



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
Facultad en Ciencias Químicas
Posgrado en Ciencias Químicas
Área de Bioquímica y Biología Molecular

Maestría en Ciencias Químicas

Tesis para obtener el grado de maestra en Ciencias

**“Evaluación de los receptores Kiss1r en el útero
de ratas Wistar puberales”**

Presenta

Q.F.B. Joaquina De la Rosa Priego

Directores de Tesis

Dr. Victorino G. S. Alatraste Bueno
Laboratorio de Neuroendocrinología FCQ-BUAP

Dra. Liliana Martínez Mendieta
Laboratorio de Neuroquímica FCQ-BUAP

H. Puebla de Zaragoza, Diciembre de 2022

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (Periodo 2020-2022).

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neuroendocrinología, FCQ-BUAP bajo la dirección del Dr. Victorino G.S. Alatraste Bueno y la Dra. Liliana Martínez Mendieta a quienes agradezco su apoyo durante el desarrollo de esta tesis. Al Dr. Alan Carrasco Carballo por su apoyo en la realización del análisis *in silico* de esta tesis.

Al jurado revisor de la tesis la Dra. María Isabel Martínez García, el Mto. Félix Luna Morales y la Dra. Victoria Palafox Sánchez por su tiempo y sugerencias para la revisión de esta tesis.

ÍNDICE

1.1	Desarrollo posnatal uterino en mamíferos	1
1.1.1	Desarrollo posnatal uterino en roedores	2
1.1.2	Desarrollo de glándulas uterinas (adenogénesis).....	3
1.2	Sistema Kiss1/Kiss1r	4
1.2.1	Sistema Kiss1/Kiss1R en el útero.....	6
1.2.2	Bioquímica del receptor Kiss1R.....	7
1.2.3	Antagonista del receptor Kiss1r (p-234)	8
1.3	GPCR y modelado de proteínas por homología	9
1.4	Docking Molecular	11
2	JUSTIFICACIÓN.....	12
3	HIPÓTESIS	13
4	OBJETIVOS.....	13
4.1	Objetivo general.....	13
4.2	Objetivos específicos	13
5	METODOLOGÍA	14
5.1	Animales	14
5.1.1	Administración del p-234	14
5.1.2	Eutanasia y obtención de los tejidos.....	14
5.1.3	Tratamiento de los tejidos y análisis morfométrico	15
5.1.4	Inmunohistoquímica del receptor Kiss1r.....	15
5.1.5	Análisis estadístico	15
5.2	Análisis <i>in silico</i> del receptor Kiss1r	16
5.2.1	Modelado por homología del receptor KISSR	16
5.2.2	Modelado de las kisspeptinas y p-234.....	17
5.2.3	Docking molecular	17
6	Resultados	19
6.1.1	Localización del receptor Kiss1r en el útero de rata Wistar a la PAV	19
6.1.2	Expresión de los receptores Kiss1r en las células del útero a la PAV posterior a la administración del antagonista p-234 del receptor Kiss1r.....	19
6.1.3	Evaluación morfométrica del útero de ratas Wistar a la PAV	22

6.1.4	Efecto de la administración del antagonista p-234 sobre la PAV de ratas Wistar	26
6.2	Análisis <i>in silico</i> del receptor KISS1R	27
6.2.1	Modelado por homología del receptor KISS1R	27
6.2.2	Modelado de las kisspeptinas y p-234	30
6.2.3	Docking Molecular	33
7	Discusión	37
7.1	Efecto de la administración del antagonista p-234 en el útero	37
7.2	Análisis <i>in silico</i> del receptor KISS1R	39
8	Conclusiones	42
9	Referencias	43

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de la morfología y patron radial del desarrollo posnatal en roedores. ...	3
Figura 2. Desarrollo de las glándulas uterinas de ratona antes de la pubertad.....	4
Figura 3. Diagrama del origen y longitud de las kisspeptinas.....	5
Figura 4. Esquema de la señalización central y periférica de Kiss1/Kiss1r.....	7
Figura 5. Vía de señalización del receptor Kiss1r.....	8
Figura 6. Estructura química de p-234.....	9
Figura 7. Esquema de la metodología realizada en animales.....	16
Figura 8. Esquema de la metodología realizada para el análisis in silico.....	18
Figura 9. Localización de los receptores Kiss1r en células del útero de rata Wistar.....	19
Figura 10. Expresión del receptor Kiss1r en el útero de rata Wistar.....	20
Figura 11. Semi-cuantificación del receptor Kiss1R en el útero de rata Wistar a la PAV..	21
Figura 12. La administración de p-234 disminuye el grosor del endometrio a la PAV.....	22
Figura 13. La administración de p-234 1 nM modifica el grosor del miometrio.....	23
Figura 14. El p-234 disminuye el grosor del perimetrio a la PAV.....	24
Figura 15. Las glándulas uterinas a la PAV disminuyen con el p-234.....	25
Figura 16. El p-234 1 nM retrasa la primera apertura vaginal (PAV) de ratas Wistar.....	26
Figura 17. Alineamiento de la secuencia KISS1R y 5HDG (NOP).....	27
Figura 18. Estructura de NOP (5DHG), platilla para el modelado de KISS1R.....	28
Figura 19. Estructura del modelo crudo de KISS1R modelado por homología.....	28
Figura 20. Estructura de KISS1R minimizado modelado por homología.....	29
Figura 21. Estructura del modelado de KISS1R dentro de la membrana celular de neuronas.....	29
Figura 22. Estructura del modelado de KISS1R dentro de la membrana celular de células epiteliales.....	30
Figura 23. Modelo 3D de las kisspeptinas y p-234.....	32
Figura 24. Representación 3D de la interacción de KISS1R con las kisspeptinas y p-234	33
Figura 25. Representación 3D de la interacción de KISS1R con las kisspeptinas y p-234	34
Figura 26. Representación 2D de la interacción de KISS1R/Kp-10 y KISS1R/p-234 región extracelular.....	35
Figura 27. Representación 2D de la interacción de KISS1R/Kp-10 y KISS1R/p-234 region intracelular.....	36

Resumen

La maduración del útero en los mamíferos se da en el periodo posnatal en donde se establece el crecimiento y la morfogénesis propia del órgano. En el desarrollo uterino posnatal ocurre la organización y estratificación del estroma endometrial, la diferenciación y crecimiento del miometrio y el desarrollo de glándulas endometriales o adenogénesis. Estos eventos están regulados por diferentes factores de crecimiento y hormonas como el estradiol y la prolactina. Recientemente se ha descrito que el receptor Kiss1r (GPR54) y sus ligandos las kisspeptinas tienen funciones importantes en el tracto reproductor femenino. En los ovarios es un promotor de la foliculogénesis y la esteroidogénesis, mientras que a nivel uterino se ha implicado en la implantación del embrión y la adenogénesis por lo que es importante conocer su papel sobre el desarrollo uterino. Por otro lado, se ha diseñado un antagonista del receptor KISS1R el p-234, que a nivel hipotalámico suprime la liberación de GnRH, sin embargo, se desconoce cuál es su interacción molecular con el KISS1R. Por lo que el objetivo de este trabajo fue conocer la participación del Kiss1r en el útero de ratas Wistar puberales, mediante la administración in situ del p-234, así como estudiar con un docking molecular la interacción del p-234-KISS1R en un modelo de membrana epitelial. Usamos 4 grupos (n=5), Control, Vehículo, p-234 1 nM y p-234 10 nM. La evaluación morfométrica uterina se realizó mediante técnicas histológicas a la primera apertura vaginal (PAV) y utilizando la técnica de inmunohistoquímica se evaluó la expresión de Kiss1r. El modelado por homología del KISS1R y sus ligandos, así como el docking molecular se realizó en la plataforma Schrödinger.

En el análisis morfométrico se observó que en los grupos p-234 1 nM y 10 nM hubo una disminución del número de glándulas uterinas y del grosor del endometrio, miometrio y perimetrio del útero respecto al grupo Control y Vehículo. El receptor Kiss1r se localizó en el endometrio y el miometrio. Además, en el grupo p-234 1 nM hubo un retaso de la PAV. Por otro lado, con el docking molecular se determinó que el p-234 y las kisspeptinas tienen el mismo bolsillo de unión y la energía de unión para p-234 es menor respecto a Kp-10 y mayor respecto a las demás kisspeptinas. Por lo que el antagonismo de p-234 es efectivo teniendo un efecto negativo en el desarrollo uterino de nuestras ratas.

1 INTRODUCCIÓN

El útero es un órgano fundamental para la reproducción en mamíferos. El desarrollo y diferenciación uterina ocurre en el periodo posnatal. Un evento característico de la maduración uterina es la adenogénesis en donde se ve involucrados diferentes factores de crecimiento y hormonas como el estradiol y la prolactina (Spencer *et al.*, 2005). Actualmente, se han propuesto nuevos moduladores para los órganos involucrados en la reproducción, entre los que destacan el receptor Kiss1r (GPR54). En el hipotálamo el receptor Kiss1r es un importante modulador de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y por lo tanto del eje hipotálamo-hipófisis-ovarios (HHO). La expresión de Kiss1r también ha sido encontrada en otros órganos del HHO como en los ovarios, e interesantemente también en el útero. En los ovarios se estudia su participación en la función ovárica y en el útero su función en la implantación del embrión y adenogénesis (Pinilla *et al.*, 2012; Cao, et al 2018; Trevisan *et al.*, 2018). En los siguientes párrafos se describe al sistema Kiss1/Kiss1r y su función en la reproducción de los mamíferos. La nomenclatura utilizada para hacer referencia al sistema kisspeptidérgico es la propuesta por Gottsch *et al* (2009) donde sugiere utilizar KISS1 y KISS1R (Kisspeptina y su receptor, respectivamente) para referirse a humanos, mientras que utiliza Kiss1 y Kiss1r (de manera semejante a la anterior) para el caso de roedores y especies no humanas.

1.1 Desarrollo posnatal uterino en mamíferos

En los mamíferos el desarrollo y diferenciación de la mayoría de los órganos del tracto reproductivo femenino se completan durante el periodo fetal, sin embargo, en el caso del útero se da en el periodo posnatal (Spencer *et al.*, 2005; Kelleher *et al.*, 2019). Hablando acerca del útero, durante la etapa prenatal, se diferencia de los conductos müllerianos y consta de un epitelio tubular central rodeado de mesénquima indiferenciado al nacer (Cooke *et al.*, 2013).

Durante el desarrollo posnatal uterino se establece la histoarquitectura tejido-especifica, en donde se establece el crecimiento y la morfogénesis radial que dan lugar a la histología tisular uterina: el endometrio, miometrio y el perimetrio (Gray *et al.*, 2001). Dentro de los eventos del desarrollo uterino están la organización y estratificación del estroma endometrial

orientado radialmente, la diferenciación y crecimiento del miometrio que consta de dos capas de musculo liso circular interno y longitudinal externo y el desarrollo de glándulas endometriales o adenogénesis (Cooke *et al.*, 2013; Kelleher *et al.*, 2019). El momento en el que ocurren estos eventos de desarrollo difiere entre especies y refleja diferencias en la madurez uterina al nacer (Kelleher *et al.*, 2019). En los roedores el útero presenta un epitelio simple mesenquimatoso indiferenciado y sin glándulas endometriales al nacimiento y la diferenciación y desarrollo máximo ocurre durante las dos primeras semanas de vida. En el caso de las ovejas sucede algo similar ya que el útero no se encuentra totalmente desarrollado al nacimiento (Spencer *et al.*, 2012; Kelleher *et al.*, 2019). Mientras que en los humanos el útero al momento del nacimiento se asemeja al de un adulto, si bien es menos desarrollado ya existe la presencia de glándulas endometriales, aunque son escasas y superficiales (Spencer *et al.*, 2012). La adenogénesis también ocurre en periodos diferentes, siendo que en el humano esta se inicia en el feto y se completa al alcanzar la pubertad, mientras que en roedores y ovejas es principalmente en el periodo posnatal y finaliza antes de la pubertad (Gray *et al.*, 2001)

1.1.1 Desarrollo posnatal uterino en roedores

En los roedores el desarrollo y diferenciación uterina depende de interacciones epiteliales-mesenquimatosas para el control local y la coordinación de los comportamientos celulares, incluidos el movimiento, la diferenciación y la proliferación (Gray *et al.*, 2001). Estudios en roedores indican que el mesénquima uterino dirige y especifica patrones del desarrollo posnatal, mientras que el epitelio es necesario para la organización del estroma endometrial y la diferenciación miometrial. La diferenciación celular se completa dos semanas después del nacimiento y esta mediada por factores de crecimiento y por cambios en la composición y distribución de los componentes de la matriz extracelular en donde intervienen los glicosaminoglicanos y las metaloproteinasas de matriz (Gray *et al.*, 2001; Spencer *et al.*, 2005).

En los roedores el útero es bicorne (Figura 1a), histológicamente consta de epitelio luminal que es un epitelio columnar simple rodeado de células estromales que contienen glándulas revestidas por epitelio glandular es decir epitelio cuboidal simple (Gray *et al.*, 2001; Cooke *et al.*, 2013). El endometrio contiene glándulas con pocas ramificaciones y

enrollamientos en comparación con las glándulas del útero humano o de animales domésticos. Rodeando al endometrio hay capas circulares internas y longitudinales externas del musculo liso que forman parte del miometrio (Figura 1b) (Spencer *et al.*, 2005, Cooke *et al.*, 2013, Kelleher *et al.*, 2019).

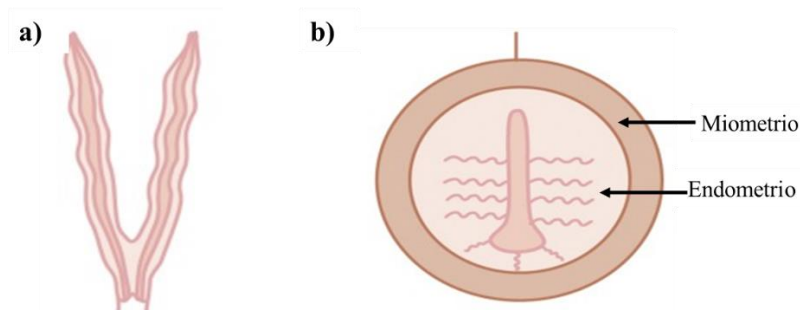


Figura 1. Diagrama de la morfología y patrón radial del desarrollo posnatal en roedores. a) Diagrama frontal de útero bicorne de roedores. b) Diagrama de corte longitudinal del útero que muestra el patrón radial característico del útero, las líneas curvas en el endometrio denotan las glándulas endometriales (Tomado de Cooke *et al.*, 2013).

1.1.2 Desarrollo de glándulas uterinas

La adenogénesis o desarrollo de glándulas uterinas es un evento característico de la maduración uterina posnatal e implica el nacimiento de glándulas del epitelio luminal y una proliferación celular en estas estructuras a medida que crecen en el estroma circundante, en donde se alargan y maduran (Gray *et al.*, 2001; Cooke *et al.*, 2013).

La adenogénesis está regulada por factores intrínsecos y extrínsecos, dentro de los primeros se encuentran las interacciones célula-célula, los factores de crecimiento involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular como el FGF-7, FGF-10, HGF, IGF-I. Los factores extrínsecos son aquellos que se originan en otros órganos como los estrógenos que son producidos en los ovarios y la prolactina producida en la hipófisis (Gray *et al.*, 2001; Spencer *et al.*, 2005; Kelleher *et al.*, 2019).

La adenogénesis se inicia por la diferenciación del epitelio glandular a partir del epitelio luminal. Las glándulas nacientes se alargan en el estroma y luego se enrollan y se ramifican ligeramente a medida que se desarrollan a través del estroma hacia la capa circular interna del miometrio. En roedores al nacer (día postnatal 0; P0) no hay brotes de glándulas presentes (Figura 2). Las invaginaciones epiteliales en forma de brote y lágrima son evidentes entre P7

y P9 y forman tubos alargados en P14. En P21, la histoarquitectura del útero se parece a la del adulto, con glándulas enrolladas y ligeramente ramificadas (Kelleher *et al.*, 2019).

El proceso de adenogénesis antes del P10 es independiente de los estrógenos provenientes de los ovarios, entre P10 y P14 los estrógenos están involucrados en el crecimiento uterino no así de la adenogénesis, sin embargo, en el útero adulto son un mitógeno primario para el epitelio uterino (Spencer *et al.*, 2005; Kelleher *et al.*, 2019).

Un nuevo participante en el desarrollo uterino es el péptido kisspeptina y su receptor Kiss1R del cual se hablará más adelante.

