

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO DE BIOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

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



AUTOR DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER:

M^a de los Ángeles de Pedro Muñoz

TUTORA:

Elena Díaz Rodríguez

Junio 2014

Resumen:

Objetivos. El presente estudio trata de demostrar si en la placenta humana a término expresa la proteína Kisspeptina siguiendo un ritmo circadiano; y si existe una relación entre dichos niveles y las características fetales y del parto. Para ello, se realizó un estudio donde participaron 28 mujeres gestantes sanas con edades comprendidas entre $32,5 \pm 8$ años. Se recogieron fragmentos de las placentas a término correspondientes a seis horas del día: 0:00, 4:00, 8:00, 12:00, 16:00, 20:00 y se estudió la posible existencia de un ritmo circadiano en la expresión de Kisspeptina. *Resultados.* Los datos obtenidos mediante la realización de la técnica de Western Blot fueron ajustados a un modelo matemático basado en las Series de Fourier. *Conclusión.* Por primera vez se demuestra que en placenta humana a término la Kisspeptina se expresa con un patrón rítmico circadiano.

Abstract:

Objectives. This study tries to prove if Kisspeptin protein is expressed in term human placenta following a circadian rhythm; and if there are some relationship between these levels and fetal characteristics and delivery. Therefore, we performed a study involving 28 healthy pregnant women aged 32.5 ± 8 years and collected fragments term placentas for six hours a day: 0:00, 4:00, 8:00, 12:00, 16:00, 20:00. The possible existence of a circadian rhythm was studied in the kisspeptin expression. *Results.* The data obtained by performing Western blotting technique were fitted to a mathematical model based on the Fourier Series. *Conclusion.* For the first time, it was demonstrated that human term placenta Kisspeptina expressed with a circadian rhythm pattern.

PALABRAS CLAVE: Kisspeptina, KISS-1, placenta, ritmo circadiano.

KEY WORDS: Kisspeptin, KISS-1, placenta, circadian rhythm.

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento al Área de Fisiología del departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo por permitirme realizar mi proyecto fin de Máster en sus instalaciones.

Gracias al Servicio de Obstetricia y Ginecología del HUCA y a la Dra. Cati Fernández-Plaza por participar en la recogida de muestras.

En especial quiero agradecer a mi tutora Elena Díaz Rodríguez, por su tiempo, consejos y apoyo. Pero sobre todo, por darme a conocer el maravilloso mundo de la Cronobiología.

No quiero olvidarme de Javi, muchísimas gracias por tu paciencia y por enseñarme a realizar los western blot, sin ti este proyecto no habría sido posible.

A Marta y a Paula que gracias a vosotras los largos días de laboratorio se han pasado volando; y al resto de mis compañeros de Máster me ha encantado pasar este espléndido año con vosot@s.

Por último a mi familia, por todo el apoyo y comprensión a lo largo de toda mi formación, muchas gracias por estar siempre a mi lado.

Abreviaturas

- **A:** Amplitud
- **Akt:** Proteín kinasa B
- **Arg:** Arginina
- **BCA:** Ácido Bicinconínico
- **Bmal1:** Gen reloj *Aryl hydrocarbon receptor nuclear*
- **BSA:** Albumina sérica bovina
- **Ca²⁺:** calcio
- **CKIe:** Enzima Caseín kinasa le
- **Clock:** Gen reloj *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*
- **Cry:** Gen reloj Criptocromo
- **CXCR4:** C-X-C chemokine receptor type 4
- **CX43:** Conexina 43
- **Erk:** extracellular-signal-regulated kinases
- **FSH:** Hormona folículo estimulanye
- **GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas
- **Gpr54:** Receptor de Kisseptina murino
- **GSH:** Ganglio cervical superior
- **HUCA:** Hospital Universitario Central de Asturias
- **IGL:** Lámina intergeniculada
- **IGM:** Inmunoglobulina G
- **IP3:** Inositol trifosfato
- **K⁺:** Potasio
- **Kiss1:** Gen Kisseptina murino
- **KISS1:** Gen Kisseptina humano
- **Kiss1r:** Receptor de kisseptina murino
- **KISS1R:** Receptor de kisseptina humano
- **KO:** Knock Out
- **Kp:** Kisseptina
- **LH:** Hormona luteinizante
- **MMP:** Metaloproteasa
- **MT2R:** Receptor de la melatonina2
- **NFκβ:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- **NSQ:** Núcleo supraquiasmático
- **PACAP:** Polipéptido pituitaria adenilato ciclasa de activación
- **PER:** Gen reloj Period
- **Phe:** Fenilalanina
- **PI3K:** Fosfoinositol-3-Kinasa
- **PKC:** Proteín Kinasa C
- **PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **Rev-Erb:** Rev-ErbA alpha
- **T:** Periodo
- **TGH:** Tracto genículo-hipotalámico
- **TNF-α:** Factor de necrosis tumoral alpha
- **TRH:** Tracto retino-hipotalámico
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular

Índice

Introducción	10
1. Placenta	10
1.1 Desarrollo embriológico.	10
1.2 Funciones de la placenta.	14
1.3 Placenta a término: características macroscópicas.....	16
2. Cronobiología: ritmos circadianos.....	17
2. 1 Ritmos biológicos: definición, parámetros y clasificación.	18
2. 2 Fisiología de los ritmos biológicos: el sistema circadiano.....	19
2. 3 Propiedades de un reloj circadiano	21
2.4 Genes reloj y mecanismo molecular del reloj circadiano.....	22
2.5 Relojes circadianos en tejidos periféricos.	23
2.6 Ritmos circadianos en la gestación.....	24
2.7 Desincronización del reloj circadiano y enfermedad.....	25
3. Sistema kiss1/kiss1R.....	26
3.1 Estructura de la Kisspeptina.....	27
3.2 Mecanismo de acción.....	27
3.3 Expresión del sistema KISS1/KISS1R.....	28
3.4 Funciones y efectos.	29
Hipótesis Y Objetivos	35
1. Justificación.	35
2. Hipótesis.	35
3. Objetivos.....	35
Materiales Y Metodología	36
1. Sujetos de estudio.....	36
2. Diseño del experimento.	36
2.1 Homogenización de proteína.....	37
2.2 Cuantificación de proteína y Western Blot.....	37
3. Análisis estadístico.....	39
3.1 Análisis general.	39
3.2 Tratamiento matemático de los datos.....	39

Resultados	41
1. Resultados generales.	41
2. Resultados del ajuste matemático.	42
Discusión	43
Conclusiones.....	50
Bibliografía	51

Índice de Ilustraciones

- Ilustración 1: Feto en el interior de la placenta.
- Ilustración 2: Fecundación, división embrionaria e implantación.
- Ilustración 3: Representación de los distintos tipos de deciduas.
- Ilustración 4: Etpas prelacunar y lacunar del periodo prevelloso del desarrollo embrionario.
- Ilustración 5: Tipos de vellosidades embrionarias.
- Ilustración 6: Aspecto y componentes de una placenta humana en sus fases finales del embarazo.
- Ilustración 7: Distintos procesos de intercambio de sustancias metabólicas entre el feto y la madre.
- Ilustración 8: Aspecto macroscopico de la cara materna y fetal de una placenta humana a término.
- Ilustración 9: Represntación de algunas funciones reguladas por ritmos biológicos.
- Ilustración 10: Parámetros que definen un ritmo biológico ajustado a una curva sinusoidal.
- Ilustración 11: Clasificación de los Ritmos Biológicos en función de su frecuencia.
- Ilustración 12: Componentes principales de un sistema circadiano.
- Ilustración 13: Regulación rítmica circadina de la secreción de melatonida.
- Ilustración 14: Genes reloj implicados la producción de ritmos circadianos.
- Ilustración 15: Tejidos periféricos con genes reloj (relojes secundarios).
- Ilustración 16: Representación de la diversidad de enfermedades asociadas a la desincronización de los ritmos circadianos.
- Ilustración 17: Procesamiento proteolítico del precursor del gen KISS1 para generar la familia de las kisspeptinas.
- Ilustración18: Rutas de señalización desencadenadas por la unión de Kisspeptina a su receptor.
- Ilustración19: Un papel de KISS1 y KISS1R en el desarrollo del cáncer y metástasis.
- Ilustración 20: Modelo propuestos según el cual las neuronas Kiss1 actúan como reguladores intermedios entre la función metabólica y la reproductora.

- Ilustración 21: Representación esquemática de las deleciones y mutaciones inactivantes del gen KISS1R observadas en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico. Los puntos negros indican las mutaciones, con la referencia de la sustitución aminoacídica. Los puntos grises indican la deleción predicha por de Roux et al.
- Ilustración 22: Expresión proteica de los productos de KISS1 y KISS1R durante el primer trimestre de gestación y el proceso de invasión trofoblástica.
- Ilustración 23: Tiempos circadianos utilizados en el ensayo.
- Ilustración 24: Resultados obtenidos en la realización del Western blot. En la imagen A se observan las bandas de seis individuos, uno por cada hora estudiada, correspondiéndose a: 0h, 4h, 8h, 12h, 16h y 20h respectivamente para la actina y la kisseptina. Los valores de actina permiten normalizar los valores obtenidos de Kisseptina. En la imagen B se representan los valores correspondientes a todas las muestras de tejido placentario utilizadas como la media \pm el error estándar y aparece representada con un línea roja la tendencia de las muestras.
- Ilustración 25: Modelo matemático obtenido del ajuste de los datos a una función oscilatoria mediante el uso de las Series de Fourier. En el eje de abscisa 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 Kisseptina normalizados con los valores de actina en unidades arbitrarias. Todos los puntos representados se corresponden con la media de los valores obtenidos por cada hora estudiada.

Introducción

1. Placenta

La placenta humana es un órgano muy especializado, esencial en el embarazo de los mamíferos superiores, que hace de intermediario entre la madre y el feto mientras dura el proceso de gestación. El término placenta proviene etimológicamente del latín “torta plana” y aparentemente fue introducido en 1559 por el médico Realduo Columbus.



Ilustración 1: Feto en el interior de la placenta

<http://www.crecerfeliz.es/Embarazo/Cuidados/placenta-filtro-de-vida/funcionamiento-placenta>

1.1 Desarrollo embriológico.

La placenta humana comienza a desarrollarse durante la segunda semana del embarazo y continúa su evolución hasta el cuarto mes, cuando ya se encuentra totalmente formada y diferenciada, aunque sufre pequeñas modificaciones hasta el término del embarazo.

Tras la fecundación del ovocito por el espermatozoide en el tercio distal de la trompa de Falopio, el cigoto comienza su descenso hacia la cavidad uterina. Durante el trayecto sufre un proceso de división hasta alcanzar el útero el quinto día en estadio de blastocisto. El sexto día de desarrollo embrionario se produce la eclosión o “Hatching”, es decir, la salida del blastocisto de la zona pelúcida, necesaria para que se produzca la implantación que tiene lugar aproximadamente una semana después de la fecundación⁽¹⁾.

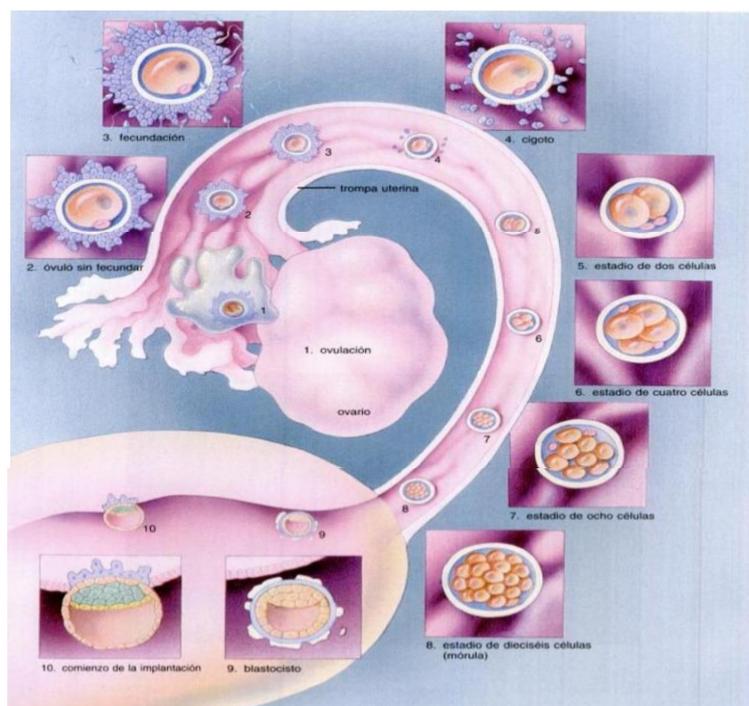


Ilustración 2: Fecundación, división embrionaria e implantación⁽¹⁾

La decidua (del latín *deciduos*, desprenderse) es el endometrio grávido o la capa funcional del endometrio en la mujer embarazada y además, es la parte del útero que se desprende durante el parto⁽¹⁾.

Al producirse la implantación del embrión, la decidua experimenta una serie de modificaciones conocidas con el nombre de reacción decidual y se diferencia en tres regiones según su relación con el lugar de implantación: la decidua basal es la porción adyacente al *conceptus* que posteriormente dará origen al componente materno de la placenta, la decidua capsular es la porción superficial que rodea al *conceptus* y el endometrio restante constituye la decidua parietal.

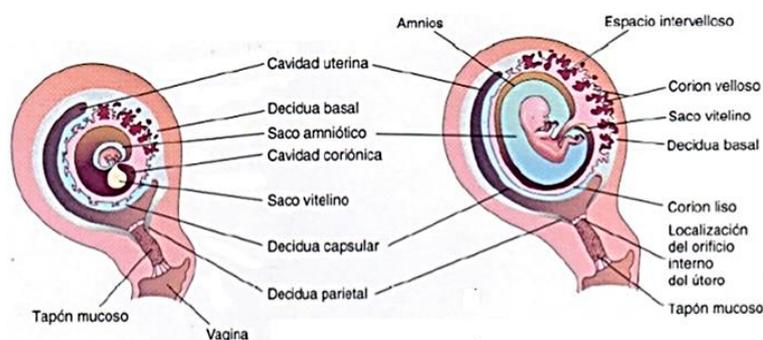


Ilustración 3: Representación de los distintos tipos de deciduas⁽¹⁾

En el desarrollo de la placenta se distinguen cuatro periodos fundamentales⁽¹⁾⁽²⁾:

- **El periodo preveloso:** se caracteriza por la evolución de las vellosidades a lo largo de la cavidad de implantación. Comprende desde el sexto hasta el decimotercer día del embarazo. En esta etapa el trofoblasto primario embrionario se divide: en una capa externa, el sincitiotrofoblasto, que carece de estructura celular y es la encargada de erosionar el endometrio debido a que posee actividad proteolítica, y una capa interna, el citotrofoblasto, que posee una elevada actividad mitótica.

