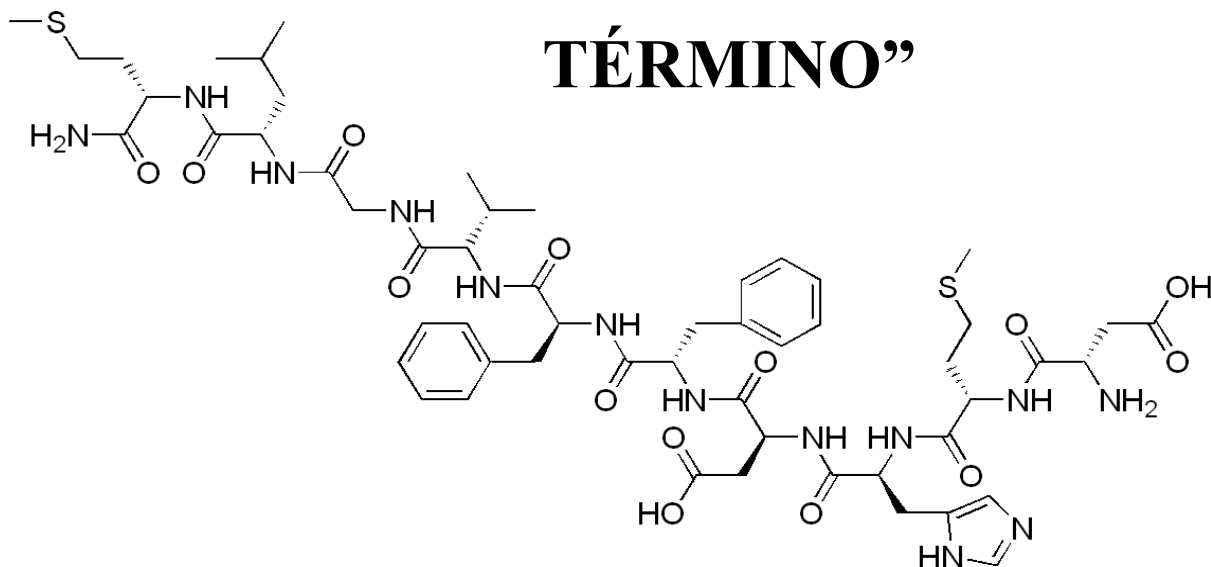


“ESTUDIO CIRCADIANO DE LA EXPRESIÓN DE NEUROQUININA B EN PLACENTA HUMANA A TÉRMINO”



MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

JUNIO 2016

AUTOR: Helena Casero Robles

TUTORES:

Ana Alonso García

José Fdo. Vázquez Villa



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL



Universidad de Oviedo

RESUMEN

Objetivo: El presente estudio trata de demostrar si la expresión de Neuroquinina B (NKB) en la placenta humana a término sigue un ritmo circadiano. *Material y métodos:* Para ello, se analizaron muestras de placenta a término de 36 mujeres con gestaciones sin complicaciones, correspondientes a seis horas del día (0:00, 4:00, 8:00, 12:00, 16:00 y 20:00) y se estudió la posible existencia de un ritmo circadiano en la expresión de NKB mediante la cuantificación de dicha proteína por *Western Blot* y ajuste al modelo matemático basado en las Series de Fourier. *Resultados:* No se encontraron diferencias significativas en la expresión de NKB en las horas estudiadas. Por otra parte, el ajuste a la serie de Fourier explicó el 100% de la variación total de los datos sobre el promedio. *Conclusión:* la NKB se expresa en placenta humana a término ajustándose a un modelo rítmico ultradiano con un periodo de 12 h.

Palabras clave: Ritmo circadiano, Ritmo ultradiano, Placenta humana a término, Neuroquinina B, Gestación, Kisspeptina, Serie de Fourier.

ABSTRACT

Aim: The present study tries to prove whether Neurokinin B (NKB) is expressed in human placenta at birth following a circadian rhythm. *Material and methods:* For that purpose, 36 human placenta samples at the time of birth from women who carried pregnancy with no complications were analyzed. Samples matched 6 different times of day (0:00, 4:00, 8:00, 12:00, 16:00 and 20:00). The possible existence of a circadian rhythm in NKB expression was studied through protein quantification by western blot analyses and the adjustment to a mathematical model based on Fourier Series. *Results:* No significant differences were found in the expression of NKB at the times studied. On the other hand, Fourier Series adjustment explained 100% of the total data variation over the mean. *Conclusion:* NKB is expressed in human placenta in a cyclic manner following a 12 hours period.

key words: Circadian rhythm, Ultradian rhythm, Full-term human placenta, Neurokinin B, Pregnancy, Kisspeptin, Fourier series.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores del Trabajo Fin de Master, la Doctora Ana Alonso por darme la oportunidad de terminar una etapa de aprendizaje habiendo conocido como funciona el mundo del laboratorio de investigación, por sus palabras de apoyo y su continuo entusiasmo y el Doctor José Fernando Vázquez porque con su ayuda y minuciosas correcciones he conseguido presentar un trabajo perfecto en todos los sentidos.

Además, es necesario nombrar al Departamento de Fisiología al completo por su ayuda tanto material como profesional, entre los que quiero destacar a la Doctora Elena Díaz cuyos conocimientos han permitido la realización de este trabajo.

Por supuesto no puedo dejar de agradecerse a mi familia y a Ander por apoyarme y ayudarme en cada nuevo proyecto. En este ámbito personal quiero dedicarle mi TFM a mi abuela Mari, por creer en mí más que yo misma, con la frase “El que ha hecho el mundo que lo cuide” siempre me pide que disfrute, que la vida son dos días.

No quiero nombrar uno por uno a todos mis amigos, pero tampoco quiero olvidarme de ellos en estos agradecimientos. Por los de siempre y por los que acaban de llegar.

Y finalmente quiero nombrar a: Chipi, Teo, Enya, Bianca, Miel, Blues y los gatitos porque de todos ellos hemos aprendido algo y todos ellos han hecho que sonría.

**“ Si no puedes volar entonces corre,
si no puedes correr entonces camina,
si no puedes caminar entonces arrástrate,
pero sea lo que hagas, sigue moviéndote hacia
delante. ”**

· Martin Luther King

ABREVIATURAS

- **BCA** Ácido Bicinconínico
- **BMAL** *Brain and muscle Arnt-like protein*
- **CKIe** Casein kinase Ie
- **CLOCK** *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*
- **CRY** *Cryptochromo*
- **Dyn** Dynorfina
- **SEM** Error Estándar de la Media
- **FSH** Hormona Folículo Estimulante
- **GnRH** Hormona Liberadora de Gonadotropinas
- **GPCR** Receptor asociado a proteínas G
- **H₂O** Agua
- **hCG** Gonadotropina Coriónica Humana
- **HCl** Ácido Clorhídrico
- **hCS** Somatotropina Coriónica Humana
- **hCTSH** Tirotropina Coriónica
- **HRP** Peroxidasa de Rabano
- **IGF** Factor de Crecimiento Insulínico
- **LH** Hormona Luteinizante
- **mM** Mili Molar
- **NaCl** Cloruro Sódico
- **NaF** Fluoruro Sódico
- **NKA** Neuroquinina A

- **NKB** Neuroquinina B
- **NSQ** Núcleo Supraquiasmático
- ***Per*** *Period*
- **pH** Potencial de hidrogeniones
- **PMSF** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- ***PPT-B*** *Preprotachykinin B*
- **PVDF** Fluoruro de Polivinilideno
- **REV- ERB** *Reverse Erythroblastosis Virus*
- **ROR** *Retiroid related orphan receptor*
- **SDS** Dodecilsulfato sódico
- **SNC** Sistema Nervioso Central
- **TAC** *Tachykinin precursor*
- **TM** Trans-membrana
- **TNF α** Factor de Necrosis Tumoral alpha
- **VEGF** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

ÍNDICE

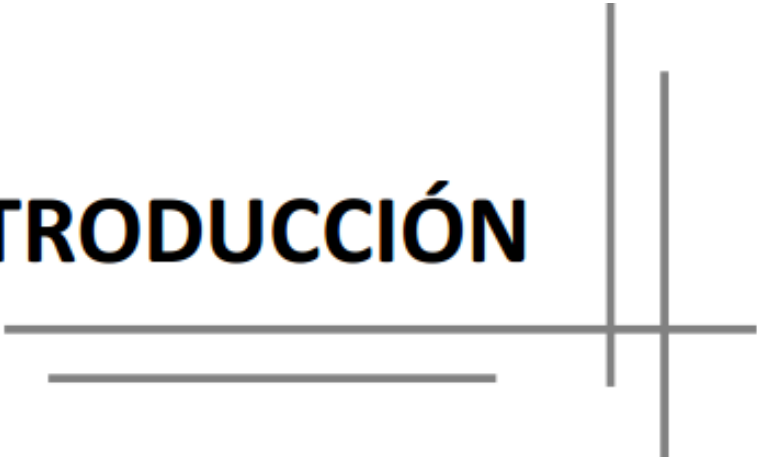
RESUMEN	3
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	10
INTRODUCCIÓN	11
Cronobiología. Sistema circadiano	12
Ritmos Biológicos	12
El sistema circadiano	13
Genes Reloj: Componentes Moleculares del NSQ.	14
Relojes Periféricos	16
Sistema circadiano y reproducción	16
Placenta	18
Desarrollo placentario	18
Estructura funcional de la placenta	20
Genes Reloj en placenta	22
Taquiquininas	22
Neuroquinina B	24
Taquiquininas y gestación	26
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO	29
MATERIAL Y METODOS	30
Muestras	31
Diseño del experimento	31

Obtención de extractos de proteínas	31
Cuantificación de proteínas y Western Blot	32
Análisis estadístico.	33
Análisis general.	33
Ajuste a las Series de Fourier.	34
RESULTADOS	35
Resultados Generales	36
Resultados del ajuste a las Series de Fourier.	37
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFIA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Periodo de los ritmos biológicos clasificados de acuerdo a su frecuencia.	Pág. 12
Figura 2. Componentes principales del sistema circadiano y las relaciones entre ellos.	Pág. 13
Figura 3. Ubicación del NSQ en un corte sagital (A) y un corte axial (B).	Pág. 14
Figura 4. Maquinaria molecular del reloj circadiano.	Pág. 15
Figura 5. Coordinación circadiana entre el NSQ y los relojes periféricos.	Pág. 16
Figura 6. Esquema simplificado de las interacciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.	Pág. 17
Figura 7. Corte transversal de vellosidades primarias, secundarias y terciarias.	Pág. 19
Figura 8. Estructuras de la placenta.	Pág. 20
Figura 9. Representación gráfica de la estructura de los receptores taquiquinérgicos.	Pág. 23
Figura 10. Representación esquemática del gen TAC3 que representa el exón que codifica la NKB.	Pág. 24
Figura 11. Modelo de regulación de la GnRH y retroalimentación de esteroides.	Pág. 25
Figura 12. Distribución de taquiquininas y sus receptores durante la implantación.	Pág. 26
Figura 13. Resumen esquemático de la relación entre GnRH, Kiss y NKB detectado en cultivo primario de células placentarias.	Pág. 27
Figura 14. Imagen representativa de las Bandas obtenidas según la técnica de Western Blot para la Neuroquinina B (17Kda) y la β -Actina (44Kda) Cada banda corresponde a un individuo por cada hora del día estudiada: 0h, 4h, 8h, 12h, 16h y 20h respectivamente para la β -Actina y la NKB.	Pág. 36
Figura 15. Cantidad total de la proteína NKB en tejido placentario humano a término. U.A.A.: Unidades Arbitrarias de Absorbancia.	Pág. 37
Figura 16. Modelo matemático obtenido del ajuste de los datos a una función oscilatoria mediante el uso de las Series de Fourier. En el eje de abscisas se representan las horas del día estudiadas en un periodo de 24h y en el eje de ordenadas se indica el resultado de los valores de Neuroquinina B normalizados con los valores de β -Actina en placenta humana a término en unidades arbitrarias.	Pág. 38

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Cronobiología. Sistema circadiano

Ritmos Biológicos

La cronobiología, del griego *Kronos* = tiempo, *bios* = vida y *logos* = ciencia, es la disciplina científica que estudia los cambios rítmicos que se producen en los seres vivos en sus distintos niveles de organización (Madrid., 2006).