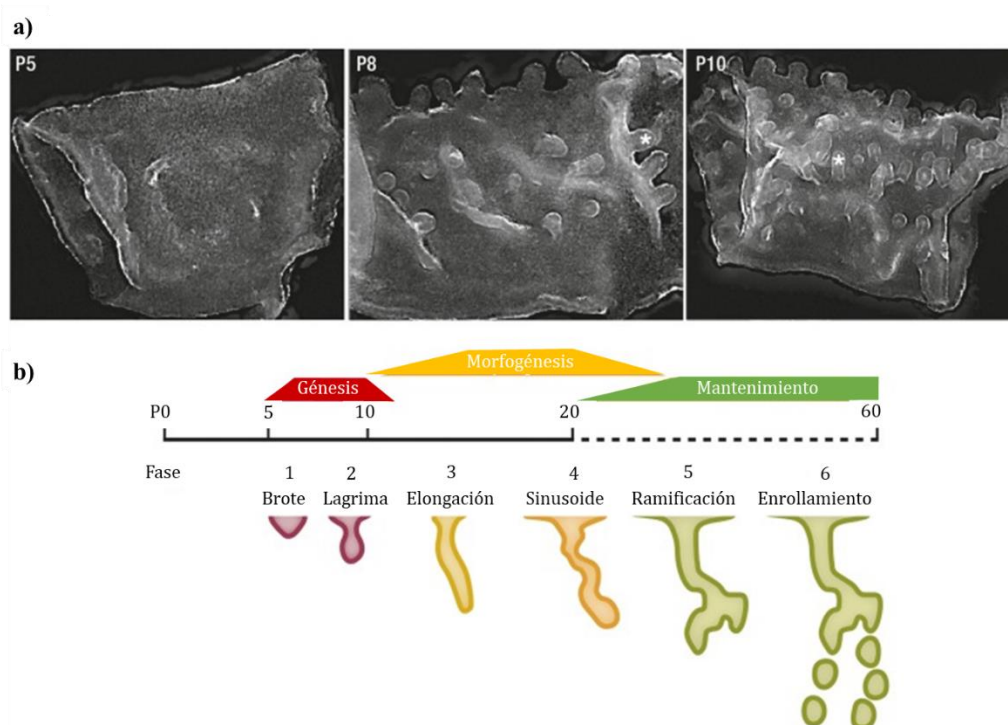


Figura 2. Desarrollo de las glándulas uterinas de ratona antes de la pubertad. a) Imágenes de campo oscuro del epitelio uterino aislado antes del posnatal 5, P5 y durante la génesis y gemación de las glándulas del epitelio luminal (indicado con el asterisco). b) Descripción general de la morfogénesis de la glándula uterina basada en la edad posnatal, la histología y las fases de la adenogénesis en ratón. (Tomado y modificado de Kelleher *et al.*, 2019).

1.2 Sistema Kiss1/Kiss1r

Existen varios receptores que regulan el desarrollo celular en el útero, como lo son: los recetores a estrógeno y progesterona, como previamente se describió. Sin embargo, nuevas moléculas y sus receptores podrían intervenir en este proceso. Por lo cual, no es de extrañar que Kiss1 y su receptor pueda estar involucrados en este proceso.

En 1996, la Kiss1 fue descubierta como producto del gen Kiss1, capaz de suprimir la metástasis (Lee *et al.*, 1996). Kiss1 proviene de una proteína más grande llamada preprokisspeptina (145 aminoácidos). La preprokisspeptina sufre escisiones proteolíticas que dan lugar a fragmentos más cortos de 54, 14, 13 y 10 aminoácidos (Figura 3); dichos péptidos son conocidos como Kisspeptinas (Kotani *et al.*, 2001). Las Kisspeptinas o también llamadas generalmente Kiss1, comparten una secuencia central en el extremo C-terminal, que conserva 10 aminoácidos terminales con un motivo Arg-Phe-NH₂, esenciales para la activación del receptor Kiss1R (Pasquier *et al.*, 2014; Pinilla *et al.*, 2012).

En 1999 se describió el receptor Kiss1r como un receptor huérfano acoplado a proteína G, el cual fue identificado por homología de secuencia a partir del cerebro de rata (Lee *et al.*, 1999). En 2001, cuatro grupos independientes identificaron a Kiss1 como agonista del receptor Kiss1R (Clements *et al.*, 2001; Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001 y Ohtaki *et al.*, 2001). Los estudios hechos por estos grupos mostraron que la kisspeptina generaba la movilización de Ca²⁺ intracelular, hecho que sugería que el receptor Kiss1R estaba acoplado a proteína G_{q/11} (Millar & Babwah, 2015).

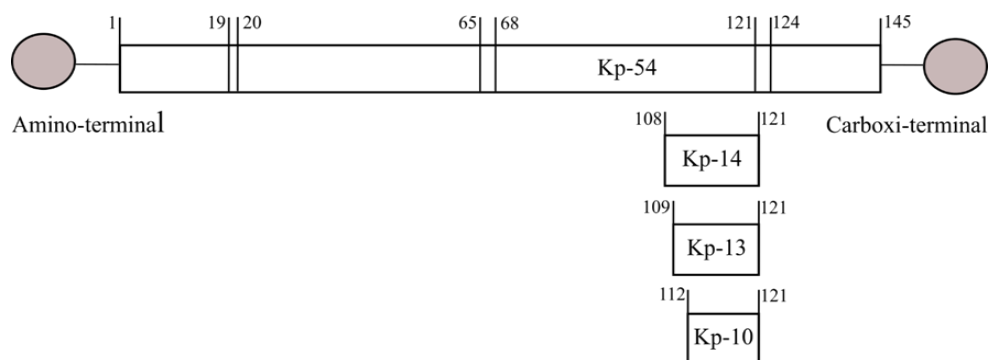


Figura 3. Diagrama del origen y longitud de las kisspeptinas. El péptido señal se encuentra entre las posiciones 1-19, mientras que el primer sitio de corte se da en las posiciones 65 y 67 y el segundo entre las posiciones 121-124, dando lugar a la región central de Kp-54 o a Kp-14, Kp-13, Kp-10. (Tomado y modificado de Tng, 2015).

Es importante destacar que el sistema Kisspeptidérgico se ha localizado en órganos periféricos, abriendo nuevas puertas de investigación y de su uso. Algunos órganos que presentan al sistema Kisspeptidérgico son, el hígado, el páncreas, el intestino, la placenta, la medula espinal, los testículos, los ovarios y el útero. La función del sistema Kiss1/Kiss1R en estos órganos aún no está bien determinada y se sigue estudiando (Kauffman *et al.*, 2007; Trevisan *et al.*, 2018). Sin embargo, se propone que, en el páncreas, el sistema Kiss1/Kiss1r

participa en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Izzi-Engbeaya *et al.*, 2019). Mientras que, este sistema es estudiado en el cáncer como supresor de la metástasis, migración e invasión celular (Oakley *et al.*, 2009).

1.2.1 Sistema Kiss1/Kiss1R en el útero

La presencia de Kiss1 o Kiss1R ha sido poco descrita en el útero. Los úteros de ratones hembra KO a Kiss1 antes de la pubertad tienen la morfología típica de un animal normal, sin embargo, el útero adulto es más pequeño y filiforme (D'Anglemont *et al.*, 2007). Algo similar ocurrió en aquellos ratones hembra KO a Kiss1r que también mostraron cuernos uterinos hipoplásicos.

En el útero humano la expresión de KISS1/KISS1R es principalmente en las células epiteliales del endometrio (Cejudo Roman *et al.*, 2012). En la ratona preñada se da en el epitelio luminal y glandular, fenómenos que se han relacionado con la progresión de la decidualización de las células estromales del útero (Zhang *et al.*, 2014). Además de que en el útero de la ratona ovariectomizada la expresión del ARNm de *Kiss1* fue regulada positivamente después del tratamiento con estradiol planteando así que la señalización Kiss1/Kis1r en útero puede ser regulada por el estradiol (Zhang *et al.*, 2014). En ratonas KO a Kiss1 el factor inhibidor de la leucemia (Lif), importante para la implantación, tiene una expresión baja sugiriendo que kisspeptina regula la expresión de Lif en las células del útero (Calder *et al.*, 2014).

En estudios realizados por León *et al.*, (2016) mostraron que en ratonas KO a Kiss1 o a Kiss1r hubo una pérdida del 97% de glándulas endometriales y una reducción del 81% en el crecimiento uterino en el adulto. El tratamiento con estradiol o la reactivación de las neuronas GnRHérgicas reestableció completamente el crecimiento uterino, pero la adenogénesis solo en 25%. Por otro lado, en animales con expresión de Kiss1r solo en órganos periféricos si bien hay una reducción de la adenogénesis y crecimiento uterino, son menores que los observados en los ratones KO a Kiss1 o Kiss1r; proponiendo así que el sistema Kiss1/Kiss1R debe ser un importante regulador de la adenogénesis y el crecimiento uterino en ratonas adultas (Figura 4).

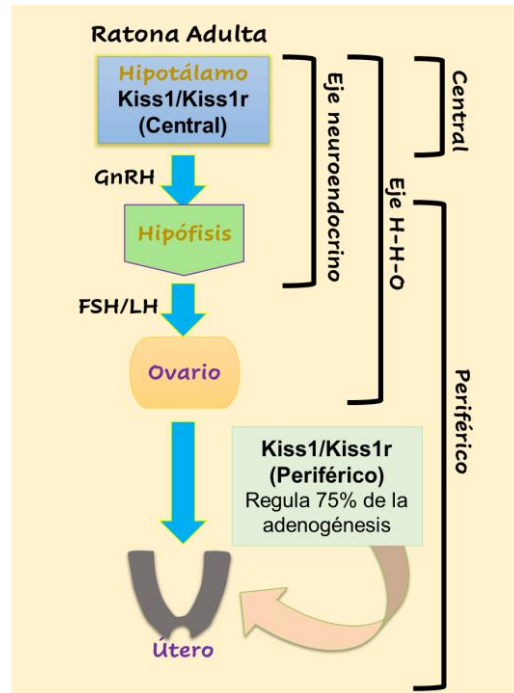


Figura 4. Esquema de la señalización central y periférica de Kiss1/Kiss1r. La señalización periférica del sistema Kiss1/Kiss1r potencia el desarrollo de las glándulas endometriales en la ratona. (Tomado y modificado de León et al., 2016).

1.2.2 Bioquímica del receptor Kiss1R

En humanos el receptor KISS1R es una proteína transmembranal de 398 aminoácidos en los ratones de 396 y en las ratas de 395 aminoácidos. Los receptores a kisspeptina de rata y humanos tienen un 85% de homología, mientras que en los dominios transmembranales llega a 98%, entre el ratón y el ser humano, el porcentaje de homología es de 82% (Kirby *et al.*, 2010).

El receptor Kiss1R pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) de tipo rodopsina clase A. Está compuesto por un dominio N-terminal extracelular de aproximadamente 50 aminoácidos, seguido por siete hélices transmembranales y termina con un dominio citoplásmico C-terminal de aproximadamente 70 aminoácidos. Las 7 hélices transmembranales están conectadas por tres asas extracelulares y tres asas citoplasmáticas (Bianco & Kaiser, 2013; Pasquier *et al.*, 2014).

El receptor Kiss1R está acoplado a proteína G de la clase $G\alpha_{q11}$, y su activación por Kiss1 en las neuronas GnRH activa la señalización intracelular de la fosfolipasa C y la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-

trifosfato (IP3). La posterior unión de IP3 a sus receptores en el retículo endoplásmico provocan una liberación Ca^{2+} intracelular promoviendo la despolarización de la membrana neuronal y la secreción de GnRH (Pinilla *et al.*, 2012; Trevisan *et al.*, 2018).

Por otra parte, el DAG activa la PKC que induce la fosforilación de las proteínas quinasas activadas p38 y las quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares (ERK1 y ERK2) involucradas en la proliferación celular (Huma *et al.*, 2013). La activación de Kiss1R recluta arrestina- β 1 y arrestina- β 2, que también modulan, de manera opuesta, la señalización del receptor; mientras que la arrestina- β 1 disminuye la fosforilación de ERK mediada por Kiss1R la arrestina- β 2 la aumenta (Figura 5) (Pinilla *et al.*, 2012).

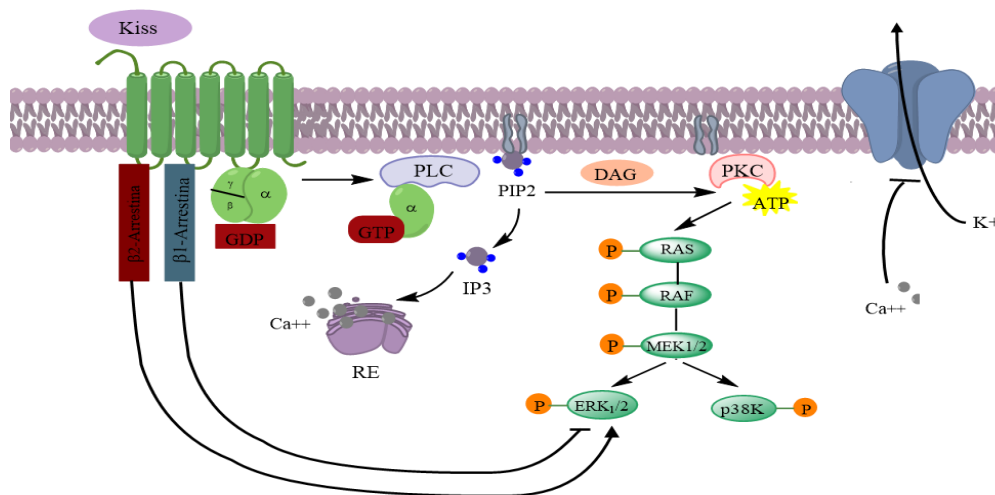


Figura 5. Vía de señalización del receptor Kiss1r. El dominio C-terminal se une a las subunidades catalíticas y reguladoras de PLC y activa las vías de señalización dependientes del calcio y MAPK p38, ERK1 y ERK2. PLC: Fosfolipasa C, PKC: Proteína quinasa C, DAG: Diacilglicerol, PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, IP3: inositol-1,4,5-trifosfato, RE: Retículo endoplásmico, GDP: Guanosín difosfato, GTP: Guanosín trifosfato, ATP: Adenosín trifosfato (Tomado y modificado de Pinilla *et al.* 2012).

1.2.3 Antagonista del receptor Kiss1r (p-234)

Una herramienta farmacológica para poder estudiar al Kiss1r es el p-234. El p-234 es un péptido sintético que tiene siete residuos conservados de Kp-10 y tres sustituciones Tyr1 por D-Ala, Ser5 por Gly y Leu8 por D-Trp ([D]-A]NWNGFG[D]-W]RF) (Figura 6), con especificidad para Kiss1r, posee una afinidad de 2.7 nM y se ha observado que es capaz de inhibir la liberación de Fosfato inositol (IP) y antagonizar la liberación intracelular de calcio. En machos castrados, la administración de 1nmol del p-234 a los 0, 60 y 120 min reduce los

niveles séricos de LH; además suprime la liberación de GnRH. (Roseweir *et al.*, 2009). A pesar de que es una molécula comprobada por su efectividad como antagonista, no se conoce la manera en la que interactúa con el receptor Kiss1r.

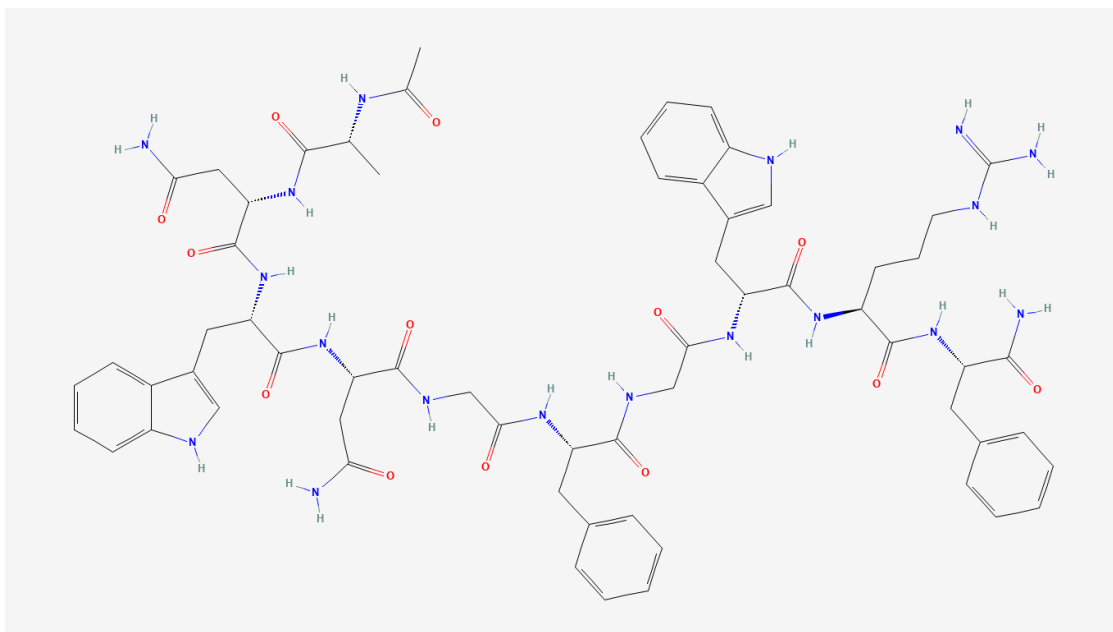


Figura 6. Estructura química de p-234 (PubChem CID 90488890)

1.3 GPCR y modelado de proteínas por homología

Los GPCR son la familia más grande de receptores transmembranales y son importantes objetivos farmacológicos. En el humano se han identificado 826, sin embargo, representan un gran desafío al momento de su expresión purificación y cristalización por lo que existe una baja cantidad de estructuras de alta resolución resueltas, de las distintas familias solo se han resuelto las estructuras cristalinas de 21 (Wu *et al.*, 2017). Por lo que una estrategia del estudio *in silico* para la construcción de modelos 3D de proteínas es el modelado por homología.

