



Facultad de Ciencias

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas

“ADMINISTRACIÓN LOCAL DE KISSPEPTINA EN EL OVARIO DE RATAS ADULTAS: IMPLICANCIAS EN EL DESARROLLO FOLICULAR Y OVULACIÓN”

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

Leandro Maximiliano Contreras Rojas

Director de Tesis: **Dr. Gonzalo Cruz Neculpán**

Codirector de Tesis: **Dr. Hernán Lara Peñaloza**

2016

*Esta tesis va dedicada
a mi familia, mis amigos y a
mi pareja... ustedes hacen
que todo valga la pena.*

Agradecimientos

En el transcurso de esta aventura que fue la Universidad una verdadera muchedumbre de personas cruzaron su camino conmigo, compartieron una parte de su vida y me ayudaron a ser la persona que soy ahora. Probablemente injusto será mi homenaje, ya que solo mencionare por nombres a los pocos que mi mente divagante recuerde en este momento, sumado al breve espacio que dicho reconocimiento puede tomar en el presente trabajo, pero tómense por aludidos todos aquellos que alguna vez cruzaron sus caminos conmigo y compartieron más que un simple saludo.

En primer lugar debo agradecer a mi tío **Arturo Gómez** y su maravillosa familia, sin su desinteresado y realmente heroico apoyo y tolerancia, creo que jamás podría haber comenzado mi aventura en la Universidad de Valparaíso. Mi deuda de gratitud con ellos es eterna.

De mi liceo, el IRFE, debo agradecer a todos, pero en especial a **Alex Herrera**, **María Inés Vega** y **Carlos Zumaeta**. También a mis profesores **Manuel Zabala** y **Robinson Tapia** quienes me dieron el primer empujón a la hora de decantarme por una carrera científica.

Amigos de Sta. Cruz... **Mitchell**, **Chipe**, **Chispa**, **Mante**, **Pape**, **José**, **Alan**, etc... con el tiempo terminamos tomando rumbos diferentes, pero todavía conservamos la chispa de una buena historia, de una interesante película y de una loca

conversación filosófica/Geek. Ustedes amigos no son demasiados, pero son los precisos ☺.

Agradezco a mis maestros con especial mención en ningún orden concreto a **Leticia Luna, Caroline Weinstein, Patricia Carreño, Patricia Acuña y Georgina Sánchez**. Ustedes marcaron un antes y un después en mi vida académica y personal, y si es verdad el dicho que dice que a la Universidad la hacen sus maestros, entonces Química y Farmacia en la UV es la mejor de Chile.

Gracias a mis amigos y compañeros de aventura en Valparaíso y sus alrededores, en especial a **Raúl Riquelme, Favián Uribe, Carlos Andrade, Andrés Novoa, Cristian Amaral, Viviana Herrera, Daniela Iturra, Victoria Correa, Katherine Loaiza, Natalya Díaz y Patricia Henríquez**. Con ustedes tengo los recuerdos más psicodélicos y delirantes de mi vida porteña.

Necesito manifestar mi gratitud también a mis compañeros, amigos y casi hermanos de Farmacia, entre algunos con los que más he compartido a **Claudia Álamos** (tu familia fue casi mi segunda familia en la distancia y tú eres mi primera amiga en Farmacia, muchas gracias), **Favián** y **Raúl** (gracias amigos/hermanos por acompañarme todos estos años), **Claudia Castro, Naty, Andrea** (Gracias por todo el apoyo y amistad brindados) y en especial a mi amiga **Eva Verdejo** (gracias por tratar de entender mi locura y prestarme tu apoyo y ayuda cuando más lo necesité, eres una joya como persona y me siento muy honrado de poder decir que soy tu amigo).

Fuera del ámbito académico agradezco a **Alejandra, Gizeth y Romina** por su amistad y ayuda constantes y a **Javier** (Aceituno), **Marcos, Simon y Pedro** por la amistad, el cariño y las decenas de conversaciones interesantísimas que hemos compartido.

Gracias con todo el afecto del mundo también para **Cristina Pedraza** y a su familia por ser un apoyo incondicional durante la duración de la carrera, por darme la mano cuando no tenía más opciones incontables veces y por ser la familia más cariñosa y solidaria que conozco, al extremo de acogerme en su hogar cuando no tuve un techo que me cubriera. Ojala pudiese algún día retornar tanto cariño, preocupación y afecto, pero mientras tanto solo puedo decir gracias por ser mi ángel de la guarda.

Gracias a todas en Secretaría de Estudios y disculpa **Susan** por ser tu peor pesadilla académica, ojala no te vuelva a tocar otro como yo porque ahí sí que te saldrían canas verdes.

Gracias a mi polola **Isabella Contreras** por ser un pilar en mi vida, por ayudarme y entenderme, por amarme a pesar de mis innumerables defectos, por estar allí para mí siempre y sobre todo, por ser quien eres. Te amo.

Agradezco al **Dr. Hernán Lara** la oportunidad, la confianza y la casi infinita paciencia puesta en mí para la realización de este trabajo, lamento profundamente no haber podido cumplir todas las expectativas que se tenían de mí y deseo

expresarle mis más sinceras disculpas por la insuficiente presteza que hubiera sido deseable en la realización del mismo.

Gracias a todas las chicas y chicos presentes y pasados del **LARM** y alrededores, en especial al **Dr. Gonzalo Cruz** por su amistad, su ayuda, sus enseñanzas y su inquebrantable fe en mí persona. No habría llegado hasta acá de no haber sido por todos ellos.

Finalmente y por sobre todo agradezco a mis padres, que aún en situación de carencia, supieron criarnos, educarnos, alimentarnos y guiarnos a mi hermana y a mí en este largo camino, apoyo que incluso en la distancia marcó la diferencia, ya sea con un consejo sabio o con alguna ayuda pecuniaria. Ellos son en gran parte la razón por la que pude salir adelante. Al final, a pesar de todas las adversidades ¡sí se pudo amados padres! Gracias por ser el pilar fundamental de mi existencia y porque a pesar de la distancia, nunca se han movido de nuestro lado.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por el Proyecto del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (**FONDECYT**) **Nº 1130049**: “Neuroendocrine regulation of the rat ovary: Prenatal exposure to sympathetic stress and its transgenerational effects on the reproductive function of the progeny” cuyo director responsable es el **Dr. Hernán Enrique Lara Peñaloza** de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Chile y realizado en las dependencias del Laboratorio de Alteraciones Reproductivas y Metabólicas (**LARM**) de la Facultad de Ciencias, Instituto de Fisiología, Universidad de Valparaíso cuyo responsable es el **Dr. Gonzalo Andrés Cruz Neculpán**.

Resumen

El péptido Kisspeptina es un regulador de la secreción de GnRH sintetizada principalmente en el hipotálamo. Este participa en el correcto funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas a nivel central. Sin embargo, Kisspeptina y su receptor se expresan también en el ovario. Recientemente se ha descrito que el control nervioso simpático que regula la función ovárica puede influir en la expresión de Kisspeptina. Una sobreactivación de la inervación ovárica en estrés es un factor desencadenante de alteraciones foliculares, pero existen pocos antecedentes del rol de Kisspeptina en estas alteraciones. Considerando lo anterior, nuestra hipótesis es la siguiente: “La administración local de Kisspeptina en el ovario induce el desarrollo folicular y la ovulación en ratas sometidas a estrés por frío crónico intermitente”. Para comprobar esto administramos localmente Kisspeptina por 7 días y además por 28 días en presencia o ausencia de estrés por frío crónico intermitente (EFCI). Realizamos análisis morfométrico de los folículos ováricos y cuerpos lúteos utilizando un microscopio óptico. Encontramos que Kisspeptina por 7 días aumentó la cantidad de folículos secundarios y folículos antrales sanos. Además, Kisspeptina por 28 días aumentó la cantidad de folículos antrales sanos y cuerpos lúteos. Kisspeptina también aumentó los folículos antrales sanos y cuerpos lúteos en ratas sometidas a EFCI. Dado que los efectos deletéreos del EFCI sobre los folículos no fueron observados en esta tesis, no podemos concluir que la Kisspeptina los revirtió, sin embargo, concluimos que Kisspeptina ejerce un efecto trófico de en los folículos secundarios y antrales.

Abstract

The peptide Kisspeptin is a regulator GnRH secretion and it is synthesized mainly in the hypothalamus. Kisspeptin participate in the proper functioning of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis at the central level. However, Kisspeptin and its receptor are also expressed in the ovary. Recently it was described that Kisspeptin can participate in the sympathetic nervous control which regulates ovarian function. Overactivation of ovarian innervation in stress is a trigger factor of follicular disorders, but there is little information about the role of Kisspeptin in this alterations. Considering this, our hypothesis is: "The local administration of Kisspeptin in the ovary improves ovarian follicular development and induces ovulation in rats subjected to chronic intermittent cold stress." To check this we locally administered Kisspeptin for 7days and also for 28 days in the presence or absence of cold intermittent chronic stress (CICS). We perform morphometric analysis of ovarian follicles and corpora lutea using an optical microscope. We found that Kisspeptin for 7 days increased the number of secondary follicles and healthy antral follicles. Furthermore, Kisspeptin for 28 days increased the amount of healthy antral follicles and corpora lutea. Kisspeptin also increased healthy antral follicles and corpora lutea in rats submitted to CICS. Since the deleterious effect of CICS on the follicles was not observed in this thesis, we cannot conclude that the Kisspeptin reversed the alterations produced by stress; however, we conclude that Kisspeptin exerts a trophic effect on secondary and antral follicles.