A su vez el periodo preveloso se subdivide en dos fases:

-**Fase pre-lacunar:** se inicia desde la aposición del blastocisto en el epitelio endometrial hasta que se ha producido una invasión completa del endometrio. Sucede del día sexto al noveno.

-**Fase lacunar o Trabecular:** se caracteriza por la aparición de vacuolas aisladas en el sincitiotrofoblasto que, al fusionarse e invaginarse, forman lagunas extensas llamadas cavidades hemáticas. Posteriormente, dichas lagunas se fusionan y forman redes extensas que constituyen los primordios de los espacios intervellosos de la placenta. Esta fase ocurre desde el noveno día hasta el decimotercero.

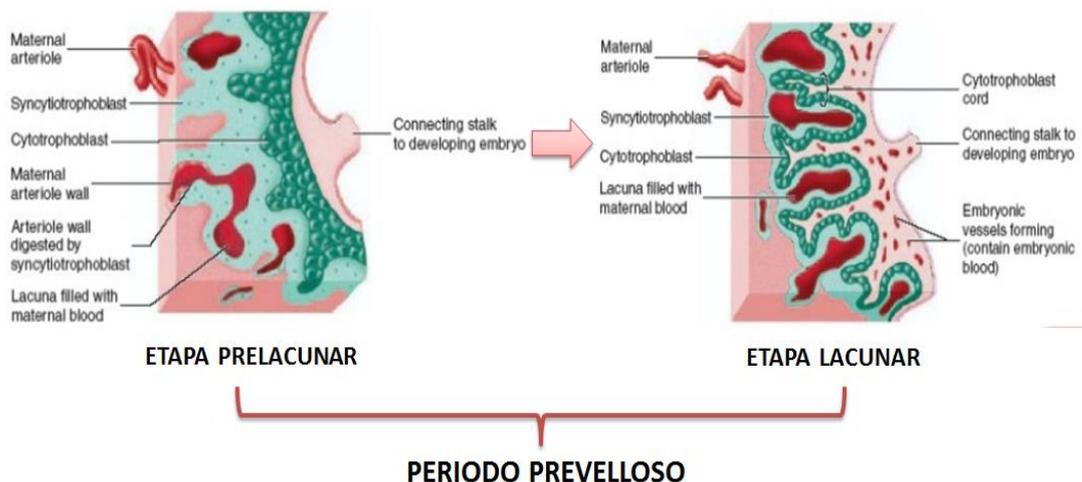


Ilustración 4: Etapas prelacunar y lacunar del periodo preveloso del desarrollo embrionario⁽¹⁾

-**El periodo Velloso:** tiene lugar del día 13 hasta el tercer mes de embarazo. En esta etapa se desarrollan las vellosidades primarias y las secundarias que posteriormente evolucionan a vellosidades terciarias.

-Vellosidades primarias: se constituyen el decimotercer día del desarrollo embrionario al producirse una proliferación y diferenciación del citotrofoblasto en prolongaciones dirigidas a la capa sincitial, dando lugar a columnas celulares rodeadas de sincitio.

-Vellosidades secundarias: surgen el decimoctavo día del desarrollo embrionario cuando el interior de las vellosidades primarias se forma un núcleo de tejido mesenquimático, que tiene su origen en el mesodermo extraembrionario somático.

-Vellosidades terciarias: se desarrolla el vigésimo-primer día de desarrollo embrionario. Las células mesodérmicas centrales presentes en las vellosidades secundarias se diferencian en células y en pequeños vasos sanguíneos formando el sistema capilar vellositario.

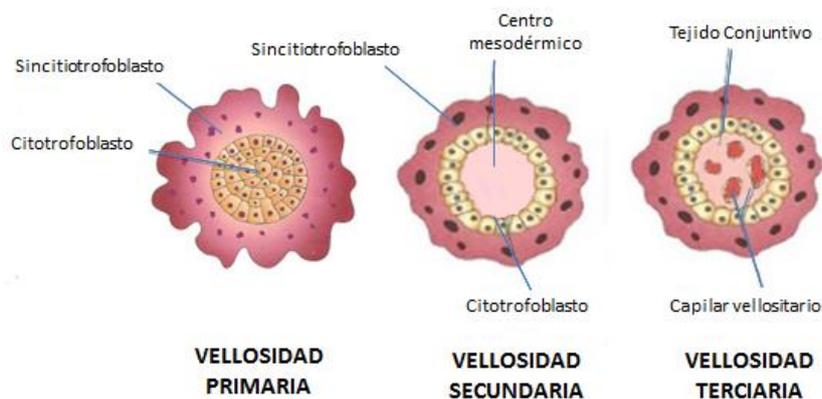


Ilustración 5: Tipos de vellosidades embrionarias⁽¹⁾

A partir de la tercera semana se inicia un desarrollo sostenido de las vellosidades, formándose las *vellosidades de anclaje*, que van desde la placa coriónica a la decidua basal y las vellosidades libres o terminales, que provienen de ramificaciones de las vellosidades de anclaje y a través de ellas se produce el intercambio de nutrientes.

Por otro lado, las vellosidades que se forman en la superficie del corion relacionadas con el polo embrionario aumentan rápidamente de número, se ramifican y crecen, formando el corion vellosito frondoso. En cambio, las vellosidades relacionadas con el polo anembrionario del endometrio se comprimen y disminuyen en cantidad y tamaño hasta degenerar y desaparecer por completo, formando el corion calvo.

- **Placenta totalmente funcional:** al comienzo del cuarto mes la placenta se compone de una porción fetal constituida por el corión frondoso y una porción materna formada por la decidua basal. Entre la lámina coriónica y la lámina decidual se encuentran los espacios intervillosos que contienen sangre materna. Las vellosidades formadas en los estadios previos se desarrollan hacia dichos espacios. A final de este mes el corion liso, se pone en contacto con la decidua parietal, y constituye la cavidad uterina⁽³⁾.

Entre el cuarto y quinto mes de gestación de la decidua se forman unos tabiques deciduales, que sobresalen hacia los espacios intervillosos sin llegar a alcanzar la lámina coriónica. Estos tabiques están constituidos por un núcleo de tejido materno recubierto de una capa de tejido sincitial y al formarse, la placenta queda dividida en compartimentos denominados cotiledones.

Hacia el final de la gestación la placenta sufre un proceso de maduración donde aumenta progresivamente el número y ramificaciones de las vellosidades. Además, se produce un aumento del diámetro del capilar intravellositario. Este desarrollo es paralelo al crecimiento del feto. A partir de la semana 36 esta maduración se detiene. Por último, al término de la gestación se observa un proceso de senescencia placentaria.

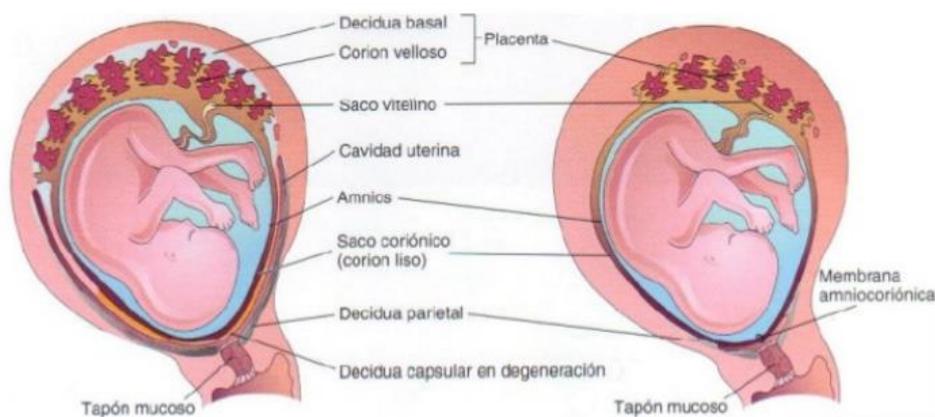


Ilustración 6: Aspecto y componentes de una placenta humana en sus fases finales del embarazo⁽¹⁾

1.2 **Funciones de la placenta.**

La placenta es un órgano vital para el mantenimiento de la gestación, debido a que realiza múltiples funciones esenciales, tanto para la madre como para el feto.⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾

-Función de barrera o Protección: la placenta supone una doble protección para el feto. En primer lugar, le protege a nivel biológico actuando como filtro frente a sustancias, parásitos, virus y bacterias que pudiesen afectarle. Sin embargo, esta protección es deficitaria frente a compuestos como fármacos, alcohol o drogas, que pueden causar graves daños al feto en desarrollo. En segundo lugar, la placenta ofrece una protección física, debido a la existencia de las distintas membranas y al líquido amniótico, que proporcionan un ambiente estanco, estéril y con temperatura controlada. Esta situación permite que el feto no se vea afectado por las posibles variaciones ambientales externas, ni por los golpes o perturbaciones que pudiesen sucederse.

-Transporte e intercambio de sustancias: La placenta tiene la función de garantizar la homeostasis del feto mediante el suministro de nutrientes (agua, electrolitos, hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos, proteínas, bilirrubina y vitaminas), eliminación de desechos y la realización del intercambio de gases. Para ello, posee tres tipos de mecanismos de transporte: la difusión simple, la difusión facilitada, el transporte activo, pinocitosis o paso directo a través de la membrana placentaria.

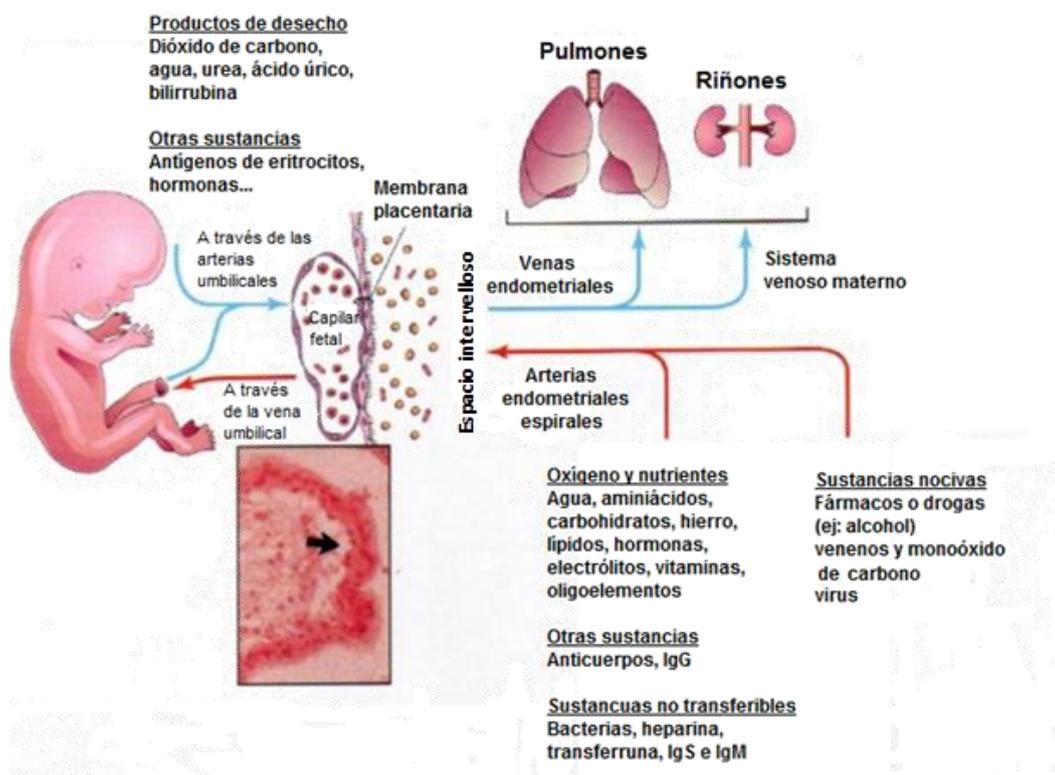


Ilustración 7: Distintos procesos de intercambio de sustancias metabólicas entre el feto y la madre⁽¹⁾

-Función metabólica: la placenta, principalmente al inicio del embarazo, sintetiza glucógeno, colesterol y ácidos grasos, que actúan como fuente de nutrientes y reserva energética para el embrión/feto durante la gestación.

-Función endocrina: la placenta actúa como órgano endocrino, secretando hormonas proteicas y esteroideas, con el fin de favorecer el desarrollo fetal. Durante los dos primeros meses de embarazo, las células del sincitiotrofoblasto producen hCG para mantener el cuerpo lúteo. Esta hormona es excretada por la madre en la orina y se utiliza como predictor del embarazo. La placenta también secreta somatomamotrofina (antes denominada patógeno placentario), es una hormona similar a la hormona de crecimiento. La progesterona comienza a producirse a finales del cuarto mes con el fin de mantener la gestación; mientras que los estrógenos, aumentan sus niveles a lo largo de toda la gestación con la función de contribuir al crecimiento del útero y al desarrollo de las glándulas mamarias.

-Función inmunológica: la madre es la encargada de proveer al feto de un sistema inmunológico durante las primeras etapas de su desarrollo. En torno a la semana 14, las inmunoglobulinas G de origen materno (IgG) son transportadas al feto mediante pinocitosis, dotándole de una inmunidad pasiva frente a ciertas enfermedades infecciosas. Sin embargo, la competencia 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. En el momento del nacimiento, los recién nacidos son capaces de producir sus propias IgG, pero no es hasta los tres años cuando adquieren concentraciones similares a las de un adulto.

1.3 Placenta a término: características macroscópicas.

La placenta a término es discoidal de tipo hemocorial (la sangre materna y fetal nunca se mezclan). Sus dimensiones varían mucho dependiendo de la gestación, pero por término medio, su diámetro oscila entre 15 y 25 cm y el espesor entre 2 y 3 cm. El peso suele estar comprendido entre 500 y 600 g⁽¹⁾.

-Componente de origen materno: la cara materna presenta una superficie irregular debido a la existencia serie de elevaciones denominadas cotiledones (15-20) cubiertos por una delgada capa de decidua basal y separados por surcos que se forman a partir de los tabiques deciduales.

-Componente de origen fetal: la superficie fetal posee un aspecto liso y se encuentra totalmente recubierta por la lámina coriónica. Esta cara se encuentra orientada hacia la cavidad amniótica, y en ella se observan arterias y venas de grueso calibre denominadas vasos coriónicos, que se proyectan hacia el cordón umbilical.