El modelado de proteínas por homología es un método de predicción computacional para determinar la estructura tridimensional (3D) de una proteína a partir su secuencia de aminoácidos (Jin, 2006). Se basa en que la secuencia primaria de la proteína posee la información de la estructura terciaria o cuaternaria, por lo tanto, primero se determina la similitud (~30% de identidad de secuencia) entre la secuencia de una proteína de estructura

conocida (plantilla) y una proteína problema. Si la secuencia de aminoácidos es similar se supone que la estructura terciaria también lo será. El proceso de modelado consiste en los siguientes pasos:

- 1) **Identificación y selección de plantillas:** La secuencia problema se utiliza para la identificación de estructuras de plantilla en PDB (<https://www.rcsb.org/>) o herramientas de búsqueda de alineación como las bases de datos de NCBI y UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Cuanta más similitud de secuencia haya entre la proteína problema y la proteína plantilla, mejor será la calidad del modelo generado. También se deben considerar otros factores como la similitud filogenética, factores ambientales como el pH, el tipo de solvente y la existencia de ligando unido ya que tiene un papel para garantizar las condiciones óptimas en la construcción de una estructura precisa (Jin, 2006; Muhammed & Aki-Yalcin, 2019).
- 2) **Alineación de las secuencias:** La alineación asigna a cada uno de los aminoácidos de la proteína problema el correspondiente en la secuencia plantilla. Frecuentemente aparecen en las secuencias inserciones o deleciones, debido a que no habrá aminoácidos que se correspondan entre ambas secuencias. Dicho alineamiento puede realizarse de a pares o de forma múltiple, donde varias secuencias son alineadas de forma simultánea con el fin de identificar regiones conservadas, predecir sitios funcionales o realizar análisis filogenéticos (Cavassoto & Palomba, 2015; Muhammed & Aki-Yalcin, 2019).
- 3) **Construcción del modelo:** El modelo puede construirse a partir de una única plantilla (single-template) o a partir de varias (multiple-template). En el primer caso el programa construye el modelo al cumplir con las restricciones provenientes de la estructura de la plantilla según la alineación. Estas restricciones están determinadas por restricciones estereoquímicas sobre la longitud de enlace, el ángulo de enlace, los ángulos diédricos y las distancias de contacto de van der Waals. En el segundo caso la proteína problema es dividida en varios segmentos y diferentes moldes son utilizados para modelar cada uno de ellos (Cavassoto & Palomba, 2015; Muhammed & Aki-Yalcin, 2019).
- 4) **Optimización del modelo:** La optimización del modelo comienza con una minimización o reducción de energía utilizando campos de fuerza de mecánica

molecular. En cada minimización de energía se eliminan algunos errores grandes, pero pueden introducirse otros dependiendo del método utilizado (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019).

- 5) **Validación del modelo:** El análisis de la estereoquímica del modelo es un requisito básico. Este análisis se realiza con parámetros como la longitud de enlace, el ángulo de torsión y el ángulo de rotación (Muhammed & Aki-Yalcin, 2019).

1.4 Docking Molecular

Una herramienta para el estudio de proteínas es el acoplamiento molecular (*docking*) en donde se utilizan herramientas computacionales para estudiar los complejos formados por la interacción entre ligando-receptor que pueden generarse en los procesos celulares. El *docking* molecular se realiza a partir de la estructura 3D de las moléculas individuales y así obtener el complejo ligando-receptor (Padilla & Rojo, 2002; Ballón & Grados, 2019).

El acoplamiento molecular emplea dos algoritmos. El primero de muestreo o búsqueda que predice las configuraciones o conformaciones estructurales (poses) que el ligando puede asumir dentro de un dominio o sitio activo en la proteína de interés, y el segundo tiene una función de puntuación que predice las energías de unión entre el ligando y el receptor para cada una de las configuraciones establecidas por el primer algoritmo. Posteriormente todas las configuraciones de unión del ligando y su receptor son clasificadas de acuerdo con sus energías de unión (Ferreira *et al.*, 2015; Ballón & Grados, 2019).

Los programas de acoplamiento molecular utilizan funciones de puntuación para estimar la energía de unión de los complejos ligando-receptor predichas La variación de energía, que ocurre por la formación de la estructura ligando-receptor, está dada por la constante de unión (K_d) y la energía libre de Gibbs (ΔG_L) (Ferreira *et al.*, 2015).

2 JUSTIFICACIÓN

El sistema Kiss1/Kiss1r tiene funciones importantes en la reproducción; a nivel hipotalámico la señalización de Kiss1/Kiss1r desencadena la liberación de GnRH activando al eje HHO. La activación de este eje en los ovarios desencadena la foliculogénesis, la ovulación y la síntesis de progesterona y estradiol, este último es de interés a nivel uterino ya que es un promotor de la adenogénesis evento necesario para el desarrollo celular uterino, además que regula la secreción de GnRH mediante la señalización hacia las neuronas kisspeptidérgicas (Popa *et al.*, 2008; Oakley *et al.*, 2009; Gray *et al.*, 2001).

Por otra parte, a nivel periférico el sistema Kiss1/Kiss1r también tiene importancia en el tracto reproductor femenino. En los ovarios participa en la foliculogénesis, la ovulación y la esteroidogénesis, mientras que en útero participa en el proceso de la decidualización, (Hu *et al.*, 2018; Trevisan *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2019).

El conocimiento del sistema Kiss1/Kiss1r en ovario y útero se ha profundizado en los últimos años de manera importante, sin embargo, estos estudios han sido realizados en ratas adultas, modelos KO a Kiss1 o Kiss1r y han servido para establecer su participación los procesos antes mencionados. Mientras que, en edades previas a la adulta, el papel de Kiss1/Kiss1r es poco conocido, por lo cual en este trabajo se busca conocer la participación que tiene el receptor Kiss1r en el desarrollo celular uterino mediante el uso de un antagonista específico para Kiss1r, el p-234, además del estudio de un modelo *in silico* como el *docking* molecular de la interacción KISS1R-p-234 y su relación con el complejo KISS1R-kisspeptinas que hasta el momento se desconoce.

3 HIPÓTESIS

El receptor Kiss1r promueve el desarrollo uterino de ratas Wistar puberales.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la participación del receptor Kiss1r en el desarrollo del útero de ratas Wistar a la edad puberal.

4.2 Objetivos específicos

1. Estudiar *in silico* la interacción del receptor Kiss1r con el antagonista p-234.
2. Determinar la distribución de los receptores Kiss1r en las células del útero al P24 y a la PAV.
3. Evaluar el patrón de expresión de los receptores Kiss1r en las células del útero a la PAV posterior a la administración del antagonista p-234 del receptor Kiss1r.
4. Evaluar los cambios morfológicos del endometrio, miometrio, perimetrio, así como el número de glándulas uterinas a la edad de la PAV posterior a la administración del antagonista p-234 del receptor Kiss1r.

5 METODOLOGÍA

5.1 Animales

El manejo y cuidado de los animales se realizó conforme a los ordenamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y las normas establecidas por el comité para el uso de animales de laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Trabajamos con ratas preñadas hembra de la cepa Wistar que fueron 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. Esperamos a que finalizaran su periodo de gestación y 10 días posteriores al parto se realizó el sexado de las crías escogiéndose solo a las ratas hembra que fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos cada uno con una n=5. Los grupos experimentales fueron; control, vehículo (administradas en útero con 0.6 UI de solución Hartman), y dos grupos administrados con el antagonista del receptor Kiss1R (Kisspeptin-234 trifluoroacetate salt; p-234), con una concentración de 1nM y 10 nM.

5.1.1 Administración del p-234

La administración tanto del vehículo como de las dos concentraciones del antagonista se realizaron a los 24 días de edad (posnatal 24; P24). Para la administración las ratas fueron anestesiadas con ketamina/xilacina (0.2 ml/100g, IP), posteriormente mediante una cirugía en la región dorsal se expuso el útero y se realizó la administración *in situ* del vehículo o de p-234 a 1 nM o 10 nM. Posteriormente los animales se monitorearon hasta su recuperación.

5.1.2 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 diaria de la ausencia de la membrana vaginal. La ausencia de la membrana indica el primer estro del animal. La eutanasia se realizó en una cámara de CO₂, posteriormente se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina isotónica y paraformaldehído al 4%; seguida de la disección de los úteros.

5.1.3 Tratamiento de los tejidos y análisis morfométrico

Los tejidos obtenidos se almacenaron en paraformaldehído al 4% en PBS, posteriormente se incluyeron en parafina y se realizaron cortes con un grosor de 5µm, que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE). Para el análisis morfométrico se tomaron aleatoriamente de la zona media del útero 10 campos del cuerno izquierdo y 10 del derecho de los diferentes cortes teñidos con HE y se realizaron 5 mediciones por campo con el software Motic Images plus 3.0.

5.1.4 Inmunohistoquímica del receptor Kiss1r

Los cortes histológicos se desparafinaron, hidrataron y lavaron con solución de PBS. La recuperación antigénica se realizó con buffer de citratos (0.1 mM, pH=6). Los tejidos se lavaron con PBS-Triton-100X al 2%, y las proteínas se bloquearon con albúmina bovina libre de IgG al 0.5% en PBS-T. Posteriormente, los cortes histológicos se incubaron durante 18 horas con el anticuerpo primario IgG de conejo policlonal anti-GPR54 (Santa Cruz, Biotechnology; 1:200), y 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 marcarán con DAPI en Vecta Shield (1:100). La fluorescencia se detectó con un microscopio Leica DM100.

5.1.5 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como las medias \pm EEM. En todas las comparaciones, usamos la prueba ANOVA de una vía seguidos de la prueba de Tukey. Los grupos fueron diferentes cuando la probabilidad entre ellos fue igual o menor al 5 %.

Diagrama de trabajo de los experimentos en animales

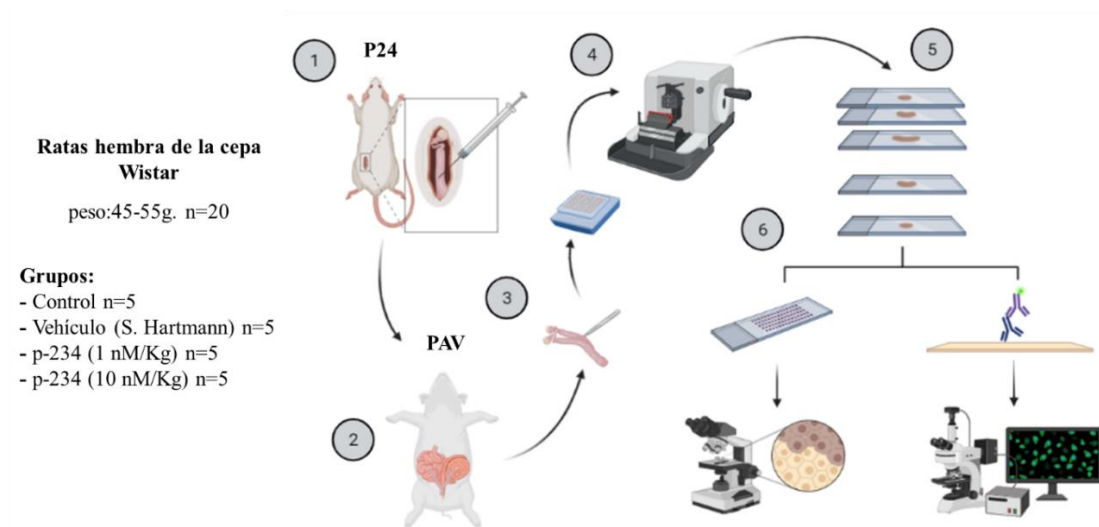


Figura 7. Esquema de la metodología realizada en animales. Administración de p-234 1nM y 10nM y vehículo (1), Eutanasia y obtención de los úteros (2), embebidos en parafina (3) cortes seriados (4), tinción HE (5) y análisis de datos (6). Creado en Biorender.com

5.2 Análisis *in silico* del receptor Kiss1r

5.2.1 Modelado por homología del receptor KISSR

Para realizar el modelado de la proteína KISS1R (Q969F8) se obtuvo su secuencia aminoacídica de la base de datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q969F8.fasta>). Posteriormente con la secuencia del KISS1R, se hizo un alineamiento con la herramienta Multiple Sequence RViewer de la plataforma Schrödinger, para identificar las secuencias homólogas y establecer la plantilla a usar.

El modelado de KISS1R se realizó con la plataforma Schrödinger utilizando como plantilla la estructura cristalina de rayos X del receptor del péptido FQ de nociceptina/orfanina (NOP; 5 DHG.pbd RCSB Protein Data Bank) con una resolución de 3.00 Å, posteriormente se procedió a la formación del modelo 3D por homología, para continuar con el análisis de la estabilidad del modelo, adición de estados de protonación a pH fisiológico y finalmente a la minimización del modelo, esto realizado en el módulo ProteinWizardPrep de la plataforma Schrödinger.

Para la inserción de la membrana, se utilizaron dos modelos prediseñados uno para células epiteliales y el segundo para sistema nervioso central en el módulo MembraneBouilPrep, posterior a la inserción se optimizaron puentes de hidrogeno, estados de protonación y minimizo a la estructura más estable.

5.2.2 Modelado de las kisspeptinas y p-234

Para el modelado de las kisspeptinas (Kp-54, Kp-14, Kp-13, Kp-10) se obtuvo la secuencia aminoacídica y estructura de la base de datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q15726#sequences>) de KISS1 (Q15726). La secuencia obtenida y su estructura se utilizó como plantilla para el modelado de las kisspeptinas, mientras que la secuencia aminoacídica de p-234 se obtuvo de Roseweir *et al.*, (2009). El modelado de las kisspeptinas se realizó en la plataforma Schrödinger haciendo un alineamiento con la herramienta Multiple Sequence RViewer y posteriormente se procedió a la formación del modelo 3D por homología para continuar con el análisis de la estabilidad del modelo, adición de estados de protonación a pH fisiológico y finalmente la minimización del modelo. Dado que en este caso las kisspeptinas y p-234 son ligandos del KISS1R, se generó la estructura molecular 3D en con la herramienta LigPrep.

5.2.3 Docking molecular

Para la realización del docking se utilizó la plataforma Schrödinger, en donde se prepararon el ligando con la herramienta LigPrep y el receptor en Protein Preparation Wizard. En donde se agregaron hidrógenos polares y se optimizaron. El acoplamiento molecular se calculó con Glide.

Diagrama de trabajo del análisis *in silico*

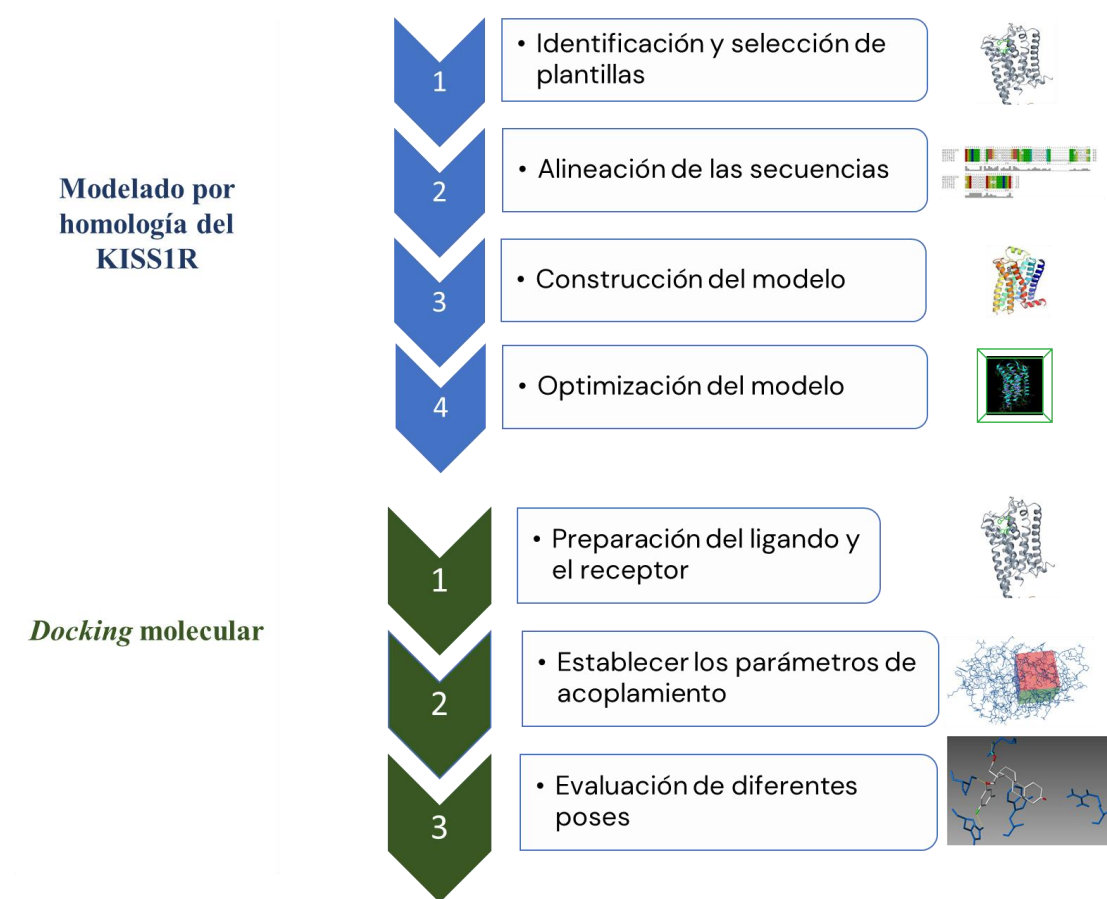


Figura 8. Esquema de la metodología realizada para el análisis *in silico*. Todo el procedimiento se realizó en la plataforma Schrödinger.