Los médicos y filósofos de la antigua Grecia ya observaban cambios regulares en las funciones del organismo, fenómeno que ahora conocemos como “ritmos biológicos” (Salgado-Delgado et al., 2009).

Los ritmos biológicos podemos caracterizarlos según su periodo, tiempo que tarda en repetirse una oscilación completa, o su frecuencia, número de ciclos por unidad de tiempo. De esta manera los ritmos pueden clasificarse como ritmos circadianos, con un periodo próximo a 24 h, ultradianos con un periodo menor de 20 h o infradianos con periodos mayores de 28 h. (Madrid., 2006). En nuestra vida diaria existen ejemplos de cada uno de ellos (Figura 1, pág.12).

Tipo de ritmo	Periodo	Ejemplo
Ultradiano	0.1 segundos	Electroencefalograma
	1 segundo	Ritmo cardiaco
	6 segundos	Ritmo respiratorio
	60 minutos	Secreciones hormonales
	90 minutos	Alternancia de estados de sueño
Circadiano	24 horas	Actividad-reposo Temperatura corporal
	Infradiano	28 días
365 días		Hibernación

Figura 1. Periodo de los ritmos biológicos clasificados de acuerdo a su frecuencia.

(Tomado de Salgado-Delgado et al., 2009.)

La generación de ritmos circadianos es un proceso dependiente de un reloj interno (Gruart et al., 2002), importante para la supervivencia de las especies, por ello la selección natural ha favorecido que todos los organismos posean relojes que generen oscilaciones periódicas, capacitándolos para estimar el paso del tiempo y permitiéndoles anticiparse a las demandas dependientes de los cambios ambientales (Salgado-Delgado et al., 2009).

El sistema circadiano

Se denomina sistema circadiano al conjunto de elementos tanto exógenos como endógenos de un organismo que controlan los ritmos biológicos de naturaleza circadiana. Rigurosamente hablando podemos considerar que un sistema circadiano consta de tres componentes principales (Boden y Kennaway., 2006, Golombek y Yannielli.,2006) (Figura 2, pág.13):

- Vías de entrada o vías aferentes, que permiten la sincronización ambiental del medio externo al marcapasos. La más conocida es el ciclo luz-oscuridad.
- Un oscilador endógeno o *marcapasos circadiano*, que es una estructura localizable, funcional y anatómicamente capaz de generar por sí mismo oscilaciones rítmicas, siendo lo que se denomina marcapasos o reloj biológico.
- Vías de salida o vías eferentes, que desde el marcapasos transmiten la ritmicidad circadiana originada hasta los sistemas efectores, son lo que denominados ritmos manifiestos: hormonales, actividad, temperatura etc.

Tan importantes como los componentes principales del sistema circadiano, son las relaciones entre ellos (Figura 2, pág.13), como, por ejemplo, el mecanismo de sincronización entre las señales ambientales y el marcapasos y el mecanismo de acoplamiento entre el marcapasos y los ritmos que controla. Sin embargo, esta simplicidad del modelo se complica por la presencia de relaciones directas entre las vías de entrada y los ritmos, lo que se conoce como enmascaramiento y por los mecanismos de retroalimentación entre los ritmos circadianos y el reloj (Lucas-Sánchez et al., 2012).

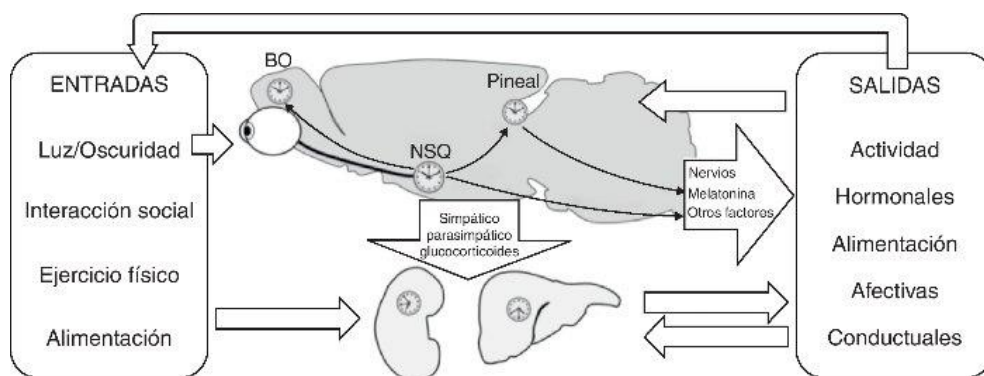


Figura 2. Componentes principales del sistema circadiano y las relaciones entre ellos.

(Tomado de Lucas-Sánchez et al., 2012.)

El reloj o marcapasos circadiano principal en mamíferos se localiza en una estructura hipotalámica llamada núcleo supraquiasmático (NSQ), en el sistema nervioso central, y en relojes localizados en las células de diversos tejidos, conocidos como osciladores periféricos (Reppert y Weaver, 2002).

El NSQ se encuentra ubicado en el hipotálamo anterior (Figura 3, pág.14), en su zona ventral, justo encima del quiasma óptico (Hill et al., 2004), presentando dos zonas citoquímicamente definidas conocidas como centro y corteza. El centro recibe principalmente señales de tipo lumínicas, esenciales para la sincronización con el ciclo luz-oscuridad, mientras que la corteza recibe aferencias no fóticas de tipo moduladoras (Golombek y Yannielli, 2006).

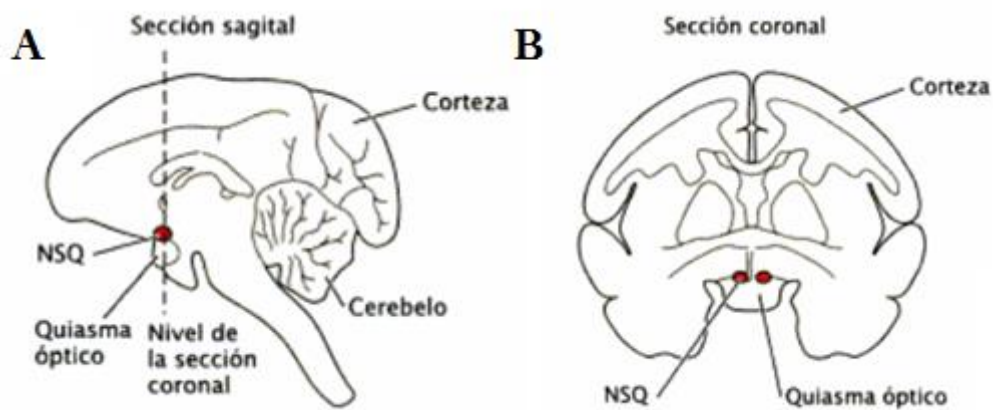


Figura 3. Ubicación del NSQ en un corte sagital (A) y un corte axial (B). (Tomado de Hill et al., 2004)

Existen numerosas evidencias que ponen de manifiesto el papel del NSQ como el reloj central, por ejemplo, su ablación hace que cese la actividad rítmica, mientras que, si se realiza un trasplante de tejido perteneciente al NSQ en un animal lesionado, la condición de arritmicidad se revierte y se recuperan los ritmos biológicos con el periodo del animal donante. Además, las neuronas del NSQ presentan un patrón rítmico de descargas de potenciales de acción, tanto in vivo como in vitro (Stephan y Zucker, 1972, Ralph y Lehman, 1991).

Genes Reloj: Componentes Moleculares del NSQ

La base molecular de este reloj circadiano se encuentra en un ciclo de retroalimentación gobernado por los llamados genes reloj, los cuales se consideran la maquinaria básica de los relojes biológicos.

En los mamíferos se han descrito al menos nueve genes reloj denominados: *Per1* (*Period*), *Per2*, *Per3*, *CRY1* (*Cryptochrome*), *CRY2*, *CLOCK* (*Circadian locomotor output cycles kaput*), *BMAL1* (*Brain and muscle ARNT-like protein 1*), *CK1 ϵ* (*Caseína cinasa I ϵ*) y *RER-ERB* (*Reverse erythroblastosis virus*) (Hernández-Rosas y Santiago-García, 2010).

Los genes codifican una serie de proteínas que producen mecanismos de autorregulación (Ko y Takahashi, 2006). *CLOCK* y *BMAL1* actúan como elementos positivos mediante el heterodímero *CLOCK* /*BMAL1* que se une al promotor de varios genes reloj, como *Per1*, *Per2*, *Per3*, *CRY1*, *CRY2*, *Rev-Erb*, *ROR* (*Retinoid Rrelated Orphan Receptor*) y otros genes que están controlados por el reloj. El heterodímero *CLOCK*/*BMAL1* también estimula la transcripción de *BMAL1*, generando un bucle de retroalimentación positivo (Figura 4, pág.15). Los receptores nucleares *REV-ERB* y *ROR* participan en la regulación de la expresión de *BMAL1*, inhibiendo o activando su transcripción, respectivamente.

Por otra parte, los elementos negativos *CRY1* y *PER2* forman el heterodímero *CRY1*/*PER2*, el cual se transloca al núcleo para inhibir la actividad *CLOCK*/*BMAL1* (Gómez-Abellán et al., 2012).

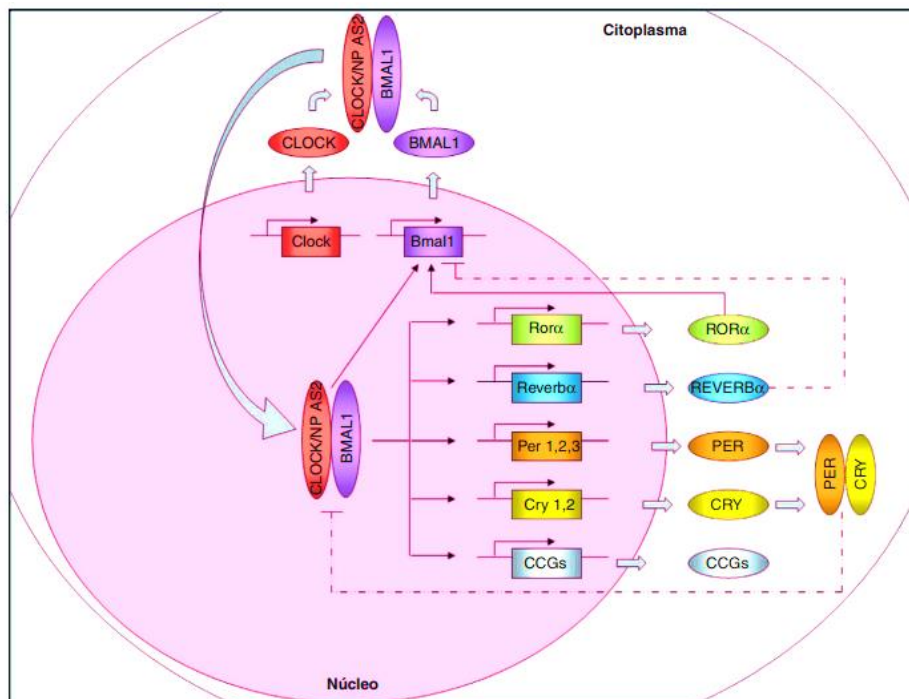


Figura 4. Maquinaria molecular del reloj circadiano. (Tomado de Gómez-Abellán et al., 2012)

Relojes Periféricos

Los genes reloj, una vez identificados en el NSQ, se describieron también en otros muchos tejidos, tanto centrales como periféricos, (hepático, cardíaco, uterino...) son los denominados relojes secundarios o periféricos, cuya actividad está regulada por el reloj principal (Shi y Zheng, 2013) (Figura 5, pág.16).