Índice de Contenidos

Introducción	1
Hipótesis	8
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
Materiales y Métodos	10
Animales de experimentación:	10
Diseño experimental:	10
Morfometría:	11
Análisis estadístico:	13
Resultados	14
1. Folículos secundarios en ratas controles o sometidas a EFCl y tratadas con Kisspeptina	14
Figura 2. Número y tamaño promedio de folículos secundarios	14
Figura 3. Número promedio de folículos secundarios separados por tamaño y grupos experimentales.	15
2. Folículos antrales en ratas controles o sometidas a EFCl y tratadas con Kisspeptina	16
Figura 4. Número promedio de folículos antrales sanos y atrésicos en los distintos grupos experimentales	16
Figura 5. Número promedio de folículos antrales sanos separados por tamaño y grupos experimentales	18
Tabla 1. Representación del grado de significancia del promedio de folículos antrales sanos separados por grupos experimentales y tamaño	18
Figura 6. Diámetro promedio de folículos antrales sanos y atrésicos	19
3. Cuerpos Lúteos en ratas controles o sometidas a EFCl y tratadas con Kisspeptina	20
Figura 7. Número y diámetro promedio de cuerpos lúteos	20
Figura 8. Número promedio de cuerpos lúteos separados por tamaño y grupos experimentales.	22

Tabla 2. Representación del grado de significancia del promedio de cuerpos lúteos separados por grupos experimentales y tamaño	22
4. Folículos anómalos en ratas controles o sometidas a EFCl y tratadas con Kisspeptina	23
Figura 10. Número y diámetro promedio de quistes lúteos.	24
Discusión	25
Conclusiones	32
Bibliografía.....	33

Introducción

La función reproductiva es fundamental para la perpetuación de las diversas especies. Esta depende de señales hormonales, paracrinas y nerviosas que regulan la función de las gónadas tanto en machos como hembras. En la hembra estas señales fluctúan de forma cíclica tanto en humanos como en otros mamíferos desde la pubertad hasta el fin de la vida reproductiva. El ovario es la gónada femenina y sus funciones principales son mantener un ambiente adecuado para el desarrollo de los gametos y además producir hormonas que regulan diversos órganos sensibles a éstas (McGee & Hsueh 2000). Los gametos femeninos son los ovocitos y se desarrollan dentro de estructuras que contienen células somáticas denominadas células de la teca y células de la granulosa. El crecimiento y desarrollo de estos folículos se denomina foliculogénesis y su objetivo es preparar al óvulo para ser liberado desde el ovario (McGee & Hsueh 2000). En la figura 1 se muestran todos los estadios de desarrollo de estos folículos. Brevemente, los folículos más pequeños corresponden a *folículos primordiales*. Estos folículos se generan en el segundo semestre de gestación en la mujer y durante los inicios de la vida posnatal en la rata y corresponden a lo que se denomina “reserva folicular”, ya que la extensión de la vida reproductiva depende de la cantidad remanente de estos folículos. Después que la hembra alcanza la pubertad estos folículos se reclutan cíclicamente y dan origen a los *folículos primarios*, *folículos secundarios*, *folículos antrales* y *folículos preovulatorios*. Una vez que el folículo preovulatorio ha crecido lo suficiente de

tamaño y sus células se han desarrollado, este folículo ovula (libera el ovocito) y la estructura remanente se transforma en el *cuerpo lúteo*. Para una descripción morfológica de los folículos ver la sección de metodología.

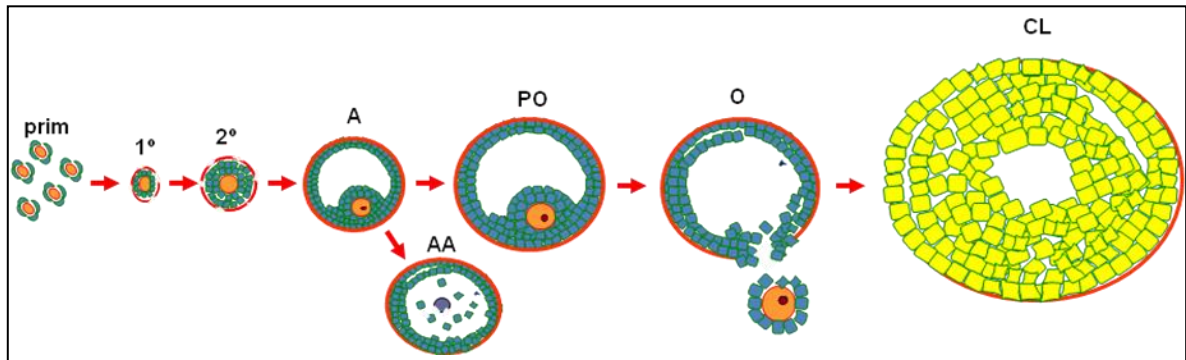


Figura 1: Etapas del desarrollo folicular. (Prim) folículo primordial. (1º) folículo primario. (2º) folículo secundario. (A) folículo antral. (AA) folículo antral atrésico. (PO) folículo preovulatorio. (O) folículo ovulatorio. (CL) cuerpo lúteo.

Distintas señales endógenas intervienen en la regulación de la función ovárica. En la actualidad se sabe que el principal control de la función ovárica radica en el *eje hipotálamo-hipófisis*. El hipotálamo libera la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) a la eminencia media. Desde ahí la GnRH viaja vía sanguínea hacia la hipófisis anterior y actúa en sus receptores ubicados en el gonadotropo, estimulando la liberación de hormona Folículo Estimulante (FSH) y hormona Luteinizante (LH). La FSH promueve el reclutamiento folicular y la maduración de los folículos y posteriormente la LH produce una cascada de procesos que llevan a la liberación del ovocito maduro. Las células de la teca y la granulosa a su vez sintetizan hormonas esteroideas y/o peptídicas en respuesta a la acción de FSH y

LH, las cuales mediante procesos de feedback negativo y positivo regulan la liberación de estas gonadotrofinas (Fox et al. 1990).

Además del control endocrino de la función ovárica, existe un control nervioso esencialmente noradrenérgico ejercido a través de fibras nerviosas postganglionares de origen simpático (Aguado 2002, Lara et al. 2002) que conforma el plexo ovárico (PO) y el nervio ovárico superior (SON). Las vías nerviosas se originan en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Gerendai et al. 1998, Luza et al. 2003) e inervan las regiones perivasculares y el estroma ovárico. El SON interactúa directamente con células tecales (Lawrence & Burden 1980) y ha demostrado una inducción sobre el crecimiento folicular y la secreción de esteroides sexuales (Lara et al. 1990a, Lara et al. 1990b). Este circuito está presente desde el nacimiento pero se activa completamente durante la pubertad (Ricu et al. 2008). Brevemente, en el ovario de distintos mamíferos (incluyendo humanos) se expresan neurotrofinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF). Estas neurotrofinas son factores tróficos que promueven la supervivencia, crecimiento y diferenciación neuronal y participan en el reclutamiento de la inervación ovárica (Lara et al. 1990a), además de otras funciones como la regulación del desarrollo folicular temprano y la ovulación (Dissen et al. 2002, Mayerhofer et al. 1996). En la actualidad se sabe que la estimulación fisiológica normal beta-adrenérgica sobre el ovario induce la expresión de receptores de FSH en folículos pequeños de ratas neonatas (Mayerhofer et al. 1996) y que un incremento patológico de los niveles de noradrenalina ovárica a través del estrés

por frío crónico intermitente es capaz de inducir alteraciones en el desarrollo folicular y formación quistes ováricos (Bernuci et al. 2013, Dorfman et al. 2003).

Últimamente ha tomado gran interés el estudio de una molécula considerada actualmente el regulador maestro de la secreción de GnRH. Este péptido llamado Kisspeptina se expresa en diversos tejidos entre ellos el hipotálamo y el ovario. En este último ejercería una regulación paracrina de la foliculogénesis, ya que también se expresa su receptor GPR54.

Las Kisspeptinas son una familia de hormonas neuropeptídicas provenientes de la expresión del gen Kiss1. El producto del gen Kiss1 da origen a un pre-propéptido de 145 aminoácidos que en humanos fue descubierto y aislado en 1996 como un supresor de melanoma maligno (Lee et al. 1996). Durante el 2001 tres estudios independientes caracterizaron los distintos péptidos de los procesos proteolíticos que sufría el producto de este gen para obtener así su actividad biológica conocida al día de hoy (Kotani et al. 2001, Muir et al. 2001, Ohtaki et al. 2001). Es así como modificaciones postraduccionales del pre-propéptido dan origen a Kisspeptina-54, Kisspeptina-14, Kisspeptina-13 y Kisspeptina-10 (Bilban et al. 2004, Kotani et al. 2001), todas ellas con actividad biológica, siendo Kisspeptina-10 la de mayor actividad en términos de activación de receptor (Kobayashi et al. 2010).

