

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

# “DISRUPCIÓN CIRCADIANA Y REPRODUCCIÓN. PAPEL DE LA KISSPEPTINA Y NEUROQUININA B”



**TUTORA**

Beatriz Medina Colorado

Elena Díaz Rodríguez

**Julio 2016**

ELENA DÍAZ RODRÍGUEZ, Profesora Titular del Área de Fisiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por Dña. BEATRIZ MEDINA COLORADO, titulado: “DISRUPCIÓN CIRCADIANA Y REPRODUCCIÓN. PAPEL DE LA KISSPEPTINA Y NEUROKININA B”, realizado bajo su dirección, dentro del programa de Máster en “Biología y Tecnología de la Reproducción”, reúne a su juicio las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster, y por ello autoriza la presentación del mismo.

Para que así conste donde convenga, firma la presente certificación en Oviedo a 11 de julio de 2016.

Fdo. Elena Díaz Rodríguez.

## RESUMEN

*Objetivo:* El presente estudio trata de demostrar la influencia de la exposición a luz continua de las madres durante la gestación sobre los niveles gonadales de los neuropéptidos Kisspeptina y NKB en sus descendientes durante la pubertad, así como la capacidad reparadora del cronobiótico melatonina a lo largo de la gestación para restablecer la expresión de ambos neuropéptidos. También se valorara la influencia de la exposición a luz continua y la capacidad reparadora de la melatonina sobre otros indicadores como es la apertura vaginal en las hembras, y el peso corporal en los descendientes. *Material y Métodos:* Para ello, se analizaron muestras gonadales tanto de machos como de hembras descendientes cuyas madres habían estado expuestas durante la gestación a luz continua, fotoperiodo normal y luz continua con tratamiento de melatonina, mediante la cuantificación de Kisspeptina y NKB por *Western blot* y un posterior análisis estadístico. *Resultados:* Se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de KISS1 y NKB en el tejido testicular en los sujetos estudiados. Al igual que se encontraron diferencias significativas en la edad de la apertura vaginal en aquellas hembras cuyas madres habían estado expuestas a luz continua durante la gestación, y también en el peso corporal de los descendientes. *Conclusiones:* la cronodisrupción durante la vida intrauterina altera los niveles gonadales de KISS1 y NKB en los testículos, durante la pubertad, retrasa el inicio de la pubertad en hembras y altera el peso de los descendientes. Así como el tratamiento con melatonina revierte los efectos producidos por la cronodisrupción.

**PALABRAS CLAVE:** luz continua, Kisspeptina, NKB y melatonina

## ABSTRACT

*Aim:* This work tries to probe the influence of constant light on offspring's kisspeptin and NKB gonadal levels during puberty, as well as the melatonin capacity to restore their expression levels. In addition, we evaluate the influence of constant light and melatonin's repair ability on other parameters such as the vaginal opening, and offspring body weight. *Material and methods:* We analysed Kisspeptin and NKB gonadal levels by means of Western Blotting from control, LL, and LL+MEL offspring (males and females), while they were pregnant. *Results:* Significant differences were found in expression levels of KISS1 and NKB on testicular tissues from the studied subjects. The age of the vaginal opening was also significantly different in those animals whose mother were exposed to constant light, as well as the offspring's body weight. *Conclusion:* Intrauterine Cronodisruption (i.e. constant light) modifies testes levels of KISS1 and NKB, delays puberty onset in females and alters offspring body weight. We have also demonstrated that melatonin treatment is capable to revert the effect of cronodisruption.

**key words:** constant light, Kisspeptin, Neurokinin and melatonin

“Un científico es aquella persona que ve lo que todas las personas ven, pero piensa algo que nadie más ha pensado”

*Albert Sáenz Gyongi*

## AGRADECIMIENTOS

Es un poco complicado ponerse a escribir esta parte ya que hay tanto que agradecer para tan pocas líneas, que son simplemente líneas para tantos sentimientos encontrados no solo a la hora de realizar este trabajo si no en la gran aventura que ha sido este año.