Todos los osciladores periféricos están sincronizados a través de vías endocrinas, nerviosas, metabólicas o conductuales que dependen del NSQ en el sistema nervioso central (Hastings et al., 2007, Waddell et al., 2012). Bajo ciertas condiciones metabólicas o fisiológicas, el control local del ritmo de los osciladores periféricos se puede desacoplar del control del NSQ, para adaptarse a condiciones particulares sin afectar al reloj central, de tal forma que se restrinja la expresión de ciertos genes cuando sus productos son requeridos. Cuando estas condiciones particulares desaparecen, el NSQ puede resincronizar a los osciladores periféricos de regreso a su ritmo normal (Hernández-Rosas y Santiago-García, 2010).

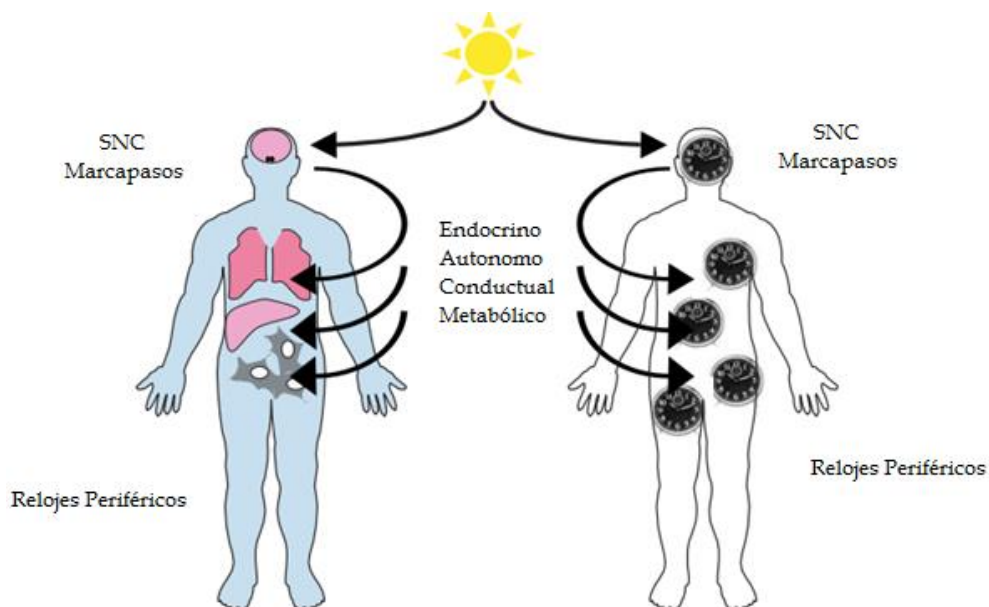


Figura 5. Coordinación circadiana entre el NSQ y los relojes periféricos. (Traducido de Hastings et al., 2007.)

Sistema circadiano y reproducción

Las hembras de mamíferos presentan un ciclo reproductivo regular, conocido como ciclo menstrual en la especie humana y ciclo del estro en roedores. Este ciclo es el resultado de una interacción compleja entre el sistema circadiano, neuropéptidos

hipotalámicos, gonadotropinas y hormonas esteroideas (Simonneaux y Bahougne , 2015). Siendo la ovulación el fenómeno fundamental del ciclo.

Para que la ovulación se produzca cíclicamente con precisión, es necesario un mecanismo regulador capaz de integrar todas las señales que se van produciendo. El hipotálamo es el órgano central del ritmo cíclico, donde los grupos neuronales producen Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) de manera intermitente, en forma de pulsos que se producen con una frecuencia comprendida entre 60 y 120 minutos según la fase del ciclo (Ordás y Usadizaga, 2011). La GnRH difunde a través de los capilares al sistema hipofisario y de allí a las células de la hipófisis anterior. Su función es estimular la producción y secreción de las hormonas hipofisarias: Hormona Folículo Estimulante (FSH) y Hormona Luteinizante (LH) entre otras (Figura 6, pág.17).

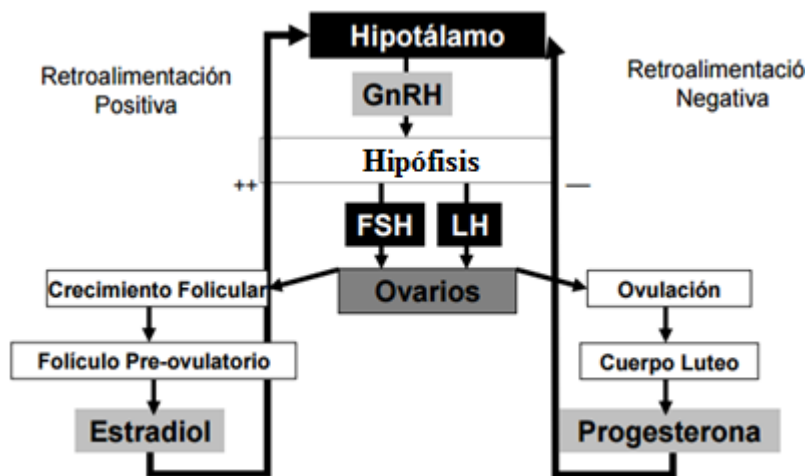


Figura 6. Esquema simplificado de las interacciones hormonales del eje hipotálamo - hipófisis-ovario. (Tomado de Rippe, 2009.)

La pulsatilidad en la liberación de GnRH es fundamental para inducir una secreción adecuada de gonadotropinas, existiendo una estrecha relación entre la GnRH y la liberación pulsátil de LH necesaria para la ovulación. Por ejemplo, la administración pulsátil de GnRH exógeno es capaz de restaurar el pico preovulatorio de LH, la ovulación y los ciclos menstruales normales. Sin embargo, la administración continua de GnRH induce un bloqueo reversible de la secreción en las células gonadotropas (Simonneaux y Bahougne, 2015).

La mayoría de las funciones biológicas, incluyendo la reproducción femenina, están sincronizadas con la variación diaria de los factores ambientales. Esta relación se

manifiesta en la tasa de crecimiento fetal en ratas, la cual está influida por el ciclo luz/oscuridad, siendo durante la fase oscura cuando se produce el mayor aumento de peso fetal (Waddell et al., 2012).

Asimismo, existen evidencias de que la interrupción del ciclo luz/oscuridad, influye en la función normal de la placenta y en el crecimiento fetal. En condiciones de luz constante, se ha observado hasta una reducción del 24% del peso fetal a término e histológicamente la placenta posee alteraciones patológicas (Gozeri et al., 2008). En este sentido las mujeres con jornada laboral nocturna o con profesiones asociadas al transporte aéreo tienen mayor riesgo de parto prematuro y niños con peso estadísticamente menor (Mahoney, 2010). Poniendo de manifiesto la relación entre el sistema circadiano y la reproducción.

Placenta

La placenta es un órgano muy especializado característico de los mamíferos superiores. Se desarrolla exclusivamente durante la gestación manteniendo funciones esenciales para establecer la conexión entre la madre y el hijo y es expulsada tras el parto al finalizar la gestación (Hernández-García, 2011).

Desarrollo placentario

Después de la fecundación se produce la segmentación del cigoto a medida que éste se traslada por la trompa de Falopio. Cuando alcanza el útero, aproximadamente 5 días después de la fecundación, ya se ha formado la blástula, compuesta por una capa de células denominadas trofoblasto y la masa celular interna. Las células del trofoblasto están implicadas en la fijación e implantación del embrión, así como en la posterior formación del corion y de la placenta. La masa celular interna será la encargada de desarrollar al nuevo individuo y, además, participará en la formación de ciertas estructuras extraembrionarias (amnios, saco vitelino y alantoides) (Carlson, 2014, Gilbert, 2015).

El proceso de implantación se produce aproximadamente seis días después de la fecundación, durante el mismo, el trofoblasto invade el estroma endometrial, originando dos capas celulares: una externa, el sincitiotrofoblasto, encargada de erosionar el

endometrio, y otra interna, el citotrofoblasto, con capacidad de división. El sincitiotrofoblasto al penetrar en el estroma decidual y al perforar los capilares sanguíneos, forma lagunas de sangre materna, fundamental para la alimentación del embrión durante los primeros días de la gestación. El tejido uterino materno implicado en el proceso de implantación recibe el nombre de decidua. Las lagunas trofoblásticas se fusionan para constituir el espacio intervelloso, en el cual, entre los días 13 y 21 se organizan las vellosidades coriales: vellosidades primarias (columnas celulares rodeadas de sincitiotrofoblasto), vellosidades secundarias (al formarse un núcleo de tejido mesenquimático) y vellosidades terciarias (las células mesodérmicas se diferencian pequeños vasos sanguíneos formando el sistema capilar veloso (Figura 7, pág.19).

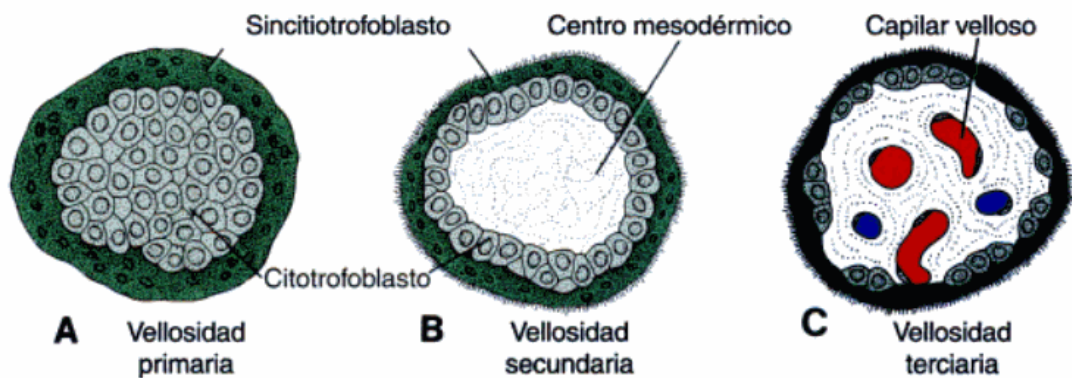


Figura 7. Corte transversal de vellosidades primarias, secundarias y terciarias.

(Tomado de Sadler y Langman, 2007.)

Estas vellosidades proporcionan una gran superficie para la transferencia de nutrientes y productos de desecho a través de los capilares (Mescher, 2013). La transferencia se realiza partir de la barrera placentaria, interpuesta entre la sangre materna y la sangre fetal. Dicha barrera está compuesta por células endoteliales de los capilares fetales, lámina basal del endotelio capilar fetal, lámina basal de los citotrofoblastos, citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos (Garther y Hiatt, 2013)

Estructura funcional de la placenta

Las estructuras placentarias se muestran la Figura 8 (pág.20), donde destacan el componente fetal, el materno y el cordón umbilical. El cordón umbilical es el responsable de la circulación sanguínea entre la madre y el feto (Young et al., 2014).

Se denomina cara fetal a aquella que está orientada hacia la cavidad amniótica, tapizada por el amnios, una membrana delgada, brillante y lisa que permite reconocer los vasos sanguíneos que son continuación de los vasos del cordón umbilical que se inserta en esa cara. La cara materna de la placenta es la que está unida al útero, al desprenderse en el parto esta cara tiene un color rojizo y sangrante con surcos intercotiledoneos resultado de la rotura de los tabiques placentarios (González -Merlo y Gonzalez-Bosquet, 2013).

