



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

**Facultad de Ciencias Químicas**



**“Participación de los receptores Kiss1R en el desarrollo celular  
uterino y la pubertad de ratas Wistar”**

**Tesis presentada para obtener el grado de:  
Licenciado en Químico Farmacobiólogo**

**Presenta:**

**pQFB Joaquina De la Rosa Priego**

**Director**

**D.C. Victorino G. S. Alatraste Bueno  
Laboratorio de Neuroendocrinología  
Departamento de Análisis Clínicos FCQ-BUAP**

**Co-Director**

**D.C. Bertín Paiz Candia  
Laboratorio de Neuroendocrinología  
Departamento de Análisis Clínicos FCQ-BUAP**

Puebla, Puebla a 11 de Diciembre de 2018

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1 Pubertad en mamíferos.....	3
1.2 Mecanismo neuroendocrino del inicio de la pubertad en mamíferos.....	3
1.3 Hormonas que modulan el inicio de la pubertad.....	4
<i>GnRH</i> .....	4
<i>LH</i> .....	4
<i>FSH</i> .....	4
<i>Hormona del crecimiento</i> .....	5
<i>Factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I)</i> .....	5
<i>Leptina</i> .....	6
<i>Melatonina</i> .....	6
1.4 Neurotransmisores involucrados en el control de las neuronas GnRH .....	7
<i>Glutamato</i> .....	7
<i>Norepinefrina</i> .....	7
<i>Dopamina</i> .....	8
<i>Galanina</i> .....	8
<i>Neuropéptido Y</i> .....	8
<i>GABA</i> .....	9
<i>Opioides endógenos</i> .....	10
<i>Glía</i> .....	11
<i>Factores de crecimiento</i> .....	11
1.5 Kisspeptina nuevo modulador del eje neuroendocrino .....	12
1.6 El receptor a Kisspeptina: Kiss1R.....	15
1.7 Kisspeptina en órganos periféricos femeninos .....	15
1.8 Generalidades del útero .....	18
<i>Anatomía</i> .....	18
<i>Histología del útero de rata</i> .....	19
<i>Función del útero</i> .....	20
<i>Irrigación del útero</i> .....	20
<i>Inervación del útero</i> .....	21
1.9 Antagonista del receptor Kiss1R: Sal de Kisspeptina-234 trifluoroacetato (p-234) .....	22
1.10 Rata Wistar.....	22
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	24
<b>HIPÓTESIS</b> .....	25

<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<u>Objetivo general</u> .....	25
Objetivos particulares.....	25
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	26
3.1 Animales.....	26
3.2 Administración de la sal de Kisspeptina-234 trifluoroacetato (p-234).....	26
3.3 Eutanasia y obtención de los tejidos.....	26
3.4 Tratamiento de los tejidos y análisis histológico.....	27
3.5 Localización por inmunohistoquímica de los receptores Kiss1R en el útero.....	27
3.6 Análisis estadístico.....	27
3.7 Diagrama de trabajo.....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	29
4.1 Edad de la primera apertura vaginal (PAV).....	29
4.2 Análisis morfométrico de úteros de ratas administradas con p-234 a 1nM y 10nM.....	29
Endometrio.....	31
Miometro.....	31
Perimetrio.....	32
4.3 Grosor de las fibras musculares del miometrio de ratas administradas con p-234 1nM y 10nM.....	33
4.4 Conteo de células positivas a Kiss1R en útero de ratas administradas con p-234 1nM y 10nM.....	36
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	38
<b>CONCLUSIONES</b> .....	40
<b>REFERENCIAS</b> .....	41

## 1. INTRODUCCIÓN

La pubertad es un tema de gran interés que tiene relevancia médica, cultural y económica, además de ser importante para la preservación de las especies. La pubertad es el proceso en el que un individuo pasa de la infancia a la adultez, y adquiere la capacidad de reproducirse. En el caso de las hembras son capaces de mantener el embarazo, y así perpetuar la especie. La pubertad, va acompañada del crecimiento corporal y del desarrollo de características sexuales secundarias, además, se producen importantes cambios hormonales, físicos y de comportamiento (Ojeda & Terasawa, 2009; Toro, Aylwinand & Lomniczi, 2018).

El inicio de la pubertad se ve asociado a cambios de la actividad neuroendocrina en el sistema nervioso central (SNC) y la maduración se da en cada uno de los niveles del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (H-P-G) (Heger 2016; Ojeda & Terasawa, 2009).

### 1.1 Pubertad en mamíferos

La pubertad es un fenómeno clave en la maduración sexual de los mamíferos, en esta etapa se alcanza la capacidad reproductiva y se producen cambios importantes de crecimiento, conducta, y, además, en humanos psicológicos. (Ojeda & Terasawa, 2009; Tena-Sempere, 2012)

La edad de inicio de la pubertad es característica para cada especie. Los seres humanos requieren el mayor tiempo en este proceso de maduración siendo en promedio alrededor de 10 años en mujeres y 12 años en varones. En roedores, el tiempo es más corto, ratas hembras 39 días y cobayas 36 días, mientras que en machos es de 49 y 54, respectivamente (por mencionar algunas especies) (Ojeda & Terasawa, 2009).

Neuroendocrinológicamente la pubertad es el aumento de la actividad secretora de las neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo, que a su vez activa el eje gonadotrópico para conducir la maduración gonadal completa que lleva a las capacidades reproductivas. También está influenciado por factores ambientales (geografía, altitud, percepción de la luz, condiciones socioeconómicas y culturales) y por moléculas bioactivas (naturales o artificiales) que pueden afectar directamente el sistema neuroendocrino (Ojeda & Terasawa, 2009; Tena-Sempere, 2012).

### 1.2 Mecanismo neuroendocrino del inicio de la pubertad en mamíferos

Previamente se mencionó que el inicio de la pubertad es consecuencia de la activación de las neuronas GnRHérgicas ubicadas en el hipotálamo, que producen y liberan la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH en hipófisis es necesaria para la adecuada estimulación, síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) y, por lo tanto, de la función gonadal. En el hipotálamo, la actividad de la liberación pulsátil de las neuronas

GnRHérgicas depende de entradas nerviosas excitatorias y/o inhibitorias transsinápticas y gliales originadas a partir de subconjuntos neuronales o células gliales interconectadas a la red neuronal GnRH (Fig. 1) (Ojeda & Terasawa 2009; Tena-Sempere, 2012; Toro, et. al., 2018).

### **1.3 Hormonas que modulan el inicio de la pubertad**

A continuación, se describen las principales hormonas que intervienen en la liberación de GnRH a nivel hipotalámico, que pueden activarla o inhibirla.

#### ***GnRH***

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido que se sintetiza en el área preóptica (POA) del hipotálamo. La GnRH se libera a la circulación portal hipofisaria de forma pulsátil a intervalos de aproximadamente 60 minutos en primates y humanos. En mamíferos juveniles, el intervalo de pulso de la liberación de GnRH es mucho más largo, 90-120 min. La aceleración de la frecuencia del pulso acompañada de un aumento en la amplitud del pulso, por lo tanto, un aumento en la producción total de la liberación de GnRH, desencadena el inicio de la pubertad. También se ha demostrado que la administración pulsátil de GnRH en monos juveniles da como resultado una pubertad precoz y la administración pulsátil de antagonistas retardada el inicio de la pubertad (Terasawa, 2005).

#### ***LH***

La hormona luteinizante (LH), es una glicoproteína producida en hipófisis que al ser liberada a circulación portal y al llegar a los ovarios es capaz de desencadenar la ovulación; esto debido a que los receptores a LH se encuentran en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. La activación de los receptores a LH en las células de la teca estimula la síntesis de andrógenos, que posteriormente se convierten en estrógenos por las células de la granulosa. En los testículos, la LH se une a sus receptores en las células de Leydig, estimulando la síntesis y la secreción de testosterona (Andersson, 2008; Richards & Ascoli, 2018).

#### ***FSH***

La hormona folículo estimulante (FSH) es producida en la hipófisis y placenta. La FSH es una glucoproteína heterodimérica que consta de dos subunidades distintas,  $\alpha$  y  $\beta$ ; la subunidad  $\alpha$  es común en la glándula pituitaria y placentaria, mientras que la subunidad  $\beta$  es específica de la hormona, en conjunto el heterodímero confiere actividad biológica (Das & Kumar, 2018).

La FSH estimula el desarrollo folicular en el ovario, y en particular de las células de la granulosa. FSH junto con LH preparan al folículo para la ovulación y la luteinización. La FSH estimula específicamente la producción de la hormona esteroideas, progesterona y la producción del sistema enzimático (aromatasa) para convertir la testosterona en estrógeno. En machos, la FSH actúa sobre las células de Sertoli de los túbulos seminíferos, mientras que LH actúa principalmente sobre las células intersticiales (Bousfield, Li & Ward, 2006).

### ***Hormona del crecimiento***

La hormona del crecimiento (GH) es un polipéptido monocatenario de 191 aminoácidos producido por la hipófisis. Esta hormona participa en el metabolismo y está relacionada con el crecimiento de cartílago y hueso. Originalmente se descubrió como responsable de la regulación del crecimiento durante la infancia (Brinkman & Sharma 2018).

Diversos estudios en rata y ratón han demostrado que la inhibición de su receptor tiene como efecto el retraso de la pubertad, además de que los niveles de GH incrementan en la pubertad en machos y hembras. Sugiriendo que esta hormona contribuye al inicio de la pubertad. (Ojeda & Terasawa 2009)

### ***Factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1)***

El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) es un péptido similar a la insulina que se sintetiza en hígado y cerebro. El IGF-1 tiene diversas funciones como promotor del crecimiento y diferenciación celular. El IGF-1 se ha asociado como un modulador del eje neuroendocrino puesto que los niveles circulantes de IGF-I aumentan en la pubertad en ambos sexos (Granada, 2006; Ojeda & Terasawa, 2009).

El IGF-1 también se sintetiza en el cerebro. Los estudios en roedores sugieren que la expresión del ARNm de IGF-1 aumenta en la pubertad, además estudios *in vitro* muestran que el IGF-I estimula la liberación de GnRH, mientras que en ratas hembra la administración intracerebral acelera el momento de la pubertad. Además de que ratones KO al receptor de GH administrados con IGF-1 muestran un avance en la llegada de la pubertad. En los chimpancés y los babuinos, machos y hembras, los niveles circulantes de IGF-1 aumentan junto con la elevación puberal de andrógenos. Mientras que, en humanos, los niveles séricos de IGF-1 alcanzan un pico máximo durante el crecimiento puberal. En conjunto, estos datos indican que han llevado a IGF-1 es una señal metabólica que facilita el inicio de la pubertad en los mamíferos (Ojeda & Terasawa, 2009).

## ***Leptina***

La leptina es una hormona derivada de los adipocitos implicada en una gran cantidad de procesos fisiológicos, incluido el control del equilibrio energético y en el eje neuroendocrino. Estudios en ratones deficientes de leptina muestran que en etapas prepuberales los órganos sexuales son normales sin embargo son incapaces de alcanzar la madurez sexual. Mientras que en mono Rhesus la administración de leptina puede incrementar el nivel de LH plasmática, lo cual sugiere que la leptina tiene la capacidad de activar a las neuronas GnRHérgicas, sin embargo, se ha encontrado que las neuronas GnRHérgicas no poseen receptores a leptina, por lo tanto, se cree que esta podría estar modulando de forma indirecta, es decir mediante otras neuronas. (Ojeda & Terasawa, 2009).

En los últimos años se ha propuesto que la leptina puede estimular a las neuronas Kisspeptinérgicas que a su vez estimulan a las neuronas GnRHérgicas. Estudios, en ratón, realizados por Donato et al. (2010) han demostrado que la eliminación de los receptores a leptina en las neuronas kisspeptinérgicas no afectan el inicio de la pubertad, otros estudios han mostrado que en el núcleo arcuato (ARC), la leptina también puede actuar sobre las neuronas glutamatérgicas (Elías, 2012), sin embargo, aun hacen falta más evidencias para explicar el mecanismo exacto por el cual la leptina estimula de manera indirecta a las neuronas GnRHérgicas (Elías, 2012; Chou & Mantzoros, 2014).

## ***Melatonina***

La melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina, es una molécula que afecta el rendimiento reproductivo en una amplia variedad de especies. La melatonina se sintetiza y secreta principalmente por la glándula pineal, también se forma en pequeñas cantidades por otros órganos como la retina, la glándula de Harder, el tracto gastrointestinal, los linfocitos y la piel (Srinivasan, et al., 2009).

La melatonina ha sido sugerida como una hormona inhibitoria para el inicio de la pubertad. Esto debido a que la melatonina retrasa el momento de la pubertad en hamsters y ovejas; además de que la concentración circulante de melatonina se eleva en la primera infancia, y disminuye durante la última infancia permaneciendo estable desde el inicio de la pubertad hasta la edad adulta en humanos y monos (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

Algunos estudios realizados en pacientes humanos con tumores pineales exhiben pubertad precoz; ritmos circadianos de melatonina en hombres ciegos difieren de aquellos en hombres normales, y el momento de la pubertad en niños ciegos está retrasado mientras que niñas ciegas sin percepción de luz tienen una aparición más temprana de la menarquia que las niñas normales (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

## 1.4 Neurotransmisores involucrados en el control de las neuronas GnRH

En esta sección hablare acerca de los neurotransmisores que están involucrados en la modulación positiva y negativa de las neuronas GnRHérgicas.

### *Glutamato*

El glutamato (Glu) es uno de los aminoácidos excitadores más abundante en el cerebro, sus receptores están localizados en una gran variedad de núcleos hipotalámicos (núcleo preóptico medial (MPN), núcleo preóptico mediano, ARC, núcleo hipotalámico ventromedial y dorsomedial, núcleo supraóptico, y núcleo paraventricular). Hay tres clases de receptores ionotrópicos a los que se une el glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA); kainato y ácido DL- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA); las neuronas GnRH expresan todos estos.

La estimulación de los receptores NMDA da como resultado una pubertad precoz en ratas y monos, mientras que la administración de los bloqueadores del receptor NMDA (MK-801 o ácido 2-amino-5 fosfonovalérico (AP-5)) retrasa el inicio de la pubertad en ratas. Otros estudios en mamíferos adultos sugieren que la activación de los receptores NMDA estimula la liberación de GnRH/LH; estudios *in vivo*, en ratas y monos adultos, donde se usa MK-801 suprime los pulsos de GnRH. Estudios más detallados han demostrado que tanto las concentraciones de glutamato en el POA como la liberación del aminoácido de los explantes de POA aumentan durante el desarrollo juvenil (P16 a P30) en ratas hembra. Concluyendo que las concentraciones de Glu aumentan en el hipotálamo durante el desarrollo puberal alcanzando un máximo después del inicio de la pubertad. (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012)

La expresión de NMDA (no de Kainato y AMPA) en el hipotálamo experimenta cambios puberales en la expresión de ARNm, y en la coexpresión de sus subunidades de receptor en las neuronas GnRHérgicas. Los niveles de ARNm de NR1 en el POA-AH aumentan peri-puberalmente, y la coexpresión de NR1 con neuronas GnRHérgicas aumenta significativamente al alcanzar la función reproductiva adulta (Maffucci & Gore, 2009).