6 Resultados

6.1.1 Localización del receptor Kiss1r en el útero de rata Wistar a la PAV

La localización del receptor Kiss1r en el útero de rata Wistar a la PAV se realizó empleando la técnica de inmunohistoquímica por fluorescencia. En la figura 9 se muestra la presencia de Kiss1r en las células del epitelio luminal y glándulas del endometrio (flechas de color amarillo), en el miometrio se localizó en las células del musculo liso (flechas azules) y en el perimetrio se observó en las células del tejido conjuntivo laxo (flechas blancas).

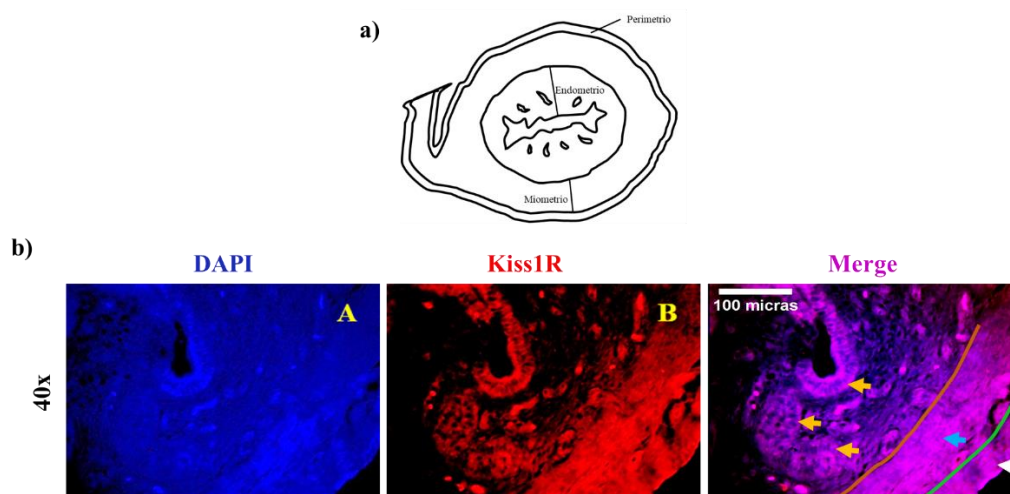


Figura 9. Localización de los receptores Kiss1r en células del útero de rata Wistar. a) Representación esquemática de un corte transversal de cuerno uterino de rata. b) Inmunohistoquímica del receptor Kiss1r, los núcleos están en azul, marcados con DAPI (bA), los receptores Kiss1R están en rojo y fueron marcados con Texas-Red (bB) y en la bC se presenta el merge (colocalización). Las flechas amarillas indican la localización del receptor Kiss1r en el endometrio, las flechas azules en el miometrio y las blancas en el perimetrio mientras que las líneas anaranjadas delimitan el endometrio y el miometrio y la línea verde delimita el miometrio y perimetrio.

6.1.2 Expresión de los receptores Kiss1r en las células del útero a la PAV posterior a la administración del antagonista p-234 del receptor Kiss1r.

La semi-cuantificación de fluorescencia del receptor Kiss1r en el útero de rata, se midió como intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (IntDen) sobre campo para cada una de las regiones del útero (Figura 10). En el endometrio la intensidad de fluorescencia del grupo control y vehículo fue de 59.1 ± 4.1 y 61.6 ± 5.2 , respectivamente, mientras que para los grupos p-234 1nM y p-234 10nM es de 64.3 ± 4.1 y 69.5 ± 4.1 , respectivamente no

obteniéndose diferencia significativa. En caso del miometrio ocurre algo similar puesto que la intensidad de fluorescencia para el control es de 92.8 ± 4.4 , para el vehículo 82.4 ± 6.8 , y para los animales administrados con el p-234 1nM y 10 nM es de 79.8 ± 3.4 y 75.6 ± 5.3 respectivamente. En el perimetrio el comportamiento anterior se repite puesto que no hay diferencia significativa entre los grupos control y vehículo (103.3 ± 4.7 y 94.9 ± 11.4 , respectivamente) respecto a los administrados con p-234 1 nM y 10 nM (79.1 ± 4 y 75.2 ± 4.2 , respectivamente) (Figura 10).

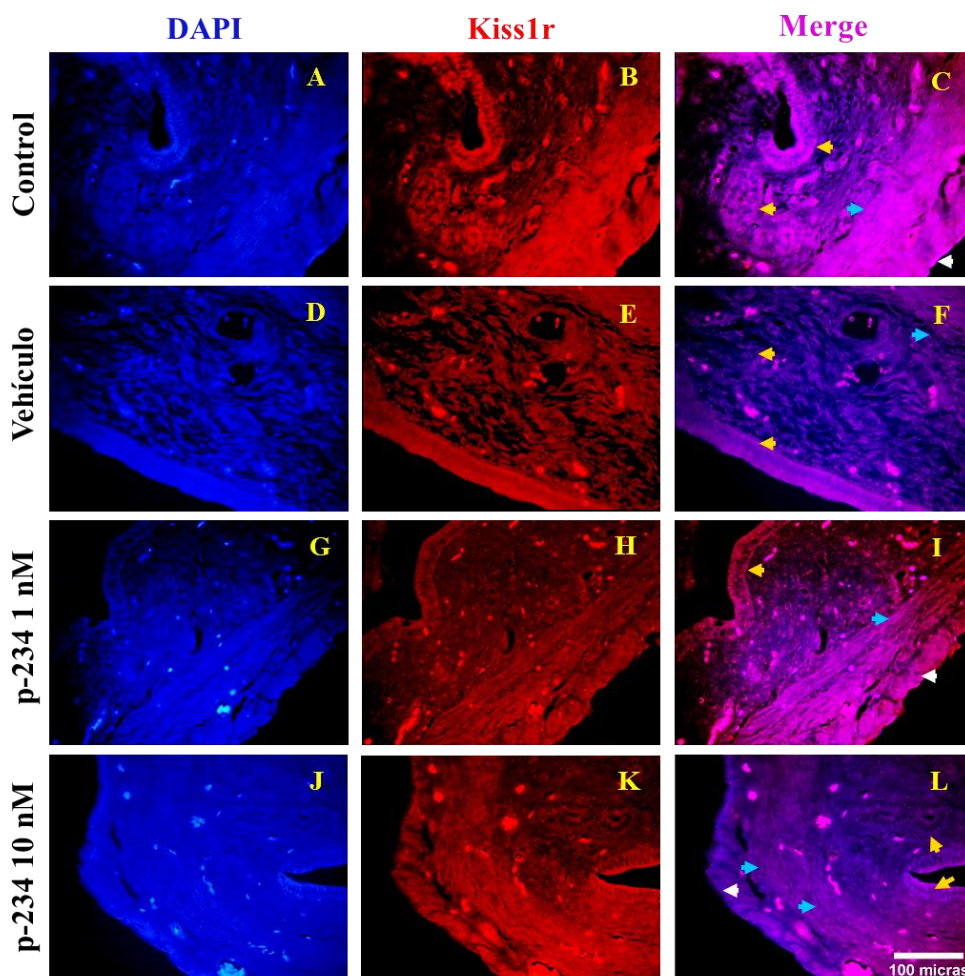


Figura 10. Expresión del receptor Kiss1r en el útero de rata Wistar. Inmunohistoquímica de los receptores Kiss1r en células del útero de los grupos Control, Vehículo, p-234 1nM y p-234 10nM a la edad de la PAV. En la primera columna, los núcleos están en azul, marcados con DAPI (A, D, G y J). En la segunda columna, los receptores Kiss1 están en rojo marcados con Texas-Red (B, E, H y K) y en la tercera columna se presenta el merge (colocalización) (C, F, I y L).

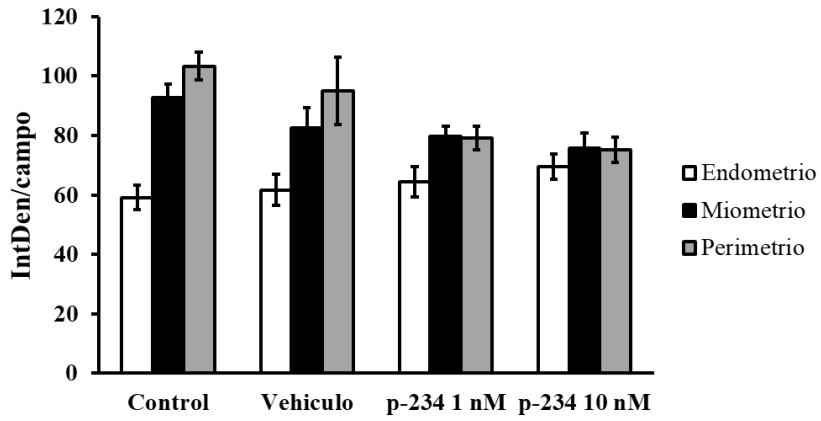


Figura 11. Semi-cuantificación del receptor Kiss1R en el útero de rata Wistar (n=5) a la PAV. Las barras representan el promedio \pm EEM. El análisis estadístico fue realizado con una prueba ANOVA y una prueba post Tukey.

6.1.3 Evaluación morfométrica del útero de ratas Wistar a la PAV

6.1.3.1 Endometrio

Al realizar la medición del grosor del endometrio encontramos que para el grupo control y vehículo el grosor es de $299.3 \pm 3.4 \mu\text{m}$ y $314.3 \pm 3.6 \mu\text{m}$, respectivamente, mientras que para los animales administrados con p-234 a concentración de 1 nM y 10 nM disminuyó el grosor siendo de $228.5 \pm 3.9 \mu\text{m}$ y $277.9 \pm 4.2 \mu\text{m}$, respectivamente, menor en una proporción del 26.4% y 10.3% respecto al grupo control y vehículo (Figura 12).

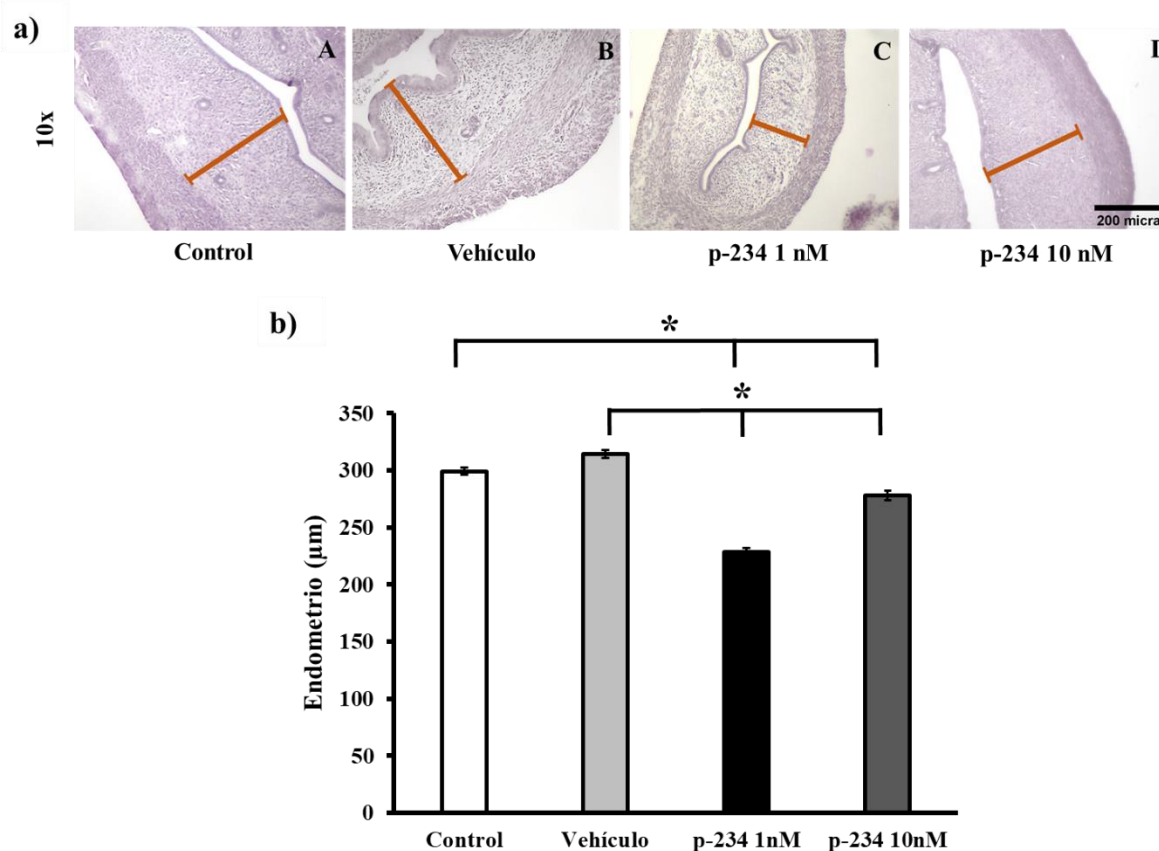


Figura 12. La administración de p-234 disminuye el grosor del endometrio a la PAV a. a) Cortes histológicos transversales representativos del útero de rata Wistar a la edad de la PAV (Tinción H&E). En A útero del grupo control, B grupo vehículo, C grupo administrado con p-234 1 nM y, en D grupo administrado con p-234 10 nM. Las líneas marrones representan el grosor del endometrio. b) Grafica del grosor del endometrio a la edad de la PAV de los grupos (n=5) control, vehículo, p-234 1 nM y p-234 10 nM. Las barras representan el promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA y una prueba post Tukey * p < 0.05.

6.1.3.2 Miometrio

El grosor del miometrio a la PAV del grupo control fue $105.3 \pm 1.5 \mu\text{m}$, en el caso del vehículo fue de $123.5.1 \pm 1.7 \mu\text{m}$, mientras que en el grosor del grupo p-234 1nM fue $105.6 \pm 1.9 \mu\text{m}$, siendo diferente al grupo vehículo. Para el grupo p-234 10nM el grosor del miometrio fue de $120.6 \pm 1.7 \mu\text{m}$, teniendo una diferencia significativa respecto al grupo vehículo (Figura 13).

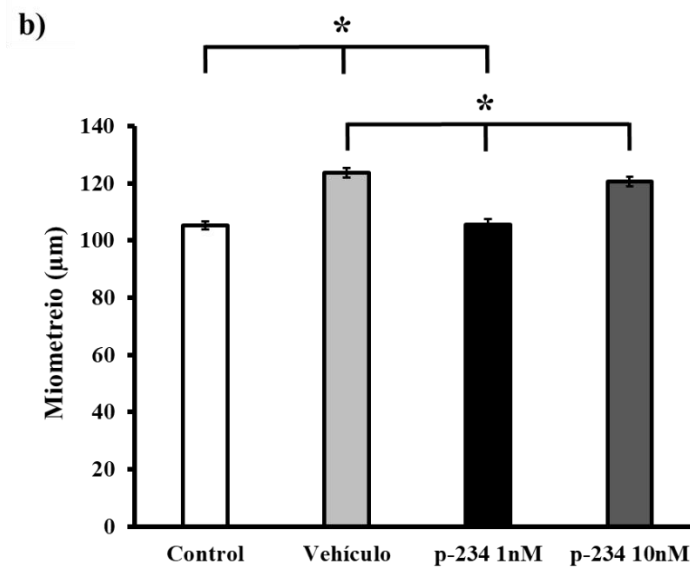
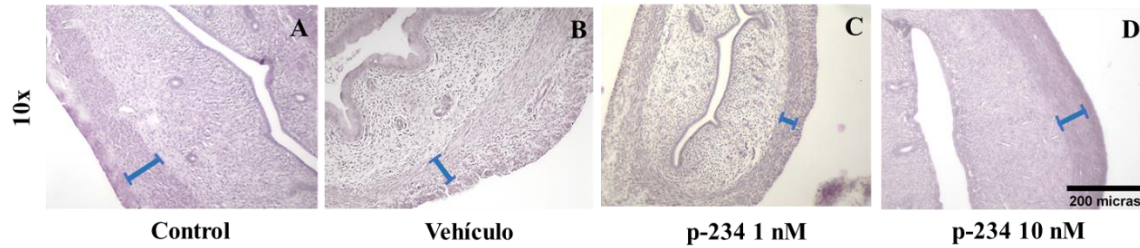


Figura 13. La administración de p-234 1 nM modifica el grosor del miometrio. a) Cortes histológicos transversales representativos del útero de rata Wistar a la edad de la PAV (Tinción H&E). En A útero del grupo control, B grupo vehículo, C grupo administrado con p-234 1nM y, en D grupo administrado con p-234 10nM. Las líneas azules representan el grosor del endometrio. b) Grafica del grosor del endometrio a la edad de la PAV de los grupos (n=5) control, vehículo, p-234 1nM y p-234 10 nM. Las barras representan el promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA post Tukey * $p < 0.05$.

6.1.3.3 Perimetrio

En el caso del perimetrio el grosor del grupo control y vehículo ($41.9 \pm 0.9 \mu\text{m}$ y $41.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$, respectivamente) fue significativamente mayor al de p-234 1nM ($37.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$). Por otro lado, el grosor del perimetrio para el grupo p-234 10nM ($39.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$) fue menor respecto al grupo vehículo (Fig. 14).