Una de las principales funciones de la Kisspeptina es su acción a nivel hipotalámico como una de las principales señales para la exocitosis de GnRH (Matsui et al. 2004, Navarro et al. 2004, Thompson et al. 2004). Este efecto lo produce a través de su receptor metabotrópico asociado a proteína $G_{q/11}$ (GPR54)

(Kotani et al. 2001, Muir et al. 2001, Ohtaki et al. 2001). La señalización celular del receptor GPR54 es a través de la activación de la fosfolipasa C, lo que produce un aumento del inositol trifosfato, con un consecuente aumento del calcio intracelular y de diacilglicerol lo que promueve la activación de la proteína kinasa C, la que finalmente causa activación de la vía de las MAP Kinasas (Erk 1/2 y P38) (Castellano et al. 2006b). En el año 2003 se encontró que pacientes que padecían hipogonadismo hipogonadotrópico poseían mutaciones inactivantes del GPR54 (de Roux et al. 2003, Seminara et al. 2003). Posteriores experimentos en ratas demostraron que la eliminación o inactivación del gen Kiss1 o GPR54 producían el mismo fenotipo (d'Anglemont de Tassigny et al. 2007, Funes et al. 2003, Lapatto et al. 2007). Por otra parte, la administración exógena de Kisspeptina lleva a un adelanto de la pubertad y la administración de un antagonista de GPR54 conduce a una pubertad tardía (Matsui et al. 2004, Navarro et al. 2004).

Se ha demostrado que Kisspeptina y su receptor se expresan en el ovario de diversas especies, sin embargo, su función en la gónada aún no se conoce con precisión. Mediante técnicas de inmunoreactividad en tejido ovárico se ha encontrado expresión de Kisspeptina en células de la teca de folículos en desarrollo y preovulatorios mientras que en células de la granulosa sólo se expresa una cantidad moderada durante el proestro tardío con expresión en el citoplasma del ovocito también; en el cuerpo lúteo se expresa fuertemente en células luteinizadas de la teca con un creciente aumento en la expresión en células luteinizadas de la granulosa paralela al desarrollo de este, disminuyendo

con la regresión del mismo, encontrándose finalmente sólo en células que aún conservan capacidad esteroideogénica; las células esteroideogénicas intersticiales y el epitelio superficial ovárico también muestran una clara expresión de Kisspeptina. Su receptor el GPR54 fue detectado en células de la teca de folículos preovulatorios, en el cuerpo lúteo y en células de la glándula intersticial (Castellano et al. 2006a, Gaytan et al. 2009). Dentro de los antecedentes, Kisspeptina ha demostrado inducir la liberación de progesterona desde células lúteas (Peng et al. 2013). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la síntesis ovárica de Kisspeptina puede estar regulada por la inervación simpática del ovario (Ricu et al. 2012). En este contexto, ovarios incubados con isoproterenol, un agonista β -adrenérgico presentan una mayor expresión del ARNm y la proteína Kisspeptina, efecto que es evitado por la incubación con el β -bloqueador propranolol. La expresión de Kisspeptina incrementa en la etapa de proestro del ciclo estral de la rata (Castellano et al. 2006a), lo que nos lleva a pensar en un posible rol en la ovulación o el reclutamiento cíclico de los folículos antrales, ya que ambos procesos ocurren en la etapa proestro. Es interesante que la mayor liberación de noradrenalina también ocurre en la misma etapa del ciclo estral en condiciones fisiológicas (Lara et al. 2002). Por otra parte, el incremento de noradrenalina ovárica a través de estrés por frío agudo produce un aumento de Kisspeptina, pero de forma crónica muestra una tendencia a la disminución de la misma (Ricu, 2013) y altera el desarrollo folicular induciendo a la formación de folículos anómalos y de quistes ováricos (Bernuci et al. 2008, Dorfman et al. 2003, Paredes et al. 1998). Las evidencias actuales mantienen una incógnita en el efecto

local de Kisspeptina en el desarrollo folicular y ovulación, sin embargo, al parecer el péptido tendría un efecto trófico sobre las células ováricas si nos basamos en su mecanismo de acción, lugares de expresión y algunos efectos demostrados. Según la evidencia presentada nos planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis

“La administración local de Kisspeptina en el ovario induce el desarrollo folicular y la ovulación en ratas sometidas a estrés por frío crónico intermitente”

Objetivo General

Determinar los efectos producidos por la administración local de Kisspeptina en el ovario sobre el desarrollo folicular y ovulación en ratas adultas controles y sometidas a estrés.

Objetivos Específicos

1. Determinar la cantidad total de folículos secundarios, antrales y cuerpos lúteos en el ovario de ratas sometidas a la administración local de Kisspeptina por 7 y 28 días comparado con ratas controles.
2. Determinar la cantidad total de folículos secundarios, antrales y cuerpos lúteos en el ovario de ratas sometidas a estrés por frío crónico a las que se administra Kisspeptina localmente en el ovario.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación:

Para este estudio se dispuso de muestras provenientes de animales que ya han sido recolectadas y que pertenecen al proyecto FONDECYT 1130049, cuyo investigador principal es el Dr. Hernán Lara de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

21 ratas hembras vírgenes de la cepa Sprague-Dawley, con un peso de 200 g se mantuvieron durante todo el desarrollo del experimento con ciclos de luz-oscuridad 12h-12h y a una temperatura promedio de 23°C, con acceso a alimento y agua *ad libitum*. La mantención y seguimiento de las series experimentales se realizó en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales y el sufrimiento de estos. Las series experimentales y procedimientos fueron aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y de la comisión nacional de investigación científica y tecnológica (CONICYT).

Diseño experimental:

Se dividió a las ratas en 5 grupos experimentales de la siguiente forma: grupo Control + Suero fisiológico (Control), grupo Control + Kisspeptina por 7 días (Kiss 7), grupo Control + Kisspeptina por 28 días (Kiss 28), grupo Estrés + Suero fisiológico (Estrés), grupo Estrés + Kisspeptina por 28 días (Estrés+Kiss 28). El

estrés de los grupos Estrés y Estrés+Kiss 28 correspondió a someter a los animales a 4°C por 3h diariamente de lunes a viernes por 28 días (Dorfman et al, 2003). Las minibombas osmóticas ALZET (modelo 2004, 0,25 µL/hr. Alza Corp. Palo alto, CA), fueron implantadas subcutáneamente en la región dorsal, cargadas previamente con Kisspeptina-10 (Phoenix pharmaceuticals, Belmont, CA) a una concentración 100^4 nmol / 200 µL. Esta cantidad de Kisspeptina, si se vaciara al plasma, no activa la liberación de GnRH (Thompson et al, 2004). Para evitar que el ovario izquierdo, el cual no va a recibir el fármaco compense la función del ovario derecho (Ojeda y Ramirez, 1972), se realizó una **ovariectomía unilateral** de este órgano el mismo día de la implantación de la minibomba osmótica en el ovario contralateral.

Morfometría:

1) Procedimiento histológico: se realizó la extracción del ovario derecho y a continuación fue fijado con fijador Bouin (mezcla formada por p-formaldehído al 37-40%, ácido pícrico saturado y ácido acético glacial) por un lapso de 24h, subsiguientemente las muestras fueron deshidratadas mediante lavados con etanol 70% por al menos 24h, para luego ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados y consecutivos con un espesor de 6 µm los que fueron teñidos posteriormente con tinción de Hematoxilina-Eosina.

2) Recuento morfológico: Los criterios para recuento de estructuras foliculares se realizaron de acuerdo a métodos ya publicados (Cruz et al, 2012) para analizar las poblaciones de folículos secundarios, antrales sanos, antrales atrésicos y cuerpos

lúteos. A continuación se señalan los principales criterios para la cuantificación de la población folicular: a) Folículos secundarios: son aquellos en que el ovocito está rodeado por 2 o más capas de células de la granulosa con forma cuboidal y que aún no presentan cavidad antral, estos se cuantificaron y fueron medidos en la sección en que se visualiza el núcleo del ovocito; b) Folículos antrales: son aquellos folículos en los que el ovocito está rodeado por más de dos capas de células de la granulosa cuboidales de apariencia normal y presenta cavidad antral, estos se cuantificaron y fueron medidos al ser visualizado el núcleo del ovocito; c) Folículos antrales atrésicos: son aquellos folículos que corresponden a la clasificación "b)" pero presentan más del 5% de células con núcleo picnótico en la sección cruzada mayor del folículo. Otros criterios de atresia fueron ovocitos deformes, fragmentados o que han reiniciado meiosis, discontinuidad de la membrana basal que separa las células de la teca con las células de la granulosa o discontinuidad de la corona radiata (capa de células de la granulosa que rodea al ovocito en un folículo antral); d) Cuerpos lúteos: son el remanente de un folículo antral que ha ovulado en el cual se puede observar una estructura de gran tamaño con células tanto de la teca como de la granulosa luteinizadas, estos fueron cuantificados y medidos en la sección en que se observa el mayor diámetro. Este análisis comprendió el recuento total de las estructuras foliculares descritas, la medición de su diámetro y distribución por tamaño. Se contabilizaron y midieron además algunas estructuras foliculares anómalas como quistes lúteos y folículos tipo 3, se consideraron como quistes lúteos a estructuras con apariencia de cuerpos lúteos (con luteinización de las células de la teca y de la granulosa) pero

con la presencia de un espacio antral que ocupase al menos 1/3 de este y como folículos tipo 3 a cualquier folículo antral sin signos de atresia con un diámetro igual o superior a 750 μm con o sin signos de hipertecosis ya que con este tamaño ya deberían haber sido ovulados.