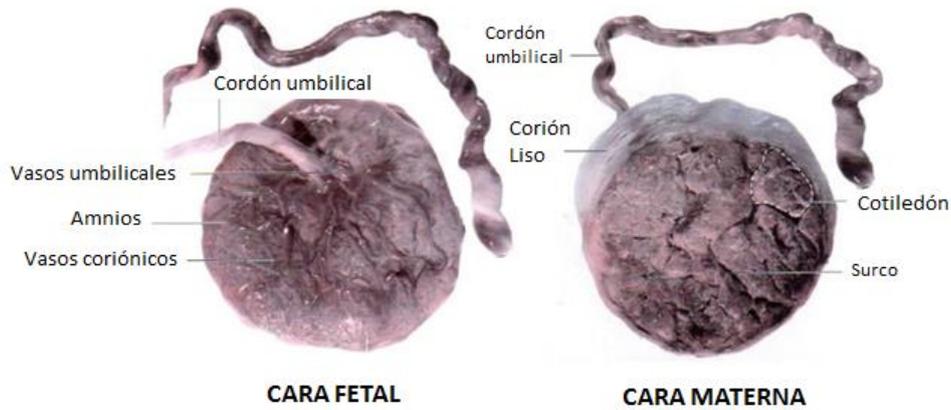


Ilustración 8: Aspecto macroscópico de la cara materna y fetal de una placenta humana a término⁽¹⁾

2. Cronobiología: ritmos circadianos

La cronobiología es la ciencia que estudia las adaptaciones de los organismos vivos, en todos los niveles de organización, a ciclos ambientales que ocurren regularmente. El término proviene etiológicamente del griego: *Kronos* (tiempo), *bios* (vida) y *logos* (conocimiento)⁽⁶⁾.

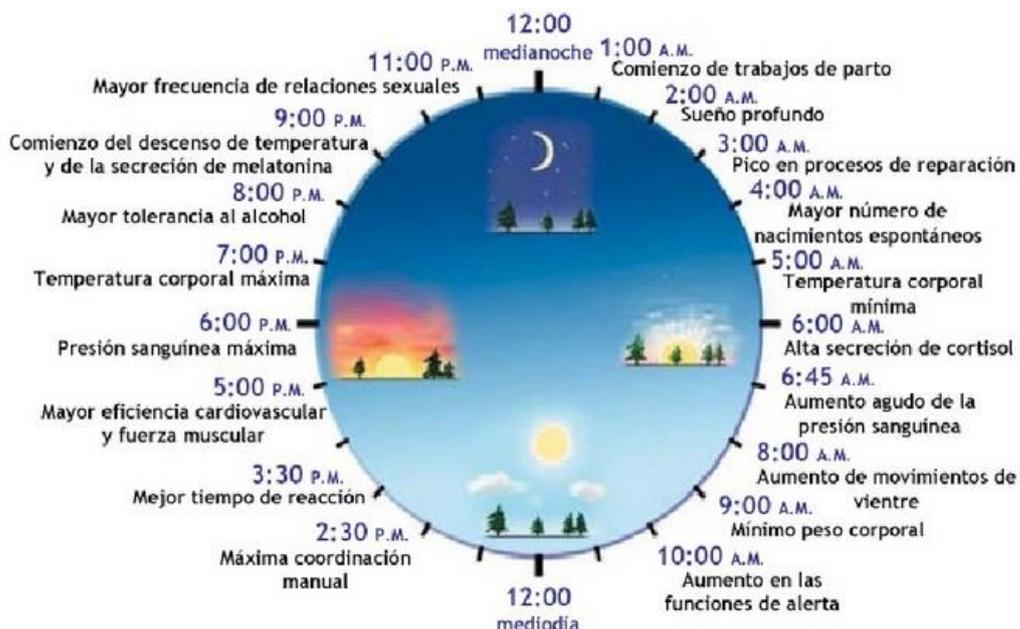


Ilustración 9: Representación de algunas funciones reguladas por ritmos biológicos

<http://www.ech24.org/blogs/blogs-graveyard-circadian/>

2. 1 Ritmos biológicos: definición, parámetros y clasificación.

Más concretamente la cronobiología se encarga del estudio de los ritmos biológicos, entendiendo por tales, toda oscilación cíclica de una variable biológica que se repite a intervalos regulares en el tiempo, siendo por tanto, predecibles. Se consideran variables biológicas: la temperatura corporal, la frecuencia cardiaca o la presión arterial entre otras muchas.

Cualquier ritmo biológico se define por los siguientes parámetros:⁽⁶⁾⁽⁷⁾

-**Periodo (T):** es la duración de un ciclo completo en una variable rítmica, se expresa en unidades de tiempo y se corresponde con el inverso de la frecuencia.

-**Amplitud (A):** es el valor obtenido como la diferencia entre el valor máximo y mínimo del ritmo. En una función sinusoidal también puede medirse calculando como la diferencia entre el máximo o el mínimo y el mesor de un ritmo ajustado.

-**Mesor (Midline Estimating Statistic of Rhythm):** es el valor medio de un ritmo ajustado a una función sinusoidal.

-**Fase:** es un punto de referencia temporal de un ritmo. Se distingue dos fases características en un sistema sinusoidal, la Acrofase, que es el momento en el que la variable alcanza el valor máximo y la Batifase, que constituye el punto donde el valor de la variable es mínimo.

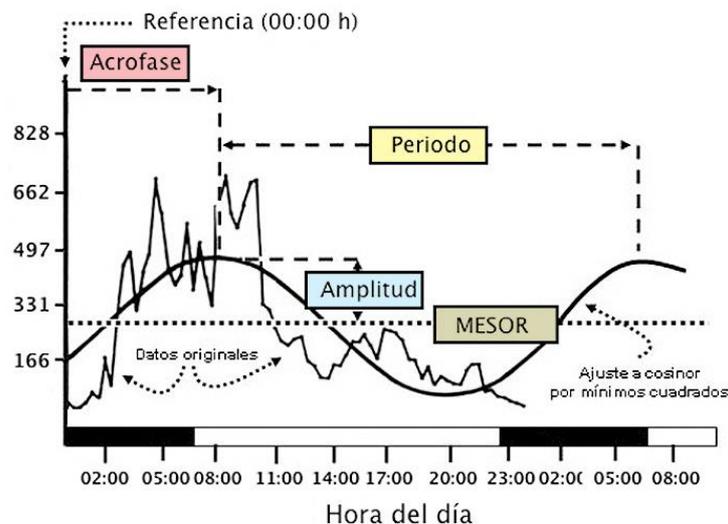


Ilustración 10: Parámetros que definen un ritmo biológico ajustado a una curva sinusoidal

<http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-9.-envejecimiento-y-ritmos-biologicos/9.2-concepto-de-sistema-circadiano>

Por otro lado, los ritmos biológicos pueden clasificarse en función de la duración de su periodo⁽⁸⁾⁽⁷⁾:

-Ritmos ultradianos son los procesos biológicos cuyo ritmo oscila con un periodo menor a veinte horas. Entre estos ritmos de alta frecuencia se encuentran las ondas del electroencefalograma, las fases del sueño, la frecuencia respiratoria o la motilidad gástrica.

-Ritmos circadianos (del latín *circa*, que significa 'alrededor de' y *dies*, que significa 'día') son procesos biológicos que se repiten en ciclo de aproximadamente veinticuatro horas. Este tipo de ritmo es muy frecuente en los sistemas biológicos como por ejemplo en el ciclo sueño-vigilia, las variaciones de la presión arterial, los procesos metabólicos o la secreción hormonal.

-Ritmos infradianos: son los procesos biológicos cuyo ritmo oscila con un periodo mayor a veintiocho horas. Entre estos ritmos de baja frecuencia se encuentran el ciclo menstrual o el ciclo de hibernación.

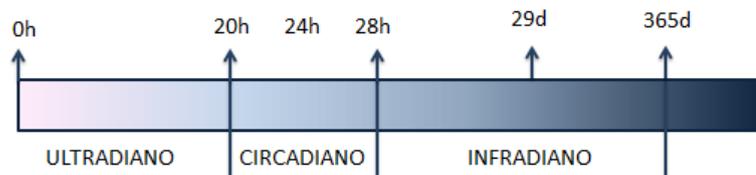


Ilustración 11: Clasificación de los Ritmos Biológicos en función de su frecuencia

2. 2 Fisiología de los ritmos biológicos: el sistema circadiano.

Se denomina sistema circadiano al conjunto de elementos que controlan los ritmos biológicos de naturaleza circadiana y compone de tres elementos principales: 1) vías de entrada o vías aferentes, que permitan la llegada de las señales de sincronización procedentes del medio externo al marcapasos. A estas señales ambientales de sincronización se las conocen por el término alemán *Zeitgeber* ("dador de tiempo"), la más conocida es el ciclo luz-oscuridad. 2) El oscilador endógeno o Marcapasos, que es una estructura localizable, funcional y anatómicamente capaz de generar por sí mismo oscilaciones rítmicas. 3) Vías de salida o vías eferentes que desde el marcapasos transmiten la ritmicidad circadiana originada hasta los sistemas efectores⁽⁶⁾⁽⁹⁾.



Ilustración 12: Componentes principales de un sistema circadiano

1) Vías aferentes:

Actualmente, se han descrito diferentes vías aferentes que participan en la captación y transmisión de la información relativa a las condiciones ambientales. Estas vías se dividen en neuronales (fólicas y no fólicas) y humorales⁽⁹⁾.

La principal vía de entrada del sistema circadiano es a través del tracto retino-hipotalámico (TRH), que lleva la información lumínica directamente desde la retina al núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ), mediante proyecciones neuronales que se originan en las células ganglionares, permitiendo la sincronización de las condiciones lumínicas y el reloj endógeno circadiano. Los neurotransmisores más importantes liberados por el TRH son el glutamato y el polipéptido de la pituitaria de activación de la adenilato ciclasa (PACAP). Así mismo, existe otra vía menos relevante que proviene de la lámina intergeniculada (IGL), que constituye la vía del tracto genículo-hipotalámico(TGH)⁽¹⁰⁾.

En cuanto a las vías aferentes de tipo humoral, encontramos melatonina. Esta hormona se caracteriza por poseer una secreción limitada a los periodos de oscuridad, por lo que la melatonina constituye una señal química de la duración de la noche o fotoperiodo de oscuridad.

2) Reloj o Marcapasos endógeno:

En los mamíferos, el reloj o marcapasos circadiano principal se localiza en el NSQ. El NSQ se compone de dos pequeños núcleos de unos pocos miles de neuronas, localizados próximos al tercer ventrículo y en posición dorsal respecto al quiasma óptico.

Existen numerosas evidencias que ponen de manifiesto el papel del NSQ como el reloj central o principal del sistema circadiano⁽⁹⁾:

-Si se producen lesiones o se destruye completamente el NSQ se pierde la mayoría de los ritmos circadianos en mamíferos⁽¹¹⁾.

-Si se realiza un trasplante de tejido perteneciente a el NSQ en un animal lesionado, la condición de arritmicidad se revierte y se recuperan los ritmos biológicos con el periodo del animal donante⁽¹²⁾.

-En cultivo in-vitro se ha observado ritmos cuantificables en explantes del NSQ, y además, células pertenecientes a el NSQ son capaces de mostrar ritmicidad cuando se cultivan de manera aislada⁽¹³⁾.

3) Vías eferentes:

Las vías eferentes permiten la transmisión de la señal circadiana desde su inicio en el NSQ hasta el resto del cuerpo, mediante la activación de tres sistemas efectores: el neuroendocrino (que afecta a liberación hormonal producida por la hipófisis), el parasimpático y el simpático. Las proyecciones neuronales originadas en el NSQ, que se proyectan hasta estos sistemas son las encargadas de controlar las variaciones circadianas en: la glándula pineal, las glándulas adrenales, el páncreas, el hígado o la placenta, entre otros órganos.

La vía eferente más estudiada es la que regula la secreción de melatonina. Las fibras nerviosas provenientes del NSQ se proyectan hacia el área tubero-medial del hipotálamo lateral, a continuación las sinapsis nerviosas descienden por el tronco cerebral hasta alcanzar el ganglio cervical superior (GCS) del que parten fibras noradrenérgicas hacia la glándula pineal, donde se activa el proceso hormonal de secreción de melatonina⁽⁶⁾.

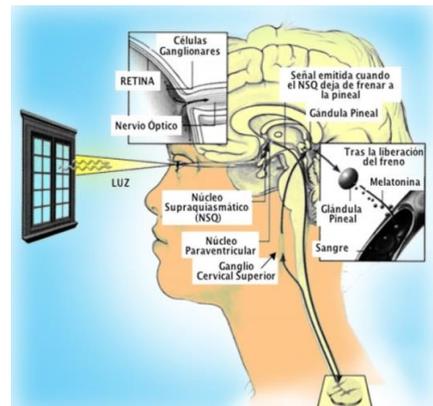


Ilustración 13: Regulación rítmica circadiana de la secreción de melatonina

<http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-9.-envejecimiento-y-ritmos-biologicos/9.2-concepto-de-sistema-circadiano>

2. 3 Propiedades de un reloj circadiano

Las características fundamentales del reloj circadiano son tres: 1) El carácter endógeno de los ritmos, es decir, la capacidad de un organismo para producir ritmos por sí mismo, sin necesidad de cambios externos. 2) La capacidad de sincronización a condiciones ambientales rítmicas periódicas, que permite a los organismos modificar sus ritmos endógenos para estar en fase con el medio externo. 3) La capacidad de compensar los cambios físico-químicos del organismo para permanecer constantes⁽⁶⁾.

-Carácter endógeno de los ritmos circadianos.

Los ritmos circadianos poseen naturaleza endógena, es decir, su funcionamiento depende de un reloj interno, en lugar de las oscilaciones ambientales⁽⁶⁾.

Cuando privamos animales de señales procedentes del medio externo, es decir, los mantenemos en aislamiento; la ausencia de los sincronizadores permite que se manifieste el ritmo biológico con el periodo propio del oscilador endógeno. En estas condiciones decimos que el ritmo está en curso libre (*“free running”*) y designamos su periodo con la letra griega Tau (τ), que se define como la periodicidad endógena con la que oscila un ritmo biológico en ausencia de osciladores. Sin embargo en presencia de sincronizadores, como por ejemplo ciclos de luz/oscuridad el ritmo adquiere el periodo propio del sincronizador, habitualmente designado con la letra “T”.

Experimentalmente se ha observado que los animales diurnos presentan de manera endógena un periodo superior a 24 horas (en torno a 25 horas), mientras que en los animales nocturnos es menor de 24, pero es la sincronización de los relojes endógenos con el medio externo lo que permite que ambos presenten ritmos circadianos de 24 horas⁽⁷⁾.

2.4 Genes reloj y mecanismo molecular del reloj circadiano.

Con el avance de la biología molecular, se ha logrado conocer los principales genes implicados en los sistemas circadianos. Actualmente se han descrito en mamíferos varios genes reloj: *Bmal1*, *Caseína cinasa I ϵ* (*Ckle*), *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Per 1*, *Per2*, *Per 3* y *Rev-Erb α* ⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

El reloj molecular se compone de tres sistemas de expresión genética acoplados: 1) un conjunto de elementos positivos (*Clock* y *Bmal1*), 2) un conjunto de elementos negativos (*CRY* y *PER*) y 3) un sistema de genes controlados por el reloj que participan en la regulación de los ritmos celulares (*Rev-Erb* y *Ckle*)⁽⁶⁾. Los elementos positivos y negativos están formados por los llamados “genes reloj” y sus productos proteicos generan un patrón de oscilación mediante su expresión cíclica. Esta oscilación se encuentra fuertemente regulada, tanto a nivel transcripcional como traduccional y post-traduccional⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾.