### *Norepinefrina*

Las neuronas adrenérgicas están implicadas en el control de la liberación de GnRH y LH, y como mediadores de la estimulación de esteroides preovulatoria en el ovario (Ojeda & Terasawa, 2009)

Existen dos tipos de receptores adrenérgicos los  $\alpha$  y los  $\beta$  cada uno tiene subtipos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , y  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ). Cada receptor es estimulado por diferentes ligandos, el efecto que causa la activación de los receptores  $\alpha$  es opuesto al de los  $\beta$ . En primates la activación de  $\alpha_1$ , estimula la liberación de GnRH;

mientras, que ratas hembras tratadas con reserpina (un bloqueador de la síntesis de monoaminas) retrasa la apertura vaginal. Ruf & Holmes (1973), mostraron que ratas hembra tratadas con 6-hidroxi-dopamina (que destruyen selectivamente neuronas catecolaminérgicas) se retrasa la apertura vaginal (Ojeda & Terasawa, 2009).

La respuesta *in vitro* de GnRH a norepinefrina, en ratas hembras, aumenta a medida que el animal se acerca a la pubertad y esta respuesta se ve reforzada por el estradiol, sugiriendo una participación de entradas noradrenérgicas en la progresión del proceso puberal. Estos resultados indican que norepinefrina es un neurotransmisor que contribuye a facilitar el aumento puberal en la liberación de GnRH /LH (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

### ***Dopamina***

El rol principal de la dopamina en el inicio de la pubertad aún no está bien establecido. Se ha demostrado que las concentraciones hipotalámicas de dopamina, en rata, aumentan antes y alrededor de la edad de la pubertad. El tratamiento crónico con pergolida (agonista de los receptores D1 y D2) provoca un avance en la apertura vaginal, mientras que la pimozida (antagonista de los receptores dopaminérgicos D2, D3 y D4) en el área preóptica medial, también tiene como resultado un adelanto en el inicio de la pubertad. La administración crónica con pergolida entre el P11 y P20 induce un adelanto en la pubertad. Estos resultados nos indican que las neuronas dopaminérgicas afectan el inicio de la pubertad de las dos maneras, tanto estimulatoria como inhibitoria, sin embargo, no juega un rol crucial en la activación de las neuronas GnRHérgicas (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

### ***Galanina***

Se ha propuesto a la galanina como un modulador de la actividad de la GnRH facilitando el inicio de la pubertad, las concentraciones de galanina en el hipotálamo incrementan en un modelo de pubertad precoz en ratas, además de que en ratas macho y hembra la galanina incrementa en el POA durante la pubertad. Estas observaciones sugieren que galanina está influenciada por los esteroides gonadales (estrógenos y testosterona) que se producen en el momento de la pubertad. En mono Rhesus se ha encontrado que galanina no tiene ningún efecto en la estimulación de GnRH (Ojeda & Terasawa, 2009).

### ***Neuropéptido Y***

El neuropéptido Y (NPY) es un péptido de 36 aminoácidos y es uno de los péptidos más abundantes encontrados en el sistema nervioso central de mamíferos. En la rata, la concentración de

NPY a nivel hipotalámico incrementa durante el desarrollo posnatal. Así mismo, NPY tiene un incremento significativo en el momento de la primera salida preovulatoria, sugiriendo que este tiene control en la secreción de GnRH (Ojeda & Terasawa, 2009). En ratas y cerdos el contenido de neuronas NPYérgicas en el hipotálamo es bajo en el desarrollo posnatal e incrementa durante la pubertad. Mientras que, en monos, no parece haber cambios en el número de neuronas NPYérgicas después del nacimiento (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

El rol del NPY en la pubertad ha sido ampliamente discutido. Diversos estudios en ratas, conejos y monos hembra ovariectomizadas muestran que NPY actúa inhibitoriamente en la secreción de GnRH/LH. Mientras que en animales intactos o tratados con estrógenos, el NPY estimula la secreción de GnRH. Sin embargo, estudios realizados en mono Rhesus hembras muestran que el NPY tiene actividad estimuladora independientemente del estado de las gónadas (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

Woller et al. (1992) demostraron que cuando el NPY es administrado intraventricularmente en S-ME puede estimular sistemas inhibitorios de GnRH, como pasa en neuronas  $\beta$ -endorfinas. Esta interpretación mantiene que NPY es estimulador de la liberación de GnRH si este se administra directamente en ME. El NPY contribuye al inicio de la pubertad mas no es decisivo para que este proceso se lleve a cabo (Ojeda & Terasawa 2009, p 2057).

Se ha informado un papel modulador negativo del NPY en el inicio de la pubertad en ratas y, más recientemente, en monos Rhesus. El Majdoubiy et al. (2000) informaron que, aunque el contenido del ARNm de GnRH en neonatos no es diferente del ARNm de animales juveniles, el ARNm hipotalámico disminuyó en los machos juveniles respecto a los niveles más altos detectados en los recién nacidos. Además, el bloqueo de los receptores Y1 (1229U91) mediante inyección intraventricular de un antagonista de NPY estimuló en gran medida la liberación de LH en monos prepúberes (Terasawa y Kurian 2012, p458). Investigaciones en ratones NPY-KO han demostrado que el NPY ejerce efectos inhibidores a través de la inhibición presináptica de las neuronas de glutamato. Por lo tanto, está claro que el NPY puede ejercer tantos efectos inhibidores como excitadores sobre la actividad neuronal hipotalámica (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

## ***GABA***

GABA es el neurotransmisor inhibitor dominante en el hipotálamo. GABA es capaz de inhibir la actividad de las neuronas GnRHérgicas. GABA se sintetiza principalmente a partir de glutamato a través de una reacción de descarboxilación catalizada por ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

En ratas puberales la administración en el POA de antagonistas del receptor GABA-A, adelanta la pubertad mientras que si se administra un agonista ocurre un retraso. Sin embargo, la evidencia sugiere que en ratas antes de alcanzar la pubertad, GABA es un estimulador positivo, y al llegar a la edad de pubertad se convierte en uno negativo, no así para primates no humanos en donde desde la etapa infantil GABA inhibe la secreción de GnRH, y antes de la pubertad se reduce su nivel provocando un incremento de GnRH. Estudios realizados en células inmaduras de hipotálamo demuestran que GABA produce una respuesta excitatoria en las neuronas GnRH, si bien demostró que esto pasa en todas las células inmaduras aún quedan dudas respecto a cuál es el papel que está cumpliendo GABA en el inicio de la pubertad. Otros estudios han demostrado que las células maduras poseen algunas subunidades que las inmaduras no esto podría justificar porque en la edad prepuberal funciona de una manera y al madurar de otra (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

### ***Opioides endógenos***

Debido a que los péptidos opioides suprimen la liberación pulsátil de LH, y un antagonista del receptor opioide, naloxona, contrarresta el efecto de retroalimentación negativa del estrógeno sobre las gonadotropinas en animales adultos, se ha propuesto que los opioides endógenos tienen algún papel en la pubertad. Tanto en ratas como en ovejas inmaduras, la naloxona estimula la liberación de LH y se ha demostrado que la administración de naloxona durante la vida posnatal temprana desencadena pubertad precoz en ratas hembra. Sin embargo, estudios realizados en ratas macho y hembra, sugieren que la pérdida de la inhibición mediada por opioides en la liberación de GnRH no juega un papel crítico en el inicio de la pubertad, puesto que el bloqueo de los receptores opioides causa efectos opuestos sobre la liberación de LH durante el desarrollo prepuberal inhibiendo la producción de LH en machos, pero estimulándola en las hembras.

En primates, los péptidos opioides no juegan un papel importante en el inicio de la pubertad. Los opioides mantienen la liberación de GnRH baja antes de la pubertad, en chimpancés la naloxona no aumenta la liberación de LH hasta después del inicio de la pubertad, y se vuelve más efectiva durante el curso de la pubertad. Estos datos nos muestran que los péptidos opioides como grupo no parecen jugar un papel en la restricción del inicio de la pubertad. Sin embargo, los péptidos opioides pueden complementar un papel inhibitor del GABA antes de la pubertad que conducen al aumento puberal en la producción de GnRH (Ojeda & Terasawa, 2009; Terasawa & Kurian, 2012).

## ***Glía***

Antes se creía que la glía solo desempeñaba funciones de apoyo en el sistema nervioso central, recientemente se ha encontrado que estas células pueden generar, procesar y transmitir información, al igual que las neuronas (Ojeda & Terasawa, 2009).

Las células gliales poseen una gran variedad de receptores a neurotransmisores y muchos de los receptores están acoplados a sistemas de segundo mensajero. Las células gliales pueden participar en el inicio de la pubertad modificando la liberación pulsátil de las neuronas GnRHérgicas, por la producción factores de crecimiento, proporcionando una vía de señalización desde otras neuronas. Ejemplos de ello es el neuroligando, bradiquinina, que estimula la liberación de glutamato de los astrocitos, que a su vez parece indicar señales de neuronas de bradiquinina, o bien, modificación del entorno local de la liberación de GnRH (Ojeda & Terasawa, 2009; Ojeda, Lomniczi, & Sandau, 2010).

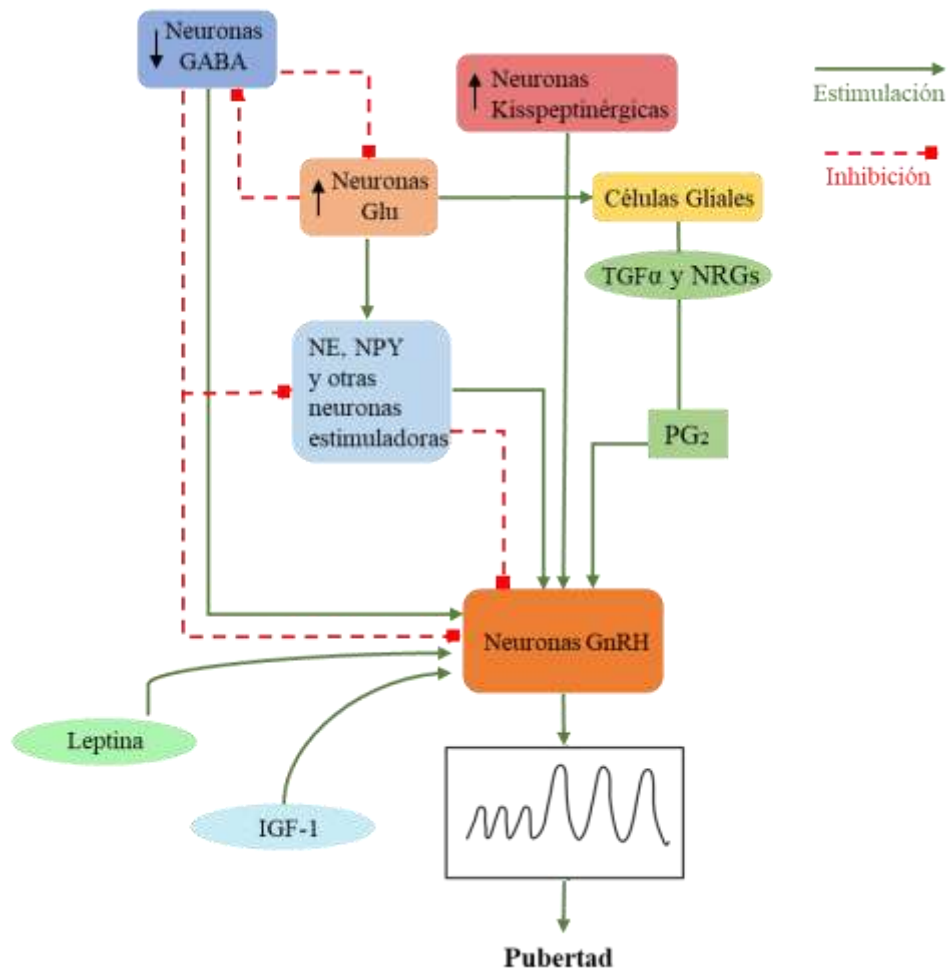
## ***Factores de crecimiento***

La astrogliia sintetiza y libera factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF $\alpha$  y TGF  $\beta$ ), el factor de crecimiento fibroblástico básico (FCFb), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1), neuronal (Ojeda & Terasawa, 2009).

Los receptores de EGF median los efectos del TGF $\alpha$ , y el ARNm del receptor de EGF y el EGF disminuyen antes del primer aumento preovulatorio de GnRH, lo que indica que EGF puede tener participación en el inicio de la pubertad. Mientras que el TGF $\beta$  derivado de la astrogliia estimula los niveles de ARNm de GnRH. Estudios *in vitro* con células GT1 han mostrado que el FCFb también estimula la liberación de GnRH, mientras que el FCFb altera la secreción de GnRH. En ratas hembras el FCFb disminuye significativamente con la pubertad inducida por NMDA, mientras que los niveles de ARNm del receptor de bFGF no muestran ningún cambio. La glía también participa en el inicio de la pubertad en los monos Rhesus, puesto que en el hipotálamo el ARNm de TGF $\alpha$  aumenta con la pubertad y la expresión del TGF $\alpha$  cambia de forma bifásica durante la maduración sexual, siendo que, la expresión es alta durante el período infantil cuando los niveles de gonadotropinas son altos y disminuye durante el período juvenil, aumentando nuevamente en el momento de la pubertad (Ojeda & Terasawa, 2009).

Radovick et al. (1997) han informado que la línea celular de neurosecreción de GnRH NLT (GN) expresa receptores a IGF-1, y que IGF-1 es capaz de regular la expresión de ARNm de GnRH. Por lo tanto, es plausible el aumento puberal en IGF-1 puede alterar directamente la actividad de las neuronas GnRH, y este mecanismo puede contribuir al aumento puberal en GnRH liberación, aunque es dudoso que el IGF-1 derivado de astrogliial juegue un papel en desencadenar el inicio de la

pubertad. Específicamente, mientras que los astrocitos son la fuente primaria de IGF-1 del hipotálamo, parece que las fuentes periféricas de IGF-1 son más propensas a contribuir a la activación de la red neuronal de GnRH en la pubertad (Ojeda & Terasawa, 2009).

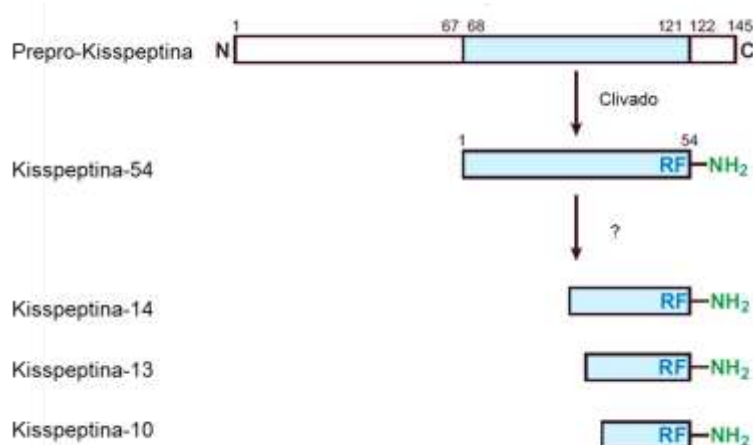


**Fig. 1.** El incremento en la secreción de GnRH se debe a la activación de un mecanismo integral en el que participan la comunicación neuronal de moléculas excitadoras e inhibitorias y la comunicación transináptica y glial (Modificado de Ojeda & Terasawa, 2009).