Análisis estadístico:

Las diferencias entre los distintos grupos experimentales fueron analizadas usando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por comparaciones múltiples mediante el test LSD de Fisher. Fueron consideradas diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Resultados

1. Folículos secundarios en ratas controles o sometidas a EFCI y tratadas con Kisspeptina

En la figura 2 se muestra el número (2A) y diámetro promedio (2B) de los folículos secundarios en los grupos experimentales analizados. Sólo se observa un aumento del número de folículos secundarios en el grupo de animales tratados con Kisspeptina por 7 días versus el grupo Control.

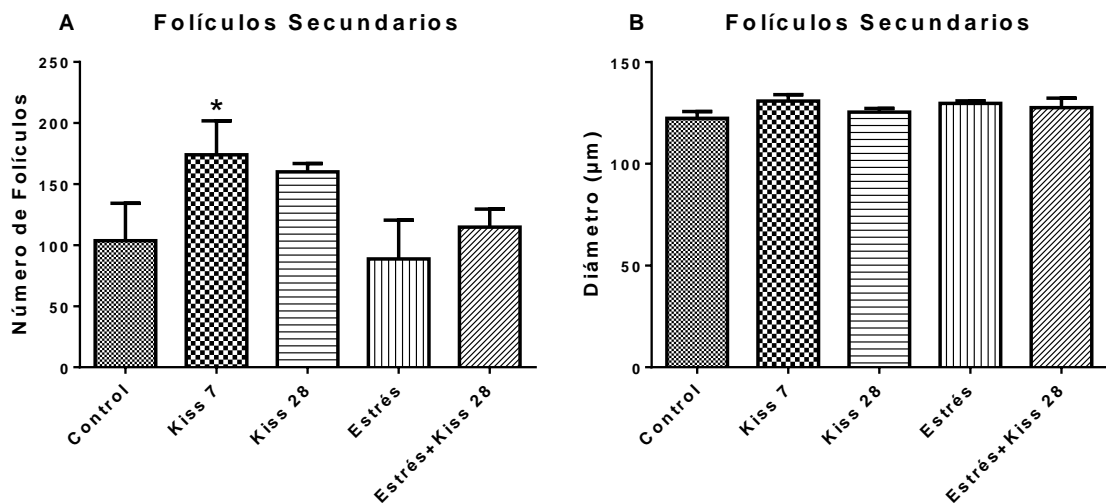


Figura 2. Número y tamaño promedio de folículos secundarios. Número promedio de folículos secundarios (A) y diámetro promedio de folículos secundarios (B). En el grupo Control (n=3), Kiss7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. * p<0,05.

En la figura 3 se muestra el número promedio de folículos secundarios sanos separados por tamaño en los grupos experimentales analizados. Observamos un aumento de los folículos antrales secundarios mayores a 90 μm en el grupo Kiss 7 comparado con el grupo Control.

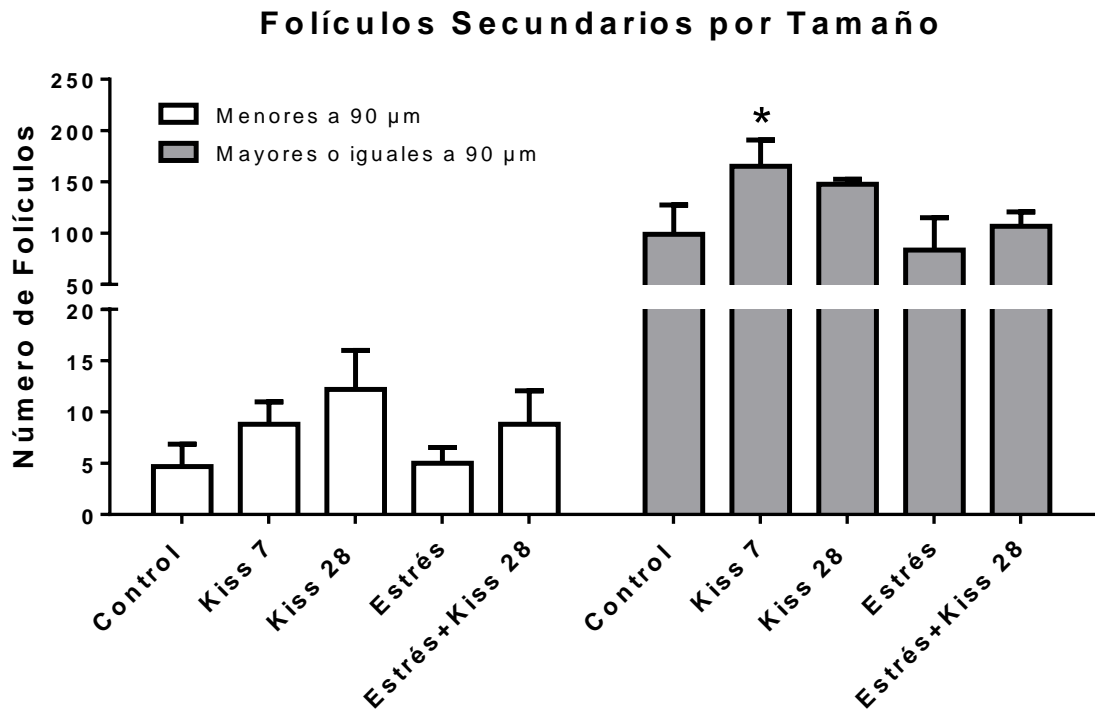


Figura 3. Número promedio de folículos secundarios separados por tamaño y grupos experimentales. En el grupo Control (n=3), Kiss 7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. * $p < 0,05$.

2. Folículos antrales en ratas controles o sometidas a EFCI y tratadas con Kisspeptina

En la figura 4 se muestra el número promedio de folículos antrales sanos (4A) y atrésicos (4B) en los grupos experimentales analizados. Observamos un aumento del número de folículos antrales en los grupos de animales tratados con Kisspeptina por 7 y 28 días versus el grupo Control sólo en el caso de los folículos antrales sanos. En el caso de las ratas sometidas a EFCI no observamos cambios en el número total de folículos antrales con respecto al grupo Control. La administración de Kisspeptina por 28 días incrementó el número de folículos antrales sanos en ratas sometidas a EFCI tanto respecto al grupo Control como respecto al grupo Estrés. Además, aumentó la cantidad de folículos antrales atrésicos versus el grupo Control.

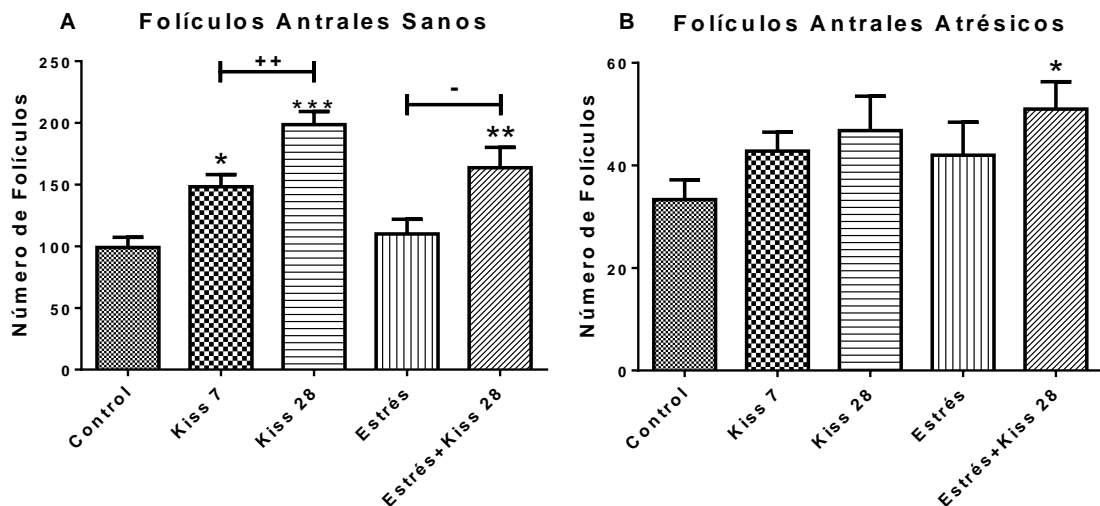


Figura 4. Número promedio de folículos antrales sanos y atrésicos en los distintos grupos experimentales. Número promedio de folículos antrales sanos (A) y folículos antrales atrésicos (B). (*), (**) y (***) compara el grupo respectivo versus el grupo Control, (++) compara versus grupo Kiss 7 y (-) compara versus grupo Estrés. En el grupo Control (n=3), Kiss7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. * y - $p < 0,05$; ** y ++ $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la figura 5 se muestra el número promedio de folículos antrales sanos separados por tamaño en los grupos experimentales analizados. Para una mayor claridad en la tabla 1 se representa el grado de significancia estadística obtenido de la comparación de los datos graficados en la figura 5. Observamos un aumento de los folículos antrales sanos menores a 200 μm en el grupo Kiss 28 comparado con el grupo control y Kiss 7 y también en el grupo Estrés+Kiss 28 comparado con el grupo Control. Además, se observa un aumento de la cantidad de folículos en el grupo Estrés+Kiss 28 comparado con el grupo Estrés en este rango de tamaño.