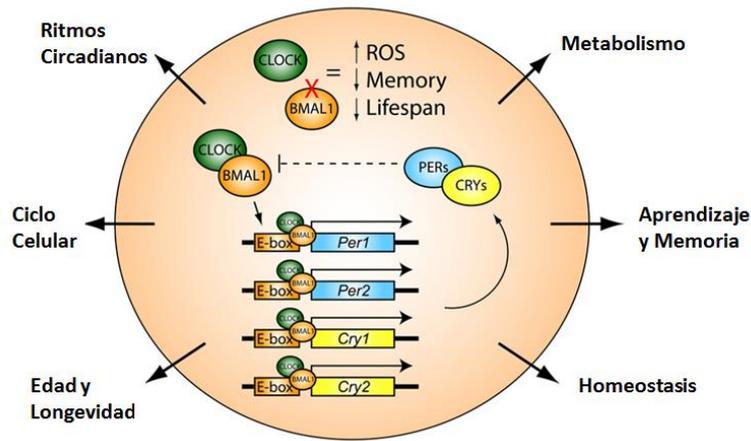


Ilustración 14: Genes reloj implicados la producción de ritmos circadianos
<http://www.impactaging.com/papers/v2/n5/full/100144.html>

El sistema de oscilaciones circadianas básicamente actúa y se regula mediante un ciclo de retroalimentación negativa en el que los componentes positivos promueven la síntesis de los componentes negativos que, al acumularse, reprimen su propia síntesis⁽¹⁷⁾.

2.5 Relojes circadianos en tejidos periféricos.

Después de que se constatará la existencia de un reloj maestro y de los genes reloj, se estudió la presencia de dichos genes en tejidos periféricos y se observó una expresión rítmica, similar a la que poseen las neuronas en el NSQ. A estos tejidos periféricos con capacidad rítmica se les denominó relojes u osciladores circadianos secundarios⁽¹⁸⁾. Presentaron patrones temporales de expresión de los genes reloj tejidos como: el hígado, el corazón, los pulmones, los riñones y la placenta; entre otros muchos⁽¹⁵⁾⁽¹⁹⁾.

Sin embargo, estudios realizados in vitro demuestran que las oscilaciones circadianas producto de la expresión de los genes reloj en los tejidos periféricos, no se pueden mantener en cultivo de manera prolongada⁽¹⁸⁾⁽²⁰⁾. Situación que sí ocurre con el cultivo de células procedentes del NSQ. Esto parece indicar que el NSQ, como reloj maestro o central del sistema circadiano, posee un ritmo intrínseco capaz de sincronizar la actividad de los osciladores circadianos secundarios, ya bien sea mediante señales neuronales o humorales.

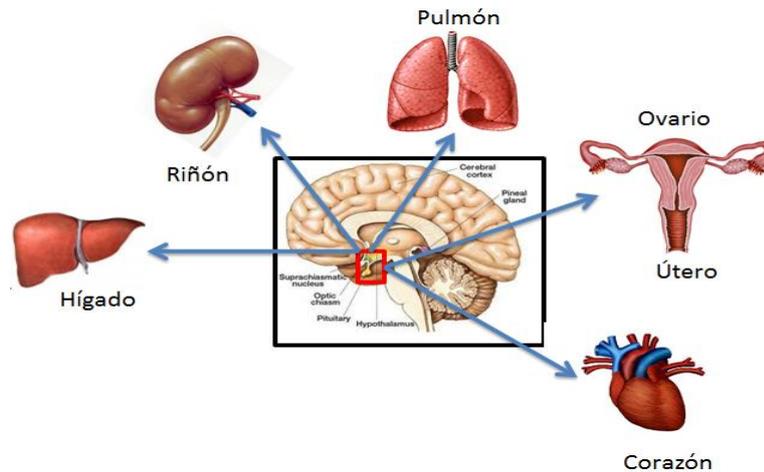


Ilustración 15: Tejidos periféricos con genes reloj (relojes secundarios)

2.6 Ritmos circadianos en la gestación.

No existe ningún tipo de duda al considerar la placenta como un órgano rítmico, ya que son muchos los ejemplos que ponen de manifiesto la relación entre los ritmos circadianos y las funciones placentarias. Se ha observado que la mayoría de ritmos circadianos maternos no solo se mantienen durante toda la gestación sino que son transmitidos al feto, que actúa como un oscilador periférico dentro del útero materno⁽²¹⁾.

Esta relación se ejemplifica durante la preñez de las ratas, la tasa de crecimiento fetal está influida por el ciclo luz/oscuridad; produciéndose el mayor aumento del peso fetal durante la fase oscura⁽²²⁾. También, existen evidencias indirectas de que la variación circadiana, concretamente la interrupción del ciclo luz/oscuridad, influye en la función normal de la placenta y en el crecimiento fetal⁽²³⁾. 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.

Así mismo, se ha observado que las gestaciones de ratas expuestas a cambios en el fotoperiodo resultan en crías intolerantes a la glucosa y con resistencia a la insulina. Estas afecciones pueden estar mediadas en parte por alteraciones en la melatonina⁽²¹⁾.

En el embarazo humano, también existen indicaciones indirectas de los efectos adversos de los trastornos en los ritmos circadianos en el resultado del embarazo. Las mujeres con jornada laboral nocturna o con profesiones asociadas al transporte aéreo tienen niños con peso estadísticamente menor y mayor riesgo de partos prematuros⁽²⁴⁾.

2.7 Desincronización del reloj circadiano y enfermedad.

El ser humano es esencialmente diurno, acostumbra a realizar su actividad vital en las horas de luz, y reserva las horas de descanso para la noche. Pero en la actualidad, debido al desarrollo tecnológico y a cambios socioculturales, se está produciendo un aumento de la desincronización del reloj interno respecto a las señales externas, que se relaciona con alteraciones metabólicas y fisiológicas del organismo⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾.

Estos trastornos de los ritmos circadianos, en humanos, son relativamente frecuentes, y a grandes rasgos pueden dividirse en dos grupos⁽²⁷⁾:

-Trastornos endógenos: comprenden aquellas patologías en las que el oscilador circadiano o las vías de sincronización se encuentran afectadas, como en la ceguera, algunos casos de envejecimiento con disminución de la amplitud de los ritmos, tumores que afecten a los NSQ...

-Trastornos exógenos: en este tipo de desórdenes existe un desfase entre los ritmos endógenos y las señales externas; el cuerpo marca una hora del día diferente a la establecida por los relojes “artificiales”. Son ejemplos los casos de desincronización por vuelos transmeridianos (jet-lag) y los de los trabajadores en turnos rotativos.

En los trabajos a turnos, una de las causas más comunes de la desincronización del reloj biológico, los trabajadores realizan su actividad laboral fuera de las horas “normales”, provocando que el reloj circadiano se encuentre activo en su periodo de descanso. Esto supone alteraciones en los ciclos de sueño/vigilia y acarrea un estado de fatiga, cansancio, irritabilidad, mayor predisposición a padecer enfermedades⁽²⁸⁾...

Otras alteraciones descritas debidas a la alteración de los ritmos circadianos son: la ganancia de peso⁽²⁵⁾⁽²⁹⁾, alteraciones gastrointestinales, cardiovasculares⁽³⁰⁾⁽³¹⁾, respiratorias (asma nocturno), renales⁽³⁰⁾, menstruales, mayor prevalencia en desarrollar diversos tipos de cáncer⁽³¹⁾⁽³²⁾ y a padecer enfermedades mentales del índole de ansiedad, estrés e incluso esquizofrenia⁽³³⁾...

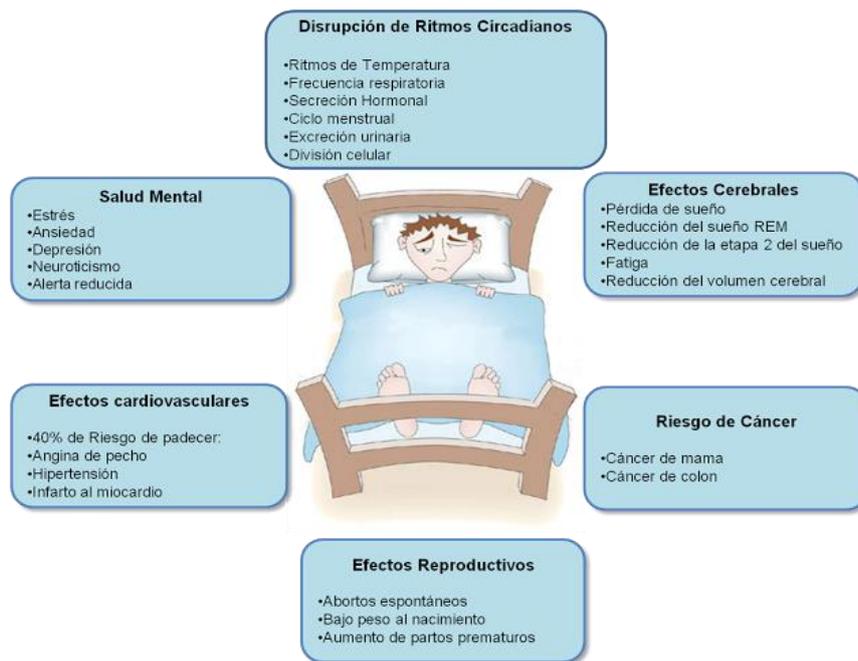


Ilustración 16: Representación de la diversidad de enfermedades asociadas a la desincronización de los ritmos circadianos ⁽³⁰⁾

3. Sistema kiss1/kiss1R.

El gen KISS1 se identificó por primera vez en 1996 por Lee *et al.*, como un gen supresor de metástasis⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾, de ahí que su producto proteico recibiera inicialmente el nombre de metastina.

Posteriormente, al descubrirse la relación con otras funciones biológicas se le denominó KISS1. Curiosamente, esto es debido a que fue clonado en Hershey, Pennsylvania, una ciudad conocida por hacer los chocolates “kisses”⁽³⁶⁾.

El gen GPR54 se clonó originariamente en 1999 en cerebro de rata y su producto se caracterizó como un receptor huérfano acoplado a proteínas G con siete dominios transmembrana y una cierta similitud con los receptores de galanina⁽³⁷⁾. Posteriormente, se identificó su ortólogo humano, llamado inicialmente AXOR12 o hOT7T175, y conocido actualmente como KISS1R⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾.

No fue hasta el año 2001 cuando se vinculó el receptor KISS1R, hasta el momento huérfano, a los productos del gen KISS1. Esto sucedió gracias a que se observó que la Kisspeptina-54 en procesos de metástasis pulmonar, interactuaba con el receptor KISS1R⁽³⁹⁾. Posteriormente, se realizaron estudios adicionales para constatar que realmente la Kisspeptina era capaz de activar al receptor KISS1R⁽³⁸⁾, siendo la kisspeptina-10 (kp-10) la que lo hace con mayor actividad.

3.1 Estructura de la Kisspeptina.

El producto del gen KISS1 es una proteína precursora de 145 aminoácidos que origina mediante un proceso proteolítico diferencial un conjunto de productos peptídicos denominados kisspeptinas (kps). Como resultado de este procesamiento se genera la kisspeptina-54 (kp-54) o mestastina por su capacidad para inhibir la metástasis tumoral, que es el producto mayoritario y una serie de péptidos de menor tamaño y de secuencia más conservada, Kisspeptina-14 (kp-14), kisspeptina-13(kp-13) y kisspeptina-10 (kp-10). Se caracterizan por compartir 10 aminoácidos de la región C-terminal, que presenta una secuencia característico Arg-Phe-amida⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾.

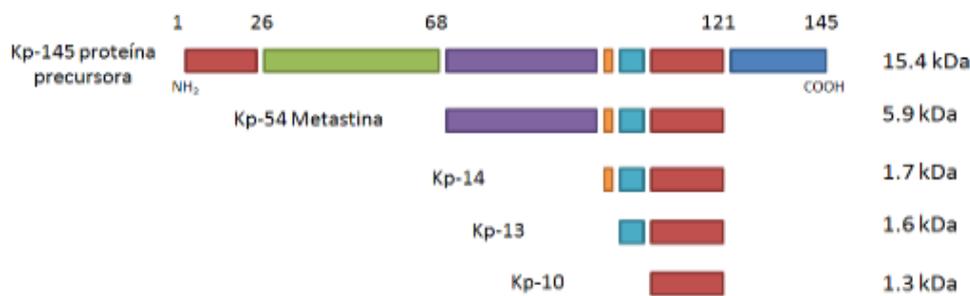


Ilustración 17: Procesamiento proteolítico del precursor del gen KISS1 para generar la familia de las Kisspeptinas⁽⁴¹⁾.

3.2 Mecanismo de acción.

La unión de la Kisspeptina a su receptor específico (KISS1R) desencadena una amplia variedad de cascadas de señalización intracelulares⁽⁴²⁾. La activación del receptor KISS1R activa a su vez, una proteína G ($G\alpha_q/11$), que se divide en sus tres subunidades. La subunidad alpha activa a la fosfolipasa C (PLC) y como resultado se forma inositol-(1,4,5)-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). La presencia de un aumento de los nivel de IP3 intracelulares provoca la movilización de los depósitos de calcio (se produce una salida de Ca^{2+} desde el RE hacia el citoplasma)⁽⁴³⁾. Al aumentar niveles de Ca^{2+} intracelulares, se bloquean los canales de K^+ de la membrana, impidiendo su entrada al citoplasma. Esto supone la despolarización de la membrana celular, lo que genera un impulso nervioso capaz de activar las neuronas de GnRH e incrementar la síntesis de GnRH. Además, la elevación de los niveles de Ca^{2+} junto con la presencia de DAG, produce la activación de la proteína kinasa C (PKC).

Se ha demostrado que KISS1R desencadena la formación de ácido araquidónico y ERK 1/2, p38, PI3K/Akt(44). También se ha descrito que KISS1R se encuentra permanentemente asociado a la Arrestina β . Esta junto con la familia de quinasas de GPCR (GRKs) participan en la desensibilización homóloga del receptor.

Por otro lado, la unión de la Kisspeptina a KISS1R regula negativamente la actividad quimiotáctica de otro receptor acoplado a proteína G (CXCR4) con un conocido papel en el desarrollo de la metástasis. Las kps, asimismo, pueden afectar a otros procesos de señalización como el de la expresión de metaloproteinasas de matriz 9 (vía NF κ B) y el de la calcineurina⁽⁴⁵⁾.

