Tac2* WT Fw: 5'-CGA CGT GGT TGA AGA GAA CA -3' y Cre*Tac2* WT Rv: 5'-GAG ATG TGG TTC CTG GCT GT -3'. Por otra parte, para detectar el alelo *Kiss1* Floxado, los cebadores utilizados fueron: *Kiss1*-Flox Fw: 5'- AAT GAG CAC GTA TTG GAG CC -3' y *Kiss1*-Flox Rv 5'-TGC TAG GTC CTC AAA CGC AG -3'. La reacción de PCR consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 min seguido de un número variable de ciclos de amplificación que incluían, una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un anillamiento a una temperatura específica de 55°C para Cre*Tac2* y 58°C para *Kiss1*flox, durante 30 segundos, y una extensión a 72°C durante 1 min. A continuación, se aplicó un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 min. El resultado de la amplificación da lugar en el caso de Cre a una banda de 570pb para el alelo WT y una banda de 379pb para el alelo Cre en *Tac2*, mientras que el alelo floxado de *Kiss1* da lugar a una banda de 371pb (**Figura 12**).

De otra parte, se evaluó la eliminación del exón 3 del gen *Kiss1*, por PCR en tejidos específicos, POA, ARC y Córtex, en el ARC de ratones TaKKO. Los cebadores utilizados para detección de la banda recombinante fueron: *Kiss1*-Flox FW: 5'- AAT GAG CAC GTA TTG GAG CC -3' y Rev2093 (tras el exón 3): 5'-TAA GCC GTT GGG TTG GAC TC -3'. La reacción de PCR consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 min seguido de un número variable de ciclos de amplificación que incluían, una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un anillamiento a una temperatura específica 59°C, durante 30 segundos, y una extensión a 72°C durante 1 min; seguido de un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 min. El resultado de la amplificación dio lugar a una banda detectable (debido a la eliminación del exón 3) de 500pb (**Figura 12**). Nuestros análisis determinaron que la eliminación del exón 3 sólo se produjo en ARC (banda recombinante) y no en el resto de tejidos analizados.

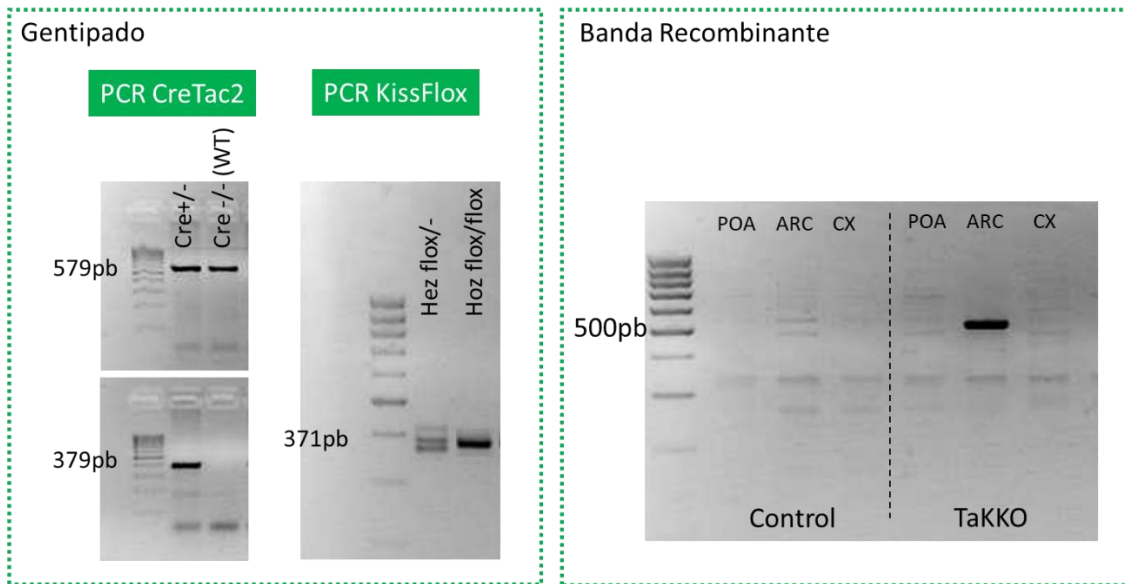


Figura 12. Panel izquierdo: producto del genotipado de las PCR para CreTac2 y Kiss1FloX. Panel derecho: banda recombinante resultado de la eliminación del exón 3 en Kiss1 presente únicamente en el ARC de ratones TaKKO.

## 2. Drogas y reactivos

La Kp-10 (Kisspeptina110-119-NH<sub>2</sub>) de ratón fue obtenida de Phoenix Pharmaceuticals Ltd. (Belmont, CA, USA) y disuelta en solución salina (NaCl 0.9%). La testosterona (cat# 86500-5G) y el 17- $\beta$ -estradiol (cat# E8875-5G) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Saint Louis, MI, USA) y diluidos en aceite puro de oliva virgen extra. Por último, glucosa (cat# G5767) e insulina (cat# 12643) fueron obtenidas de Sigma Aldrich.

## 3. Procedimientos generales

### 3.1. Canulación y administración intracerebroventricular de drogas

Para llevar a cabo los estudios farmacológicos, los ratones fueron canulados icv 48 horas previas al inicio del tratamiento correspondiente, con el fin de permitir la administración en el ventrículo lateral de los compuestos. Las cánulas (INTRAMEDIC 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 [229]. Una vez canulados, los animales fueron alojados en

jaulas individuales hasta la finalización de los experimentos. Las dosis de los diferentes compuestos se administraron en un volumen final de 5  $\mu$ l.

### **3.2. Gonadectomía y reemplazamiento hormonal**

Cuando el diseño experimental así lo requería (bloque experimental 1), se sometió a los animales a gonadectomía (GDX) y reemplazamiento de esteroides gonadales. Para ello los ratones fueron anestesiados por inhalación con isoflurano 1000 mg/g (FATRO) y sometidos a una gonadectomía bilateral por vía abdominal seguido de un reemplazamiento hormonal dos semanas previas al tratamiento. El reemplazamiento consistía en un implante subcutáneo de una cápsula de SILASTIC (Dow Corning, Milland, MI, USA), que contenía testosterona (5 mg/ml) en el caso de los machos y  $17\beta$  estradiol (10  $\mu$ g/ml) en el caso de las hembras. Las características de las cápsulas son las siguientes: longitud total de 1,5 cm; longitud efectiva de 1cm; diámetro interno de 1,98 mm y diámetro externo de 3,18 mm.

### **3.3. Análisis de composición corporal y parámetros metabólicos**

La composición corporal fue medida mediante una resonancia magnética cuantitativa con un EchoMRI™ 700 analyzer (Houston, TX, software v.2.0).

Para analizar distintos parámetros metabólicos tales como el gasto energético, el coeficiente respiratorio (RQ) y la actividad locomotora se utilizó el equipo Oxilet pro: Intake & Activity (LE1335), O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Analyzer (LE405) y Air switch and Flow checking (LE4004FL), número de serie 1791914 de Harvard Apparatus. El gasto energético se expresa como kilocalorías consumidas por día. El RQ, definido como el volumen de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) liberado sobre el volumen de oxígeno (O<sub>2</sub>) consumido durante la respiración, es una forma de calorimetría indirecta que da información sobre el tipo de reserva energética utilizada para la actividad metabólica, que pueden ser bien grasas, carbohidratos o proteínas. Por último, se analizó igualmente la actividad locomotora que determina el movimiento del animal en un plano horizontal.

### **3.4. Procesamiento de muestras**

Al finalizar los procedimientos experimentales, los ratones fueron anestesiados y sometidos a eutanasia por decapitación. Los tejidos, empleados posteriormente para análisis de ARN fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento. El hipotálamo fue diseccionado mediante un corte horizontal de 2 mm de profundidad, utilizando como límites 1 mm anterior al quiasma óptico,

y 1mm posterior al borde de los cuerpos mamilares y a las fisuras hipotalámicas, siguiendo protocolos previamente establecidos en el laboratorio, según lo recogido en la literatura científica [229].

Para la determinación hormonal en suero, se obtuvieron muestras de sangre de los animales mediante punción yugular. Las muestras de suero se separaron por centrifugación a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se almacenaron a -20°C hasta que se utilizaron para los ensayos hormonales.

### **3.5. Genotipado**

En primer lugar, se llevó a cabo la extracción y aislamiento de ADN genómico a partir de tejido procedente de oreja del ratón. El tejido se sometió a un proceso de digestión en una solución de lisis (1M Tris pH 8,5; 0,5M EDTA pH 8; 1M Cloruro Sódico (NaCl); SDS 10%), durante 2 horas a 55°C, para llevar a cabo la ruptura de las membranas celulares y la degradación de las proteínas. Una vez completado el proceso de digestión, se centrifuga la muestra 5 minutos a 12000 rpm y se recoge el sobrenadante que contiene el ADN genómico. A continuación, el ADN genómico se precipita con isopropanol y se realiza un lavado con etanol al 70%. Posteriormente, el ADN genómico se seca y se reconstituye en 50 µl de agua libre de nucleasas.

En segundo lugar, la amplificación de las correspondientes secuencias para cada alelo en cada modelo animal se llevó a cabo por PCR en un termociclador T100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para la realización de las reacciones de PCR se emplearon 4 µl de la dilución final del ADN genómico. La mix utilizada para cada muestra es la siguiente: 10 µl de tampón de PCR (5X Green GoTaq Flexi Buffer. Promega), 4 µl de 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 2 µl de 5 mM dNTPs (Canvax), 1 µl del cebador específico 10 mM, 0.25 µl de ADN polimerasa (GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase. Promega) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 50 µl.

Los fragmentos generados por PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% en solución TBE 1X (TBE 10X: 10% Tris-HCl, 5% ácido bórico y 4% EDTA) y visualizados con bromuro de etidio (1 µg/ml).

### **3.6. Extracción de ARN y retrotranscripción (RT)**

El ARN total de los tejidos se extrajo empleando un kit comercial de extracción de ARN (FavorPrep, Tissue Total RNA Mini Kit. FAVORGEN) siguiendo las condiciones establecidas por el fabricante.

El ARN total fue cuantificado en un espectrofotómetro ND-1000 v3.5.2 (Nanodrop Technology®, Cambridge, UK). Las reacciones de RT se llevaron a cabo utilizando el kit iScript cDNA Synthesis (1708891; Bio-Rad Laboratories Inc., USA) a partir de 1 µg de ARN total. La RT mix para cada muestra consiste en: 1 µg de ARN, 4 µl del mix de reacción de la iScript 5x, 1 µl de la enzima transcriptasa inversa iScript y agua libre de nucleasas para un volumen final de 20 µl. A continuación, la mix es incubada en un termociclador T100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) siguiendo el siguiente protocolo: 5 minutos a 25°C (priming), 20 minutos a 46°C (RT) y 1 min a 95°C (inactivación de la RT). Finalmente, el ADNc obtenido en cada una de las muestras fue diluido en agua libre de nucleasas en un volumen final de 100 µl y almacenadas a -20°C.

### **3.7. PCR cuantitativa a tiempo real**

Para llevar a cabo las reacciones de PCR a tiempo real se utilizó el sistema de detección CFX Real-Time - C1000™ Thermal-Cycler (Bio-Rad). El ADNc de cada muestra obtenido de la RT se incluyó por duplicado empleando 5 µl de la dilución final de la RT. Para la reacción de amplificación, se usó SYBR Green (BRYT Green. GoTaq qPCR Master Mix 2x. Cat# A6001/2. Promega) como marcador fluorescente. La mix para cada muestra contiene: 5 µl de ADNc, 6,25 µl de GoTaq Master Mix, 0,5 µl del cebador correspondiente 10mM y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 15 µl. En todos los casos se incluyó un control negativo para cada señal que no produjo ninguna amplificación.

Para los análisis de expresión de los distintos genes estudiados se utilizaron las siguientes parejas de cebadores: POMC forward: 5'- TGA AAA CCC CCG GAA GTA CG -3'; POMC reverse: 5'- ACG TTG GGG TAC ACC TTC AC -3'; CART forward: 5'- ATC GGG AAG CTG TGT GAC TG -3'; CART reverse: 5'- TCT CTG AGG GGA ACG CAA AC -3'; NPY forward: 5'- CAG AAA ACG CCC CCA GAA CAA GG -3'; NPY reverse: 5'- GGC AGA CTG GTT TCA GGG GAT GGA T -3'; AgRP forward: 5'- AAG CTC AGG GCA CAA GAG AC -3'; AgRP reverse: 5'- CAG TGC CAA CAG CAG ACC AC -3'. UCP1 forward (5'-GCC GGG TTT TGC ACC ACA CT-3'); UCP1 reverse (5'-CCA GGA CCC GAG TCG CAG AA-3'); UCP3 forward (5'-ACC ATG GTT GGA CTT CAG CC-3'); UCP3 reverse (5'-TGG GTT CTC CCC TTG GAT CT-3'). Las condiciones usadas para las reacciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial y activación de la enzima a 95°C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento 57°C (excepto para NPY donde la temperatura de anillamiento fue 62°C y para UCP1 y UCP3, donde la temperatura de anillamiento fue 60°C)

durante 30 segundos y una extensión de 72°C durante 1 minuto. Los valores obtenidos fueron normalizados mediante la amplificación de un fragmento de ARNm de la proteína ribosomal S11 (RP-S11) como control interno. Los cebadores empleados fueron: RP-S11 forward: 5'-CAT TCA GAC GGA GCG TGC TTA C -3' y RP-S11 reverse: 5'-TG CAT CTT CAT CTT CGT CAC -3'. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial y activación de la enzima a 95°C durante 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillamiento 58°C durante 30 segundos y una extensión de 72°C durante 10 segundos.

### **3.8. Determinaciones hormonales**

Los niveles plasmáticos de leptina se cuantificaron utilizando un kit comercial de Radioinmunoensayo (RIA) (Multi-species leptin RIA kit. Cat# XL-85K) obtenido de Merck Millipore; la sensibilidad del ensayo fue de 0,5ng/ml. Los niveles de insulina fueron medidos con un kit de LINCO Research con una sensibilidad de 0,1 ng/ml. Por otra parte, los niveles hormonales de LH y FSH circulantes se determinaron utilizando kits de RIA proporcionados por el National Institutes of Health, NIH (Dr. Parlow, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases National Hormone and Peptide Program, Bethesda, MD, USA). Las hormonas suministradas por el NIH (LH-I-10, FSH-I-9) fueron marcadas con I<sup>125</sup> mediante el método de Iodo-gen (Pierce Chemical Col., Rockford, IL) y las concentraciones de gonadotropinas fueron expresadas usando como referencia una preparación de LH-RP-3 y FSH-RP-2. La sensibilidad del ensayo fue de 75 pg/mL para LH y 0.4 ng/mL para FSH. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de ambas hormonas, fueron menores del 8 y 10%, respectivamente.

Además, se determinaron en plasma los niveles de testosterona, dihidrotestosterona (DHT) y androstenediona en machos, mientras que en hembras se midieron los niveles de estradiol y progesterona. Para ello se ha utilizado el método de espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía de gases (GC-MS/MS), descrito previamente en la literatura [230]. El límite mínimo de detección para el ensayo fue: 4 pg/mL para testosterona, 1,6 pg/mL para DHT, 4 pg/mL para androstenediona, 0,3 pg/mL para estradiol y 8 pg/mL para progesterona.

### 3.9. Hibridación in situ

Para el análisis de la expresión génica y la distribución neuroanatómica de Kiss1 y Tac2 en los núcleos ARC y AVPV de los tejidos hipotalámicos obtenidos de los diferentes grupos experimentales, se utilizó la técnica de hibridación in situ (ISH). Para ello se cortaron 5 series de secciones hipotalámicas (20 µm) en un criostato utilizando portaobjetos específicos para la adhesión de los cortes en frío SuperFrost Plus (Thermo Fisher Scientific Inc.) y guardados a -80°C hasta su análisis. Las coordenadas seleccionadas durante el proceso de corte de las secciones son elegidas con el fin de obtener una representación de toda el área hipotalámica que contienen nuestras señales diana (Kiss1 y Tac2) localizadas entre el área rostral hipotalámica y la comisura blanca posterior (epitalámica) [229].

En el desarrollo de esta técnica se emplearon ribosondas antisentido específicas para el ARNm de Kiss1 y Tac2 de ratón. En este sentido, para la detección de Kiss1 se utilizó una ribosonda localizada entre los nucleótidos 82 y 371 del ADN genómico (Genbank: NM 181692.1) y en el caso Tac2 entre los nucleótidos 177 y 440 del ADN genómico (GenBank: NM\_009312). Para su generación, en primer lugar, se fabricó un molde de ADN mediante PCR utilizando primers específicos para cada gen modificados en su extremo 5' con las secuencias específicas de los promotores para las polimerasas del bacteriófago T3 y T7. Para Kiss1, las secuencias de los primers sentido y anti-sentido son: T3-Kiss1 FW (5'-CAG AGA TGC AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GAT GGT GAA CCC TGA ACC CAC A-3') y T7-Kiss1 RV (5'-CCA AGC CTT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA ACC TGC CTC CTG CCG TAG CG-3'). Para la generación de la sonda de Tac2, los primers sentido y anti-sentido empleados son los siguientes: T3-Tac2 FW (5'-CAG AGA TGC AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GAA GGG AGG GAG GCT CAG TAA G-3') y T7-Tac2 RV (5'-CCA AGC CTT CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA TTT GAG GAT GCC AAA GCT G-3').

La reacción de PCR se realizó utilizando una polimerasa (Go Taq flexi DNA; Promega Biotech), siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando un termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con el siguiente protocolo: 5 minutos de desnaturalización a 95° C seguida de 4 ciclos con las siguientes condiciones cada uno: 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 54° C y 2 minutos a 72° C; a continuación se aplican 35 ciclos con los siguientes pasos: 1 minuto de desnaturalización inicial a 94° C, 1 minuto a 65° C para el

anillamiento y 72° C de extensión durante 30 segundos y finalmente, se realiza una extensión adicional a 72° C durante 5 minutos.

El producto de esta PCR se separa mediante un gel de agarosa al 2% y se purifica la banda específica para *Kiss1* o *Tac2* mediante un kit de extracción de ADN (QiaQuick gel extraction kit; Qiagen). Por último, para la generación de la ribosonda de nuestro gen diana (*Kiss1* o *Tac2*), el fragmento purificado en el paso anterior es utilizado como molde para una reacción de transcripción in vitro con las características que se detallan a continuación: en un volumen final de 20 µl, se añaden 250 mCi de [33P]-UTP (Perkin Elmer, Massachusetts, USA), 0.5 µg del molde purificado en el paso anterior, 2 µl de 3NTPs (5 mM rATP, rCTP y rGTP), 1 µl de inhibidor de RNAasa (Promega), 4 µl de buffer de transcripción (Promega), y 2 µl de T7 RNA polimerasa (Promega). Tras 120 min de incubación a 37° C se añade 1 µl T7 RNA polimerasa (Promega) y se incuba a 37° C durante una hora más. Tras este proceso de transcripción, todo el ADN residual es digerido mediante la adición de 2 µl de DNAasa (Promega), durante 30 minutos, parándose dicha reacción con 3 µl de 0.5 M EDTA, pH 8.0 y se completa el volumen final hasta 50 µl con agua libre de nucleasas. La purificación de la ribosonda tras la reacción de transcripción se realiza mediante microcolumnas Illustra™ ProbeQuant™ G-50 (GE Healthcare, UK).

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

La hibridación de la ribosonda tanto para *Kiss1* como para *Tac2* en el tejido hipotalámico se realizó durante 16 horas a 55°C. La solución de hibridación contenía 4x SCC (Tampón citrato sódico salino), 50% de formamida desionizada, 1x solución Denhardt's y 50% de dextrán sulfato. A esta solución de hibridación se añade la ribosonda desnaturalizada a una concentración de 0.03 pmol/ml junto con ARNt (10mg/ml).

Después de la hibridación, se lavaron las secciones mediante agitación en 4x SCC durante 30 min, se incubaron a 37°C en una solución de 10 mg/ml de ARNasa A (Roche Biochemical) durante 1 hora, se volvieron a lavar en 0.1x SCC en agitación durante 1 hora a 65°C y, finalmente, se realizó una



deshidratación en series crecientes de etanol. Tras 1 hora de secado a temperatura ambiente, los cortes fueron sumergidos en emulsión Kodak Autoradiography type NTB (Eastman Kodak), secados y conservados a 4°C durante una semana protegidos de la luz. Tras este periodo de tiempo, los cortes fueron revelados siguiendo las instrucciones del proveedor (3 min en Kodak Dektol Developer; 10 seg en agua destilada; 5 min en Kodak Fixer; 5 min en agua destilada). Para el montaje de las secciones, en primer lugar, se realiza una deshidratación seriada en etanol seguida de dos lavados SUB-X (Sigma) y se emplea un medio de montaje específico (SUB-X mounting medium; Sigma).

Para el estudio cuantitativo, las principales secciones hipotalámicas con expresión del ARNm de Kiss1 o Tac2 fueron analizadas utilizando un microscopio de campo oscuro acoplado a una cámara de vídeo. Los resultados fueron expresados como el número de células (agrupaciones de granos de plata) presentes en los distintos núcleos o áreas hipotalámicas estudiadas, que fueron el núcleo ARC y el AVPV.

#### **4. Diseños experimentales**

##### **Bloque experimental I. Estudios farmacológicos del impacto de la Kisspeptina-10 en la regulación de la homeostasis metabólica.**

###### **Estudio I - 1. Análisis de los efectos de la administración central de kisspeptina en control de la homeostasis metabólica.**

Con el objetivo de poder evaluar el posible papel de las kisspeptinas sobre la regulación del metabolismo y la homeostasis energética se realizaron una serie de experimentos en los que se analizaba el efecto de la administración de kisspeptina a nivel central sobre distintos parámetros metabólicos.

Para evaluar el papel directo de las kisspeptinas, independientemente de la fluctuación de esteroides sexuales, ratones WT de la cepa C57BL6J, de ambos sexos, de 4 meses de edad fueron gonadectomizados y suplementados con una concentración determinada de esteroides, testosterona (5mg/ml) en el caso de los machos y 17  $\beta$  estradiol (10 $\mu$ g/ml) en el caso de las hembras [168]. La gonadectomía se realizó dos semanas previas al inicio del tratamiento. El tratamiento consistió en la administración diaria icv de vehículo (Veh, salino) o

1 nmol de Kp-10 durante un periodo de 11 días (**Figura 13**). A continuación, se describen los diferentes experimentos llevados a cabo durante el tratamiento.

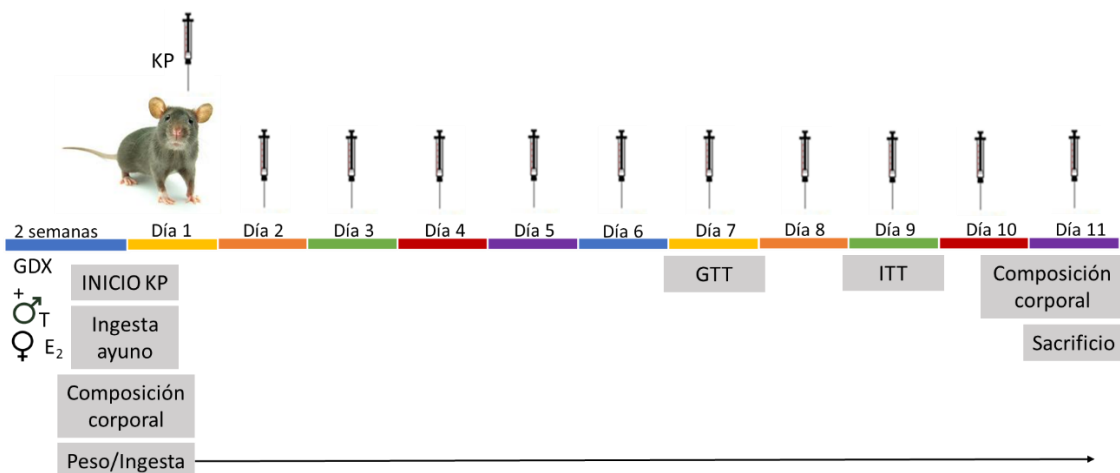


Figura 13. Representación esquemática del protocolo experimental en el Estudio I - 1.

**Experimento 1.** El día 1 de tratamiento con Kp-10 se comenzó a monitorizar el peso corporal, que fue medido diariamente hasta el día 7 de tratamiento. Adicionalmente se llevaron a cabo análisis de composición corporal al inicio y al final del tratamiento, determinando la grasa corporal y la masa magra total mediante un equipo de resonancia magnética cuantitativa (EchoMRI).

**Experimento 2.** La ingesta acumulada cada 24h se monitorizó de manera manual siguiendo los protocolos estándar de nuestro laboratorio [231], desde el día 1 hasta el día 7 de tratamiento. Además, para evaluar la respuesta a corto plazo de las kisspeptinas sobre ingesta, el día 1 de tratamiento los animales fueron sometidos a un ayuno de 4h y a continuación se realizó un test en el que se determinó la ingesta a 1, 2, 3, 4, 6 y 24h tras la administración central de kisspeptina tanto en la fase de luz (inicio del ayuno a las 9:00h e inicio del test a las 13:00h) , como en oscuridad.

**Experimento 3.** Con el fin de analizar la implicación de las kisspeptinas en el control de diversos parámetros implicados en la regulación del metabolismo energético, se determinaron el gasto energético, el coeficiente respiratorio (RQ ratio) y la actividad locomotora en un periodo de 24h. Para ello, los animales fueron alojados en unas jaulas metabólicas durante un periodo de 72h, (48h de habituación y 24h de registro de datos) (**Figura 14**). Durante todo el periodo los animales fueron inyectados icv con 1nmol de Kp10 cada 24h.

Adicionalmente al final del tratamiento los animales fueron sacrificados y se obtuvo el peso del tejido adiposo marrón (BAT) como marcador indirecto de termogénesis.

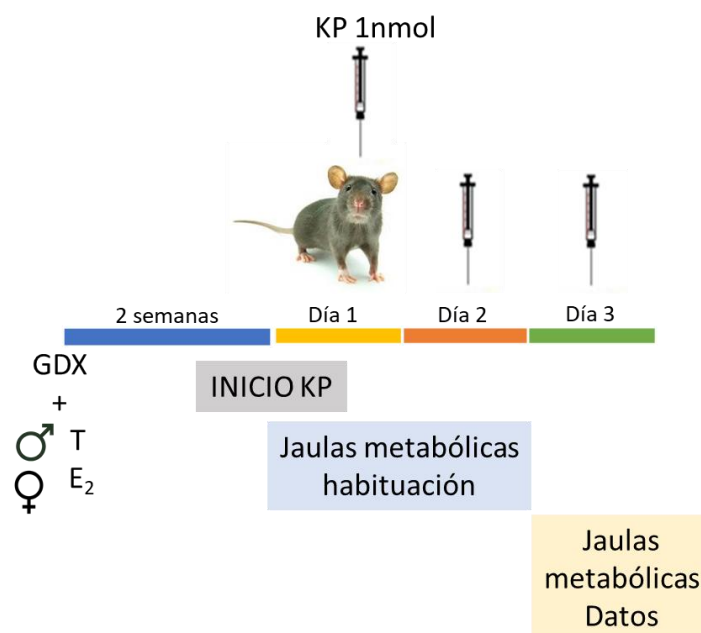


Figura 14. Representación esquemática del diseño experimental en el experimento 3.

**Experimento 4.** Para evaluar la implicación de la administración central de kisspeptinas en el control de la homeostasis de la glucosa, se llevó a cabo un test de tolerancia a la glucosa (GTT) y un test de tolerancia a la insulina (ITT) los días 7 y 9 del tratamiento respectivamente. En ambos casos los ratones fueron previamente sometidos a un ayuno de 4 h, con el objetivo de evitar diferencias individuales en los niveles de glucosa. En primer lugar, los ratones fueron inyectados icv con 1 nmol de Kp-10 (tiempo 0) y tras 10 minutos post-administración, recibieron un bolo intraperitoneal (ip) de glucosa (2 g/kg de peso corporal) o de insulina (0,75UI). En ambos casos, se determinaron los niveles de glucosa antes (basal= tiempo 0) y a los 20, 60 y 120 minutos tras la administración de glucosa o insulina (**Figura 15**). La concentración de glucosa fue medida utilizando un glucómetro ACCU-CHECK Aviva (Roche Diagnostics). Los cambios en los niveles de glucosa han sido estimados mediante el método trapezoidal y representados como el perfil y el área bajo la curva (AUC) durante el periodo de 120 minutos.

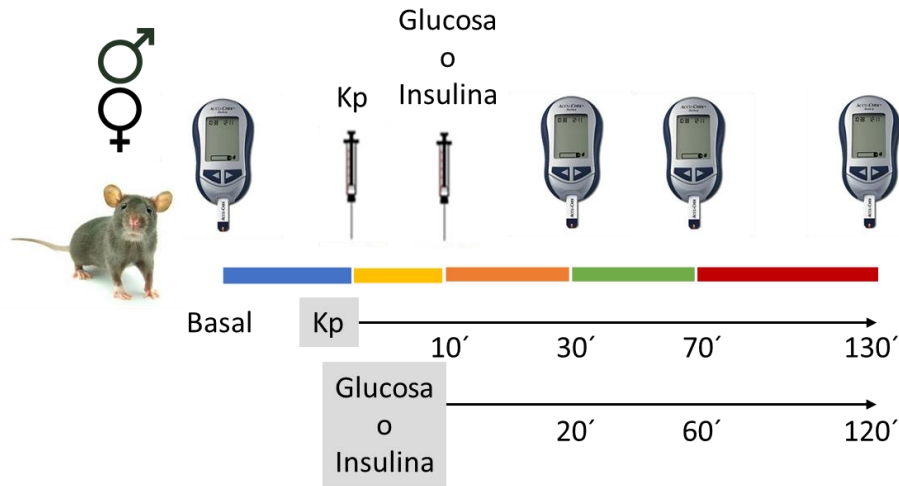


Figura 15. Representación esquemática de los tests de tolerancia a glucosa e insulina.

### **Estudio I - 2. Análisis de los efectos de la administración periférica de kisspeptina en control de la homeostasis metabólica.**

Con el objetivo de evaluar la respuesta metabólica a la administración periférica de kisspeptinas, análisis similares a los realizados en el estudio 1 se llevaron a cabo en ratones C57BL6J macho y hembra, que fueron gonadectomizados y reemplazados con testosterona (5mg/ml) o 17  $\beta$  estradiol (10 $\mu$ g/ml) respectivamente. La gonadectomía se realizó dos semanas previas al inicio del tratamiento, el cual consistió en la administración diaria ip de 3 nmol de Kp-10 durante un periodo de 11 días. En los **experimentos del 5 - 8** parámetros metabólicos como evolución del peso corporal y la ingesta (a corto y largo plazo), gasto energético, RQ, actividad locomotora y metabolismo de la glucosa fueron analizados siguiendo los mismos procedimientos descritos en el **Estudio I - 1**.

**Bloque experimental II. Efectos de la señalización de Kisspeptinas frente a los efectos de los esteroides gonadales en el control de la homeostasis energética. Estudios en el modelo Gpr54<sup>-/-</sup>Tg.**

**Estudio II - 1. Evaluación de parámetros metabólicos en ratones Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-</sup>T con dieta control.**

**Experimento 9.** En primer lugar, se realizó una caracterización básica del modelo en la que se determinó los niveles de LH y FSH, así como el perfil de esteroides gonadales tanto en ratones macho y hembra Gpr54<sup>-/-</sup>, con ausencia total de señalización por kisspeptinas y totalmente hipogonadales, como ratones Gpr54<sup>-/-</sup>Tg los cuales tienen ausencia de señalización por kisspeptinas excepto en neuronas GnRH y rescate de la función gonadal. Para ello, se obtuvieron muestras de sangre en ratones macho y hembra adultos y se midieron por una parte los niveles en plasma de LH y FSH por RIA, y por otra parte se determinaron los niveles de testosterona, dihidrotestosterona (DHT) y adicionalmente androstenediona en machos, y los niveles de estradiol y progesterona en hembras mediante espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía de gases (GC-MS/MS).

**Experimento 10.** A fin de avanzar en el estudio del papel fisiológico de la señalización de kisspeptinas sobre parámetros metabólicos clave, como son el peso y la composición corporal y los niveles de leptina (como marcador adicional de adiposidad), se llevaron a cabo análisis comparativos de dichos parámetros entre ratones con tres genotipos diferentes: Gpr54<sup>+/+</sup> (control WT), Gpr54<sup>-/-</sup>, con ausencia total de señalización por kisspeptinas y totalmente hipogonadales por lo que los niveles de esteroides sexuales son muy bajos o nulos, y ratones Gpr54<sup>-/-</sup>Tg, los cuales tienen ausencia de señalización por kisspeptinas excepto en neuronas GnRH, y presentan por tanto un rescate de la función gonadal, con niveles de esteroides gonadales preservados. Los experimentos se llevaron a cabo en ratones macho y hembra alimentados ad libitum con dieta control.

En primer lugar, se monitorizó el peso corporal semanalmente desde el destete a las 3 semanas de vida (21d) hasta la etapa adulta (semana 18 de vida). Al final de la monitorización, se llevaron a cabo análisis de composición corporal entre la semana 18 y 20 de vida. Para ello se empleó el equipo de resonancia magnética cuantitativa, realizándose determinaciones tanto de la grasa corporal como de la masa magra. Adicionalmente, en la semana 20 de vida, se tomaron muestras de sangre por punción yugular para posteriores análisis hormonales en suero, y de tejido adiposo marrón (BAT) y tejido adiposo blanco subcutáneo (WATsc) para posteriores análisis de expresión génica (**Figura 16**).

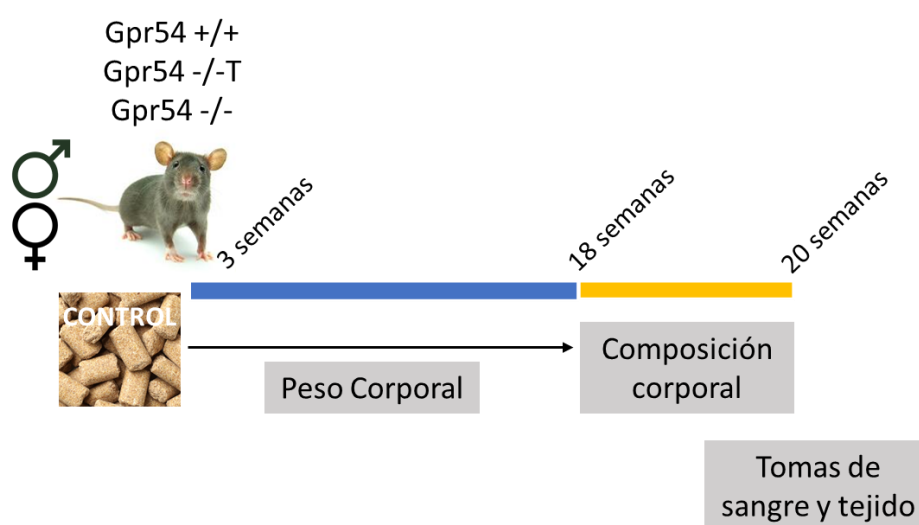


Figura 16. Esquema del protocolo experimental llevado a cabo en el experimento 10.