### 1.5 Kisspeptina nuevo modulador del eje neuroendocrino

Kisspeptina (Kiss) fue descubierta en 1996 como producto del gen *Kiss-1*, capaz de suprimir la metástasis (Kotani et al., 2001). Kiss fue nombrado así por su papel como secuencia supresora (SS). Las letras "Ki" se añadieron al prefijo "ss" para formar "Kiss" en homenaje al lugar de su descubrimiento, es decir, Hershey, Pennsylvania, hogar del famoso "Chocolate Kiss de Hershey" (Smith, Clifton & Steiner 2006; Oakley, Clifton & Steiner 2009).

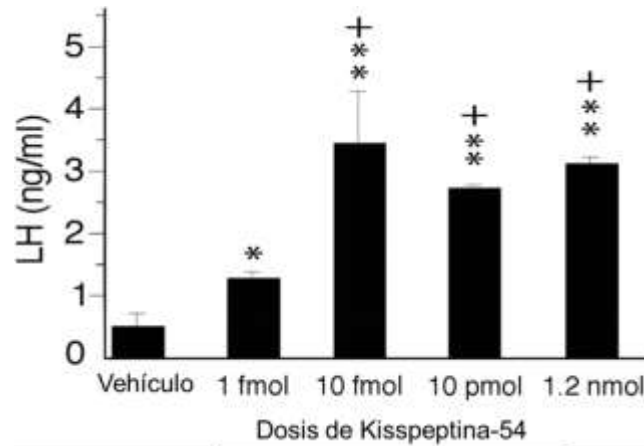
Kiss es un péptido de 54 aminoácidos que proviene de la prepro-kisspeptina. Esta prepro-kisspeptina es una proteína de 145 aminoácidos, que es clivada enzimáticamente hasta llegar a fragmentos de 54, 14, 13 y 10 aminoácidos. Estos aminoácidos comparten un extremo COO-H común y un motivo RF-amida (Fig. 2) (Kotani et al., 2001). Lo cual, se logró identificar en varios tejidos como la placenta, hipotálamo e hipófisis, cerebelo, corteza y tallo cerebral (Kauffman, Clifton, & Steiner 2007).



**Fig. 2** La Prepro-Kisspeptina es cortada enzimáticamente para la producción de Kisspeptina-54. Los péptidos más cortos (como Kisspeptina-10, -13 y -14) pueden ser productos de degradación de Kisspeptina-54 (Modificado de Popa, Clifton, & Steiner, 2008)

La importancia de Kiss en la reproducción se descubrió cuando dos grupos independientes, de Roux et al. (2003) y Seminara et al. (2003) reportaron que pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (HHI), presentaron disminución de esteroides sexuales, gametogénesis alterada y falta de ciclicidad menstrual debido a mutaciones del gen que codifica para el receptor a Kiss (Kiss1R), además de ser asociadas con severa deficiencia en LH y FSH (Popa, Clifton, & Steiner, 2008).

Kiss es un potente secretagogo para las neuronas GnRHérgicas, se ha demostrado que la administración central o periférica de éste estimula la secreción de gonadotropinas (Popa, Clifton, & Steiner, 2008). Gottsch et al. (2006) informaron que dosis tan bajas de Kiss (1 fM) inyectadas en el ventrículo lateral del ratón, puede provocar un estallido de secreción de LH y FSH (Fig. 3).



**Fig. 3** Efectos de diferentes dosis de kisspeptin-54 (que van desde 0-5 nmol administrado ICV) en los niveles séricos de LH, medidos 30 minutos después de la administración. \*,  $P < 0.01$  vs. Vehículo; \*\*,  $P < 0.001$  vs. Vehículo; +,  $P < 0.001$  vs. 0.001 pmol kisspeptina-54. (Modificado de Gottsch et al. 2006)

Por su parte, Navarro et al. (2004) reportaron que una dosis de 1 nM de Kiss administrada en el ventrículo derecho de ratas hembra puede incrementar los niveles séricos de LH y de estradiol, asimismo, las aposiciones entre los axones de las neuronas Kisspeptinérgicas y los somas neuronales de las neuronas GnRHérgicas aumentan al momento de la pubertad, sugiriendo también un aumento en la entrada de Kiss a las neuronas GnRHérgicas en esta etapa del desarrollo (Oakley, Clifton & Steiner, 2009). Estudios realizados por Pita et al. (2011) probaron que los niveles circulantes de Kiss plasmática son mayores en la pubertad precoz en comparación con las niñas normales pre-púberes.

La señalización de Kiss-Kiss1R también se ha demostrado periféricamente en ratas pre-púberes de 25 días de edad en donde se encontró que Kiss estimula la secreción de FSH y LH (Matsui, Takatsu, Kumano, Matsumoto & Ohtaki, 2004).

En la regulación de las neuronas Kisspeptinérgicas participan los esteroides sexuales, ya que, las neuronas Kisspeptinérgicas expresan receptores a andrógenos (RA), y receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  (RE $\alpha$ , RE $\beta$ ) (Smith, Clifton & Steiner, 2006). Las neuronas Kisspeptinérgicas se encuentran, principalmente, en el núcleo ARC y el núcleo AVPV (Núcleos Kisspeptinérgicos). Estos núcleos tienen implicaciones en el feedback positivo y negativo de Kiss (Kauffman, Clifton, & Steiner, 2007). En roedores las neuronas Kisspeptinérgicas que se encuentran en el ARC están siendo reguladas negativamente por los esteroides sexuales gonadales (testosterona y estrógeno) mientras que en el caso de las hembras el estradiol regula de manera positiva en el núcleo AVPV (Smith, Clifton & Steiner, 2006).

## 1.6 El receptor a Kisspeptina: Kiss1R

Lee et al. (1999), descubrieron el receptor a Kiss en ratas, conocido como Kiss1R o también GPR54. En otro trabajo, Muir et al. (2001) a partir de cerebro humano, clonaron el receptor AXOR12, que exhibe un 81% de homología con el Kiss1R.

Kiss a través de su receptor Kiss1R, es capaz de activar la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). La expresión de Kiss1R es absolutamente necesaria para hacer funcional al eje gonadotrópico.

Bioquímicamente, el receptor Kiss1R es un receptor con 7 dominios transmembranales, acoplado a proteína  $G_{q/11}$ , cuando Kiss se une al receptor Kiss1R, se cierran los canales de  $K^+$  hacia el interior para despolarizar a las neuronas GnRHérgicas. La subunidad  $\alpha$  se une a la Fosfolipasa C (PLC) para que esta a continuación transforme a Fosfatidil inositol 4,5, bifosfato (PIP<sub>2</sub>), en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> abre los depósitos intercelulares de  $Ca^{++}$  (retículo endoplásmico), para su liberación, incrementando así la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular y despolarizando a la neurona. También permite la afluencia de cationes mediante la apertura de un receptor de potencial transitorio de canal tipo 4 (TRPC4) que resulta de la activación de PLC que en este caso se disocia PIP<sub>2</sub> del canal TRPC4 para potenciar su actividad al tiempo que la tirosina quinasa fosforila y activa TRPC4 (Fig. 4) (Oakley, Clifton & Steiner 2009).

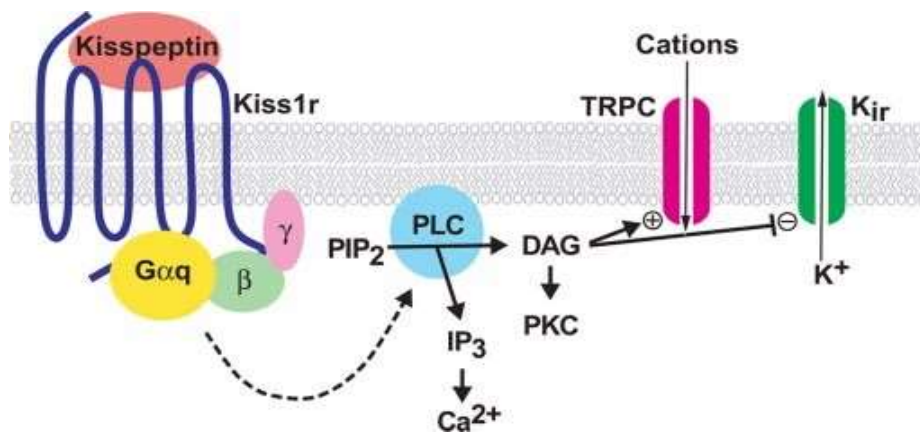


Fig. 4 Mecanismo de acción del receptor Kiss1R (Oakley, Clifton & Steiner 2009)

## 1.7 Kisspeptina en órganos periféricos femeninos

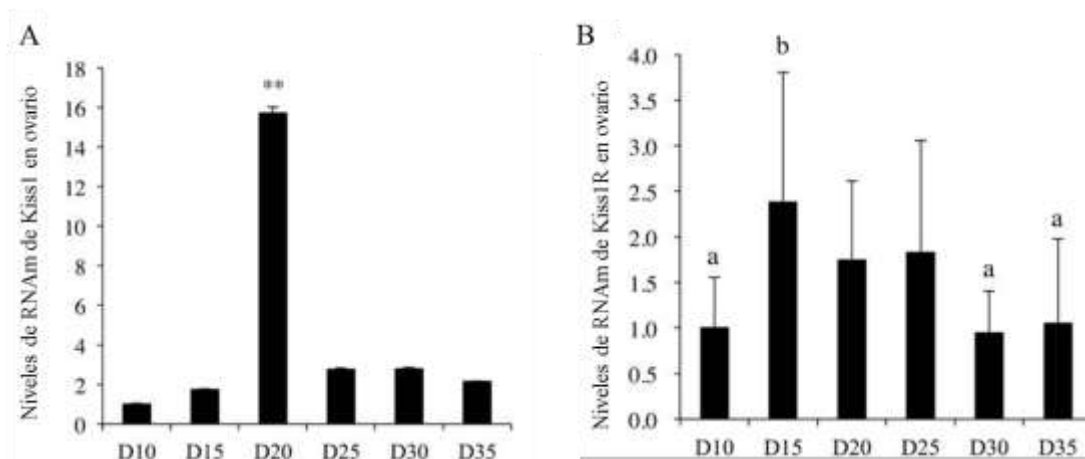
A partir del descubrimiento del papel de Kiss en la pubertad a nivel de SNC también comenzó su estudio en órganos periféricos relacionados con el eje gonadotrópico. Los órganos sexuales (ovarios y testículos) en hembras y machos son indispensables para la regulación del eje, puesto que

participan en la retroalimentación positiva y negativa a través de la secreción esteroidea. A continuación, se describe, su papel en ovarios y útero.

### ***Kisspetina en el Ovario***

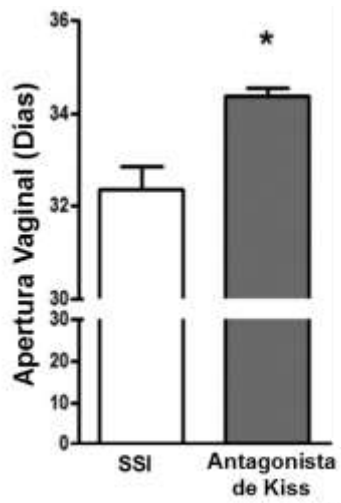
Kiss se ha localizado en ovarios cíclicos humanos y de títes, encontrándose un prominente marcaje en la capa de células de la teca de folículos en crecimiento, cuerpo lúteo, glándula intersticial y epitelio de la superficie ovárica, en tanto que Kiss1R también se encontró en células de la teca humana y luteales (Gaytán et al., 2009). Además de que estudios hechos por Castellano et al. (2006) mostraron que los genes Kiss1 y Kiss1R se expresaron en ovarios de rata durante todo el ciclo estral. También reportaron, que los niveles de ARNm de Kiss1R se mantuvieron bajos y sin variaciones significativas. El ARNm de Kiss1 fluctuó de forma dependiente del ciclo, bajo la regulación de la LH hipofisaria. Sugiriendo así, la participación de Kiss periférica en la regulación del ciclo estral.

Mientras que Yamasaki et al. (2017) han demostrado que los niveles del ARNm de Kiss-1 y Kiss-1R ováricos varían durante el desarrollo. Observando, que en ratas hembras juveniles, los niveles de expresión de ARNm de Kiss-1 y Kiss-1R son más altos alrededor de los días 15-20 postnatales en comparación con los niveles de otros días (Fig. 5).



**Fig. 5** Niveles de ARNm de Kiss1 y Kiss1R (A, B) ovárico desde el día (D) 10 hasta D35 (n = 7 por grupo). Los niveles de ARNm en D10 se establecieron como 1,0. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE. a, b: letras diferentes indican diferencias significativas diferentes ( $P < 0.05$ ). \*\*:  $P < 0.01$  vs. todos los otros grupos (Modificado de Yamasaki et al. 2017).

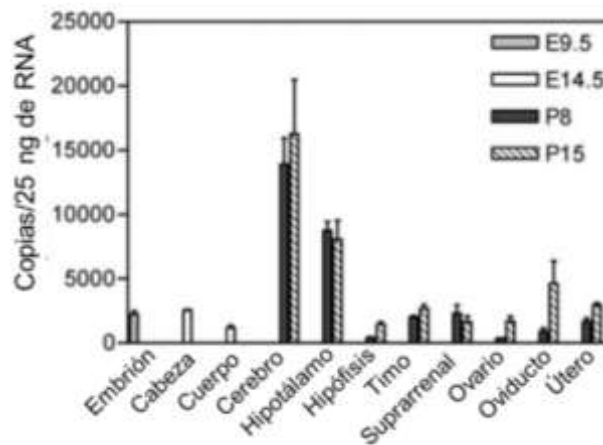
Otros estudios hechos por Ricu et al. (2012), muestran la presencia de Kiss en el ganglio celiaco inervando a los ovarios, sugiriendo una red neuronal entre el ganglio celiaco y el ovario. Este mismo equipo de trabajo, reportó que la administración directa a ovarios de un antagonista de Kiss (p-234) in vivo retrasa la apertura vaginal y altera el ciclo estral (Fig. 6).



**Fig. 6** Efecto de la administración in vivo intraovárica del antagonista de la kisspeptina (p-234) en la edad de la apertura vaginal. Promedio de apertura vaginal en control (n = 10) y antagonista de kisspeptina (n = 10) Los asteriscos representan una diferencia estadísticamente significativa, se realizó la prueba t de Student para datos emparejados (\*, P <0.05) (Modificado de Ricu, et al. 2012).

### *Kisspeptina en el Útero*

En útero, la presencia de Kiss o Kiss1R ha sido poco descrita, ratonas homocigotas KO para Kiss1R muestran un útero hipoplásico, además de que las concentraciones de ARNm para Kiss1R en ratonas normales tienen un máximo pico al P15, sugiriendo que la función principal de Kiss1R en el desarrollo sexual ocurre después del nacimiento y antes de la pubertad (Funes, et al. 2003) (Fig. 7). Mientras que D'Anglemont et al. (2007) reportaron que ratonas hembra KO a Kiss presentan úteros considerablemente más pequeños y filiformes además de anomalías histológicas en útero.