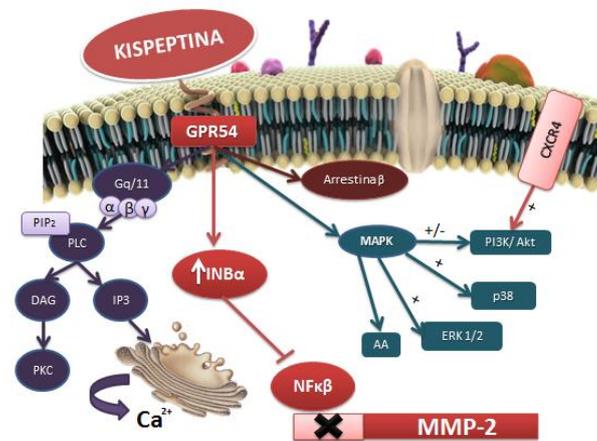


Ilustración18: Rutas de señalización desencadenadas por la unión de Kisspeptina a su receptor

3.3 Expresión del sistema KISS1/KISS1R.

La distribución del sistema KISS1/KISS1R ha sido estudiada en una gran diversidad de especies, como la rata, el ratón, la oveja, el cerdo, el chimpancé y por supuesto, en el ser humano. Se ha descubierto que aunque en todo ellos está relacionada con los centros neuroendocrinos reguladores de la función reproductora, su localización y patrones de expresión varían. En humanos, los productos del gen KISS1 se expresan mayoritariamente en placenta, testículo, páncreas, hígado, intestino delgado y en distintas áreas del SNC⁽³⁹⁾⁽⁴⁶⁾. Sin embargo, en rata, se detecta principalmente en cerebelo, ovario, colón y placenta⁽⁴⁷⁾.

3.4 Funciones y efectos.

Actualmente, se le reconocen a las kps múltiples funciones: estimulador del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, regulador de la función sexual, supresor de procesos tumorales, vasoconstrictor, estimulador del proceso de lactancia..., por lo que solamente se mencionaran aquellas relacionadas directamente con la reproducción.

-Papel de la Kisspeptina en la metástasis tumoral: el gen Kiss1 fue inicialmente descrito como un gen supresor de metástasis del cromosoma 6 en líneas celulares de melanoma humano⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾ y actualmente, existen numerosos estudios que han demostrado que el sistema KISS1-KISS1R actúa como supresor de metástasis en numerosos tipos de cáncer en los seres humanos, inhibiendo la migración e invasión celular y afectando a la proliferación del cáncer⁽⁵⁰⁾. Concretamente, se vincula a una mutación la pérdida de la función inhibidora del sistema KISS1-KISS1R con la progresión del cáncer, aunque existen opiniones contradictorias sobre este hecho. Se han encontrado Kps en muestras de cáncer de tiroides⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾, de ovarios⁽⁵³⁾, de la vejiga⁽⁵⁴⁾, de estómago⁽⁴⁴⁾⁽⁵⁵⁾, de cáncer de páncreas⁽⁵⁶⁾, de cáncer de pulmón⁽⁴²⁾⁽⁴⁴⁾...

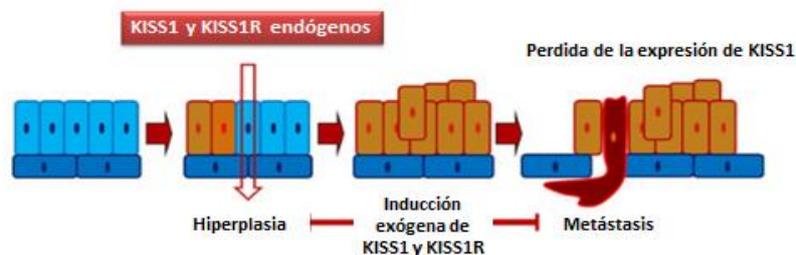


Ilustración 19: Un papel de KISS1 y KISS1R en el desarrollo del cáncer y metástasis ⁽³⁹⁾

-Papel de la Kisspeptina en el metabolismo: Estudios científicos avalan el hecho de que la reproducción depende principalmente de los recursos energéticos y metabólicos del organismo. Un ejemplo de esto, son las personas con desnutrición, que por no poder satisfacer los requisitos de energía necesario para sostener los mecanismos reproductivos, padece infertilidad⁽⁵⁷⁾. En el lado opuesto, las personas con obesidad mórbida también padecen trastornos de fertilidad. Es decir, existe una clara relación entre el balance energético y la reproducción. Los mecanismos neurológicos que participan en esta relación aún no están totalmente descritos⁽⁵⁸⁾.

Datos recientes han demostrado que el sistema KISS1/KISS1R puede constituir el elemento integrador entre las señales metabólicas, como la nutrición o el fotoperiodo y el sistema reproductivo⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾. Y a su vez, el estado metabólico es un factor regulador clave del sistema Kiss1-hipotalámico⁽⁵⁸⁾. El modelo más representativo de esta relación es el efecto de la leptina (hormona metabólica) que al aumentar sus niveles debido a un periodo de ayudo reduce los niveles periféricos de gonadotropinas, disminuye la expresión de KISS1 y aumenta la proporción de receptores KISS1R presentes a nivel hipotalámico⁽⁵⁹⁾. Esto supone para el organismo un importante descenso de la secreción de gonadotropinas que afecta en última instancia a la función reproductora.

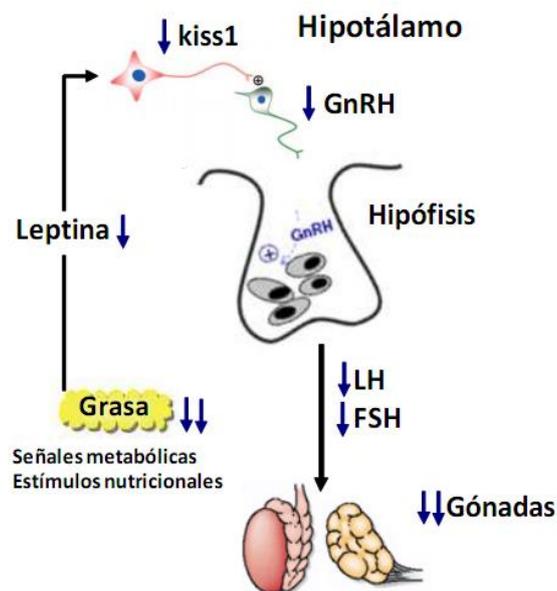


Ilustración 20: Modelo propuesto según el cual las neuronas Kiss1 actúan como reguladores intermedios entre la función metabólica y la reproductora⁽⁴¹⁾.

-Papel de la Kisspeptina en el control neuroendocrino de la reproducción.

-Mutaciones de KISS1R e hipogonadismo hipogonadotrópico: el papel neuroendocrino de las kps fue descubierto en el año 2003, por varios grupos de investigación de manera independiente⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾, cuando se percataron de la presencia mutaciones inactivantes del receptor KISS1R en pacientes afectados de hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático. Este síndrome se caracteriza por la ausencia o el retraso del inicio de la pubertad e infertilidad como consecuencia de los bajos niveles plasmáticos de gonadotropinas y esteroides sexuales⁽⁶³⁾.

Para corroborar este nuevo hallazgo se estudiaron ratones carentes del gen *kiss1r*, que presentaban un fenotipo similar a los humanos que sufrían inactivación de *KISS1R*⁽⁶²⁾⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾. En concreto, los ratones knock-out (KO) macho presentan los caracteres sexuales secundarios poco desarrollados, con testículos de pequeño tamaño y bajos niveles de testosterona, mientras que las hembras presentan defectos en la apertura vaginal, ovarios y útero de pequeño tamaño y fallos en la concepción. A continuación, también se demostró que ratones KO para *kiss1* un fenotipo similar a los ratones carentes de *kiss1r*⁽⁶⁵⁾. Estos hechos llevaron a proponer que el sistema KISS1/KISS1R desempeñaba un papel esencial en el control del inicio y el correcto desarrollo de la pubertad.

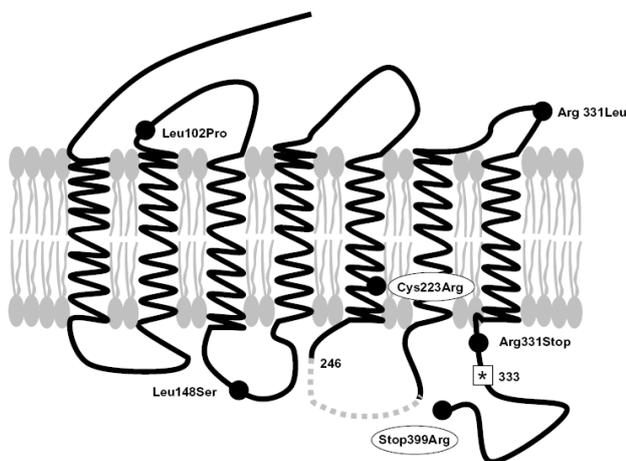


Ilustración 21: Representación esquemática de las deleciones y mutaciones inactivantes del gen *KISS1R* observadas en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico. Los puntos negros indican las mutaciones, con la referencia de la sustitución aminoacídica. Los puntos grises indican la deleción predicha por de Roux *et al.* (2008) ⁽⁴¹⁾.

- Kiss1 estimula la secreción de gonadotropinas actuando sobre las neuronas GnRH: Los mecanismos por los que kisspeptina estimulan la secreción de gonadotropinas han sido también objeto de intensa investigación. Se ha demostrado que la Kp-10 y la Kp-54 ejercen un potente efecto estimulador sobre la secreción de LH en gran variedad de animales, como en rata, ratón, oveja, primate y en el ser humano⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾⁽⁶⁹⁾. Las kps son capaces de provocar la secreción de LH en diferentes etapas de desarrollo y a través de diferentes vías de administración. Esto sugiere que, a excepción de la GnRH, la Kisspeptina es uno de los estimuladores más potentes de la secreción de LH conocida hasta ahora en los mamíferos⁽⁶⁸⁾.

Además, otros estudios han demostrado la capacidad de la Kisspeptina para estimular la secreción de FSH⁽⁷⁰⁾, aunque existen diferencias entre los patrones de respuesta de estas dos hormonas. Un ejemplo es la secreción de FSH inducida por la administración de Kps es más lenta en comparación con la de LH. Por otra parte, la liberación de FSH, también parece ser menos sensible al efecto estimulador de la Kisspeptina.

Las razones de dichas divergencias entre la secreción de gonadotropinas mediadas por Kisspeptina aún es desconocida, pero se cree que está relacionada con el patrón de liberación de la GnRH y las diferentes acciones de regulación de los factores periféricos⁽⁷⁰⁾.

- Kiss1 es esencial para el inicio de la pubertad: un gran número de estudios experimentales sugieren que las kps actúan como interruptor en el funcionamiento del eje HPG⁽⁶²⁾. Se ha observado que la expresión de kiss1 y kiss1r aumenta con el inicio de la pubertad en la mayoría de especies. En contraposición, la ausencia o retraso de la pubertad está asociado con mutaciones el receptor kiss1r⁽⁷¹⁾, lo que indica que las kps son necesarias para el correcto desarrollo de la pubertad. También, se ha demostrado que la administración exógena de kp-10 en ratas hembra inmaduras adelanta la apertura vaginal, signo de pubertad⁽⁶⁷⁾; lo mismo sucede en primates juveniles donde se produce una desencadenamiento precoz de los pulsos de GnRH similar los que ocurren durante la pubertad⁽⁷²⁾.

-Papel de la Kisspeptina en el embarazo: Tanto la expresión de KISS1 como de su receptor KISS1R es especialmente elevada durante el primer trimestre de gestación y disminuye a lo largo del embarazo⁽⁷³⁾⁽⁷⁴⁾. Este aumento de expresión coincide con el momento de la gestación cuando se produce la regulación y la limitación de la invasión del trofoblasto⁽⁷⁵⁾⁽⁷⁶⁾.

Esto sugiere que las kps poseen un papel muy importante en el control de la invasión de la placenta, posiblemente mediante una regulación inhibitoria de metaloproteasa-2⁽⁷⁷⁾. Apoyando estos datos, se ha comprobado mediante radioinmunoensayo que las concentraciones de kps existentes en hombres y mujeres no embarazadas son muy bajas⁽⁷⁸⁾.

Alteraciones en la expresión placentaria de KISS1 o de su receptor se asocian con pobre placentación y aparición de preeclampsia⁽⁷⁹⁾⁽⁸⁰⁾. Sin embargo, se ha observado que pacientes con una mutación (L148S) en el KISS1R son capaces de desarrollar una gestación con ayuda de un tratamiento hormonal, lo que indica que la placentación también puede tener lugar en ausencia de un receptor funcional⁽⁸¹⁾.

Otro importante hecho cuya funcionalidad aún no se encuentra descrita, es el significativo aumento de los niveles plasmáticos de kps a lo largo de la gestación, que decaen bruscamente cinco días después del parto a niveles próximos a los de mujeres no gestantes⁽⁷⁹⁾. Se piensa que dicho incremento está relacionado con la regulación del eje HHP en relación con su papel en el parto y la lactancia.

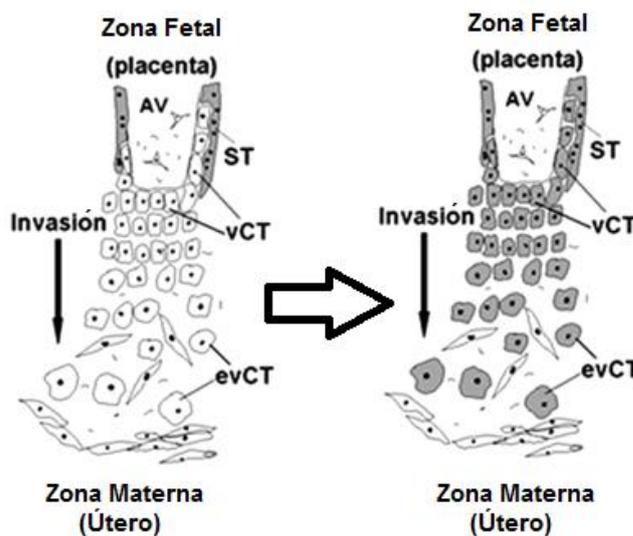


Ilustración 22: Expresión proteica de los productos de KISS1 y KISS1R durante el primer trimestre de gestación y el proceso de invasión trofoblástica⁽⁷³⁾.

-Efectos del fotoperiodo en la Kisspeptina: Varios argumentos sugieren un efecto del fotoperiodo en el sistema KISS1/KISS1R y en la reproducción. 1) Los ratones con una pérdida de función en el receptor *Kiss1r* presentan un fenotipo sexual similar a hámsters sirios fotoinhibidos (gónadas atrofiadas y bajos niveles de esteroides sexuales). Sin embargo, ambos animales presentan una expresión normal de GnRH⁽⁸²⁾. 2) Las neuronas KISS1 se encuentran presentes en el lugar que se cree que la melatonina realiza su acción fisiológica sobre el eje reproductor⁽⁸³⁾.

El mecanismo de acción exacto de la melatonina en el control de la reproducción aún está por identificar. 3) El fotoperiodo y la melatonina pueden modular la tasa de desarrollo y la pubertad en algunas especies de temporada⁽⁸⁴⁾.