Por otra parte, se aprecia un aumento en el número de folículos con un tamaño entre 200 y 399 μm en los grupos Kiss 7 y Kiss 28 con respecto al grupo Control. Se observa además un aumento de la cantidad de folículos en el grupo Kiss 28 con respecto al grupo Kiss 7. A su vez se observa una disminución del número de folículos en el grupo Estrés+Kiss 28 comparado con el grupo Kiss 28. Por otra parte, se puede observar una tendencia al aumento en el grupo Estrés+Kiss 28 respecto al grupo Control.

Al analizar los folículos de tamaño mayor o igual a 400 μm se observa un aumento en el número de éstos bajo la estimulación de Kisspeptina en los grupos Kiss 7, Kiss 28 y Estrés+Kiss 28 comparado con el grupo Control. A su vez se aprecia un aumento de los folículos antrales del grupo Estrés+Kiss 28 comparado con el grupo Estrés en este rango de tamaño.

Folículos Antrales Sanos por Tamaño

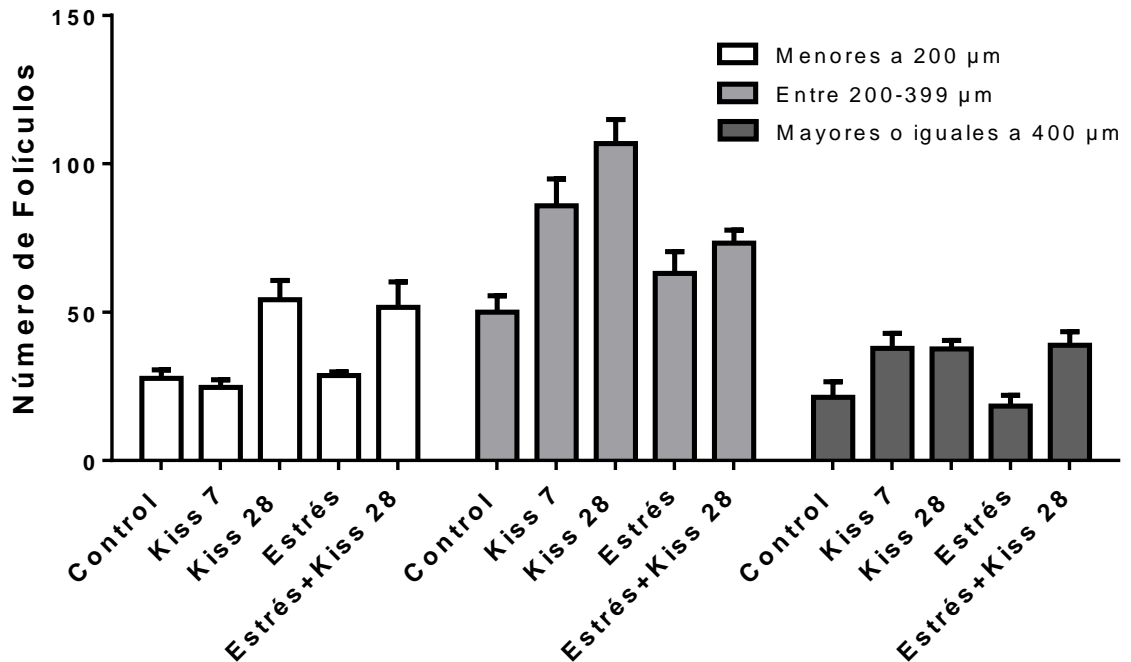


Figura 5. Número promedio de folículos antrales sanos separados por tamaño y grupos experimentales. En el grupo Control (n=3), Kiss 7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. Las diferencias significativas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Representación del grado de significancia del promedio de folículos antrales sanos separados por grupos experimentales y tamaño (Figura 5).

Grupo \ Tamaño	< 200 µm	200-399 µm	≥ 400 µm
Kiss 7	ns	**	*
Kiss 28	*	***	*
Estrés	ns	Ns	ns
Estrés+Kiss 28	*	T*(P=0.0580) # #	*
	-		- -

(*), (**) y (***) compara el grupo respectivo versus el grupo Control, (+) y (++) compara versus grupo Kiss 7, (-) y (- -) compara versus grupo Estrés y (# #) compara versus Kiss 28. En el grupo Control (n=3), Kiss 7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). *, + y - p<0,05; **, ++ y - - p<0,01 y *** p<0,001. T indica tendencia.

En la figura 6 se muestra el diámetro promedio de los folículos antrales sanos (6A) y atrésicos (6B) en los grupos experimentales analizados. Observamos una disminución en el diámetro de los folículos antrales sanos en el grupo tratado con Kisspeptina por 28 días respecto al grupo tratado por 7 días. No se observa ningún otro cambio ni tendencia entre los otros grupos experimentales, tanto en los folículos antrales sanos como en los atrésicos.

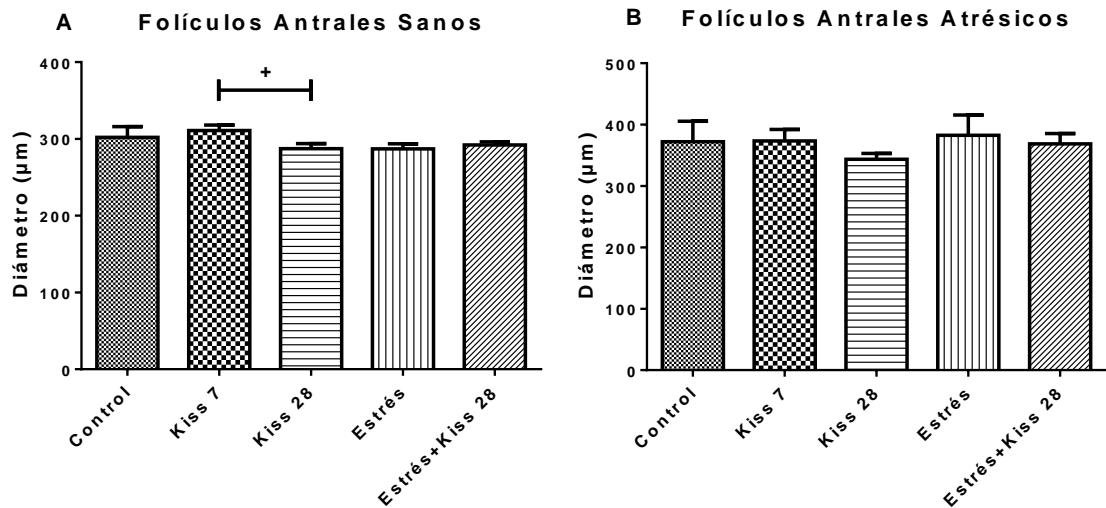


Figura 6. Diámetro promedio de folículos antrales sanos y atrésicos. Diámetro promedio de folículos antrales sanos (A) y folículos antrales atrésicos (B). (+) compara versus grupo Kiss 7. En el grupo Control (n=3), Kiss7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. + $p < 0,05$

3. Cuerpos Lúteos en ratas controles o sometidas a EFCI y tratadas con Kisspeptina

En la figura 7 se muestra el número (7A) y diámetro promedio (7B) de los cuerpos lúteos en los grupos experimentales analizados. Observamos un aumento del número de cuerpos lúteos en el grupo de animales tratados con Kisspeptina por 28 días comparados con el grupo Control y el grupo Kiss 7. En el caso de las ratas sometidas a EFCI no se aprecian cambios en el número total de cuerpos lúteos con respecto al grupo Control aunque si se observa un aumento en su diámetro. La administración de Kisspeptina por 28 días incrementó el número de cuerpos lúteos en ratas sometidas a EFCI tanto respecto al grupo Control como respecto al grupo Estrés.

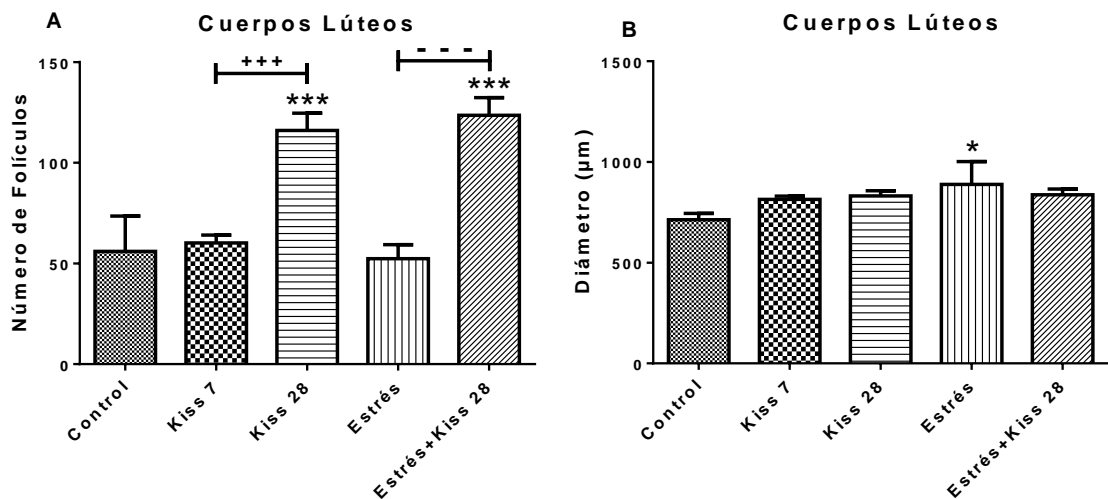


Figura 7. Número y diámetro promedio de cuerpos lúteos. Número promedio de cuerpos lúteos (A) y diámetro promedio de cuerpos lúteos (B). (*) y (***) compara el grupo respectivo versus el grupo Control, (+++) compara versus grupo Kiss 7 y (- - -) compara versus grupo Estrés. En el grupo Control (n=3), Kiss7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. * $p < 0,05$; +++, - - - y *** $p < 0,001$

En la figura 8 se muestra el número promedio de cuerpos lúteos separados por tamaño en los grupos experimentales analizados. Para mayor claridad, en la tabla 2 se representa el grado de significancia estadística obtenido de la comparación de los datos graficados en la figura 8. Respecto a los cuerpos lúteos menores a 600 μm se puede observar que a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, si existe una tendencia al aumento en la cantidad de cuerpos lúteos en el grupo tratado con Kisspeptina por 28 días comparado con el grupo tratado por 7 días.