**Fig. 7** Análisis de PCR cuantitativa de la expresión de Kiss1R en tejidos de tipo salvaje de ratonas en diferentes puntos temporales de desarrollo (Modificado de Funes, et al. 2003).

Zhang et al. (2014) mostraron que en el útero de ratón hembra ovariectomizado la expresión del ARNm de Kiss se regula positivamente después del tratamiento con estradiol. Este hallazgo es importante y propone que la expresión de Kiss en útero también está regulada por estradiol como en el hipotálamo.

Estudios realizados por León et al. (2016) han demostrado que en ratón hembra KO a Kiss o a Kiss1R hay una pérdida casi completa (aproximadamente 97%) de la formación total de glándulas endometriales y una reducción significativa (aproximadamente 81%) en el crecimiento uterino en el ratón adulto. Y que el tratamiento con estradiol o la reactivación de las neuronas GnRHérgicas puede reestablecer completamente el crecimiento uterino, pero la adenogénesis solo en una media del 25%. Proponiendo así que el sistema de señalización de Kiss debe ser un importante regulador de la adenogénesis y el crecimiento uterino en el ratón adulto puesto que en un segundo experimento se mantuvo la expresión de los receptores en órganos periféricos encontrándose que la reducción de adenogénesis y crecimiento uterino fue menor que la observada en los ratones KO a Kiss y Kiss1R.

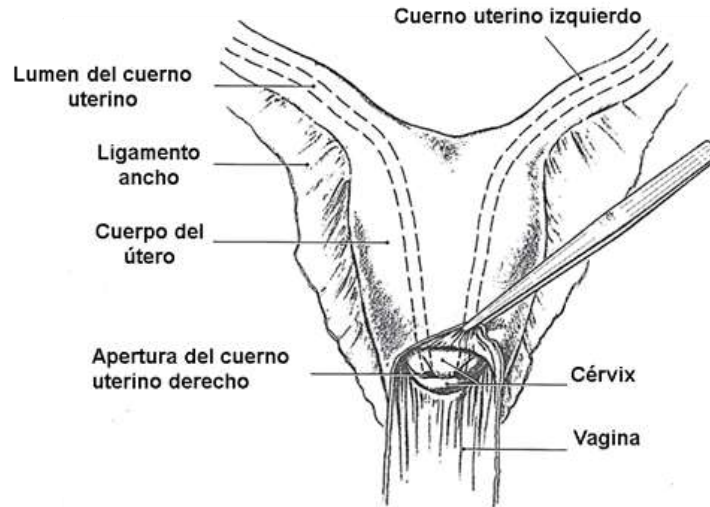
## **1.8 Generalidades del útero**

El útero es el órgano responsable de una variedad de funciones tales como la gestación (embarazo), la menstruación y el parto.

### ***Anatomía***

El útero de los roedores posee una anatomía bicornes, está formada por dos cuernos uterinos los cuales convergen hacia la región caudal formando el cuerpo uterino, el cual continúa hasta el cuello uterino (Fig. 8) (Mossman, 1977).

El útero está soportado por varios ligamentos que incluyen el ligamento ovárico-uterino, el ligamento redondo, el ligamento ancho, el ligamento cardinal y los ligamentos útero-sacros. Además, está apoyado (inferiormente) por el diafragma pélvico, el diafragma urogenital y el cuerpo perineal (Fig. 4) (Sosa-Stanley & Bhimji, 2012)

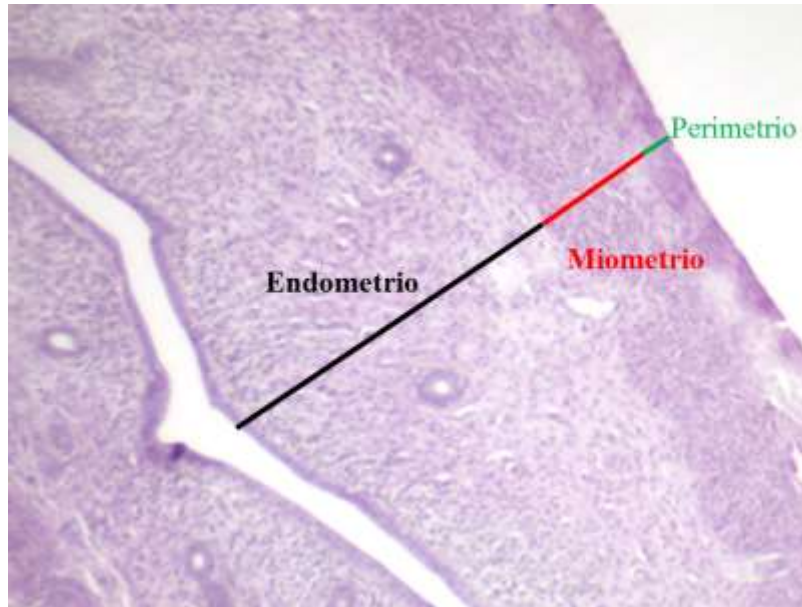


**Fig.8** Anatomía del útero de rata (Modificado Walker, Warren F., 1997).

### ***Histología del útero de rata***

El útero se compone de tres capas de tejido que son:

1. Endometrio: consiste en el endometrio funcional (superficial) y basal. La capa funcional responde a las hormonas reproductivas. Esta constituido por un epitelio cilíndrico simple que reviste el lumen del útero. Por debajo de este epitelio y separado por una membrana basal, se localiza una capa de tejido conectivo laxo, muy vascularizada. También pueden observarse glándulas uterinas que son invaginaciones tubulares del epitelio luminal.
2. Miometrio: formado principalmente por dos capas de musculo, una interna orientada circularmente y una más externa orientada longitudinalmente;
3. Serosa / Perimetrio: capa externa compuesta de tejido conjuntivo laxo, recubierto por la serosa peritoneal. Presenta muchos vasos linfáticos, sanguíneos y fibras nerviosas (Fig. 9) (Pérez y Romano, 1996; Sosa-Stanley y Bhimji, 2012).



**Fig. 9** Corte histológico del útero de rata Wistar, en donde se observan las tres capas de tejido que lo conforman (Foto tomada en el Laboratorio de Neuroendocrinología de la FCQ-BUAP. Tinción H&E).

### ***Función del útero***

La principal función del útero es aceptar el óvulo fertilizado que pasa a través de la trompa de Falopio. El óvulo luego se implanta en el endometrio, donde recibe alimento de los vasos sanguíneos desarrollados exclusivamente para ese fin. A medida que el embrión crece y madura, el útero se expande para soportar el embarazo. (Shirasuna e Iwata 2017).

### ***Irrigación del útero***

En la rata, las arterias segmentarias generalmente surgen como ramas de la anastomosis arterial ovario-uterina y entran en el útero a lo largo del borde mesometrial, estas arterias segmentarias surgen de "asas arteriales" que se ramifican, circulan paralelas y luego se unen nuevamente a la arteria ovárico-uterina. Las arterias segmentarias pasan entre las capas del mesometrio, generalmente se ramifican varias veces antes de alcanzar el músculo circular de los músculos adyacentes al mesometrio.

Las ramas arteriales pueden estar dorsal o ventralmente alrededor del útero, formando las 'arterias circunferenciales', o pueden dividirse muchas veces para formar una correa de pequeñas arterias que suministran al endometrio en la región del mesometrio.

Las arterias circunferenciales siguen una trayectoria tortuosa alrededor del útero entre las capas musculares longitudinal y circular, antes de realizar un análisis antimesometrial entre ellas y

también con arterias circunferenciales adyacentes (anteriores o posteriores). Los capilares musculares longitudinales, se derivan de las arterias circunferenciales, formando pequeños bucles paralelos regulares.

El endometrio es suministrado por una serie de arterias que surgen de cada arteria circunferencial, denominadas arterias espirales. Algunas arterias espirales se estrechan mientras pasan a través de la capa muscular circular, antes de aumentar el diámetro luminal dentro del endometrio. En el endometrio pueden continuar hacia el lumen sin ramificaciones, antes de dividirse para formar el plexo capilar subepitelial, o se ramifican varias veces en el endometrio con cada rama subdividida aún más antes de unir el plexo capilar luminal. Los capilares del plexo subepitelial tienen un patrón complejo de conexión, con rutas largas, intermedias y cortas entre cualquier arteriola y vénula. Las glándulas dentro del endometrio tienen un esqueleto vascular característico, que comprende una "canasta" de capilares suministrados por una arteriola en un lado y drenados por una vénula en el otro lado. Los capilares de las glándulas a menudo se anastomosan con los del plexo subepitelial que rodea las bocas de las glándulas, el retorno venoso del endometrio consiste en una serie de vénulas cortas y relativamente gruesas que se unen antes de desembocar en una gran vena circunferencial. A diferencia del suministro arterial, hay venas circunferenciales en dos niveles: entre el endometrio y el miometrio; y entre las capas musculares longitudinales y circulares del miometrio.

Las venas circunferenciales de los dos niveles se conectan hacia el lado mesometrial del útero, donde el vaso interno pasa a través de la capa circular del músculo para unirse al vaso externo. Las venas circunferenciales externas dorsal y ventral anastomosa de manera similar a las arterias, mientras que las venas circunferenciales internas dorsal y ventral no parecen tener anastomosis principales en esta región. No hay venas equivalentes a las arterias del triángulo mesometrial, lo que sugiere que la sangre de esta área drena a áreas adyacentes a través del capilar subepitelio plexo. Los capilares de la capa muscular longitudinal se conectan a la vena circunferencial externa, mientras que los de la capa muscular circular se conectan tanto a la vena circunferencial interna como a la externa.

Las venas circunferenciales dorsal y ventral pasan al mesometrio donde se unen entre sí y con las venas circunferenciales de áreas adyacentes del útero para formar las venas segmentarias. Al igual que con las arterias segmentarias, se pueden encontrar asas venosas anastomóticas dentro del mesotetrio (Rogers & Gannon, 1981).

### ***Inervación del útero***

El útero tiene nervios simpáticos, parasimpáticos y sensoriales que inervan principalmente los vasos sanguíneos y el músculo liso del miometrio. En la rata, el 90% de las fibras nerviosas simpáticas que inervan la parte superior del cuerno uterino se originan en las neuronas suprarrenales

y los ganglios de la cadena simpática entre los segmentos espinales T10-L3. Mientras que la innervación del útero inferior y el cuello uterino se originan en los ganglios paravertebrales, principalmente entre los segmentos espinales L2-L4. En cobayas y humanos, una parte considerable de la innervación simpática del cuerpo uterino y del cuello uterino surge de las neuronas en el plexo pélvico ubicado en la unión útero-vaginal. La densidad total de la innervación varía sustancialmente entre las diferentes especies. Además, la densidad de innervación es más pesada en el extremo tubárico del cuerno uterino y del cuello uterino que en las partes principales del cuerno/cuerpo. Nance et al. (1988) muestran que en la rata, las fibras que innervan la región craneal del cuerno uterino surgen de los segmentos vertebrales T13-L1, mientras que las neuronas en los ganglios L6 y S1 innervan la región caudal del cuerno uterino y el cuello uterino. Los ganglios nodosos a través del nervio vago contribuyen a la innervación aferente del útero de la rata.

Debido a que la innervación simpática se aproxima a las glándulas uterinas, se sugiere que estas fibras tienen un papel en la secreción endometrial, diferente a los nervios parasimpáticos que rara vez penetran profundamente en el endometrio y no se asocian con las glándulas endometriales (Brauer & Smith, 2015).

### **1.9 Antagonista del receptor Kiss1R: Sal de Kisspeptina-234 trifluoroacetato (p-234)**

El p-234 es un péptido sintético con especificidad para el receptor Kiss1R, capaz de inhibir la liberación intracelular de Fosfato inositol (IP). En machos castrados la administración del p-234 de 1 nmol a los 0, 60 y 120 min reduce los niveles séricos de LH; además de suprimir la liberación de GnRH. (Roseweir, et al., 2009).

### **1.10 Rata Wistar**

Las ratas Wistar son ratas albinas que pertenecen a la especie *Rattus norvegicus*. Esta variedad fue desarrollada en el Instituto Wistar en 1906 para su uso en la investigación biológica y médica. La rata Wistar es actualmente una de las cepas de ratas más populares utilizadas para la investigación de laboratorio. Se caracteriza por su cabeza ancha, orejas largas, y con una longitud de la cola que es siempre inferior a la longitud de su cuerpo además de que estas siempre son más activas comparadas a otras cepas.

#### Características Generales

- Tamaño de camada promedio: 9
- Animal dócil
- Carecen de Vesícula Biliar

- Poco activas durante el día.
- Usan sus bigotes para orientación espacial.
- Olfato muy desarrollado.
- Carecen del reflejo del vómito.
- Poseen Glándulas de Harder que secretan Porfirinas.
- Longevidad 2.5 a 3.5 años.

La rata es uno de los animales más utilizados en el estudio de la fisiología de la reproducción. Una de las ventajas que tiene la rata para su uso en la investigación es el corto tiempo de gestación (22.5 días en promedio) comparada con otros mamíferos (monos, 30-50 meses y ovejas; 5-7 meses). Asimismo, la duración del ciclo estral tiene una duración de 4 a 5 días, mientras que la pubertad se alcanza a los 39 días en promedio (Maeda, Okhura & Tsukaura, 2000).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Kiss es un potente secretagogo para GnRH; tanto Kiss como Kiss1R, están implicados en su regulación. Las neuronas GnRHérgicas se encuentran en el hipotálamo y proyectan hacia la hipófisis. Cuando hay liberación de GnRH, en hipófisis se estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), estas por vía sanguínea estimulan la secreción de estradiol y progesterona en gónadas, que se encargan de regular a su vez la secreción de GnRH, de esta manera hay una comunicación constante entre hipotálamo, hipófisis y gónadas, mejor conocido como eje H-H-G, su regulación depende de una gran cantidad de eventos hormonales.

La expresión de Kiss1R es necesaria para hacer funcional al eje gonadotrópico. Diversos estudios han demostrado que la carencia total del receptor Kiss1R o bien de Kiss tienen efectos negativos en la maduración sexual. Individuos con mutaciones en los genes que codifican para el receptor Kiss1R tienen hipogonadismo y como características principales están gónadas pequeñas e inmaduras, así como carencia de vello facial, en el caso de los varones.

Si bien Kiss y Kiss1R han sido estudiados ampliamente a nivel de sistema nervioso central, en órganos periféricos solo se tiene conocimiento de su función en ovarios y testículos y poco se sabe acerca de la función que podría estar desempeñando en útero. Por otro lado, se sabe que el útero es un órgano importante en la maduración sexual, el cual se encuentra influenciado por la liberación de estrógenos por parte de los ovarios. Además, el útero a lo largo de la vida del sujeto sufre cambios histológicos, morfológicos y fisiológicos importantes que van desde prepararse para la primera ovulación hasta ser capaz de soportar un embarazo. De aquí la importancia de evaluar el desarrollo y el papel que Kiss1R tiene en el inicio de la pubertad y el desarrollo celular uterino.

## **HIPÓTESIS**

La administración del antagonista p-234 de Kiss1R en útero de ratas Wistar juveniles disminuye el desarrollo celular uterino al inicio de la pubertad.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general***

Evaluar la participación del receptor Kiss1R en el desarrollo uterino y su papel en el inicio de la pubertad de ratas hembra Wistar.