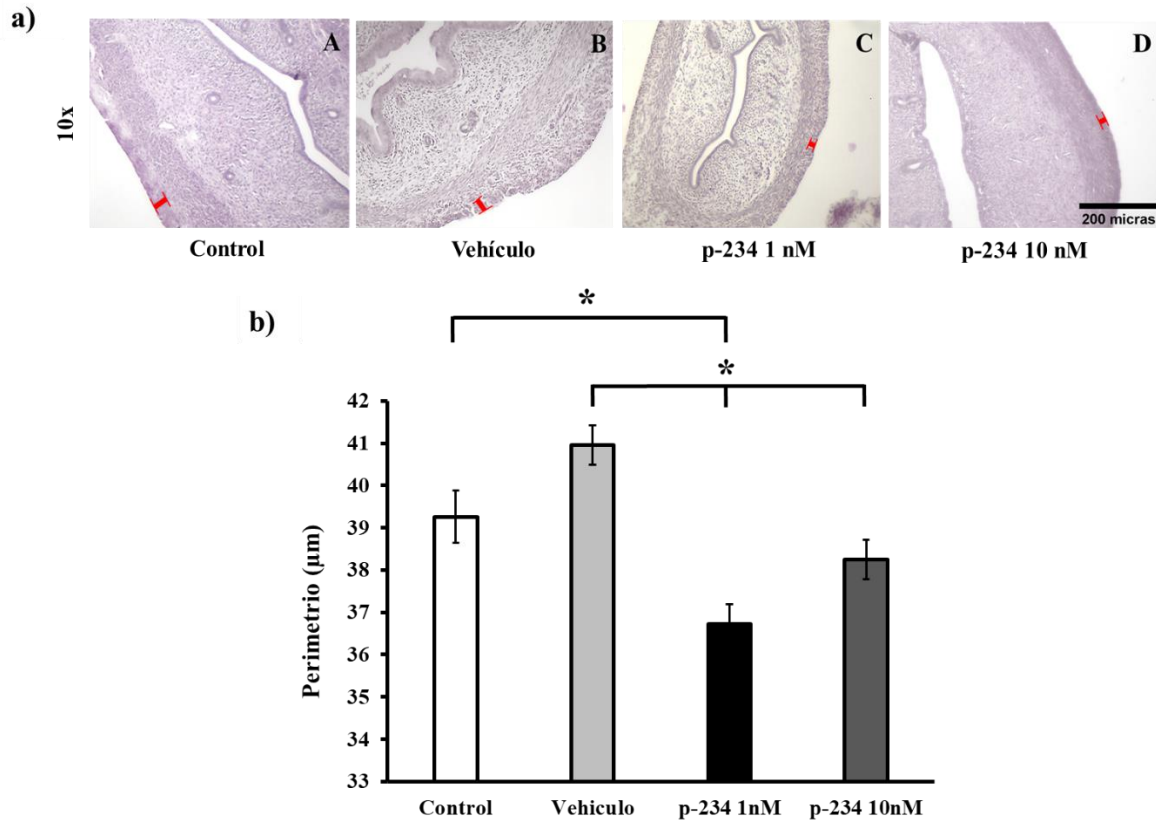


Figura 14. El p-234 disminuye el grosor del perimetrio a la PAV. a) Cortes histológicos transversales representativos del útero de rata Wistar a la edad de la PAV (Tinción H&E). En A útero del grupo control, B grupo vehículo, C grupo administrado con p-234 1nM y, en D grupo administrado con p-234 10nM. Las líneas rojas representan el grosor del endometrio. b) Grafica del grosor del endometrio a la edad de la PAV de los grupos (n=5) control, vehículo, p-234 1nM y p-234 10 nM. Las barras representan el promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA y una prueba post Tukey * $p < 0.05$.

6.1.3.4 *Conteo de glándulas endometriales*

El número de glándulas uterinas por campo para los grupos control y vehículo (2.67±0.17 y 2.39±0.13, respectivamente) fue mayor en comparación con p-234 1nM (1.89±0.08) y p234 10nM (1.84±0.10) (Fig. 15).

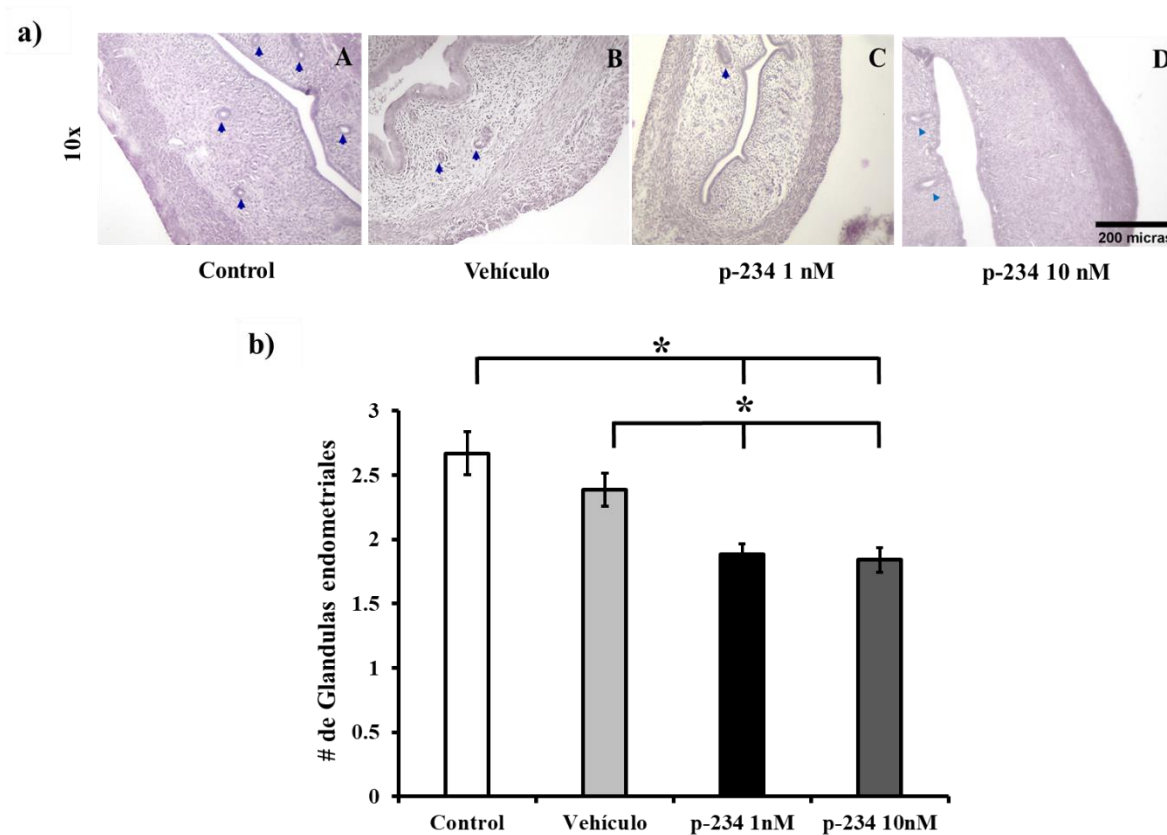


Figura 15. Las glándulas uterinas a la PAV disminuyen con el p-234. a) Número de glándulas uterinas por campo a la edad de la PAV de los grupos (n=5) Control, Vehículo, p-234 1nM y p-234 10nM. La flecha azul señala las glándulas uterinas presentes en el endometrio. Las barras representan el promedio ± EEM. El análisis estadístico fue realizado con una prueba ANOVA y una prueba post Tukey * $p < 0.05$.

6.1.4 Efecto de la administración del antagonista p-234 sobre la PAV de ratas

Wistar

La PAV en el grupo control se observó a los 40.6 ± 1.6 días y en el grupo vehículo se presentó a los 41 ± 1.9 días, mientras que, en el grupo p-234 1nM se retrasó respecto a los grupos control y vehículo, debido a que la PAV se observó hasta los 55.4 ± 4.3 . En el grupo p-234 10nM también se observó un retraso de la PAV a los 49.4 ± 3 días, sin embargo, no es estadísticamente diferente (Fig. 16).

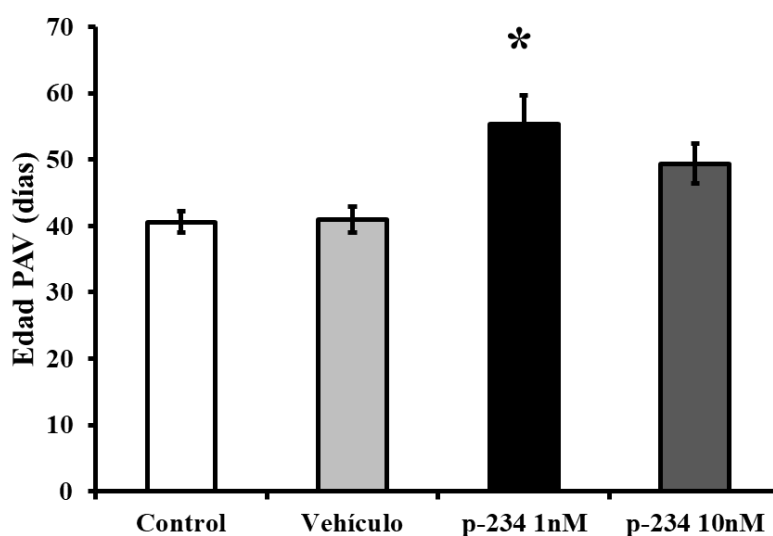


Figura 16. El p-234 1 nM retrasa la primera apertura vaginal (PAV) de ratas Wistar. Grupos (n=5) Control, y administrada con vehículo y con p-234 (1nM y 10nM). Las barras representan el promedio \pm EEM, Las barras representan el promedio \pm EEM. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA y una prueba post Tukey * $p < 0.05$.

6.2 Análisis *in silico* del receptor KISS1R

6.2.1 Modelado por homología del receptor KISS1R

La búsqueda de la proteína plantilla mediante el alineamiento múltiple arrojó como mejor candidato al receptor del péptido FQ de nociceptina/orfanina (NOP) (5 DHG.pbd) con un 80% de similitud con el KISS1R. Posteriormente se realizó el análisis del alineamiento entre los aminoácidos que nos da el programa, evaluando la naturaleza química de estos (Figura 17).

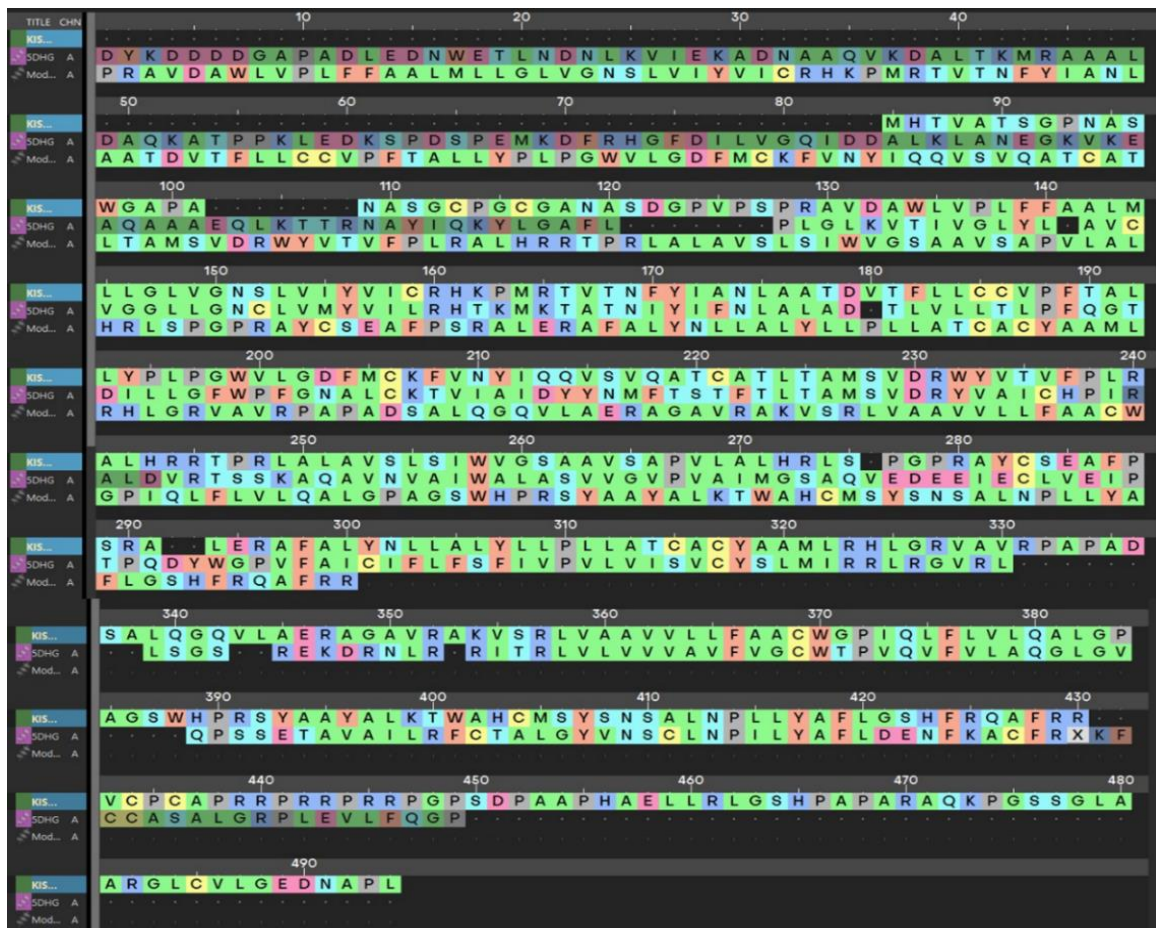


Figura 17. Alineamiento de la secuencia KISS1R y 5DHG (NOP). El alineamiento mostró una similitud entre las secuencias de 80%. Los aminoácidos se muestran en diferentes colores clasificados según su grupo funcional, en verde los no polares (hidrofóbicos), en azul claro los polares sin carga, en naranja los aromáticos, en azul oscuro los cargados positivamente y en morado los cargados negativamente.

Utilizando como plantilla al receptor NOP (Figura 18) se generó el modelado de KISS1R (Figura 18); para llegar a la optimización del modelo primero se agregaron los estados de protonación, la formación de puentes de hidrogeno y disulfuro de los aminoácidos, y después se realizó la minimización de la estructura, paso crítico en el modelado puesto que es aquí en donde se evalúa la estabilidad termodinámica del modelo (Figura 20).

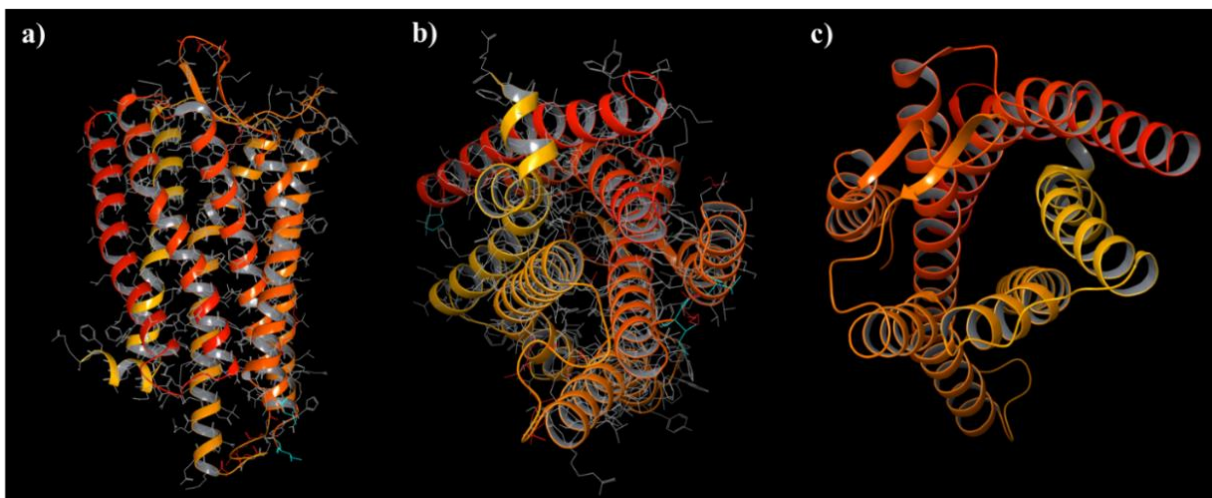


Figura 18. Estructura de NOP (5DHG), plantilla para el modelado de KISS1R. a) Vista frontal b) vista inferior y c) vista superior. El receptor NOP está conformado por 7 dominios transmembranales conectado por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares.

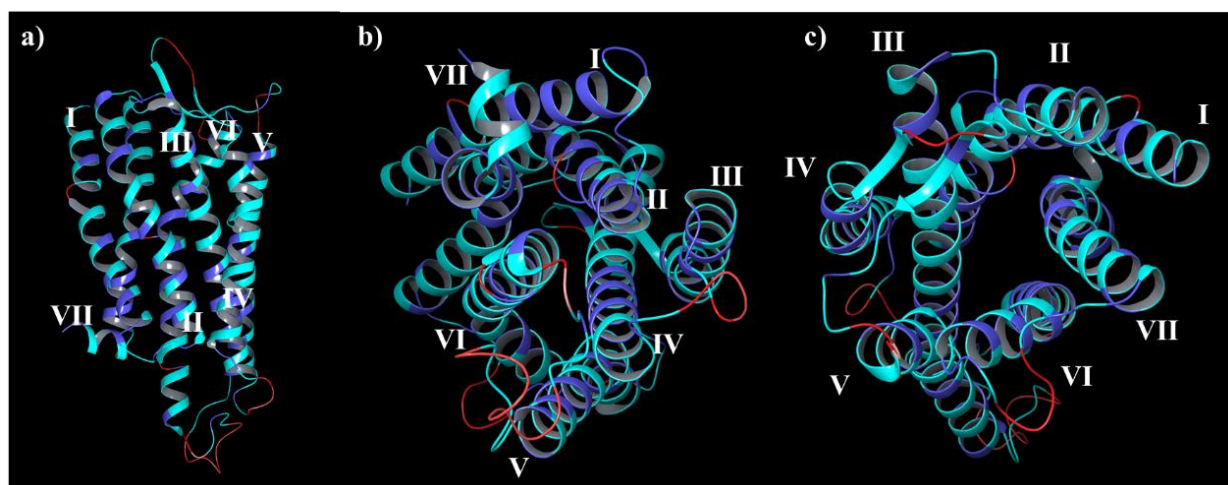


Figura 19. Estructura del modelo crudo de KISS1R modelado por homología. a) Vista frontal b) vista inferior y c) vista superior. Las 7 hélices transmembranales (I-VII) conectadas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. En la segunda asa extracelular hay dos motivos β - plegada antiparalela, localizados entre las hélices IV y V.