No quiero empezar sin el agradecimiento más importante de todos, a Elena Díaz Rodríguez. Gracias, por tanto y por tan poco. Gracias por abrirme la puerta esa primera semana de septiembre e involucrarte conmigo en este proyecto. Gracias por las mañanas y tardes en el laboratorio, los días de lluvia, fines de semana, puentes e incluso vacaciones. Gracias por tu entrega y dedicación todos estos meses, y sobre todo gracias por ser en muchos momentos más que una profesora.

Al departamento de Fisiología y sobre todo a Ana por su entrega. Y gracias por tu alegría todos los días a pesar de nuestra desesperación con los Western blot.

A Helena Robles Casero, por haberme ayudado estos meses y hacerme las horas de laboratorio mucho más amenas. No tengo duda de que vas a conseguir todo lo que te propongas. Mucha suerte en el nuevo viaje que estoy segura que vas hacer muy pronto. También a Inés por darnos apoyo en los últimos días.

No puedo dejar a TODOS mis compañeros del Máster, estoy segura que sin ellos todo esto no hubiera sido lo mismo. Siempre voy a recordar las risas, las fiestas, los trabajos en grupo... y aunque muchos estaréis fuera, no dudéis de que en Asturias dejasteis huella. Tengo que hacer una mención especial, a Laura Suarez, Laura Gamoneda y Sergio González, habéis sido sin duda mi mayor y mejor descubrimiento este año, me habéis apoyado no solo en este proyecto, sino también a nivel personal. Gracias sin duda por todos los momentos.

A mis amigos, por estar SIEMPRE.

A Isaac, que agradecerle a él. Sin él, creo que no estaría escribiendo estas líneas. Has sido un gran apoyo, como en cada cosa que hago. Gracias por formar parte de esta aventura y sobre todo por formar parte de la mayor de todas, mi vida.

A David Maestro, por tu compañía, comprensión, por las tardes que me has venido ayudar al laboratorio, por estar en los malos y en los buenos momentos. Y sobre todo por ser un amigo, el mejor.

Dar la mayor de las GRACIAS a mis padres. Han sido ellos los que en un principio me han incitado hacer este Master, a pesar de mi negatividad hacía ello. Hoy tengo que decir que GRACIAS, gracias una y mil veces por ello, porque no os equivocabais. Me ha encantado el Master, la gente, los profesores... y ha sido todo ellos en parte gracias a vosotros. Gracias por vuestra dedicación y sobre todo esfuerzos para que yo pueda estar aquí. Gracias por apoyarme y no dejar nunca que deje de perseguir mis sueños.

Y como no, a mi hermano Alejandro, una pequeña parte de mí.

Y para finalizar, y no menos importante. Quiero dar las gracias a mi abuela, estoy segura que te sentirías muy orgullosa de mí estés donde estés. Gracias por todas tus enseñanzas y tu sabiduría.

Sé que me olvido de más gente, pero como he dicho son muchos agradecimientos para tan pocas líneas. Es por eso que doy las gracias a todos ellos.

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>1. CRONOBIOLOGÍA</b> .....	<b>14</b>
<b>2. SISTEMA CIRCADIANO</b> .....	<b>14</b>
2.1 Carácter endógeno de los ritmos circadianos .....	15
<b>3. RITMOS BIÓLOGICOS: Definición y clasificación</b> .....	<b>16</b>
<b>4. RELOJ CIRCADIANO: NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (NSQ)</b> .....	<b>18</b>
<b>5. RELOJES SECUNDARIOS</b> .....	<b>20</b>
<b>6. GLÁNDULA PINEAL</b> .....	<b>20</b>
<b>7. MELATONINA</b> .....	<b>22</b>
7.1 Funciones.....	22
7.2 Biosíntesis .....	23
7.3 Receptores .....	26
<b>8. EL PROBLEMA DE LA LUZ DURANTE LA NOCHE</b> .....	<b>26</b>
<b>9. INFLUENCIA DE LA MELATONINA EN LOS DESCENDIENTES</b> .....	<b>28</b>
<b>10. KISSPEPTINA</b> .....	<b>30</b>
10.1 KISS1/KISS1R .....	30
10.2 Estructura .....	30
10.3 Mecanismo de acción .....	31
10.4 Primeras evidencias de la importancia del sistema KISS1/GPR54 .....	32
10.5 Localización de las neuronas Kisspeptina .....	33
10.6 Co-transmisores de la señalización de Kisspeptina .....	34
10.7 Funciones.....	35
<b>11. NEUROQUININA B (NKB)</b> .....	<b>38</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>41</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>1. Hipótesis</b> .....	<b>41</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>41</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>Animales</b> .....	<b>42</b>