### ***Objetivos particulares***

1. Evaluar el efecto del antagonismo del Kiss1R sobre el inicio de la pubertad, determinando la edad de la PAV
2. Determinar el efecto del antagonismo del Kiss1R sobre los cambios morfológicos del útero en el grosor del endometrio, del miometrio, perimetrio y el número de glándulas endometriales a la edad de la PAV.
3. Evaluar el grosor de las fibras musculares del miometrio a la edad de la PAV.
4. Localizar y cuantificar la presencia del Kiss1R en útero a la edad de la PAV.

### 3. METODOLOGÍA

En esta sección se describe brevemente la metodología utilizada para la realización de la parte experimental de este trabajo. Los procedimientos de manejo, mantenimiento, cirugía y disección de los animales estuvieron bajo las especificaciones que establece la NOM-062-ZOO-1999 y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Así mismo, la sustentante acreditó el curso de manejo y cuidado de animales de laboratorio impartido por el Bioterio Claude Bernard.

#### ***3.1 Animales***

Se trabajó con 20 ratas hembra de la cepa Wistar, mantenidas con ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas, con alimento y agua a libre acceso en el Bioterio Claude Bernard de la BUAP. A los 10 días de edad, las ratas se dividieron aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales. Se formaron cuatro grupos, el grupo control (animales intactos; n=5), el grupo vehículo (administradas con 0.6 UI de solución Hartman; n=5), y dos grupos administrados con p-234 (Sal de Kisspeptina-234 trifluoroacetato Santa Cruz Biotechnology), con una dosis de  $1.297016861^{-6}mg/kg$  (concentración 1nM, n=5) y  $1.297016861^{-2}mg/kg$  (concentración 10nM, n=5).

#### ***3.2 Administración de la sal de Kisspeptina-234 trifluoroacetato (p-234)***

La administración tanto del vehículo como de las dos dosis de p-234 se realizó a los 24 días de edad (P24), mediante una cirugía en la región dorsal que consistió en la administración directa de éstas en el útero. Antes de la administración del vehículo o del p-234, las ratas recibieran una dosis de ketamina/xilacina (0.2 ml/100g) administradas por vía intraperitoneal, como anestésico. Después de la cirugía los animales se mantuvieron en observación hasta que recuperaron la conciencia y se regresaron al bioterio. Los días siguientes a la cirugía se revisaron y limpiaron las heridas con clorhexidina para evitar infecciones.

#### ***3.3 Eutanasia y obtención de los tejidos***

La eutanasia de los animales se realizó a la edad de la primera apertura vaginal (PAV), la cual se determinó mediante la observación de la presencia o ausencia de la membrana vaginal en las ratas. Para el procedimiento, se metió a los animales en una cámara de CO<sub>2</sub>, posteriormente se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina isotónica y paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PBS) y enseguida la disección de úteros.

### ***3.4 Tratamiento de los tejidos y análisis histológico***

Los tejidos obtenidos se almacenaron en paraformaldehído al 4% en PBS para completar la fijación. Después se deshidrataron e incluyeron en parafina para posteriormente hacer cortes histológicos con un grosor de 5µm, y finalmente realizar la tinción de Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Masson e inmunohistoquímica,

Para la medición de endometrio, miometrio, perimetrio y conteo de glándulas endometriales se tomaron aleatoriamente 10 campos de los diferentes cortes teñidos con H&E y se midieron con el software Motic Images plus 3.0. Por otro lado, con las muestras de la tinción tricromica de Masson se midieron fibras musculares usando el mismo programa.

### ***3.5 Localización por inmunohistoquímica de los receptores Kiss1R en el útero***

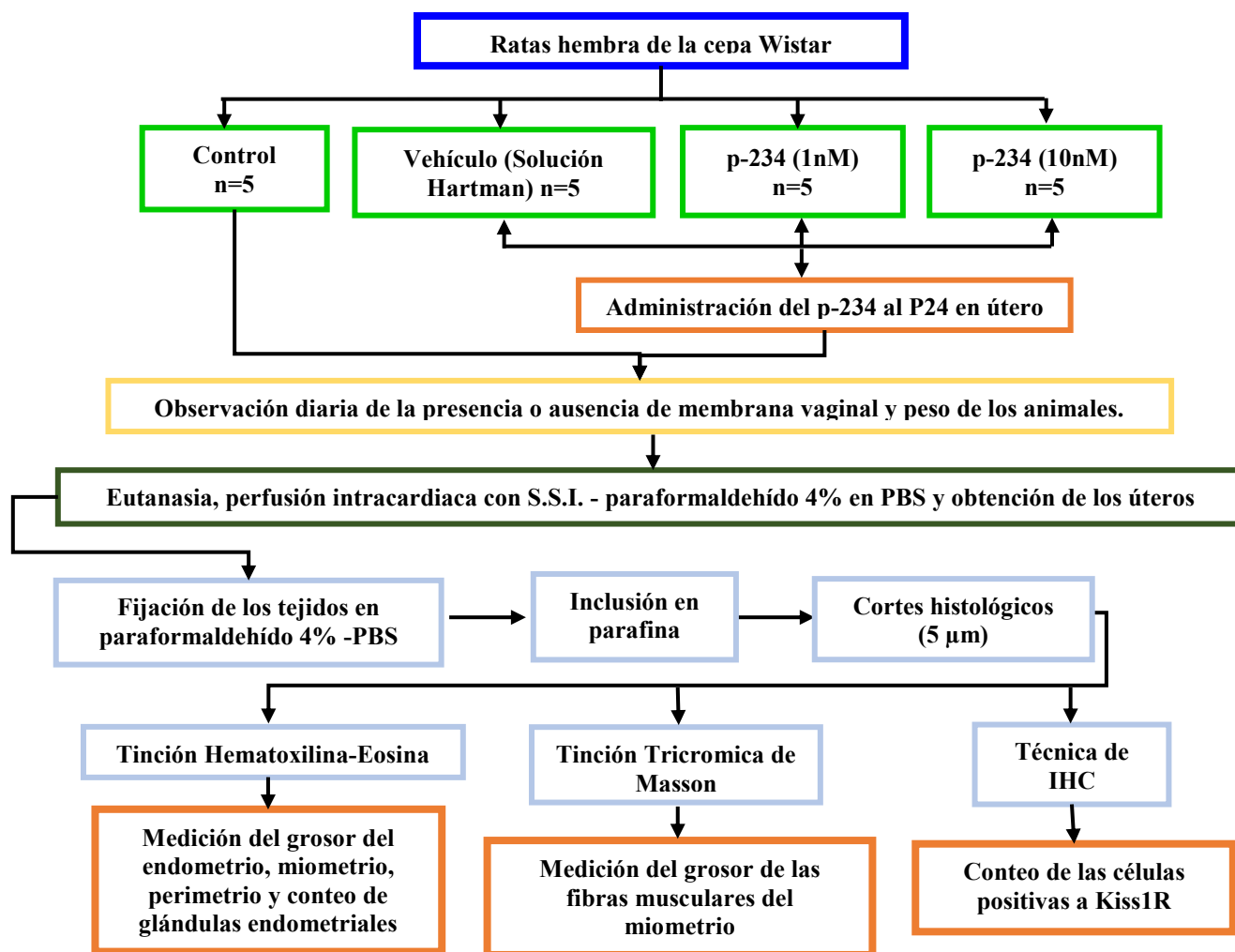
Los cortes histológicos se desparafinaron, hidrataron y lavaron con solución de PBS, posteriormente, la recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos (0.1 mM, pH=6). Los tejidos se permeabilizaron con PBS-Triton-100X al 2% y las proteínas se bloquearon con albúmina bovina libre de IgG al 0.5% en PBS-T. A continuación, los cortes histológicos se incubaron por 18 horas con el anticuerpo primario IgG de conejo policlonal anti-GPR54 (Santa Cruz, Biotechnology) (1:200), posteriormente por 2 horas a 4 °C con el anticuerpo secundario IgG de mono (H+L) anti-conejo acoplado a Texas Red (abcam) (1:400). Los núcleos de las células se marcaron con DAPI en Vecta Shield (1:100). La fluorescencia se detectó con un microscopio Leica DM100 que tiene acoplada una cámara con la que se tomaron fotografías con el programa ProgRes.

El conteo de células positivas a Kiss1R se realizó con la herramienta del “cell counter” del software NIH ImageJ, proceso para el que se tomaron 5 campos representativos y se consideraron a las células positivas a Kiss1R cuando se observó el núcleo azul con la periferia rosa.

### ***3.6 Análisis estadístico***

Para el estudio del grosor del endometrio, miometrio, perimetrio, glándulas endometriales y fibras musculares, los datos se sometieron a una prueba de ANOVA de una vía, seguida de U de Mann-Witney. De igual manera, se aplicaron dichas pruebas para el conteo de células Kiss1R positivas en útero. Dos grupos se consideraron diferentes cuando la probabilidad entre ellos fue \*p<0.05.

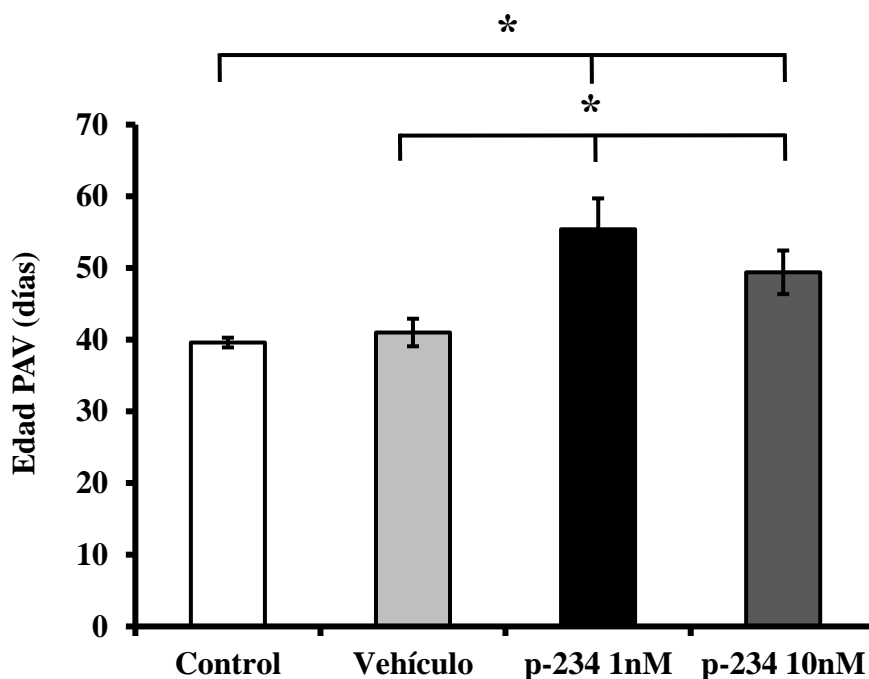
### 3.7 Diagrama de trabajo



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Edad de la primera apertura vaginal (PAV)

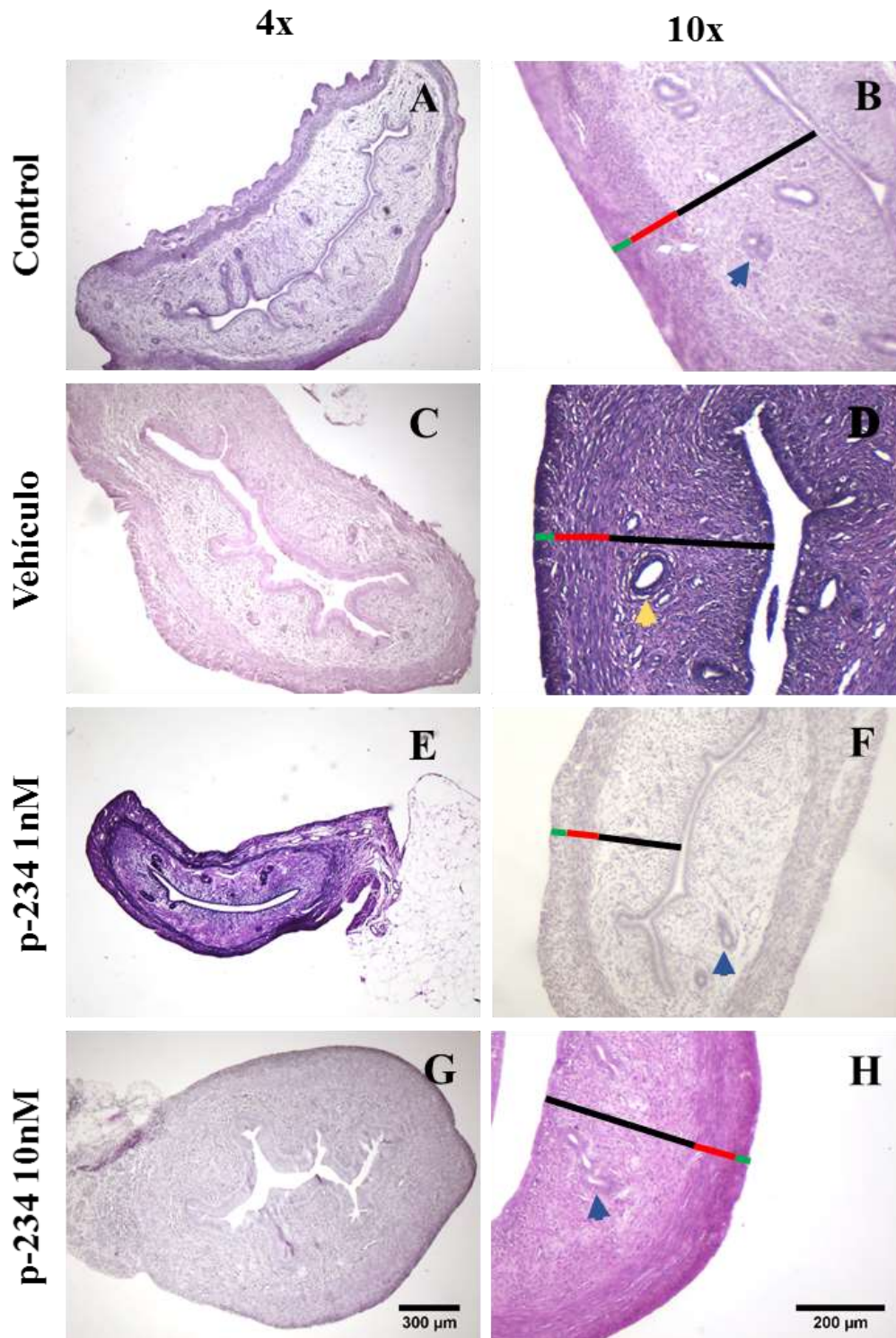
La PAV en las ratas del grupo Control fue a los  $39.6 \pm 0.67$  días y en las del grupo Vehículo se presentó a los  $41 \pm 1.92$  días, mientras que, en las ratas administradas con p-234 a concentración de 1nM y 10nM, se retrasó a  $55.4 \pm 4.30^*$  y  $49.4 \pm 3.04^*$  días, respectivamente, en comparación con el control y vehículo. \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney (Fig. 10).



**Fig. 10** Edad de primera apertura vaginal (PAV) de ratas Wistar del grupo Control□, Vehículo□, p-234 1nM■ y p-234 10nM■. Las barras representan el promedio ± EEM \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.