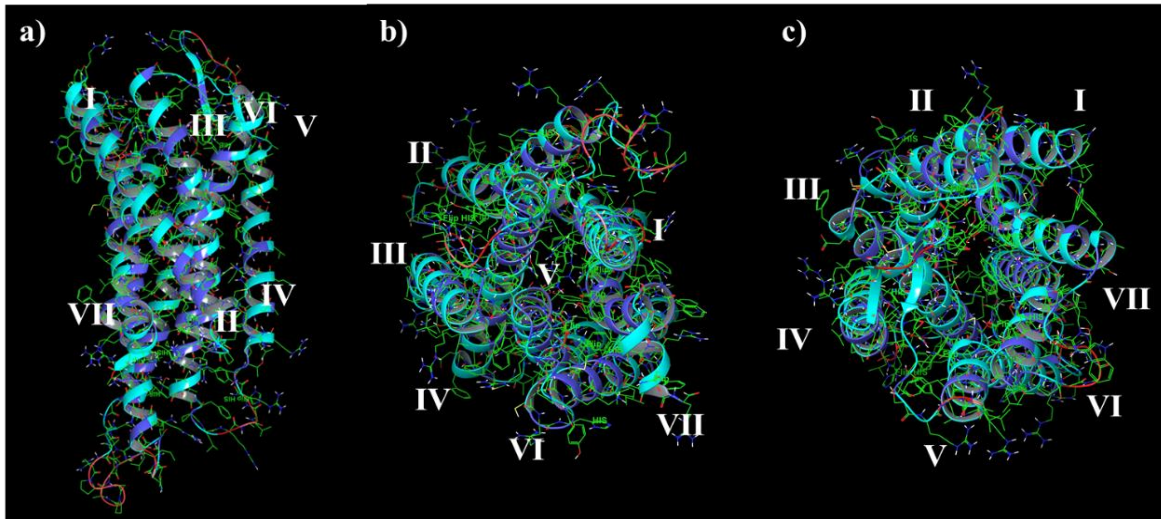


Figura 20. Estructura de KISS1R minimizado modelado por homología. a) vista frontal, b) vista inferior y c) vista superior. Las 7 hélices transmembranales (I-VII) conectadas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. En la segunda asa extracelular hay dos motivos β - plegada antiparalela, localizados entre las hélices IV y V.

Para conocer si el modelo del receptor KISS1R se ajusta a la membrana celular y si hay cambios en él, se introdujo en dos tipos de membrana celular. Debido a que la membrana celular varía en su composición de fosfolípidos e hidratos de carbono, se realizó el modelado en neuronas (Figura 21) y células epiteliales pertenecientes al útero (Figura 22). De manera similar a la anterior es necesario optimizar los modelos y remover las moléculas de agua presentes en la membrana celular.

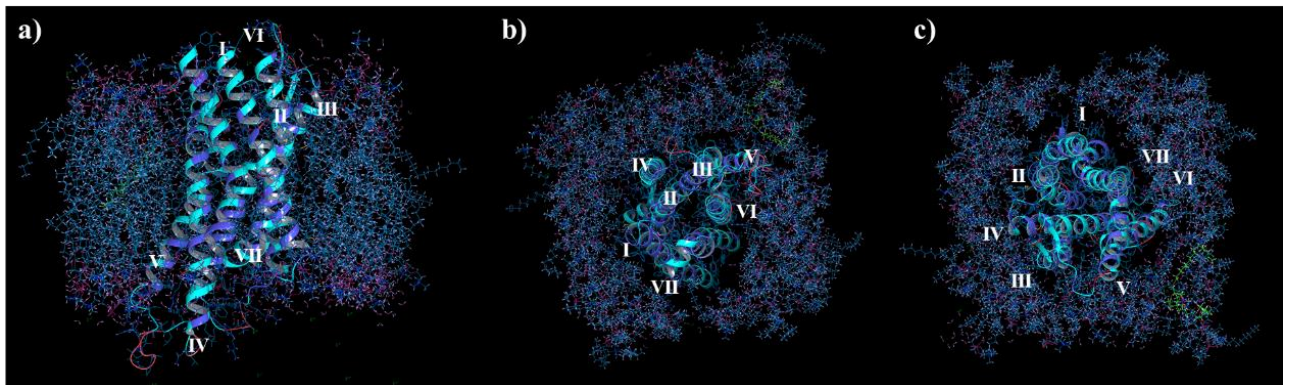


Figura 21. Estructura del modelado de KISS1R dentro de la membrana celular de neuronas. Estructura del modelado de KISS1R dentro de la membrana celular de neuronas. a) vista frontal, b) vista intracelular y c) vista extracelular. Las 7 hélices transmembranales (I-VII) conectadas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. En la segunda asa extracelular hay dos motivos β - plegada antiparalela, localizados entre las hélices IV y V.

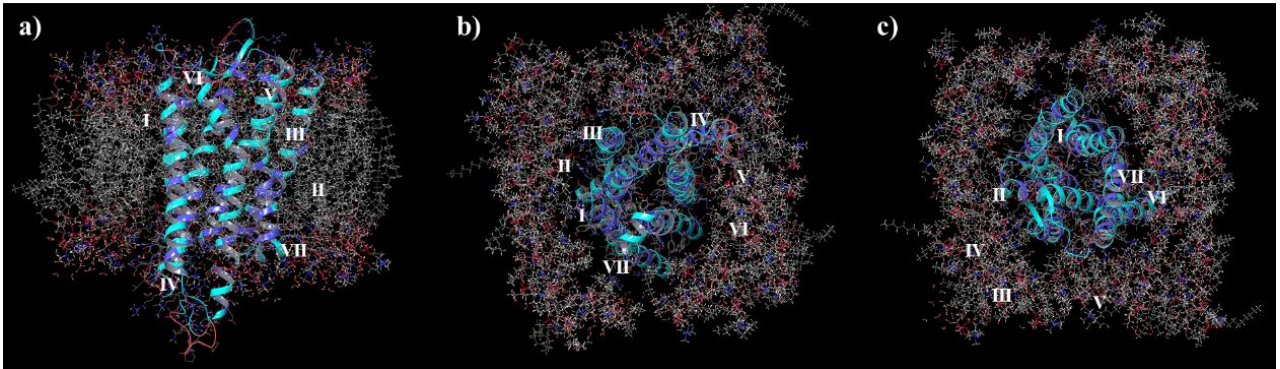


Figura 22. Estructura del modelado de KISS1R dentro de la membrana celular de células epiteliales. a) vista frontal, b) vista intracelular y c) vista extracelular. Las 7 hélices transmembranales (I-VII) conectadas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. En la segunda asa extracelular hay dos motivos β - plegada antiparalela, localizados entre las hélices IV y V.

6.2.2 Modelado de las kisspeptinas y p-234

Las secuencias para generar la estructura 3D de las kisspeptinas se obtuvieron de la KISS1 (Q15726) de la base de datos de UNIPROT. Q15726 es una proteína de 138 aminoácidos de KISS1 que contiene el péptido señal en la posición 1-19, y los sitios de escisión entre las posiciones 66-68 y 122-123-124 que dan lugar a las kisspeptinas (Kp-54, Kp-14, Kp-13 y Kp-10) (Tabla 1). La secuencia aminoacídica del p-234 se basa en la de Kp-10 con sustituciones en la posición 112 Tyr por D-Ala, en la posición 116 se intercambia a Ser por Gly y en la posición 119 Leu por D-Trp (Tabla 1).

El modelado 3D de las kisspeptinas y el p-234 se realizó con la herramienta LigPrep, considerando un Force field OPLS4 y estados de ionización a pH 7.4 ± 2 . (Figura 23).

Tabla 1. Secuencias aminoacídicas de las kisspeptinas y p-234

Nombre	Secuencia	Posición
Kp-138	MNSLVS WQLLLFLCATHF GE PLEKVASVGNSRPTGQ QLE SLG LLAPGEQSLPCTERKPAATARLSRR * GTSLSPPPESSGS R Q Q P G LS A PH S R Q IP A P Q G A VL V Q R E K D L P N Y N W N S F G L R F* G K R E A A P G N H G R S A G R G	1-138
Kp-54	G T SLS P PP E SS G S P Q Q P G LS A PH S R Q IP A P Q G A VL V Q R E K D LP N Y N W N S F G L R F	68-121
Kp-14	D L P N Y N W N S F G L R F	108-121
Kp-13	L P N Y N W N S F G L R F	109-121
Kp-10	Y N W N S F G L R F	112-121
p-234	[(D)-A]N W N G F G [(D)-W]R F	

*Sitios de corte para la formación de Kp-54

En color azul se muestra la secuencia del péptido señal, mientras que en café la secuencia de Kp-54

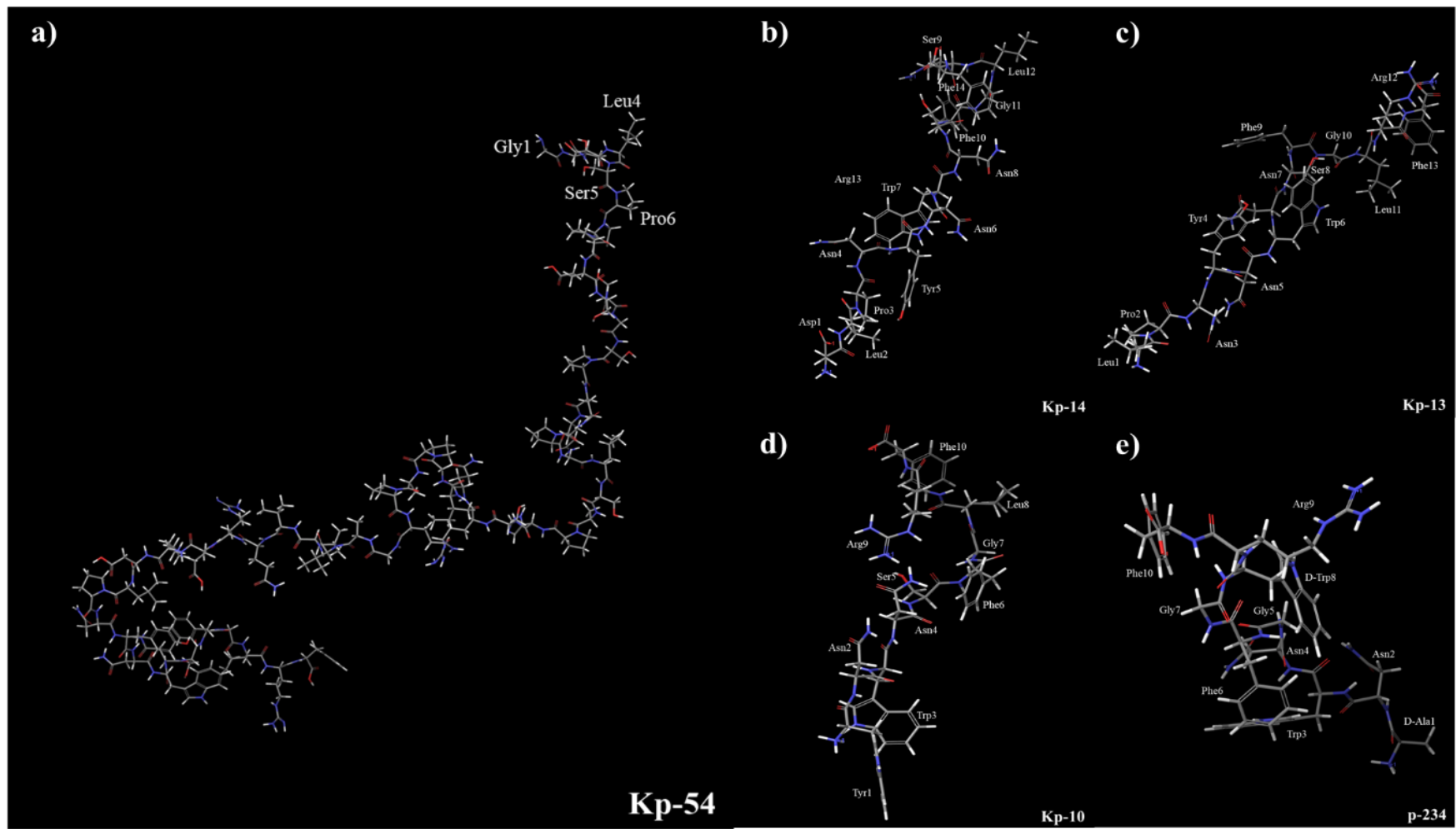


Figura 23. Modelo 3D de las kisspeptinas y p-234. Kp-54 (a), Kp-14 (b), Kp-13 (c), Kp-10 (d) y p-234 (e).

6.2.3 Docking Molecular

Con la ayuda de la plataforma Maestro de Schrödinger se realizó el acoplamiento molecular de Kp-54, Kp-14, Kp-13, Kp-10 y el p-234 con el receptor KISS1R modelados anteriormente. Los resultados de acoplamiento molecular muestran que la interacción de Kp-54, Kp-14 y Kp-13 con el KISS1R ocurre en la cara extracelular del receptor (Figura 24), y se da con los 10 últimos aminoácidos de cada kisspeptina, mientras que Kp-10 y p-234 tienen interacción en la región extracelular e intracelular (Figura 25). Además, Kp-10 y p-234 tienen mayor energía de unión respecto a Kp-54, Kp-14 y Kp-13 (Tabla 2).

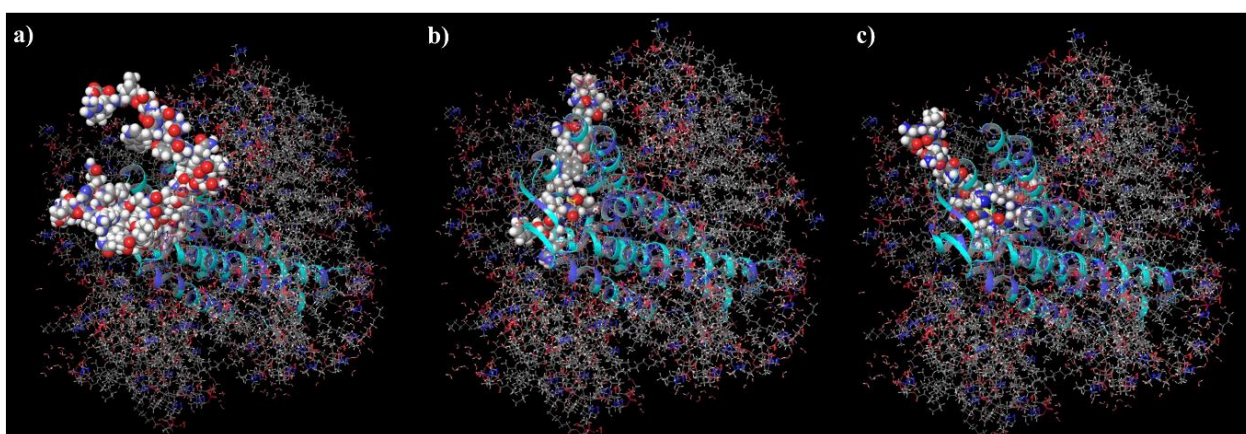


Figura 24. Representación 3D de la interacción de KISS1R con las kisspeptinas y p-234. a) Kp-54, b) Kp-14 y c) Kp-13, en la región extracelular.