Además, se han observado variaciones en la expresión de KISS1 en especies estacionales dependiendo de si se encuentran expuestas a fotoperiodos de día corto o de día largo. Un ejemplo, son los hámster sirios que al exponerse a un fotoperiodo de día corto de manera natural tienen inhibida la actividad reproductora. En esta situación el número de neuronas KISS1 que se expresa en el hipotálamo se reduce drásticamente en comparación con las presentes en esos mismos animales durante la exposición a fotoperiodos de día largo. Sin embargo en las ratas Wistar, que constituyen una especie de reproducción no estacional, los niveles de expresión de KISS1 no se ven alterados⁽⁸²⁾.

Todos estos datos parecen indicar que en reproductores estacionales, la melatonina podría actuar sobre las células KISS1 para modular la actividad reproductiva⁽⁸⁵⁾. Esto a su vez, supone una clara referencia a la relación entre los sistemas circadianos sincronizados por el fotoperiodo y la melatonina (efector) y la Kisspeptina.

Hipótesis Y Objetivos

1. Justificación.

Hasta el momento, el papel de la Kisspeptina en la placenta humana se ha asociado únicamente con la regulación de la invasión del trofoblasto en las primeras etapas de la gestación. Sin embargo, la importancia de la kisspeptina en el sistema reproductivo, conlleva a pensar la existencia de una posible implicación también en las etapas finales del embarazo y en el trabajo del parto.

Numerosos estudios han demostrado que la placenta es un órgano rítmico, en el cual se expresan múltiples hormonas con ritmo circadiano, como es el caso de la oxitocina, la cual a su vez posee un papel de vital relevancia durante el parto.

Por otro lado, se ha observado en mamíferos estacionales, una clara relación entre el fotoperíodo, la melatonina y el eje neuroendocrino-reproductor, en el cual la Kisspeptina actuaría como nexo de unión entre el sistema circadiano y el sistema reproductor.

En presente proyecto se tratará de determinar por primera vez el posible vínculo entre los sistemas circadianos y la Kisspeptina en una gestación a término; teniendo en cuenta todas las menciones a dicha relación reflejadas en la bibliografía existente.

2. Hipótesis.

El producto del gen KISS1 se expresa siguiendo un patrón de ritmo circadiano en placenta humana a término. La expresión de dicho gen puede estar relacionada con las características del parto o del feto.

3. Objetivos.

- ✓ El objetivo principal de este proyecto es demostrar si la placenta humana a término expresa la proteína kisspeptina siguiendo un ritmo circadiano.
- ✓ Como objetivo secundario se tratará de establecer la existencia de una relación entre los niveles de expresión de la proteína Kisspeptina y las características del parto y del feto al nacer.

Materiales Y Metodología

1. Sujetos de estudio.

En la realización del presente estudio participaron 28 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.

2. Diseño del experimento.

Las muestras empleadas fueron obtenidas de placentas a término, una vez transcurrido el parto y la posterior expulsión de la misma, mediante la realización de una sección transversal de un fragmento de un espesor medio de 23,09g. Se procuró que los fragmentos pertenecieran a una misma área de la placenta.

Las 28 muestras seleccionadas pertenecen a seis periodos horarios diferentes:

- 🕒 00:00 horas 5 muestras
- 🕒 04:00 horas 5 muestras
- 🕒 08:00 horas 5 muestras
- 🕒 12:00 horas 5 muestras
- 🕒 16:00 horas 3 muestras
- 🕒 20:00 horas 5 muestras

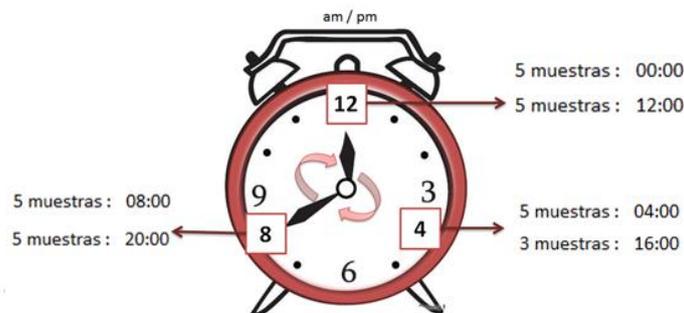


Ilustración 23: Tiempos circadianos utilizados en el ensayo.

2.1 Homogenización de proteína.

Se recuperan las muestras de tejido placentario previamente conservadas a -80°C y se mantienen permanente en hielo con el fin de evitar la posible degradación proteica. Se realiza la homogenización mecánica de un fragmento aproximado de 150 mg en Buffer1 [Tris-HCl 50mM (pH 7,5), NaCl 150mM, Nonidet P- 40 al 1% v/v (Roche Diagnostics, Indianapolis, EE.UU.), desoxicolato de sodio 0,05% w/v, ortovanadato de sodio 1mM, PMSF 0,1mM, EDTA 5M]. Para ello se utiliza el "Politron PT 1200 E" (Kinematica AG; Luzern, Suiza).

A continuación, se centrifuga la muestra ya homogenizada a 6.000 rpm durante 30 min a 4°C . Se recoge el sobrenadante utilizando una doblepunta. Se almacena a -20°C hasta su utilización. El uso de dos puntas a la vez evita que la muestra se contamine con restos del pellet.

2.2 Cuantificación de proteína y Western Blot.

La cantidad total de proteína fue cuantificada por el método del Ácido Bicinchonónico (BCA) que fue descrito por primera vez por Smith *et al.* en 1985⁽⁸⁶⁾. Para ello, se utilizó el Kit comercial "Pierce BCA Protein Assay" (Thermo Scientific) y se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Una vez cuantificadas las muestras, a 30 μg de proteína de cada una de ellas, se le añaden 3 μl de tampón de carga para proteínas [60 mM Tris HCl pH 6,8, 2% SDS, 2,5% glicerol, 2,5% β -mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol]. Se desnaturalizan exponiéndolas a 100°C durante 2,5 min y posteriormente se separan mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

La electroforesis se realizan en un aparato *Mini protean* (Bio-Rad, EE.UU.) en geles de poliacrilamida al 10%. Finalizada la electroforesis, las muestras se electrotransfieren a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore Corporation, Billerica MA, EE.UU.), que fueron previamente activadas con metanol, mediante el método descrito por Towbin *et al.* en 1979⁽⁸⁷⁾.

Concluida la transferencia, se incuban las membranas de PVDF durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación con una solución de bloqueo compuesta por TBST (20 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Tween 20) con leche desnatada en polvo al 7.5%, con el objetivo de minimizar las uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana. Transcurrido este tiempo, se realizan a las membranas lavados sucesivos con TBST y se incuba durante toda la noche a 4 °C y en agitación con una disolución del anticuerpo primario contra la proteína de interés. El anticuerpo primario usado fue anti-KISS1 (Millipore, EE.UU.) a una concentración de 1:1000 en TBST con 0,1% BSA y 0,1 de azida sódica.

A la mañana siguiente, se retira el anticuerpo primario y se realizan varios lavados de las membranas con TBST durante 30 min; tras los cuales son incubados durante una hora a temperatura ambiente y en agitación, con un anticuerpo secundario anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una concentración de 1:20.000 en TBST, al 5% en leche.

Los complejos Proteína-Anticuerpo primario-Anticuerpo secundario-HRP son revelados utilizando Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore Corporation, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante y utilizando como técnica de revelado la quimioluminiscencia mediante el ChemiDoc-it™ Imaging System (UVP, Reino Unido).

Realizada la primera detección de proteínas, se incuban las membranas de nitrocelulosa durante 35 min a 65°C en agitación con una solución denominada "Stripping Buffer" (200 mM glicina, 0,5% Tween20, pH 2,5), para eliminar los restos de la señal luminiscente producida por la detección anterior. Se realizan un lavado de las membranas con TBST y un bloqueo de las posibles uniones inespecíficas como el citado anteriormente. A continuación, se incuba la membrana con otro anticuerpo primario, β actina, a una concentración de 1:3000 en TBST, 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.

Después de este tiempo el complejo Proteína-Anticuerpo primario-HRP se revela como ya se ha explicado. Las bandas obtenidas son valoradas por densitometría óptica utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA).

2. Análisis estadístico.

2.1 Análisis general.

Concluida la parte propiamente experimental, se utiliza el programa *SigmaStart* (Versión 3.5) (Systat Software, Chicago, EE.UU.) para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos; y el programa *GraphPad Prism* (Versión 5.0) para elaborar las gráficas.

Se comprobó la normalidad mediante el test Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. Además se analizaron las diferencias entre grupos mediante el test paramétrico Análisis de la Varianza o ANOVA de una vía. Y se realizó un postanálisis de la varianza mediante el test de Tukey.

Todos los datos son representados como la media \pm el error estándar de la media (ESM) de los resultados obtenidos. Se estableció un nivel de significación (α) 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.

2.2 Ajuste a las Series de Fourier.

Para estudiar la posible existencia un patrón rítmico en la expresión de Kisspeptina en explantes 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:

$$a_0 + a_1 \cos(xw) + b_1 \sin(xw) + a_2 \cos(2xw) + b_2 \sin(2xw)$$

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 del gen KISS1.

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 R^2 . 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.

R^2 mide cuanta variación de los datos es capaz de explicar el ajuste. R^2 puede tomar cualquier valor entre 0 y 1. Por ejemplo, un valor R^2 de 0,9 significa que el ajuste explica el 90% de la variación total de los datos sobre el promedio.

R^2 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

1. Resultados generales.

Los resultados de este trabajo muestran una variable expresión proteica de kisspeptina en los tiempos estudiados. Siendo significativamente diferente dicha expresión a las 4:00 h frente a las 0:00 h, 8:00 h, 16:00h y 20:00; y a las 12:00 h respecto a las 20:00h. Esta variación a lo largo de las horas se muestra y representa en la ilustración 24:

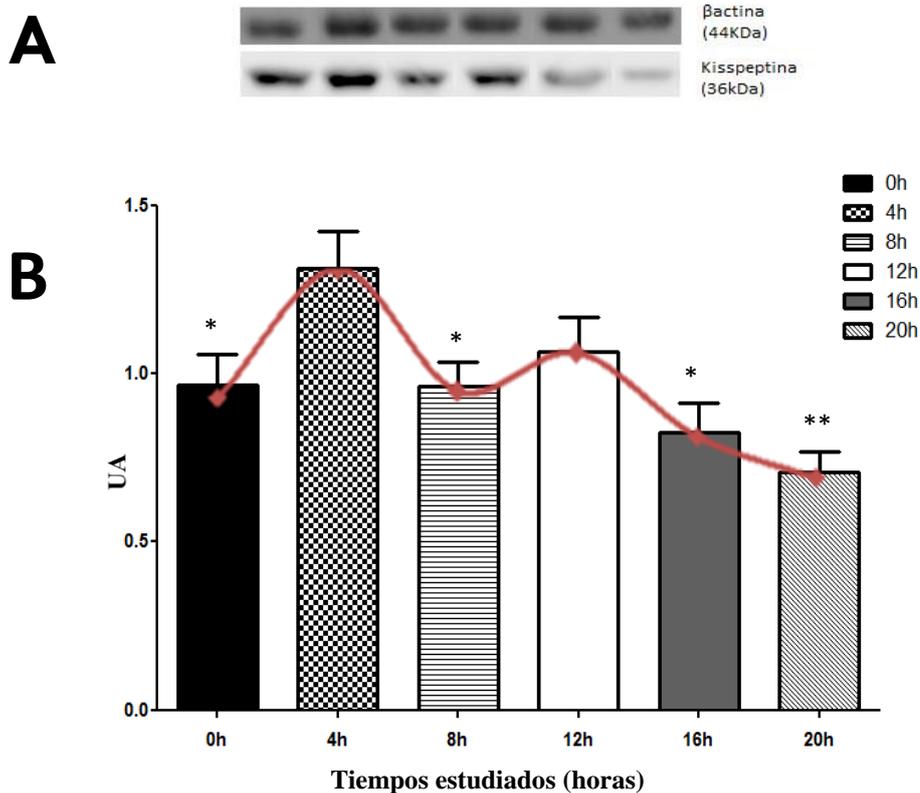


Ilustración 24: Resultados obtenidos en la realización del Western blot. En la imagen A se observan las bandas de seis individuos, uno por cada hora estudiada, correspondiéndose a: 0h, 4h, 8h, 12h, 16h y 20h respectivamente para la actina y la kisspeptina. Los valores de actina permiten normalizar los valores obtenidos de Kisspeptina. En la imagen B se representan los valores correspondientes a todas las muestras de tejido placentario utilizadas como la media \pm el error estándar y aparece representada con un línea roja la tendencia de las muestras.

2. Resultados del ajuste a las Series de Fourier.

A continuación se muestra el resultado del ajuste de los datos obtenidos en la cuantificación de la proteína Kisspeptina mediante Western blot, 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 KISS1.

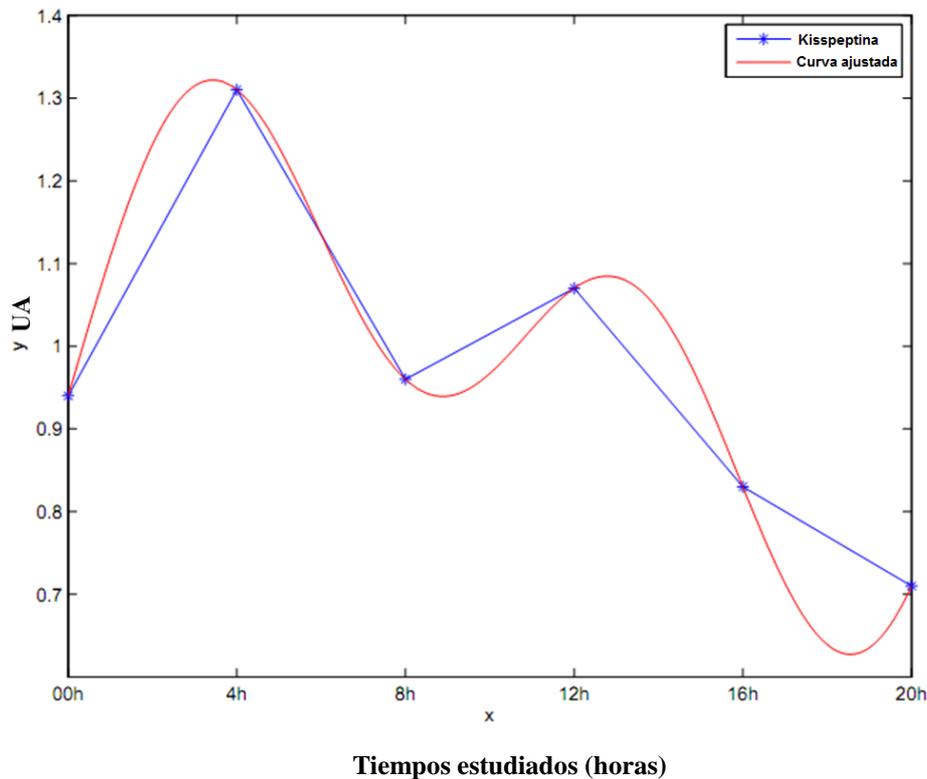


Ilustración 25: Modelo matemático obtenido del ajuste de los datos a una función oscilatoria mediante el uso de las Series de Fourier. En el eje de abscisa se representan las horas del día estudiadas en un periodo de 24h y en el eje de ordenadas se indica el resultado de los valores de Kisspeptina normalizados con los valores de actina en unidades arbitrarias. Todos los puntos representados se corresponden con la media de los valores obtenidos por cada hora estudiada.