### 4.2 Análisis morfométrico de úteros de ratas administradas con p-234 a 1nM y 10nM

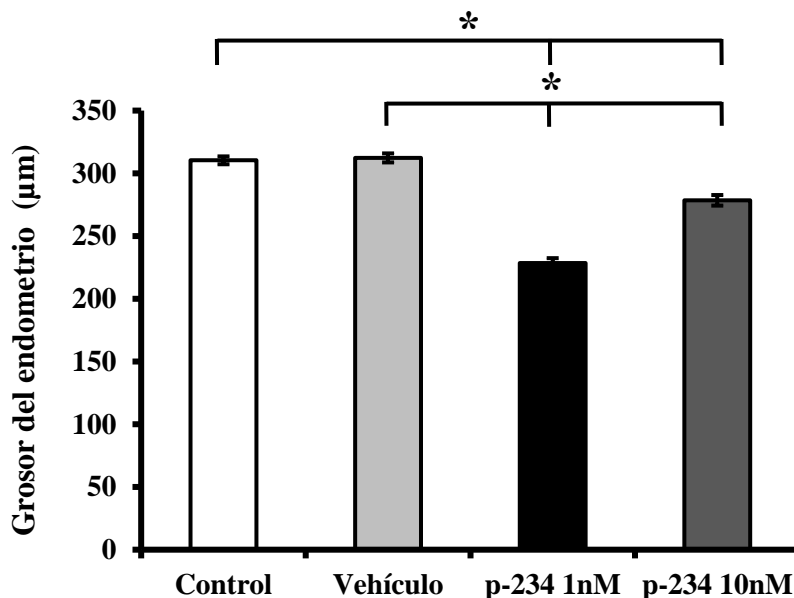
Para el análisis morfométrico se tomaron fotografías a 10x y se realizó la medición como se describe en la parte metodológica, a continuación, muestro un panel de microfotografías en donde se pueden observar las diferentes capas celulares que conforman el útero, de los grupos a la PAV. Posteriormente se encuentran las gráficas de los promedios de cada capa celular.



**Fig. 11** Cortes histológicos transversales del útero de rata Wistar a la edad de la PAV (Tinción Hematoxilina-Eosina). En A y B útero del grupo Control, C y D grupo Vehículo, E y F grupo administrado con p-234 (1nM) y, en G y H el grupo administrado con p-234 (10nM). Las líneas negras representan el grosor del endometrio, las rojas del miometrio y las verdes del perimetrio, mientras que las flechas señalan las glándulas uterinas.

## Endometrio

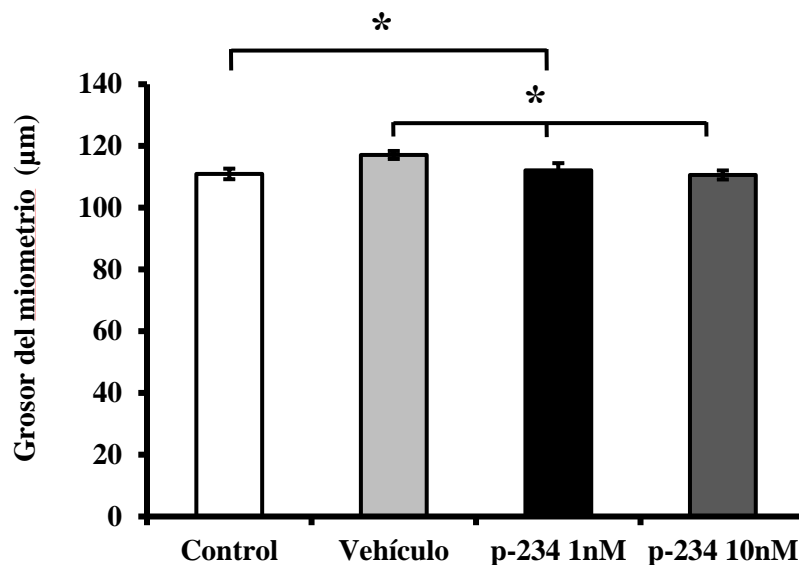
El análisis morfométrico del endometrio (Fig. 11), indicó que el grupo Control tiene un grosor  $310.36 \pm 3.14 \mu\text{m}$ , en tanto que el grupo Vehículo tiene  $312.28 \pm 3.60 \mu\text{m}$ , mientras que, para los animales administrados con p-234 a concentración de 1nM y 10nM se redujo el grosor del endometrio, quedando para el grupo p-234 1nM una longitud de  $228.48 \pm 3.90^* \mu\text{m}$  y para p-234 10nM una de  $278.48 \pm 4.22^* \mu\text{m}$ , significativamente, menor respecto al grupo Control y Vehículo.  $* < p 0.05$ , prueba ANOVA post U-Mann-Whitney (Fig. 12).



**Fig. 12** Grosor del endometrio uterino de ratas Wistar a la edad de la PAV de los grupos Control  $\square$ , y Vehículo  $\blacksquare$ , p-234 1nM  $\blacksquare$  y p-234 10nM  $\blacksquare$ . Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM  $* < p 0.05$ , prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.

## Miometrio

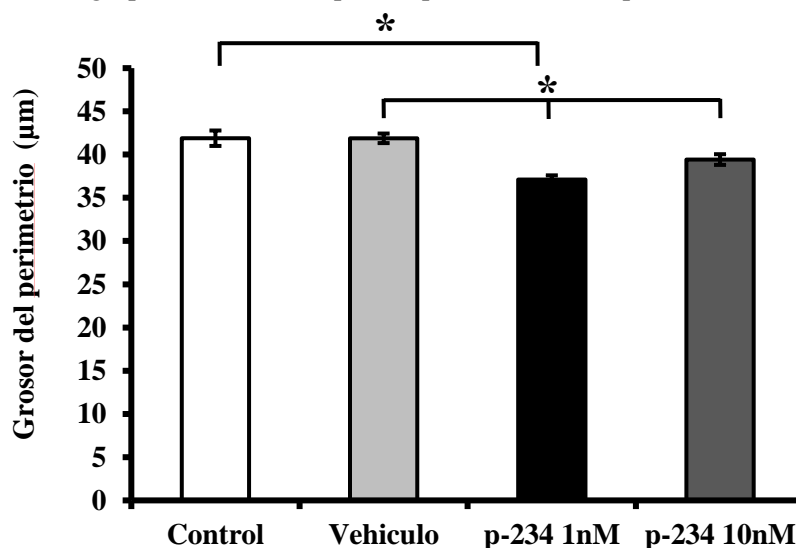
El grosor del miometrio a la PAV de los grupos Control y Vehículo fue de  $110.95 \pm 1.71 \mu\text{m}$  y  $117.10 \pm 1.29 \mu\text{m}$ , respectivamente, mientras que hubo una disminución en el grosor del grupo p-234 1nM con un promedio de  $112.10 \pm 2.33^* \mu\text{m}$ , siendo diferente a los dos primeros. Para el grupo p-234 10nM fue de  $110.61 \pm 1.45^* \mu\text{m}$ , teniendo una diferencia significativa respecto al grupo Vehículo.  $* < p 0.05$ , prueba ANOVA post U-Mann-Whitney (Fig. 13).



**Fig. 13** Grosor del miometrio uterino de ratas Wistar a la edad de la PAV de los grupos Control □, y Vehículo □, p-234 1nM ■ y p-234 10nM ■. Las barras representan el promedio ± EEM \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.

### *Perimetrio*

En el caso del perimetrio, el grosor del grupo Control y Vehículo ( $41.90 \pm 0.90 \mu\text{m}$  y  $41.88 \pm 0.55 \mu\text{m}$ , respectivamente) fue significativamente mayor al de p-234 1nM ( $37.11 \pm 0.48^* \mu\text{m}$ ). Por otro lado, se registró que el grosor del perimetrio para el grupo p-234 10nM ( $39.42 \pm 0.62^* \mu\text{m}$ ) fue menor respecto al grupo vehículo. \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney (Fig. 14).



**Fig. 14** Grosor del perimetrio uterino de ratas Wistar a la edad de la PAV de los grupos Control □, y Vehículo □, p-234 1nM ■ y p-234 10nM ■. Las barras representan el promedio ± EEM \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.

### Conteo de glándulas endometriales de ratas administradas con p-234 a 1nM y 10nM

El número de glándulas uterinas para los grupos Control y Vehículo ( $2.67 \pm 0.17$  y  $2.39 \pm 0.13$ , respectivamente) fue mayor en comparación con p-234 1nM ( $1.89 \pm 0.08^*$ ) y p-234 10nM ( $1.84 \pm 0.10^*$ ). \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney (Fig. 15).

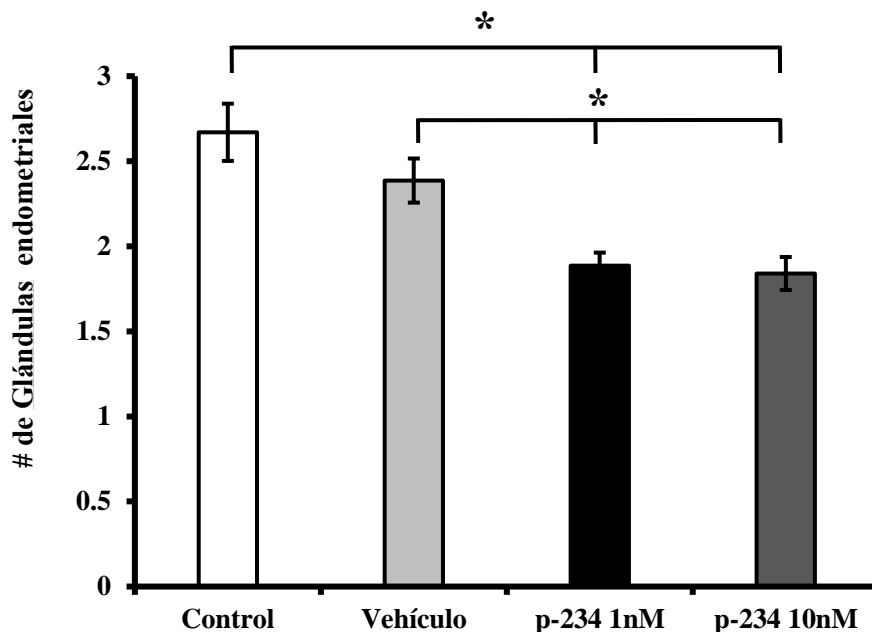
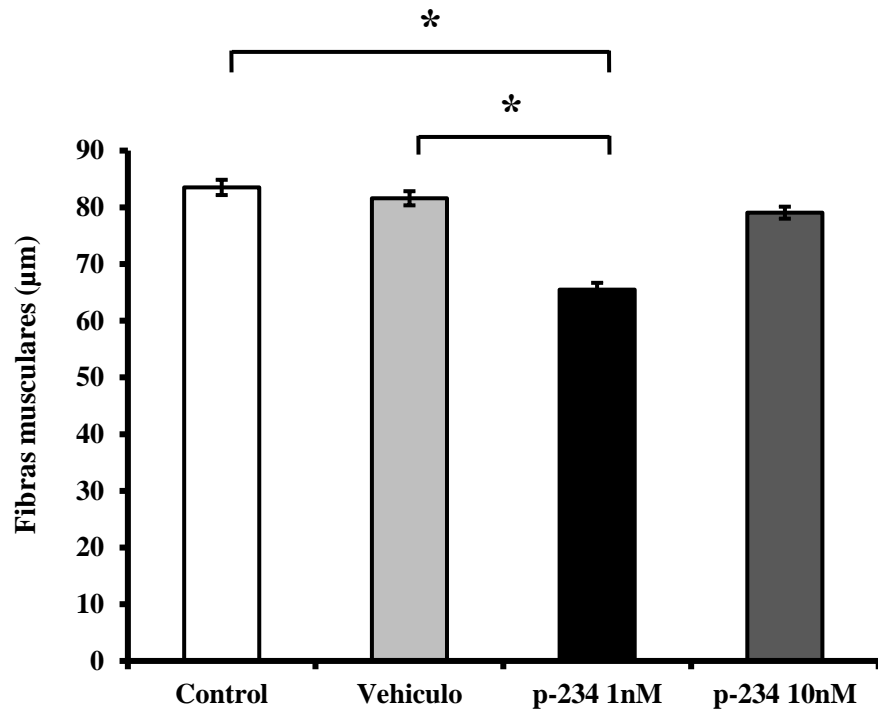


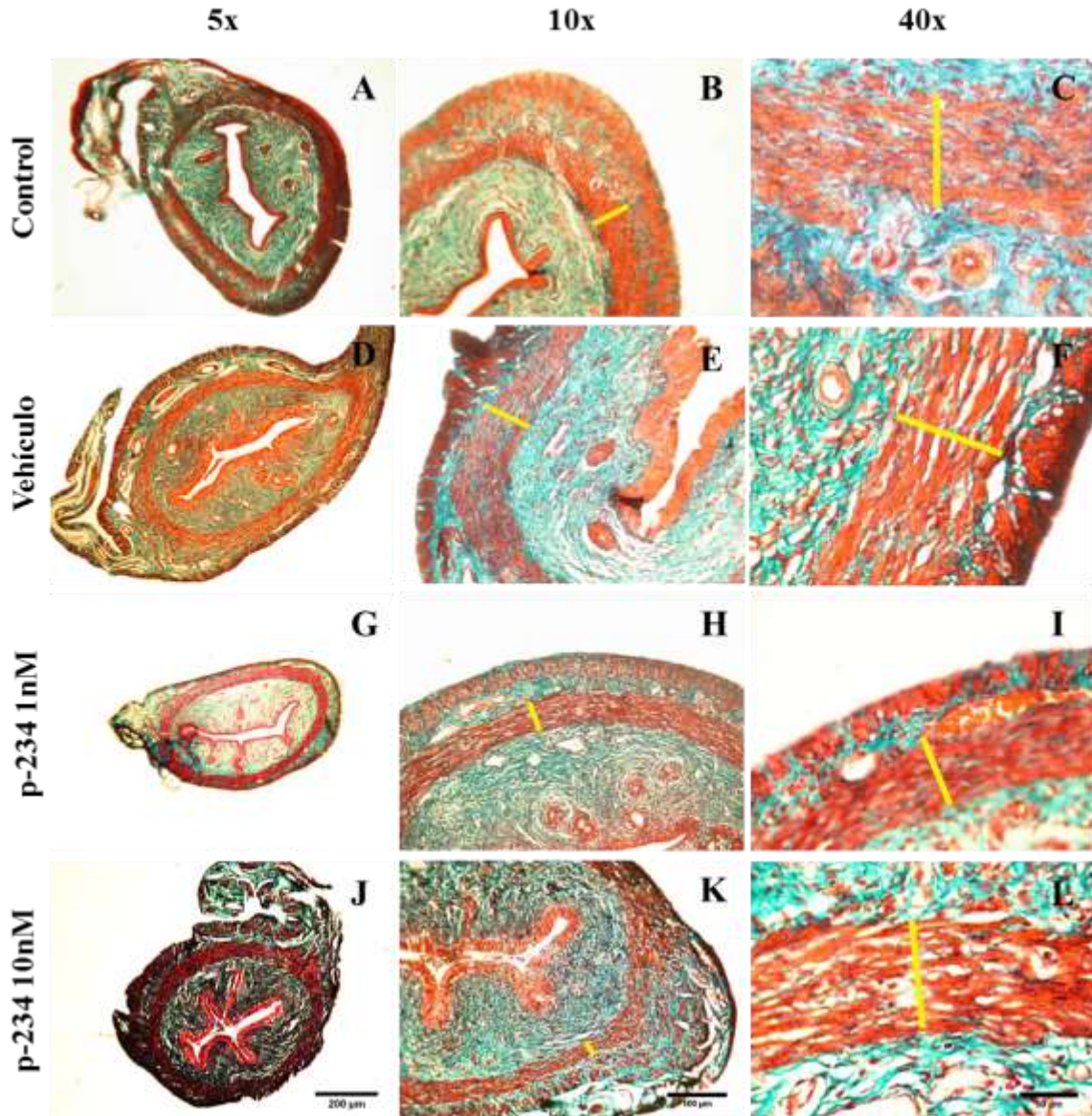
Fig. 15 Número de glándulas uterinas por campo a la edad de la PAV de los grupos Control □, y Vehículo □, p-234 1nM ■ y p-234 10nM ■. Las barras representan el promedio ± EEM \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.