Tabla 2. Energías de unión de las kisspeptinas y p-234 con el KISS1R

Péptido	Interacción extracelular Energía de unión (Kcal/mol)	K_D	Interacción transmembranal Energía de unión (Kcal/mol)	K_D
Kp-54	-9.318	2.78×10^{-7}	-5.453	1.5×10^{-4}
Kp-14	-9.697	1.50×10^{-7}	-6.971	1.24×10^{-5}
Kp-13	-9.697	1.50×10^{-7}	-6.987	1.21×10^{-5}
Kp-10	-12.082	3.15×10^{-9}	-7.092	1.02×10^{-5}
p-234	-10.948	1.98×10^{-8}	-9.131	3.76×10^{-7}

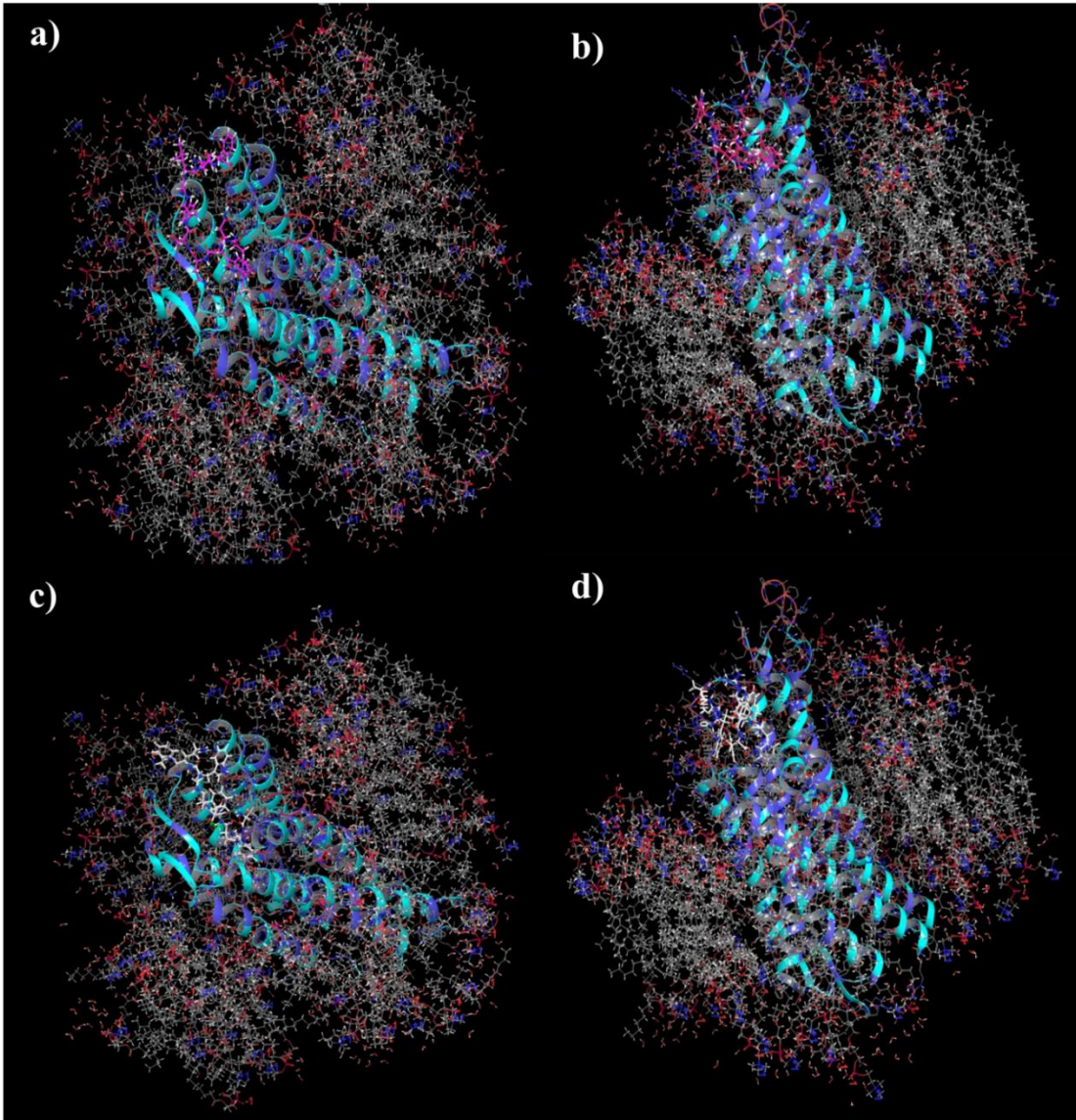


Figura 25. Representación 3D de la interacción de KISS1R con las kisspeptinas y p-234. a) Kp-10 en la región extracelular, b) Kp-10 en la región intracelular, c) p-234 en la región extracelular y d) p-234 en la región intracelular.

La Kp-10 en la región extracelular forma interacciones con los residuos aminoacídicos Asp41, Tyr190, Gly186, Ser192, Glu193, Glu201 y Lys305 (Figura 26a), mientras que p-234 tiene interacción con Asp41, Arg188, Pro296, Lys305, Phe195 y Lys305 (Figura 26b). Por otro lado, en la región intracelular Kp-10 tiene interacción con His329, Glu252, Arg154 y Glu252 (Figura 27a), y p-234 con los residuos aminoacídicos His329, Lys71, Pro147, Arg154 y Leu148 (Figura 27b).

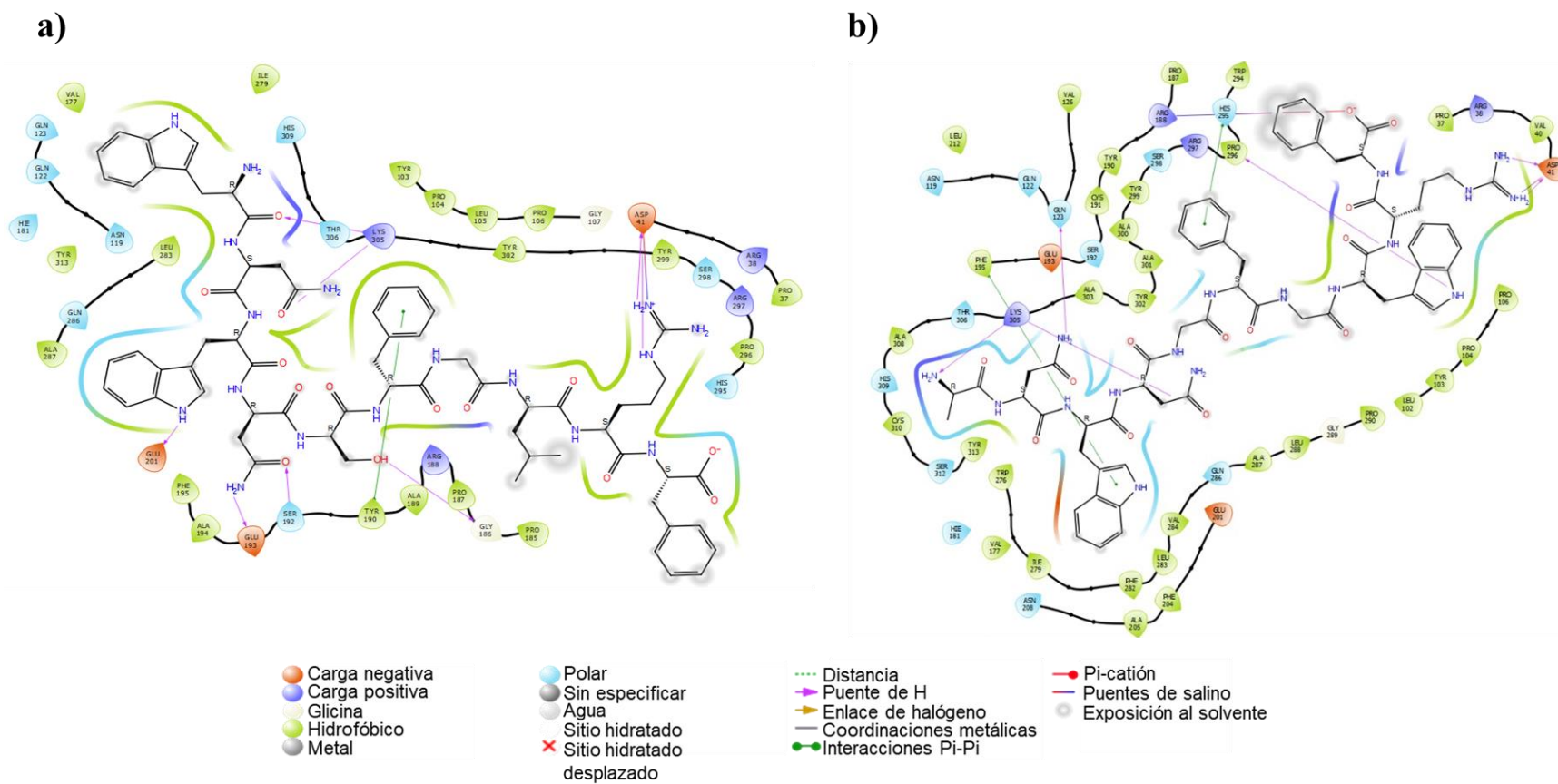


Figura 26. Representación 2D de la interacción de KISS1R/Kp-10 y KISS1R/p-234. a) Kp-10 y b) p-234 en la región extracelular.

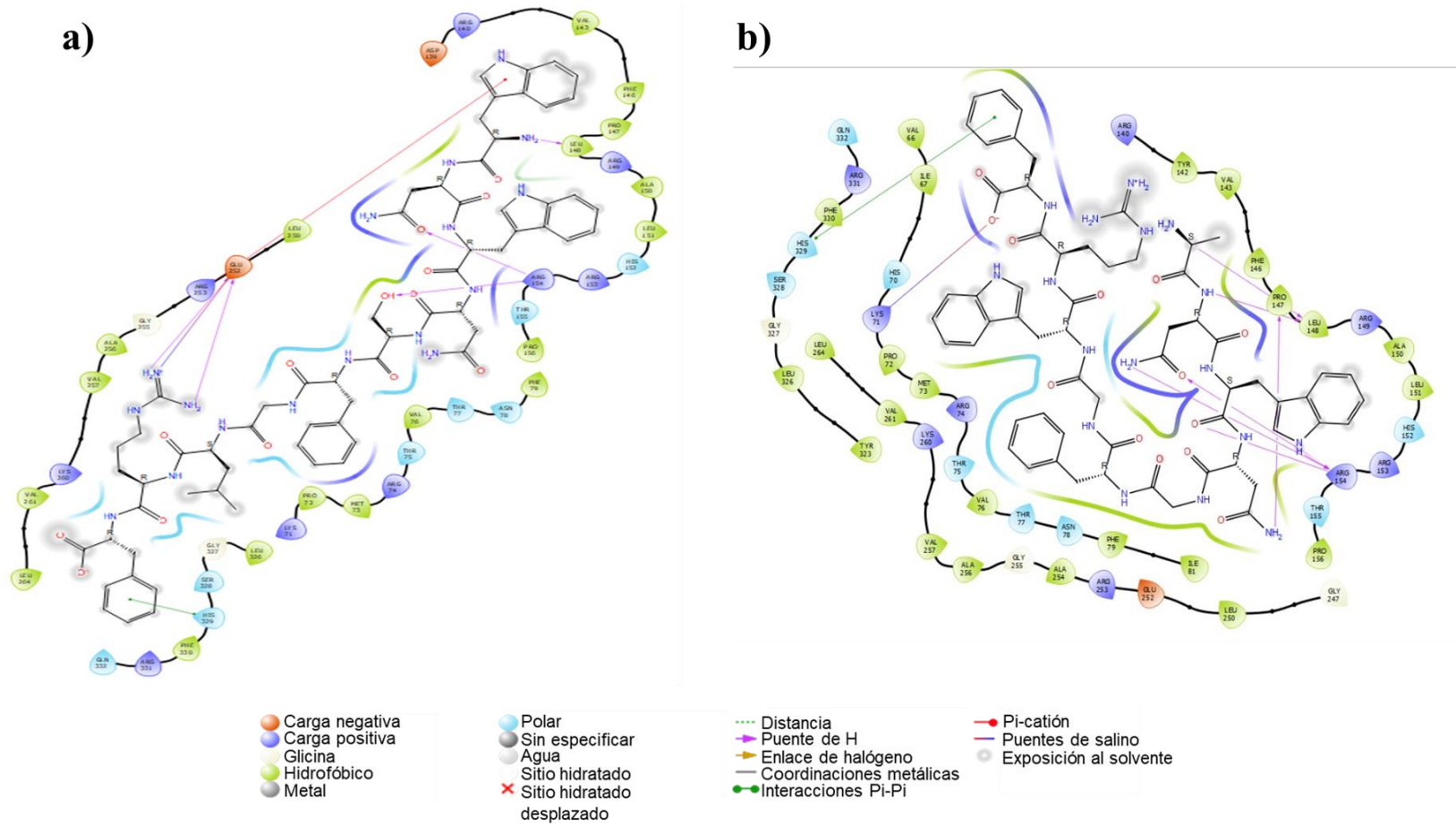


Figura 27. Representación 2D de la interacción de KISS1R/Kp-10 y KISS1R/p-234. a) Kp-10 y b) p-234 en la región intracelular.

7 Discusión

El útero es un órgano importante en la reproducción de los mamíferos, por lo que un desarrollo adecuado es esencial para que pueda desempeñar sus funciones. El conocer la participación de nuevos moduladores nos permite estudiar y comprender nuevos mecanismos de su desarrollo y funciones. Por lo cual, los resultados obtenidos en este trabajo muestran la importancia de los receptores Kiss1r en el desarrollo celular del útero de la rata. Además, de describir el sitio de interacción del antagonista p-234/KISS1R en un modelo de membrana epitelial.

7.1 Efecto de la administración del antagonista p-234 en el útero

Mediante inmunohistoquímica se localizó al receptor Kiss1r en el epitelio luminal y glandular del endometrio y en las fibras musculares del miometrio del útero de rata Wistar a la edad de la PAV. Esta localización coincide con otros trabajos en donde se ha encontrado al Kiss1r en el epitelio luminal y glandular de ratonas preñadas (Zhang *et al.*, 2014) y en edades prepuberales se ha reportado la presencia del ARNm de Kiss1r en el útero (D'Anglemont *et al.*, 2007). Por lo que la presencia del receptor Kiss1r en estas células sugiere un papel en la proliferación celular uterina.

Debido a que el desarrollo uterino es posnatal y esta caracterizado por la adenogénesis (Gray *et al.*, 2001; Kelleher *et al.*, 2019), la hipótesis antes mencionada se ve apoyada con los resultados del análisis morfométrico realizado en el presente trabajo y en donde se observa una clara disminución en el grosor del endometrio de los grupos que recibieron el antagonista p-234 a las concentraciones de 1nM y 10nM. Es posible relacionar el efecto encontrado al bloqueo del receptor Kiss1r con p-234, ya que de acuerdo con el mecanismo de señalización este puede activar la vía de las MAPK, ERK1/2 y p38 (Kotani, *et al.*, 2001; Pinilla *et al.*, 2012), involucrados en la proliferación celular (Huma *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019). En trabajos con cultivos celulares de células epiteliales mamarias bovinas se ha observado que el p-234 puede tener efectos anti-proliferativos (Li *et al.*, 2019), estos datos apoyan nuestra hipótesis. En el caso del miometrio y perimetrio, en donde también está presente el receptor Kiss1r, también se puede observar una disminución del grosor, y podríamos sugerir que el bloqueo por parte del p-234 causa efectos similares al endometrio,

sin embargo, no hay datos en este tipo celular que lo respalden. Por lo cual se sugiere que el efecto de la disminución del grosor del endometrio es debido al antagonismo del receptor Kiss1r por p-234.

Por otro lado, el número de glándulas endometriales disminuye en los animales administrados con p-234 al P24 por lo que se propone que este evento también está relacionado con el bloqueo de Kiss1r por p-234. Se sabe que hay un incremento del ARNm de Kiss1r entre el P8 y P15 (Funes *et al.*, 2013), evento que coincide con la formación de glándulas uterinas (Spencer *et al.*, 2005) y en roedores la adenogénesis posnatal es independiente de la señalización por estradiol. León *et al.*, (2016) mostraron que en ratonas KO a KISS1 al P21 hay una disminución significativa glándulas uterinas, sugiriendo que el desarrollo de las glándulas en edades posnatales es independiente del estradiol ovárico, pero dependiente de la señalización Kiss1-Kiss1R uterina (León *et al.*, 2016, Radovick & Babwah 2019).

En la semi-cuantificación del receptor Kiss1r en el útero, observamos que no hay una diferencia significativa entre los diferentes grupos de este estudio. Esto probablemente se deba a que la expresión transmembranal del Kiss1r no está en función de la activación del receptor. A nivel ovárico se ha observado que Kiss1r no tiene fluctuación en su expresión durante el ciclo estral de la rata mientras que, el ARNm de Kiss1 si fluctúa, por lo que se sugiere que algo similar podría estar ocurriendo en el útero (Castellano *et al.*, 2006). Por lo que se considera que el p-234 ejerce únicamente una función de antagonista sin participar en la modulación de la expresión del Kiss1r.

Otro parámetro evaluado fue la PAV como marcador del inicio de la pubertad en roedores. La PAV es causada por un proceso apoptótico en las células epiteliales vaginales desencadenado por niveles elevados de estrógenos debido al primer estro. En las ratas Wistar la PAV oscila entre 33.4 ± 1.2 y 41.6 ± 3.7 días (Rivest, 1991), compatible con la PAV observada para el grupo control y vehículo (40.6 ± 1.6 y 41 ± 1.9 , respectivamente), mientras que la administración al P24 del p-234 1 nM causa un retraso sobre la PAV. Se sabe que la administración intracerebroventricular (icv) del p-234 puede retrasar la PAV en ratas, por lo que el p-234 inhibe la secreción de GnRH, retrasando de manera central el inicio de la pubertad y por ende la PAV (Navarro *et al.*, 2004). También, se ha mostrado que la PAV puede ser retrasada por la administración directa del p-234 en ovario (Ricu *et al.*, 2012), lo

que implica una señalización periférica de Kiss1/Kiss1r, puesto que el p-234 por sí solo no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y se debe añadir una etiqueta de penetratina, un péptido de penetración celular catiónico que facilita el paso de p-234 a través de la barrera hematoencefálica (Pineda *et al.*, 2010). Sin embargo, el mecanismo por el cual se retrasa la PAV en los animales administrados con p-234 1 nM se desconoce. Al haberse realizado una administración *in situ* podría sugerirse un efecto local, es decir, que la inmadurez del útero de los animales pertenecientes al grupo p-234 1 nM tenga un efecto negativo sobre la PAV y la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas haya ocurrido a la edad promedio establecida. No obstante, al medir otros índices como el peso de los ovarios y del útero (datos no mostrados) no se encontraron diferencias significativas, aunque la edad del grupo p-234 1 nM sea mayor, por lo que puede proponerse una señalización de tipo sensorial del útero hacia hipotálamo. Hay estudios que sugieren que Kiss1/Kiss1r participa en la señalización sensorial y nocicepción; Spampinato, *et al.*, (2011) mostraron que la administración de p-234 causa analgesia mientras que Kiss1 provoca hiperalgesia y activa la fosforilación en la Ser800 del TRPV1, por otro lado, se sabe que la denervación sensorial inducida con capsaicina (ligando exógeno del TRPV1) tiene efectos sobre el inicio de la pubertad (Morán, *et al.*, 2003; Alatraste, *et al.*, 2013). Sin embargo, los datos obtenidos son insuficientes para establecer un mecanismo por el cual ocurre el retraso de la PAV.