**Experimento 11.** Para discernir entre el papel de la señalización por kisspeptinas y el impacto de los esteroides gonadales en el control de los patrones de ingesta, se monitorizó la ingesta espontánea de ratones  $Gpr54^{-/-}$  y  $Gpr54^{-/-T}$  vs.  $Gpr54^{+/+}$  de ambos sexos. Los ratones fueron sometidos a un ayuno de 12h (fase de oscuridad) y posteriormente alimentados ad libitum con dieta control. La ingesta se recogió manualmente siguiendo los procedimientos estándar de nuestro laboratorio [231]. La ingesta acumulada se monitorizó durante un periodo de 24h, haciendo distinción entre el periodo de luz (de 9:00 a 19:00h) y el periodo de oscuridad (de 19:00 a 9:00 h) (**Figura 17**). Adicionalmente se midió el peso corporal antes y después del test de ingesta con el fin de analizar la eficiencia metabólica.

Adicionalmente, con el objetivo de profundizar en el conocimiento del efecto de las kisspeptinas en la regulación de la ingesta, se estudió la expresión hipotalámica mediante qPCR de genes claves en el control de las sensaciones de hambre y saciedad, como son *Pomc*, *Cart*, *Npy* y *Agrp*. Para ello se recogieron muestras de cerebro completo de ratones adultos macho y hembra de los tres genotipos ( $Gpr54^{+/+}$ ,  $Gpr54^{-/-Tg}$  y  $Gpr54^{-/-}$ ), se diseccionó el hipotálamo y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

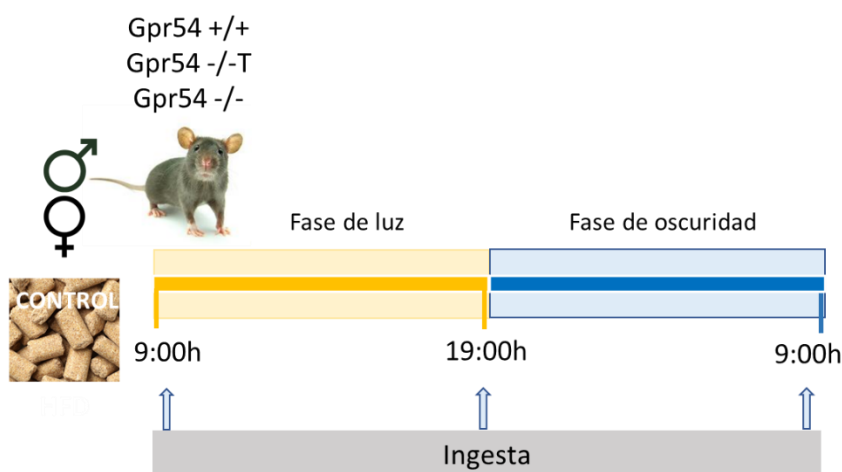


Figura 17. Representación esquemática del procedimiento llevado a cabo para la monitorización de los patrones de ingesta.

**Experimento 12.** Para evaluar la implicación de la señalización por kisspeptinas en el control de la homeostasis de la glucosa, se llevó a cabo un GTT en ratones macho y hembra adultos  $Gpr54^{-/-}$  y  $Gpr5^{-/-Tg}$  (**Figura 18**). Los ratones fueron sometidos a un ayuno de 4h y a continuación recibieron un bolo de glucosa (2 g/kg de peso corporal) ip. Los niveles de glucosa se determinaron antes (basal) y a los 20, 60 y 120 minutos tras la administración de glucosa. La concentración de glucosa fue medida utilizando un glucómetro ACCU-CHECK Aviva (Roche Diagnostics). Los cambios en los niveles de glucosa fueron estimados mediante el método trapezoidal, y representados como el área bajo la curva (AUC) durante el periodo de 120 minutos calculado sobre los niveles basales a tiempo 0 (basal).

Finalmente, dado los resultados obtenidos en el GTT, donde se encontraron perturbaciones en el manejo de la glucosa selectivamente en las hembras, se llevó a cabo un ITT en hembras de los tres genotipos. Los ratones

fueron sometidos a un ayuno de 4 h y se midieron los niveles de glucosa antes (basal) y a los 20, 60 y 120 minutos de la administración ip de insulina (0,75UI). Los cambios en los niveles de glucosa fueron estimados mediante el método trapezoidal y fueron representados como el perfil y el área bajo la curva (AUC) durante el periodo de 120 minutos tras la administración de insulina.

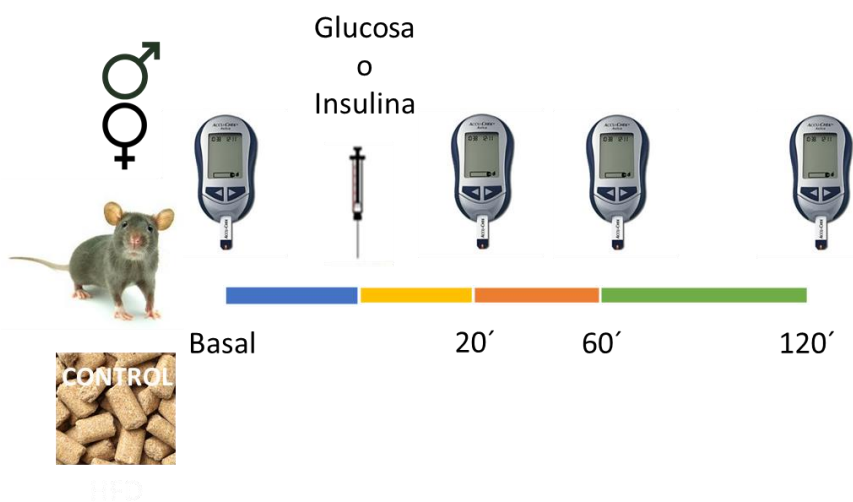


Figura 18. Representación esquemática de los test de tolerancia a glucosa e insulina en el experimento 12.

## Estudio II - 2. Evaluación de parámetros metabólicos en ratones $Gpr54^{-/-}$ y $Gpr54^{-/-}Tg$ en diferentes condiciones obesogénicas.

**Experimento 13.** Para evaluar el impacto de insultos obesogénicos sobre las funciones putativas de las kisspeptinas en el control de parámetros metabólicos clave, se realizaron análisis similares a los llevados a cabo en los experimentos 10, 11 y 12 en ratones machos y hembras de los tres genotipos ( $Gpr54^{+/+}$ ,  $Gpr54^{-/-}Tg$  y  $Gpr54^{-/-}$ ), sometidos, en este caso, a una dieta de alto contenido de grasa (HFD) desde el destete (21d) hasta la edad de 18 semanas (**Figura 19**). Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones similares a las de los estudios 10, 11 y 12, lo que permitió una comparación adecuada de los datos. La ganancia de peso corporal fue monitorizada semanalmente y los análisis de composición corporal se llevaron a cabo al final del período experimental. La monitorización de la ingesta de alimentos y el GTT se realizaron tras someter a los ratones a una dieta HFD durante un periodo de 11 semanas.



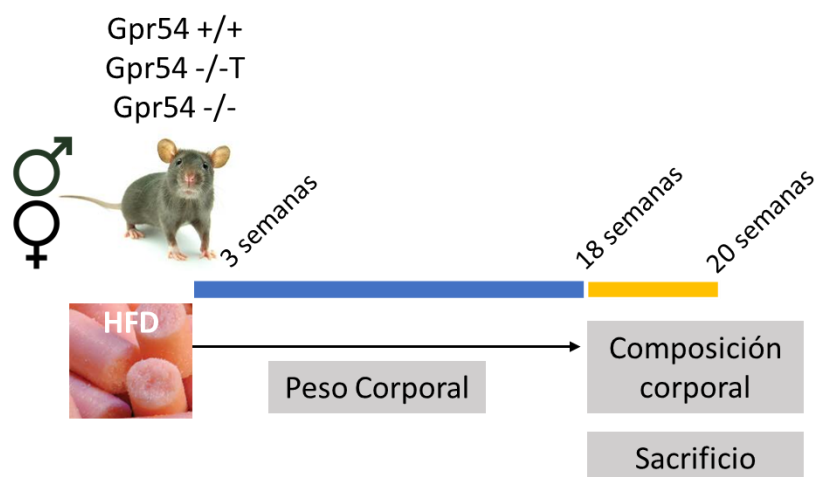


Figura 19. Representación esquemática del protocolo experimental llevado a cabo en el experimento 13.

**Experimento 14.** Por otra parte, se analizó además el efecto de otra manipulación obesogénica, como es la OVX, por sí sola o en combinación con HFD. Para ello se sometió a ratones hembra de los tres genotipos (Gpr54<sup>+/+</sup>, Gpr54<sup>-/-Tg</sup> y Gpr54<sup>-/-</sup>) a castración y alimentación con dieta control (OVX+CD) o bien castración y alimentación con una dieta HFD (OVX+HFD). Los parámetros de peso corporal, ingesta y tolerancia a glucosa fueron analizados de manera similar a los procedimientos descritos en los estudios 10, 11 y 12.

### **Bloque experimental III. Implicación de las neuronas Kiss1 del ARC en el control de la homeostasis metabólica. Estudios en el modelo TaKKO.**

#### **Estudio III – 1. Implicación de la señalización de kisspeptinas del ARC en la regulación de parámetros metabólicos.**

Dado que el núcleo ARC es un centro regulador clave de la homeostasis metabólica, la ingesta y el peso corporal, nos propusimos caracterizar el papel de las kisspeptinas producidas por las neuronas KNDy en el control de

parámetros clave para el metabolismo energético, utilizando para ello un modelo de ratón, TaKKO, con eliminación selectiva de *Kiss1* en aquellas neuronas del ARC que expresen *Tac2*.

**Experimento 15.** En primer lugar, se llevó a cabo una caracterización básica del modelo para comprobar la eliminación de *Kiss1* en las neuronas KNDy del ARC en el modelo TaKKO. Para ello, se realizó una ISH para detectar *Kiss1* en ARC en ratones macho y en ARC y AVPV en ratones hembra de dos meses de edad del genotipo TaKKO, y se compararon con los correspondientes ratones control. Adicionalmente, se llevó a cabo una caracterización básica de la funcionalidad del eje reproductor en los ratones TaKKO.

**Experimento 16.** Para evaluar el efecto de la ausencia de kisspeptinas producidas en el ARC sobre el peso y la composición corporal, ambos parámetros fueron analizados en ratones TaKKO macho y hembra, y sus correspondientes controles, a los 2, 4 y 6 meses de edad. El peso corporal se recogió manualmente siguiendo los protocolos habituales de nuestro laboratorio. La composición corporal se determinó mediante resonancia magnética cuantitativa haciendo distinción entre grasa corporal y masa magra. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con dieta control durante todo el periodo experimental.

**Experimento 17.** Para evaluar el papel de las kisspeptinas producidas en el ARC sobre la ingesta, se compararon ratones macho y hembra de los genotipos control y TaKKO alimentados con dieta control. Dado los resultados previos en los que las diferencias de peso y composición corporal entre ratones control y TaKKO fueron significativas a la edad de 4 meses, los siguientes parámetros analizados se llevaron a cabo a esta edad. Los ratones fueron alojados en jaulas metabólicas durante un periodo de 48h, de manera que las primeras 24h fueron de habituación y en las siguientes 24h se determinó la ingesta en fase de luz y oscuridad. Adicionalmente, se analizaron parámetros metabólicos clave, tales como son el gasto energético, el RQ (en fase de luz y oscuridad) y la actividad locomotora (en fase de luz y oscuridad).

**Experimento 18.** Por último, para evaluar la implicación de las kisspeptinas producidas en el ARC en el control de la homeostasis de la glucosa, se llevaron a cabo GTT e ITT en ratones de 4 meses de edad, machos y hembras, de los genotipos control y TaKKO. Los ratones fueron sometidos a un ayuno de 4h y a continuación recibieron un bolo ip de glucosa (2 g/kg de peso corporal) o insulina (0,75UI). Los niveles de glucosa se determinaron antes (basal) y a los

20, 60 y 120 minutos tras la administración de los compuestos. La concentración de glucosa fue medida utilizando un glucómetro ACCU-CHECK Aviva (Roche Diagnostics). A continuación, se determinaron los cambios en los niveles de glucosa mediante el método trapezoidal y se representaron el perfil y el área bajo la curva (AUC) durante el periodo de 120 minutos.

## **5. Presentación de datos y estadística**

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Prism (GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software, La Jolla, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Todos los datos fueron presentados como la media  $\pm$  SEM para cada grupo. Se aplicaron pruebas paramétricas para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En concreto, para evaluar la variación entre los grupos experimentales se realizó un test t-Student (para comparaciones entre dos grupos) o un ANOVA seguido de un test de rango múltiple de Student-Newman-Keuls (para comparaciones de más de dos grupos). El nivel de significación se estableció en  $P \leq 0.05$ .



# RESULTADOS

---



## Resultados

La presente Tesis Doctoral pretende abordar de una forma integral el análisis de los efectos metabólicos de las kisspeptinas mediante el empleo combinado de herramientas farmacológicas y de genómica funcional en modelos de ratón. Para ello, se han implementado un total de tres bloques de estudios experimentales que, para mayor claridad, son presentados de forma individualizada a continuación.

### **Bloque experimental I. Estudios farmacológicos del impacto de la Kisspeptina-10 en la regulación de la homeostasis metabólica.**

#### **Estudio I - 1: Análisis de los efectos de la administración central de kisspeptina en control de la homeostasis metabólica.**

Para evaluar el efecto de las kisspeptinas a nivel central sobre la regulación de la homeostasis energética, se realizó un tratamiento crónico (11 días) consistente en la administración diaria de Kisspeptina-10 (Kp, 1 nmol) o salino (Veh) vía icv en ratones adultos, machos y hembras, previamente castrados y reemplazados con esteroides gonadales (testosterona en el caso de los machos y  $17\beta$  estradiol en el caso de las hembras). Se analizó el perfil metabólico mediante la determinación de diversos parámetros, tales como el peso y composición corporal, la ingesta, el gasto energético, el coeficiente respiratorio y la actividad locomotora, y tolerancia a la glucosa, en todos los grupos experimentales.

En primer lugar, se analizó la evolución del peso corporal durante una semana tras el inicio del tratamiento con Kp-10, así como su posible efecto sobre la composición corporal, determinada por el porcentaje de grasa corporal y el porcentaje de masa magra de cada individuo. No se observaron cambios en el peso corporal en los animales, machos y hembras, inyectados con Kp-10 frente a los tratados con salino, empleados como control. En todo caso, en el caso de las hembras se observó una tendencia a la disminución de peso corporal en el grupo tratado con Kp-10 a partir del día 2 de tratamiento; sin embargo, este descenso no fue significativo. En cuanto a la composición corporal, tampoco se encontraron cambios en los niveles de adiposidad en ratones tratados con Kp-10, tanto en machos (**Figura 19**) como en hembras (**Figura 20**), que presentaron valores similares a los animales inyectados con vehículo al finalizar el

tratamiento. Sin embargo, en hembras se observó una disminución en el porcentaje de masa magra después del tratamiento crónico con Kp-10, en línea con lo observado en la evolución de peso corporal.

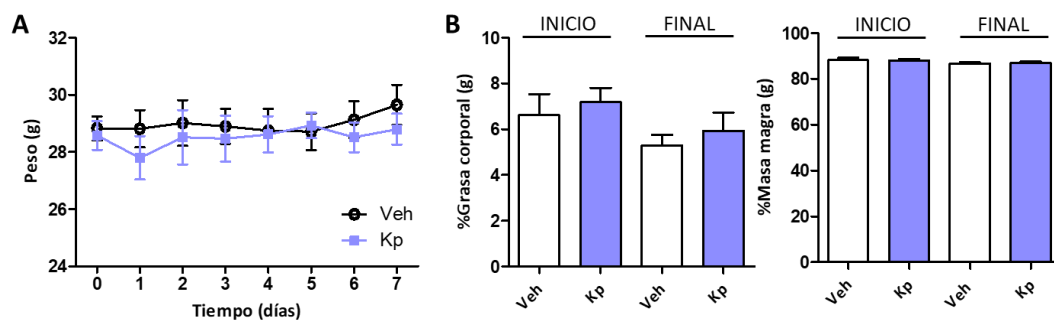


Figura 19. Evolución del peso (A) y composición corporal (B; porcentaje de grasa corporal y masa magra) en ratones macho inyectados con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh) icv. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.

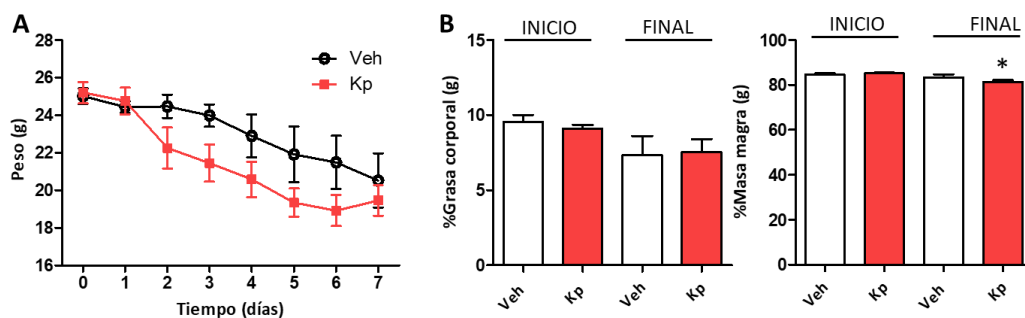


Figura 20. Evolución del peso (A) y composición corporal (B; porcentaje de grasa corporal y masa magra) en ratones hembra inyectados con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh) icv. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$  vs Kp; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Además del peso corporal, se monitorizó el efecto de la administración de Kp-10 sobre la ingesta a distintos tiempos, con el objetivo de diferenciar sus posibles efectos a corto y largo plazo. En ratones macho, si bien la ingesta diaria fue similar entre el grupo tratado con Kp-10 y el grupo control inyectado con veh durante los distintos días del tratamiento, si se observaron diferencias significativas en la respuesta de ingesta a corto plazo tras la administración icv



del Kp-10 (**Figura 21**). Así, tras un ayuno de 4 horas, se observó una evidente disminución de la ingesta en el grupo tratado con Kp-10, siendo especialmente significativa esta respuesta en la fase de oscuridad, en concreto entre 1h y 6h post-administración.

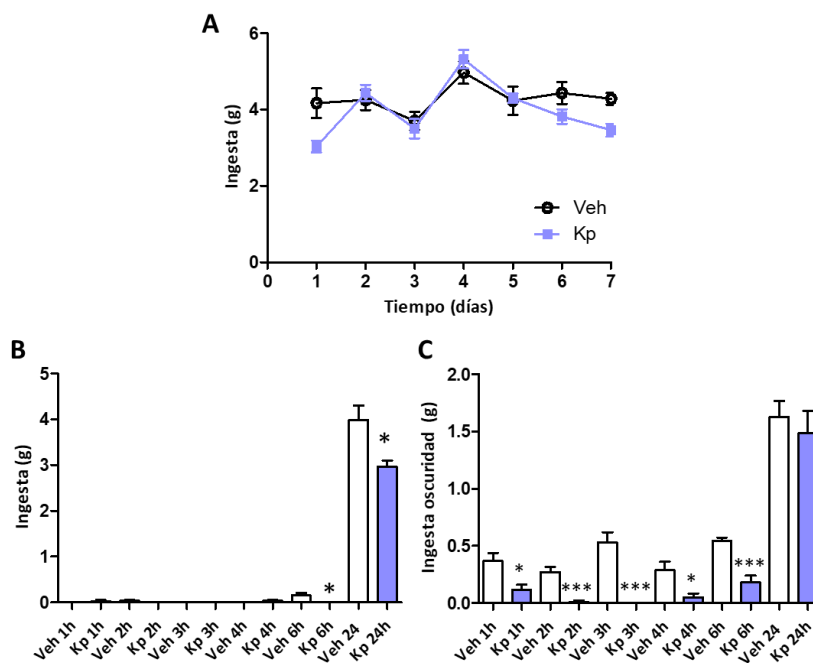


Figura 21. En (A), ingesta acumulada diaria tras la administración de un bolo diario de Kp-10 por un periodo de 7 días. En los paneles inferiores, respuestas agudas de ingesta a diferentes tiempos tras la administración de un bolo de Kp-10, en la fase de luz (B) u oscuridad (C). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs Veh; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

En el caso de las hembras, se detectó una tendencia, aunque no significativa, a disminuir la ingesta en el grupo tratado con Kp-10 durante todo el periodo de monitorización. Sin embargo, la monitorización a distintos tiempos de la ingesta en respuesta aguda a la administración de Kp-10 no identificó diferencias respecto del grupo control, a ninguno de los tiempos estudiados (**Figura 22**).

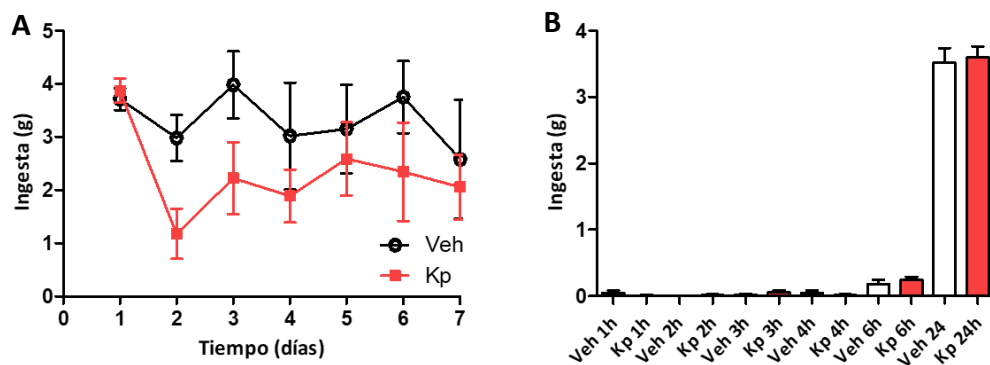


Figura 22. En (A), ingesta acumulada diaria tras la administración de un bolo diario de Kp-10 por un periodo de 7 días y respuesta aguda de ingesta a diferentes tiempos tras la administración de un bolo de Kp-10, en la fase se luz (B). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.

A fin de completar la caracterización del posible papel de las kisspeptinas en la regulación del metabolismo, se analizaron, de forma complementaria, una serie de parámetros, como el gasto energético (kilocalorías consumidas por día), la actividad locomotora y el coeficiente respiratorio (RQ, ratio  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ ), que da información sobre el tipo de reserva energética utilizada (grasas o carbohidratos).

En los machos tratados con Kp-10 se observó una disminución significativa en el gasto energético, que va acompañado de una disminución del peso del tejido adiposo marrón (BAT, como marcador indirecto de termogénesis) y de la actividad locomotora tanto en la fase de luz como en la fase de oscuridad. Además, se observó un incremento en el RQ por encima de 0.8, indicando el uso preferente de carbohidratos como fuente de energía (**Figura 23**).

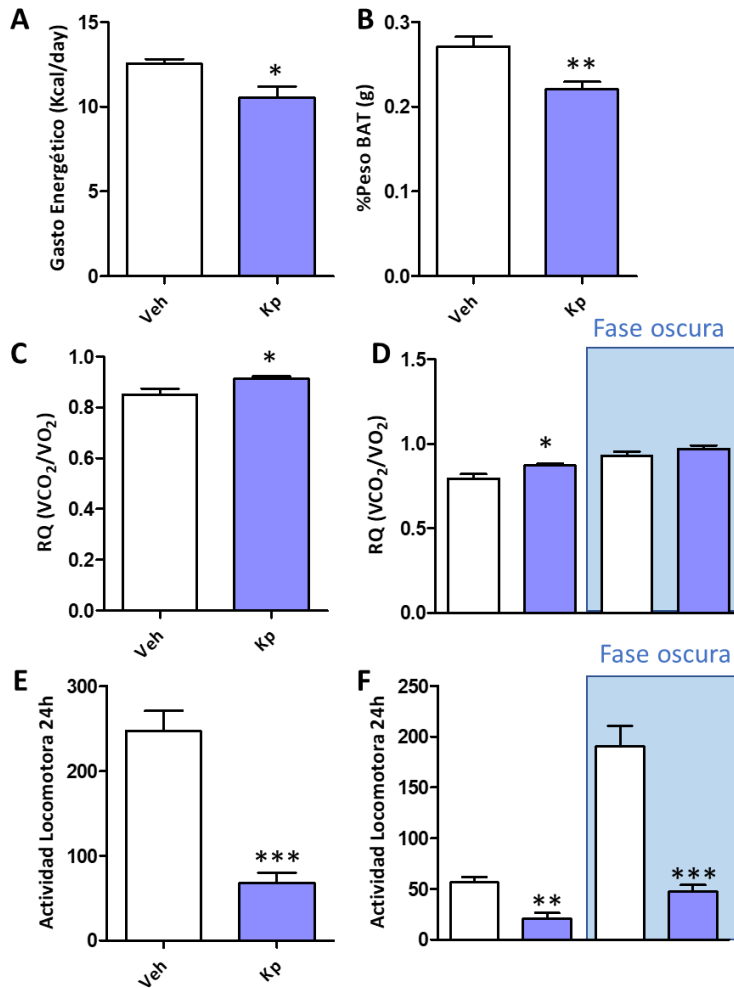


Figura 23. Parámetros metabólicos en ratones macho inyectados icv con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh). Representación del gasto energético (A), índice somático de BAT (% de peso BAT/ peso corporal) (B), el coeficiente respiratorio (RQ) total (C) y RQ en fase de luz y oscuridad (D), y actividad locomotora, tanto total (E) y como en las fases de luz y oscuridad (F). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs Veh; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Por el contrario, en los ratones hembra se observó un incremento estadísticamente significativo en la actividad locomotora, tanto en la fase de luz como en oscuridad, en los animales tratados con Kp-10, junto con un aumento de BAT como posible indicador de un aumento de la termogénesis. Sin embargo, en este caso el RQ fue similar en ambos grupos. (Figura 24).

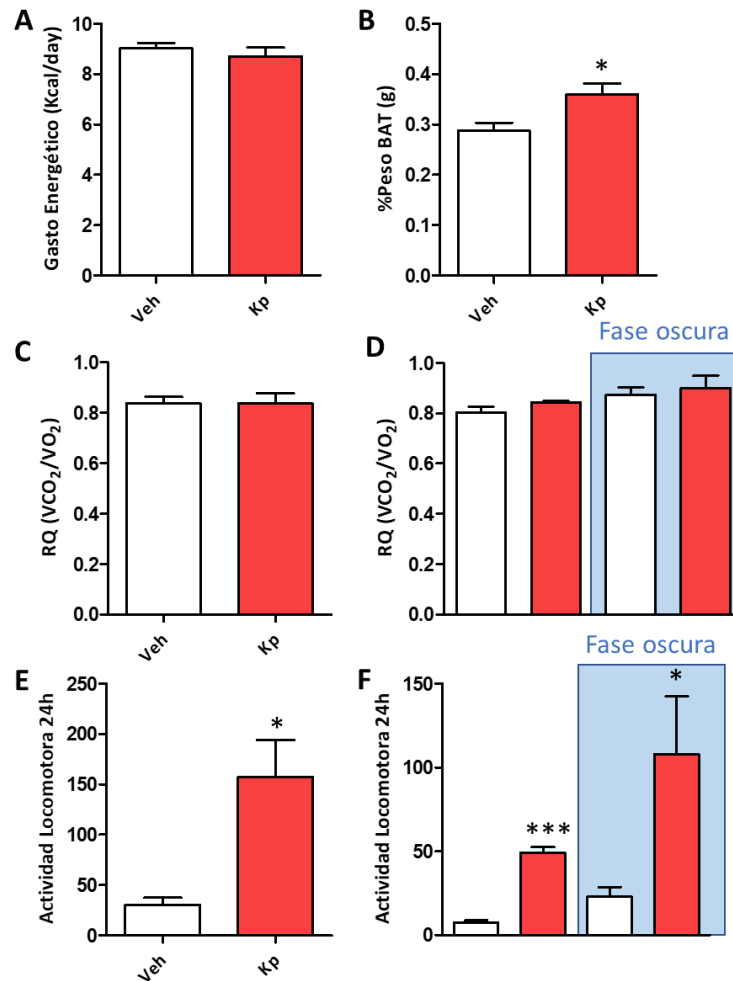


Figura 24. Parámetros metabólicos en ratones hembra inyectados icv con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh). Representación del gasto energético (A), índice somático de BAT (% de peso BAT/peso corporal) (B), el coeficiente respiratorio (RQ) total (C) y RQ en fase de luz y oscuridad (D), y actividad locomotora, tanto total (E) y como en las fases de luz y oscuridad (F). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs Veh; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Por último, se analizó el efecto de la administración central de Kp-10 sobre la homeostasis de la glucosa, mediante la realización de un GTT, así como sobre la resistencia a insulina, analizada mediante ITT, en ratones de ambos sexos sometidos a tratamiento crónico con kisspeptina. En machos, la administración de Kp-10 no causó alteraciones en la tolerancia a la glucosa o en la respuesta a insulina, a excepción de un ligero empeoramiento en el perfil de glucosa a los 120 min del ITT, aunque éste no se vio reflejado en la respuesta integral calculada mediante el AUC (**Figura 25**). En hembras, sin embargo, se observó que, aun cuando las respuestas a diferentes tiempos e integral (AUC) del GTT y el ITT no se vieron alteradas en el grupo tratado con Kp-10, los animales inyectados con kisspeptina mostraron unos niveles de glucosa basal (es decir, antes del GTT e ITT) inferiores al grupo control (**Figura 26**).

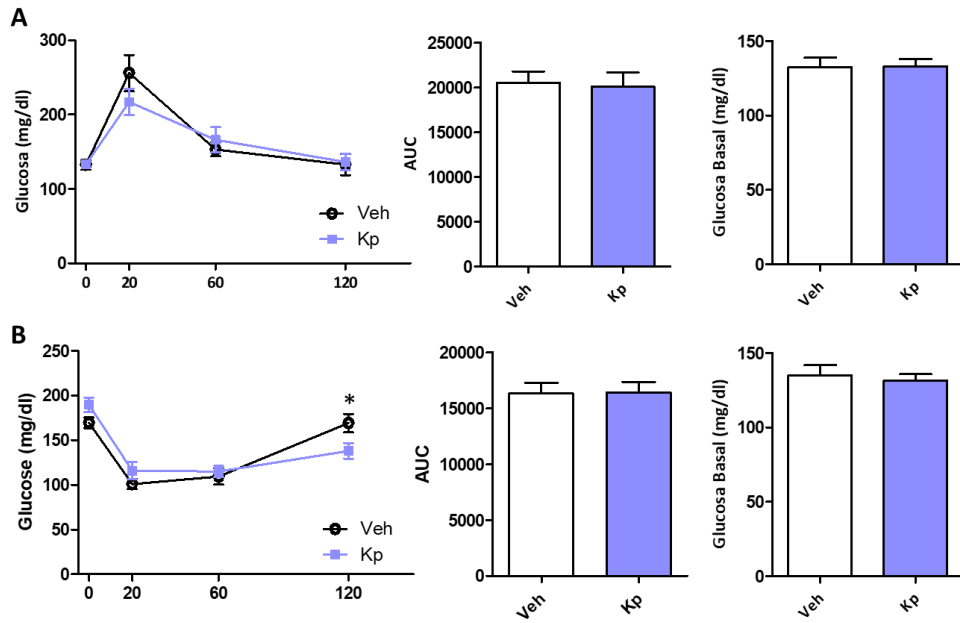


Figura 25. Test de tolerancia a glucosa (GTT) y test de tolerancia a insulina (ITT) en ratones macho inyectados icv con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh). En A, están representadas la curva temporal de respuesta al GTT, los niveles integrales de glucosa durante el GTT (AUC) y los niveles de glucemia basal. En B, se representa la curva temporal de respuesta al ITT, los valores AUC durante el ITT y los niveles de glucemia basal. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$  vs Veh; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

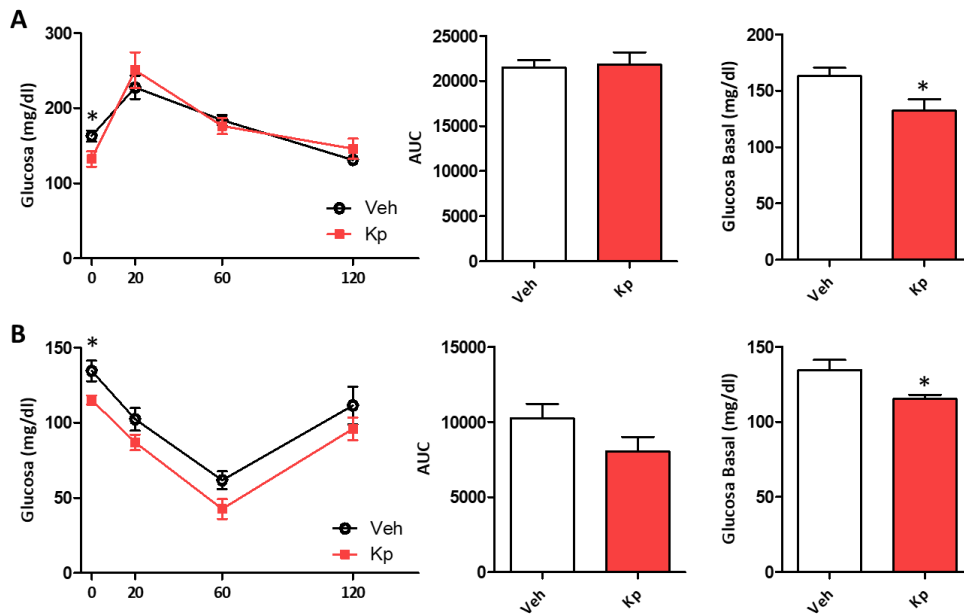


Figura 26. Test de tolerancia a glucosa (GTT) y test de tolerancia a insulina (ITT) en ratones hembra inyectados icv con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh). En A, están representadas la curva temporal de respuesta al GTT, los niveles integrales de glucosa durante el GTT (AUC) y los niveles de glucemia basal. En B, se representa la curva temporal de respuesta al ITT, los valores AUC durante el ITT y los niveles de glucemia basal. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$  vs Veh; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

## Estudio I - 2: Análisis de los efectos de la administración periférica de kisspeptina en el control de la homeostasis metabólica.

De forma paralela, nos propusimos estudiar el impacto metabólico de la administración crónica de kisspeptina a nivel periférico. Para ello se analizaron diversos parámetros, similares a los incluidos en el estudio I.1, en ratones macho y hembra, castrados y reemplazados con esteroides gonadales, a los que se sometió a la administración diaria ip de vehículo (salino) o 3 nmol de Kisspeptina-10 (Kp-10), durante un periodo de 11 días.

En relación con la evolución del peso y composición corporal, los ratones macho inyectados con Kp-10 presentaron valores similares de peso, adiposidad y masa magra respecto de sus respectivos controles, desde el inicio hasta el final del tratamiento (**Figura 27**). De la misma forma, tampoco se observaron diferencias en el peso o la composición corporal en el caso de las hembras, de forma que los animales tratados con Kp-10 mostraron unos valores similares a los Veh a todo lo largo del tratamiento (**Figura 28**).

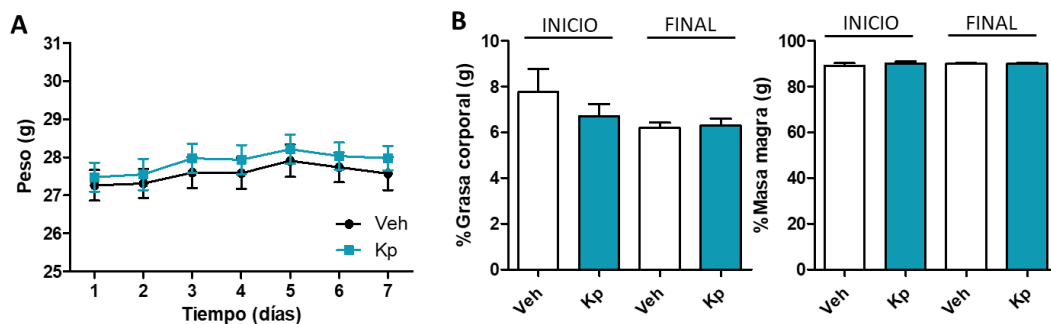


Figura 27. Evolución del peso (A) y composición corporal (B; porcentajes de grasa corporal y masa magra), en ratones macho inyectados ip con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.