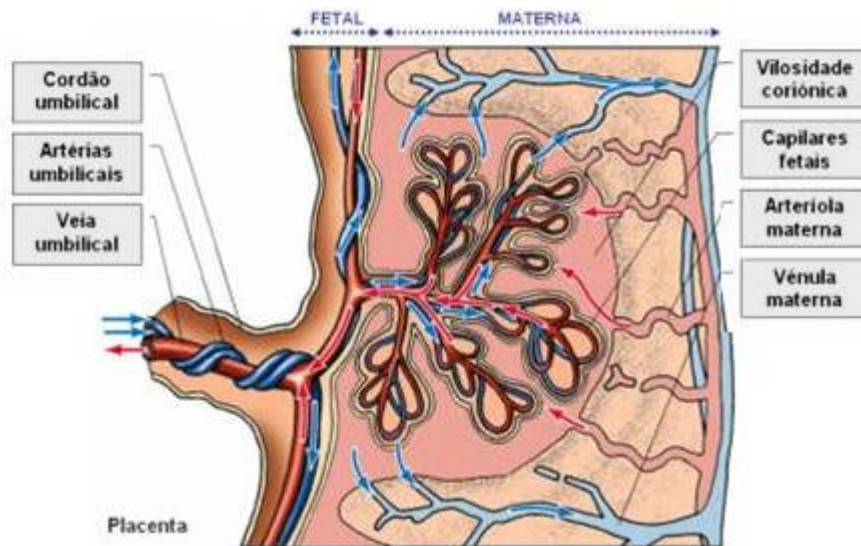


Figura 8. Estructura de la placenta. (Tomado de Fernández, 2016.)

La histología placentaria se modifica a lo largo de la gestación, al final de ésta, las vellosidades son abundantes, con un diámetro más reducido que en el primer trimestre. El citotrofoblasto ha desaparecido casi por completo, el sincitiotrofoblasto persiste al final de la gestación, pero los núcleos se agrupan constituyendo conglomerados nucleares con importante actividad metabólica y endocrina. Los vasos de las vellosidades se desplazan a la periferia, existiendo zonas en las que se ponen en contacto con el sincitiotrofoblasto, constituyendo la membrana vasculosincitial, donde la sangre fetal y la materna solo están separadas por una delgada capa de sincitiotrofoblasto y el endotelio vascular.

La placenta desempeña una serie de funciones, que son esenciales para el mantenimiento de la gestación pudiéndose agrupar en tres grandes apartados:

1. Función de transporte o de intercambio entre los sistemas circulatorios materno fetal: el feto recibe oxígeno y nutrientes y la madre del feto productos de desecho (González-Merlo y Gonzalez-Bosquet, 2013).

2. Función secretora: comprende la producción de diferentes tipos de hormonas y proteínas como la secreción de progesterona, gonadotropina coriónica humana (hCG), tirotropina coriónica (hCTSH), somatomamotropina coriónica humana (hCS), así como el factor de crecimiento endotelial, factor de crecimiento insulínico (IGF-I), factor de crecimiento de fibroblastos, la leptina, y las interleucinas I y III entre otros muchos. También produce estrógenos, prostaglandinas y prolactina (Mescher, 2013).

3. Función inmunológica: las inmunoglobulinas G de origen materno (IgG) son transportadas al feto mediante pinocitosis, dotándole de una inmunidad pasiva frente a ciertas enfermedades infecciosas. Ya que la defensa inmunológica propia del feto no comienza a desarrollarse hasta el final del tercer trimestre, cuando es capaz de producir los componentes del sistema de complemento (González-Merlo y Gonzalez-Bosquet, 2013).

Cuando se produce una incorrecta y desorganizada invasión de las arterias o una insuficiente formación de las vellosidades coriales, se desarrolla un ambiente vascular con un bajo flujo sanguíneo, alta resistencia e hipoxia que da lugar a restricciones en el crecimiento fetal debido a la baja actividad de las funciones placentarias e incluso se relaciona con la preeclampsia (Hiden et al., 2007, Carrillo-Esper y Sanchez-Zúñiga, 2013).

La preeclampsia se define como un estado patológico de la mujer en el embarazo que se caracteriza por una alta presión sanguínea que se presenta después de las 20 semanas de gestación en una mujer normotensa, acompañada por presencia de proteínas en la orina y aumento excesivo de peso. Los estados hipertensivos asociados al embarazo aparecen en aproximadamente en el 15% de todos los embarazos, siendo su complicación más grave la Eclampsia, una de las causas del incremento de la morbilidad y mortalidad materno-fetal. (Carrillo-Esper y Sanchez-Zúñiga, 2013).

La etiología es aún desconocida, describiéndose diferentes factores de riesgo como la predisposición genética, el descontrol del sistema inmune o una placentación anómala.

Genes Reloj en placenta

La expresión de genes reloj ha sido demostrada en órganos y tejidos periféricos, tanto reproductivos (útero, ovarios...) (Simonneaux y Bahougne, 2015) como no reproductivos (hígado, pulmón, páncreas), siguiendo un ritmo circadiano (Kennaway et al., 2012). Los genes reloj fueron observados primeramente en tejido placentario de rata (Wharfe et al., 2011, Waddell et al., 2012), no siendo hasta unos años más tarde cuando se identificaron por primera vez genes reloj (*CLOCK*, *PER* y *CRY2*) en placenta humana a término. Su expresión mostraba un patrón rítmico circadiano dependiente de la hora del día, poniendo de manifiesto que la placenta humana es un órgano rítmico (Pérez et al., 2015).

Taquiquininas

Las taquiquininas son una familia de péptidos biológicamente activos, de los cuales la sustancia P fue la primera descubierta en 1931. (Von Euler y Gaddum, 1931), sin embargo, hasta la década de los ochenta no se descubrieron otras taquiquininas, como la neuroquinina A (NKA) y la neuroquinina B (NKB) (Kimura et al., 1983; Kangawa et al., 1983)

Esta familia peptídica comparte una región C-terminal hidrofóbica conservada, -Phe-X-Gli-Leu-Met-NH₂, donde X puede ser, o bien un aminoácido aromático, o un aminoácido alifático ramificado (Almeida et al., 2004). Esta zona hidrofóbica del péptido es determinante en la activación de los receptores taquiquinérgicos (Maggi, 1995). En el extremo N-terminal, las taquiquininas presentan regiones divergentes e hidrofílicas que parecen estar implicadas en la especificidad hacia un determinado receptor (Ingi et al., 1991).

Todas las taquiquininas conocidas están codificadas por tres genes: *Tachyinin precursor* TAC1, TAC3, y TAC4. (Almeida et al., 2004).

Los receptores de las taquiquininas pertenecen a la superfamilia de receptores de membrana asociados a proteína G (GPCRs), caracterizados por compartir la misma

estructura, que incluye siete dominios transmembrana (TM I-VII), con tres lazos en la cara extracelular (E 1-3) y otros tres en la cara intracelular (C 1-3), un terminal amino en el exterior y un terminal carboxilo en el lado citosólico (Figura 9, pág. 23).

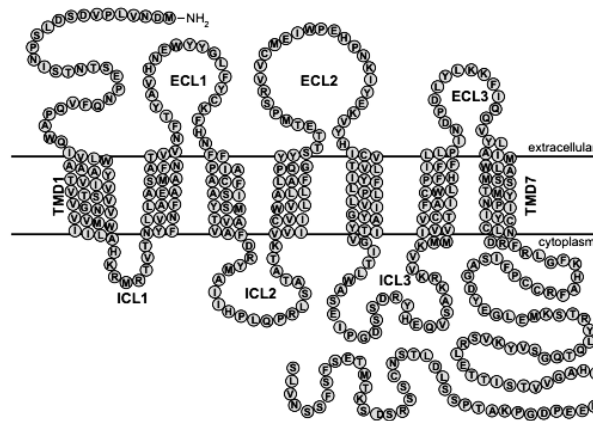


Figura 9. Representación gráfica de la estructura de los receptores taquiquinergicos. (Tomado de Steinhoff et al., 2014.)

Inicialmente, las taquiquininas fueron consideradas como neuropéptidos debido a su amplia distribución en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (Holzer, 1988), sin embargo, estudios recientes demuestran la expresión de *TAC1* en la práctica totalidad de tejidos humanos, destacando el corazón, el colon, las glándulas mamarias, las células endoteliales y el cerebro, así como en la mayor parte de las células sanguíneas inmunes (Pinto et al., 2004). Respecto a *TAC3*, se ha demostrado que NKB se expresa incluso en la placenta (Page y Lowry, 2000.a), un tejido que carece de cualquier forma de innervación nerviosa, mientras que *TAC4*, de hecho, presenta una expresión principalmente neuronal (Pinto et al., 2004). Al igual que las taquiquininas, los receptores taquiquinergicos también están ampliamente representados en multitud de tejidos y tipos celulares (Pinto et al., 2004). Por lo que podemos deducir que las taquiquininas representan un papel relevante en la señalización intercelular y la comunicación entre el sistema nervioso y los demás sistemas biológicos.

En tejidos periféricos, las taquiquininas están implicadas en procesos como el mantenimiento de la homeostasis a nivel de la presión sanguínea (Page et al., 2003), o de la hematopoyesis, como reguladores del eje neural-hematopoyético-inmune (Klassert et al., 2010). La comunicación entre el sistema nervioso y otros sistemas periféricos, donde

las taquiquininas actúan como nexos, también se observa en el sistema reproductor actuando como reguladores del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Hu et al., 2014).

Neuroquinina B

El segundo gen de las taquiquininas, el *TAC3* o Preprotaquiquinina (*PPT-B*), es el encargado de codificar NKB (Almeida et al., 2004). Presenta 7 exones, de los cuales, el exón 5 codifica el precursor preprotaquiquinina B, el cual conduce a proneuroquinina B y finalmente a NKB (Page et al., 2009, Navarro, 2013) (Figura 10, pág.24).



Figura 10. Representación esquemática del gen *TAC3* que representa el exón que codifica la NKB.

(Tomado de Navarro , 2013.)

En los últimos años, el producto del gen *TAC3*, NKB, ha surgido como un regulador clave de la función reproductiva, especialmente en la pulsatilidad de GnRH producido en el hipotálamo, de tal forma que una mutación con pérdida de función en NKB o su receptor NK3R puede desembocar en un hipogonadismo hipogonadotrópico o incluso en infertilidad (Young et al., 2010), no solo influyendo el funcionamiento normal del sistema reproductivo en la edad adulta sino también siendo importante para el inicio de la pubertad, dirigiendo la pulsatilidad de GnRH a través de una subpoblación de neuronas Kiss situadas en el Núcleo Infundibular y el Área Preóptica (Hu et al., 2014, Skorupskaite et al., 2014) (Figura 11, pág.25).

Hasta la fecha, se describía a la kisspeptina como el único neurotransmisor que controlaba la secreción de GnRH. Actualmente, muchos estudios demuestran que la kisspeptina se coexpresa junto a la NKB y la Dinorfina (Dyn) en una población de neuronas en el núcleo infundibular, llamadas neuronas KNDy (Kiss/NKB/Dyn). Estos tres péptidos parecen actuar conjuntamente como moduladores clave de la secreción de GnRH, creyendo que las neuronas KNDy sirven como marcapasos central que controla la secreción pulsátil de GnRH y por tanto la liberación de gonadotropinas. Parece probable que las neuronas KNDy sirvan como intermediario en la acción de los estrógenos sobre las neuronas GnRH, ya que dichas neuronas poseen receptores β estrogénicos pero no receptores alfa estrogénicos ($ER\alpha$), considerados como los receptores que median el feed- back negativo (Hua et al., 2014).