7.2 Análisis *in silico* del receptor KISS1R

Para el análisis *in silico* se construyó el modelo 3D del receptor KISS1R usando como plantilla al receptor NOP, un receptor GPCR con un porcentaje de homología con KISS1R del 80%. Para realizar el docking molecular se incrustó el modelo 3D del KISS1R en un modelo de membrana de célula epitelial. Lo anterior se consideró como un parámetro más que nos acerca al comportamiento del KISS1R en un sistema biológico, en donde tendrá interacción no solo con el ligando, sino también con moléculas de agua, colesterol y ácidos grasos que conforman la membrana celular. La elección de este modelo de membrana epitelial se debe a que la localización del KISS1R en el útero, se da principalmente en el epitelio luminal y glandular según lo reportado por otros autores (Zhang *et al.*, 2014; D'Anglemont *et al.*, 2007) que coinciden con los datos aquí mostrados (Figura 2).

Los resultados obtenidos en el *docking* molecular muestran que todas las kisspeptinas tienen interacción con el receptor KISS1R en la región extracelular. En los casos de Kp-54, Kp-14 y Kp-13 se pudo observar que los aminoácidos que tienen interacción directa con el receptor son los 10 últimos cercanos a la región RF-amida, o bien Kp-10. En diferentes estudios se ha determinado que la región RF-amida es importantes para la actividad biológica de las kisspeptinas (Niida *et al.*, 2006; Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2009; Orsini *et al.*, 2007), y este trabajo coincide en que es esta región la que tiene interacción con el KISS1R.

La longitud de las kisspeptinas muestra una relación con las energías de unión al KISS1R (Tabla 2), siendo Kp-10 la que tiene una mayor energía de unión por lo que se une más fácilmente al receptor. Además, la forma 3D de las kisspeptinas también tienen un papel importante para que se pueda llevar a cabo su interacción con el receptor KISS1R. En el caso de Kp-10 y Kp-13 se ha determinado que entre los residuos Asn4 y Tyr10 se observa una estructura helicoidal (Niida *et al.*, 2006; Orsini *et al.*, 2007) y si bien en el caso de Kp-54 no se ha determinado la estructura definida si se observó una estructura helicoidal en los últimos 7 residuos pertenecientes a la región RF-amida (Shin *et al.*, 2009), por lo que estructura helicoidal también es importante para la interacción ligando-receptor.

Por otro lado, la interacción del p-234 con KISS1R también ocurre en la región extracelular. Si bien el p-234 conserva la región RF-amida, la sustitución de Leu3 por D-Trp y Tyr10 por D-Ala, modifica la estructura helicoidal antes mencionada. Kp-10 y p-234 tienen interacción con los residuos Asp41 y Lys305. En el bolsillo de unión de Kp-10 y de p-234 encontramos aminoácidos como Arg38, Tyr103, Ala287, Arg297 y Tyr313 (Figura 9), por lo que podemos concluir que todas las kisspeptinas y el p-234 comparten el mismo sitio de unión. La existencia de mutaciones en los residuos antes mencionados son la causa de patologías como el hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (Ke & Lee, 2019). En el caso de Tyr313 se trata de un aminoácido totalmente conservado entre especies que forma puentes de hidrogeno con Cys95 y Thr99 permitiendo la adecuada formación del bolsillo de unión (Brioude *et al.*, 2013).

En cuanto a la energía de unión del p-234 (Tabla 2) si bien es menor a la de Kp-10, es mayor respecto a Kp-54, Kp14 y Kp-13 razón por la cual es un potente antagonista. Se sugiere que el p-234 actúa como un antagonista competitivo reversible, puesto que las interacciones que tiene con el receptor son principalmente puentes de hidrogeno y no se observaron enlaces

covalentes. El antagonista p-234 es capaz de revertir el efecto causado por la administración de Kp-10 (Roseweir *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2017), por lo que la interacción del p-234 con el receptor KISS1R estará en función no solo de la concentración de este sino también de las kisspeptinas. Y los resultados obtenidos en la evaluación morfométrica del útero están relacionados con el antagonismo que ejerce el p-234 sobre el Kiss1r.

8 Conclusiones

El receptor Kiss1r se localiza en el epitelio luminal y glandular del endometrio, y en las células musculares del miometrio del útero de rata Wistar a la PAV. La administración del p-234 en el útero de rata Wistar al P24 disminuye el grosor del endometrio, miometrio y perimetrio, además de retrasar la PAV.

Mediante *docking* molecular se determinó que el p-234 y las kisspeptinas comparten el mismo sitio de unión en donde se encuentran los aminoácidos Arg38, Tyr103, Ala287, Arg297 y Tyr313, por lo que se sugiere el p-234 ejerce un antagonismo competitivo sobre el receptor Kiss1R. Por lo que el antagonismo de p-234 es efectivo teniendo un efecto negativo en el desarrollo uterino de nuestras ratas.

9 Referencias

1. 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. DOI: 10.4236/arsci.2013.13005
2. Ballón, P. W. G. & Grados, T. R. E. (2019). Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *CON-CIENCIA*, 7(2), 55-72. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006&lng=es&tlng=es.
3. Bianco, S. D. & Kaiser, U. B. (2013). Molecular biology of the kisspeptin receptor: signaling, function, and mutations. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 784, 133–158. DOI: 10.1007/978-1-4614-6199-9_7
4. Brioude, F., Bouligand, J., Francou, B., Fagart, J., Roussel, R., Viengchareun, S., Combettes, L., Brailly-Tabard, S., Lombe`s, M., Young, J. & Guiochon-Mantel, A. (2013) Two Families with Normosmic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Biallelic Mutations in KISS1R (KISS1 Receptor): Clinical Evaluation and Molecular Characterization of a Novel Mutation. *PLoS ONE* 8(1): e53896. DOI:10.1371/ journal.pone.0053896
5. Calder, M., Chan, Y. M., Raj, R., Pampillo, M., Elbert, A., Noonan, M., Gillio-Meina, C., Caligioni, C., Bérubé, N. G., Bhattacharya, M., Watson, A. J., Seminara, S. B., & Babwah, A. V. (2014). Implantation failure in female Kiss1^{-/-} mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. *Endocrinology*, 155(8), 3065–3078. DOI: 10.1210/en.2013-1916
6. Cao, Y., Li, Z., Jiang, W., Ling, Y., & Kuang, H. (2019). Reproductive functions of Kisspeptin/KISS1R Systems in the Periphery. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 17(1), 65. DOI: 10.1186/s12958-019-0511-x
7. 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. DOI: 10.1210/en.2006-0117
8. Cavasotto, C. N. & Palomba, D. (2015). *Chem. Commun.* DOI: 10.1039/C5CC05050B
9. Cejudo Roman, A., Pinto, F. M., Dorta, I., Almeida, T. A., Hernández, M., Illanes, M., Tena-Sempere, M., & Candenas, L. (2012). Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract. *Fertility and Sterility*, 97(5), 1213-1219. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.02.021
10. Clements, M. K., McDonald, T. P., Wang, R., Xie, G., O'Dowd, B. F., George, S. R., Austin, C. P. & Liu, Q. (2001). FMRFamide-related neuropeptides are agonists of the

- orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 248(5), 1189-1193. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5098
11. Cooke, P. S., Spencer, T. E., Bartol, F. F. & Hayashi, K. (2013). Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 547-558. DOI: 10.1093/molehr/gat031
 12. D' Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L. A., Dixon, J. P. C., Day, K., Leitch, H. G., Hendrick, A. G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M. B. L., Aparicio, S. & Colledge, W. H. (2007). Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *PNAS*, 104(25), 10714-10719. DOI: 10.1073/pnas.0704114104
 13. Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G. & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(7), 13384–13421. DOI: 10.3390/molecules200713384
 14. Funes, S., Hedrick, J. A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F. J. & Gustafson, E. L. (2003). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and biophysical research communications*, 312(4), 1357-1363. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.11.066
 15. Gottsch, M. L., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. (2009). From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclatura. *Peptides*, 30 (1), 4-9. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.06.016
 16. 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>
 17. Gutiérrez-Pascual, E., Leprince, J., Martínez-Fuentes, A. J., Ségalas-Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., Duran-Prado, M., Guilhaudis, L., Desperrois, E., Lebreton, A., Pinilla, L., Tonon, M. C., Malagón, M. M., Vaudry, H., Tena-Sempere, M. & Castaño, J. P. (2009). In vivo and in vitro structure-activity relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides. *Molecular pharmacology*, 76(1), 58-67. DOI: 10.1124/mol.108.053751
 18. Hu, K. L., Zhao, H., Chang, H. M., Yu, Y. & Qiao, J. (2018). Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in the Ovary. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 365. DOI: 10.3389/fendo.2017.00365
 19. Huma, T., Wang, Z. B., Rizak, J., Ahmad, F., Shahab, M., Ma, Y., Yang, S. & Hu, X. (2013). Kisspeptin-10 modulates the proliferation and differentiation of the rhesus monkey derived stem cell line: R366.4. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-7, DOI: 10.1155/2013/135470
 20. Izzi-Engbeaya, C., Hill, G. T. & Bowe, E. J. (2019). Kisspeptin and Glucose Homeostasis. *Seminars Reproductive Medicine*, 37(03), 141-146. DOI: 10.1055/s-0039-3400242

21. Jin X. (2006). *Essential Bioinformatics*. United States of America Cambridge University Press.
22. 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. DOI: 10.1016/j.tins.2007.08.001
23. Ke, R., Ma, X. & Lee, L. (2019). Understanding the functions of kisspeptin and kisspeptin receptor (Kiss1R) from clinical case studies. *Peptides*, 120, 170019. DOI: 10.1016/j.peptides.2018.09.007
24. Kelleher, A. M., DeMayo, F. J. & Spencer, T. E. (2019). Uterine Glands: Developmental Biology and Functional Roles in Pregnancy. *Endocrine Reviews*, 40(5), 1424-1445. DOI: 10.1210/er.2018-00281
25. Kirby, H. R., Maguire, J. J., Colledge, W. H. & Davenport, A. P. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 565-578. DOI: 10.1124/pr.110.002774
26. Kotani, M., Detheux, M., Vandenberghe, A., Communi, D., Vanderwinden, J. M., Le Poul, E., Brezillon, 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. *The Journal Biological Chemistry*, 276(37), 34631-34636. DOI: 10.1074/jbc.M104847200
27. Lee, D. K., Nguyen, T., O'Neill, G. P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A. D., Coulombe, N., Tan, C. P., Tang-Nguyen, A.-T., George, S. R. & O'Dowd, B. F. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Letters*, 446(1), 103-107. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00009-5
28. Lee, J. H., Miele, M. E., Hicks D. J., Phillips K. K., Trent, J. M., Weissman, B. E. & Welch, D. R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of National Cancer Institute*, 88(23), 1731-1737. DOI: 10.1093/jnci/88.23.1731
29. 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. DOI: 10.1038/srep29073
30. Li, Y., Cao, Y., Wang, J., Fu, S., Cheng, J., Ma, L., Zhang, Q., Guo, W., Kan, X. & Liu, J. (2019). Kp-10 promotes bovine mammary epithelial cell proliferation by activating GPR54 and its downstream signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5): 4481-4493. DOI: 10.1002/jcp.29325
31. Millar, R., P. & Babwah, A. V. (2015). KISS1R: Hallmarks of an Effective Regulator of the Neuroendocrine Axis. *Neuroendocrinology*, 101, 193-210. DOI: 10.1159/000381457

32. Morán C, Morales L, Razo RS, Apolonio J, Quiróz U, Chavira Ry Domínguez R. Effects of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. *Life Science*, 2003. 73, 2113-25.
33. Muhammed, M. T. & Aki-Yalcin, E. (2019). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(1), 12-20. DOI: 10.1111/cbdd.13388
34. Muir, A. I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N. A., Michalovich, D., Moore, D. J., Calamari, A., Szekeres, P. G., Sarau, H. M., Chambers, J. K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J. E., Middleton, S. E., Darker, J. G., Larminie, C. G., Wilson, S., Bergsma, D. J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K. L. & Harrison, D. C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KISS-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 28969-28975. DOI: 10.1074/jbc.M102743200
35. Navarro, V. M., Fernández-Fernández, R., Castellano, J. M., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M. L., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C. & 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. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.072298
36. Niida, A., Wang, Z., Tomita, K., Oishi, S., Tamamura, H., Otaka, A., Navenot, J. M., Broach, J. R., Peiper, S. C. & Fujii, N. (2006). Design and synthesis of downsized metastin (45-54) analogs with maintenance of high GPR54 agonistic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(1), 134-137. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.09.054
37. Oakley, A. E., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. (2009). Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews*, 30(6), 713-743. DOI: 10.1210/er.2009-0005
38. Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O. & Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene kiss-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411, 613-617. DOI: 10.1038/35079135
39. Orsini, M. J., Klein, M. A., Beavers, M. P., Connolly, P. J., Middleton, S. A. & Mayo, K. H. (2007). Metastin (KiSS-1) mimetics identified from peptide structure-activity relationship-derived pharmacophores and directed small molecule database screening. *Journal of medicinal chemistry*, 50(3), 462-471. DOI: 10.1021/jm0609824
40. Padilla, Z. J. A. & Rojo, D. A. (2002). Simulación del reconocimiento entre proteínas y moléculas orgánicas o docking. Aplicación al diseño de fármacos. *Mensaje Bioquímico UNAM*. XXVI. 129-145.
41. Pasquier, J., Kamech, N., Lafont, A. G., Vaudry, H., Rousseau, K. & Dufour, S. (2014). Molecular evolution of GPCRS: Kisspeptin/kisspeptin receptors. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(3), T101-T117. DOI: 10.1530/JME-13-0224

42. Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Roseweir, A., Romero, M., Sanchez-Garrido, M. A., Ruiz-Pino, F., Morgan, K., Pinilla, L., Millar, R. P. & Tena-Sempere, M. (2010). Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology*, 151(2), 722–730. DOI: 10.1210/en.2009-0803
43. Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, P. R. & Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. *Physiological Reviews*, 92(3), 1235-1316. DOI: 10.1152/physrev.00037.2010
44. 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>
45. Radovick, S. & Babwah, A. V. (2019). Regulation of Pregnancy: Evidence for Major Roles by the Uterine and Placental Kisspeptin/KISS1R Signaling Systems. *Seminars in Reproductive Medicine* 37(4), 182-190. DOI: 10.1055/s-0039-3400966
46. 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. DOI: 10.1210/en.2012-1279
47. Rivest, R. W. (1991). Sexual maturation in female rats: hereditary, developmental and environmental aspects. *Experientia*. 15;47(10):1027-38. doi: 10.1007/BF01923338.
48. Roseweir, A. K., Kauffman, A. S., Smith, J. T., Guerriero, K. A., Morgan, K., Pielecka-Fortuna, J., Pineda, R., Gottsch, M. L., Tena-Sempere, M., Moenter, S. M., Terasawa, E., Clarke, I. J., Steiner, R. A. & Millar, R. P. (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *The Journal of Neuroscience*, 29(12), 3920-3929. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5740-08.2009
49. Shin, R., Welch, D. R., Mishra, V. K., Nash, K. T., Hurst, D. R. & Krishna, N. R. (2009). Nuclear magnetic resonance and circular dichroism study of metastin (Kisspeptin-54) structure in solution. *Clin Exp Metastasis* 26:527–533. DOI: 10.1007/s10585-009-9252-0
50. 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
51. Spencer, T. E., Dunlap, K. A., & Filant, J. (2012). Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption. *Molecular and cellular endocrinology*, 354(1-2), 34–53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.035>
52. Spencer, T. E., Hayashi, K., Hu, J. & Carpenter, K. D. (2005). Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Current topics in Developmental Biology*, 68, 85-122. DOI: 10.1016/S0070-2153(05)68004-0
53. Sun, J., Liu, J., Huang, B., Kan, X., Chen, G., Wang, W., & Fu, S. (2017). Kisspeptin-10 Induces β -Casein Synthesis via GPR54 and Its Downstream Signaling Pathways in

- Bovine Mammary Epithelial Cells. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2621. DOI: 10.3390/ijms18122621
54. Tng E. L. (2015). Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore medical journal*, 56(12), 649–656. <https://doi.org/10.11622/smedj.2015183>
 55. Trevisan, C. M., Montagna, E., de Oliveira, R., Christofolini, D. M., Barbosa, C. P., Crandall, K. A. & Bianco, B. (2018). Kisspeptin/GPR54 System: What Do We Know About Its Role in Human Reproduction? *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(4), 1259-1276. DOI: 10.1159/000493406
 56. Wu, F., Song, G., de Graaf, C. & Stevens, R. C. (2017). Structure and Function of Peptide-Binding G Protein-Coupled Receptors. *Journal of Molecular Biology*, 429(17), 2726-2745. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.06.022
 57. 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(5), e97647. DOI: 10.1371/journal.pone.0097647