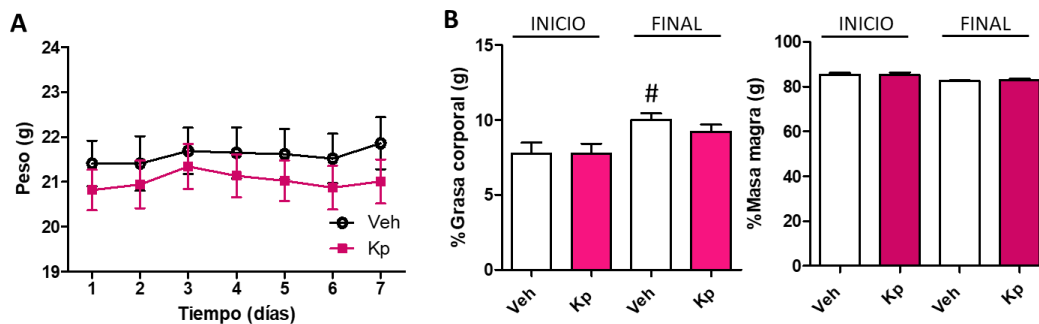


Figura 28. Evolución del peso (A) y composición corporal (B; porcentajes de grasa corporal y masa magra) en ratones hembra inyectados ip con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. #  $p \leq 0,05$  vs vehículo inicio.

En relación con la ingesta, la administración periférica de Kp-10 no alteró los patrones de ingesta a corto o largo plazo, en ninguno de los dos sexos. Así, y a diferencia de lo observado tras la administración central de Kp-10 en ratones macho (donde fue detectable una respuesta anorexigénica), no se mostraron diferencias significativas en los perfiles de ingesta en los ratones macho o hembra tratados con Kp-10 ip respecto de los correspondientes controles. (Figura 29).

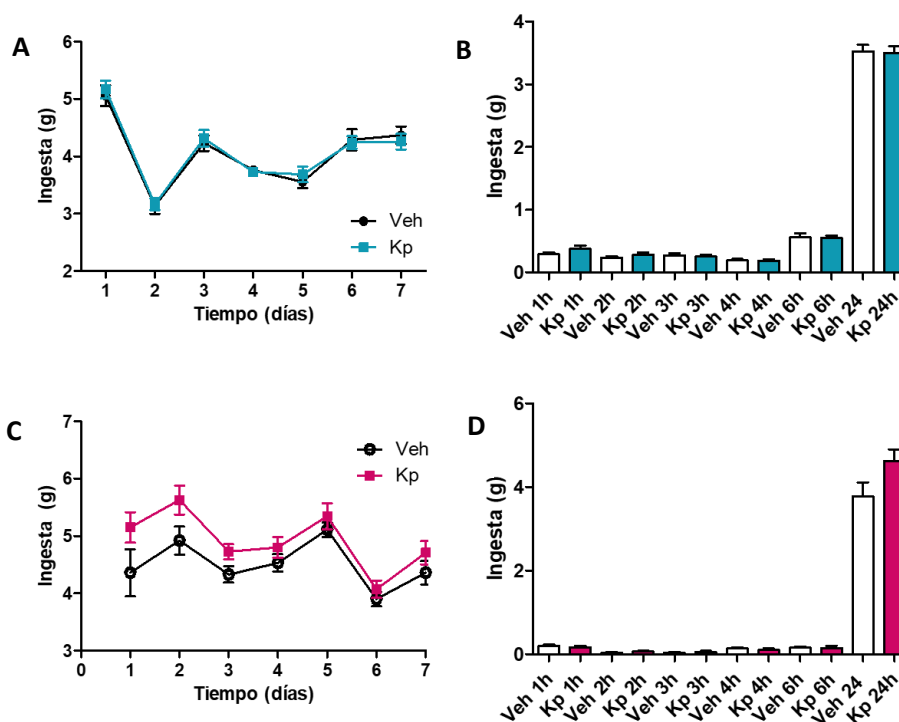


Figura 29. En (A), ingesta acumulada diaria tras la administración de un bolo diario de Kp-10 por un periodo de 7 días y respuesta aguda de ingesta a diferentes tiempos tras la administración de un bolo de Kp-10, en la fase se luz (B) en ratones machos. En (C) la Ingesta diaria y a tiempos cortos (D) en hembras. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.

En relación con el gasto energético, el RQ y la actividad locomotora, la administración periférica de Kp-10 no provocó diferencias significativas en ninguno de estos parámetros, ni en ratones macho ni hembra. Sin embargo, en términos de actividad locomotora, se observó una tendencia a su disminución en ratones macho (**Figura 30**), mientras que en las hembras se detectó un ligero incremento, sobre todo en la fase nocturna (**Figura 31**). Aunque en ambos casos las diferencias observadas no alcanzaron el nivel de significación estadística, los patrones de actividad observados serían similares a los obtenidos tras la administración central de Kp-10, sugiriendo un posible efecto diferencial sobre la actividad locomotora en machos y hembras.

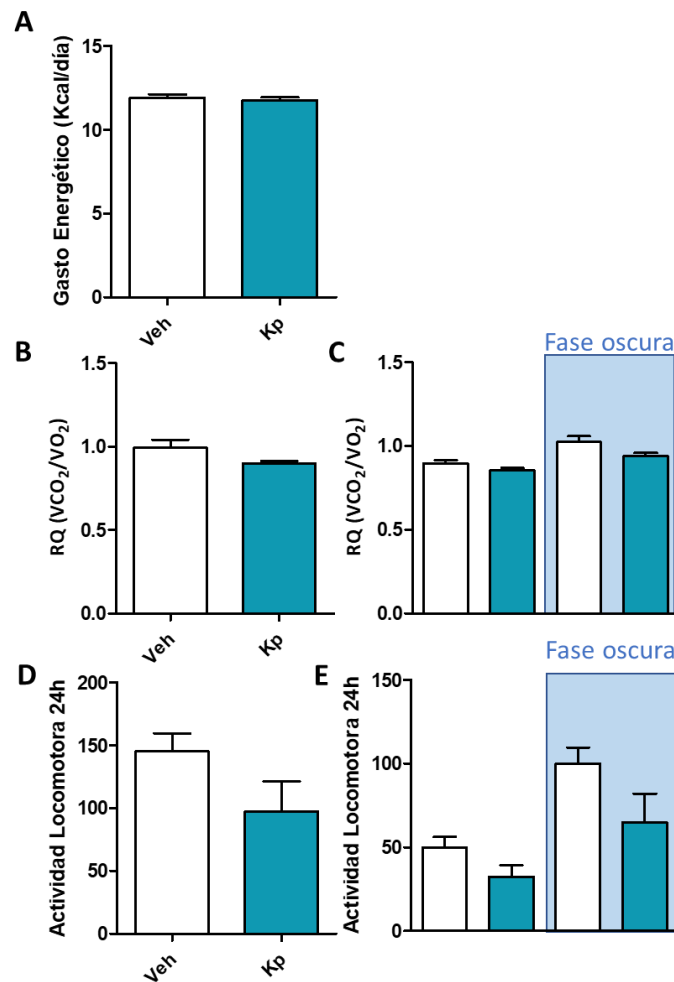


Figura 30. Parámetros metabólicos en ratones macho inyectados ip con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh). Representación del gasto energético (A), el coeficiente respiratorio (RQ) total (B) y RQ en fase de luz y oscuridad (C), y actividad locomotora, tanto total (D) y como en las fases de luz y oscuridad (E). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.



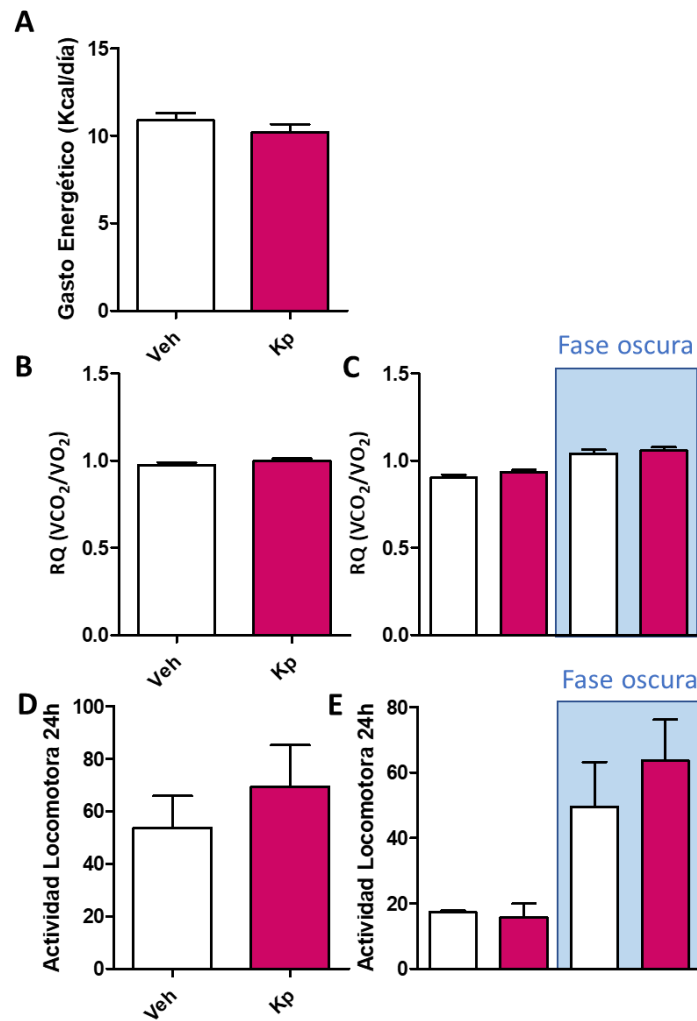


Figura 31. Parámetros metabólicos en ratones hembra inyectados ip con Kp-10 (Kp) o vehículo (Veh). Representación del gasto energético (A), el coeficiente respiratorio (RQ) total (B) y RQ en fase de luz y oscuridad (C), y actividad locomotora, tanto total (D) y como en las fases de luz y oscuridad (E). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.

Por último, a fin de completar el estudio del impacto metabólico de la administración sistémica de Kp-10, se analizó el efecto de ésta sobre la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina, mediante la realización de GTT e ITT, respectivamente. En ratones macho, se observó un ligero incremento de la sensibilidad a insulina, que se evidenció en un descenso significativo del AUC durante el ITT, sin que se detectaran cambios en la tolerancia global a la sobrecarga de glucosa (**Figura 32**). Por el contrario, no se observaron cambios en el ITT en el caso de las hembras, ya que los grupos tratados con Kp-10 y Veh presentaron valores similares de AUC y glucosa basal (**Figura 33**).

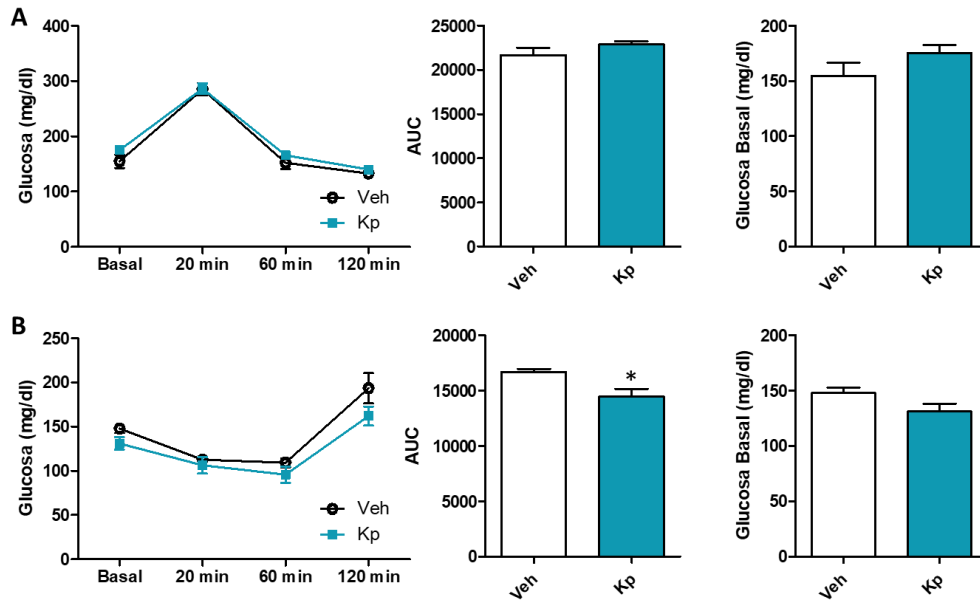


Figura 32. Test de tolerancia a glucosa (GTT) y test de tolerancia a insulina (ITT) en ratones macho inyectados ip con Kp-10 (Kp) o vehiculo (Veh). En A, están representadas la curva temporal de respuesta al GTT, los niveles integrales de glucosa durante el GTT (AUC) y los niveles de glucemia basal. En B, se representa la curva temporal de respuesta al ITT, los valores AUC durante el ITT y los niveles de glucemia basal. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$  vs Veh; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

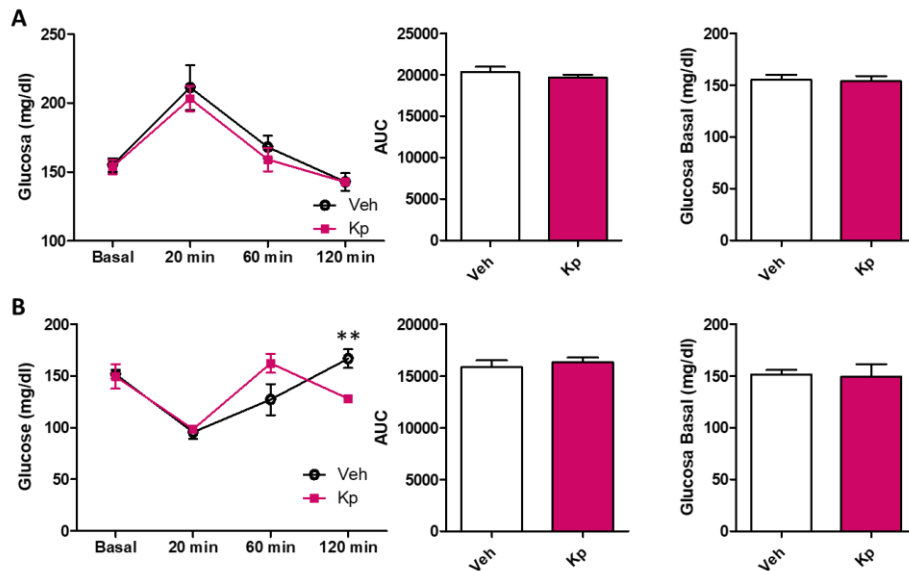


Figura 33. Test de tolerancia a glucosa (GTT) y test de tolerancia a insulina (ITT) en ratones hembra inyectados ip con Kp-10 (Kp) o vehiculo (Veh). En A, están representadas la curva temporal de respuesta al GTT, los niveles integrales de glucosa durante el GTT (AUC) y los niveles de glucemia basal. En B, se representa la curva temporal de respuesta al ITT, los valores AUC durante el ITT y los niveles de glucemia basal. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*\*  $p \leq 0,01$  vs Kp; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

## **Bloque experimental II. Efectos de la señalización de Kisspeptinas frente a los efectos de los esteroides gonadales en el control de la homeostasis energética: Estudios en el modelo Gpr54Tg**

El objetivo de este segundo bloque experimental fue discernir entre los efectos metabólicos de las kisspeptinas per se y aquellos derivados de su probada capacidad de modular la secreción de esteroides gonadales. Para ello, evaluamos un modelo genético, el ratón Gpr54<sup>-/-</sup>Tg, que permite discriminar entre los efectos derivados de la ausencia de señalización de las kisspeptinas y los producidos por la ausencia de esteroides gonadales. En concreto, se analizaron comparativamente los distintos parámetros metabólicos evaluados en el bloque anterior, en tres líneas de ratón (tanto en machos como en hembras): (a) Gpr54<sup>+/+</sup> (control WT); (b) Gpr54<sup>-/-</sup> (KO), con ausencia global del receptor, y por tanto ausencia de señalización de kisspeptina y niveles de esteroides gonadales son muy bajos o nulos; y (c) ratones Gpr54<sup>-/-</sup> Tg (línea rescatada) con ausencia del receptor excepto en neuronas GnRH y por tanto con función gonadal preservada. Los análisis metabólicos se llevaron a cabo durante la etapa postnatal y en adultos jóvenes; periodo en el que el rescate de la función gonadal en la línea Gpr54<sup>-/-</sup> Tg es completo [197].

### **Estudio II - 1. Evaluación de parámetros metabólicos en ratones Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-</sup>Tg con dieta control.**

En primer lugar se llevaron a cabo análisis hormonales en ratones Gpr54<sup>+/+</sup> (WT; control), Gpr54<sup>-/-</sup>Tg (rescatado) y Gpr54<sup>-/-</sup> (KO) con el fin de determinar el estado funcional de eje gonadotropo/gonadal en cada fenotipo. Comparado con el grupo control, Gpr54<sup>+/+</sup>, los ratones KO globales para el receptor, Gpr54<sup>-/-</sup>, mostraron una supresión significativa de los niveles de LH en ambos sexos. De igual manera, los niveles circulantes de FSH se redujeron en ratones Gpr54<sup>-/-</sup>, aunque esta inhibición en hembras no alcanzó significancia estadística (**Figura 34**). Adicionalmente, se determinaron los niveles de esteroides gonadales que fueron significativamente menores en ratones Gpr54<sup>-/-</sup> de ambos sexos (**Figura 35**). Así, en los machos Gpr54<sup>-/-</sup>, las concentraciones en suero de testosterona y DHT fueron suprimidas respecto a los controles Gpr54<sup>+/+</sup>, mientras que en las hembras, los niveles circulantes de estradiol y progesterona también fueron significativamente más bajos que en los controles.

Por el contrario, los ratones  $Gpr54^{-/-}Tg$  no mostraron diferencias frente a los ratones  $Gpr54^{+/+}$  en los niveles circulantes de LH y FSH, ni en las concentraciones plasmáticas de esteroides gonadales en ambos sexos, confirmando así la eficacia de nuestra estrategia de rescate mediante la cual se ha revertido el profundo estado hipogonadal a nivel central causado por la ablación de  $Gpr54$ . Cabe destacar que, a pesar de la profunda supresión de los niveles de esteroides gonadales en los ratones  $Gpr54^{-/-}$  (KO), los niveles de andrógenos sintetizados en las glándulas adrenales, en este caso androstenediona, fueron similares en machos de los tres genotipos ( $Gpr54^{+/+}$ :  $33.66 \pm 3.65$ ;  $Gpr54^{-/-}$ :  $39.77 \pm 2.74$ ; y  $Gpr54^{-/-}Tg$ :  $43.05 \pm 4.31$  pg/mL), y por lo tanto, esto confirma el carácter central del estado hipogonadal en los ratones  $Gpr54^{-/-}$  y su rescate en ratones  $Gpr54^{-/-}Tg$ .

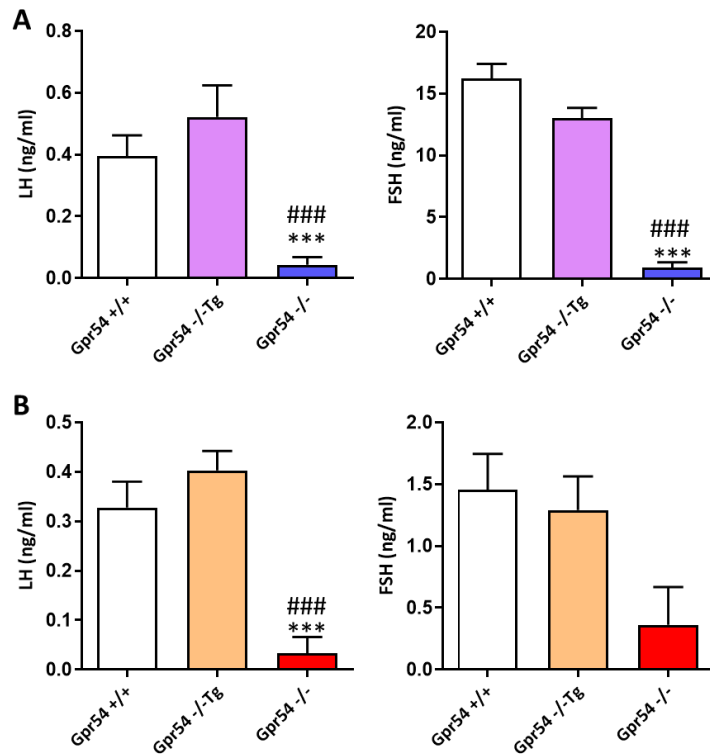


Figura 34. Niveles plasmáticos de gonadotropinas, LH y FSH, en ratones macho (A) y hembra (B) de tres genotipos:  $Gpr54^{+/+}$  (WT)  $Gpr54^{-/-}$  ( $Gpr54$ KO global) y  $Gpr54^{-/-}Tg$  (Rescatado). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs  $Gpr54^{+/+}$ ; ###  $p \leq 0,001$  vs  $Gpr54^{-/-}Tg$ ; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

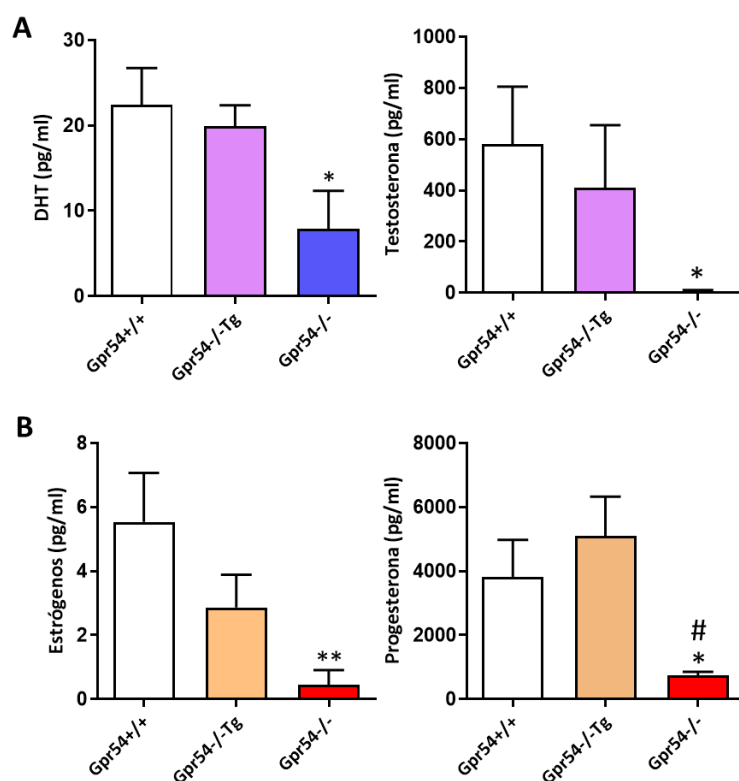


Figura 35. Niveles de esteroides gonadales en suero, niveles de DHT y testosterona en ratones macho (A) y Estrógeno y progesterona en ratones hembra (B) de tres genotipos: Gpr54+/+ (WT) Gpr54-/- (Gpr54KO global) y Gpr54-/-Tg (Rescatado). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  vs Gpr54+/+; #  $p \leq 0,05$  vs Gpr54-/-T; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

En cuanto a la caracterización metabólica, en los modelos Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-</sup>Tg, el peso corporal fue monitorizado semanalmente desde el destete (21d) hasta la etapa adulta (18 semanas de vida). La ganancia de peso corporal en ratones macho Gpr54<sup>-/-</sup> fue menor durante todo el periodo de estudio, mientras que los ratones Gpr54<sup>-/-</sup>Tg mostraron un fenotipo intermedio entre los KO globales y los controles (**Figura 36**). Teniendo en cuenta las diferencias en el crecimiento corporal entre el período pre/peri-puberal (considerado como <8 semanas después del parto) y la edad adulta (> 8 semanas), la ganancia acumulada de peso corporal se calculó independientemente para ambos períodos, ya sea como aumento de la ganancia integral de peso corporal calculada como AUC, o como diferencia neta en términos de peso corporal absoluto entre el inicio y el final del período de estudio. Estos análisis confirmaron el fenotipo intermedio de los machos Gpr54<sup>-/-</sup>Tg durante el período pre/peri-puberal, ya que mostraron una mayor ganancia de peso corporal que

los ratones Gpr54 KO, pero menor que los controles. Por el contrario, el aumento absoluto del peso corporal durante el período adulto (>8 semanas) no fue estadísticamente diferente entre los tres genotipos.

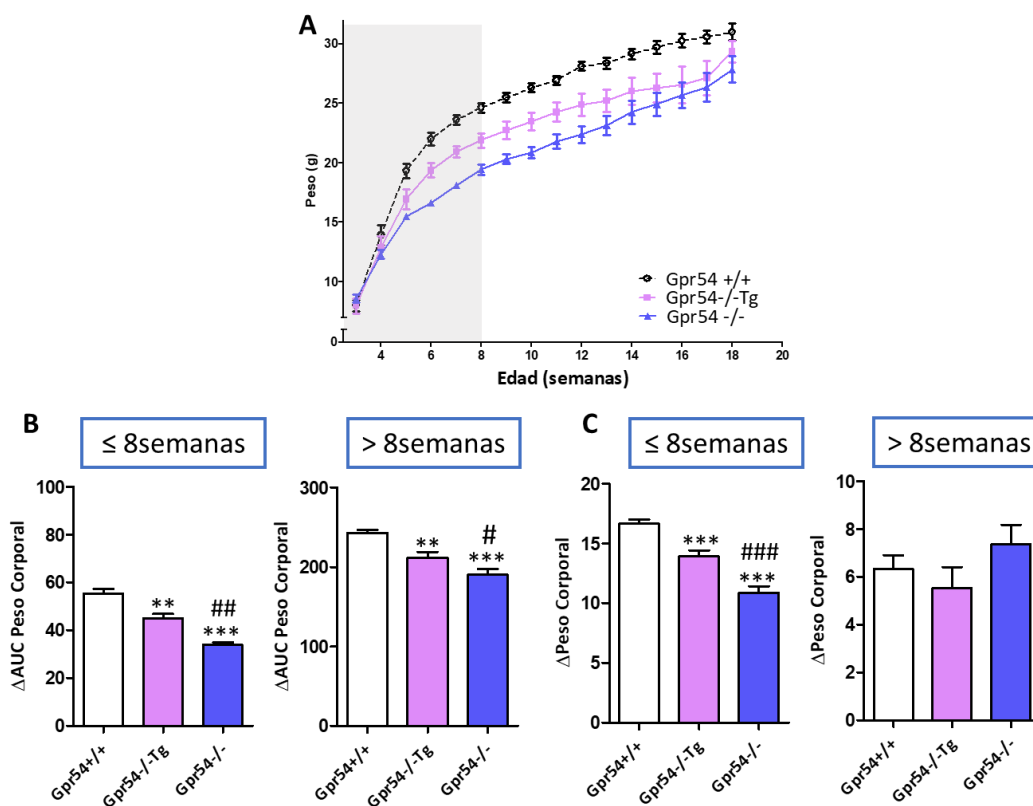


Figura 36. En A, evolución del peso corporal en ratones macho de tres genotipos: Gpr54<sup>+/+</sup> (WT) Gpr54<sup>-/-</sup> (Gpr54KO global) y Gpr54<sup>-/-</sup>Tg (Rescatado), desde el destete (21d) hasta el periodo adulto (18 semanas de vida). Adicionalmente, se muestra el análisis de la ganancia de peso corporal haciendo distinción en dos ventanas del crecimiento: < 8 semanas de vida y > 8 semanas de vida; para ambos periodos se ha representado en (B) la ganancia de peso integral (representado como Δ AUC) y en (C) el incremento de peso absoluto (representado como Δ Peso corporal). Los valores se representan como la media ± SEM. \*\* p ≤ 0,01 y \*\*\* p ≤ 0,001 vs Gpr54<sup>+/+</sup>; # p ≤ 0,05; ## p ≤ 0,01 y ### p ≤ 0,001 vs Gpr54<sup>-/-</sup>T; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

En hembras, las diferencias en las curvas de ganancia de peso corporal fueron menos marcadas que en los machos, aunque con un claro contraste en la evolución de los parámetros de ganancia ponderal entre los periodos pre/peripubertal y adulto (**Figura 37**). Así, la ganancia de peso corporal fue menor tanto en hembras Gpr54<sup>-/-</sup> como en hembras con Gpr54<sup>-/-</sup>Tg en el período < 8 semanas, cuando se calculó como ganancia integral de peso (AUC), mientras que no se detectó ninguna diferencia durante la edad adulta (> 8 semanas). Sin

embargo, cuando se calculó como diferencia neta entre el peso corporal inicial y final, se detectó un aumento significativo en el período adulto, pero sólo para los ratones hembra *Gpr54*<sup>-/-</sup>, con ablación global de la señalización de kisspeptinas.

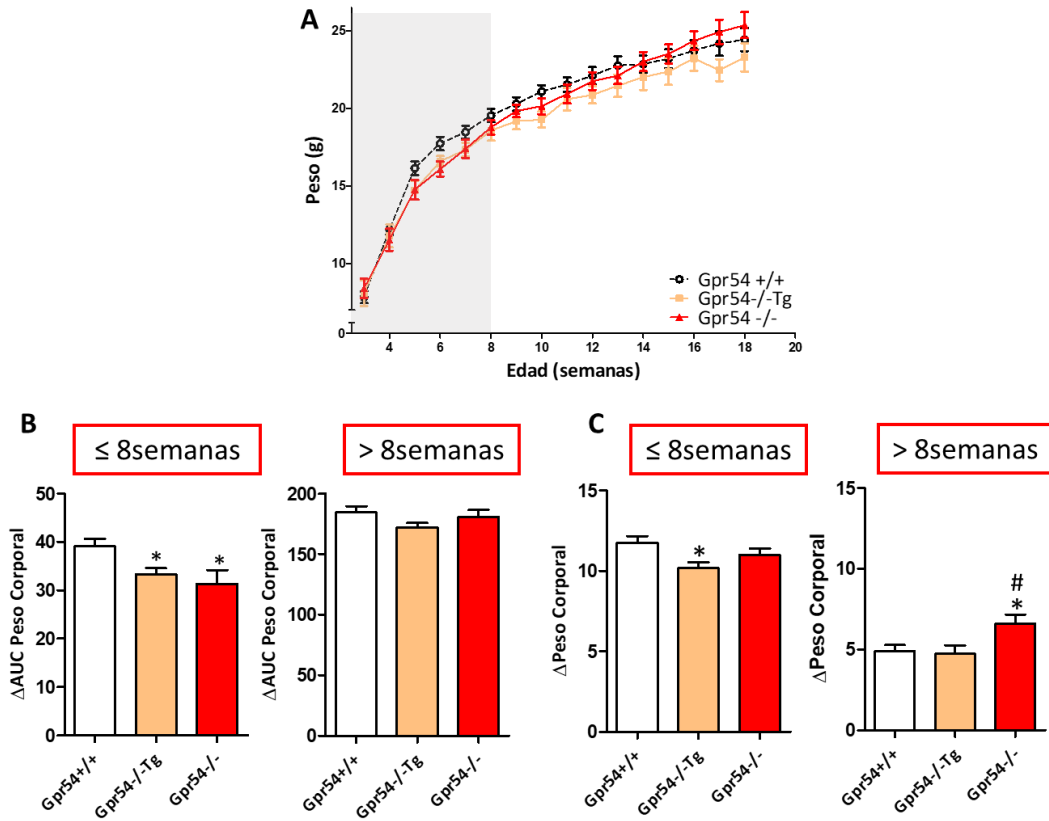


Figura 37. Evolución del peso corporal en ratones hembra de tres genotipos: *Gpr54*<sup>+/+</sup> (WT) *Gpr54*<sup>-/-</sup> (*Gpr54*KO global) y *Gpr54*<sup>-/-Tg</sup> (Rescatado), desde el destete (21d) hasta el periodo adulto (18 semanas de vida). Adicionalmente, se muestran en los paneles inferiores el análisis de la ganancia de peso corporal haciendo distinción en dos ventanas del crecimiento: < 8 semanas de vida y > 8 semanas de vida; para ambos periodos se ha representado la ganancia de peso integral (representado como Δ AUC) y el incremento de peso absoluto (representado como Δ Peso corporal). Los valores se representan como la media ± SEM. \*  $p \leq 0,05$  vs *Gpr54*<sup>+/+</sup>; #  $p \leq 0,05$  vs *Gpr54*<sup>-/-Tg</sup>; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Adicionalmente se llevaron a cabo análisis de composición corporal y de niveles de leptina circulantes en ratones macho y hembra de los tres genotipos, a las 18-20 semanas de vida. La determinación de la composición corporal reveló un incremento en la adiposidad en ratones *Gpr54*<sup>-/-</sup>, tanto en machos como en hembras, así como una disminución de la masa magra en estos animales. Por

el contrario, los ratones GPr54<sup>-/-</sup>Tg mostraron un fenotipo similar a los controles en ambos sexos. En cuanto a los niveles de leptina circulantes, en concordancia al incremento de grasa corporal, se observó un aumento en la concentración de leptina en los ratones Gpr54<sup>-/-</sup>, tanto machos como en hembras, mientras que los ratones Gpr54<sup>-/-</sup>Tg presentaron niveles de leptina similares a los controles (**Figura 38**).

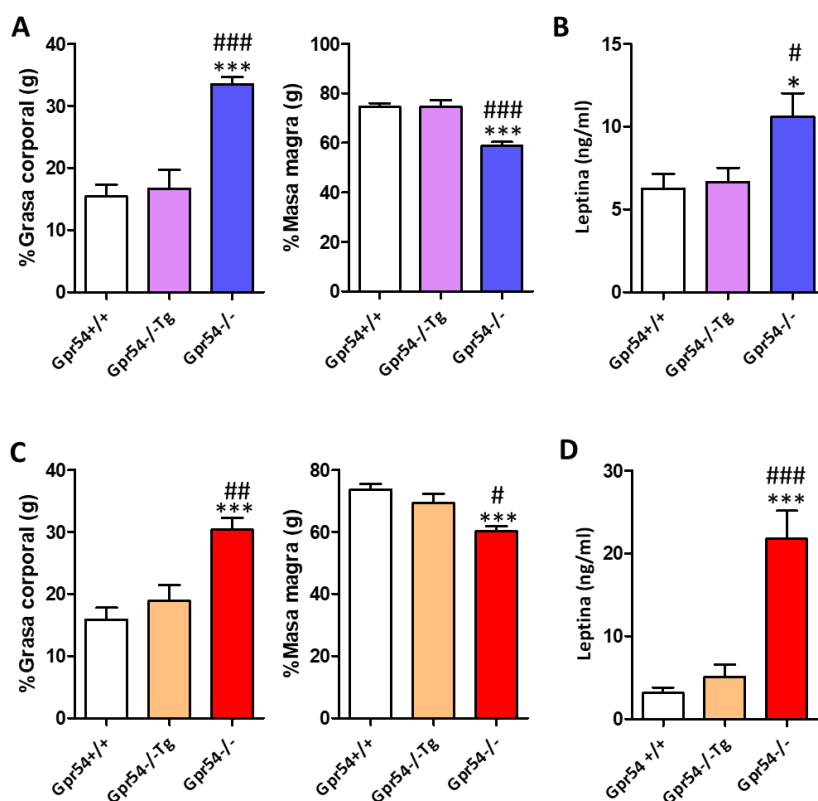


Figura 38. Composición corporal y niveles circulantes de leptina en ratones macho representados en (A) y (B) respectivamente y en ratones hembra representados en (C) y (D) respectivamente, en la etapa adulta (>18 semanas de vida) de tres los genotipos estudiados. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs Gpr54<sup>+/+</sup>; #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$  y ###  $p \leq 0,001$  vs Gpr54<sup>-/-</sup>Tg; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Por último, a fin de elucidar posibles mecanismos de control del peso y composición corporal, analizamos en los tres genotipos la expresión en tejido adiposo de genes clave en el gasto energético, como los que codifican las proteínas desacoplantes mitocondriales, UCP1 y UCP3, relacionadas con la termogénesis. En machos, no se encontraron cambios en la expresión de UCP1 y UCP3 en BAT, a excepción de un ligero incremento de UCP1 en los ratones GPr54<sup>-/-</sup>Tg. Tampoco se detectaron cambios en la expresión de estos genes en WAT en machos de los tres genotipos analizados (**Figura 39**). Sin embargo, en



hembras, se observó una reducción evidente de la expresión de UCP1 en BAT en el genotipo  $Gpr54^{-/-}$ , mientras que las hembras  $Gpr54^{-/-}Tg$  presentaron un fenotipo intermedio. En el caso de UCP3, no se observaron cambios en su expresión en los tejidos analizados en los distintos genotipos analizados (**Figura 39**).