Discusión

Realizando una extensa revisión de la literatura existente, aparecen múltiples ejemplos que ponen de manifiesto la posible relación entre la Kisspeptina expresada en placenta y los sistemas circadianos.

Uno de los más significativos lo encontramos en la invasión del trofoblasto. La invasión de las vellosidades del trofoblasto en la decidua uterina durante el proceso de implantación, es de vital importancia para el desarrollo placentario y fetal, y su desregulación está asociada con gestaciones anormales. Una invasión superficial, se relaciona con restricciones de crecimiento intrauterino fetal y preeclampsia⁽⁷⁶⁾. Esta última, se considera una de las complicaciones más comunes del embarazo y se caracteriza por placentación anormal, desequilibrio de los mecanismos de regulación de la angiogénesis y un rechazo inmunológico materno. En contraste, invasiones excesivamente profundas ocasionan fenómenos de placenta adherida, increta y percreta.

La invasión del trofoblasto se parece mucho a la invasión de las células tumorales, por ejemplo, ambos procesos comparten la expresión de proteasas que degradan la matriz extracelular (ECM) tales como metaloproteinasas de matriz (MMPs); pero con la diferencia que la invasión del trofoblasto posee una regulación estricta en el tiempo y el espacio⁽⁷⁹⁾.

Son varios los mecanismos regulatorios descritos que participan en limitar la invasión del trofoblasto. Los que tienen mayor interés en nuestro estudio son la Kisspeptina, el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

La Kisspeptina, que tradicionalmente se ha vinculado a la supresión de procesos tumorales, también posee un reconocido papel en la represión de la invasión del trofoblasto, sobre todo Kp-10. En la placenta, los niveles de expresión de kisspeptina y su receptor son más altas en el primer trimestre, coincidiendo temporalmente con los picos de invasión e inhibición de la misma. El mecanismo detallado mediante el cual actuaría la Kisspeptina aún está poco estudiado. Pero se cree que la regulación de la inhibición se produce de manera indirecta a través de la inhibición de las metaloproteasas, en especial, de la MMP-2 y de la MMP-9⁽⁷³⁾⁽⁷⁹⁾.

TNF α , junto con otras citoquinas proinflamatorias, y VEGF, también se han asociado con procesos de angiogénesis e inhibición de la invasión del trofoblasto⁽⁸⁸⁾. Pero a diferencia de la Kisspeptina, en ellos se ha descrito la existencia de un patrón de expresión rítmico.

En el caso de TNF α se ha observado que posee una expresión circadiana en la placenta humana durante la gestación y en el proceso del parto, cuya función actualmente se desconoce. Esto se debe principalmente, a que existe poca información disponible acerca de la función exacta del sistema circadiano en la placenta⁽²¹⁾⁽⁸⁹⁾.

Aunque recientemente, se ha sugerido la existencia de una relación entre la disrupción del sistema circadiano, principalmente, debido a la falta de sueño, y ciertas perturbaciones hormonales en la placenta durante la gestación que se asocian con complicaciones en el embarazo y alteraciones en el crecimiento fetal⁽⁹⁰⁾.

Respecto a VEGF, se ha visto que presenta una actividad rítmica circadiana, cuyas oscilaciones se incrementan en condiciones de hipoxia. Este comportamiento frente ambientes hipóxicos también ha sido observado en varios genes reloj expresados en la placenta humana durante el primer trimestre de embarazo⁽⁸⁹⁾⁽⁹¹⁾.

Todas estas observaciones parecen afirmar que durante el primer trimestre del embarazo, cuando los niveles de oxígeno son muy bajos, el trofoblasto actúa como un reloj circadiano periférico que oscila con un ritmo robusto. Y esto hace pensar que la Kisspeptina, como mecanismo también involucrado en la regulación del trofoblasto, podría presentar un ritmo circadiano, del mismo modo que lo hacen TNF α y VEGF.

Apoyando esta hipótesis, se encuentra el hecho de que a partir de la décima semana de gestación, cuando el aumento del flujo de sangre materna permite el establecimiento de un entorno normóxico placentario, se observa que el reloj periférico trofoblástico se ralentiza, es decir, se produce un cambio en la cantidad e intensidad de los estímulos, que puede estar relacionado con los procesos de vascularización necesarios en este momento gestacional⁽⁹¹⁾.

Otro ejemplo donde se puede intuir la posibilidad de que Kisspeptina posea una expresión rítmica circadiana, lo encontramos en la ritmicidad del parto.

El parto se define como el incremento de las contracciones uterinas acompañado por la dilatación cervical durante el embarazo que culmina con el alumbramiento de un niño⁽⁹²⁾.

Numerosos estudios ponen de manifiesto la existencia de un ritmo circadiano en el parto, es decir, es el sistema circadiano quien regula en que momento concreto tiene lugar el nacimiento, dentro de un ciclo de 24 horas. El trabajo del parto suele comenzar en un periodo de tiempo comprendido entre la media noche y las seis de la madrugada, siendo las cuatro de la mañana la hora más frecuente. En cambio la mayoría de nacimientos naturales suceden durante las primeras horas del día. Las ocho de la mañana es la hora a la cual se produce el mayor número de nacimiento de manera natural⁽⁹³⁾.

La melatonina es una de las vías eferentes más importantes del sistema circadiano y tiende a considerarse la señal circadiana desencadenante del parto en humanos, o lo que es lo mismo, la encargada de la sincronización circadiana de las contracciones uterinas que marcan el momento del parto⁽⁹³⁾.

La mayoría de los estudios en los que se basa esta consideración se han realizado en rata. El que más apoya el papel de la melatonina como regulador del parto es el siguiente: las ratas pinealectomizadas (carecen de melatonina endógena), poseen una ciclicidad estral y una capacidad para quedarse preñadas sin alteraciones. Sin embargo, el tiempo circadiano de su parto durante el día, es decir, el momento normal en el que esta especie suele tener sus crías, se altera. Este ritmo circadiano es capaz de restaurarse si se administra durante la fase oscura del fotoperiodo melatonina exógena. Pero si dicha melatonina se administra durante la fase luminosa (periodo horario en el cual no se secreta de manera natural) no se observa ningún efecto, y el parto sucede a cualquier hora del día⁽⁹²⁾⁽⁹⁴⁾.

Hasta el momento, los mecanismos moleculares que conducen a las contracciones uterinas del parto no están completamente dilucidados. Se conoce que la producción de melatonina por la glándula pineal, como consecuencia de la propagación de un ritmo oscilatorio generado por el NSQ, durante la fase nocturna del ciclo luz/oscuridad, activa un conjunto de rutas de señalización en las que interactúan múltiples factores y diversas vías de regulación.

La melatonina actúa a través de uno de sus receptores (MT2R) activando una vía de señalización en la cual están implicados una proteína Gq, PLC y PKC, que a su vez, provoca un aumento del calcio intracelular, que terminan con la activación de la oxitocina, que es la encargada de difundir las contracciones de miometrio. Se ha demostrado que mutaciones en cualquiera de los puntos de esta vía de señalización tiene como resultado la inhibición de las contracciones miométrales⁽⁹³⁾⁽⁹⁵⁾.

Además, la melatonina induce un aumento en la expresión de la proteína de Cx43 a través de una vía dependiente de PKC. Cx43 se encarga de facilitar el acoplamiento de las células del miometrio y de la sincronización de la contracción uterina en las fases finales del parto⁽⁹⁴⁾.

La oxitocina, como ya se ha mencionado, es fundamental para el desarrollo de las contracciones uterinas durante el parto; pero también es vital para la lactancia. Se sintetiza por las neuronas del núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo y se libera en la hipófisis posterior a la circulación para ejercer su acción local sobre el miometrio⁽⁹⁶⁾.

El papel de la oxitocina como regulador del momento del parto junto con la melatonina es controvertido. Se ha descrito que ratones carentes del gen de la oxitocina resultaban arrítmicos respecto al momento del parto. Sin embargo, ratones KO para el receptor de oxitocina presentaban un parto normal. Por otro lado, la inhibición de los receptores de oxitocina en ratas tampoco tuvo ningún efecto en el momento del parto⁽⁹²⁾. Hay que tener en cuenta que muchas de las especies de ratas y ratones son insensibles a las variaciones fotoperiódicas debido a modificaciones genéticas, por lo que es imposible que sus partos puedan ser regulados por el sistema circadiano; este argumento explica fácilmente la disparidad en los resultados obtenidos. De cualquier modo, la expresión de la oxitocina siguiendo un patrón rítmico circadiano es un hecho fehaciente.

Todo este intento por comprender los mecanismos implicados en la regulación circadiana del momento del parto deja entre ver, la falta de un punto de unión entre la vía efectora del sistema circadiano, la melatonina, y el último efector, la oxitocina, cuya expresión también se encuentra modulada por las oscilaciones circadianas del NSQ (reloj circadiano principal).

La Kisspeptina podría ejercer perfectamente dicho papel como unión entre ambos componentes, porque en primer lugar, y con una relación clara, la Kisspeptina es capaz de modular la secreción de oxitocina activando las neuronas hipotalámicas productoras de oxitocina⁽⁹⁶⁾. Y en segundo lugar, todas las vías de señalización descritas, que actualmente se supone que son activadas por la melatonina, coinciden con exactitud con el mecanismo de acción descrito para la Kisspeptina.

Por lo que resulta obvio pensar que el proceso que tiene lugar sería el siguiente: el fotoperíodo actuaría como sincronizador que activaría al NSQ que generaría una oscilación rítmica que activaría la secreción de melatonina por la glándula pineal, la cual a su vez activaría las neuronas KISS-1 que secretarían rítmicamente Kisspeptina. Esta Kisspeptina iniciaría sus correspondientes rutas de señalización⁽⁷⁵⁾, que concluirían con la secreción rítmica de oxitocina que en última instancia iniciaría las contracciones miométriales que ponen de manifiesto el momento del parto. De esta manera se vuelve a demostrar un claro indicio de la posible ritmicidad circadiana de la Kisspeptina en la placenta.

Por otro lado y apoyando el papel de la Kisspeptina como mediador o modulador en la ritmicidad de parto, está el hecho de que aún no se ha logrado discernir la función concreta del incremento significativo de los niveles de Kisspeptina en la placenta a lo largo de la gestación, y el hecho de que dichos niveles se normalicen una vez transcurrido el parto.

Sí que se ha determinado que el nivel de Kisspeptina placentaria está asociado con el momento de parto natural; y que una elevada expresión suprafisiológica de Kisspeptina se asocia con partos prematuros. También existen hipótesis que relacionan tales elevaciones en la Kisspeptina con la señal que sería necesaria para activar las neuronas de oxitocina, como se ha mencionado con anterioridad, para prepararse para el parto y lactancia.

Otro posible mecanismo de acción mediante el cual la Kisspeptina podría influir en el momento del parto, sería modulando la apoptosis en el trofoblasto. Como ya se ha indicado, la Kisspeptina es un potente supresor de la proliferación celular en procesos cancerosos, debido a que es capaz de inducir la apoptosis celular⁽⁹⁷⁾.

Los fenómenos de apoptosis se producen durante todo el desarrollo de la placenta normal, aumentando a medida que el embarazo progresa. Pero es en el

momento del trabajo del parto cuando existe un aumento significativo de la apoptosis placentaria⁽⁹⁸⁾.

Resumiendo esta relación, tanto la participación de la Kisspeptina en las vías de contractibilidad endometrial, como en el proceso de apoptosis, sugieren una posible implicación en el trabajo del parto, y siendo este rítmico, por asociación podría asumirse también la ritmicidad circadiana de la Kisspeptina.

De manera mucho más indirecta que los ejemplos hasta hora mencionados aparecen en la literatura otros indicios, que permiten asociar la Kisspeptina con la cronobiología, en especial, con los sistemas circadianos.

La leptina es una proteína secretada principalmente por las células de las grasas y liberada a la circulación sanguínea, que ejerce una acción reguladora sobre la ingesta de alimentos y el metabolismo. Además, se considera el inductor metabólico de la pubertad en mamíferos.

Se ha observado que la leptina presenta un ritmo circadiano característico, con una acrofase dos horas antes del inicio de parte lumínica del fotoperiodo, similar a la que presenta la melatonina⁽⁹⁹⁾. Así mismo, se ha demostrado la presencia de una regulación circadiana en otros muchos componentes del metabolismo como en la glucosa o en la insulina⁽¹⁰⁰⁾. Por lo que es lógico asumir que todo el sistema metabólico humano se encuentra regulado por el sistema circadiano; además apoyando esta afirmación existen numerosos estudios que aluden a la disrupción del sistema circadiano como causa de muchos trastornos metabólicos como la diabetes, la obesidad, o el síndrome metabólico⁽¹⁰⁰⁾⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾.

Por otro lado, como se menciona en la introducción, el momento de la pubertad es un evento complejo dentro del desarrollo del ser humano, que comprende un conjunto de cambios en el organismo, entre los que se encuentra la maduración sexual del individuo; y se encuentra regulado tanto por señales endógenas como por señales ambientales. Entre estas regulaciones, destacan las condiciones metabólicas y la cantidad de reservas energéticas presenten en el organismo, como esenciales en la sincronización de la pubertad. Esto tiene sentido, desde el punto de vista biológico especialmente en las mujeres, las cuales una vez alcanzado su capacidad reproductora, deben ser capaces de hacer frente a una gestación y a la lactancia⁽¹⁰³⁾.

La Kisspeptina se considera el guardián de la reproducción en mamíferos por su implicación en todos los ámbitos reproductivos, incluido la pubertad. Se ha demostrado que las neuronas KISS1 son sensibles al estado metabólico del organismo. Un balance energético negativo induce la supresión del sistema Kiss1/Kiss1r en ratas prepúberes, lo que acarrea en último término que no tenga lugar la pubertad de dichas ratas⁽¹⁰³⁾.

Entonces, si se tiene en cuenta, que el sistema circadiano regula fuertemente el sistema metabólico, que este a su vez, regula a través de la leptina el sistema KISS1/KISS1R en su función de inducir el momento de la pubertad, y que además la pubertad se encuentra regulada mediante señales ambientales, es fácil llegar a pensar que el sistema KISS1/KISS1R, se trata de una pieza intermedia en el control circadiano de la pubertad. Y Por consiguiente, la Kisspeptina podría poseer una regulación circadiana. El modo en el que el sistema circadiano ejercería su regulación sobre el momento de la pubertad sería el siguiente: la ingesta de alimentos, junto con el balance energético supondrían el sincronizador del sistema que activaría en NSQ, el cual produciría un patrón rítmico que activaría la secreción de leptina, la cual actuaría sobre las neuronas KISS1 provocando la secreción de Kisspeptina y con esto la inducción del momento de la pubertad.