Además, se aprecia un aumento en el número de cuerpos lúteos entre 600 y 799 μm en el grupo tratado por 28 días con respecto al grupo tratado por 7 días. Se observa también un aumento del número de cuerpos lúteos en el grupo Estrés+Kiss 28 al compararlo con el grupo Estrés. Se puede apreciar además una tendencia al aumento en número de cuerpos lúteos en el grupo Estrés+Kiss 28 respecto al grupo Control.

Al analizar los cuerpos lúteos de tamaños entre 800 y 999 μm se observa un aumento en el número de los mismos bajo la estimulación de Kisspeptina en los grupos Kiss 28 y Estrés+Kiss 28 respecto al grupo Control. También se aprecia un aumento de los cuerpos lúteos en el grupo Estrés+Kiss 28 comparado con el grupo Estrés.

Finalmente en los cuerpos lúteos mayores o iguales a 1000 μm existe un aumento en la cantidad de cuerpos lúteos tanto del grupo Kiss 28 como del grupo Estrés+Kiss 28 respecto al grupo Control. También se aprecia un aumento de la cantidad de cuerpos lúteos del grupo Kiss 28 comparado con el grupo Kiss 7 y del grupo Estrés+Kiss 28 versus el grupo Estrés.

Cuerpos Lúteos por Tamaño

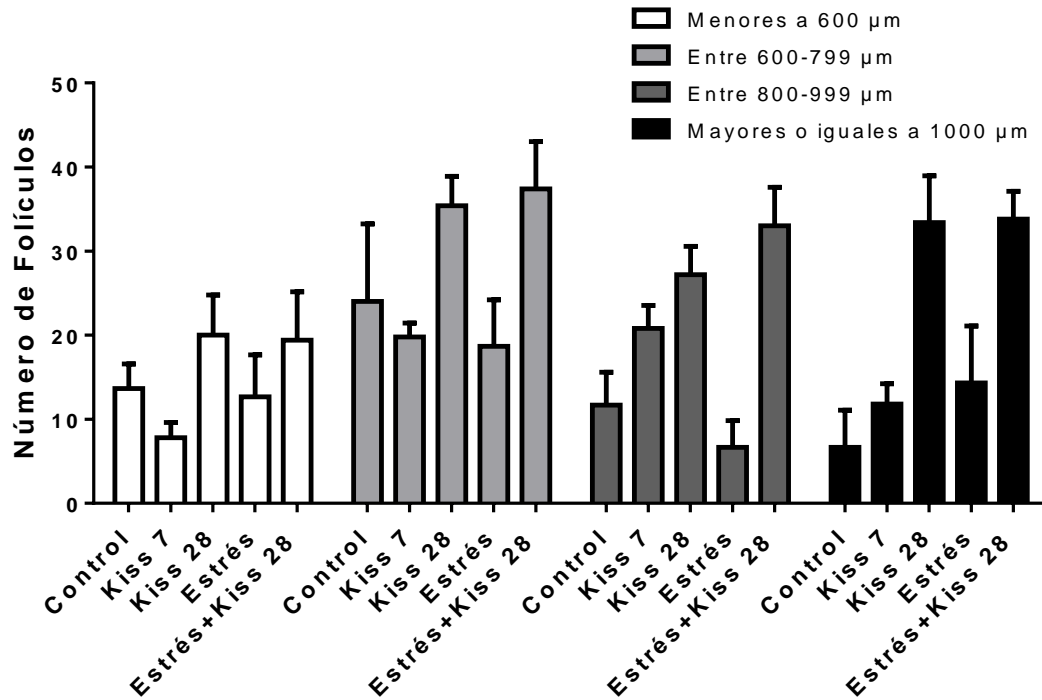


Figura 8. Número promedio de cuerpos lúteos separados por tamaño y grupos experimentales. En el grupo Control (n=3), Kiss 7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. Las diferencias significativas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Representación del grado de significancia del promedio de cuerpos lúteos separados por grupos experimentales y tamaño (Figura 8).

Tamaño \ Grupo	< 600 μm	600-799 μm	800-999 μm	≥ 1000 μm
Kiss 7	ns	ns	ns	ns
Kiss 28	T+(P=0.0547)	+	*	**
Estrés	ns	ns	ns	ns
Estrés+Kiss 28	ns	T*(P=0.0880)	**	***
		-	- - -	-

(*), (**) y (***) compara el grupo respectivo versus el grupo Control, (+) y (++) compara versus grupo Kiss 7, (-) y (- - -) compara versus grupo Estrés. En el grupo Control (n=3), Kiss 7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). *, + y - p<0,05; ** y ++ p<0,01; *** y - - - p<0,001. T indica tendencia.

4. Folículos anómalos en ratas controles o sometidas a EFCI y tratadas con Kisspeptina

En la figura 9 se muestra el número (9A) y diámetro promedio (9B) de los folículos tipo 3 en los grupos experimentales analizados. Observamos una disminución del número en animales tratados con Kisspeptina por 7 y 28 días, comparados con el grupo Control, lo mismo sucede con el diámetro promedio de los mismos. En el caso de las ratas sometidas a EFCI no observamos cambios en el número total de folículos tipo 3 ni en su diámetro promedio con respecto al Control. La administración de Kisspeptina por 28 días disminuyó el número de folículos tipo 3 en ratas sometidas a EFCI tanto respecto al Control como al grupo Estrés y hubo una disminución del diámetro de los mismos respecto al Control.

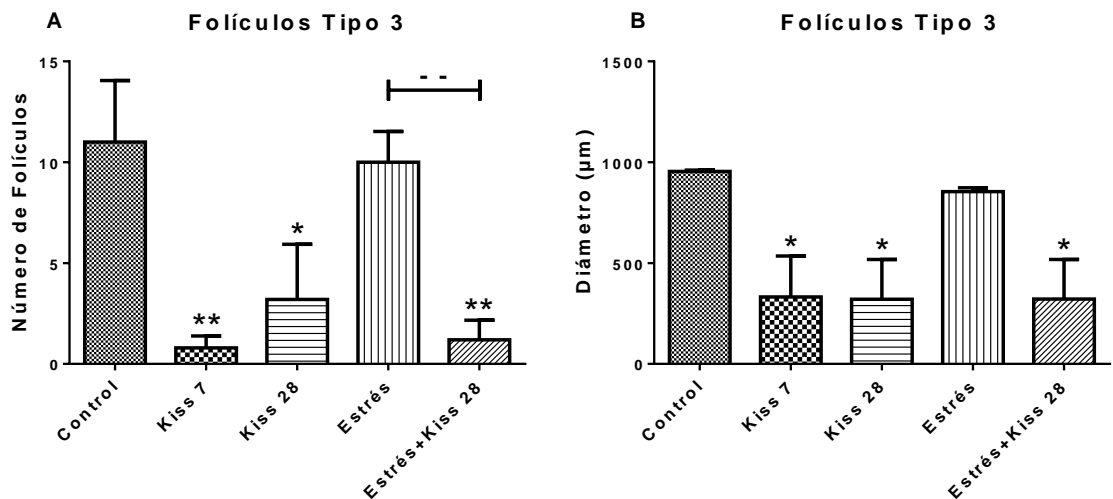


Figura 9. Número y diámetro promedio de folículos tipo 3. Número promedio de folículos tipo 3 (A) y diámetro promedio de folículos tipo 3 (B). (*) y (**) compara el grupo respectivo versus el grupo Control y (- -) compara versus grupo Estrés. En el grupo Control (n=3), Kiss7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. * p<0,05; ** y - - p<0,01.

En la figura 10 se muestra el número (10A) y diámetro promedio (10B) de los quistes lúteos en los grupos experimentales analizados. No se observa diferencia entre los grupos en cuanto a la cantidad o diámetro promedio de quistes lúteos.