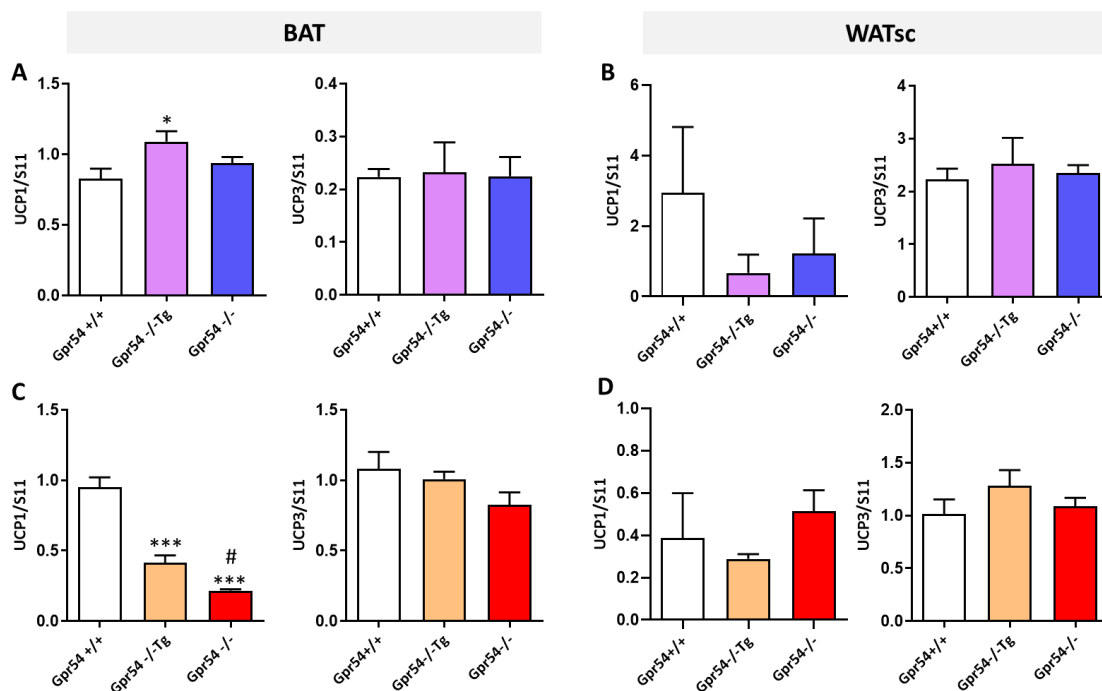


Figura 39. Análisis de expresión de UCP1 y UCP3 en ratones macho (A) y (B); y hembra (C) y (D) de los tres genotipos analizados:  $Gpr54^{+/+}$  (WT)  $Gpr54^{-/-}$  ( $Gpr54$ KO global) y  $Gpr54^{-/-}Tg$  (Rescatado), en grasa parda (BAT) y en tejido adiposo blanco subcutáneo (WATsc). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs  $Gpr54^{+/+}$ ; #  $p \leq 0,05$  vs  $Gpr54^{-/-}Tg$ ; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Igualmente, se monitorizaron patrones de ingesta en ratones  $Gpr54^{-/-}$  (KO globales) y  $Gpr54^{-/-}Tg$  (rescatados) adultos tras un ayuno de 12h. La ingesta durante las fases de luz y oscuridad, así como la ingesta acumulada durante 24h fueron analizadas en ambos sexos (**Figura 40**). En machos, solo los ratones  $Gpr54^{-/-}$  mostraron una supresión significativa de la ingesta, tanto en la fase de luz como en la fase oscura, mientras que los ratones  $Gpr54^{-/-}Tg$  presentaron unos patrones de ingesta iguales a los controles. En hembras, la ingesta de las ratonas  $Gpr54^{-/-}$  presentó una disminución significativa, tanto en la fase de luz como en oscuridad, al igual que en machos. Sin embargo, la ingesta también fue parcialmente suprimida en las hembras  $Gpr54^{-/-}Tg$ , las cuales comieron menos que el grupo control ( $Gpr54^{+/+}$ ) durante todo el período de estudio, con

un fenotipo intermedio entre las ratonas control y las KO globales durante la fase oscura y durante el periodo total de 24 horas.

Este perfil intermedio también fue detectado en hembras cuando se calculó la eficiencia energética (ratio entre la ingesta durante 24 horas y el peso corporal) para los tres genotipos. En machos, esta ratio no se vio afectada, mostrando valores similares en los tres genotipos.

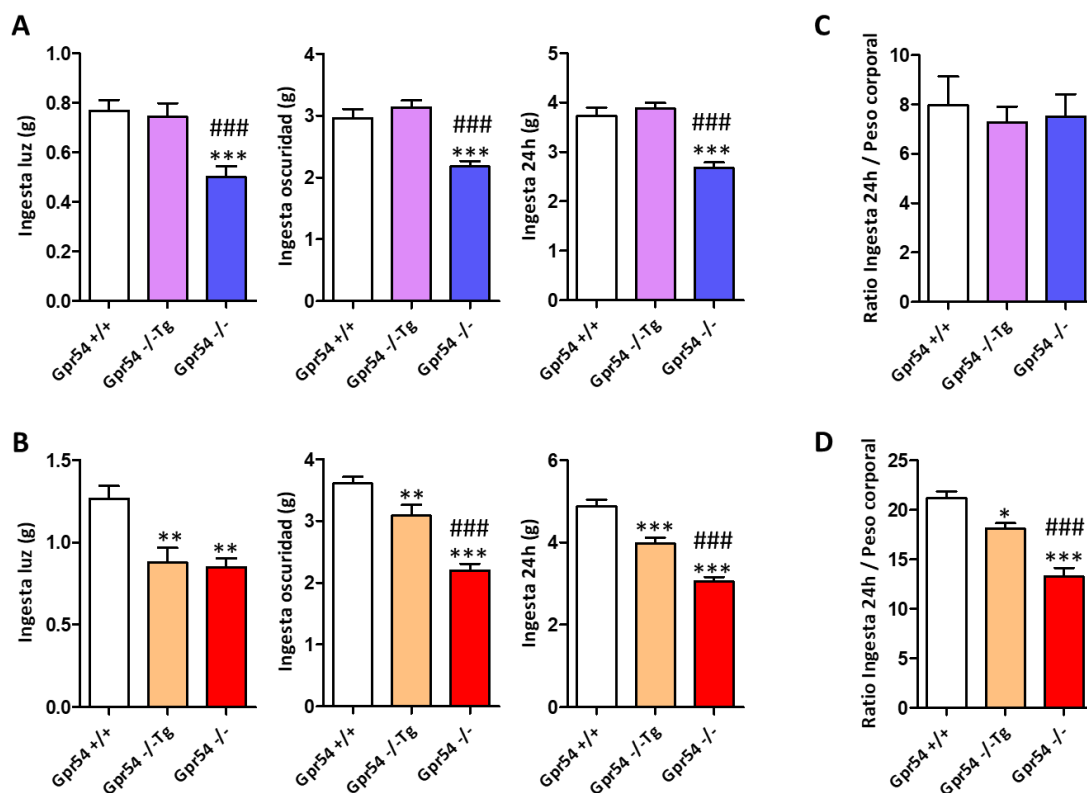


Figura 40. Patrones de ingesta en ratones macho (A) y hembra (B) de los tres genotipos estudiados: Gpr54<sup>+/+</sup> (WT) Gpr54<sup>-/-</sup> (Gpr54KO global) y Gpr54<sup>-/-Tg</sup> (Rescatado), en la etapa adulta. La ingesta espontánea tras un ayuno de 12h está representada en la fase de luz y oscuridad, así como la ingesta total en un periodo de 24h. Adicionalmente se representa la eficiencia energética como la ratio de ingesta por peso corporal en machos (C) y en hembras (D). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  y \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs Gpr54<sup>+/+</sup>; ###  $p \leq 0,001$  vs Gpr54<sup>-/-Tg</sup>; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

A continuación, teniendo en cuenta las diferencias observadas en los patrones de la ingesta, se analizó la expresión de genes hipotalámicos clave en la regulación de la misma (**Figura 41**). Así, acorde a los datos de ingesta, la expresión del neuropéptido POMC, que codifica el neuropéptido anorexigénico,  $\alpha$ -MSH, mostró un aumento significativo en ratones Gpr54<sup>-/-</sup> de ambos sexos, que en el caso de las hembras se asoció igualmente a un aumento de los niveles

de expresión del gen del neuropéptido anorexigénico CART. Por el contrario, la expresión de POMC y de CART en el hipotálamo de los ratones *Gpr54<sup>-/-</sup>Tg* fue similar a la observada en los WT. En cuanto a la expresión hipotalámica de los genes orexigénicos, NPY y AgRP, no se detectaron cambios entre los distintos genotipos de ambos sexos.

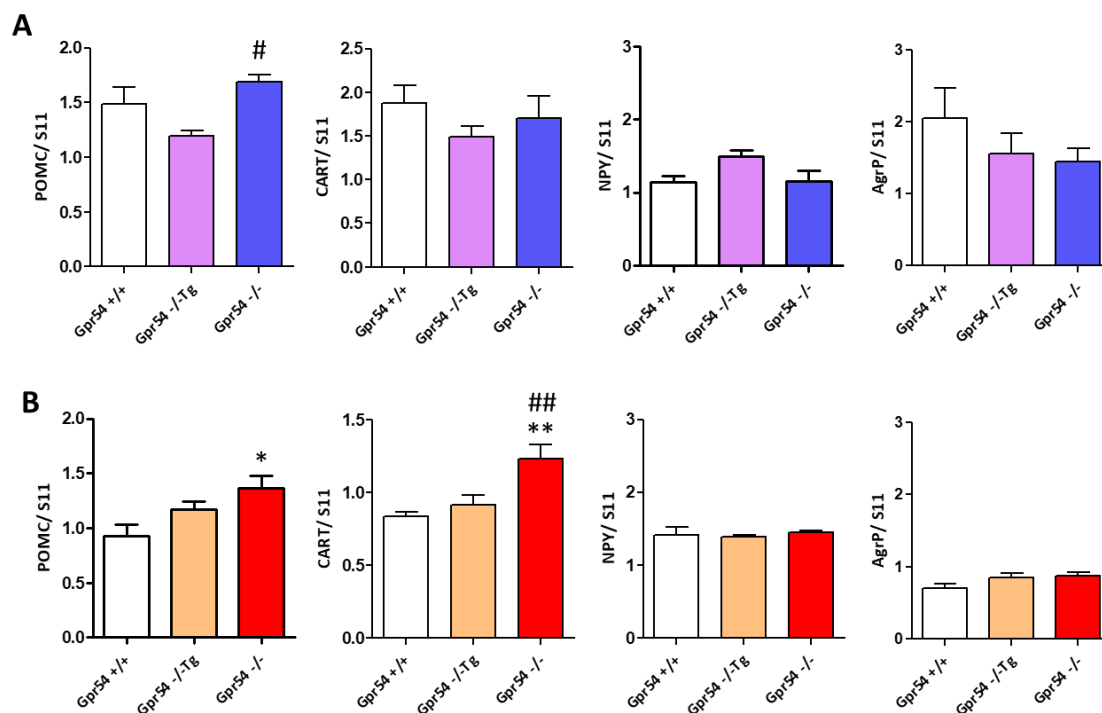


Figura 41. Niveles de expresión de genes hipotalámicos implicados en el control anorexigénico (POMC y CART) u orexigénico (NPY y AgRP) de la ingesta. Se presentan datos de análisis en ratones macho (A) y ratones hembra (B) de los tres genotipos: *Gpr54<sup>+/+</sup>* (WT) *Gpr54<sup>-/-</sup>* (*Gpr54*KO global) y *Gpr54<sup>-/-</sup>Tg* (Rescatado), estudiados en la etapa adulta. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  vs *Gpr54<sup>+/+</sup>*; #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p \leq 0,01$  vs *Gpr54<sup>-/-</sup>Tg*; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Por otro lado, se evaluaron posibles alteraciones en la homeostasis glucídica en ratones macho y hembra adultos *Gpr54<sup>-/-</sup>* (KO globales) y *Gpr54<sup>-/-</sup>Tg* (rescatados), mediante la realización de GTT tras un ayuno de 4h. En machos, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos estudiados, con perfiles de glucosa y respuestas integrales (AUC) durante el GTT similares a las obtenidas en el grupo control (**Figura 42**).

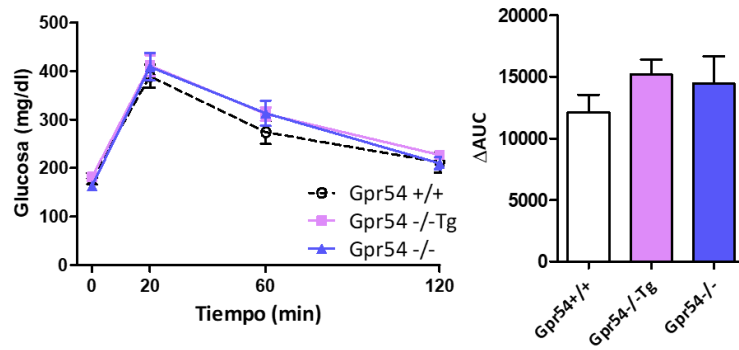


Figura 42. Test de tolerancia a glucosa (GTT) en ratones macho de los tres genotipos, Gpr54<sup>+/+</sup>, Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-Tg</sup>, en la etapa adulta. Se presenta el perfil de glucosa antes (tiempo 0) y a los 20, 60 y 120 min de administrar un bolo de glucosa ip. Adicionalmente, se muestra igualmente la respuesta de glucemia integral, en forma de AUC, durante el periodo de 120 min, calculado sobre los niveles basales a tiempo 0. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.

Por el contrario, en hembras, los ratones Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-Tg</sup> mostraron alteraciones en la tolerancia a la sobrecarga de glucosa, variables según el genotipo. Así, mientras que las hembras Gpr54<sup>-/-</sup> mostraron niveles elevados de glucosa basal y peores perfiles glucémicos a los 20, 60 y 120 minutos tras la administración del bolo de glucosa, las ratonas Gpr54<sup>-/-Tg</sup> tuvieron un fenotipo intermedio, con niveles de glucosa significativamente más altos que los de los controles a los 20 minutos, pero similares a partir de 60 minutos. Estas diferencias en los perfiles glucémicos en el GTT también se vieron reflejadas en las respuestas integrales de la glucosa (AUC), donde se observó un fenotipo intermedio en las hembras Gpr54<sup>-/-Tg</sup>, siendo las hembras Gpr54<sup>-/-</sup> las que mostraron un mayor deterioro. Sin embargo, cuando se analizó la resistencia a insulina mediante ITT, ni las hembras Gpr54<sup>-/-</sup> ni las Gpr54<sup>-/-Tg</sup> mostraron alteraciones detectables en la sensibilidad a insulina, ni tampoco sufrieron perturbaciones evidentes de los niveles de glucosa basal, a pesar de un aumento moderado en los Gpr54<sup>-/-</sup> (**Figura 43**).

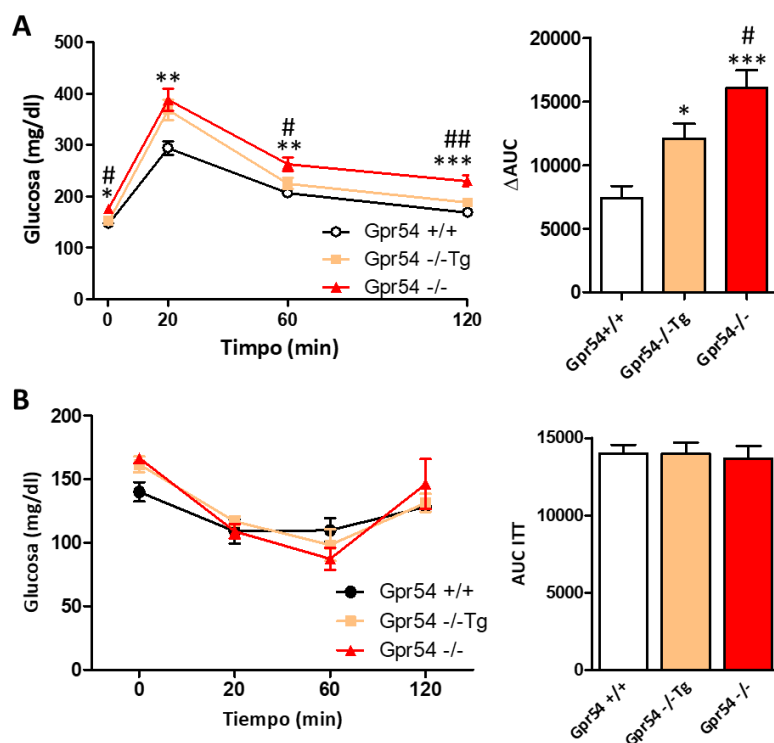


Figura 43. En (A), Test de tolerancia a glucosa (GTT) y en (B) Test de tolerancia a insulina (ITT) en ratones hembra de los tres genotipos (Gpr54<sup>+/+</sup>; Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-</sup>Tg) en la etapa adulta. Se presenta el perfil de glucosa antes (tiempo 0) y a los 20, 60 y 120 min tras la administración de un bolo de glucosa o insulina ip. Adicionalmente, se muestran las respuestas de glucemia integral, en forma de AUC, tras la inyección de glucosa o insulina, calculados sobre los niveles basales a tiempo 0. Los valores se representan como la media ± SEM. \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01 y \*\*\* p ≤ 0,001 vs Gpr54<sup>+/+</sup>; # p ≤ 0,05; ## p ≤ 0,01 vs Gpr54<sup>-/-</sup>Tg; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

## Estudio II - 2. Evaluación de parámetros metabólicos en ratones Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-</sup>Tg en diferentes condiciones obesogénicas.

De forma complementaria a los estudios en condiciones basales llevados a cabo en el Estudio II-1, se analizaron comparativamente los cambios en el peso y la composición corporal, así como los perfiles de ingesta y la homeostasis de la glucosa en ratones Gpr54<sup>-/-</sup>Tg y Gpr54<sup>-/-</sup> sometidos a insultos obesogénicos, tales como la exposición a una dieta alta en grasa (HFD) en ratones de ambos sexos y la ovariectomía en ratones hembra.

Los ratones macho control alimentados desde el destete con HFD, con un contenido del 45% en grasa, mostraron un aumento de peso corporal, especialmente relevante a partir de 10 semanas de exposición a la dieta. Los

ratones machos  $Gpr54^{-/-}$ , con inactivación global de  $Gpr54$ , presentaron una respuesta exagerada a HFD en cuanto al aumento de peso corporal respecto de los ratones  $Gpr54^{-/-}$  alimentados con dieta control. En el mismo sentido, los ratones  $Gpr54^{-/-}$  mostraron un aumento significativo del porcentaje de masa grasa, que incluso triplicó el de los ratones WT alimentados con dieta control. Asimismo, los ratones macho  $Gpr54^{-/-}Tg$  presentaron respuestas intermedias de ganancia de peso corporal en respuesta a HFD, tanto en términos de perfil de evolución del peso como de ganancia de peso acumulada a tiempo final. Sin embargo, la ganancia de masa grasa de los ratones  $Gpr54^{-/-}Tg$  alimentados con HFD fue similar a la de los controles WT (**Figura 44**).

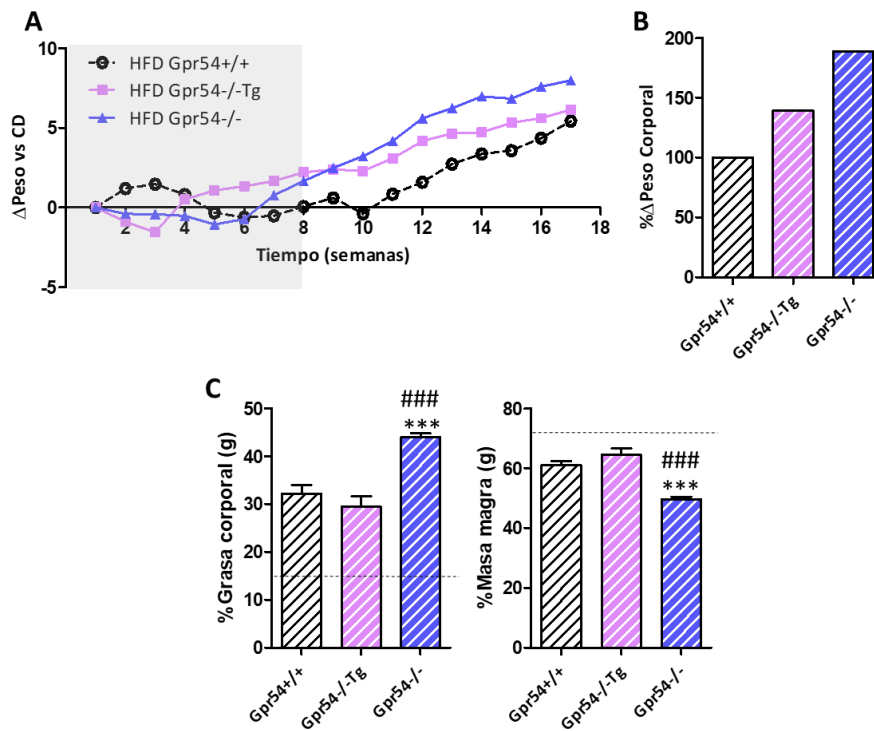


Figura 44. Efectos de HFD en el peso y la composición corporal en ratones macho  $Gpr54^{+/+}$ ;  $Gpr54^{-/-}$  y  $Gpr54^{-/-}Tg$ . En el panel superior, se presenta la evolución de la ganancia de peso respecto a los correspondientes genotipos con dieta control desde el destete (21d) hasta la etapa adulta (18 semanas de vida) (A), así como el incremento de peso a tiempo final, normalizado respecto del incremento de los controles,  $Gpr54^{+/+}$  (B). En (C), se muestran los datos de composición corporal, distinguiendo entre porcentaje de grasa corporal o de masa magra respecto al peso total; la línea discontinua representa la media de los  $Gpr54^{+/+}$  con dieta control. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs  $Gpr54^{+/+}$ ; ###  $p \leq 0,001$  vs  $Gpr54^{-/-}Tg$ ; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Respecto a las hembras, las ratonas control alimentadas con HFD mostraron un aumento en el peso corporal que fue detectable ya a las 6 semanas de exposición a la dieta. Las hembras *Gpr54*<sup>-/-</sup> presentaron un aumento sustancial de la ganancia de peso en respuesta a HFD, que comenzó a ser detectable antes que en las hembras *Gpr54*<sup>-/-</sup> alimentadas con dieta control, con un aumento de más del 50% de la ganancia de peso corporal frente a los animales WT alimentados con HFD. Este incremento en el peso corporal se reflejó también en un aumento significativo del porcentaje de masa grasa, que fue acompañado de un descenso en el porcentaje de masa magra en estos animales. Sin embargo, a diferencia de los machos, las hembras *Gpr54*<sup>-/-</sup>Tg presentaron una respuesta a HFD estrictamente similar a los controles WT, tanto en ganancia de peso corporal como en porcentaje de adiposidad (**Figura 45**).

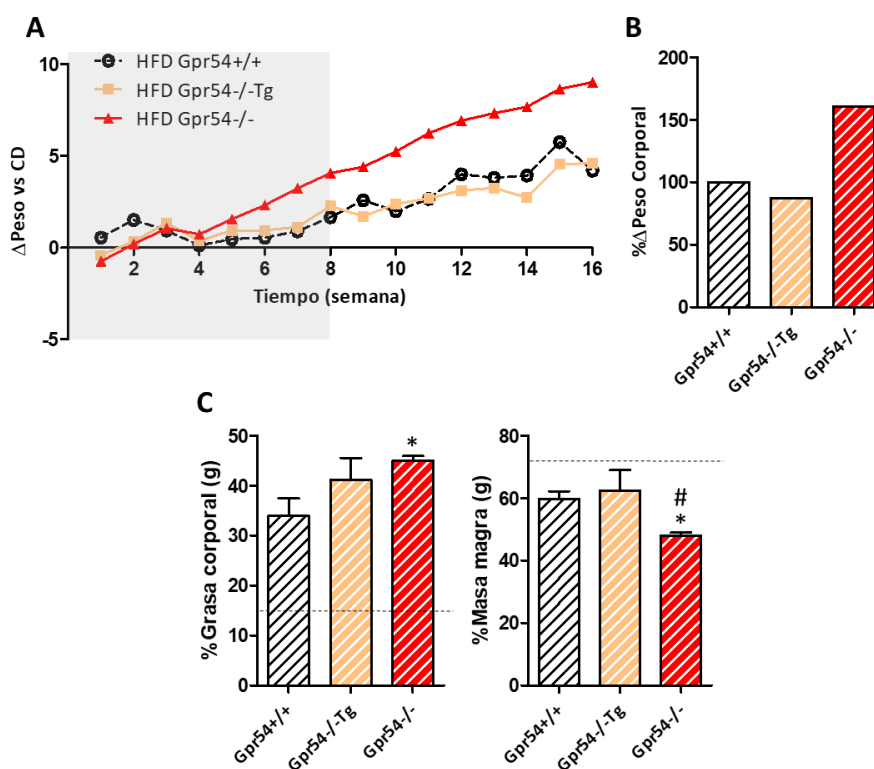


Figura 45. Efectos de HFD en el peso y la composición corporal en ratonas hembra *Gpr54*<sup>+/+</sup>; *Gpr54*<sup>-/-</sup> y *Gpr54*<sup>-/-</sup>Tg. En el panel superior, se presenta la evolución de la ganancia de peso respecto a los correspondientes genotipos con dieta control desde el destete (21d) hasta la etapa adulta (18 semanas de vida) (A), así como el incremento de peso a tiempo final, normalizado respecto del incremento de los controles, *Gpr54*<sup>+/+</sup> (B). En (C), se muestran los datos de composición corporal, distinguiendo entre porcentaje de grasa corporal o de masa magra respecto al peso total; la línea discontinua representa la media de los *Gpr54*<sup>+/+</sup> con dieta control. Los valores se representan como la media ± SEM. \*  $p \leq 0,05$  vs *Gpr54*<sup>+/+</sup>; #  $p \leq 0,05$  vs *Gpr54*<sup>-/-</sup>Tg; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

El análisis de los patrones de ingesta en ratones control alimentados con HFD puso de manifiesto que, a diferencia de los ratones macho alimentados con dieta control, los ratones *Gpr54*<sup>-/-</sup> y los *Gpr54*<sup>-/-</sup>Tg macho presentan una reducción significativa de la ingesta acumulada durante un periodo de 24h, tanto en la fase diurna como en la nocturna (**Figura 46, A**). De igual modo, la ingesta acumulada en 24h y la ingesta nocturna en las hembras *Gpr54*<sup>-/-</sup> se redujo considerablemente, siendo estadísticamente significativa dicha reducción durante el periodo nocturno. Sin embargo, la ingesta en las hembras *Gpr54*<sup>-/-</sup>Tg fue similar a la de las WT, tanto a las 24h como en la fase de oscuridad, estando parcialmente atenuada durante la fase diurna (**Figura 46, B**).

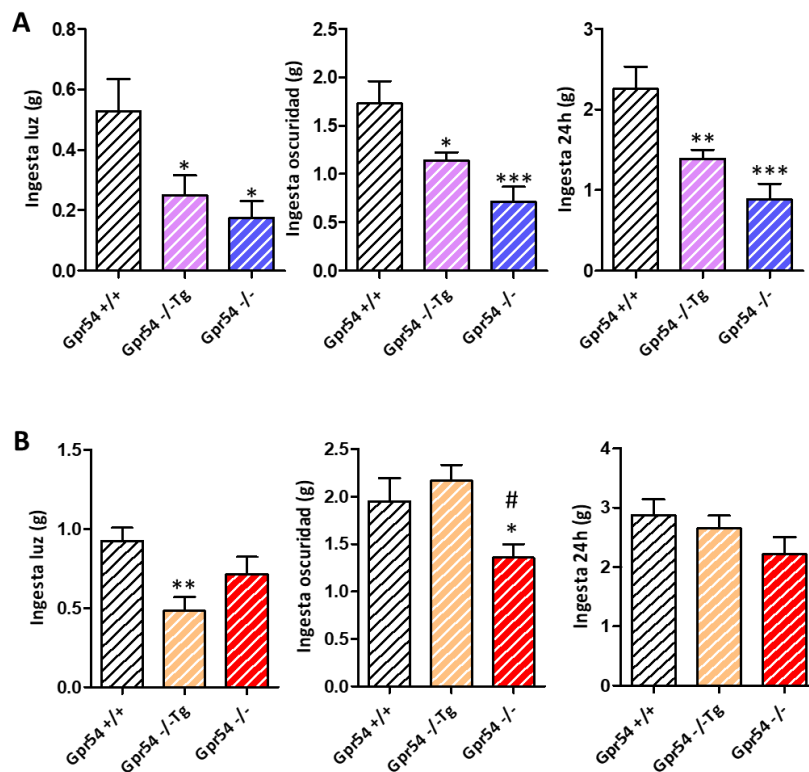


Figura 46. Patrones de ingesta en ratones macho (A) y hembra (B) de tres genotipos (*Gpr54*<sup>+/+</sup>, *Gpr54*<sup>-/-</sup> y *Gpr54*<sup>-/-</sup>Tg en la etapa adulta y alimentados con HFD durante 11 semanas. Se representa la ingesta espontánea tras un ayuno de 12h tanto en la fase de luz como de oscuridad, así como la ingesta total en un periodo de 24h. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  y \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs *Gpr54*<sup>+/+</sup>; #  $p \leq 0,05$  vs *Gpr54*<sup>-/-</sup>Tg; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.



A pesar de las diferencias observadas en los patrones de ingesta, la expresión hipotalámica de genes que codifican los neuropéptidos anorexigénicos, POMC y CART, permaneció inalterada, tanto machos como hembras, a excepción de un aumento en los niveles de POMC en los machos *Gpr54*<sup>-/-</sup> (**Figura 47**).

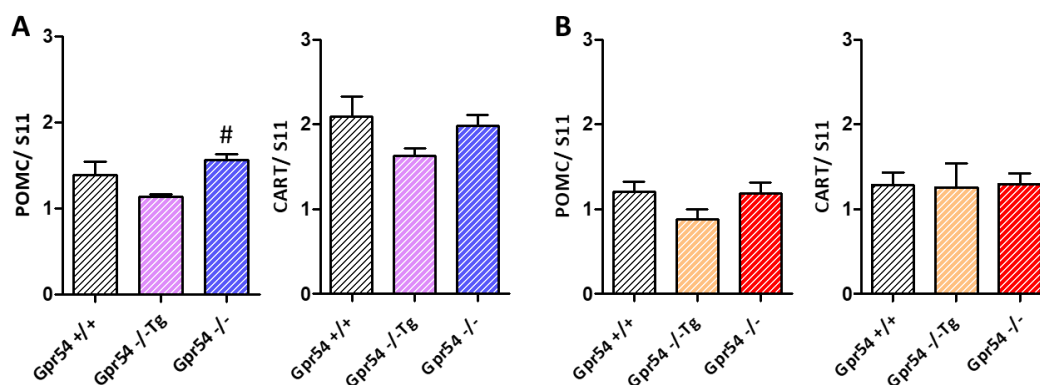


Figura 47. Expresión hipotalámica de los genes POMC y CART en ratones macho (A) y hembra (B) de los tres genotipos (*Gpr54*<sup>+/+</sup>, *Gpr54*<sup>-/-</sup> y *Gpr54*<sup>-/-Tg</sup>), en la etapa adulta y alimentados con HFD durante 11 semanas. Los valores se representan como la media ± SEM. #  $p \leq 0,05$  vs *Gpr54*<sup>-/-Tg</sup>; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

A continuación, se analizó el impacto de la exposición a HFD sobre la homeostasis de la glucosa en los tres genotipos. Nuestros resultados mostraron que la tolerancia a glucosa empeoró significativamente tras exposición a HFD en los ratones macho *Gpr54*<sup>-/-</sup> y *Gpr54*<sup>-/-Tg</sup> respecto de los ratones WT, sin que se detectaran diferencias significativas en la magnitud de las alteraciones del GTT entre los machos de ambos genotipos (**Figura 48**). En las hembras, a diferencia de los machos, la tolerancia a la glucosa empeoró significativamente solo en las hembras *Gpr54*<sup>-/-</sup> alimentadas con HFD, mientras que las hembras *Gpr54*<sup>-/-Tg</sup> mostraron unos perfiles temporales de glucemia y unas respuestas integradas (AUC) durante el GTT similares a la de controles WT alimentados con HFD (**Figura 48**).