### 4.3 Grosor de las fibras musculares del miometrio de ratas administradas con p-234 1nM y 10nM

La medición del grosor de las fibras musculares (Fig. 17) en los diferentes grupos mostró que no hay diferencia entre el grupo Control y Vehículo ( $41.89 \pm 0.89 \mu\text{m}$  y  $41.88 \pm 0.55 \mu\text{m}$ , respectivamente), sin embargo, sí la hubo respecto al grupo p-234 1nM ( $37.11 \pm 0.48^* \mu\text{m}$ ), mientras que el grupo p-234 10nM no mostró variación significativa ( $39.42 \pm 0.62 \mu\text{m}$ ). \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney (Fig. 16).



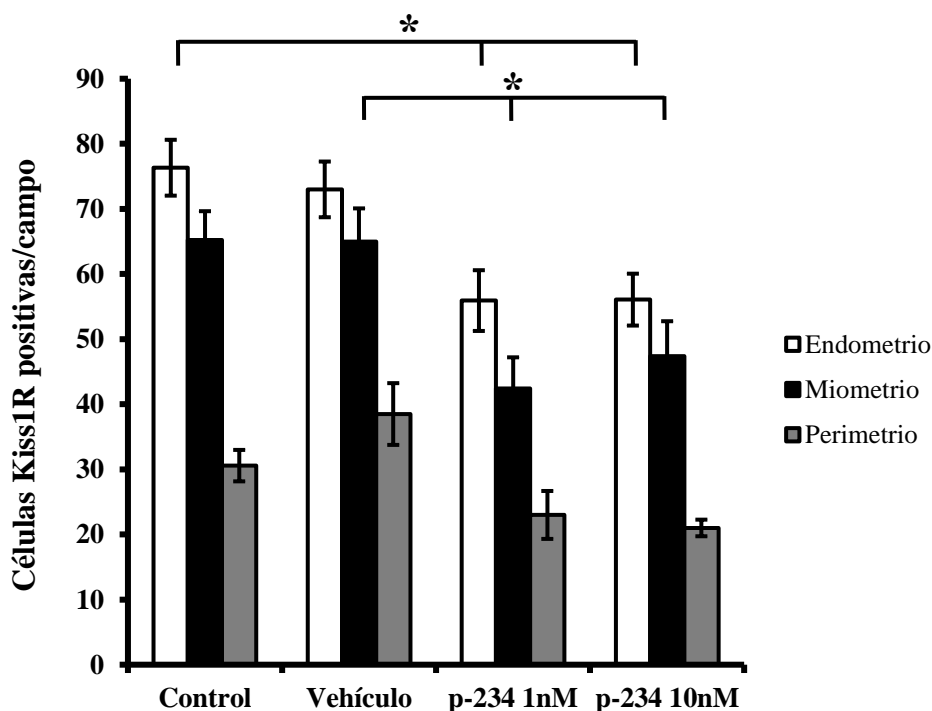
**Fig. 16** Grosor de las fibras musculares del miometrio uterino de ratas Wistar a la edad de la PAV de los grupos Control $\square$ , y Vehículo $\square$ , p-234 1nM $\blacksquare$  y p-234 10nM $\blacksquare$ . Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.



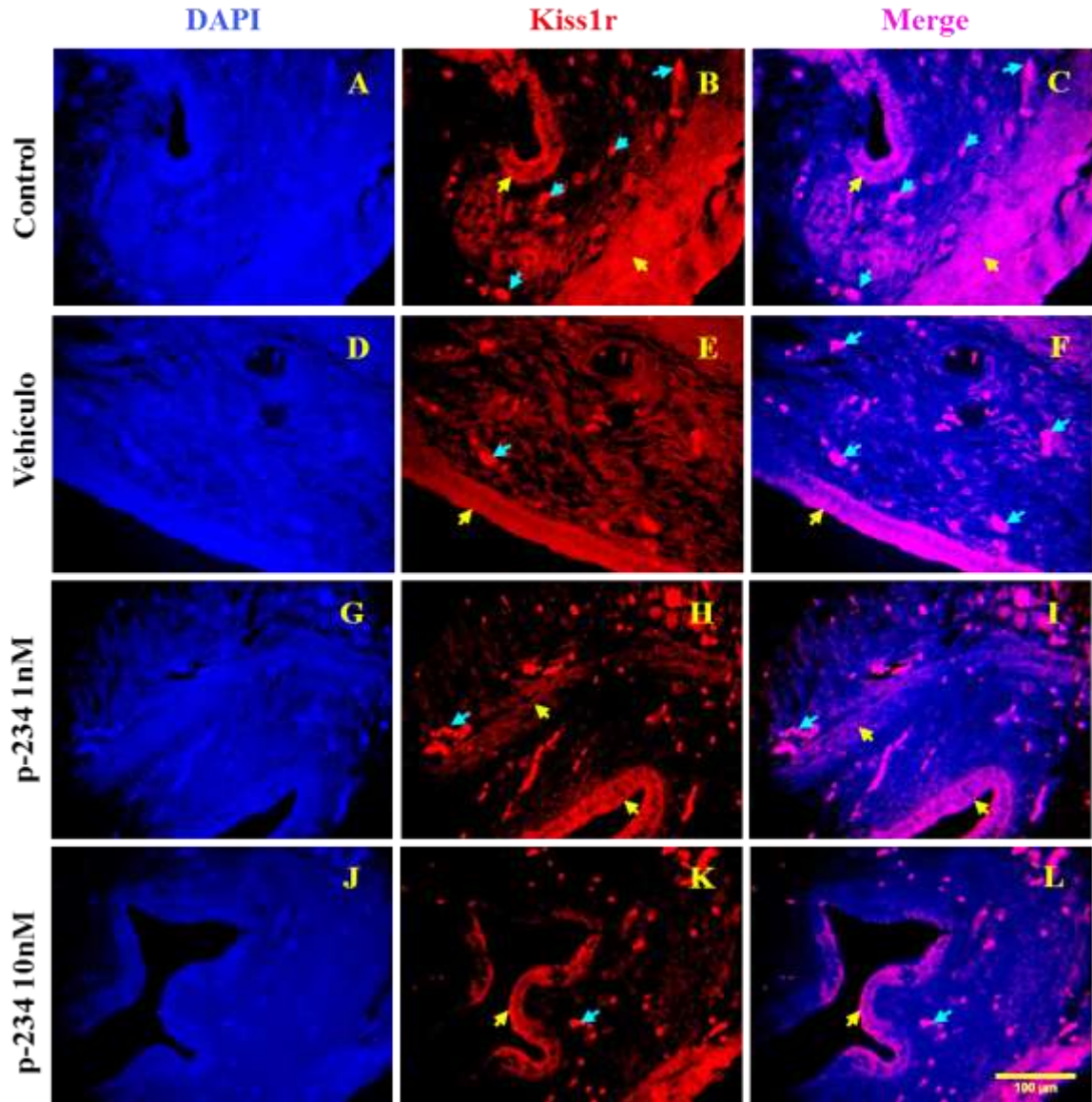
**Fig. 17** Cortes histológicos transversal del útero de rata Wistar a la edad de la PAV (Tinción Tricromica de Masson). De A-C útero del grupo Control, D-F grupo vehículo, G-I grupo administrado con p-234 (1nM) y J-L el grupo administrado con p-234 (10nM). Las líneas amarillas representan el grosor de las fibras musculares.

#### 4.4 Conteo de células positivas a Kiss1R en útero de ratas administradas con p-234 1nM y 10nM

El conteo de las células positivas a Kiss1R (Fig. 19) determinó que en el endometrio los valores para el grupo control y vehículo fueron de  $76.33 \pm 4.29$  y  $73 \pm 4.28$ , respectivamente, mientras que para los grupos p-234 1nM y p-234 10nM son de  $55.92 \pm 4.66^*$  y  $56.07 \pm 3.98^*$ , significativamente menores a los dos primeros. En el miometrio, se observaron resultados similares puesto que el número de células positivas a Kiss1R en el grupo control y vehículo ( $65.21 \pm 4.43$  y  $65 \pm 5.08$ , respectivamente) son mayores que los del grupo p-234 1nM ( $42.42 \pm 4.79^*$ ) y p-234 10nM ( $47.4 \pm 5.35^*$ ). En el caso del perimetrio se observó que hay una disminución de células Kiss1R positivas en el grupo p-234 10nM ( $21 \pm 1.27^*$ ) respecto al grupo control y vehículo ( $30.57 \pm 2.41$  y  $38.5 \pm 4.74$ , respectivamente) en tanto que para el grupo p-234 1nM ( $23 \pm 3.68$ ) no se observó diferencia significativa respecto al Control, pero si para el Vehículo. \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney (Fig. 18).



**Fig. 19** Conteo de células positivas a Kiss1R en útero de ratas Wistar a la edad de la PAV de los grupos Control □, y Vehículo □, p-234 1nM ■ y p-234 10nM ■. Las barras representan el promedio  $\pm$  EEM \* < p 0.05, prueba ANOVA post U-Mann-Whitney.



**Fig. 20** Inmunohistoquímica de los receptores Kiss1R en células del útero de rata Wistar de los grupos Control, Vehículo, p-234 1nM y p-234 10nM (n=5) a la edad de la PAV. En la primera columna, los núcleos están en azul, marcados con DAPI (A, D, G y J). En la segunda columna, los receptores Kiss1R están en rojo y fueron marcados con Texas-Red (B, E, H y K) y en la tercera columna se presenta el merge (colocalización) (C, F, I y L). Las flechas amarillas indican cuales son las células positivas a Kiss1R, mientras que las flechas azules muestran marcas inespecíficas que no se tomaron en cuenta.

## Discusión de resultados

El útero es un órgano clave en la reproducción de los mamíferos que sufre diversos cambios a lo largo de la vida del sujeto, como lo es el inicio de la pubertad. El desarrollo de este órgano es esencial para iniciar la maduración sexual.

En la maduración del útero se ven involucradas diversas hormonas, como los estrógenos y la prolactina, que contribuyen a la proliferación celular del tejido epitelial glandular y luminal, además de factores de crecimiento como el FGF-7, FGF-10, HGF, IGF-I que están involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular en conjunto con los estrógenos (Gray, et al. 2001), así como factores neurotróficos como el NGF, BDNF y sus receptores TrkA y p75 que contribuyen a un desarrollo adecuado del útero (Latini, et al. 2008).

En los últimos años se ha demostrado que la señalización Kiss-Kiss1R es vital para el desarrollo del útero. La ausencia parcial o total de Kiss o Kiss1R causa disminución del tamaño y funciones, es decir hipoplasia uterina (Funes, et al. 2003; D'Anglemont, et al. 2007).

Este estudio muestra que el bloqueo de los receptores Kiss1R con p-234 ocasiona el retraso de la PAV. Además de que la disminución del endometrio, miometrio y glándulas uterinas, sugieren la participación de Kiss1R en la proliferación celular.

Mediante IHC, se localizó el receptor Kiss1R en epitelio luminal y glandular; dichos grupos celulares son importantes para el crecimiento del útero, pues aquí es donde se sintetiza y secreta una compleja gama de proteínas como enzimas, factores de crecimiento, citoquinas, linfoquinas, hormonas y proteínas de transporte (glicodelina)

Es importante mencionar que la mayor expresión de ARNm de Kiss1R ocurre entre P8-P15 (Funes, et al. 2003), que coinciden con la formación de glándulas uterinas (Gray, et al. 2001), además de que hay incremento en la concentración estrogénica en estos días, lo cual es importante dado que estudios realizados por Zhang, et al. (2014), sugieren que la expresión de Kiss en útero está regulada positivamente por estradiol, aunque León, et al. (2016) han mostrado que la administración de este no es suficiente para recuperar la función endometrial y glandular en un 100%.

Sin embargo, aún no está claro el mecanismo por el cual podría llevarse a cabo esta regulación en útero. Los datos anteriores sustentan los resultados obtenidos en este trabajo, dejando claro que la presencia de Kiss1R es indispensable para la maduración uterina.

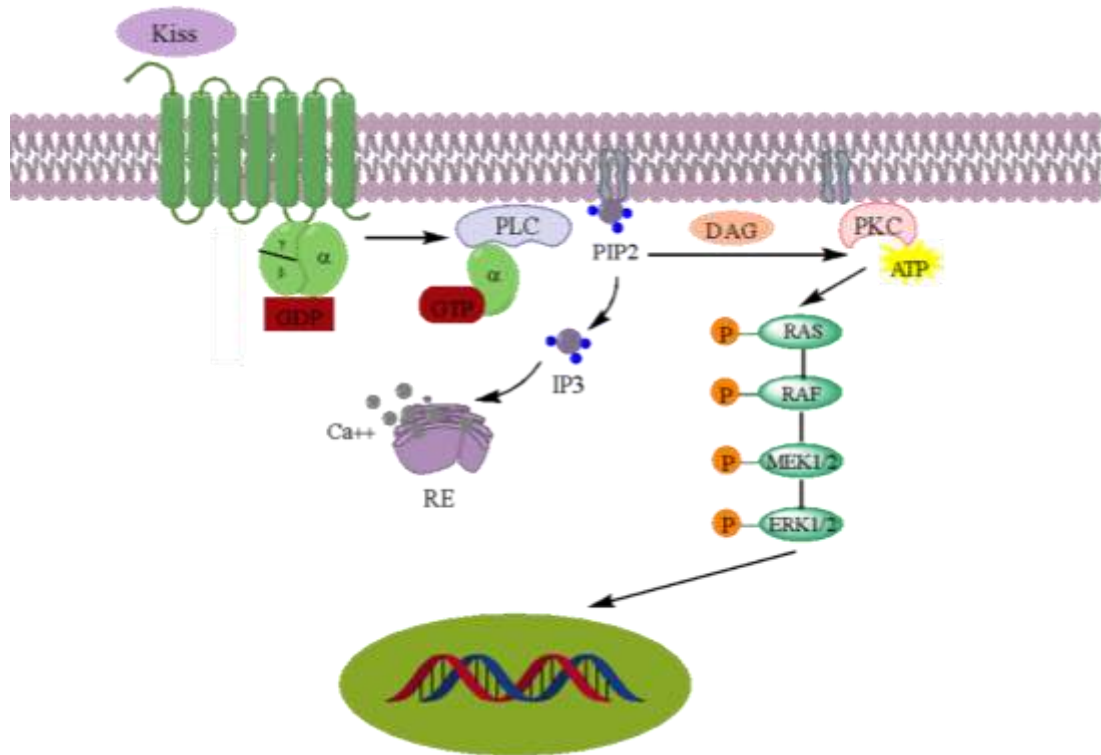
La investigación evidenció que el grosor de las fibras musculares se vio reducido en los animales administrados con p-234 1nM y, correlacionando los datos obtenidos con la IHC en donde también se localizó al receptor Kiss1R en miometrio, se observó una disminución en la expresión del receptor, por lo que se determinó que hay una relación directa entre la reducción de fibras musculares

y la expresión de Kiss1R, sugiriendo que Kiss1R modula positivamente el crecimiento de las fibras musculares.