Modelo "Neuronas KND"

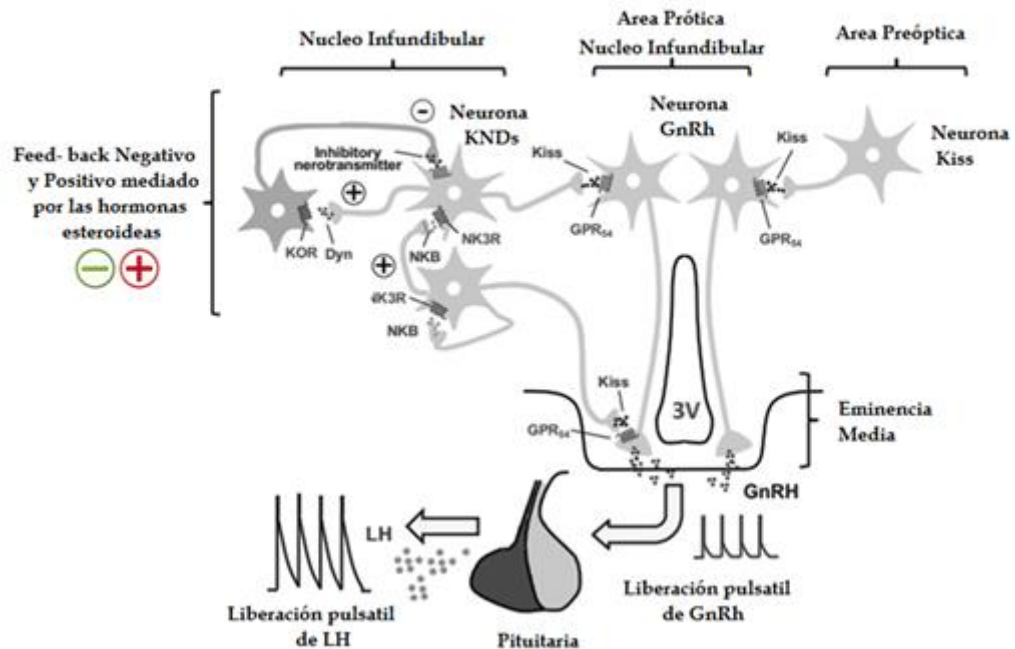


Figura 11. Modelo de regulación de la GnRH y retroalimentación de esteroides.

(Modificado de Hu et al., 2014.)

Existen estudios que muestran que la NKB estimula la síntesis de kisspeptina, mientras que la Dyn, tiene un papel contrario, es decir, una influencia inhibitoria de la expresión de kisspeptina en las neuronas KND. Lo que puede hacer pensar que una población está implicada en el mecanismo de *feed back* positivo y otras en el *feed back* negativo como así se demostró en roedores (Hu et al., 2014). En la especie humana, por el contrario, no se da importancia a las neuronas del área preóptica por que se demostró que las neuronas del núcleo infundibular podían establecer tanto el mecanismo del *feed back* positivo como negativo de las hormonas esteroideas (Skorupskaite et al., 2014). NKB y Dyn están, sin embargo, ausentes de la población en el área preóptica (Cheng et al., 2010) (Figura 11, pág. 25).

Además de sus funciones a nivel central, muchos autores abogan por un papel importante de la kisspeptina y NKB en la regulación de las funciones reproductoras periféricas, ya que ambos se expresan en placenta, ovario, testículo e incluso próstata (Navarro et al., 2012, Hua et al., 2014).

Taquiquinas y gestación

Todas las taquiquinas y receptores taquiquinérgicos se sintetizan de forma local en el útero de ratas durante el embarazo temprano sufriendo cambios importantes en la expresión de la sustancia P, NKB y sus receptores durante los primeros días alrededor de la implantación (Figura 12, pág. 26).

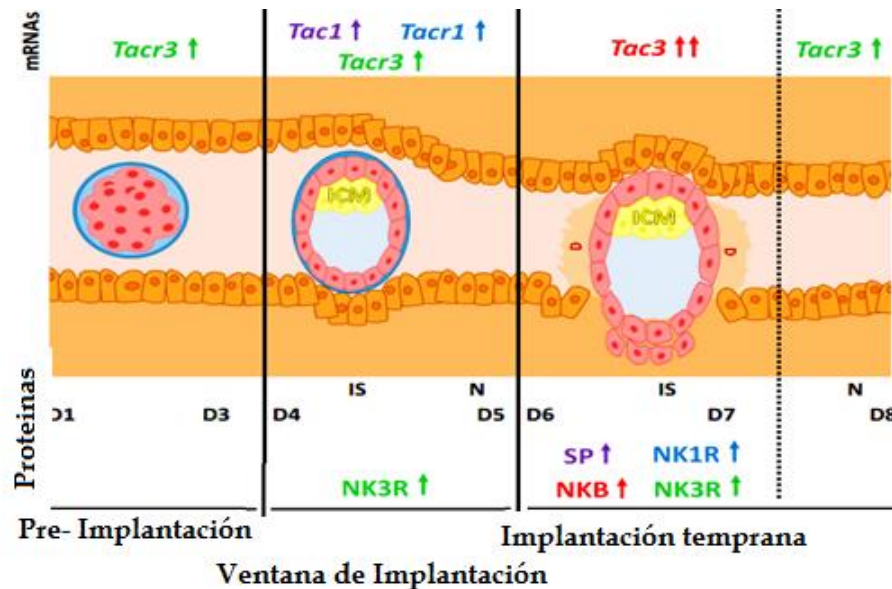


Figura 12. Distribución de taquiquinas y sus receptores durante la implantación.

(Traducción de Pinto et al., 2015)

Una investigación reciente muestra que tanto a nivel de ARNm como de proteínas, NKB y NK3R se expresan en el útero de las ratas incrementándose notablemente desde el día 6 en adelante, mostrando una localización preferente en el lugar de la implantación, pero también en el embrión y el trofoblasto placentario. Este hecho avala un papel de dichas proteínas en la implantación y placentación, actuando tanto del lado de la madre como del embrión. Además, esto se confirma al producirse una reducción en el tamaño de la camada cuando se administra un antagonista selectivo de NK3R (Pinto et al., 2015). En mujeres gestantes la expresión de NKB destaca en el exterior del sincitiotrofoblasto de la placenta, produciendo concentraciones de NKB detectables en sangre desde la novena semana. Aunque no existen diferencias significativas en los niveles de NKB a lo largo de las diferentes semanas de gestación, si se aprecia un leve incremento, alcanzando los niveles más altos a término (D'Anna et al., 2002).

Por otro lado, diversos estudios en rata demostraron que la unión de NKB a su receptor, causa contracción de la vena porta y venoconstricción del plexo mesentérico, reduciendo el flujo sanguíneo de la circulación esplácnica (hígado, bazo, páncreas), para aumentar la circulación uteroplacentaria. Estos datos sugieren un papel de la NKB en la adaptación hemodinámica y por tanto su implicación en desordenes de hipertensión (Mastrangelo et al., 1987, D`Orleans-Juste et al., 1991), apoyando los resultados obtenidos por D'Anna y dando una razón del aumento de NKB durante la gestación.

A pesar de todo, las funciones de NKB en placenta aún no están del todo claras, ya que, es posible que, como ocurre con la Kisspeptina, las funciones del mismo péptido en el hipotálamo no sean las mismas que en la placenta.

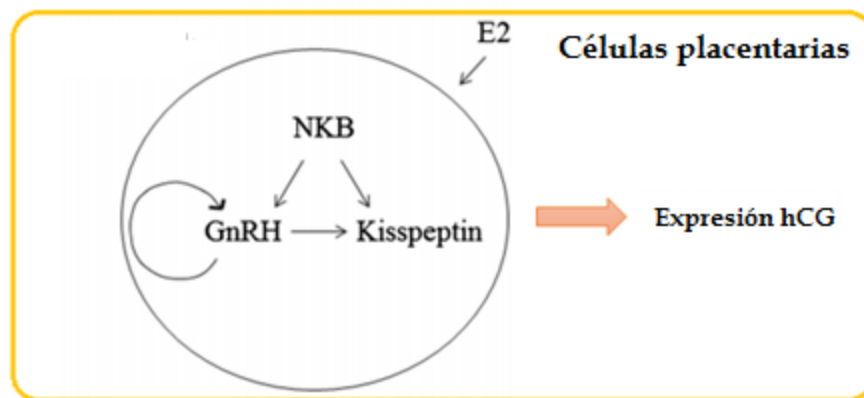


Figura 13. Resumen esquemático de la relación entre GnRH, Kiss y NKB detectado en cultivo primario de células placentarias. (Modificado de Oride et al., 2015)

La relación de GnRH y Kisspeptina en el hipotálamo ha sido ampliamente estudiada y descrita como crucial para el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y el mantenimiento de las funciones reproductoras. Estos neuropeptidos, también se expresan en placenta, concretamente en cultivos primarios de tejido placentario se ha observado la relación mostrado en la Figura 13 (pág.27) (Oride et al., 2015).

En este sentido, estudios recientes muestran que un aporte de estradiol en cultivo primario de tejido placentario estimula la expresión tanto de GnRH como de Kisspeptina y NKB. Sin embargo, la Kisspeptina no aumenta la expresión de GnRH como cabría de esperar ni de NKB. A su vez un aporte tanto de GnRH como de NKB por separado estimula la expresión de Kisspeptina. Y todos ellos (GnRH, NKB, Estradiol y Kiss) estimulan la síntesis y secreción de Gonadotropina Coriónica Humana. (Oride et al., 2015).

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



JUSTIFICACIÓN

La función de la NKB en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas está claramente definida, la NKB regula la expresión de Kiss y modula el *feed back* positivo y negativo de los estrógenos, produciendo la pulsatilidad de GnRH y de LH. Siendo relevante para el inicio de la pubertad y el mantenimiento de la reproducción.

A su vez, la expresión de NKB en la placenta es una de las mejor descritas en la bibliografía ya que aumenta progresivamente según avanza la gestación, alcanzando su máximo valor a término. Sin embargo, su papel todavía no es del todo conocido y se ha asociado la NKB con un papel en el control hemodinámico de la invasión y placentación, pero no está claro si su aumento es la causa de la desregulación placentaria, o si se produce como consecuencia de dicha desregulación.

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que la placenta es un órgano rítmico, en el cual se expresan múltiples genes reloj y péptidos como la Kisspeptina con ritmo circadiano. Dada la implicación de la NKB en la secreción pulsátil de Kisspeptina GnRH y por tanto LH, entre otros, puede que la NKB presente a su vez una expresión rítmica.

Los ritmos biológicos controlan situaciones como la actividad / descanso, la temperatura corporal, la presión arterial, el gasto cardiaco, el consumo de oxígeno, el equilibrio de los fluidos o la secreción de glándulas endocrinas. Y su desregulación es causa de múltiples patologías. La desregulación de genes y proteínas que presentan ritmos biológicos en la placenta pueden estar relacionados con patologías como la hipertensión y en casos extremos la preclamsia, observándose niveles de NKB muy altos en esos casos.

HIPÓTESIS

La neuroquinina B se expresa siguiendo un patrón de ritmo circadiano en la placenta humana a término.

OBJETIVO

Demostrar que la placenta humana a término expresa la proteína NKB de manera rítmica.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

El presente estudio observacional transversal fue realizado a través del análisis de muestras de placenta de 36 mujeres con gestaciones sin complicaciones, cuyos partos tuvieron lugar en la Unidad de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). El promedio de edad de las mujeres gestantes fue de $32,5 \pm 8$ años. Todas las participantes firmaron el consentimiento informado requerido por la legislación vigente referido a la donación de tejidos con fines de investigación.

Diseño del experimento

Las muestras empleadas fueron obtenidas a partir de secciones transversales de placentas a término tras su expulsión una vez concluido el parto. Una vez obtenidas, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Las muestras fueron tomadas en seis periodos horarios:

00:00 horas	6 muestras
04:00 horas	6 muestras
08:00 horas	6 muestras
12:00 horas	6 muestras
16:00 horas	6 muestras
20:00 horas	6 muestras

Obtención de extractos de proteínas

Para preparar extractos crudos de proteínas se toman aproximadamente muestras de 100 mg de tejido placentario conservadas a -80°C , se lavan con PBS e inmediatamente son homogenizadas en 1 ml de Buffer de lisis [[Tris-HCl (Ácido clorhídrico) 50 mM (mili Molar) [pH (Potencial de hidrogeniones) = 7,5], NaCl (Cloruro Sódico) 150 mM, Triton X-100 al 1%, ortovanadato de sodio 1 mM, PMSF (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo) 1 mM, Fluoruro Sódico (NaF) 10 M] mediante homogeneización manual empleando un

homoginizador con émbolo de vidrio (POBEL) y procurando mantenerlo permanente en hielo con el fin de evitar la posible degradación proteica.

Los extractos así obtenidos fueron centrifugados a 4 °C a 6.000 rpm, durante 30 min para eliminar el material insoluble. Concluida la centrifugación, se recogió el sobrenadante y fue almacenado a -20 °C para su posterior cuantificación.