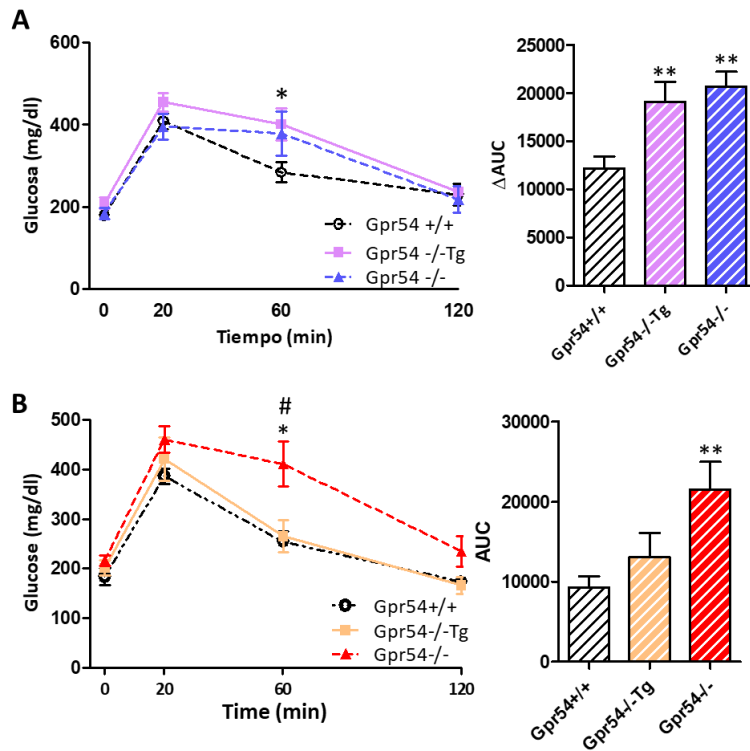


Figura 48. Test de tolerancia a glucosa (GTT) en ratones macho (A) y hembra (B) de los tres genotipos, Gpr54<sup>+/+</sup>, Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-Tg</sup>, en la etapa adulta. Se presenta el perfil de glucosa antes (tiempo 0) y a los 20, 60 y 120 min de administrar un bolo de glucosa ip. Adicionalmente, se muestra igualmente la respuesta de glucemia integral, en forma de AUC, durante el periodo de 120 min, calculado sobre los niveles basales a tiempo 0. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  vs Gpr54<sup>+/+</sup>; #  $p \leq 0,05$  vs Gpr54<sup>-/-Tg</sup>; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Finalmente, selectivamente en hembras de los tres genotipos, analizamos el impacto obesogénico de la OVX, así como el efecto combinado de la OVX y la exposición a HFD sobre distintos parámetros metabólicos en las hembras Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-Tg</sup>. En términos de peso corporal (**Figura 49**), tanto la OVX como la combinación de OVX y HFD provocaron una ganancia exagerada de peso corporal respecto a las hembras intactas, tanto en el genotipo Gpr54<sup>-/-</sup> global como en las ratonas Gpr54<sup>-/-Tg</sup> rescatadas.

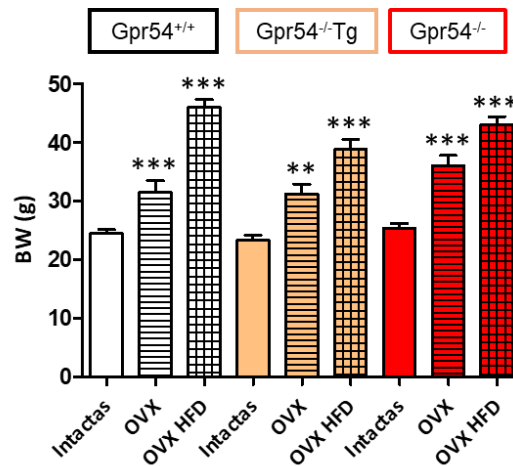


Figura 49. Efecto sobre el peso corporal de la OVX, aplicada como insulto obesogénico, aislada o en combinación con HFD en ratones hembra adultos de los tres genotipos (Gpr54<sup>+/+</sup>; Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-Tg</sup>). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs Gpr54<sup>+/+</sup>; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

De otra parte, la exposición a estas manipulaciones obesogénicas, individualmente o en combinación, indujo alteraciones en el patrón de la ingesta. Así, las hembras OVX con ausencia global del receptor Gpr54 mostraron una disminución de ingesta, tanto en la fase de oscuridad como en la ingesta acumulada durante 24h. Sin embargo, las hembras rescatadas Gpr54<sup>-/-Tg</sup> presentaron una respuesta en términos de ingesta a la OVX que fue similar a la de los controles, a excepción de una supresión moderada de la ingesta durante la fase oscura (**Figura 50**). En el caso de ratonas Gpr54<sup>-/-</sup>, además de modificaciones en la ingesta, éstas mostraron perturbaciones en la tolerancia a la glucosa, con un empeoramiento significativo respecto del grupo WT, tanto en el perfil glucémico como en las respuestas integradas (**AUC; Figura 50**).

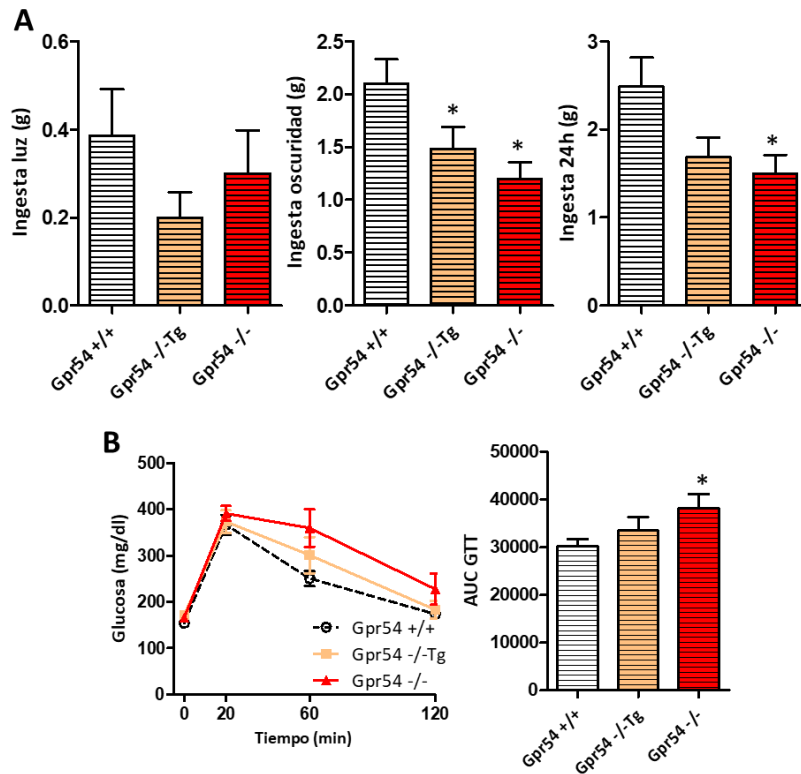


Figura 50. Patrones de ingesta en hembra OVX de tres genotipos (Gpr54<sup>+/+</sup>, Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-Tg</sup>) en la etapa adulta. En (A), se representa la ingesta espontánea tras un ayuno de 12h tanto en la fase de luz como de oscuridad, así como la ingesta total en un periodo de 24h. Además, en (B), test de tolerancia a glucosa (GTT) en ratones hembra de los tres genotipos, Gpr54<sup>+/+</sup>, Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-Tg</sup>, en la etapa adulta. Se presenta el perfil de glucosa antes (tiempo 0) y a los 20, 60 y 120 min de administrar un bolo de glucosa ip. Adicionalmente, se muestra igualmente la respuesta de glucemia integral, en forma de AUC, durante el periodo de 120 min, calculado sobre los niveles basales a tiempo 0. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$  vs Gpr54<sup>+/+</sup>; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

De igual modo, la combinación de los dos insultos obesogénicos, HFD y OVX, causó una perturbación aún más notable de la ingesta (durante la fase oscura y durante el período de 24 horas) y de la tolerancia a la glucosa, pero sólo en ratones hembras Gpr54<sup>-/-</sup>, mientras que las hembras Gpr54<sup>-/-Tg</sup> presentaron respuestas similares a las de las hembras WT sometidas a HFD y OVX (**Figura 51**).

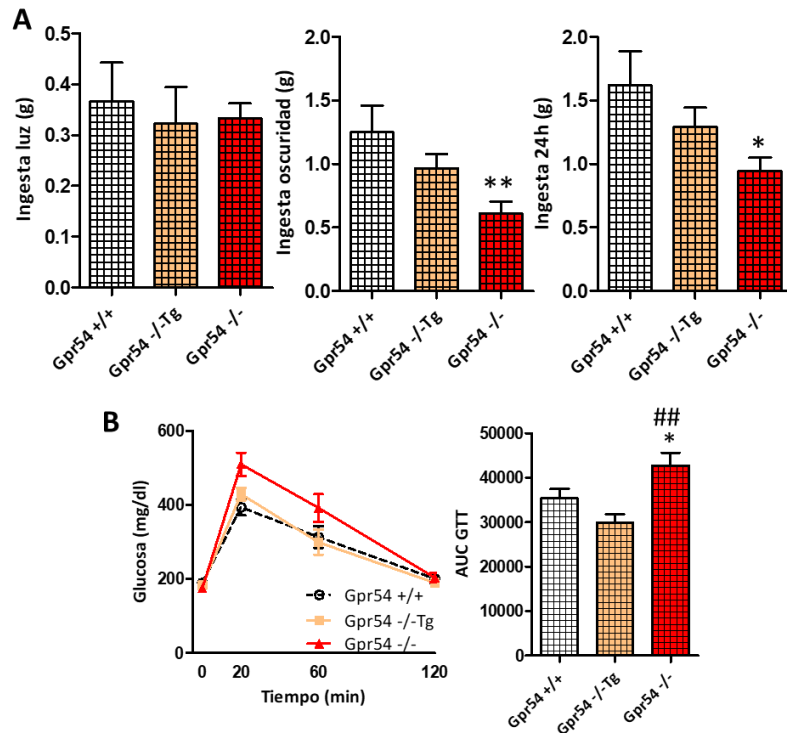


Figura 51. Patrones de ingesta en hembra OVX de tres genotipos (Gpr54<sup>+/+</sup>, Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-</sup>Tg en la etapa adulta y alimentados con HFD durante 11 semanas. En (A), se representa la ingesta espontánea tras un ayuno de 12h tanto en la fase de luz como de oscuridad, así como la ingesta total en un periodo de 24h. Además, en (B), test de tolerancia a glucosa (GTT) en ratones hembra de los tres genotipos, Gpr54<sup>+/+</sup>, Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-</sup>Tg, en la etapa adulta. Se presenta el perfil de glucosa antes (tiempo 0) y a los 20, 60 y 120 min de administrar un bolo de glucosa ip. Adicionalmente, se muestra igualmente la respuesta de glucemia integral, en forma de AUC, durante el periodo de 120 min, calculado sobre los niveles basales a tiempo 0. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  vs Gpr54<sup>+/+</sup>; ##  $p \leq 0,01$  vs Gpr54<sup>-/-</sup>Tg; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

### Bloque experimental III. Implicación de las neuronas Kiss1 del ARC en el control de la homeostasis metabólica: Estudios en el modelo TaKKO.

#### Estudio III – 1. Implicación de la señalización de kisspeptinas del ARC en la regulación de parámetros metabólicos.

A fin de profundizar en la caracterización de las acciones reguladoras de las kisspeptinas en el control del metabolismo, en este último bloque experimental llevamos a cabo el análisis de los parámetros metabólicos definidos en los dos bloques previos en un nuevo modelo murino, denominado

TaKKO (por *Tac2-specific Kiss1 KO*), definido por la ablación selectiva de la expresión de Kiss1 (y por ello de kisspeptinas) en células que expresan Tac2, y por ello en las neuronas KNDy del ARC. Esta aproximación de genómica funcional nos permitiría discriminar el papel de las kisspeptinas producidas en este núcleo clave en la homeostasis metabólica, frente a las acciones de kisspeptinas producidas en tipos celulares distintos de las neuronas KNDy, tanto a nivel del sistema nervioso central como a nivel periférico.

Dado el carácter novedoso del modelo, en primer lugar, llevamos a cabo la comprobación de la eliminación de la expresión de Kiss1 en las neuronas KNDy del ARC en el modelo TaKKO. Para ello, realizamos análisis tipo ISH, a fin de detectar variaciones en los niveles de ARNm de *Kiss1*, tanto en el ARC de ratones macho, como en el ARC y el AVPV de ratones hembra, del genotipo TaKKO y sus correspondientes controles, a los dos meses de edad.

En ratones macho, se detectó una reducción significativa de la expresión de Kiss1 en el ARC de ratones TaKKO respecto de los controles, que se tradujo en una supresión del número de clústeres de células que expresan Kiss1 (**Figura 52**). Esta disminución en la expresión de Kiss1 fue especialmente marcada en el ARC de ratones TaKKO hembra. Además, dado que en las hembras existe una segunda población de neuronas Kiss1 en el AVPV, se analizó la expresión de Kiss1 en este segundo núcleo, detectándose igualmente una reducción en el número de células que expresan Kiss1 en las hembras TaKKO, aunque mucho menor en magnitud que la observada en el ARC (**Figura 53**).

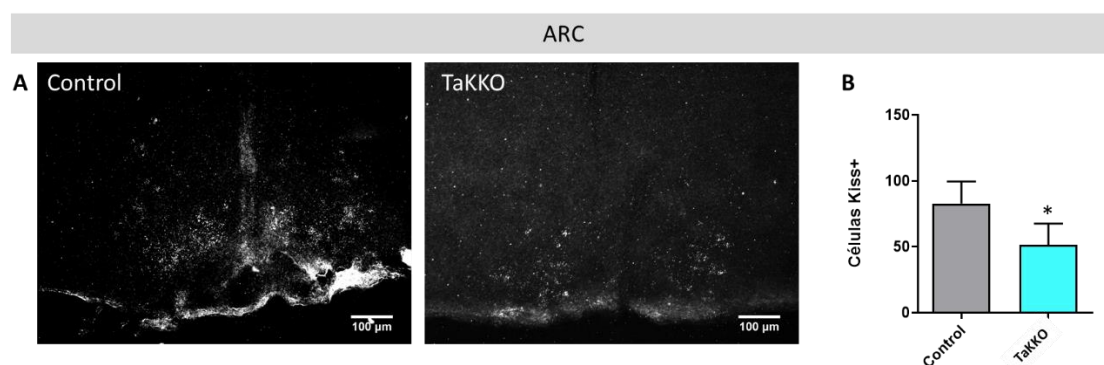


Figura 52. En (A), microfotografías representativas de los análisis de ISH de la expresión de Kiss1 en la región anterior del núcleo ARC en ratones macho de 2 meses de edad, tanto controles como TaKKO. Adicionalmente, en (B) se muestran los datos de la cuantificación de los clústeres de células que expresan Kiss1 en el ARC. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; Student t-test.

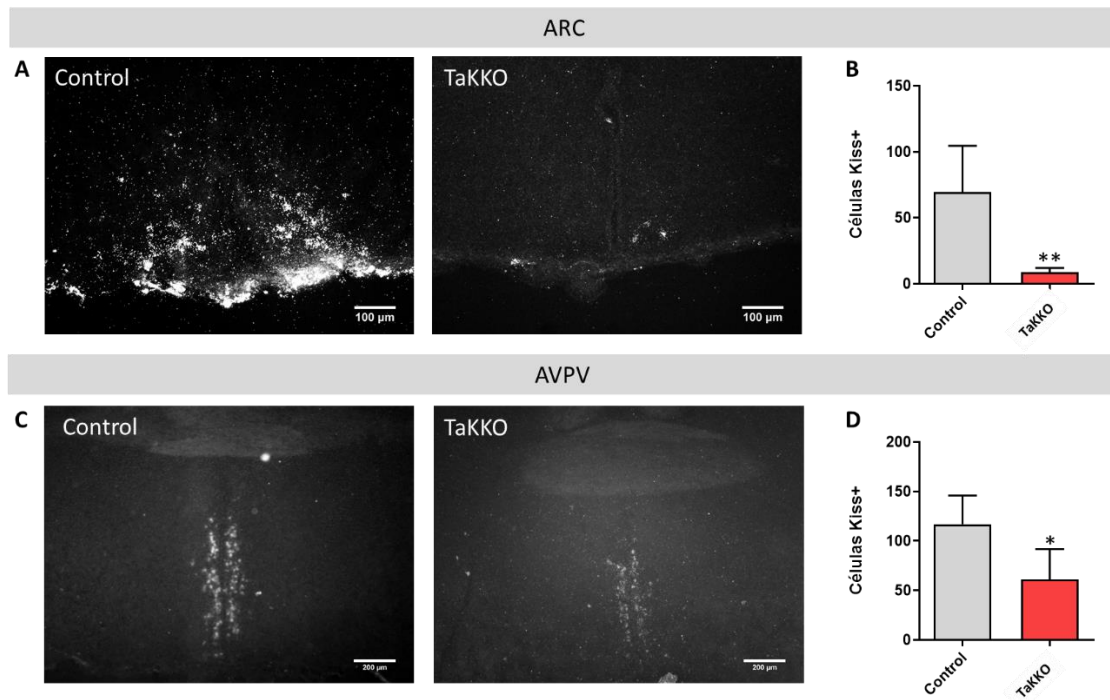


Figura 53. En (A), microfotografías representativas de los análisis de ISH de la expresión de *Kiss1* en la región anterior del núcleo ARC y en el AVPV en ratones hembra de 2 meses de edad, tanto controles como TaKKO. Adicionalmente, en (B) se muestran los datos de la cuantificación de los clústeres de células que expresan *Kiss1* en el ARC. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$  y \*\*  $p \leq 0,01$ ; Student t-test.

A continuación, a fin de determinar la funcionalidad de las neuronas KNDy a pesar de la eliminación de la expresión de *Kiss1*, se analizó la expresión de ARNm de *Tac2* en el ARC de ratones macho y hembra. En este caso, no se encontraron diferencias en la expresión de *Tac2* en ratones TaKKO respecto a los controles en ambos sexos (**Figura 54 y 55**), por lo que no parece haber ningún mecanismo compensatorio por parte de las neuronas KNDy tras la eliminación de *Kiss1*.

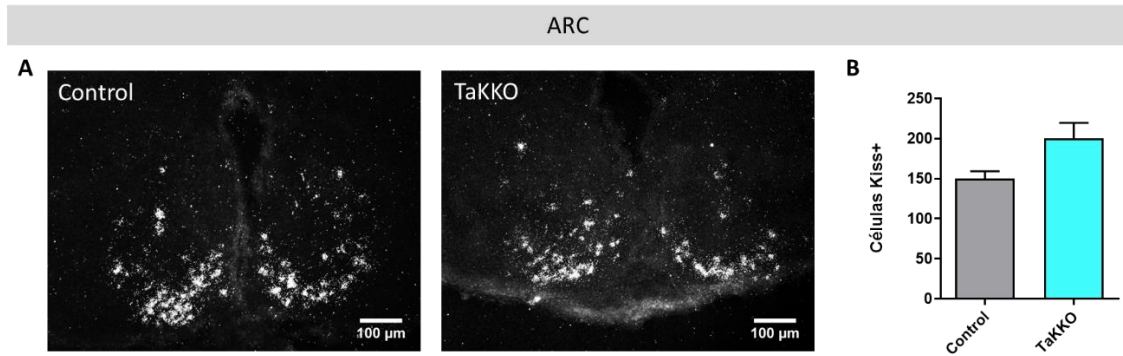


Figura 54. En (A), microfotografías representativas de los análisis de ISH de la expresión de Tac2 en la región anterior del núcleo ARC en ratones macho de 2 meses de edad, tanto controles como TaKKO. Adicionalmente, en (B) se muestran los datos de la cuantificación de los clústeres de células que expresan Kiss1 en el ARC. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.

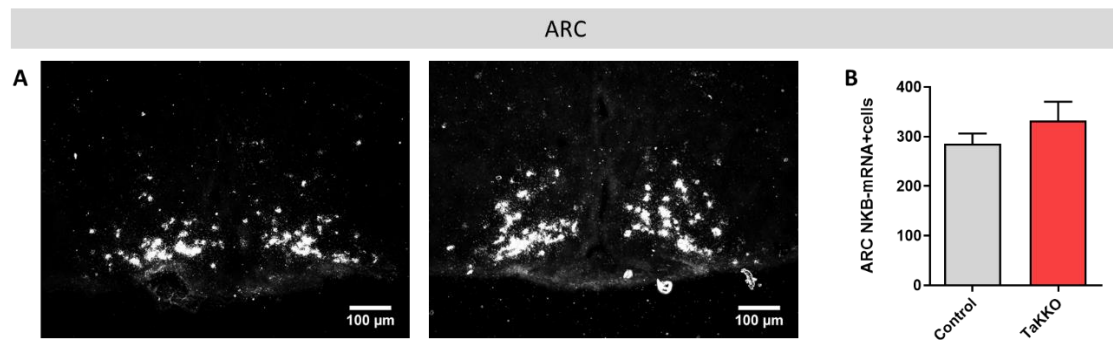


Figura 55. En (A), microfotografías representativas de los análisis de ISH de la expresión de Tac2 en la región anterior del núcleo ARC en ratones hembra de 2 meses de edad, tanto controles como TaKKO. Adicionalmente, en (B) se muestran los datos de la cuantificación de los clústeres de células que expresan Kiss1 en el ARC. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.

Por último, se realizó una caracterización básica de los principales parámetros reproductivos del modelo TaKKO. Para ello se analizó en ratones control y TaKKO de ambos sexos, por una parte, la edad de la apertura vaginal en hembras y la separación balano-prepucial en machos como signos externos de la llegada de la pubertad, y por otro lado se determinó el peso relativo de las gónadas (ovario y testículo), así como los niveles de LH y FSH en ratones de 2 meses de edad. En ratones macho no se observó diferencias en la edad de llegada de la pubertad, ni el peso de testículo a los dos meses de edad en ratones TaKKO vs. controles. Además, los valores de LH y FSH permanecieron similares a los controles. Sin embargo, en ratones hembra, aún cuando la edad de apertura vaginal fue similar para ratonas control y TaKKO, se detectó una



disminución del peso de ovario en ratonas de 2 meses de edad que se correspondió con una bajada de los niveles circulantes de LH en ratonas TaKKO (**Figura 56**).

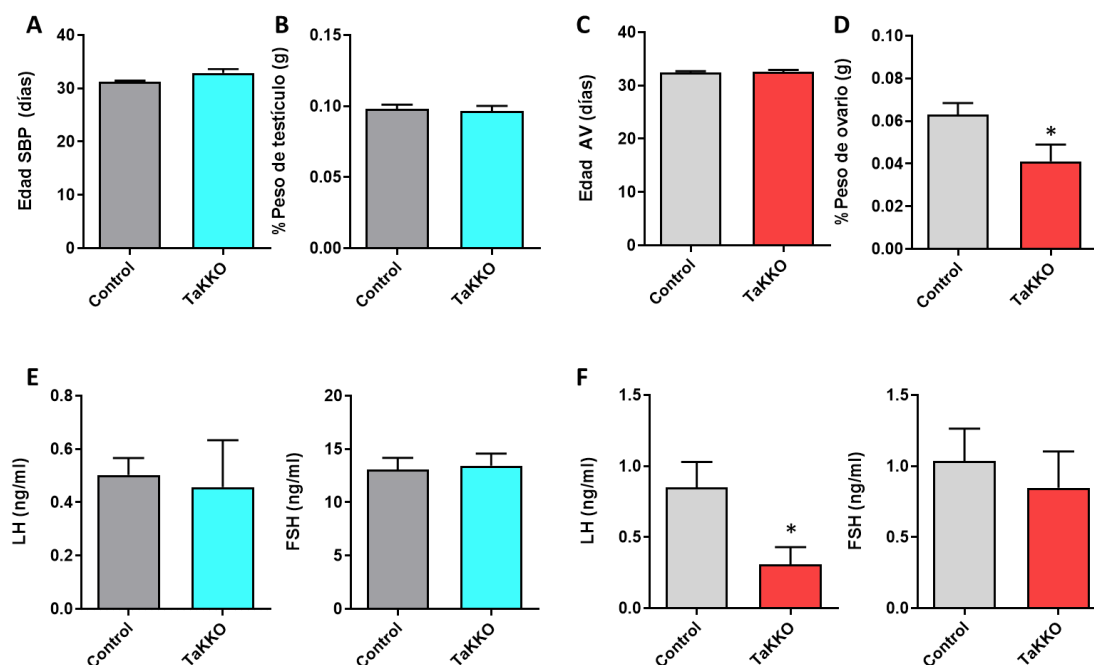


Figura 56. Caracterización básica de parámetros reproductivos representados como: (A) media de edad de separación balanoprepucial en machos (SBP), (B) peso de testículo relativo al peso corporal, (C) edad media de apertura vaginal (AV) en hembras y (D) peso de ovario relativo al peso corporal. Por último, determinaciones hormonales de LH y FSH en ratones macho (E) y hembra (F). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; Student t-test.

A fin de llevar cabo la caracterización metabólica del modelo TaKKO, se analizaron parámetros metabólicos clave, tales como el peso y la composición corporal, la ingesta, el gasto energético, el RQ, la actividad locomotora y el metabolismo glucídico, en ratones TaKKO macho y hembras, y sus correspondientes controles, en el periodo adulto.

Los análisis de peso y composición corporal se implementaron en ventanas concretas del periodo adulto, que incluyeron los 2 meses, 4 meses y 6 meses de edad (**Figura 57**). En machos, si bien el peso corporal fue similar entre ratones controles y TaKKO a las distintas edades estudiadas, se observó un aumento en la adiposidad en ratones TaKKO macho, que fue significativa a los 4 meses de edad, y que se asoció a un descenso de la masa magra. Por su parte, en ratones hembra, el incremento en la adiposidad observado en ratones TaKKO

que fue ya estadísticamente significativo a los 2 meses de edad, y se mantuvo hasta los 6 meses de edad. En todo caso, el mayor aumento en el porcentaje de grasa se detectó a los 4 meses, junto con un descenso significativo de la masa magra en las ratonas TaKKO hembra. En términos globales, sin embargo, las ratonas TaKKO hembra presentaron un peso corporal notablemente menor que los controles.

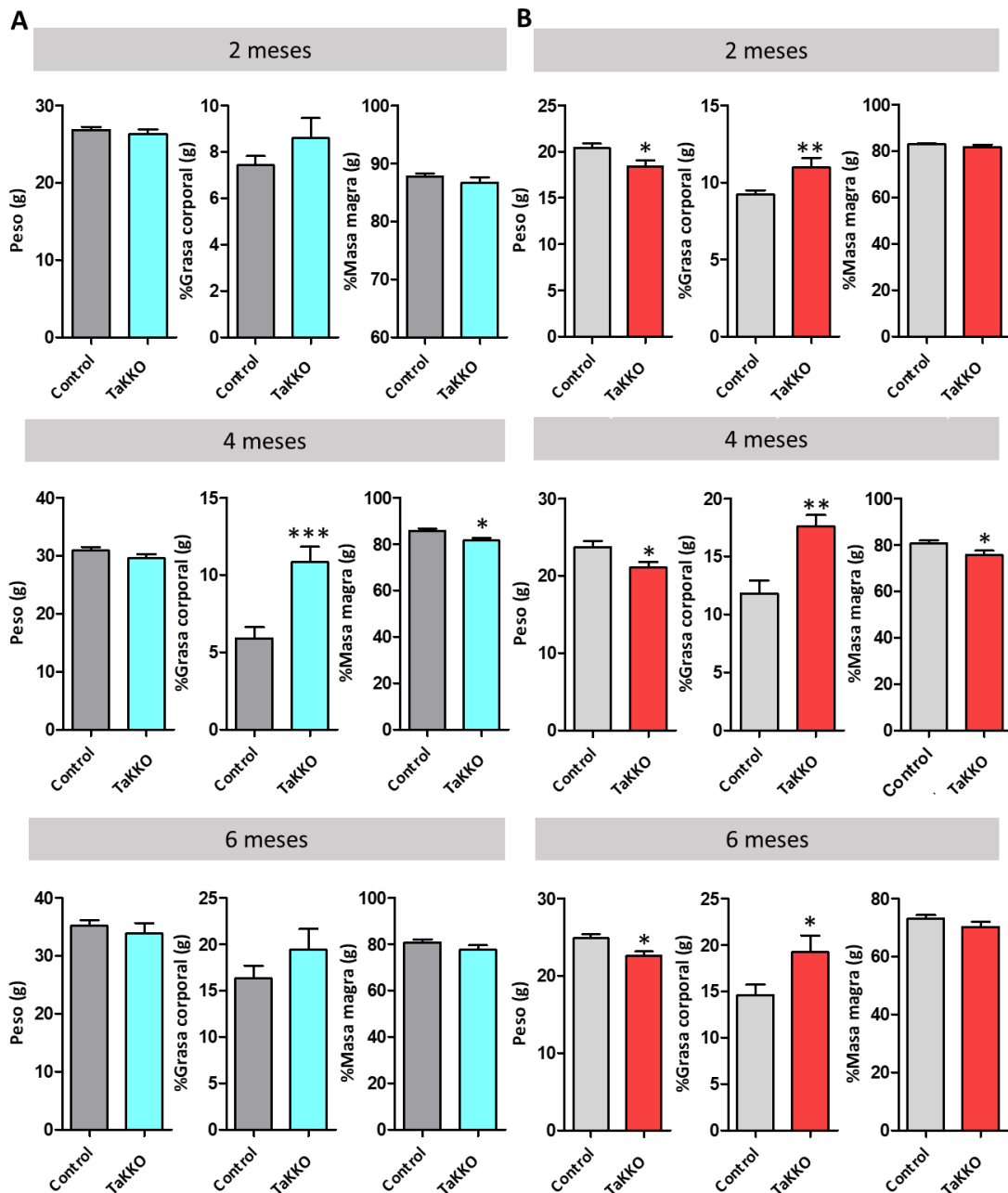


Figura 57. Evolución del peso y de la composición corporal en ratones macho (A) y hembra (B), de los genotipos control y TaKKO, en distintas edades del periodo adulto. Los valores se representan como la media ± SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  y \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs control; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Dado que las mayores diferencias fueron encontradas a la edad de 4 meses, el resto de los parámetros metabólicos estudiados en ratones macho y hembra TaKKO y sus correspondientes controles, fueron analizados a esta edad.

El análisis de los patrones de ingesta, determinados como ingesta en fase de luz y oscuridad y durante un periodo acumulado de 24h (**Figura 58**), no revelaron diferencias respecto de los controles, aunque identificó una tendencia a la disminución de la ingesta en los ratones TaKKO, tanto en machos como en hembras, especialmente durante la fase de oscuridad.

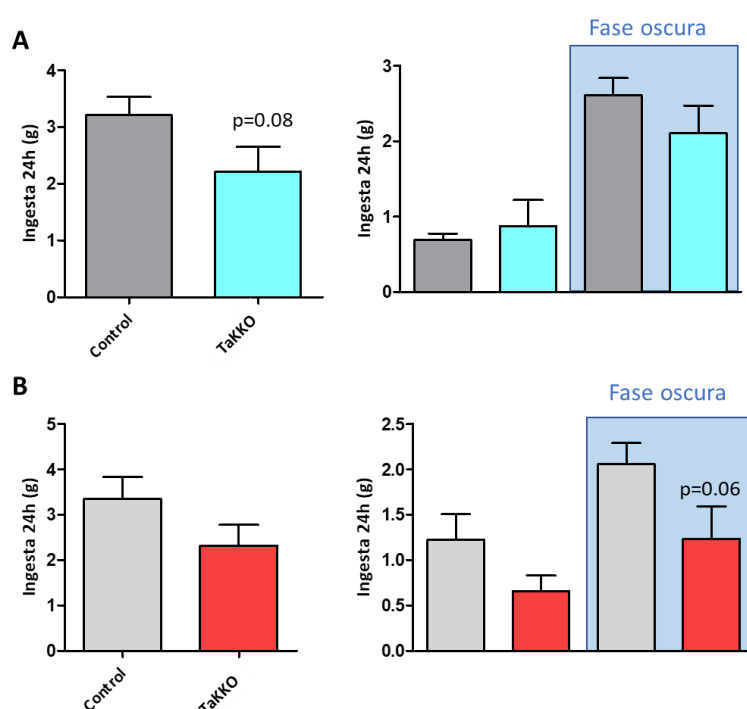


Figura 58. Patrones de ingesta en ratones macho (A) y hembra (B), de los genotipos control y TaKKO, a los 4 meses de edad. La ingesta espontánea está representada como la ingesta total en un periodo de 24h (izquierda), así como la ingesta en las fases de luz y oscuridad (derecha). Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM.

Adicionalmente, se analizó en ratones TaKKO de 4 meses, de ambos sexos, el gasto energético, definido como kcal consumidas al día, el % de peso de BAT, como marcador indirecto de termogénesis, el RQ y la actividad locomotora. En ratones macho, se detectó una reducción del gasto energético frente a los controles, que se vió acompañada de una reducción del peso del BAT, mientras que el RQ y la actividad locomotora no se vieron afectadas (**Figura 59**).

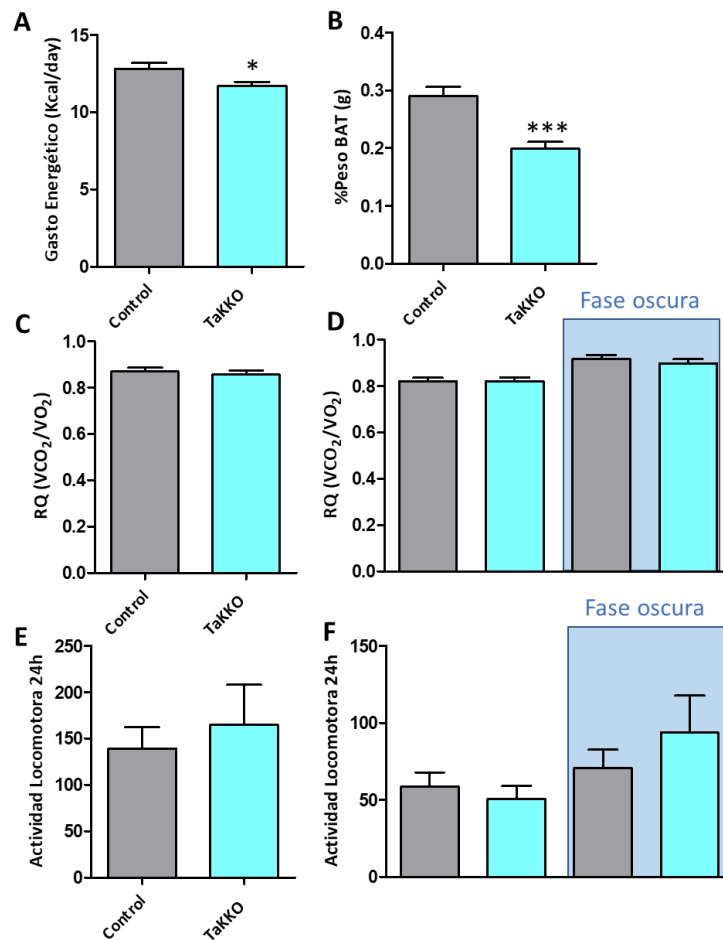


Figura 59. Parámetros metabólicos básicos en ratones macho control y TakKO. Se muestran: (A) gasto energético, (B) % peso BAT / peso corporal; (C) coeficiente respiratorio (RQ) total y (D) en las fases de luz y oscuridad; (E) actividad locomotora total y (F) en las fases de luz y oscuridad. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  vs Control; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Análisis similares realizados en hembras evidenciaron que la ausencia de expresión de kisspeptinas en las neuronas KNDy del ARC indujo una disminución considerable en la actividad locomotora respecto de los controles, que fue mayor durante la fase de luz, así como una reducción en el peso de BAT y aumento diurno del RQ, indicativo del uso preferente de carbohidratos como fuente de energía (**Figura 60**).