Lo anterior debido a que el miometrio recibe inervación simpática, parasimpática y sensorial de los segmentos espinales L2-L4, además de que se ha encontrado que en los ganglios de la raíz dorsal de L4/L5 hay expresión de Kiss y Kiss1R y coexpresan con NF-200, IB4 y CGPR (Mi, et al., 2009). Dado que las neuronas positivas a CGRP son de tipo sensorial, productoras de NGF y BDNF, importantes para el desarrollo de fibras nerviosas, podemos proponer que la disminución del tejido muscular es causada por la disminución de la expresión de Kiss1R puesto que en cultivos celulares de hipocampo se ha observado que Kiss incrementa los niveles de BDNF por lo cual es probable que Kiss tenga este mismo efecto en útero (Arai & Orwing, 2008).

Por otro lado, se ha mostrado que Kiss-Kiss1R participan en la regulación de la sensibilidad al dolor, puesto que la administración de Kiss provoca hiperalgesia y activa la fosforilación en la Ser800 del TRPV1, evento clave en los mecanismos de sensibilización nociceptiva periférica (Spampinato, et al., 2011). La activación de TRPV1 mediante Kiss es importante puesto que estudios de Alatraste et al. (2013) señalan que este receptor es fundamental para el desarrollo ovárico y uterino, además de plantear una vía de señalización sensorial de estos órganos hacia el hipotálamo.

Todo lo anterior nos lleva a proponer que hay una señalización de Kiss-Kiss1R, de manera periférica, de útero a hipotálamo y que la disminución de Kiss1R y de fibras musculares, provocado por la administración de p-234, indican que la comunicación entre útero e hipotálamo a través de las fibras sensoriales se ve disminuida provocando así el retraso de la PAV.



**Mecanismo de activación del Kiss1R en útero.** Cuando Kiss se une a Kiss1R la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gq/11 fosforilada activa a la fosfolipasa C (PLC- $\beta$ ), que conduce a la activación de segundos mensajeros incluida la hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5, bifosfato (PIP2), habiendo así una acumulación de inositol (1,4,5) trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Posteriormente el IP3 libera el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) almacenado en el retículo endoplasmático liso (REL) mediante su unión a receptores que son canales de calcio regulados por ligando. Por otro lado la activación de la proteína quinasa C (PKC) activa a Ras para reclutar y activar Raf en la membrana plasmática por fosforilación en múltiples sitios dando lugar a MEK1/2 que después se fosforila en dos residuos de serina que posteriormente fosforilan ERK1/2. ERK1/2 activado fosforila RSK y tanto RSK como ERK se translocan al núcleo donde activan múltiples factores de transcripción que finalmente producen una síntesis de proteínas efectoras y causan cambios en la proliferación celular y la supervivencia.

## CONCLUSIONES

- El antagonismo de Kiss1R retrasa el inicio de la pubertad
- Kiss1R participa en el desarrollo morfológico uterino
- Estos resultados muestran que Kiss1R participa en el inicio de la pubertad y el desarrollo morfológico uterino en ratas wistar hembras

## REFERENCIAS

- Alatríste, V., Herrera-Camacho, I., I. Martínez, M., D. Limón, I., González-Flores, O. & Luna, F. (2013). Sensory denervation with capsaicin reduces ovarian follicular development and delays the onset of puberty in guinea pigs. *Advances in Reproductive Sciences*, 1, 29-37. <http://dx.doi.org/10.4236/arsci.2013.13005>
- Andersson, H. (2008). Clinical Reproductive Endocrinology. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 21, 635-662. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370491-7.00021-0>
- Arai, A. C. & Orwig, N. (2008). Factors that regulate KiSS1 gene expression in the hippocampus, *Brain Research*. 1243 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.031>
- Brauer, M. M. & Smith, P. G. (2015). Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 187, 1–17. <http://doi.org/10.1016/j.autneu.2014.11.009>
- Brinkman, J. E. & Sharma, S. (2018). Physiology: Growth Hormone. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482141/>
- Castellano, J. M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V. M., Bellido, C., Dieguez, C., Aguilar, E., Sánchez-Criado, J. E., Pellicer, A., Pinilla, L., Gaytan, F., & Tena-Sempere, M. (2006). Expression of KiSS-1 in Rat Ovary: Putative Local Regulator of Ovulation? *Endocrinology*, 147(10), 4852–4862. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0117>
- Chaudhry, R. & Chaudhry, K. (2018). Anatomy: Pelvis, Uterus, Arteries, Uterine. StatPearls. Treasure Island (FL): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482267/>
- Chou, H. S. & Mantzoros, C. (2014). 20 years of leptin: Role of leptin in human reproductive disorders. *J Endocrinol*. 223 (1) T49-T62. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0245>
- D' Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L. A., Dixon, J. P. C., Day, K., Leitch, H. G., Hendrick, A. G., ... Colledge, W. H. (2007). Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional *Kiss1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (25), 10714–10719. <http://doi.org/10.1073/pnas.0704114104>
- Das, N. & Kumar, R. (2018). Molecular Regulation of Follicle-Stimulating Hormone Synthesis, Secretion and Action. *Journal of Molecular Endocrinology*. doi 10.1530%2FJME-17-0308
- Donato, J. Jr., Cravo, R. M., Frazao, R., Gautron, L., Scott, M. M., Lachey, J., Castro, I. A., Margatho, L. O., Lee, S., Lee, C. & et al. (2011). Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in *Kiss1* neurons. *Journal of Clinical Investigation* 121 355–368. doi:10.1172/JCI45106
- Elias, C.F. (2012). Leptin action in pubertal development: recent advances and unanswered questions. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 23 9–15. doi: 10.1016/j.tem.2011.09.002
- El Majdoubi, M., Sahu, A., Ramaswamy, S., & Plant, T. M. (2000). Neuropeptide Y: A hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 6179-84. doi: 10.1073/pnas.090099697

- Funes, S., Hedrick, A. J., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, S. F. & Gustafson L. E. (2003). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312 1357–1363. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.066
- Gaytán, F., Gaytán, M., Castellano, J. M., Romero, M., Roa, J., Aparicio, B., Garrido, N., Sánchez-Criado, J. E., Millar, R. P., Pellicer, A., Fraser, H. M., & Tena-Sempere, M. (2009). KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *The American Physiological Society*, 296 (3), E520-E531. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90895.2008>
- Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., Seminara, S., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2006). A Role for Kisspeptins in the Regulation of Gonadotropin Secretion in the Mouse. *Endocrinology*, 145 (9), 4073-4077. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0431>
- Granada, Y. M. L. (2006). Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte. *Endocrinol Nutr*. 53(7) 467-75. doi: 10.1016/S1575-0922(06)71133-0
- Heger, S. (2016). Neuroendokrine Regulation der Pubertät und ihre Störungen. *Gynäkologische Endokrinologie*, 14 (4) 233–238. <https://doi.org/10.1007/s10304-016-0091-1>
- Gray, C. A., Bartol, F. F., Tarleton, B. J., Wiley, A. A., Johnson, G. A., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. (2001). Developmental Biology of Uterine Glands. *Biology of Reproduction*, 65 (5), 1311–1323. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1311>
- Kauffman, A. S., Clifton, D. K., Steiner, R. A. (2007). Emerging ideas about kisspeptin– GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends in neurosciences*, 30 (10), 504-511. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.08.001>
- Kotani, M., Dethoux, M., Vandenberghe, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., Brézillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S. N., Vassart, G., & Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631–34636. <http://doi: 10.1074/jbc.M104847200>
- Latini, C., Frontini, A., Morroni, M., Marzioni, D., Castellucci, M., & Smith, P. G. (2008). *Cell Tissue Res* 334: 1. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0657-x>
- León, S., Sul, A., Sull, J., Calder, M., HAYashi, K., Bhattacharya, M., Power, S., Vilos, A. G., Vilos, G. A., Tena-Sempere, M., & Babwah, V. A. (2016). Beyond the brain-Peripheral kisspeptin signaling is essential for promoting endometrial gland development and function. *Scientific Reports*, 6: 29073. <https://doi:10.1038/srep29073>
- Maeda, K., Ohkura, S. & Tsukamura, H. (2000). Physiology of reproduction. The laboratory Rat. 145-176
- Maffucci, J. A., & Gore, A. C. (2009). Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle: Gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 274, 69. [http://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)02002-9](http://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)02002-9)

- Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., & Ohtaki, T. (2004). Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(2), 383-388. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.18513>.
- Mi, W. L., Mao-Ying, Q. L., Liu, Q., Wang, X.W., Li, X., Wang, Y.Q., & Wu, G. C. (2009). The distribution of kisspeptin and its receptor GPR54 in rat dorsal root ganglion and up-regulation of its expression after CFA injection. *Brain Research Bulletin*, 78 (1-5), 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.12.003>
- Mossman, H. W. (1977). Comparative Anatomy. Biology of the Uterus. Elizabeth M. Ramsey (auth.), Ralph M. Wynn (eds.)-Biology of the Uterus-Springer US (1977) (1)19-34
- Navarro, V., Fernández-Fernández, R., Castellano, J., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M., ... Tena-Sempere, M. (2004). Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *The Journal of Physiology*, 561(Pt 2), 379–386. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072298>
- Oakley, A. E., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2009). Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews*, 30(6), 713–743. <http://doi.org/10.1210/er.2009-0005>
- Terasawa, E., & Ojeda, S. R. (2010). Neuroendocrine regulation of puberty. In *Hormones, Brain and Behavior Online* (pp. 2035-2113). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-008088783-8.00064-4
- Ojeda, S., Lomniczi, A. & Sandau, U. (2010). Contribution of glial-neuronal interactions of the neuroendocrine control of female puberty. *Eur J Neurosci*. 32 (12) 2003-10. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07515.x.
- Pérez, M. M.; Romano, P. M.C. (1996). Interacción neuroendócrina en el útero: papel de las hormonas esteroides sexuales. *Ciencia veterinaria*. Ed. Ricardo Moreno Chan. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pita, J., Barrios, V., Gavela-Pérez, T., Martos-Moreno, G. Á., Muñoz-Calvo, M. T., Pozo, J., Rovira, A., Argente, J., & Soriano-Guillén, L. (2011). Circulating kisspeptin levels exhibit sexual dimorphism in adults, are increased in obese prepubertal girls and do not suffer modifications in girls with idiopathic central precocious puberty. *Peptides*, 32(9), 1781-1786. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.07.016>
- Popa, S. M., Clifton, D. K., Steiner, R. A. (2008). The Role of Kisspeptins and GPR54 in the Neuroendocrine Regulation of Reproduction. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 213-238. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100540>
- Richards, J. S. & Ascoli, M. (2018). Endocrine, Paracrine, and Autocrine Signaling Pathways That Regulate Ovulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. doi 10.1016%2Fj.tem.2018.02.012
- Ricu, M. A., Ramirez, V. D., Paredes, A. H., & Lara, H. E. (2012). Evidence for a Celiac Ganglion-Ovarian Kisspeptin Neural Network in the Rat: Intraovarian Anti-Kisspeptin Delays Vaginal Opening and Alters Estrous Cyclicity. *Endocrinology*, 153(10), 4966–4977. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1279>

- Rogers, P. A. & Gannon, B. J. (1981). The vascular and microvascular anatomy of the rat uterus during the oestrous cycle. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 59, 667–679.
- Roseweir, A. K., Kauffman, A. S., Smith, J. T., Guerriero, K. A., Morgan, K., Pielecka-Fortuna, J., ... Millar, R. P. (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(12), 3920–3929. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5740-08.2009>
- Spampinato, S., Trabucco, A., Biasiotta, A., Biagioni, F., Cruccu, G., Copani, A., Colledge, W. H., Sortino, M. A., Nicoletti, F., ... Chiechio, S. (2011). Hyperalgesic activity of kisspeptin in mice. *Molecular pain*, 7, 90. doi:10.1186/1744-8069-7-90
- Shirasuna, K., & Iwata, H. (2017). Effect of aging on the female reproductive function. *Contraception and Reproductive Medicine*, 2, 23. <http://doi.org/10.1186/s40834-017-0050-9>
- Smith, T. J., Clifton, K. D., & Steiner, A. R. (2006). Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction*, 131 (4) 623-630. <http://doi:10.1530/rep.1.00368>
- Sosa-Stanley J.N. & Bhimji S. S. (2017). Anatomy, Pelvis, Uterus. StatPearls. Treasure Island (FL). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470297/>
- Srinivasan, V., Spence, W. D., Pandi-Perumal, S. R., Zakharia, R., Bhatnagar, K. P. & Brzezinski, A. (2009). Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone, *Gynecological Endocrinology*, 25:12, 779-785, doi: 10.3109/09513590903159649
- Tena-Sempere, M. (2012). ENDOCRINOLOGY AND ADOLESCENCE: Deciphering puberty: novel partners, novel mechanisms. *Eur J Endocrinol.* 167 733-747. doi: 10.1530/EJE-12-0669
- Terasawa, E. & Kurian, R. J. (2012). Neuroendocrine Mechanism of Puberty. *Handbook of Neuroendocrinology*, 433-466, doi: 10.1016/B978-0-12-375097-6.10019-8
- Terasawa, E. (2005). Role of GABA in the Mechanism of the Onset of Puberty in Non-Human Primates. *International Review of Neurobiology*, 71, 113–129.
- Toro, A. C., Aylwin, F. C., & Lomniczi, A. (2018). Hypothalamic Epigenetics Driving Female Puberty. *Journal Neuroendocrinolog.* Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/jne.12589
- Yamasaki, M., Kuwahara, A., Iwasa, T., Yamamoto, Y., Taniguchi, Y., Yano, Y., Matsui, S., Matsuzaki, T., & Irahara, M. (2017). Development-related changes in the expression of the ovarian Kiss1 and Kiss1R genes and their sensitivity to human chorionic gonadotropin in prepubertal female rats. *The Journal of Reproduction and Development*, 63(4), 409–414. <http://doi.org/10.1262/jrd.2016-179>
- Zhang, P., Tang, M., Zhong, T., Lin, Y., Zong, T., Zhong, C., Zhang, B., Ren, M. & Kuang, H. (2014). Expression and function of kisspeptin during mouse decidualization. *PLoS ONE* 9 e97647. doi:10.1371/journal.pone.0097647