Cuantificación de proteínas y *Western Blot*

Una vez obtenidos los extractos se procedió a cuantificar la cantidad total de proteína siguiendo el método del Ácido Bicinconínico (BCA). Para ello, se utilizó el Kit comercial *Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific)* siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando como estándar albúmina de suero bovino.

A continuación 22 µg de proteína de cada muestra, fueron resuspendidos en tampón de carga para proteínas [60 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS (Dodecilsulfato sódico), 2,5% glicerol, 2,5%, β-mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol] y agua (H₂O) miliQ hasta 12 µl. las muestras se desnaturalizan en el termociclador, incubándolas a 100 °C durante 5 min. La electroforesis fue llevada a cabo utilizando el sistema *Miniprotean (Bio-Rad, EE.UU.)* en geles de poliacrilamida al 13%.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfieren, mediante transferencia húmeda, a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (*Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore Corporation, Billerica MA, EE.UU.*), previamente tratadas con metanol. Para ellos se empleó un aparato de transferencia en miniatura (*Bio-Rad*) con un voltaje constante de 60 V durante 80 min.

Concluida la transferencia, recortamos las membranas por el marker de 35 KDa, con el fin de eliminar la unión inespecífica del anticuerpo a las inmunoglobulinas y se incuban las dos partes de las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con una solución de bloqueo compuesta por TBS-T (20 mM Tris- HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) con leche desnatada en polvo al 5%, con el objetivo de minimizar las uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el bloqueo, se aclara con TBS-T y se incuba la parte inferior de las membranas durante toda la noche a 4 °C y en agitación con una disolución del anticuerpo primario neuroquinina B (L16): sc-14109 Santa Cruz *Biotech*, a una concentración de 1:1000 en TBS-T al 2,5% de leche en polvo.

A la mañana siguiente, se retira el anticuerpo primario y se realizan varios lavados de las membranas con TBS-T durante 30 min, tras los cuales son incubados durante una hora a temperatura ambiente y en agitación, con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (sc-2020, Santa Cruz Biotech., Inc) a una concentración de 1:13.000 en TBS-T, al 2,5 % de leche.

La inmunodetección de la β -Actina (sc-47778, Santa Cruz Biotech., Inc) se lleva a cabo en la parte inferior de la membrana incubandola con el anticuerpo específico a una concentración de 1:3.000 en TBS-T, durante 2 h a 4 °C en agitación. En el caso de la β -Actina, no es necesario añadir un anticuerpo secundario puesto que el primario ya está conjugado con HRP.

Los complejos proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario-HRP o proteína-anticuerpo primario- HRP, fueron detectados utilizando *Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore Corporation, EE.UU.)* siguiendo las indicaciones del fabricante. Utilizando como técnica de revelado la quimioluminiscencia mediante el *ChemiDoc-it™ Imaging System (UVP, Reino Unido)*.

Análisis estadístico

Análisis general

Para realizar el análisis estadístico de los datos, se analizó la normalidad de las variables del estudio mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, obteniendo distribuciones no paramétricas. Para las comparaciones se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

El nivel de significación establecido (α) fue del 5%, considerando, por tanto, que hay diferencias estadísticamente significativas en aquellos valores en los que el grado de significación o nivel crítico (p) sea menor de a 0,05.

Para la realización de todo el análisis estadístico se utiliza el paquete informático SPSS *statistics* (versión 23.0.0) para Windows y el programa *GraphPad Prism* (Versión 7.0) para elaborar las gráficas.

Ajuste a las Series de Fourier

Para estudiar la posible existencia un patrón rítmico en la expresión de NKB en muestras de placenta humana a término, se analizan los datos utilizando las Series de Fourier, que se constituyen por un conjunto de ecuaciones, que permite ajustar los datos obtenidos a un modelo matemático propio de los ritmos biológicos:

$$f_{clo2}(x) = a_0 + a_1 * \cos(x * w) + b_1 * \sin(x * w) + a_2 * \cos(2 * x * w) + b_2 * \sin(2 * x * w)$$

Las series de Fourier descomponen las funciones periódicas en la suma de un conjunto de funciones oscilantes simples (senos y cosenos). Esto es de utilidad a la hora de aproximar funciones periódicas. Concretamente, en este trabajo, las Series de Fourier se utilizan para comprobar la periodicidad de la expresión proteica de NKB.

Como el número de puntos por cada variable no es muy amplio se utilizan Series de Fourier con dos términos. Las funciones periódicas se obtienen a través de un ajuste obtenido de un pack de herramientas proporcionado por Matlab R2013a.

El grado de ajuste de la función se establece utilizando el parámetro SSE y R2. SSE se define como el sumatorio del cuadrado del Error y constituye la derivación local de los valores de respuesta respecto de los valores del ajuste. Se define matemáticamente como:

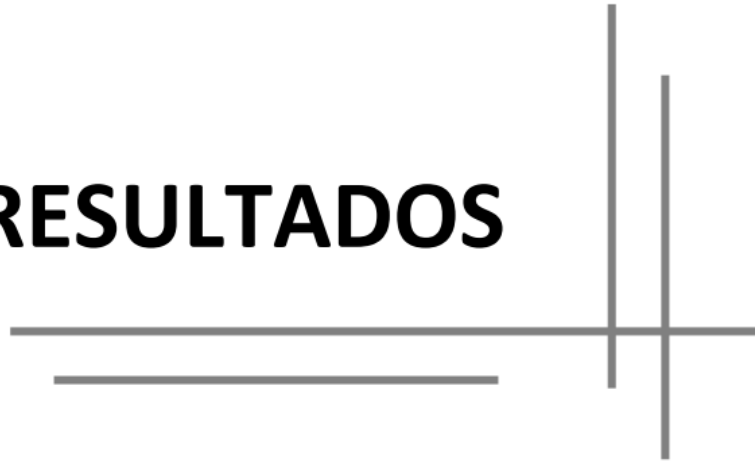
$$SSE = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Los valores cercanos a 0 indican que una componente de error muy baja, y que el ajuste obtenido será válido para realizar una correcta predicción. R2 mide cuanta variación de los datos es capaz de explicar el ajuste. R2 puede tomar cualquier valor entre 0 y 1. Por ejemplo, un valor R2 de 0,9 significa que el ajuste explica el 90% de la variación total de los datos sobre el promedio. R2 se define como:

$$SST = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y}_i)^2$$
$$R^2 = 1 - SSE/SST$$

Siendo SST la suma de cuadrados sobre la media.

RESULTADOS



RESULTADOS

Resultados Generales

En la figura 14 (pág.36) se muestra una imagen representativa de la expresión de la proteína NKB en los distintos grupos experimentales y sus valores de β -Actina correspondientes.

Para asegurar que la intensidad de las bandas mantiene una relación con la cantidad de proteína, la densidad de cada banda se normaliza con su respectivo control de carga proteica de β -Actina.

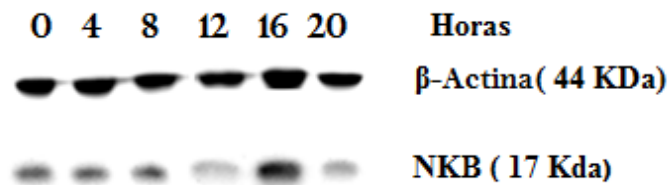


Figura 14. Imagen representativa de las Bandas obtenidas según la técnica de *Western Blot* para la NKB (17Kda) y la β -Actina (44Kda) Cada banda corresponde a un individuo por cada hora del día estudiada: 0h, 4h, 8h, 12h, 16h y 20h respectivamente para la β -Actina y la NKB.

Los valores de β -Actina permiten normalizar los valores obtenidos de NKB, representándose en la figura 15 (pág.37) los valores correspondientes a todas las muestras de tejido placentario utilizadas como la media \pm el error estándar de la media (SEM), no presentando diferencias significativas.

En la figura 15 (pág.37) se representan los valores de la cantidad de NKB normalizada con la β -Actina. La cantidad de dicha proteína presenta un aumento en el grupo 16:00h y una ligera tendencia a la disminución en los grupos de 12:00h y 20:00h. Sin embargo, las comparaciones entre grupos no resultan estadísticamente significativas.

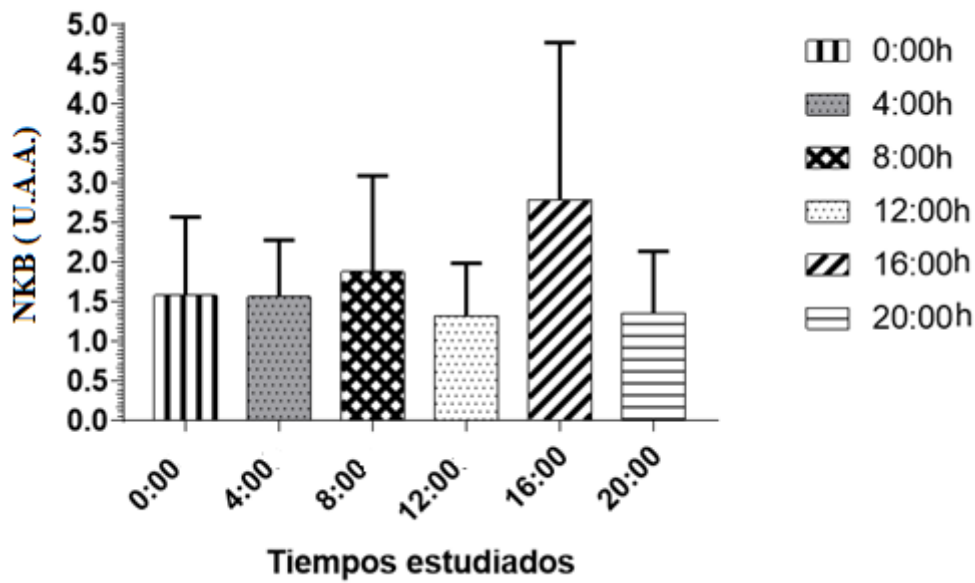


Figura 15. Cantidad total de la proteína NKB en tejido placentario humano a término. U.A.A.: Unidades Arbitrarias de Absorbancia.

Resultados del ajuste a las Series de Fourier.

Los datos obtenidos en la cuantificación de la proteína NKB ajustados al modelo matemático producto de la aproximación de dichos valores a funciones periódicas mediante el uso de Series de Fourier, con el objetivo de determinar una posible periodicidad rítmica en la expresión proteica del gen NKB, presenta los resultados expuestos a continuación.

$$F_{clo2}(x) = a_0 + a_1 \cdot \cos(x \cdot w) + b_1 \cdot \sin(x \cdot w) + a_2 \cdot \cos(2 \cdot x \cdot w) + b_2 \cdot \sin(2 \cdot x \cdot w)$$

$$a_0 = 0.177, a_1 = 0.08213, b_1 = -0.01532, a_2 = 0.02719, b_2 = -0.04824, w = 2.328.$$

$$SST = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y}_i)^2 = 4.254e - 11$$

$$R^2 = 1 - SSE/SST = 1$$

El valor de $R^2=1$ significa que el ajuste explica el 100 % de la variación total de los datos sobre el promedio.

En la figura 16 (pág.38) podemos comprobar que la media de todos los datos se ajusta al 100 % al modelo matemático propuesto, describiendo un ritmo ultradiano de doce horas. Las acrofases en la expresión de NKB se presentan a las 6:00h y 18:00h.