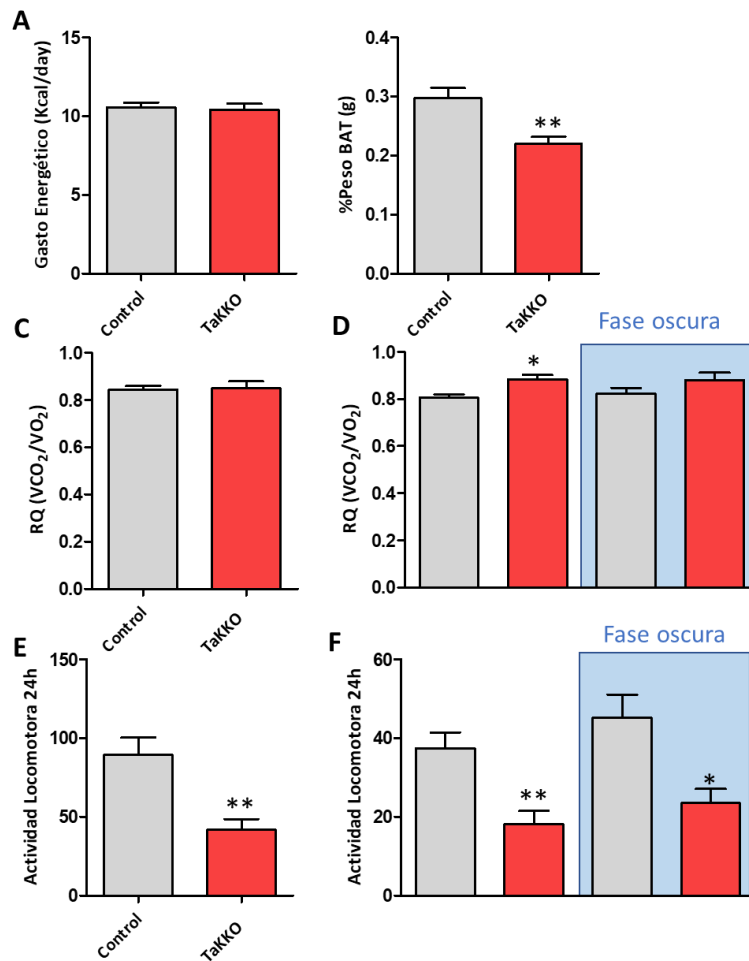


Figura 60. Parámetros metabólicos básicos en ratones hembra control y TaKKO. Se muestran: (A) gasto energético, (B) % peso BAT / peso corporal; (C) coeficiente respiratorio (RQ) total y (D) en las fases de luz y oscuridad; (E) actividad locomotora total y (F) en las fases de luz y oscuridad. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  vs Control; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

Finalmente, llevamos a cabo análisis de la homeostasis glucémica en los ratones TaKKO y sus respectivos controles, de ambos sexos, a los 4 meses de edad. Estos análisis pusieron de manifiesto que la ausencia de expresión de kisspeptinas en neuronas KNDy del ARC afecta de manera moderada la tolerancia a la glucosa. Destacablemente, los perfiles de glucosa en los GTT realizados en machos y hembras presentaron una leve mejora en el manejo de la glucosa de los ratones TaKKO, si bien, por su magnitud, este efecto no se vio reflejado en las respuestas integrales a la sobrecarga de glucosa tras 120-min (AUC), que fueron similares a los valores control en ambos sexos. En cuanto a la respuesta en los test de sensibilidad a insulina, el perfil de glucemia de los

machos TaKKO tras la administración de un bolo de insulina mostro una mejora significativa a los 20 y 120 min post administración, que sin embargo no se tradujo en cambios significativos en las respuestas integrales (AUC) a los 120-min (**Figura 61**). Por otro lado, los datos de ITT en hembras fueron similares entre ratonas control y TaKKO de 4 meses de edad (**Figura 62**).

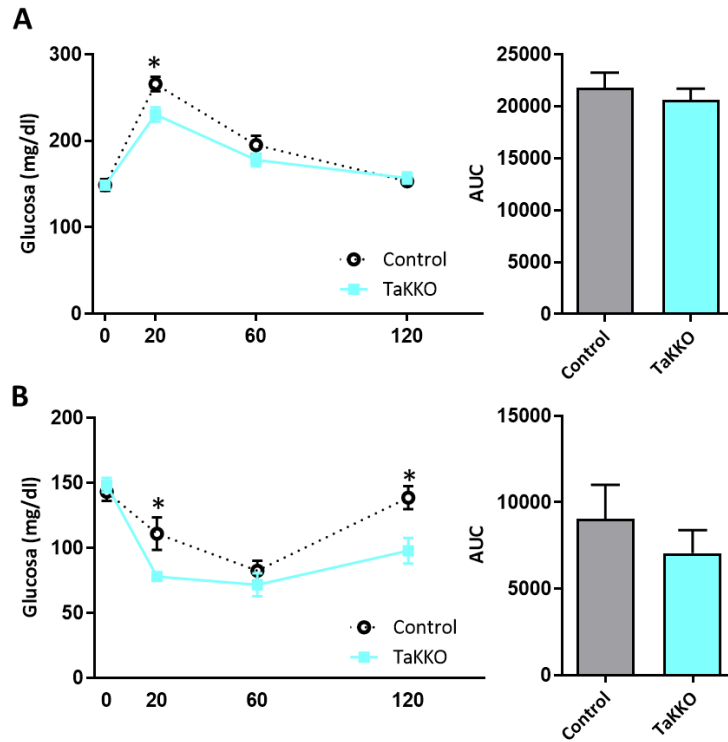


Figura 61. Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y test de tolerancia a insulina (ITT) en ratones macho, de los genotipos control y TaKKO. Se presenta el perfil de glucosa antes (tiempo 0) y a los 20, 60 y 120 min tras la administración ip de un bolo de glucosa (A) o insulina (B) ip. Adicionalmente, en los paneles de la derecha, se muestran las respuestas de glucemia integral, en forma de AUC, durante 120 min tras la inyección de glucosa o insulina. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; vs control; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.

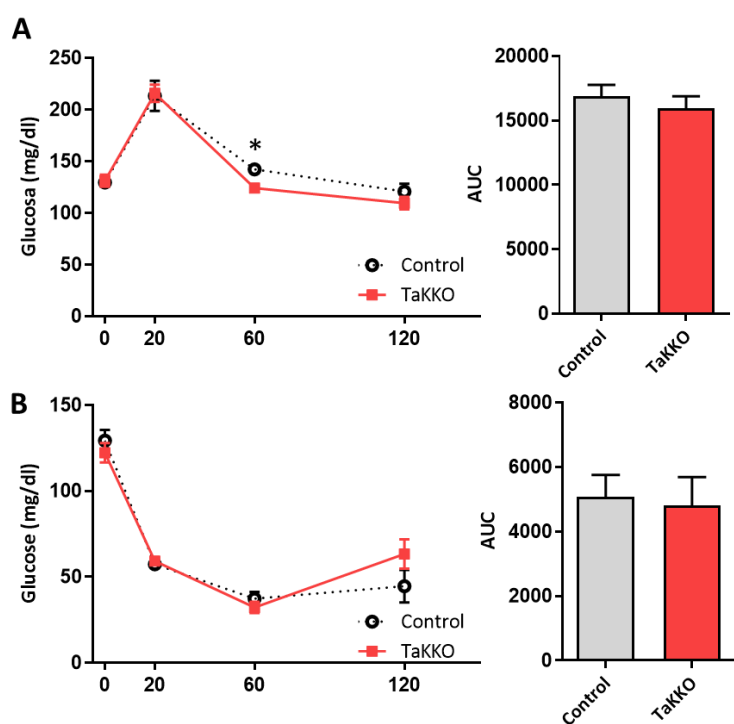


Figura 62. Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y test de tolerancia a insulina (ITT) en ratones hembra, de los genotipos control y TaKKO. Se presenta el perfil de glucosa antes (tiempo 0) y a los 20, 60 y 120 min tras la administración ip de un bolo de glucosa (A) o insulina (B) ip. Adicionalmente, en los paneles de la derecha, se muestran las respuestas de glucemia integral, en forma de AUC, durante 120 min tras la inyección de glucosa o insulina. Los valores se representan como la media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ ; vs control; ANOVA seguido de un test de rango múltiple Student-Newman-Keuls.





# DISCUSIÓN

---



## Discusión

Las kisspeptinas han sido reconocidas en la última década como reguladores esenciales del eje reproductor, actuando a través de su receptor canónico, Gpr54, sobre las neuronas hipotalámicas GnRH, activando así la maduración gonadal y la secreción de hormonas implicadas en la regulación de la función reproductora [119, 199]. A pesar del papel indiscutible de las kisspeptinas como elementos centrales del eje reproductor, diversas evidencias apuntan a otras funciones de las kisspeptinas, entre las que destacan su posible implicación en la modulación de la homeostasis energética y metabólica del organismo. Esta función metabólica incluiría no sólo la capacidad, reconocida ya hace años, de las neuronas Kiss1 de percibir, tanto de forma directa como indirecta, los cambios metabólicos del organismo y transmitir esta información a los centros reguladores de la reproducción [152], sino que además podría incluir acciones reguladoras directas sobre diversos aspectos clave del control metabólico, tales como la ingesta, el balance energético y del peso corporal, y la homeostasis de la glucosa [188], entre otras.

Sin embargo, las evidencias que apuntan a un papel de las kisspeptinas en el control del metabolismo siguen siendo fragmentarias y en ocasiones contradictorias, y su posible relevancia fisiológica es aún motivo de intenso debate. Esto se debe, en gran medida, a la dificultad para discernir las acciones primarias de las kisspeptinas sobre los circuitos metabólicos, centrales y/o periféricos, frente a sus efectos indirectos derivados de su probada capacidad de modular la secreción de hormonas gonadales, que llevan a cabo importantes acciones metabólicas por sí mismas. De igual forma, los sitios de acción primaria de las kisspeptinas en su posible regulación del metabolismo, e incluso la existencia de diferencias entre sexos en estas funciones, permanecen aún en gran medida desconocidos. En este contexto, en esta Tesis Doctoral, hemos empleado aproximaciones farmacológicas y de genómica funcional, que incluyen el uso de modelos murinos novedosos, genéticamente manipulados, con el fin de avanzar en la caracterización integral de las acciones de las kisspeptinas en el control de diversos aspectos del metabolismo en ambos sexos. Para mayor simplicidad, discutiremos a continuación los resultados de cada uno de los tres bloques temáticos de este trabajo, para finalizar con una breve discusión integral de los datos más relevantes y las principales conclusiones alcanzadas.

### *Estudios Farmacológicos*

La monitorización de parámetros metabólicos básicos tras la inyección central o periférica de dosis efectivas (en términos de activación del eje reproductor) de Kp-10 puso de manifiesto tanto el efecto preferente de la administración central de kisspeptina en términos de alteración de diversos indicadores metabólicos, como el marcado dimorfismo sexual de las acciones metabólicas de las kisspeptinas. De entrada, la administración repetida intra-peritoneal de Kp-10 en ratones macho y hembra por un periodo de once días no indujo efectos detectables sobre el peso y la composición corporal, ni produjo cambios significativos en la ingesta, el gasto energético, el cociente respiratorio ni la actividad locomotora en ninguno de los dos sexos. De igual manera, la administración periférica de Kp-10 no alteró de forma significativa la tolerancia a la sobrecarga a la glucosa ni la sensibilidad insulínica, salvo por un moderado aumento de la sensibilidad al bolo de insulina en ratones macho. Destacablemente, a nivel periférico se ha documentado que las kisspeptinas se expresan en tejidos como el hígado, la placenta, el músculo cardíaco o el tejido adiposo [188], si bien sus efectos en estos órganos y su posible contribución a la homeostasis metabólica permanecen en gran medida desconocidos. En todo caso, esta ausencia de efectos metabólicos detectables tras la administración periférica de kisspeptina está en línea con estudios reportados inicialmente en humanos en los que no se observaron alteraciones en parámetros metabólicos básicos, tales como la glucemia basal, tras la infusión parenteral de kisspeptina-54 [227]. No obstante, la falta de efectos detectables en nuestros estudios pudiera ser debida a una dosis sub-óptima de kisspeptina-10, o a los parámetros estudiados, que no incluyeron aspectos tales como la actividad termogénica del BAT, la función hepática o la tensión arterial. En todo caso, nuestro estudio es el primero en analizar los efectos de la administración farmacológica de las kisspeptinas en un modelo con niveles fisiológicos estables de esteroides sexuales, descartando el posible factor de confusión de las acciones indirectas derivadas del efecto estimulador de las kisspeptinas sobre la función gonadal.

A diferencia de la ausencia de efectos tras su administración periférica, la inyección repetida intra-cerebral de Kp-10 indujo alteraciones detectables de diversos parámetros metabólicos, con un perfil claramente diferenciado en función del sexo. Así, en machos, la inyección repetida central de Kp-10 produjo

una caída concomitante de la ingesta de alimentos, el gasto energético y la actividad locomotora, con una moderada elevación del RQ, indicativa de un cambio al uso predominante de carbohidratos como sustrato energético. Sin embargo, estas alteraciones no se tradujeron en cambios detectables en el peso y composición corporal, posiblemente por la supresión paralela de ingesta y consumo energético, ni en alteraciones de la homeostasis glucídica, con niveles de glucemia basal y respuestas en GTT e ITT similares a las de ratones macho tratados con vehículo. Por el contrario, en ratones hembra, la inyección central repetida de Kp-10 no produjo cambios significativos en la ingesta de alimentos y causó un incremento del gasto energético y la actividad locomotora, que se asociaron a una tendencia a la disminución del peso corporal, principalmente a expensas de una modesta reducción de la masa magra. Adicionalmente, el tratamiento central con Kp-10 provocó una disminución de los niveles de glucemia basal, sin cambios detectables en las respuestas a GTT e ITT.

En términos generales, la acción de la Kp-10 sobre la ingesta en machos es compatible con ciertos datos de la literatura que apuntaron un efecto de las kisspeptinas como factores supresores de la ingesta de alimentos. Así, estudios farmacológicos previos evidenciaron que las kisspeptinas pueden actuar como señales anorexigénicas, en virtud de su capacidad de inducir la activación de las neuronas POMC [232], y causar una supresión a corto plazo de la ingesta, como se ha demostrado en ratones [219], ratas macho [220], y en el gerbo [233]. Nuestros resultados están en la línea con estos datos previos, ya que los ratones macho mostraron una disminución significativa de la ingesta tras ayuno en la respuesta aguda a la administración central de Kp-10, que fue más evidente en la fase de oscuridad, pero que también se observó en la ingesta diurna a las 6h y 24h post-administración. De hecho, aunque sin alcanzar la significación estadística, la administración central de Kp-10 tendió a suprimir la ingesta diaria también en ratones hembra durante el tratamiento crónico con kisspeptinas, lo que apunta a un efecto conservado de estas como factores inhibidores de la ingesta, que en todo caso parece más manifiesto en machos.

De otra parte, la activación del gasto energético inducida por Kp-10 en hembras es compatible con datos previos de la literatura [216], y los propios del segundo bloque experimental de esta Tesis Doctoral, que sugieren que la ausencia global de efectos de las kisspeptinas induce, selectivamente en los ratones hembra, un descenso de la actividad termogénica. Nuestros resultados farmacológicos son los primeros en apuntar a un efecto preferentemente central de las kisspeptinas en la mediación de estos efectos, anorexigénico en machos

y termogénico en hembras, y ponen de manifiesto, igualmente por vez primera, que los mismos no derivan secundariamente de la capacidad de las kisspeptinas de modificar los niveles circulantes de andrógenos en machos y estrógenos en hembras.

Llamativamente, la administración central de Kp-10 indujo cambios diametralmente opuestos en términos de actividad locomotora entre sexos, suprimiendo la actividad locomotora en machos y activándola en hembras. Nuestros datos constituyen la primera evidencia acerca del impacto de la administración farmacológica central de las kisspeptinas sobre la actividad locomotora en roedores. En este sentido, datos muy recientes de Padilla y colaboradores [221], empleando modelos de ablación tóxica de neuronas Kiss1 del ARC, han puesto de manifiesto que la eliminación de dichas neuronas en ratones hembra produce una disminución de la actividad locomotora, que es plenamente compatible con el aumento de la actividad locomotora causado por la inyección icv de Kp-10 en hembras, observado en nuestro estudio. El hecho que la administración central de Kp-10 en machos produzca un efecto opuesto sugiere que el papel de las neuronas Kiss1 del ARC en el control de la actividad locomotora es sexualmente dimórfico; aspecto éste que merece estudios específicos en el futuro.

Finalmente, si bien la administración central de Kp-10 no produjo cambios significativos en las respuestas de GTT e ITT en ratones macho o hembra, los ratones hembra presentaron selectivamente una disminución de los niveles basales de glucemia tras la inyección repetida icv de kisspeptina. Este parámetro podría ser indicativo de un cierto efecto beneficioso de las kisspeptinas centrales en el manejo de la glucemia endógena, específicamente en hembras, que es parcialmente compatible con los datos obtenidos en los modelos de ablación global y selectiva de Gpr54, descritos en el segundo bloque experimental de esta Tesis Doctoral.

#### *Acciones directas vs. indirectas de kisspeptinas en el control metabólico: Estudios en el ratón Gpr54<sup>-/-</sup>Tg*

Como se apuntó en epígrafes previos, los potentes efectos estimuladores de las kisspeptinas sobre la función gonadal constituyen una posible fuente de confusión en la discriminación de las acciones genuinas (directas) de las kisspeptinas sobre la función metabólica, toda vez que los esteroides gonadales presentan *per se* importantes acciones en el control del metabolismo, el balance energético y la homeostasis glucídica. Este factor de confusión es especialmente

evidente en estudios previos a esta Tesis Doctoral, en los que se emplearon para la identificación de acciones metabólicas de las kisspeptinas modelos de ablación global del receptor de kisspeptinas, Gpr54, que se caracterizan por un profundo hipogonadismo de origen central [214, 215].

A fin de profundizar en la discriminación de los efectos directos de las kisspeptinas sobre el metabolismo, frente a aquellos derivados de sus acciones sobre la función gonadal, en esta Tesis Doctoral hemos llevado a cabo el análisis metabólico de un modelo de ratón con inactivación genética global del receptor de kisspeptinas Gpr54, y re inserción selectiva del receptor solo en neuronas GnRH, permitiendo así un rescate completo de la maduración puberal y de la función del eje gonadal, especialmente durante edades postnatales y en adultos jóvenes [197, 228]. El análisis de este modelo complementa estudios llevados a cabo en el modelo de ratón Gpr54 KO global [214], ya que nuestra línea de ratón rescatado Gpr54<sup>-/-</sup>Tg comparte la ablación de la señalización por kisspeptinas en todos los tejidos metabólicos relevantes y áreas cerebrales (a excepción de las neuronas GnRH), pero al contrario que los ratones KO globales, los ratones Gpr54<sup>-/-</sup>Tg mantienen la función gonadal dentro de un rango normal, eliminando así este factor de confusión potencial en los estudios metabólicos.

Estudios previos en ratones Gpr54 KO globales revelaron el impacto de la ausencia de señalización por kisspeptinas sobre el peso corporal y la tolerancia a glucosa, de manera más evidente en las hembras [214]. Los datos presentados en esta Tesis confirman estas observaciones previas, pero además proporcionan información adicional relevante con respecto a la influencia de la edad, el sexo y la función gonadal sobre los parámetros estudiados. A este respecto, hemos observado que los ratones macho Gpr54<sup>-/-</sup> muestran una bajada consistente de peso corporal, posiblemente debido a la ausencia del efecto anabolizante de los andrógenos, mientras que las hembras Gpr54<sup>-/-</sup> mostraron un incremento del peso corporal, principalmente durante la etapa adulta, que a su vez está relacionado con un aumento en la adiposidad, que se manifiesta en un incremento de los niveles de leptina, así como con una disminución de la expresión génica de factores termogénicos, tales como UCP1 en el tejido adiposo marrón. Este incremento de la adiposidad en las hembras Gpr54 KO es coincidente con datos previos de la literatura [214, 215]. En cuanto a los machos, la mayor parte de los estudios previos muestran una supresión del peso corporal total en ratones Gpr54 KO globales [234, 235], aunque en otros estudios también se ha observado la ausencia de cambios respecto a los controles [214]; estas divergencias pueden atribuirse a las diferencias entre los

distintos modelos genéticos en modelos con eliminación de Gpr54. Nuestro estudio, además, es el primero que documenta que durante la etapa pre/peripuberal ( $\leq 8$  semanas de edad), cuando la ratio de crecimiento es máxima, los ratones Gpr54<sup>-/-</sup> de ambos sexos muestran una ganancia de peso corporal menor que los controles. Este fenómeno también se detecta en los ratones Gpr54<sup>-/-</sup>Tg, los cuales tiene preservada por completo la llegada de la pubertad [197], lo que indica que este efecto se debe a la ausencia de señalización de kisspeptinas periférica o central en neuronas diferentes a GnRH. Todo esto sugiere que las kisspeptinas tienen un papel importante en el control del peso corporal y del crecimiento durante esta etapa temprana del desarrollo en ambos sexos. Esta función podría estar relacionada con la capacidad ya descrita de las kisspeptinas de modular la secreción de la hormona del crecimiento (GH), tal y como ha sido sugerido en diferentes especies de mamíferos [236-238], en las que se ha apuntado un papel estimulador de las kisspeptinas sobre la secreción de GH [239-241], si bien los datos experimentales no son coincidentes en todos los casos. Cabe destacar que la disminución de peso corporal observada en los ratones macho Gpr54<sup>-/-</sup> adultos se asoció, no obstante, a un aumento de los niveles de adiposidad y leptina, y a una reducción de la masa magra. Dado que este fenómeno no se detectó en los machos Gpr54<sup>-/-</sup>Tg rescatados, se puede concluir que tal cambio en el patrón de composición corporal es el resultado de la supresión de la secreción androgénica y no está relacionado con las acciones primarias de las kisspeptinas. Del mismo modo, la recuperación y aumento de peso corporal observada en ratones hembra Gpr54 KO adultos parece deberse principalmente a la falta de función ovárica, ya que ésta no se observó en el modelo rescatado Gpr54<sup>-/-</sup>Tg. Sin embargo, en este modelo rescatado, se detectó una caída parcial en la expresión de UCP1 en el BAT, sugiriendo por lo tanto una alteración incipiente de la termogénesis del tejido adiposo marrón en la línea Gpr54<sup>-/-</sup> Tg, que se manifiesta de forma mucho más marcada en los ratones KO globales.

En línea con lo descrito previamente en la literatura [214], las hembras Gpr54<sup>-/-</sup> mostraron intolerancia a la glucosa tras un test agudo (GTT), mientras que los machos del mismo genotipo no mostraron diferencias frente a los controles. Estos resultados son parcialmente compatibles con los obtenidos en el primer bloque experimental de esta Tesis donde, si bien las respuestas GTT no fueron alteradas por la administración central de Kp-10, las hembras presentaron una reducción de la glucemia basal tras inyección central repetida de kisspeptina. El análisis comparativo con las respuestas de GTT en los ratones



hembra rescatados,  $Gpr54^{-/-}Tg$ , evidencian un fenotipo intermedio en términos de tolerancia a la glucosa, con un deterioro detectable de los perfiles de GTT vs. los controles WT, que, sin embargo, fue menos severo que el detectado en los ratones KO globales. Estas observaciones sugieren una contribución combinada del fallo en la secreción ovárica y la falta de señalización de kisspeptina en la generación de la perturbación de la homeostasis de la glucosa en los modelos de ablación de  $Gpr54$ . En este sentido, se ha descrito que los estrógenos inducen la proliferación de las células beta pancreáticas y la secreción de insulina [242]. Por lo tanto, el estado de hipogonadismo observado en los ratones  $Gpr54^{-/-}$  globales parece contribuir a su estado de hiperglucemia basal e intolerancia a la glucosa. Por otro lado, se ha propuesto que las kisspeptinas estimulan o inhiben la secreción de insulina, posiblemente dependiendo del estado glucémico previo [224, 225]. En nuestro modelo rescatado, la eliminación de la señalización de kisspeptinas fuera de las neuronas GnRH empeoró el perfil glucémico en GTT, sin afectar la sensibilidad a la insulina, lo que sugiere una acción positiva de las kisspeptinas en términos de secreción de insulina. Estas observaciones cuestionan el papel recientemente propuesto de las kisspeptinas producidas en el hígado como posible factor diabetogénico, debido a su capacidad de suprimir eventualmente la secreción de insulina en ratones [226], pero están en línea con evidencias muy recientes que demuestran que la administración de kisspeptina aumenta la secreción de insulina tras una carga de intravenosa de glucosa en humanos sanos [227]. Diferencias entre los modelos y enfoques experimentales pueden explicar, al menos parcialmente, estas discrepancias. En este sentido, debe tenerse en cuenta que nuestro modelo  $Gpr54^{-/-}Tg$  no permite la discriminación de las acciones pancreáticas frente a las extra-pancreáticas de las kisspeptinas.

Como se ha discutido previamente en el bloque experimental I, y queda recogido en la literatura [219, 232], se ha descrito que la administración central de kisspeptinas puede inducir un efecto anorexigénico, principalmente en ratones macho. Este efecto, sin embargo, es de una magnitud moderada y parece ocurrir sólo a dosis farmacológicas y/o en animales en ayunas. En contraste con esta acción anorexigénica, que también se puso de manifiesto en nuestros estudios farmacológicos en ratones control, los análisis de los patrones de ingesta en nuestros modelos genéticos de manipulación de  $Gpr54$  indican que los ratones  $Gpr54^{-/-}$ , con ablación global de la señalización de kisspeptina, muestran una ingesta suprimida, tanto en las fases de luz como en la de oscuridad, lo que resulta en una reducción consistente de la ingesta durante el

período de 24 horas. Este fenómeno está asociado con un aumento en la expresión génica hipotalámica del factor anorexigénico, POMC, especialmente en ratones Gpr54<sup>-/-</sup> hembra. Estos hallazgos confirman datos anteriores que muestran una reducción de la ingesta y un aumento de la expresión de POMC en ratones con eliminación de Gpr54 a nivel global [214, 216]. Sin embargo, nuestros análisis de los patrones de ingesta en ratones rescatados, Gpr54<sup>-/-</sup>Tg, revelaron diferencias relevantes sexo-dependientes. Así, mientras que los machos Gpr54<sup>-/-</sup>Tg se comportaron igual que los controles WT en términos de ingesta de alimentos, las hembras Gpr54<sup>-/-</sup>Tg mostraron un fenotipo intermedio, con una supresión detectable de la ingesta tanto en la fase de luz como en la fase oscura, así como de la ingesta acumulada de alimentos a lo largo de 24 horas, frente a los ratones control. Estos resultados sugieren que mientras que la supresión de la ingesta detectada en machos Gpr54 KO se debe principalmente al hipogonadismo que éstos presentan, la inhibición de la ingesta en hembras con ablación del receptor de kisspeptina se debe en parte a una acción genuina de las kisspeptinas endógenas en el control de la ingesta; efecto que no se detectó en hembras sometidas a tratamientos farmacológicos con Kp-10.

Nuestro estudio es el primero en explorar el impacto de la manipulación de la señalización de kisspeptinas sobre el peso corporal y la respuesta metabólica en animales sometidos a diferentes insultos obesogénicos, como el HFD y la gonadectomía, este último en ratones hembra. Nuestros datos indican que la ausencia de la señalización de kisspeptinas a nivel global causa un deterioro exagerado de parámetros metabólicos clave tras la exposición a estas condiciones obesogénicas, con un aumento de la ganancia de peso corporal y de la masa grasa, una disminución de la masa magra y un empeoramiento de la tolerancia a la glucosa. Curiosamente, incluso aunque las hembras Gpr54<sup>-/-</sup> mostraron niveles significativamente suprimidos de esteroides sexuales, la eliminación de la función ovárica residual tras la OVX fue capaz de evocar respuestas exageradas de ganancia de peso corporal en ratones Gpr54 KO globales. Sin embargo, la comparación de las respuestas a HFD entre los genotipos Gpr54<sup>-/-</sup> y Gpr54<sup>-/-</sup>Tg reveló que, mientras que en el caso de las hembras, el deterioro del perfil metabólico fue causado principalmente por la falta de función ovárica (ya que no se detectó en ratones Gpr54<sup>-/-</sup>Tg frente a los controles), en los machos se observó un empeoramiento de la respuesta a HFD en cuanto a la ganancia de peso corporal y la tolerancia a la glucosa también en los ratones rescatados, Gpr54<sup>-/-</sup>Tg. Esto sugiere que la falta de señalización por kisspeptinas, independiente de las hormonas sexuales masculinas, podría

aumentar la vulnerabilidad al daño metabólico causado por HFD en los machos. Esto es especialmente evidente para la tolerancia a la glucosa, que se deterioró en una magnitud similar en ratones macho *Gpr54<sup>-/-</sup>* y *Gpr54<sup>-/-</sup>Tg* después de la exposición al HFD.

*Acciones metabólicas de kisspeptinas derivadas de neuronas KNDy: Estudios en el ratón TaKKO*

Como se ha indicado en epígrafes previos de esta Tesis, las neuronas *Kiss1* en el ARC, y particularmente las neuronas KNDy, que co-expresan NKB y dinorfina, son esenciales para preservar la función reproductora, regulando la secreción pulsátil de las neuronas GnRH de manera dependiente de esteroides gonadales[191]. Sin embargo, las poblaciones de neuronas *Kiss1* del ARC proyectan sus axones sobre múltiples dianas, distintas de las neuronas GnRH, por lo que más allá de la reproducción, es presumible la participación de éstas en control de diversos procesos fisiológicos. En este sentido, evidencias aun fragmentarias han sugerido un posible papel de las neuronas KNDy en aspectos relacionados con la función metabólica, si bien su relevancia fisiológica, y los transmisores específicamente implicados en estas funciones, permanecen en gran medida desconocidos. En este contexto, en el tercer bloque experimental de esta Tesis, empleamos un modelo murino novedoso, generado por nuestro grupo, el ratón TaKKO, que presenta eliminación selectiva de la expresión del gen *Kiss1* en células que expresan *Tac2*, y por ello en las neuronas KNDy del ARC, con el fin de dilucidar las posibles acciones metabólicas de las kisspeptinas producidas por esta población neuronal clave.

Nuestros resultados muestran que los ratones TaKKO, con eliminación de la producción de kisspeptinas en las células KNDy del ARC, experimentan un aumento significativo de la adiposidad en ambos sexos, siendo este efecto más notable en las hembras. Este incremento de la adiposidad es mayor en periodos tempranos de la edad adulta (hasta 4 meses de edad), de manera que en ratones adultos estas diferencias respecto a los controles se minimizan, llegando a desaparecer en los machos. Este aumento en la adiposidad es plenamente compatible con los cambios en ratones *Gpr54* KO descritos en el bloque experimental II de esta Tesis, así como con resultados de la literatura [214, 215], y sugieren un papel relevante de las kisspeptinas derivadas de las neuronas KNDy en el control de la adiposidad y la composición corporal. En este sentido, es destacable que estudios previos habían apuntado que las neuronas KNDy del ARC juegan un papel relevante en la mediación de los

cambios de peso inducidos por los estrógenos, de forma que ni el efecto obesogénico de la OVX, ni la pérdida ponderal inducida por estrógenos se ponen de manifiesto en ratas hembra con ablación tóxica de las neuronas KNDy [192]. Esos estudios previos, sin embargo, apuntaban a un papel predominante de la NKB en la mediación de dichos efectos. Nuestros datos evidencian la presumible contribución de las kisspeptinas producidas por neuronas KNDy en el control de la adiposidad corporal.

Diversos estudios en la literatura han sugerido que las neuronas Kiss1 del ARC establecen conexiones sinápticas con neuronas POMC y AgRP, implicadas en la modulación de la ingesta y de la homeostasis energética [232], y que las kisspeptinas modulan la actividad de estas neuronas de manera dependiente de esteroides gonadales [217, 218]. Asimismo, evidencias recientes, obtenidas mediante técnicas optogenéticas para la activación o inactivación neuronal, han sugerido que las neuronas Kiss1 en el ARC pueden desempeñar un papel relevante en el control del peso corporal y la ingesta, a través de otros co-transmisores, como la señalización de glutamato a través de neuronas POMC [217, 243]. A pesar de este posible efecto anorexigénico de las neuronas Kiss1 a través de la activación de neuronas POMC e inactivación de neuronas AgRP, nuestros resultados muestran que la eliminación de la producción de kisspeptinas en neuronas KNDy del ARC no provocó cambios significativos en los patrones de ingesta en machos o hembras, si bien las hembras TaKKO presentaron una tendencia (que no alcanzó la significación estadística) a una reducción de la ingesta, especialmente en la fase de oscuridad. Este fenómeno apuntaría a un moderado efecto primario de naturaleza opuesta al descrito por estudios de manipulación funcional de neuronas Kiss1 del ARC (es decir, predominantemente orexigénico) de las kisspeptinas de origen KNDy, en la línea con las observaciones del bloque II de esta Tesis sobre supresión de la ingesta en ratones hembra, tanto Gpr54 KO como Gpr54<sup>-/-</sup>Tg. Más aun, los machos TaKKO también mostraron una reducción próxima a la significación estadística de la ingesta acumulada en 24 h. Estos resultados no son incompatibles, sino que complementan, los obtenidos en estudios funcionales previos de manipulación funcional o ablación global de las neuronas KNDy [192, 221], destacando que en nuestro modelo, la neurona KNDy mantiene plenamente su función (con niveles plenamente conservados de expresión de Tac2 en el ARC), pero carece de capacidad de secretar kisspeptinas, permitiendo así en análisis selectivo de las funciones de éstas sobre la ingesta, y otros parámetros metabólicos, en condiciones fisiológicas.

De otra parte, nuestros resultados evidencian una supresión del gasto energético en los ratones TaKKO, que fue significativa en machos, y que se asoció a una disminución del peso de BAT en ambos sexos, lo que, pendiente de análisis moleculares más incisivos (por ej. expresión de UCP1) actualmente en curso, es sugestiva de una disminución de la actividad termogénica en ratones con eliminación selectiva de kisspeptinas en neuronas KNDy. Datos previos de la literatura evidenciaron a un papel de las neuronas KNDy del ARC en la regulación de la temperatura corporal mediada por hormonas sexuales [244, 245], si bien dichos estudios apuntaban a NKB como principal señal implicada en esta función. De otra parte, estudios previos en el modelo murino Gpr54 KO documentaron que la eliminación global de la señalización por kisspeptinas provoca una disminución en el gasto energético [215]. Nuestros resultados son compatibles con dichos datos, evidenciando por vez primera la posible participación de las kisspeptinas derivadas de las neuronas KNDy en el control central del gasto energético del organismo.

Adicionalmente, nuestros análisis mostraron que, selectivamente en hembras, la ablación de las kisspeptinas procedentes de neuronas KNDy causa una disminución de la actividad locomotora. En este sentido, y como se ha mencionado anteriormente en esta Discusión, estudios muy recientes han propuesto que las neuronas Kiss1 del ARC podrían operar como controladores metabólicos debido a su capacidad para modificar los ritmos corporales diarios, incluyendo los patrones de actividad locomotora [221]. Nuestros resultados están en línea con dichos estudios, que demostraron que la ablación global de las neuronas Kiss1 del ARC reduce la actividad locomotora, evidenciando un papel destacable de las kisspeptinas producidas por las neuronas KNDy en este proceso. Más aun, estos datos son plenamente compatibles con nuestros resultados farmacológicos, que pusieron de manifiesto una elevación de la actividad locomotora, específicamente en hembras, tras la administración icv de Kp-10. En línea con los datos farmacológicos, que apuntaban a un dimorfismo sexual en este efecto, los ratones TaKKO machos no presentaron alteraciones detectables de la actividad locomotora, ni en la fase diurna ni en la nocturna.

Finalmente, nuestros análisis detectaron alteraciones sutiles en los perfiles de glucemia tras la sobrecarga de glucosa o insulina en ratones TaKKO, especialmente en machos, donde la ablación selectiva de kisspeptinas de las neuronas KNDy indujo una mejora moderada del manejo de glucosa tras la sobrecarga e incluso aumento ligeramente la sensibilidad a insulina, al menos a determinados tiempos durante el GTT y el ITT. Estos cambios no se detectaron

en hembras, salvo por una mayor caída, muy moderada, en los niveles de glucemia a los 60-min del GTT. Estos resultados contrastan con los obtenidos en el bloque experimental II de esta Tesis, en los que la eliminación global de Gpr54 se asoció a un empeoramiento de los perfiles glucémicos tras la sobrecarga de glucosa, lo que sugiere un papel diferencial de la señalización de kisspeptina de diversos orígenes (KNDy vs. periférica o de otras áreas del sistema nervioso central) en el control de la homeostasis glucídica.