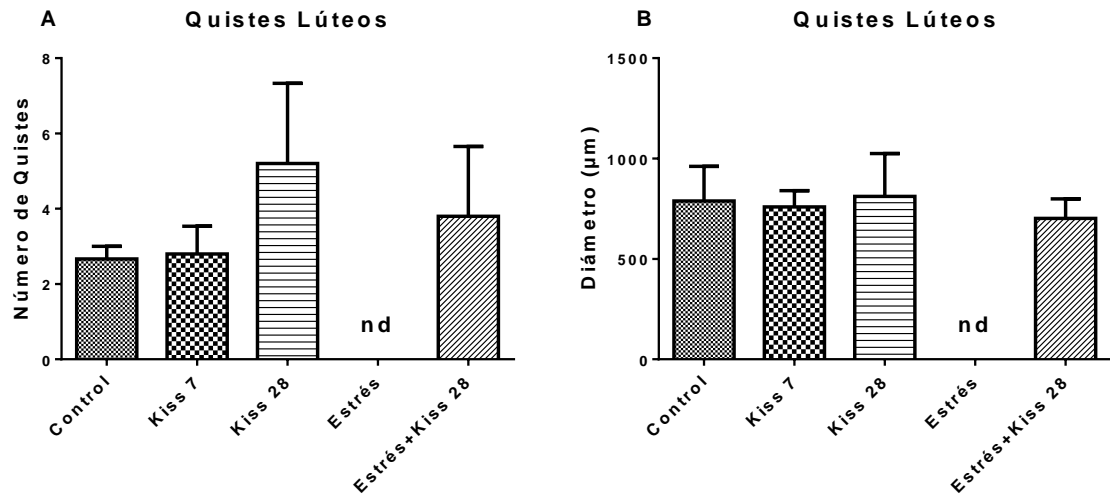


Figura 10. Número y diámetro promedio de quistes lúteos. Número promedio de quistes lúteos (A) y diámetro promedio de quistes lúteos (B). En el grupo Control (n=3), Kiss7 (n=5), Kiss 28 (n=5), Estrés (n=3) y Estrés+Kiss 28 (n=5). Los resultados se expresan como el promedio ± EEM. nd: no detectable.

Discusión

Varios estudios han demostrado que Kisspeptina está implicada en el control del inicio de la pubertad y también en la generación del pico de LH, ejerciendo una función primordial en la liberación de la hormona GnRH (Matsui et al. 2004, Navarro et al. 2004, Thompson et al. 2004). Más recientemente se ha observado la presencia de Kisspeptina y su receptor en el ovario (Castellano et al. 2006a, Gaytan et al. 2009), lo que lleva a pensar que el péptido podría estar regulando la foliculogénesis y la esteroideogénesis de forma paracrina. En esta tesis encontramos que la administración local de Kisspeptina favorece el desarrollo de los folículos y produce un aumento de los cuerpos lúteos tanto en ratas controles como en ratas sometidas a estrés.

Recientes estudios han demostrado que mientras Kisspeptina se expresa mayoritariamente en folículos antrales, su receptor (GPR54) está distribuido de forma homogénea entre los cuerpos lúteos, los folículos y células intersticiales del ovario (Laoharatchathanin et al. 2015) e incluso en el ovocito (Dorfman et al. 2014). Por otro lado, los niveles de Kisspeptina fluctúan durante el ciclo estral en la rata mostrando los niveles más altos durante el proestro tardío (Castellano et al. 2006a). Es interesante notar que el aumento de Kisspeptina en el proestro tardío es inducido por la hormona LH (Laoharatchathanin et al. 2015) indicando un posible rol en la ovulación. En esta tesis encontramos que la administración local de Kisspeptina en el ovario produce un aumento de los cuerpos lúteos en el tratamiento crónico (28 días), sin embargo, no se observó un aumento en el

tratamiento más agudo (7 días). Al separar los cuerpos lúteos según su tamaño encontramos una acumulación de estos en los tamaños más grandes en el grupo de ratas tratadas por 28 días y no observamos ningún cambio en el grupo de ratas tratadas por 7 días. Si tomamos en cuenta que el grupo Kiss 7 debería haber pasado por 1 o 2 ovulaciones hasta el momento del sacrificio, podemos hipotetizar que Kisspeptina no ejerce su acción directamente sobre el proceso de ovulación dado que no hubo aumento en los cuerpos lúteos de esta serie de animales aunque se requieren pruebas más específicas para evaluar esto. En este sentido el aumento del número de cuerpos lúteos de la serie tratada por 28 días podría estar relacionado más a un aumento en el número de folículos antrales sanos en dicha serie por acción de la Kisspeptina sobre estos folículos y por lo tanto a un aumento en la disponibilidad de los mismos para ser ovulados. Consistentemente con esta idea, en nuestro trabajo observamos que la administración local de Kisspeptina en el ovario produjo un aumento en el número de folículos antrales sanos tanto en ovarios tratados por 7 días como en los tratados por 28 días. Aunque tradicionalmente se ha pensado que Kisspeptina favorece la ovulación, consideramos que el efecto principal a nivel local es favorecer el desarrollo de folículos hacia la etapa de preovulatorio. Nuestros resultados coinciden con lo demostrado por Fernandois y cols. (2016) quienes encuentran un aumento de cuerpos lúteos después de 28 días de tratamiento con Kisspeptina infundida en el ovario de ratas senescentes.

Al analizar más profundamente el efecto de Kisspeptina sobre los folículos antrales se observa un aumento más pronunciado de estos folículos en las ratas tratadas por 28 días en comparación con las tratadas por 7 días. En la distribución por tamaño de los folículos antrales se puede observar que el efecto en las ratas tratadas por 7 días se hace significativo en folículos antrales de tamaño mayor o igual a los 200 μm , el número de folículos antrales menores a 200 μm no se ve afectado en el grupo tratado con Kisspeptina por 7 días pero aumenta considerablemente en el grupo tratado por 28 días, lo que puede sugerir que Kisspeptina no afecta la transición de folículos secundarios hacia folículos antrales o que dicho efecto no es observable con el tratamiento agudo. Esto último es consistente con el hecho de que se aprecia un aumento en la cantidad de folículos secundarios en el grupo de ratas tratadas con Kisspeptina por 7 días, sobre todo en los folículos mayores a 90 μm , corroborando la idea de que existe un efecto trófico de Kisspeptina que promueve el desarrollo de los folículos secundarios y a su vez, el aumento de folículos antrales mayores o iguales a 200 μm sin una disminución de la población de antrales de menor tamaño (de la cual provienen las poblaciones de mayor tamaño) podría implicar que el paso de folículos secundarios hacia antrales sí se encuentra acelerado pero dicho cambio sólo se observa claramente en el tratamiento crónico. Por otra parte, en la serie tratada por 28 días se observa una tendencia al aumento de la población de folículos secundarios aunque no es significativo.

En cuanto a la atresia folicular, se observa una tendencia al aumento en el número de folículos antrales atrésicos en los grupos Kiss 7 y Kiss 28 que es más pronunciado mientras mayor es el tiempo de tratamiento. Esto confirma que el aumento de folículos antrales sanos no se debe a una disminución de la apoptosis si no a un aumento en el reclutamiento y desarrollo de los folículos, lo que posteriormente lleva a una mayor ovulación de los mismos. Probablemente dicha tendencia podría hacerse significativa si se aumenta el número de individuos analizados en cada uno de los grupos.

Por otra parte, realizamos un recuento de los folículos anómalos -Tipo III y Quistes lúteos- sin encontrar diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a los quistes lúteos pero si a los folículos tipo 3 de forma bastante dispersa. Se consideraron como quistes lúteos a estructuras con apariencia de cuerpos lúteos (con luteinización de las células de la teca y de la granulosa) pero con la presencia de un espacio antral que ocupase al menos $1/3$ de este y como folículos tipo 3 a cualquier folículo antral sin signos de atresia con un diámetro igual o superior a $750 \mu\text{m}$ con o sin signos de hipertecosis ya que con este tamaño ya deberían haber sido ovulados. Debido a que encontramos la presencia de quistes lúteos en casi todos los grupos experimentales, creemos que su presencia se debe a la hipertrofia compensatoria propia de la hemiovariectomía. Por otra parte, la alta variabilidad tanto en la cantidad como en el diámetro de los folículos tipo 3 se puede deber a que por diseño experimental se sacrificó los animales a los 7 o 28 días de insertada la cánula, sin considerar la etapa del ciclo estral en el que se

encontraba cada rata, por lo que muchos de estos en realidad podrían ser folículos preovulatorios.

Recientemente se ha observado que la expresión de Kisspeptina podría estar regulada por la inervación simpática a través del SON ya que en forma aguda la activación de los receptores beta adrenérgicos lleva a un aumento de la expresión de Kisspeptina en ratas adultas (Ricu et al. 2012). Además, la activación de receptores beta-adrenérgicos lleva a un mayor desarrollo de folículos secundarios (Mayerhofer et al. 1997). Sin embargo, el incremento crónico de NA ovárica inducido a través de EFCI altera el desarrollo folicular llevando a una disminución de los folículos y a la formación de folículos anómalos y de quistes ováricos (Bernuci et al. 2008, Dorfman et al. 2003, Paredes et al. 1998). En este trabajo nosotros planteamos revertir las alteraciones foliculares producidas por el EFCI mediante la administración local de Kisspeptina en el ovario. Encontramos que Kisspeptina presenta un efecto trófico en el desarrollo de los folículos secundarios y antrales llevando a una mayor disponibilidad de folículos para la ovulación. La administración de Kisspeptina podría contrarrestar en parte los efectos deletéreos del aumento patológico de NA en el ovario ya que produjo un aumento de los folículos antrales sanos y también de los cuerpos lúteos. Sin embargo, nos llamó la atención la ausencia de cambios en ratas estresadas comparadas con ratas controles, ya que ambas presentaron un número similar de folículos secundarios, folículos antrales sanos, folículos antrales atrésicos y también de cuerpos lúteos. Creemos que esta ausencia de cambios se debió al diseño del experimento.