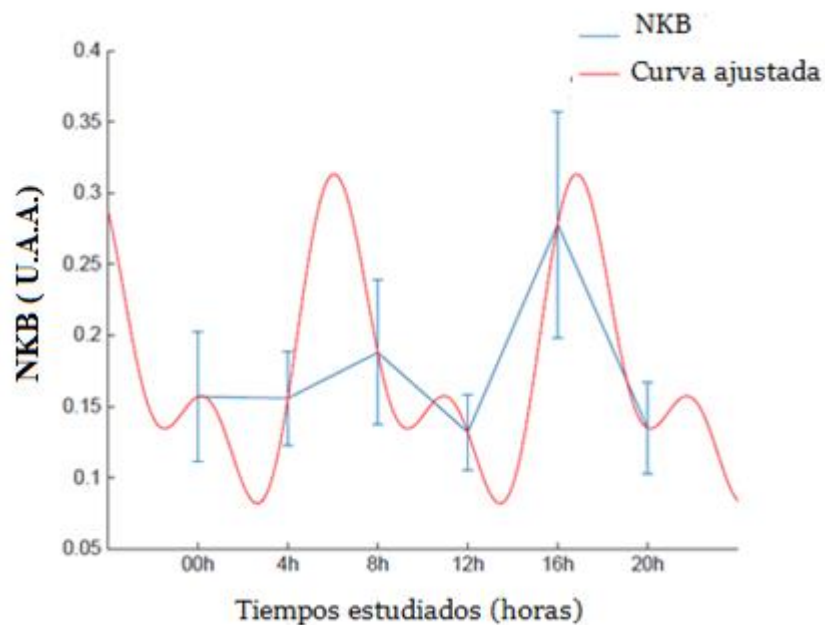


Figura 16. Modelo matemático obtenido del ajuste de los datos a una función oscilatoria mediante el uso de las Series de Fourier. En el eje de abscisas se representan las horas del día estudiadas en un periodo de 24h y en el eje de ordenadas se indica el resultado de los valores de NKB normalizados con los valores de β -Actina en placenta humana a término en unidades arbitrarias.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

La NKB fue tradicionalmente clasificada como un neurotransmisor específico de células neuronales e inmunes. De manera más reciente se demostró la expresión del gen que codifica la NKB en placenta, un órgano carente de inervación nerviosa (Page, 2004). Un grupo de investigadores dirigido por Torricelli, demostraron por primera vez la expresión de NKB en placenta humana a término mediante inmunohistoquímica. (Torricelli et al., 2007). Nuestros resultados, expuestos en la Figura 14 (pág.36), confirman dicha expresión de NKB en placenta humana a término señalada en la bibliografía.

Las funciones de la NKB en el organismo son muy amplias y no del todo conocidas, experimentos en ratas demostraron que la unión de la NKB a su receptor NK3R causaba la contracción de la vena portal y vasoconstricción del plexo mesentérico. De manera que se reduce el flujo sanguíneo de la circulación esplácnica (hígado, bazo, páncreas) para aumentar la circulación útero placentaria (D'Anna et al., 2002). En el año 2010 el grupo de investigación dirigido por Page (Page, 2010), propuso a la NKB como una señal enviada desde la placenta a la madre con el fin de maximizar el flujo de sangre a la unidad feto placentaria.

Una vez confirmada la expresión de NKB, en la Figura 15 (pág.37), podemos observar que su señal no es la misma en todas las horas estudiadas, se observa un aumento de la expresión de NKB que coincide con las 16:00 horas. Este aumento no difiere significativamente del resto de horas del estudio, posiblemente debido a que, como se indica en la página 31, este estudio se ha realizado con seis muestras de cada grupo, por lo que el SEM es elevado.

Es interesante destacar la dificultad para obtener muestras correspondientes a partos a las 16:00h. Esto coincide con la bibliografía existente respecto a un ritmo bastante estudiado durante la gestación como es el ritmo del parto. Un estudio clave sobre el potencial papel del reloj circadiano en el parto fue el realizado por Miller y colaboradores (Miller et al., 2004) en ratones gestantes *knockout* para el gen Clock. Estos animales, mostraban dificultad para iniciar el parto, prologándose o sin comenzar. Estos datos corroboran que el sistema circadiano regula en qué momento concreto tiene lugar el nacimiento. El trabajo de parto en nuestra especie suele comenzar en un periodo de tiempo

comprendido entre la media noche y las seis de la madrugada, por ello, la mayoría de los nacimientos naturales suceden sobre las ocho de la mañana (Shlabritz- Lovtsevicht et al., 2003), siendo difícil obtener muestras placentarias durante la tarde, lo que como se ha indicado, pensamos que puede ser la razón de la dificultad para obtener muestras a las 16:00h.

Aunque se desconocen los motivos, si tenemos en cuenta la propuesta del profesor Nigel M. Page sobre la función que ejerce la NKB en la placenta, tiene sentido pensar que el parto no puede coincidir con el momento álgido de secreción de NKB. Si la NKB maximiza el flujo de sangre a la unidad feto placentaria existiría un riesgo aumentado de hemorragias y sus complicaciones asociadas.

Por el contrario, se ha visto que en tejido de miometrio uterino, la NKB aumenta directamente las contracciones uterinas en rata (Magraner et al., 1998) al igual que en mujeres casi a término (Pennefather et al., 1993, Patac et al., 2000). La activación de estos receptores taquiquinérgicos, conduce a la apertura de canales de Ca^{+2} lo que induce la contractilidad del musculo liso (Syal et al., 1999). Es posible que, aunque la NKB produzca contractilidad uterina, no sea suficiente para desencadenar las contracciones que desencadenan el parto y por ello su aumento a las 16:00h no desencadene el inicio del parto.

Para valorar la presencia de ritmo en la NKB, se utilizó un modelo matemático mediante el uso de Series de Fourier. El 100% de la variación total de los datos se ajusta al modelo matemático y se muestra en la figura 16 (pág.38), observándose un ritmo claramente ultradiano. Es decir, la expresión de NKB es una actividad biológica que ocurre periódicamente en ciclos de menos de 20 h. En este caso la expresión de NKB presenta un periodo de 12 h en el cual, la mayor expresión debería coincidir a las 6:00h y 18:00h. Tal y como se muestra en la página 31, desafortunadamente nuestro diseño experimental no contemplaba la recogida de muestras a las horas correspondientes a la acrofase predicha por el ajuste de la NKB. Este puede ser el motivo de que en la figura 15 (pág.37) las diferencias en la expresión de NKB no sean significativas, ya que las muestras de las 16:00h estarían en un momento de ascenso no coincidiendo con la acrofase predicha y a su vez no tenemos muestras entre las 00:00 h y las 4:00 o las 12:00h y las 16:00 que correspondería a la batifase.

La existencia de este ritmo ultradiano es inesperada ya que, aunque se había demostrado con anterioridad que la placenta humana es un órgano claramente rítmico y que expresa genes reloj, estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Pérez et al., 2015) muestran que la mayor parte de ellos presentan un ritmo circadiano (*CLOCK*, *BMAL1* y *CRY1*) y solamente *PER2* tiene un ritmo ultradiano, sin que se conozcan con exactitud las razones de esta ritmicidad diferente.

Asimismo, se ha comprobado que la expresión de otros péptidos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) o la Kisspeptina, de reciente descubrimiento en placenta humana a término, presentan oscilaciones periódicas cada 24 h. Estos péptidos se han relacionado con una correcta invasión del trofoblasto que permita la formación de vellosidades coriales con vasos sanguíneos de altos flujo y baja resistencia esenciales para el buen funcionamiento de la placenta y el avance del embarazo sin complicaciones (Cartwright y Williams., 2012, Carrillo-Esper y Sanchez-Zúñiga, 2013, Ditisheim et al., 2013, De Pedro et al., 2015). Incluso otros parámetros presentan ritmos circadianos durante el embarazo, como es la temperatura, la presión arterial, el recuento de leucocitos, la presión del líquido amniótico o las contracciones. Asimismo, hay un ritmo claramente demostrado es el ritmo del parto, como ya indicamos (Golombek y Yannielli, 2006, Olcese, 2012). Por tanto, este trabajo demuestra por primera vez la existencia de un ritmo ultradiano en una proteína expresada en placenta y relacionada con la gestación.

Sin embargo, la función de estas oscilaciones cíclicas todavía se desconoce, debido principalmente a que existe poca información disponible acerca de la función exacta del sistema circadiano en placenta.

Se ha relacionado la expresión cíclica circadiana de melatonina producida por la glándula pineal con el inicio del trabajo de parto. Se sabe que la producción de melatonina durante la fase nocturna del ciclo luz/oscuridad, activa un conjunto de rutas de señalización que, a su vez, provoca un aumento del calcio intracelular, que terminan con la activación de la oxitocina, encargada de difundir las contracciones del miometrio. (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2003). Por ello, la previsión de que la expresión de NKB, que observamos en la figura 16 (pág.38), esté aumentada a las 6:00h se podría relacionar por la acción mediada por el receptor NK2R sobre la apertura de los canales de Ca^{2+} conduciendo a la contracción del miometrio descrita anteriormente, actuando como

adyuvante del fotoperiodo y la secreción melatonina provocando que la mayor parte de los partos comiencen de madrugada como se ha indicado.

Por otro lado, un aumento de los niveles de NKB se ha relacionado con enfermedades gestacionales como la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) (D'Anna et al., 2004), parto prematuro (Torricelli et al., 2007) y trastornos hipertensivos como la preeclampsia (Page, 2010).

Hasta el momento no se han establecido los mecanismos principales involucrados en la génesis de la preeclampsia. Durante la preeclampsia los niveles de NKB expresados tanto en sangre, cordón umbilical como en placenta son significativamente más elevados que en mujeres con gestaciones saludables (Page et al, 2000.b, Liu et al., 2009). Estas observaciones podrían ser consecuencia de una mala coordinación de la vasculaturas materna-fetal que dé lugar a vasos sanguíneos de alto flujo y baja resistencia. (Carrillo-Esper y Sanchez-Zúñiga, 2013). En ese momento, la placenta aumentaría la síntesis de NKB con el fin de maximizar el flujo sanguíneo de esa unidad feto placentaria mal formada intentando mantener el intercambio de nutrientes y oxígeno adecuado. Tanto es así, que se ha propuesto la NKB como potencial marcador para la preeclampsia, pero todavía no es posible emplearlo debido, entre otras, cosas a su variabilidad (Page, 2010). A la vista de nuestros resultados, esta variabilidad interpaciente podría deberse a la hora del día en la que se obtienen las muestras como consecuencia de la expresión rítmica predicha en la figura 16 (pág. 38). A su vez, una disrupción en la expresión cíclica de NKB durante la gestación podría considerarse como una posible causa de preeclampsia.

Recapitulando, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo y tras el análisis bibliográfico realizado, la NKB es la primera proteína estudiada hasta el momento que se expresa en placenta humana a término con una expresión rítmica que se ajusta a un modelo infradiano con un periodo de doce horas. Por tanto, consideramos que este estudio abre las puertas a nuevas investigaciones que traten de esclarecer el papel de la NKB y la alteración de los ritmos biológicos placentarios en el curso de la gestación.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

En este trabajo, en base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos, llegamos a la conclusión de que la NKB se expresa en placenta humana a término ajustándose a un modelo rítmico ultradiano con un periodo de 12 h.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFIA

A

Almeida T., Rojo J., Nieto P., Pinto F., Hernández M., Martín J. et al. Tachykinins and Tachykinin Receptors: Structure and Activity Relationships. *Current Medicinal Chemistry*. 2004; 11(15):2045-2081.

B

Boden M., Kennaway D. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction*. 2006; 132(3):379-392.

Bonzini M., Palmer K.T., Coggon D., Carugno M., Cromi A., Ferrario M.M. Shift work and pregnancy outcomes: a systematic review with meta-analysis of currently available epidemiological studies. *Int J Obstet Gynaecol*. 2011; 118(12):1429-37.

C

Carlson M.B. *Human embryology and developmental biology*. Philadelphia, Pa.: Elsevier/Saunders; 2014.

Carrillo-Esper R., Sanchez-Zúñiga M.J. Bases moleculares de la Preclampsia-eclamsia. *Rev Invest Med Sur Mex*. 2013; 20(2): 103-109.

Cartwright J.E., Williams P.J. Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in Pre-eclamsia. *J endocrinal*. 2012; 214(1):79-85.

Cheng G., Coolen L.M., Padmanabhan V., Goodman R.L., Lehman M.N. The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology*. 2010; 1:301–311.

D

D'Anna R., Corrado F., Baviera G., Jasonni V. Neurokinin B peptide levels in normal pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2002; 103(1):101-102.