*Sinopsis de los efectos metabólicos de las kisspeptinas y las aproximaciones experimentales empleadas*

Las kisspeptinas, neuropéptidos clave en el control de la pubertad y la función reproductora, han sido implicadas en los últimos años en el control de diversas funciones biológicas fuera del ámbito reproductor, que van desde la organogénesis de determinados tejidos hasta la función cardiovascular. Dada su probada participación en la mediación de los efectos de señales metabólicas sobre el eje reproductor, en los últimos años, la identificación y caracterización de las posibles acciones primarias de las kisspeptinas en el control directo de distintos aspectos de la homeostasis energética y metabólica de organismo ha concitado un interés creciente. Sin embargo, los potentes efectos de las kisspeptinas sobre la secreción de hormonas gonadales, que poseen per se importantes acciones reguladoras sobre el metabolismo, y la multiplicidad de orígenes y sitios de acción de las mismas, han complicado considerablemente la interpretación de los escasos análisis aun disponibles acerca de las funciones metabólicas de las kisspeptinas, con resultados poco concluyentes o incluso contradictorios.

En la presente Tesis Doctoral, hemos acometido el estudio integral de las acciones de las kisspeptinas en el control metabólico, mediante el uso de aproximaciones farmacológicas y de genómica funcional en modelos murinos. Gracias a esta combinación de estudios de ganancia (farmacológicos) y pérdida de función (con ablación selectiva de las kisspeptinas o su receptor en tejidos y/o tipos celulares concretos), hemos podido poner de manifiesto acciones discernibles de las kisspeptinas en el control de aspectos clave del metabolismo, tales como el peso y la composición corporal, la ingesta de alimentos, el gasto energético, la actividad locomotora y la homeostasis glucídica; estos efectos, identificados en los diferentes bloques temáticos de esta Tesis, aparecen ilustrados de forma sinóptica en los tablas y figuras de resumen gráfico que se muestran al final de esta sección. Más aun, nuestros datos son los primeros en diferenciar entre las acciones primarias de las kisspeptinas en el control

metabólico vs. las derivadas secundariamente de su capacidad de modular las secreciones gonadales, mediante el empleo de modelos adecuados, tales como los ratones gonadectomizados reemplazados con niveles fisiológicos de esteroides sexuales o el ratón  $Gpr54^{-/-}Tg$  rescatado. Finalmente, nuestro análisis sistemático de los perfiles metabólicos en los modelos de ambos sexos nos ha permitido poner de manifiesto interesantes diferencias entre machos y hembras en el control de aspectos clave del metabolismo, cuyas bases neuroendocrinas merecen ser estudiadas con mayor profundidad en el futuro.

Destacablemente, si bien empleamos aproximaciones complementarias de ganancia y pérdida de función en modelos de ratón, no en todos los casos los resultados obtenidos fueron plenamente congruentes entre todos los modelos. Por ejemplo, mientras en términos de actividad locomotora en ratones hembra, los efectos de la administración central de Kp-10 (activación) fueron totalmente compatibles con el impacto de la ablación de kisspeptinas de neuronas KNDy en las ratonas TaKKO (inhibición), los cambios de ingesta detectados en los modelos farmacológicos (inhibición, especialmente en machos) fueron llamativamente similares a los detectados en los modelos de ablación de  $Gpr54$  y de kisspeptinas de origen KNDy, donde variablemente según el genotipo y sexo, se detectó igualmente una supresión de la ingesta. Esta aparente discrepancia puede ser indicativa de la complejidad de las acciones metabólicas de las kisspeptinas, donde acciones sobre distintas dianas pudieran evocar respuestas diferentes. Por otro lado, en la comparación de los datos farmacológicos y los derivados de los modelos genéticos, debemos tener en cuenta la naturaleza congénita de las manipulaciones genéticas empleadas, que podría haber desencadenado eventos compensatorios, así como las posibles alteraciones hormonales que, con magnitud variable, presentan dichos modelos. Así, hemos descrito previamente que en nuestro modelo rescatado  $Gpr54^{-/-}Tg$  aparecen, a largo plazo, ciertas alteraciones sutiles pero detectables de la función gonadal [197]. Del mismo modo, aunque los datos disponibles demuestran claramente que, en las edades estudiadas en esta Tesis, los ratones TaKKO no son hipogonadales, éstos, especialmente las hembras, muestran una supresión parcial del eje gonadotrópico, que no obstante no altera la pubertad ni la fertilidad. Pendientes de estudios de caracterización aun en curso, estas características podrían explicar, al menos en parte, algunos de los datos no concordantes con las observaciones de nuestros estudios farmacológicos.

En todo caso, la comparación sistemática de los parámetros metabólicos analizados en los modelos farmacológicos y de genómica funcional, recogida en

esta Tesis, no sólo documenta una contribución relevante de las kisspeptinas, dependiente al menos en parte de sus efectos sobre las hormonas gonadales, en el control del peso corporal y la homeostasis metabólica, sino que también pone de manifiesto efectos primarios de la señalización de kisspeptinas en la regulación del peso corporal, la ingesta de alimentos, el gasto energético, la actividad locomotora, la homeostasis glucídica y las respuestas metabólicas a los insultos obesogénicos, algunos de los cuales se producen de una manera sexualmente dimórfica y cuya relevancia fisiopatológica, por ejemplo, en determinadas patologías reproductivas que se asocian frecuentemente con alteraciones metabólicas evidentes, merece una investigación más profunda.



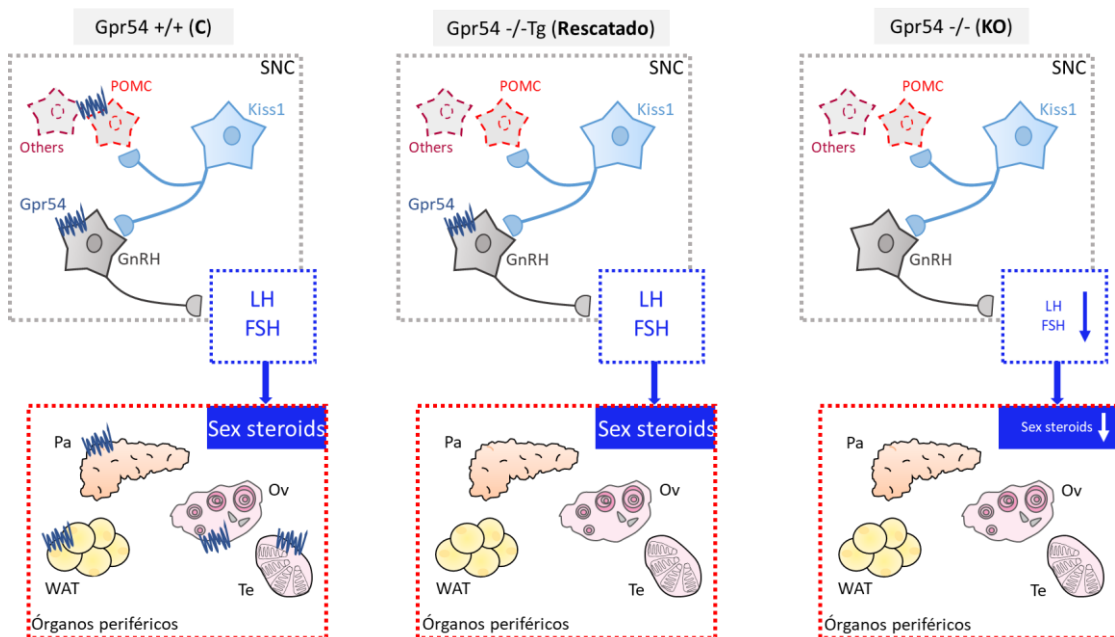
**Bloque temático I:** Estudios farmacológicos de administración de Kp-10

<b>Machos</b>	<b>Veh</b>	<b>KP ICV</b>	<b>KP IP</b>
Peso corporal	Control	=	=
%Masa grasa	Control	=	=
Ingesta	Control	↓	=
Gasto energético	Control	↓	=
RQ	Control	↑	=
Actividad locomotora	Control	↓	=
Intolerancia a glucosa (GTT)	Control	=	=
Resistencia a Insulina (ITT)	Control	=	↓

<b>Hembras</b>	<b>Control</b>	<b>KP ICV</b>	<b>KP IP</b>
Peso corporal final	Control	≤	=
%Masa grasa	Control	=	=
Ingesta	Control	=	=
Gasto energético	Control	↑	=
RQ	Control	=	=
Actividad locomotora	Control	↑	=
Intolerancia a glucosa(GTT)	Control	=	=
Resistencia a insulina (ITT)	Control	=	=

## Bloque temático II: Estudios metabólicos en el ratón $Gpr54^{-/-}$ Tg (rescatado)



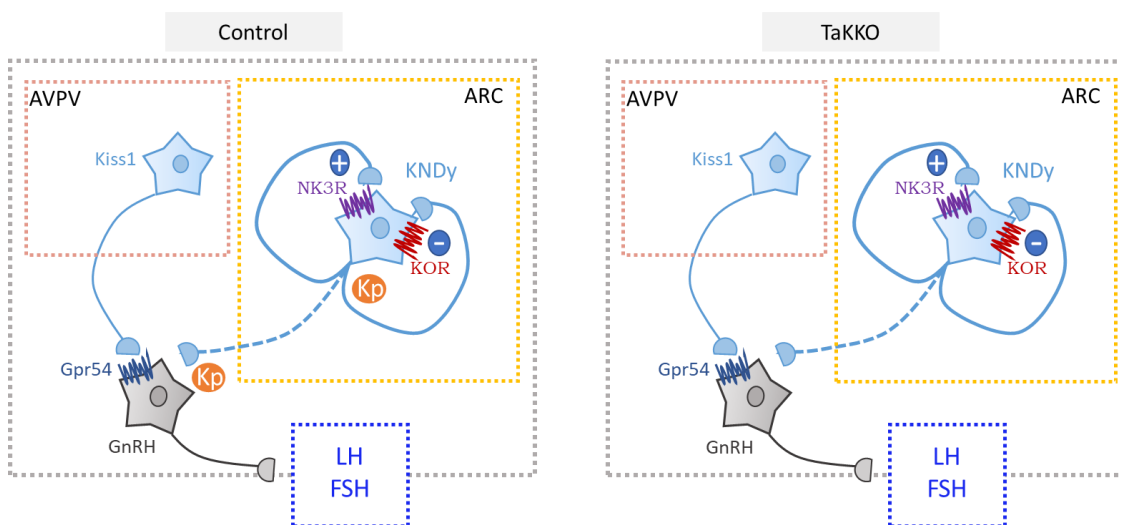
Machos	$Gpr54^{+/+}$	$Gpr54^{-/-}$ Tg	$Gpr54^{-/-}$
Peso corporal final	Control	↓	↓↓
%Masa grasa	Control	=	↑
Ingesta	Control	=	↓
Intolerancia a glucosa (GTT)	Control	=	=

Hembras	$Gpr54^{+/+}$	$Gpr54^{-/-}$ Tg	$Gpr54^{-/-}$
Peso corporal final	Control	≤	↑
%Masa grasa	Control	≥	↑
Ingesta	Control	↓	↓↓
Intolerancia a glucosa(GTT)	Control	↑	↑↑

En el panel superior, se ofrece una representación esquemática de los tres genotipos estudiados en este Bloque Temático, que incluyen el ratón control (**WT**), con señalización de kisspeptinas y función reproductiva conservada; el ratón  $Gpr54^{-/-}$  (**KO**), con ausencia global de señalización de kisspeptinas y por ello, una supresión completa del eje reproductor, que se traduce en niveles muy bajos de esteroides gonadales; y el ratón  $Gpr54^{-/-}$ Tg (**Rescatado**), en el que hay ausencia global de  $Gpr54$  salvo en neuronas GnRH, lo que permite el rescate de la función gonadal, con niveles conservados de esteroides gonadales. En el panel inferior, se ofrece un resumen de los cambios detectados en los principales parámetros metabólicos estudiados.

### Bloque temático III: Estudios metabólicos en el ratón TaKKO



<b>Machos</b>	<b>Control</b>	<b>TaKKO</b>
Peso corporal	Control	=
%Masa grasa	Control	↑
Ingesta	Control	≤
Gasto energético	Control	↓
RQ	Control	=
Actividad locomotora	Control	=
Intolerancia a glucosa (GTT)	Control	≤
Resistencia a Insulina (ITT)	Control	≤
<b>Hembras</b>	<b>Control</b>	<b>TaKKO</b>
Peso corporal final	Control	↓
%Masa grasa	Control	↑
Ingesta	Control	≤
Gasto energético	Control	↓
RQ	Control	↑
Actividad locomotora	Control	↓
Intolerancia a glucosa(GTT)	Control	≤
Resistencia a insulina (ITT)	Control	=

En el panel superior, se ofrece una representación esquemática del modelo TaKKO, en el que se produce una eliminación selectiva de la producción de kisspeptinas (Kp) en neuronas KNDy, aunque manteniendo la integridad de éstas. En el panel inferior, se ofrece un resumen de los cambios detectados en los principales parámetros metabólicos estudiados.



# CONCLUSIONES

---



## Conclusiones

Las principales conclusiones de nuestro trabajo son:

1. La administración farmacológica central, pero no periférica, de kisspeptina-10, causó una supresión concurrente de la ingesta, el gasto energético y la actividad locomotora en ratones macho, mientras que indujo un aumento del gasto energético y la actividad locomotora, junto a una moderada disminución del peso corporal, en ratones hembra, de manera independiente de cambios en los niveles de esteroides sexuales.
2. La ablación congénita del receptor de kisspeptinas indujo cambios en el peso y la composición corporal, la ingesta y la homeostasis glucídica, y agravó el impacto metabólico de manipulaciones obesogénicas, como la dieta alta en grasa y la ovariectomía. Aunque una parte notable de esos efectos parece derivar del estado de hipogonadismo asociado a la eliminación de la señalización de kisspeptinas, nuestros estudios en modelos con ablación condicional de Gpr54 ponen de manifiesto un papel primario de este sistema en el control del peso corporal en periodos pre/peri-puberales, el control de la ingesta y la homeostasis glucídica, especialmente en hembras, así como en la adaptación a insultos obesogénicos, especialmente en machos.
3. La eliminación selectiva de las kisspeptinas procedentes de neuronas KNDy produjo alteraciones en la composición corporal, con aumento de la adiposidad y descenso del gasto energético en ambos sexos, y una alteración sexualmente dimórfica de la actividad locomotora (disminuida en hembras) y de la homeostasis glucídica (con mejoras moderadas de los perfiles de tolerancia a glucosa e insulina en machos).
4. Globalmente, nuestros resultados documentan un papel fisiológico de la señalización de kisspeptinas en la regulación del peso y composición corporal, la ingesta de alimentos, el gasto energético, la actividad locomotora, la homeostasis glucídica y las respuestas metabólicas a los insultos obesogénicos. Estos efectos, sin embargo, dependen del sitio de acción y, en algunos casos, se presentan de manera sexualmente dimórfica.





# BIBLIOGRAFÍA

---



## Bibliografía

- [1] M.A. Rossi, G.D. Stuber, Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding, *Cell Metab* 27(1) (2018) 42-56.
- [2] H. Münzberg, E. Qualls-Creekmore, H.R. Berthoud, C.D. Morrison, S. Yu, Neural Control of Energy Expenditure, *Handb Exp Pharmacol* 233 (2016) 173-94.
- [3] S. Burbridge, I. Stewart, M. Placzek, Development of the Neuroendocrine Hypothalamus, *Compr Physiol* 6(2) (2016) 623-43.
- [4] A.W. Hetherington, S.W. Ranson, The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions, *American Journal of Physiology*, 1942, pp. 609-617.
- [5] A.C. Guyton, J.E. Hall, *Tratado de fisiología médica*, Ed McGraw-Hill, Interamericana de España, Madrid, 2010, 2016.
- [6] I.J. Clarke, Hypothalamus as an endocrine organ, *Compr Physiol* 5(1) (2015) 217-53.
- [7] B.J. Everitt, T. Hökfelt, Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus, *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 47 (1990) 1-15.
- [8] K.E. Barret, S.M. Barman, S. Boitano, H.L. Brooks, Ganong, *Fisiología Médica.*, 23ª ed., McGraw-Hill Interamericana editores 2010.
- [9] R.D. Cone, M.A. Cowley, A.A. Butler, W. Fan, D.L. Marks, M.J. Low, The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis, *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5 (2001) S63-7.
- [10] J.N. Campbell, E.Z. Macosko, H. Fenselau, T.H. Pers, A. Lyubetskaya, D. Tenen, M. Goldman, A.M. Verstegen, J.M. Resch, S.A. McCarroll, E.D. Rosen, B.B. Lowell, L.T. Tsai, A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types, *Nat Neurosci* 20(3) (2017) 484-496.
- [11] F. Langlet, B.E. Levin, S. Luquet, M. Mazzone, A. Messina, A.A. Dunn-Meynell, E. Balland, A. Lacombe, D. Mazur, P. Carmeliet, S.G. Bouret, V. Prevot, B. Dehouck, Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting, *Cell Metab* 17(4) (2013) 607-17.
- [12] C.B. M., *Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus*, *Peptides*, 1985, pp. 1-11.
- [13] G.S. Barsh, M.W. Schwartz, Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration, *Nat Rev Genet* 3(8) (2002) 589-600.
- [14] R.D. Cone, Anatomy and regulation of the central melanocortin system, *Nat Neurosci* 8(5) (2005) 571-8.
- [15] Y.S. Allen, T.E. Adrian, J.M. Allen, K. Tatemoto, T.J. Crow, S.R. Bloom, J.M. Polak, Neuropeptide Y distribution in the rat brain, *Science* 221(4613) (1983) 877-9.
- [16] E. Ekblad, L. Edvinsson, C. Wahlestedt, R. Uddman, R. Håkanson, F. Sundler, Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers, *Regul Pept* 8(3) (1984) 225-35.
- [17] D. Larhammar, Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide, *Regul Pept* 65(3) (1996) 165-74.
- [18] J.T. Clark, P.S. Kalra, W.R. Crowley, S.P. Kalra, Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats, *Endocrinology* 115(1) (1984) 427-9.
- [19] C.J. Billington, J.E. Briggs, M. Grace, A.S. Levine, Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism, *Am J Physiol* 260(2 Pt 2) (1991) R321-7.
- [20] C. Fekete, S. Sarkar, W.M. Rand, J.W. Harney, C.H. Emerson, A.C. Bianco, R.M. Lechan, Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis, *Endocrinology* 143(10) (2002) 3846-53.
- [21] Y. Su, E. Foppen, E. Fliers, A. Kalsbeek, Effects of Intracerebroventricular Administration of Neuropeptide Y on Metabolic Gene Expression and Energy Metabolism in Male Rats, *Endocrinology* 157(8) (2016) 3070-85.

- [22] S. Srinivasan, C. Lubrano-Berthelie, C. Govaerts, F. Picard, P. Santiago, B.R. Conklin, C. Vaisse, Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans, *J Clin Invest* 114(8) (2004) 1158-64.
- [23] A.J. Clark, 60 YEARS OF POMC: The proopiomelanocortin gene: discovery, deletion and disease, *J Mol Endocrinol* 56(4) (2016) T27-37.
- [24] A.P. Coll, I.S. Farooqi, B.G. Challis, G.S. Yeo, S. O'Rahilly, Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics, *J Clin Endocrinol Metab* 89(6) (2004) 2557-62.
- [25] M. Cai, V.J. Hruby, The Melanocortin Receptor System: A Target for Multiple Degenerative Diseases, *Curr Protein Pept Sci* 17(5) (2016) 488-96.
- [26] D. Atasoy, J.N. Betley, H.H. Su, S.M. Sternson, Deconstruction of a neural circuit for hunger, *Nature* 488(7410) (2012) 172-7.
- [27] C. Zhan, J. Zhou, Q. Feng, J.E. Zhang, S. Lin, J. Bao, P. Wu, M. Luo, Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively, *J Neurosci* 33(8) (2013) 3624-32.
- [28] W.J. Shen, T. Yao, X. Kong, K.W. Williams, T. Liu, Melanocortin neurons: Multiple routes to regulation of metabolism, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(10 Pt A) (2017) 2477-2485.
- [29] P. Kühnen, K. Clément, S. Wiegand, O. Blankenstein, K. Gottesdiener, L.L. Martini, K. Mai, U. Blume-Peytavi, A. Grüters, H. Krude, Proopiomelanocortin Deficiency Treated with a Melanocortin-4 Receptor Agonist, *N Engl J Med* 375(3) (2016) 240-6.
- [30] M.J. Low, Neuroendocrinology: New hormone treatment for obesity caused by POMC-deficiency, *Nat Rev Endocrinol* 12(11) (2016) 627-628.
- [31] B.P. Tooke, H. Yu, J.M. Adams, G.L. Jones, T. Sutton-Kennedy, L. Mundada, N.R. Qi, M.J. Low, K.H. Chhabra, Hypothalamic POMC or MC4R deficiency impairs counterregulatory responses to hypoglycemia in mice, *Mol Metab* 20 (2019) 194-204.
- [32] P. Kristensen, M.E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K.N. Christjansen, B.S. Wulff, J.T. Clausen, P.B. Jensen, O.D. Madsen, N. Vrang, P.J. Larsen, S. Hastrup, Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin, *Nature* 393(6680) (1998) 72-6.
- [33] 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(3) (2002) 203-6.
- [34] K. Suzuki, C.N. Jayasena, S.R. Bloom, Obesity and appetite control, *Exp Diabetes Res* 2012 (2012) 824305.
- [35] W.A. Banks, A.J. Kastin, W. Huang, J.B. Jaspan, L.M. Maness, Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin, *Peptides* 17(2) (1996) 305-11.
- [36] M.M. Hagan, P.A. Rushing, L.M. Pritchard, M.W. Schwartz, A.M. Strack, L.H. Van Der Ploeg, S.C. Woods, R.J. Seeley, Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(1) (2000) R47-52.
- [37] S.M. Sternson, G.M. Shepherd, J.M. Friedman, Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting, *Nat Neurosci* 8(10) (2005) 1356-63.
- [38] B. Xu, E.H. Goulding, K. Zang, D. Cepoi, R.D. Cone, K.R. Jones, L.H. Tecott, L.F. Reichardt, Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor, *Nat Neurosci* 6(7) (2003) 736-42.
- [39] E.E. Noble, C.J. Billington, C.M. Kotz, C. Wang, Oxytocin in the ventromedial hypothalamic nucleus reduces feeding and acutely increases energy expenditure, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307(6) (2014) R737-45.
- [40] S.E. Mitchell, R. Nogueiras, K. Rance, D.V. Rayner, S. Wood, C. Dieguez, L.M. Williams, Circulating hormones and hypothalamic energy balance: regulatory gene expression in the Lou/C and Wistar rats, *J Endocrinol* 190(3) (2006) 571-9.
- [41] J.K. Elmquist, C. Bjørbaek, R.S. Ahima, J.S. Flier, C.B. Saper, Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain, *J Comp Neurol* 395(4) (1998) 535-47.

- [42] C.L. Faber, M.E. Matsen, K.R. Velasco, V. Damian, B.A. Phan, D. Adam, A. Therattil, M.W. Schwartz, G.J. Morton, Distinct Neuronal Projections From the Hypothalamic Ventromedial Nucleus Mediate Glycemic and Behavioral Effects, *Diabetes* 67(12) (2018) 2518-2529.
- [43] D. Beiroa, M. Imbernon, R. Gallego, A. Senra, D. Herranz, F. Villarroya, M. Serrano, J. Fernø, J. Salvador, J. Escalada, C. Dieguez, M. Lopez, G. Frühbeck, R. Nogueiras, GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK, *Diabetes* 63(10) (2014) 3346-58.
- [44] C. Qin, J. Li, K. Tang, The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases, *Endocrinology* 159(9) (2018) 3458-3472.
- [45] M.A. Cowley, N. Pronchuk, W. Fan, D.M. Dinulescu, W.F. Colmers, R.D. Cone, Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat, *Neuron* 24(1) (1999) 155-63.
- [46] L.L. Bellinger, L.L. Bernardis, The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies, *Physiol Behav* 76(3) (2002) 431-42.
- [47] S. Bi, Y.J. Kim, F. Zheng, Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control, *Neuropeptides* 46(6) (2012) 309-14.
- [48] P. Chen, S.M. Williams, K.L. Grove, M.S. Smith, Melanocortin 4 receptor-mediated hyperphagia and activation of neuropeptide Y expression in the dorsomedial hypothalamus during lactation, *J Neurosci* 24(22) (2004) 5091-100.
- [49] R. Pandit, S. Beerens, R.A.H. Adan, Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 312(6) (2017) R938-R947.
- [50] Z. Otgon-Uul, S. Suyama, H. Onodera, T. Yada, Optogenetic activation of leptin- and glucose-regulated GABAergic neurons in dorsomedial hypothalamus promotes food intake via inhibitory synaptic transmission to paraventricular nucleus of hypothalamus, *Mol Metab* 5(8) (2016) 709-715.
- [51] H.R. Berthoud, H. Münzberg, The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics, *Physiol Behav* 104(1) (2011) 29-39.
- [52] G.D. Stuber, R.A. Wise, Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward, *Nat Neurosci* 19(2) (2016) 198-205.
- [53] G.J. Schwartz, The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects, *Nutrition* 16(10) (2000) 866-73.
- [54] E. Roh, M.S. Kim, Brain Regulation of Energy Metabolism, *Endocrinol Metab (Seoul)* 31(4) (2016) 519-524.
- [55] M. Schneeberger, R. Gomis, M. Claret, Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance, *J Endocrinol* 220(2) (2014) T25-46.
- [56] J.N. Zhu, J.J. Wang, The cerebellum in feeding control: possible function and mechanism, *Cell Mol Neurobiol* 28(4) (2008) 469-78.
- [57] R. Lathe, Hormones and the hippocampus, *J Endocrinol* 169(2) (2001) 205-31.
- [58] E.A. Fox, M.S. Byerly, A mechanism underlying mature-onset obesity: evidence from the hyperphagic phenotype of brain-derived neurotrophic factor mutants, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(6) (2004) R994-1004.
- [59] A.M. Douglass, H. Kucukdereli, M. Ponsérre, M. Markovic, J. Gründemann, C. Strobel, P.L. Alcalá Morales, K.K. Conzelmann, A. Lüthi, R. Klein, Central amygdala circuits modulate food consumption through a positive-valence mechanism, *Nat Neurosci* 20(10) (2017) 1384-1394.
- [60] M. Soto, W. Cai, M. Konishi, C.R. Kahn, Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior, *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(13) (2019) 6379-6384.
- [61] A.M. INGALLS, M.M. DICKIE, G.D. SNELL, Obese, a new mutation in the house mouse, *J Hered* 41(12) (1950) 317-8.
- [62] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J.M. Friedman, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 372(6505) (1994) 425-32.

- [63] M.L. Reitman, S. Bi, B. Marcus-Samuels, O. Gavrilova, Leptin and its role in pregnancy and fetal development--an overview, *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2) (2001) 68-72.
- [64] E. Dos Santos, F. Duval, F. Vialard, M.N. Dieudonné, The roles of leptin and adiponectin at the fetal-maternal interface in humans, *Horm Mol Biol Clin Investig* 24(1) (2015) 47-63.
- [65] M. Schanton, J.L. Maymó, A. Pérez-Pérez, V. Sánchez-Margalet, C.L. Varone, Involvement of leptin in the molecular physiology of the placenta, *Reproduction* 155(1) (2018) R1-R12.
- [66] R.V. Considine, M.K. Sinha, M.L. Heiman, A. Kriauciunas, T.W. Stephens, M.R. Nyce, J.P. Ohannesian, C.C. Marco, L.J. McKee, T.L. Bauer, Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans, *N Engl J Med* 334(5) (1996) 292-5.
- [67] J.L. Halaas, K.S. Gajiwala, M. Maffei, S.L. Cohen, B.T. Chait, D. Rabinowitz, R.L. Lallone, S.K. Burley, J.M. Friedman, Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene, *Science* 269(5223) (1995) 543-6.
- [68] H. Chen, O. Charlat, L.A. Tartaglia, E.A. Woolf, X. Weng, S.J. Ellis, N.D. Lakey, J. Culpepper, K.J. Moore, R.E. Breitbart, G.M. Duyk, R.I. Tepper, J.P. Morgenstern, Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice, *Cell* 84(3) (1996) 491-5.
- [69] K. Clément, C. Vaisse, N. Lahlou, S. Cabrol, V. Pelloux, D. Cassuto, M. Gourmelen, C. Dina, J. Chambaz, J.M. Lacorte, A. Basdevant, P. Bougnères, Y. Lebouc, P. Froguel, B. Guy-Grand, A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction, *Nature* 392(6674) (1998) 398-401.
- [70] F. Peelman, L. Zabeau, K. Moharana, S.N. Savvides, J. Tavernier, 20 years of leptin: insights into signaling assemblies of the leptin receptor, *J Endocrinol* 223(1) (2014) T9-23.
- [71] C.C. Cheung, D.K. Clifton, R.A. Steiner, Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus, *Endocrinology* 138(10) (1997) 4489-92.
- [72] M.A. Cowley, J.L. Smart, M. Rubinstein, M.G. Cerdán, S. Diano, T.L. Horvath, R.D. Cone, M.J. Low, Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus, *Nature* 411(6836) (2001) 480-4.
- [73] H. Münzberg, C.D. Morrison, Structure, production and signaling of leptin, *Metabolism* 64(1) (2015) 13-23.
- [74] T. Kitamura, Y. Feng, Y.I. Kitamura, S.C. Chua, A.W. Xu, G.S. Barsh, L. Rossetti, D. Accili, Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake, *Nat Med* 12(5) (2006) 534-40.
- [75] S.A. Robertson, G.M. Leininger, M.G. Myers, Molecular and neural mediators of leptin action, *Physiol Behav* 94(5) (2008) 637-42.
- [76] J.C. Brüning, D. Gautam, D.J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P.C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Müller-Wieland, C.R. Kahn, Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction, *Science* 289(5487) (2000) 2122-5.
- [77] E.L. Air, S.C. Benoit, K.A. Blake Smith, D.J. Clegg, S.C. Woods, Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms, *Pharmacol Biochem Behav* 72(1-2) (2002) 423-9.
- [78] R.A. Haeusler, T.E. McGraw, D. Accili, Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(1) (2018) 31-44.
- [79] A.R. Saltiel, C.R. Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature* 414(6865) (2001) 799-806.
- [80] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, K. Kangawa, Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature* 402(6762) (1999) 656-60.
- [81] M. Tschöp, D.L. Smiley, M.L. Heiman, Ghrelin induces adiposity in rodents, *Nature* 407(6806) (2000) 908-13.
- [82] K. Howick, B.T. Griffin, J.F. Cryan, H. Schellekens, From Belly to Brain: Targeting the Ghrelin Receptor in Appetite and Food Intake Regulation, *Int J Mol Sci* 18(2) (2017).

- [83] S. Gnanapavan, B. Kola, S.A. Bustin, D.G. Morris, P. McGee, P. Fairclough, S. Bhattacharya, R. Carpenter, A.B. Grossman, M. Korbonits, The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans, *J Clin Endocrinol Metab* 87(6) (2002) 2988.
- [84] M. López, R. Lage, A.K. Saha, D. Pérez-Tilve, M.J. Vázquez, L. Varela, S. Sangiao-Alvarellos, S. Tovar, K. Raghay, S. Rodríguez-Cuenca, R.M. Deoliveira, T. Castañeda, R. Datta, J.Z. Dong, M. Culler, M.W. Sleeman, C.V. Alvarez, R. Gallego, C.J. Lelliott, D. Carling, M.H. Tschöp, C. Diéguez, A. Vidal-Puig, Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin, *Cell Metab* 7(5) (2008) 389-99.
- [85] Z.B. Andrews, Z.W. Liu, N. Wallingford, D.M. Erion, E. Borok, J.M. Friedman, M.H. Tschöp, M. Shanabrough, G. Cline, G.I. Shulman, A. Coppola, X.B. Gao, T.L. Horvath, S. Diano, UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals, *Nature* 454(7206) (2008) 846-51.
- [86] N. Martínez-Sánchez, P. Seoane-Collazo, C. Contreras, L. Varela, J. Villarroya, E. Rial-Pensado, X. Buqué, I. Aurrekoetxea, T.C. Delgado, R. Vázquez-Martínez, I. González-García, J. Roa, A.J. Whittle, B. Gomez-Santos, V. Velagapudi, Y.C.L. Tung, D.A. Morgan, P.J. Voshol, P.B. Martínez de Morentin, T. López-González, L. Liñares-Pose, F. Gonzalez, K. Chatterjee, T. Sobrino, G. Medina-Gómez, R.J. Davis, N. Casals, M. Orešič, A.P. Coll, A. Vidal-Puig, J. Mittag, M. Tena-Sempere, M.M. Malagón, C. Diéguez, M.L. Martínez-Chantar, P. Aspichueta, K. Rahmouni, R. Nogueiras, G. Sabio, F. Villarroya, M. López, Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance, *Cell Metab* 26(1) (2017) 212-229.e12.
- [87] M.G. Novelle, M.J. Vázquez, K.D. Martinello, M.A. Sanchez-Garrido, M. Tena-Sempere, C. Diéguez, Neonatal events, such as androgenization and postnatal overfeeding, modify the response to ghrelin, *Sci Rep* 4 (2014) 4855.
- [88] G. Collden, E. Balland, J. Parkash, E. Caron, F. Langlet, V. Prevot, S.G. Bouret, Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin, *Mol Metab* 4(1) (2015) 15-24.
- [89] J. Gibbs, G.P. Smith, Cholecystokinin and satiety in rats and rhesus monkeys, *Am J Clin Nutr* 30(5) (1977) 758-61.
- [90] H.R. Kissileff, F.X. Pi-Sunyer, J. Thornton, G.P. Smith, C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man, *Am J Clin Nutr* 34(2) (1981) 154-60.
- [91] W. Fan, K.L. Ellacott, I.G. Halatchev, K. Takahashi, P. Yu, R.D. Cone, Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system, *Nat Neurosci* 7(4) (2004) 335-6.
- [92] J. Lee, E. Martin, G. Paulino, G. de Lartigue, H.E. Raybould, Effect of ghrelin receptor antagonist on meal patterns in cholecystokinin type 1 receptor null mice, *Physiol Behav* 103(2) (2011) 181-7.
- [93] R.E. Steinert, C. Feinle-Bisset, L. Asarian, M. Horowitz, C. Beglinger, N. Geary, Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): Secretory Controls and Physiological Roles in Eating and Glycemia in Health, Obesity, and After RYGB, *Physiol Rev* 97(1) (2017) 411-463.
- [94] T.E. Adrian, G.L. Ferri, A.J. Bacarese-Hamilton, H.S. Fuessl, J.M. Polak, S.R. Bloom, Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY, *Gastroenterology* 89(5) (1985) 1070-7.
- [95] R.L. Batterham, M.A. Cowley, C.J. Small, H. Herzog, M.A. Cohen, C.L. Dakin, A.M. Wren, A.E. Brynes, M.J. Low, M.A. Ghatei, R.D. Cone, S.R. Bloom, Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake, *Nature* 418(6898) (2002) 650-4.
- [96] M.A. Sánchez-Garrido, S.J. Brandt, C. Clemmensen, T.D. Müller, R.D. DiMarchi, M.H. Tschöp, GLP-1/glucagon receptor co-agonism for treatment of obesity, *Diabetologia* 60(10) (2017) 1851-1861.
- [97] M. Tang-Christensen, P.J. Larsen, R. Göke, A. Fink-Jensen, D.S. Jessop, M. Møller, S.P. Sheikh, Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats, *Am J Physiol* 271(4 Pt 2) (1996) R848-56.