Esencialmente en nuestra serie experimental se insertó una cánula en el ovario derecho y se ovariectomizó el ovario contralateral. La ovariectomización produce notablemente una hipertrofia compensatoria, con aumento de los niveles de la hormona FSH (Ojeda y Ramirez, 1972). Ya que los cambios en el número de folículos mostrado en el protocolo diseñado por Dorfman y cols (2003) son leves, creemos que son totalmente contrarrestados por la hipertrofia compensatoria. Lamentablemente, nuestro diseño experimental no nos permite concluir que los efectos deletéreos inducidos por el EFCI son revertidos por la administración de Kisspeptina.

Nuestro presente trabajo da indicios de una función desconocida hasta la fecha de la Kisspeptina en el desarrollo folicular, presentando un posible efecto trófico de la misma en folículos antrales y secundarios en ratas adultas. Son necesarios más estudios para poder dilucidar esta función, como por ejemplo agregar otras series experimentales en las que se infunda el ovario con Kisspeptina más su antagonista (P234). Tomando en cuenta que el EFCI produce un aumento sostenido del tono adrenérgico ovárico, lo que a su vez induce una mayor síntesis del ARNm para el receptor de Kisspeptina (Ricu, 2013), sería importante evaluar la expresión de dicho receptor y los efectos del antagonista P234 en ovarios de ratas sometidas a EFCI para dilucidar el efecto aislado del aumento supra-fisiológico del receptor de Kisspeptina en caso de encontrarse aumentado.

Kisspeptina ya está siendo utilizada en estudios clínicos relacionados con infertilidad en mujeres (Jayasena et al. 2014), nosotros proponemos que también

podría ser utilizada localmente en mujeres con un bajo desarrollo folicular debido a ovario poliquístico que no responda a otros tratamientos.

A modo de resumen, Kisspeptina ejerce un efecto trófico dependiente de la cantidad de días de tratamiento en las poblaciones foliculares analizadas (folículos secundarios y antrales) y un aumento de los cuerpos lúteos. Se requieren más pruebas para determinar con certeza si Kisspeptina aumenta la ovulación o disminuye la luteólisis. Esto confirma parcialmente el modelo propuesto por Ricu (2013) en su tesis doctoral.

Conclusiones

- La administración de Kisspeptina por 7 días aumentó la cantidad de folículos secundarios y folículos antrales sanos respecto al grupo Control mientras que por 28 días aumentó la cantidad de folículos antrales sanos en mayor proporción que el grupo Kiss 7 y también aumentó los cuerpos lúteos respecto al grupo Control.
- El EFCI no produjo las alteraciones foliculares descritas en la literatura probablemente porque nuestro diseño experimental consideraba solo ratas hemiovariectomizadas con hipertrofia compensatoria
- La administración de Kisspeptina por 28 días aumentó la cantidad de folículos antrales sanos, antrales atrésicos y cuerpos lúteos en ratas sometidas a EFCI.

Bibliografía

- AGUADO LI (2002) Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microscopy research and technique* **59**, 462-73.
- ANESETTI G, LOMBIDE P, D'ALBORA H & OJEDA SR (2001) Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell and tissue research* **306**, 231-7.
- BERNUCI MP, LEITE CM, BARROS P, et al. (2013) Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Journal of neuroendocrinology* **25**, 23-33.
- BERNUCI MP, SZAWKA RE, HELENA CV, LEITE CM, LARA HE & ANSELMO-FRANCI JA (2008) Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology* **149**, 2907-16.
- BILBAN M, GHAFARI-TABRIZI N, HINTERMANN E, et al. (2004) Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *Journal of cell science* **117**, 1319-28.
- CASTELLANO JM, GAYTAN M, ROA J, et al. (2006a) Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* **147**, 4852-62.
- CASTELLANO JM, NAVARRO VM, FERNANDEZ-FERNANDEZ R, et al. (2006b) Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Molecular and cellular endocrinology* **257-258**, 75-83.
- CRUZ G, BARRA R, GONZALEZ D, et al (2012) Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertility and sterility* **98-5**, 1283-90
- D'ANGLEMONT DE TASSIGNY X, FAGG LA, DIXON JP, et al. (2007) Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10714-9.
- DE ROUX N, GENIN E, CAREL JC, MATSUDA F, CHAUSSAIN JL & MILGROM E (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10972-6.
- DISSEN GA, ROMERO C, PAREDES A & OJEDA SR (2002) Neurotrophic control of ovarian development. *Microscopy research and technique* **59**, 509-15.
- DORFMAN M, ARANCIBIA S, FIEDLER JL & LARA HE (2003) Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biology of reproduction* **68**, 2038-43.
- DORFMAN MD, GARCIA-RUDAZ C, ALDERMAN Z, et al. (2014) Loss of Ntrk2/Kiss1r Signaling in Oocytes Causes Premature Ovarian Failure. *Endocrinology* **155**, 3098-3111.
- FOX SR, HARLAN RE, SHIVERS BD & PFAFF DW (1990) Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* **51**, 276-83.

- FUNES S, HEDRICK JA, VASSILEVA G, et al. (2003) The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and biophysical research communications* **312**, 1357-63.
- GAYTAN F, GAYTAN M, CASTELLANO JM, et al. (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. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **296**, E520-31.
- GERENDAI I, TÓTH IE, BOLDOGKŐI Z, MEDVECZKY I & HALÁSZ B (1998) Neuronal Labeling in the Rat Brain and Spinal Cord from the Ovary Using Viral Transneuronal Tracing Technique. *Neuroendocrinology* **68**, 244-256.
- KOBAYASHI T, SASAKI S, TOMITA N, et al. (2010) Synthesis and structure-activity relationships of 2-acylamino-4,6-diphenylpyridine derivatives as novel antagonists of GPR54. *Bioorganic & medicinal chemistry* **18**, 3841-59.
- KOTANI M, DETHEUX M, VANDENBOGAERDE A, et al. (2001) The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *The Journal of biological chemistry* **276**, 34631-6.
- LAOHARATCHATHANIN T, TERASHIMA R, YONEZAWA T, KURUSU S & KAWAMINAMI M (2015) Augmentation of Metastin/Kisspeptin mRNA Expression by the Proestrous Luteinizing Hormone Surge in Granulosa Cells of Rats: Implications for Luteinization. *Biology of reproduction* **93-15**, 1-9.
- LAPATTO R, PALLAIS JC, ZHANG D, et al. (2007) Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology* **148**, 4927-36.
- LARA HE, DORFMAN M, VENEGAS M, et al. (2002) Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microscopy research and technique* **59**, 495-502.
- LARA HE, MCDONALD JK, AHMED CE & OJEDA SR (1990a) Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* **127**, 2199-209.
- LARA HE, MCDONALD JK & OJEDA SR (1990b) Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* **126**, 364-75.
- LAWRENCE IE, JR. & BURDEN HW (1980) The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical record* **196**, 51-9.
- LEE JH, MIELE ME, HICKS DJ, et al. (1996) KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute* **88**, 1731-7.
- LUZA SM, ARANCIBIA S, VENEGAS M & LARA HE (2003) Thyrotropin-releasing hormone as a mediator of the central autonomic pathway controlling ovarian function. *Neuroendocrinology* **77**, 273-81.
- 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**, 383-8.
- MAYERHOFER A, DISSEN GA, COSTA ME & OJEDA SR (1997) A Role for Neurotransmitters in Early Follicular Development: Induction of Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Newly Formed Follicles of the Rat Ovary. *Endocrinology* **138**, 3320-3329.
- MAYERHOFER A, DISSEN GA, PARROTT JA, et al. (1996) Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. *Endocrinology* **137**, 5662-70.
- MCGEE EA & HSUEH AJ (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews* **21**, 200-14.
- MUIR AI, CHAMBERLAIN L, ELSHOURBAGY NA, et al. (2001) AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *The Journal of biological chemistry* **276**, 28969-75.
- NAVARRO VM, FERNANDEZ-FERNANDEZ R, CASTELLANO JM, et al. (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**, 379-86.
- OHTAKI T, SHINTANI Y, HONDA S, et al. (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **411**, 613-7.
- OJEDA SR & RAMIREZ VD (1972) Plasma level of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology* **90-2**, 466-72.
- PAREDES A, GALVEZ A, LEYTON V, et al. (1998) Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine* **8**, 309-15.
- PENG J, TANG M, ZHANG BP, et al. (2013) Kisspeptin stimulates progesterone secretion via the Erk1/2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat luteal cells. *Fertility and sterility* **99**, 1436-1443 e1.
- RICU M, PAREDES A, GREINER M, OJEDA SR & LARA HE (2008) Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology* **149**, 50-6.
- RICU MA, RAMIREZ VD, PAREDES AH & LARA HE (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**, 4966-77.
- RICU MA (2013) Participación de kisspeptina en la función ovárica y sus cambios durante la activación del sistema nervioso simpático inducida por el estrés por frío en la rata (Tesis doctoral). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- SEMINARA SB, MESSENGER S, CHATZIDAKI EE, et al. (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine* **349**, 1614-27.

THOMPSON EL, PATTERSON M, MURPHY KG, et al. (2004) Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Journal of neuroendocrinology* **16**, 850-8.

JAYASENA CN, ABBARA A, COMNINOS AN, et al. (2014) Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. *The journal of clinical investigation* **124-8**, 3667-77.