D'Anna R., Baviera G., Corrado F., Crisafulli A., Ientile R., Buemi M., Squadrito F. Neurokinin B and nitric oxide plasma levels in pre-eclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004; 111(10):1046-1050.

De Pedro M.A, Moran J., Díaz I., Murias L., Fernández- Plaza C., González C., Díaz E. Circadian Kisspeptin expression in human term placenta. *Placenta.* 2015; 36:1337-1339.

Ditisheim A.J., Dibner C., Philippe J., Pechère-Bertschi A. Biological rhythms and preeclampsia. *Front Endocrinol.* 2013; 4:1-8.

D'Orleans-Juste P., Claing A., Telemaque S., Warner T.D.,Regoli D. Neurokinins produce selective venoconstriction via NK3 receptor in the rat mesenteric vascular bed. *Eur J Pharmacol* 1991; 204:329-334.

F

Fernández C. NotaPositiva - Reproducción Humana y Manipulación de la Fertilidad [Internet]. Notapositiva.com. 2016 [visitado el 23 May 2016]. Disponible en: http://www.notapositiva.com/pt/apntestbs/biologia/12_reprod_humana_manip_fertilidade_d.htm

G

Garther, L. Hiatt, J. Female reproductive system. *Cell Biology & Histology.* 2013:343–345

Gilbert S. F. *Developmental Biology* (Tenth Edition). Ed. Sinauer. 2015

Golombek D.A.,Yannielli P. Organización del sistema circadiano en vertebrados. En: *Cronobiología Básica Clínica.* Madrid, J.A. y Rol de Lama, A. Ed. Edite@red.2006

Gómez-Abellán P., Madrid J., Ordovás J., Garaulet M. Aspectos cronobiológicos de la obesidad y el síndrome metabólico. *Endocrinol Nutr.* 2012; 59(1):50-61.

González-Merlo J., Gonzalez-Bosquet E. La placenta, las membranas ovulares, el líquido amniótico y sus funciones. En: *Obstetricia.* González- Merlo J., Laílla Vicens J.M., Fabre Gonzalez E. y Gonzalez-Bosquet E. Ed. Elsevier Masson. 2013:44-59

Gozeri E., Celik H., Ozercan I., Gurates B., Polat S.A., Hanay F. The effect of circadian rhythm changes on fetal and placental development (experimental study). *Neuro Endocrinol Lett.* 2008; 29(1):87-90.

Gruart A., Delgado J.M., Escobar C., Aguilar R. Los relojes que gobiernan la vida. México: Fondo de Cultura Económica; 2002.

H

Hastings M, O'Neill J., Maywood E. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *Journal of Endocrinology.* 2007; 195(2):187-198.

Hernández-García J.M. Fisiología del embarazo. Placenta. En *Obstetricia.* Usandizaga J.A y de la Fuente P. Ed. Marbán. 2011.

Hernández-Rosas F., Santiago-García J. Ritmos circadianos, genes reloj y cáncer. *Archivos de Medicina.* 2010; 6(2).

Hiden U., Bilban M., Knöfler M., Desaye G. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasión. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 2007; 8(1):31-39.

Hill W., Wise, G., Anderson M. Control neurológico y endocrino, sistema nervioso y relojes biológicos. En *Fisiología Animal.* Ed. Panamericana. 2004: 302-326.

Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience.* 1988; 24:739-768.

Hu G., Lin C., He M., Wong A. Neurokinin B and reproductive functions: “KNDy neuron” model in mammals and the emerging story in fish. *General and Comparative Endocrinology.* 2014; 208:94-108.

Hua W., Luo L., Tian Y., Song M., Liu Y., Cui P. et al. Analysis of the serum concentrations of kisspeptin and neurokinin B in the geese during reproductive cycle and their localisation in the ovary. *Animal Reproduction Science*. 2014; 151(1-2):78-84.

I

Ingi T., Kitajima Y., Minamitake Y., Nakanishi S. Characterization of ligand-binding properties and selectivities of three rat tachykinin receptors by transfection and functional expression of their cloned cDNAs in mammalian cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 259:968-975.

K

Kangawa K., Minamino N., Fukuda A., Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1983; 114(2):533-540.

Kennaway D.J. y Varcoe T.J. Foreword. *Molecular and celular endocrinology*. 2012; 349: 1-2.

Kimura S., Okada M., Sugita Y., Kanazawa I., Munekata E. Novel Neuropeptides, Neurokinin α and β , Isolated from Porcine Spinal Cord. *Proc. Jpn. Acad.* 1983; 59:101-104.

Klassert T., Patel S., Rameshwar P. Tachykinins and Neurokinin Receptors in Bone Marrow Functions: Neural-Hematopoietic Link. *J. Receptor Ligand Channel Res.* 2010; 3:51-61.

Ko C.H., Takahashi J.S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(2):271-277.

L

Liu Y., Chen X., Chen H. P. Placental and umbilical cord levels of neurokinin B and NKB receptors in pre-eclampsia. *International journal of gynecology and obstetric.* 2009; 107: 58-59.

Lucas-Sánchez A., Martínez-Nicolas A., Escames G., de Costa J. Envejecimiento del sistema circadiano. *Revista Española de Geriatria y Gerontología* . 2012; 47(2): 76–80.

M

Madrid J.A. Los relojes de la vida, una introducción a la cronobiología. En: *Cronobiología Básica Clínica.* Madrid, J.A. y Rol de Lama, A. Ed. Edite@red.2006.

Maggi C.A. The mammalian tachykinin receptors. *Gen. Pharmacol.* 1995; 26:911-944.

Magraner J., Pinto F.M., Anselmi E., Hernandez M., Perez-Afonso R., Martín J.D. et al. Characterization of tachykinin receptors in the uterus of the oestrogen-primed rat. *Br J Pharmacol.* 1998; 123:259-268.

Mahoney M.M. Shift work, jet lag, and female reproduction. *Int J Endocrinol.* 2010:1-9

Mastrangelo D., Mathison R., Huggel H.G., Dion S., D'Orleans-Juste P., Rhaleb N.E. et al. The rat isolated portal vein: a preparation sensitive to neurokinins, particularly neurokinin B. *Eur J Pharmacol.* 1987; 134: 321-326.

Mescher A. L. The female reproductive. In Junqueira's Basic Histology. Text & Atlas. 2013:467–470.

Miller B.H., Olson S.L., Turek F.W., Levine J.E., Horton T.H., Takahashi J.S. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol.* 2004; 14(15):1367-1373.

N

Navarro V.M. Ruiz- Pino F., Sanchez-Garrido M.A., Garcia Galiano D., Hobbs S.J., Manfredi- Lozano M., León S. et al. Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *J. Neurosci.* 2012; 153(1): 316: 328.

Navarro V.M. Interaction between kisspeptins and neurokinin B. *Adv Exp Med Bio.* 2013; 784: 1-23.

O

Olcese J. Circadian aspects of mammalian parturition a review. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 349(1): 62-67.

Ordás J., Usadizaga J.A. Fisiología del aparato genital femenino. En *Obstetricia.* Usadizaga J.A. de la Fuente P. Ed. Marban. 2011.

Oride A., Kanasaki H., Mijiddorj T., Sukhbaatar U., Ishihara T., Kyo S. Regulation of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone expression in rat placenta: study using primary cultures of rat placental cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015; 13(1):1-9

P

Page N.M, Lowry P.J. Is 'pre-eclampsia' simply a response to the side effects of a placental tachykinin? *J Endocrinol.* 2000; 167:355–361.a

Page N.M., Woods R.J., Gardiner S.M., Lomthaisong K., Gladwell R.T., Butlin D.J., Manyonda I.T., Lowry P.J. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes preeclampsia. *Nature.* 2000; 405:797-800.b

Page N.M., Bell N.J., Gardiner S.M., Manyonda I.T., Brayley K.J., Strange P.G. et al. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100:6245-6250.

Page N.M. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(12): 1652-1663.

Page N.M., Morrish D.W., Weston-Bell N.J. Differential mRNA splicing and precursor processing of neurokinin B in neuroendocrine tissues. *Peptides*. 2009; 30(8):1508-1513.

Page N.M. Neurokinin B and pre-eclampsia: a decade of discovery. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010; 8(1):4.

Patac E.N., Ziccone S., Story M.E., Fleming A.J. Lilley A., Pennefather J.N. Activation of neurokinin NKB(2) receptors by tachykinin peptides causes contraction of uterus in pregnant women near term. *Mol Hum Reprod*. 2000; 6:549-554.

Pennefather J.N. Paull J.D., Story M.E., Ziccone S.P. Supersensitivity to the stimulant action of noradrenaline on human myometrium near term. *Reprod Fertil Dev*. 1993; 5:39-48.

Perez S., Murias L., Fernandez- Plaza C., Diaz I., Gonzalez T., Otero J., Díaz E. Evidence for Clock genes circadian rhythms in human full-term placenta. *Syst Biol Reprod Med*. 2015; 61(6): 360-366.

Pinto F. M., Almeida T.A., Hernández M., Devillier P., Advenier C., Candenas M.L. mRNA expression of tachykinins and tachykinins receptors in different human tissues. *Europ. J. Pharmacol*. 2004; 494:233-239

Pinto F. M, Bello A., Gallardo-Castro M., Valladares F., Almeida T., Tena-Sempere M. et al. Analysis of the Expression of Tachykinins and Tachykinin Receptors in the Rat Uterus During Early Pregnancy. *Biology of Reproduction*. 2015; 93(2):1-8.

R

Ralph M.R., Lehman M.N. Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends Neurosci*. 1991;14(8):362- 366.

Reppert S.M., Weaver D.R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418:935–941.

Rippe A. C. El Ciclo Estral. Dairy Cattle Reproduction Conference. 2009

S

Sadler T., Langman J. *Embriología Medica con orientación Clínica*. 10th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007.

Salgado-Delgado R.C., Fuentes-Pardo B., Escobar-Briones C. La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta. *Salud Mental* 2009; 32:69-7.

Schlabritz-Loutsevitch N., Hellner N., Middendorf R., Müller D., Olcese J. The Human Myometrium as a Target for Melatonin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(2):908-913.

Shi M. y Zheng X. Interactions between the circadian clock and metabolism: there are good times and bad times. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2013; 45: 61-69.

Simonneaux V., Bahougne T. A. Multi-Oscillatory Circadian System Times Female Reproduction. *Frontiers in Endocrinology.* 2015; 6(157):1-15.

Skorupskaite K., George J., Anderson R. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human Reproduction Update.* 2014; 20(4):485-500.

Steinhoff M, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett N. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiological Reviews.* 2014; 94(1):265-301.

Stephan F.K., Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci.* 1972; 69(6):1583-1586.

Syal A., Okawa T., Vedernikov Y., Chwalisz K., Saade G.R., Garfiel R.E. Effect of placental tissue on inhibition of uterine contraction by nitric oxide donors. *Am. J. Obstet Gynecol.* 1999; 181:415-418.

T

Torricelli M., Giovannelli A., Leucci E. Florio P. de Falco G., Torres PB, Reis FM et all. Placental NKB mRNA expression increase at preterm labor. *Placenta* 2007; 28: 1020- 1023.

V

Von Euler U.S., Gaddum J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol (Lond)*. 1931; 72(1):74-87.

W

Waddell B.J., Wharfe M.D., Creww R.C., Mark P.J. A rhythmic placenta? Circadian variation, clock genes and placental function. *Placenta*. 2012; 33(7):533-539.

Wharfe M., Mark P., Waddell B. Circadian Variation in Placental and Hepatic Clock Genes in Rat Pregnancy. *Endocrinology*. 2011; 152(9):3552-3560.

Y

Young B., Woodford P., O'Dowd G. Female reproductive system. In *Wheater's Fuctional Histology. A text and Colour Atlas*. 2014:370–377.

Young J., Bouligand J., Francou B., Raffin-Sanso, M.L., Gaillez S., Jeanpierre M., Grynberg M., Kamenicky P., Chanson P., Brailly-Tabard S., Guiochon-Mantel A. TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadot. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(5):2287–2295.