- [98] M.R. Hayes, K.P. Skibicka, H.J. Grill, Caudal brainstem processing is sufficient for behavioral, sympathetic, and parasympathetic responses driven by peripheral and hindbrain glucagon-like-peptide-1 receptor stimulation, *Endocrinology* 149(8) (2008) 4059-68.
- [99] E.W.L. Sun, A.M. Martin, R.L. Young, D.J. Keating, The Regulation of Peripheral Metabolism by Gut-Derived Hormones, *Front Endocrinol (Lausanne)* 9 (2018) 754.
- [100] K.P. Skibicka, The central GLP-1: implications for food and drug reward, *Front Neurosci* 7 (2013) 181.
- [101] A.L. Alhadeff, L.E. Rupprecht, M.R. Hayes, GLP-1 neurons in the nucleus of the solitary tract project directly to the ventral tegmental area and nucleus accumbens to control for food intake, *Endocrinology* 153(2) (2012) 647-58.
- [102] L. López-Ferreras, J.E. Richard, E.E. Noble, K. Eerola, R.H. Anderberg, K. Olandersson, L. Taing, S.E. Kanoski, M.R. Hayes, K.P. Skibicka, Lateral hypothalamic GLP-1 receptors are critical for the control of food reinforcement, ingestive behavior and body weight, *Mol Psychiatry* 23(5) (2018) 1157-1168.
- [103] K. Timper, J.C. Brüning, Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity, *Dis Model Mech* 10(6) (2017) 679-689.
- [104] G.N. Wade, J.M. Gray, Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis, *Physiol Behav* 22(3) (1979) 583-93.
- [105] L. Asarian, N. Geary, Modulation of appetite by gonadal steroid hormones, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1471) (2006) 1251-63.
- [106] L.M. Brown, D.J. Clegg, Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity, *J Steroid Biochem Mol Biol* 122(1-3) (2010) 65-73.
- [107] F. Mauvais-Jarvis, D.J. Clegg, A.L. Hevener, The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis, *Endocr Rev* 34(3) (2013) 309-38.
- [108] M. Guillaume, A. Montagner, C. Fontaine, F. Lenfant, J.F. Arnal, P. Gourdy, Nuclear and Membrane Actions of Estrogen Receptor Alpha: Contribution to the Regulation of Energy and Glucose Homeostasis, *Adv Exp Med Biol* 1043 (2017) 401-426.
- [109] P.B. Martínez de Morentin, I. González-García, L. Martins, R. Lage, D. Fernández-Mallo, N. Martínez-Sánchez, F. Ruíz-Pino, J. Liu, D.A. Morgan, L. Pinilla, R. Gallego, A.K. Saha, A. Kalsbeek, E. Fliers, P.H. Bisschop, C. Diéguez, R. Nogueiras, K. Rahmouni, M. Tena-Sempere, M. López, Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK, *Cell Metab* 20(1) (2014) 41-53.
- [110] D.M. Kelly, T.H. Jones, Testosterone: a metabolic hormone in health and disease, *J Endocrinol* 217(3) (2013) R25-45.
- [111] F. Saad, Testosterone Therapy and Glucose Homeostasis in Men with Testosterone Deficiency (Hypogonadism), *Adv Exp Med Biol* 1043 (2017) 527-558.
- [112] K.N. Qin, R.L. Rosenfield, Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome, *Mol Cell Endocrinol* 145(1-2) (1998) 111-21.
- [113] C.G. Baptiste, M.C. Battista, A. Trottier, J.P. Baillargeon, Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome, *J Steroid Biochem Mol Biol* 122(1-3) (2010) 42-52.
- [114] A. Nehir Aytan, E. Bastu, I. Demiral, H. Bulut, M. Dogan, F. Buyru, Relationship between hyperandrogenism, obesity, inflammation and polycystic ovary syndrome, *Gynecol Endocrinol* 32(9) (2016) 709-713.
- [115] 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(1) (2015) 79-91.
- [116] R.A. Augustine, P.J. Knowles, Z. Khant Aung, D.R. Grattan, S.R. Ladyman, Impaired hypothalamic leptin sensitivity in pseudopregnant rats treated with chronic prolactin to mimic pregnancy, *J Neuroendocrinol* (2019) e12702.
- [117] S.L. Grimm, S.M. Hartig, D.P. Edwards, Progesterone Receptor Signaling Mechanisms, *J Mol Biol* 428(19) (2016) 3831-49.



- [118] J.M. Gray, G.N. Wade, Food intake, body weight, and adiposity in female rats: actions and interactions of progestins and antiestrogens, *Am J Physiol* 240(5) (1981) E474-81.
- [119] L. Pinilla, E. Aguilar, C. Dieguez, R.P. Millar, M. Tena-Sempere, Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms, *Physiol Rev* 92(3) (2012) 1235-316.
- [120] M. Tena-Sempere, I. Huhtaniemi, *Gonadotropins and gonadotropin receptors*, Reproductive Medicine – Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals Pathenon Publishing, 2003, pp. 225-244.
- [121] J. Roa, M. Tena-Sempere, Connecting metabolism and reproduction: roles of central energy sensors and key molecular mediators, *Mol Cell Endocrinol* 397(1-2) (2014) 4-14.
- [122] Y. Baba, H. Matsuo, A.V. Schally, Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses, *Biochem Biophys Res Commun* 44(2) (1971) 459-63.
- [123] A.V. Schally, A. Arimura, A.J. Kastin, H. Matsuo, Y. Baba, T.W. Redding, R.M. Nair, L. Debeljuk, W.F. White, Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones, *Science* 173(4001) (1971) 1036-8.
- [124] S. Melmed, K. Polonsky, P.R. Larsen, H. Kronenberg, *Williams Textbook of Endocrinology*. Chapter 7: Neuroendocrinology, Elsevier, 2016.
- [125] A.E. Herbison, Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons, *Nat Rev Endocrinol* 12(8) (2016) 452-66.
- [126] A. Lomniczi, S.R. Ojeda, The Emerging Role of Epigenetics in the Regulation of Female Puberty, *Endocr Dev* 29 (2016) 1-16.
- [127] A. Kaprara, I.T. Huhtaniemi, The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men, *Metabolism* 86 (2018) 3-17.
- [128] V. Prevot, Puberty in Mice and Rats. In: Plant TM, Zeleznik AJ (eds). *Physiology of Reproduction.*, San Diego: Academic Press, 2015, pp. 1395-1439.
- [129] 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(6) (2017) 737-763.
- [130] G.A. Stamatiades, U.B. Kaiser, Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression, *Mol Cell Endocrinol* 463 (2018) 131-141.
- [131] R. Maggi, A.M. Cariboni, M.M. Marelli, R.M. Moretti, V. Andrè, M. Marzagalli, P. Limonta, GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system, *Hum Reprod Update* 22(3) (2016) 358-81.
- [132] J. Roa, Role of GnRH Neurons and Their Neuronal Afferents as Key Integrators between Food Intake Regulatory Signals and the Control of Reproduction, *Int J Endocrinol* 2013 (2013) 518046.
- [133] J.H. Quennell, A.C. Mulligan, A. Tups, X. Liu, S.J. Phipps, C.J. Kemp, A.E. Herbison, D.R. Grattan, G.M. Anderson, Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function, *Endocrinology* 150(6) (2009) 2805-12.
- [134] W.A. Zuure, A.L. Roberts, J.H. Quennell, G.M. Anderson, Leptin signaling in GABA neurons, but not glutamate neurons, is required for reproductive function, *J Neurosci* 33(45) (2013) 17874-83.
- [135] M. Manfredi-Lozano, J. Roa, F. Ruiz-Pino, R. Piet, D. Garcia-Galiano, R. Pineda, A. Zamora, S. Leon, M.A. Sanchez-Garrido, A. Romero-Ruiz, C. Dieguez, M.J. Vazquez, A.E. Herbison, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, Defining a novel leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty, *Mol Metab* 5(10) (2016) 844-857.
- [136] J. Donato, R.J. Silva, L.V. Sita, S. Lee, C. Lee, S. Lacchini, J.C. Bittencourt, C.R. Franci, N.S. Canteras, C.F. Elias, The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion, *J Neurosci* 29(16) (2009) 5240-50.

- [137] C. Martin, V.M. Navarro, S. Simavli, L. Vong, R.S. Carroll, B.B. Lowell, U.B. Kaiser, Leptin-responsive GABAergic neurons regulate fertility through pathways that result in reduced kisspeptinergic tone, *J Neurosci* 34(17) (2014) 6047-56.
- [138] R. Fernández-Fernández, M. Tena-Sempere, V.M. Navarro, M.L. Barreiro, J.M. Castellano, E. Aguilar, L. Pinilla, Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies, *Neuroendocrinology* 82(5-6) (2005) 245-55.
- [139] M.C. Lebrethon, A. Aganina, M. Fournier, A. Gérard, A.S. Parent, J.P. Bourguignon, Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty, *J Neuroendocrinol* 19(3) (2007) 181-8.
- [140] Themmen APN, I.T. Huhtaniemi, Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function, *Endocr Rev* 21(5) (2000) 551-83.
- [141] M.V. Hai, N. De Roux, N. Ghinea, I. Beau, H. Loosfelt, B. Vannier, G. Méduri, M. Misrahi, E. Milgrom, Gonadotropin receptors, *Ann Endocrinol (Paris)* 60(2) (1999) 89-92.
- [142] A. Ulloa-Aguirre, T. Zariñán, R. Gutiérrez-Sagal, J.A. Dias, Intracellular Trafficking of Gonadotropin Receptors in Health and Disease, *Handb Exp Pharmacol* 245 (2018) 1-39.
- [143] I. Huhtaniemi, A short evolutionary history of FSH-stimulated spermatogenesis, *Hormones (Athens)* 14(4) (2015) 468-78.
- [144] I. Huhtaniemi, Mutations affecting gonadotropin secretion and action, *Horm Res* 60 Suppl 3 (2003) 21-30.
- [145] L. Schiffer, W. Arlt, K.H. Storbeck, Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited, *Mol Cell Endocrinol* 465 (2018) 4-26.
- [146] W.J. Shen, S.K. Zaidi, S. Patel, Y. Cortez, M. Ueno, R. Azhar, S. Azhar, F.B. Kraemer, Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis, *Endocrinology* 153(7) (2012) 3249-57.
- [147] C. Stocco, C. Telleria, G. Gibori, The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression, *Endocr Rev* 28(1) (2007) 117-49.
- [148] H. Nakata, T. Sonomura, S. Iseki, Three-dimensional analysis of seminiferous tubules and spermatogenic waves in mice, *Reproduction* 154(5) (2017) 569-579.
- [149] S.G. Haider, Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria, *Endocrinology* 148(6) (2007) 2581-2.
- [150] F. Gaytan, C. Morales, S. Leon, D. Garcia-Galiano, J. Roa, M. Tena-Sempere, Crowding and Follicular Fate: Spatial Determinants of Follicular Reserve and Activation of Follicular Growth in the Mammalian Ovary, *PLoS One* 10(12) (2015) e0144099.
- [151] C.S. Caligioni, Assessing reproductive status/stages in mice, *Curr Protoc Neurosci Appendix* 4 (2009) Appendix 4I.
- [152] 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 (2018) 37-49.
- [153] J. Roa, A.E. Herbison, Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice, *Endocrinology* 153(11) (2012) 5587-99.
- [154] H. Watanobe, Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats, *J Physiol* 545(1) (2002) 255-68.
- [155] J.W. Hill, J.E. Levine, Abnormal response of the neuropeptide Y-deficient mouse reproductive axis to food deprivation but not lactation, *Endocrinology* 144(5) (2003) 1780-6.
- [156] S.P. Kalra, W.R. Crowley, Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone, *Front Neuroendocrinol* 13(1) (1992) 1-46.
- [157] J.M. Castellano, J. Roa, R.M. Luque, C. Dieguez, E. Aguilar, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications, *Peptides* 30(1) (2009) 139-45.

- [158] F. Wahab, M. Shahab, R. Behr, The involvement of gonadotropin inhibitory hormone and kisspeptin in the metabolic regulation of reproduction, *J Endocrinol* 225(2) (2015) R49-66.
- [159] J. Donato, R.M. Cravo, R. Frazão, L. Gautron, M.M. Scott, J. Lachey, I.A. Castro, L.O. Margatho, S. Lee, C. Lee, J.A. Richardson, J. Friedman, S. Chua, R. Coppari, J.M. Zigman, J.K. Elmquist, C.F. Elias, 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(1) (2011) 355-68.
- [160] N. Bellefontaine, K. Chachlaki, J. Parkash, C. Vanacker, W. Colledge, X. d'Anglemont de Tassigny, J. Garthwaite, S.G. Bouret, V. Prevot, Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction, *J Clin Invest* 124(6) (2014) 2550-9.
- [161] J.M. Castellano, M. Tena-Sempere, Metabolic control of female puberty: potential therapeutic targets, *Expert Opin Ther Targets* 20(10) (2016) 1181-93.
- [162] M. López, R. Nogueiras, M. Tena-Sempere, C. Diéguez, Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance, *Nat Rev Endocrinol* 12(7) (2016) 421-32.
- [163] A.V. Roland, S.M. Moenter, Glucosensing by GnRH neurons: inhibition by androgens and involvement of AMP-activated protein kinase, *Mol Endocrinol* 25(5) (2011) 847-58.
- [164] S. Coyral-Castel, L. Tosca, G. Ferreira, E. Jeanpierre, C. Rame, D. Lomet, A. Caraty, P. Monget, C. Chabrolle, J. Dupont, 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(3) (2008) 335-46.
- [165] J. Roa, A. Barroso, F. Ruiz-Pino, M.J. Vázquez, P. Seoane-Collazo, N. Martínez-Sánchez, D. García-Galiano, T. Ilhan, R. Pineda, S. León, M. Manfredi-Lozano, V. Heras, M. Poutanen, J.M. Castellano, F. Gaytan, C. Diéguez, L. Pinilla, M. López, M. Tena-Sempere, Metabolic regulation of female puberty via hypothalamic AMPK-kisspeptin signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(45) (2018) E10758-E10767.
- [166] R. Nogueiras, K.M. Habegger, N. Chaudhary, B. Finan, A.S. Banks, M.O. Dietrich, T.L. Horvath, D.A. Sinclair, P.T. Pfluger, M.H. Tschöp, Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism, *Physiol Rev* 92(3) (2012) 1479-514.
- [167] M.J. Vazquez, C.A. Toro, J.M. Castellano, F. Ruiz-Pino, J. Roa, D. Beiroa, V. Heras, I. Velasco, C. Dieguez, L. Pinilla, F. Gaytan, R. Nogueiras, M.A. Bosch, O.K. Rønnekleiv, A. Lomniczi, S.R. Ojeda, M. Tena-Sempere, SIRT1 mediates obesity- and nutrient-dependent perturbation of pubertal timing by epigenetically controlling Kiss1 expression, *Nat Commun* 9(1) (2018) 4194.
- [168] J. Roa, D. Garcia-Galiano, L. Varela, M.A. Sánchez-Garrido, R. Pineda, J.M. Castellano, F. Ruiz-Pino, M. Romero, E. Aguilar, M. López, F. Gaytan, C. Diéguez, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system, *Endocrinology* 150(11) (2009) 5016-26.
- [169] H. Mathew, V.D. Castracane, C. Mantzoros, Adipose tissue and reproductive health, *Metabolism* 86 (2018) 18-32.
- [170] K. Ogura, M. Irahara, M. Kiyokawa, M. Tezuka, T. Matsuzaki, T. Yasui, M. Kamada, T. Aono, Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells, *Eur J Endocrinol* 144(6) (2001) 653-8.
- [171] F.P. Pralong, Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset, *Mol Cell Endocrinol* 324(1-2) (2010) 82-6.
- [172] M. Gamba, F.P. Pralong, Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin, *Mol Cell Endocrinol* 254-255 (2006) 133-9.
- [173] S.A. Divall, T.R. Williams, S.E. Carver, L. Koch, J.C. Brüning, C.R. Kahn, F. Wondisford, S. Radovick, A. Wolfe, Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice, *J Clin Invest* 120(8) (2010) 2900-9.
- [174] X. Qiu, A.R. Dowling, J.S. Marino, L.D. Faulkner, B. Bryant, J.C. Brüning, C.F. Elias, J.W. Hill, Delayed puberty but normal fertility in mice with selective deletion of insulin receptors from Kiss1 cells, *Endocrinology* 154(3) (2013) 1337-48.
- [175] M. Tena-Sempere, M.L. Barreiro, Leptin in male reproduction: the testis paradigm, *Mol Cell Endocrinol* 188(1-2) (2002) 9-13.

- [176] R. Fernández-Fernández, V.M. Navarro, M.L. Barreiro, E.M. Vigo, S. Tovar, A.V. Sirotkin, F.F. Casanueva, E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat, *Endocrinology* 146(7) (2005) 3018-25.
- [177] M.L. Barreiro, M. Tena-Sempere, Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility?, *Mol Cell Endocrinol* 226(1-2) (2004) 1-9.
- [178] M. Kotani, M. Detheux, A. Vandenberghe, D. Communi, J.M. Vanderwinden, E. Le Poul, S. Brézillon, R. Tyldesley, N. Suarez-Huerta, F. Vandeput, C. Blanpain, S.N. Schiffmann, G. Vassart, M. Parmentier, The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54, *J Biol Chem* 276(37) (2001) 34631-6.
- [179] T. Ohtaki, Y. Shintani, S. Honda, H. Matsumoto, A. Hori, K. Kanehashi, Y. Terao, S. Kumano, Y. Takatsu, Y. Masuda, Y. Ishibashi, T. Watanabe, M. Asada, T. Yamada, M. Suenaga, C. Kitada, S. Usuki, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura, M. Fujino, Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor, *Nature* 411(6837) (2001) 613-7.
- [180] N. de Roux, E. Genin, J.C. Carel, F. Matsuda, J.L. Chaussain, E. Milgrom, Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19) (2003) 10972-6.
- [181] S.B. Seminara, S. Messager, E.E. Chatzidaki, R.R. Thresher, J.S. Acierno, J.K. Shagoury, Y. Bo-Abbas, W. Kuohung, K.M. Schwinof, A.G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, U.B. Kaiser, S.A. Slaugenhaupt, J.F. Gusella, S. O'Rahilly, M.B. Carlton, W.F. Crowley, S.A. Aparicio, W.H. Colledge, The GPR54 gene as a regulator of puberty, *N Engl J Med* 349(17) (2003) 1614-27.
- [182] R.A. Steiner, Kisspeptin: past, present, and prologue, *Adv Exp Med Biol* 784 (2013) 3-7.
- [183] R. Pineda, F. Plaisier, R.P. Millar, M. Ludwig, Amygdala Kisspeptin Neurons: Putative Mediators of Olfactory Control of the Gonadotropic Axis, *Neuroendocrinology* 104(3) (2017) 223-238.
- [184] J.P. Castaño, A.J. Martínez-Fuentes, E. Gutiérrez-Pascual, H. Vaudry, M. Tena-Sempere, M.M. Malagón, Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity?, *Peptides* 30(1) (2009) 10-5.
- [185] 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(2) (2018) 107-123.
- [186] M.A. Hussain, W.J. Song, A. Wolfe, There is Kisspeptin - And Then There is Kisspeptin, *Trends Endocrinol Metab* 26(10) (2015) 564-572.
- [187] M. Bhattacharya, A.V. Babwah, Kisspeptin: beyond the brain, *Endocrinology* 156(4) (2015) 1218-27.
- [188] A. Wolfe, M.A. Hussain, The Emerging Role(s) for Kisspeptin in Metabolism in Mammals, *Front Endocrinol (Lausanne)* 9 (2018) 184.
- [189] M. Dudek, K. Ziarniak, J.H. Sliwowska, Kisspeptin and Metabolism: The Brain and Beyond, *Front Endocrinol (Lausanne)* 9 (2018) 145.
- [190] C. Fergani, V.M. Navarro, Expanding the Role of Tachykinins in the Neuroendocrine Control of Reproduction, *Reproduction* 153(1) (2016) R1-R14.
- [191] F. Ruiz-Pino, D. Garcia-Galiano, M. Manfredi-Lozano, S. Leon, M.A. Sánchez-Garrido, J. Roa, L. Pinilla, V.M. Navarro, M. Tena-Sempere, Effects and interactions of tachykinins and dynorphin on FSH and LH secretion in developing and adult rats, *Endocrinology* 156(2) (2015) 576-88.
- [192] M.A. Mittelman-Smith, H. Williams, S.J. Krajewski-Hall, J. Lai, P. Ciofi, N.T. McMullen, N.E. Rance, Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight, *Endocrinology* 153(6) (2012) 2800-12.
- [193] 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(5) (2016) 2015-27.

- [194] X.F. Li, Y.S. Lin, J.S. Kinsey-Jones, K.T. O'Byrne, High-fat diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin B expression in puberty-advanced female rats, *Endocrinology* 153(9) (2012) 4422-31.
- [195] V.M. Navarro, F. Ruiz-Pino, M.A. Sánchez-Garrido, D. García-Galiano, S.J. Hobbs, M. Manfredi-Lozano, S. León, S. Sangiao-Alvarellos, J.M. Castellano, D.K. Clifton, L. Pinilla, R.A. Steiner, M. Tena-Sempere, Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status, *J Neurosci* 32(7) (2012) 2388-97.
- [196] J.M. Castellano, V.M. Navarro, R. Fernández-Fernández, J. Roa, E. Vigo, R. Pineda, C. Dieguez, E. Aguilar, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats, *Diabetes* 55(9) (2006) 2602-10.
- [197] S. León, A. Barroso, M.J. Vázquez, D. García-Galiano, M. Manfredi-Lozano, F. Ruiz-Pino, V. Heras, A. Romero-Ruiz, J. Roa, G. Schutz, M. Kirilov, F. Gaytan, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, Direct Actions of Kisspeptins on GnRH Neurons Permit Attainment of Fertility but are Insufficient to Fully Preserve Gonadotropic Axis Activity, *Sci Rep* 6 (2016) 19206.
- [198] X. d'Anglemont de Tassigny, L.A. Fagg, J.P. Dixon, K. Day, H.G. Leitch, A.G. Hendrick, D. Zahn, I. Franceschini, A. Caraty, M.B. Carlton, S.A. Aparicio, W.H. Colledge, Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25) (2007) 10714-9.
- [199] A.E. Oakley, D.K. Clifton, R.A. Steiner, Kisspeptin signaling in the brain, *Endocr Rev* 30(6) (2009) 713-43.
- [200] K. Skorupskaite, J.T. George, R.A. Anderson, The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease, *Hum Reprod Update* 20(4) (2014) 485-500.
- [201] V.M. Navarro, J.M. Castellano, R. Fernández-Fernández, S. Tovar, J. Roa, A. Mayen, R. Nogueiras, M.J. Vazquez, M.L. Barreiro, P. Magni, E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, *Endocrinology* 146(1) (2005) 156-63.
- [202] E. Gutiérrez-Pascual, A.J. Martínez-Fuentes, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, M.M. Malagón, J.P. Castaño, Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion, *J Neuroendocrinol* 19(7) (2007) 521-30.
- [203] C.J.L. Harter, G.S. Kavanagh, J.T. Smith, The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism, *J Endocrinol* 238(3) (2018) R173-R183.
- [204] D.A. Adekunbi, X.F. Li, G. Lass, K. Shetty, O.A. Adegoke, S.H. Yeo, W.H. Colledge, S.L. Lightman, K.T. O'Byrne, Kisspeptin neurones in the posterodorsal medial amygdala modulate sexual partner preference and anxiety in male mice, *J Neuroendocrinol* 30(3) (2018) e12572.
- [205] A.N. Comninos, W.S. Dhillo, Emerging Roles of Kisspeptin in Sexual and Emotional Brain Processing, *Neuroendocrinology* 106(2) (2018) 195-202.
- [206] F. Wahab, B. Atika, F. Ullah, M. Shahab, R. Behr, Metabolic Impact on the Hypothalamic Kisspeptin-Kiss1r Signaling Pathway, *Front Endocrinol (Lausanne)* 9 (2018) 123.
- [207] R.M. Luque, R.D. Kineman, M. Tena-Sempere, Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line, *Endocrinology* 148(10) (2007) 4601-11.
- [208] M.A. Sánchez-Garrido, F. Ruiz-Pino, M. Manfredi-Lozano, S. León, V. Heras, J.M. Castellano, J.P. Castaño, R.M. Luque, M.J. Vázquez, J. Roa, A. Romero-Ruiz, C. Diéguez, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, Metabolic and Gonadotropic Impact of Sequential Obesogenic Insults in the Female: Influence of the Loss of Ovarian Secretion, *Endocrinology* 156(8) (2015) 2984-98.
- [209] M.A. Sanchez-Garrido, F. Ruiz-Pino, I. Velasco, A. Barroso, D. Fernandois, V. Heras, M. Manfredi-Lozano, M.J. Vazquez, J.M. Castellano, J. Roa, L. Pinilla, M. Tena-Sempere, 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(2) (2018) 1005-1018.

- [210] J.A. De Bond, J.T. Smith, Kisspeptin and energy balance in reproduction, *Reproduction* 147(3) (2014) R53-63.
- [211] M. Dudek, P.A. Kołodziejcki, E. Pruszyńska-Oszmałek, M. Sassek, K. Ziarniak, K.W. Nowak, J.H. Sliwowska, Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats, *Neuropeptides* 56 (2016) 41-9.
- [212] E. Pruszyńska-Oszmałek, P.A. Kołodziejcki, M. Sassek, J.H. Sliwowska, Kisspeptin-10 inhibits proliferation and regulates lipolysis and lipogenesis processes in 3T3-L1 cells and isolated rat adipocytes, *Endocrine* 56(1) (2017) 54-64.
- [213] G. Orlando, S. Leone, C. Ferrante, A. Chiavaroli, A. Mollica, A. Stefanucci, G. Macedonio, M.P. Dimmito, L. Leporini, L. Menghini, L. Brunetti, L. Recinella, Effects of Kisspeptin-10 on Hypothalamic Neuropeptides and Neurotransmitters Involved in Appetite Control, *Molecules* 23(12) (2018).
- [214] K.P. Tolson, C. Garcia, S. Yen, S. Simonds, A. Stefanidis, A. Lawrence, J.T. Smith, A.S. Kauffman, Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity, *J Clin Invest* 124(7) (2014) 3075-9.
- [215] K.P. Tolson, C. Garcia, I. Delgado, N. Marooki, A.S. Kauffman, Metabolism and Energy Expenditure, But Not Feeding or Glucose Tolerance, Are Impaired in Young Kiss1r KO Female Mice, *Endocrinology* 157(11) (2016) 4192-4199.
- [216] J.P. De Bond, K.P. Tolson, C. Nasamran, A.S. Kauffman, J.T. Smith, Unaltered Hypothalamic Metabolic Gene Expression in Kiss1r Knockout Mice Despite Obesity and Reduced Energy Expenditure, *J Neuroendocrinol* 28(10) (2016).
- [217] C.C. Nestor, J. Qiu, S.L. Padilla, C. Zhang, M.A. Bosch, W. Fan, S.A. Aicher, R.D. Palmiter, O.K. Rønnekleiv, M.J. Kelly, Optogenetic Stimulation of Arcuate Nucleus Kiss1 Neurons Reveals a Steroid-Dependent Glutamatergic Input to POMC and AgRP Neurons in Male Mice, *Mol Endocrinol* 30(6) (2016) 630-44.
- [218] J. Qiu, H.M. Rivera, M.A. Bosch, S.L. Padilla, T.L. Stincic, R.D. Palmiter, M.J. Kelly, O.K. Rønnekleiv, Estrogenic-dependent glutamatergic neurotransmission from kisspeptin neurons governs feeding circuits in females, *Elife* 7 (2018).
- [219] A. Stengel, L. Wang, M. Goebel-Stengel, Y. Taché, Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice, *Neuroreport* 22(5) (2011) 253-7.
- [220] R. Saito, K. Tanaka, H. Nishimura, K. Nishimura, S. Sonoda, H. Ueno, Y. Motojima, M. Yoshimura, T. Maruyama, Y. Yamamoto, K. Kushihara, Y. Ueta, Centrally administered kisspeptin suppresses feeding via nesfatin-1 and oxytocin in male rats, *Peptides* 112 (2019) 114-124.
- [221] S.L. Padilla, J.G. Perez, M. Ben-Hamo, C.W. Johnson, R.E.A. Sanchez, I.L. Bussi, R.D. Palmiter, H.O. de la Iglesia, Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus Orchestrate Circadian Rhythms and Metabolism, *Curr Biol* 29(4) (2019) 592-604.e4.
- [222] R.E. Brown, S.A. Imran, E. Ur, M. Wilkinson, Kiss-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake, *Mol Cell Endocrinol* 281(1-2) (2008) 64-72.
- [223] H. Cockwell, D.A. Wilkinson, R. Bouzayen, S.A. Imran, R. Brown, M. Wilkinson, KISS1 expression in human female adipose tissue, *Arch Gynecol Obstet* 287(1) (2013) 143-7.
- [224] A.C. Hauge-Evans, C.C. Richardson, H.M. Milne, M.R. Christie, S.J. Persaud, P.M. Jones, A role for kisspeptin in islet function, *Diabetologia* 49(9) (2006) 2131-5.
- [225] R.A. Silvestre, E.M. Egido, R. Hernández, J. Marco, Kisspeptin-13 inhibits insulin secretion without affecting glucagon or somatostatin release: study in the perfused rat pancreas, *J Endocrinol* 196(2) (2008) 283-90.
- [226] W.J. Song, P. Mondal, A. Wolfe, L.C. Alonso, R. Stamateris, B.W. Ong, O.C. Lim, K.S. Yang, S. Radovick, H.J. Novaira, E.A. Farber, C.R. Farber, S.D. Turner, M.A. Hussain, Glucagon regulates hepatic kisspeptin to impair insulin secretion, *Cell Metab* 19(4) (2014) 667-81.
- [227] C. Izzi-Engbeaya, A.N. Comninos, S.A. Clarke, A. Jomard, L. Yang, S. Jones, A. Abbara, S. Narayanaswamy, P.C. Eng, D. Papadopoulou, J.K. Prague, P. Bech, I.F. Godsland, P. Bassett, C. Sands, S. Camuzeaux, M. Gomez-Romero, J.T.M. Pearce, M.R. Lewis, E. Holmes, J.K. Nicholson,

- T. Tan, R. Ratnasabapathy, M. Hu, G. Carrat, L. Piemonti, M. Bugliani, P. Marchetti, P.R. Johnson, S.J. Hughes, A.M. James Shapiro, G.A. Rutter, W.S. Dhillon, The effects of kisspeptin on  $\beta$ -cell function, serum metabolites and appetite in humans, *Diabetes Obes Metab* 20(12) (2018) 2800-2810.
- [228] M. Kirilov, J. Clarkson, X. Liu, J. Roa, P. Campos, R. Porteous, G. Schütz, A.E. Herbison, Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron, *Nat Commun* 4 (2013) 2492.
- [229] G. Paxinos, K. Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Volume 2)*, Academic Press, San Diego, 2001.
- [230] M.E. Nilsson, L. Vandenput, Å. Tivesten, A.K. Norlén, M.K. Lagerquist, S.H. Windahl, A.E. Börjesson, H.H. Farman, M. Poutanen, A. Benrick, M. Maliqueo, E. Stener-Victorin, H. Ryberg, C. Ohlsson, Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Endocrinology* 156(7) (2015) 2492-502.
- [231] S. Leon, I. Velasco, M.J. Vázquez, A. Barroso, D. Beiroa, V. Heras, F. Ruiz-Pino, M. Manfredi-Lozano, A. Romero-Ruiz, M.A. Sanchez-Garrido, C. Dieguez, L. Pinilla, J. Roa, R. Nogueiras, M. Tena-Sempere, Sex-Biased Physiological Roles of NPFF1R, the Canonical Receptor of RFRP-3, in Food Intake and Metabolic Homeostasis Revealed by its Congenital Ablation in mice, *Metabolism* 87 (2018) 87-97.
- [232] L.Y. Fu, A.N. van den Pol, Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism, *J Neurosci* 30(30) (2010) 10205-19.
- [233] R. Talbi, M.P. Laran-Chich, R. Magoul, S. El Ouezzani, V. Simonneaux, Kisspeptin and RFRP-3 differentially regulate food intake and metabolic neuropeptides in the female desert jerboa, *Sci Rep* 6 (2016) 36057.
- [234] R. Lapatto, J.C. Pallais, D. Zhang, Y.M. Chan, A. Mahan, F. Cerrato, W.W. Le, G.E. Hoffman, S.B. Seminara, Kiss1<sup>-/-</sup> mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54<sup>-/-</sup> mice, *Endocrinology* 148(10) (2007) 4927-36.
- [235] W.H. Colledge, Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology, *Peptides* 30(1) (2009) 34-41.
- [236] R.M. Luque, J. Córdoba-Chacón, M.D. Gahete, V.M. Navarro, M. Tena-Sempere, R.D. Kineman, J.P. Castaño, Kisspeptin regulates gonadotroph and somatotroph function in nonhuman primate pituitary via common and distinct signaling mechanisms, *Endocrinology* 152(3) (2011) 957-66.
- [237] J.P. Chang, A. Mar, M. Wlasichuk, A.O. Wong, Kisspeptin-1 directly stimulates LH and GH secretion from goldfish pituitary cells in a Ca(2+)-dependent manner, *Gen Comp Endocrinol* 179(1) (2012) 38-46.
- [238] N.N. Kim, Y.U. Choi, H.S. Park, C.Y. Choi, Kisspeptin regulates the somatic growth-related factors of the cinnamon clownfish *Amphiprion melanopus*, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 179 (2015) 17-24.
- [239] J.T. Smith, A. Roseweir, M. Millar, I.J. Clarke, R.P. Millar, Stimulation of growth hormone by kisspeptin antagonists in ewes, *J Endocrinol* 237(2) (2018) 165-173.
- [240] C.N. Jayasena, A.N. Comninos, S. Narayanaswamy, S. Bhalla, A. Abbara, Z. Ganiyu-Dada, M. Busbridge, M.A. Ghatei, S.R. Bloom, W.S. Dhillon, Acute and chronic effects of kisspeptin-54 administration on GH, prolactin and TSH secretion in healthy women, *Clin Endocrinol (Oxf)* 81(6) (2014) 891-8.
- [241] S. Ramaswamy, R.B. Gibbs, T.M. Plant, Studies of the localisation of kisspeptin within the pituitary of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and the effect of kisspeptin on the release of non-gonadotrophic pituitary hormones, *J Neuroendocrinol* 21(10) (2009) 795-804.
- [242] F. Mauvais-Jarvis, Role of Sex Steroids in  $\beta$  Cell Function, Growth, and Survival, *Trends Endocrinol Metab* 27(12) (2016) 844-855.

- [243] S.L. Padilla, J. Qiu, C.C. Nestor, C. Zhang, A.W. Smith, B.B. Whiddon, O.K. Rønnekleiv, M.J. Kelly, R.D. Palmiter, AgRP to Kiss1 neuron signaling links nutritional state and fertility, *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(9) (2017) 2413-2418.
- [244] M.A. Mittelman-Smith, H. Williams, S.J. Krajewski-Hall, N.T. McMullen, N.E. Rance, Role for kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons in cutaneous vasodilatation and the estrogen modulation of body temperature, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(48) (2012) 19846-51.
- [245] S.L. Padilla, C.W. Johnson, F.D. Barker, M.A. Patterson, R.D. Palmiter, A Neural Circuit Underlying the Generation of Hot Flushes, *Cell Rep* 24(2) (2018) 271-277.