Dentro del marco de la reproducción, existen también otros ejemplos de la relación de la Kisspeptina con una regulación circadiana como son el pico de LH que desencadena el momento de la ovulación tanto en humanos, como en el resto de mamíferos; o el momento en el que se producen la procreación en especies estacionales. Los cuales relacionan directamente el efecto del fotoperiodo sobre la reproducción a través de la Kisspeptina.

Recopilado, en la presente discusión se han enumerado múltiples indicios y ejemplos que ponen de manifiesto que la Kisspeptina debe poseer una regulación circadiana, sin embargo, hasta la realización de este proyecto fin de máster no se había demostrado.

Por lo que queda demostrado y confirmado con el apoyo de la literatura existente, que la Kisspeptina posee una expresión rítmica, concretamente en la placenta humana. Aunque, como muestra esta discusión queda por demostrar su expresión rítmica en el resto de órganos en los que se ha observado su expresión.

Conclusiones

Del presente trabajo se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Por primera vez, se ha demostrado la expresión rítmica circadiana de kisseptina en placenta humana.

Bibliografía

1. Moore KL, Persaud TVN, Shiota K. Atlas de embriología clínica. Ed. Médica Panamericana; 1996.
2. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. Embriología Funcional: una perspectiva desde la biología del desarrollo. Ed. Médica Panamericana; 2008.
3. Sadler TW, Langman J. Langman embriología médica: con orientación clínica. Ed. Médica Panamericana; 2007.
4. Donnelly L, Campling G. Functions of the placenta. *Anaesth Intensive Care Med.* 2014;15(3):136-9.
5. Vause S, Saroya DK. Functions of the placenta. *Anaesth Intensive Care Med.* 2005;6(3):77-80.
6. Madrid JA, de Lama ÁR. Cronobiología básica y clínica. Editec@ red; 2006.
7. Cardinali DP, Jordá MP, Sánchez-Barceló EJ. Introducción a la cronobiología: fisiología de los ritmos biológicos. 1994.
8. García Fernandez JM. Los ritmos biológicos y sus fundamentos neuronales. *Sínt Madr.* 1998;778-99.
9. Boden MJ, Kennaway DJ. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction.* 2006;132(3):379-92.
10. Morin LP, Allen CN. The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev.* junio de 2006;51(1):1-60.
11. Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci.* 1972;69(6):1583-6.
12. Ralph MR, Lehman MN. Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends Neurosci.* 1991;14(8):362-6.
13. Prosser RA, Gillette MU. The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP. *J Neurosci.* 1989;9(3):1073-81.
14. Murias Torrecilla LP. Expresión de genes reloj en placenta humana a término. 2013;
15. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 2002;418(6901):935-41.

16. Siepkha SM, Yoo S-H, Park J, Lee C, Takahashi JS. Genetics and neurobiology of circadian clocks in mammals. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. NIH Public Access; 2007. p. 251.
17. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*. 2006;15(suppl 2):R271-R277.
18. Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*. 2003;18(3):250-60.
19. Schibler U, Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. *Cell*. 2002;111(7):919-22.
20. Stokkan K-A, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 2001;291(5503):490-3.
21. Waddell BJ, Wharfe MD, Crew RC, Mark PJ. A rhythmic placenta? Circadian variation, clock genes and placental function. *Placenta*. 2012;33(7):533-9.
22. Barr M. Prenatal growth of Wistar rats: Circadian periodicity of fetal growth late in gestation. *Teratology*. 1973;7(3):283-7.
23. Gozeri E, Celik H, Ozercan I, Gurates B, Polat SA, Hanay F. The effect of circadian rhythm changes on fetal and placental development (experimental study). *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29(1):87-90.
24. Mahoney MM. Shift work, jet lag, and female reproduction. *Int J Endocrinol*. 2010;2010.
25. Garaulet M, Ordovás JM. *Chronobiology and obesity*. Springer; 2012.
26. Duez H, Sebti Y, Staels B. [Circadian rhythmicity and metabolism: integration of metabolic and environmental signals]. *Med Sci MS*. 2012;29(8-9):772-7.
27. Golombek D. *Cronobiología humana: ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. 2007.
28. Foster RG, Wulff K. The rhythm of rest and excess. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(5):407-14.
29. Tahara Y, Shibata S. Chronobiology and nutrition. *Neuroscience*. 2013;253:78-88.
30. Isobe S, Ohashi N, Fujikura T, Tsuji T, Sakao Y, Yasuda H, et al. Disturbed circadian rhythm of the intrarenal renin-angiotensin system: relevant to nocturnal hypertension and renal damage. *Clin Exp Nephrol*. 2014;1-9.
31. Hansen J, Lassen CF. [Shift work and risk of cancer and coronary heart diseases.]. *Ugeskr Laeger*. 2014;176(2):146-9.
32. Gery S, Koeffler HP. Circadian rhythms and cancer. *Cell Cycle*. 2010;9(6):1097-103.

33. Karatsoreos IN. Links between circadian rhythms and psychiatric disease. *Front Behav Neurosci.* 2014;8:162.
34. Lee J-H, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(23):1731-7.
35. Lee J-H, Welch DR. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer.* 1997;71(6):1035-44.
36. Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:213-38.
37. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 1999;446(1):103-7.
38. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 2001;276(31):28969-75.
39. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2001;411(6837):613-7.
40. Roseweir AK, Millar RP. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum Reprod Update.* 2009;15(2):203-12.
41. Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(1):48-69.
42. Cvetković D, Babwah AV, Bhattacharya M. Kisspeptin/KISS1R System in Breast Cancer. *J Cancer.* 2013;4(8):653.
43. Babwah AV, Pampillo M, Min L, Kaiser UB, Bhattacharya M. Single-cell analyses reveal that KISS1R-expressing cells undergo sustained kisspeptin-induced signaling that is dependent upon an influx of extracellular Ca²⁺. *Endocrinology.* 2012;153(12):5875-87.
44. Makri A, Pissimissis N, Lembessis P, Polychronakos C, Koutsilieris M. The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. *Cancer Treat Rev.* 2008;34(8):682-92.
45. Castaño JP, Martínez-Fuentes AJ, Gutiérrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagón MM. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides.* 2009;30(1):10-5.
46. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden J-M, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34631-6.

47. Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Hattori M, Nishimura A, Ohtaki T, et al. Expression of *KISS-1*, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochim Biophys Acta BBA-Gene Struct Expr.* 2004;1678(2):102-10.
48. Welch DR, Chen P, Miele ME, McGary CT, Bower JM, Stanbridge EJ, et al. Microcell-mediated transfer of chromosome 6 into metastatic human C8161 melanoma cells suppresses metastasis but does not inhibit tumorigenicity. *Oncogene.* 1994;9(1):255-62.
49. Miele ME, Robertson G, Lee J-H, Coleman A, McGary CT, Fisher PB, et al. Metastasis suppressed, but tumorigenicity and local invasiveness unaffected, in the human melanoma cell line MelJuSo after introduction of human chromosomes 1 or 6. *Mol Carcinog.* 1996;15(4):284-99.
50. Cho S-G, Li D, Tan K, Siwko SK, Liu M. *KISS1* and its G-protein-coupled receptor GPR54 in cancer development and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(3-4):585-91.
51. Stathatos N, Bourdeau I, Espinosa AV, Saji M, Vasko VV, Burman KD, et al. *KISS-1/G* protein-coupled receptor 54 metastasis suppressor pathway increases myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1 expression and chronically inhibits calcineurin activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5432-40.
52. Ringel MD, Hardy E, Bernet VJ, Burch HB, Schuppert F, Burman KD, et al. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(5):2399-2399.
53. Jiang T, Zhang SL, Lin B, Meng LR, Gao H. [Expression and clinical significance of *KISS-1* and GPR54 mRNA in endometrial carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2005;27(4):229-31.
54. Sanchez-Carbayo M, Belbin TJ, Scotlandi K, Prystowsky M, Baldini N, Childs G, et al. Expression profiling of osteosarcoma cells transfected with MDR1 and NEO genes: regulation of cell adhesion, apoptosis, and tumor suppression-related genes. *Lab Invest.* 2003;83(4):507-17.
55. Guan-zhen Y, Ying C, Can-rong N, Guo-dong W, Jian-xin Q, Jie-jun W. Reduced protein expression of metastasis-related genes (nm23, *KISS1*, *KAI1* and p53) in lymph node and liver metastases of gastric cancer. *Int J Exp Pathol.* 2007;88(3):175-83.
56. Masui T, Doi R, Mori T, Toyoda E, Koizumi M, Kami K, et al. Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315(1):85-92.
57. Evans JJ, Anderson GM. Balancing ovulation and anovulation: integration of the reproductive and energy balance axes by neuropeptides. *Hum Reprod Update.* 2012;18(3):313-32.
58. Wagner GC, Johnston JD, Clarke IJ, Lincoln GA, Hazlerigg DG. Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology.* 2008;149(1):32-9.

59. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, et al. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*. 2005;146(9):3917-25.
60. Greives TJ, Mason AO, Scotti M-AL, Levine J, Ketterson ED, Kriegsfeld LJ, et al. Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology*. 2007;148(3):1158-66.
61. De Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(19):10972-6.
62. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1614-27.
63. Cadman SM, Kim S-H, Hu Y, Gonzalez-Martinez D, Bouloux P-M. Molecular pathogenesis of Kallmann's syndrome. *Horm Res Paediatr*. 2006;67(5):231-42.
64. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312(4):1357-63.
65. Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan Y-M, Mahan A, Cerrato F, et al. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology*. 2007;148(10):4927-36.
66. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(2):383-8.
67. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*. 2004;145(10):4565-74.
68. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1761-6.
69. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(6):2129-34.
70. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 2005;146(4):1689-97.

71. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2276-80.
72. Plant TM. The male monkey as a model for the study of the neurobiology of puberty onset in man. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;254:97-102.
73. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci.* 2004;117(8):1319-28.
74. Janneau J-L, Maldonado-Estrada J, Tachdjian G, Miran I, Motté N, Saulnier P, et al. Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):5336-9.
75. Torricelli M, Galleri L, Voltolini C, Biliotti G, Florio P, De Bonis M, et al. Changes of placental Kiss-1 mRNA expression and maternal/cord kisspeptin levels at preterm delivery. *Reprod Sci.* 2008;15(8):779-84.
76. Hiden U, Bilban M, Knöfler M, Desoye G. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(1):31-9.
77. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2(1):59.
78. Dhillon WS, Savage P, Murphy KG, Chaudhri OB, Patterson M, Nijher GM, et al. Plasma kisspeptin is raised in patients with gestational trophoblastic neoplasia and falls during treatment. *Am J Physiol-Endocrinol Metab.* 2006;291(5):E878-E884.
79. Cartwright JE, Williams PJ. Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in pre-eclampsia. *J Endocrinol.* 2012;214(1):79-85.
80. Armstrong RA, Reynolds RM, Leask R, Shearing CH, Calder AA, Riley SC. Decreased serum levels of kisspeptin in early pregnancy are associated with intra-uterine growth restriction and pre-eclampsia. *Prenat Diagn.* 2009;29(10):982-5.
81. Pallais JC, Bo-Abbas Y, Pitteloud N, Crowley Jr WF, Seminara SB. Neuroendocrine, gonadal, placental, and obstetric phenotypes in patients with IHH and mutations in the G-protein coupled receptor, < GPR54 >. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;254:70-7.
82. Revel FG, Ansel L, Klosen P, Saboureau M, Pévet P, Mikkelsen JD, et al. Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(1):57-65.
83. Malpoux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms.* 2001;16(4):336-47.
84. Shaw D, Goldman BD. Influence of prenatal and postnatal photoperiods on postnatal testis development in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Biol Reprod.* 1995;52(4):833-8.

85. Revel FG, Saboureau M, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. KiSS-1: a likely candidate for the photoperiodic control of reproduction in seasonal breeders. *Chronobiol Int.* 2006;23(1-2):277-87.
86. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* octubre de 1985;150(1):76-85.
87. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76(9):4350-4.
88. Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, Knöfler M. Tumor necrosis factor- α inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):812-22.
89. Ditisheim AJ, Dibner C, Philippe J, Pechère-Bertschi A. Biological rhythms and preeclampsia. *Front Endocrinol.* 2013;4.
90. Bonzini M, Palmer KT, Coggon D, Carugno M, Cromi A, Ferrario MM. Shift work and pregnancy outcomes: a systematic review with meta-analysis of currently available epidemiological studies. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2011;118(12):1429-37.
91. Frigato E, Lunghi L, Ferretti ME, Biondi C, Bertolucci C. Evidence for circadian rhythms in human trophoblast cell line that persist in hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(1):108-11.
92. Olcese J, Lozier S, Paradise C. Melatonin and the circadian timing of human parturition. *Reprod Sci.* 2013;20(2):168-74.
93. Schlabritz-Loutsevitch N, Hellner N, Middendorf R, Muller D, Olcese J. The human myometrium as a target for melatonin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(2):908-13.
94. Boden MJ, Varcoe TJ, Kennaway DJ. Circadian regulation of reproduction: From gamete to offspring. *Prog Biophys Mol Biol.* 2013;113(3):387-97.
95. Olcese J. Circadian aspects of mammalian parturition: a review. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;349(1):62-7.
96. Scott V, Brown CH. Beyond the GnRH axis: kisspeptin regulation of the oxytocin system in pregnancy and lactation. *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology.* Springer; 2013. p. 201-18.
97. Becker JA, Mirjolet J-F, Bernard J, Burgeon E, Simons M-J, Vassart G, et al. Activation of GPR54 promotes cell cycle arrest and apoptosis of human tumor cells through a specific transcriptional program not shared by other G_q-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326(3):677-86.

98. Cindrova-Davies T, Yung H-W, Johns J, Spasic-Boskovic O, Korolchuk S, Jauniaux E, et al. Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am J Pathol.* 2007;171(4):1168-79.
99. Hsuchou H, Wang Y, Cornelissen-Guillaume GG, Kastin AJ, Jang E, Halberg F, et al. Diminished leptin signaling can alter circadian rhythm of metabolic activity and feeding. *J Appl Physiol.* 2013;115(7):995-1003.
100. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2133.
101. Scott EM, Carter AM, Grant PJ. Association between polymorphisms in the Clock gene, obesity and the metabolic syndrome in man. *Int J Obes.* 2008;32(4):658-62.
102. Spiegel K, Tasali E, Leproult R, Van Cauter E. Effects of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(5):253-61.
103. Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty: Roles of leptin and kisspeptins. *Horm Behav.* 2013;64(2):187-94.