Procedimiento .....	42
Homogenización de la muestra .....	44
Cuantificación de proteína y Western Blot .....	44
Análisis estadísticos .....	46
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>MACHOS.....</b>	<b>48</b>
Expresión de KISS1 en los testículos .....	48
Expresión de NKB en los testículos .....	49
Pesos de los descendientes machos al nacer .....	50
<b>HEMBRAS .....</b>	<b>51</b>
Edad de la AV .....	51
Pesos de las descendientes hembras al nacer .....	52
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

## INDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 1: Principales componentes del sistema circadiano.</i> .....	15
<i>Ilustración 2: Parámetros que definen un ritmo circadiano</i> .....	16
<i>Ilustración 3: Frecuencia de los ritmos biológicos</i> .....	17
<i>Ilustración 4: El mecanismo molecular del reloj circadiano central y los osciladores circadianos periféricos</i> .....	19
<i>Ilustración 5: Inervación de la Glándula Pineal</i> .....	21
<i>Ilustración 6: Síntesis de melatonina a partir de Trp</i> .....	24
<i>Ilustración 7: Síntesis de melatonina en el pinealocito.</i> .....	25
<i>Ilustración 8: Enfermedades asociadas a la desincronización de los ritmos circadianos</i> .....	27
<i>Ilustración 9: Formas estructurales de kps humanas</i> .....	31
<i>Ilustración 10: Mecanismo de acción del receptor de Kisspeptina</i> .....	32
<i>Ilustración 11: La ubicación de las poblaciones neuronales que expresan KISS1 dentro del hipotálamo, en roedores y en seres humanos.</i> .....	33
<i>Ilustración 12: Co-transmisores de la señalización de Kisspeptina</i> .....	34
<i>Ilustración 13: Retroalimentación estrógenos/ GnRH</i> .....	36
<i>Ilustración 14: “Neuronas KNDy” modelos para la regulación de GnRH</i> .....	40

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Resultados obtenidos tras la realización del Western blot KISS1</i> .....	48
<i>Figura 2: Resultados obtenidos tras la realización del Western blot NKB</i> .....	49
<i>Figura 3: Peso de los descendientes al nacer de madres control, expuestas a LL y LL tratados con melatonina a lo largo de la gestación</i> .....	50
<i>Figura 4: Edad del inicio de la pubertad de las descendientes de madres control, expuestas a LL y LL tratados con melatonina a lo largo de la gestación</i> .....	51
<i>Figura 5: Peso de las descendientes al nacer de madres control, expuestas a LL y LL tratados con melatonina a lo largo de la gestación</i> .....	52

## INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Periodos del desarrollo de la rata hembra</i> .....	43
<i>Tabla 2: Periodos del desarrollo de la rata macho</i> .....	44

## ABREVIATURAS

- **A:** Amplitud
- **AANAT:** arilalquilamina N-acetil transferasa
- **AC:** Adenilato ciclasa
- **AMPC:** Adenosín monofosfato cíclico
- **AR:** Receptor androgénico
- **ARC:** Núcleo arcuato
- **ARNm:** Mensajero del ácido ribonucleico
- **ASMT:** N-acetilserotonina metiltransferasa
- **AV:** Apertura vaginal
- **AVPV:** Núcleo periventricular anteroventral
- **BCA:** Ácido Bicinconínico
- **BH4:** Tetrahidrobiopterina
- **Bmal1:** Gen *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator – like* (Arntl)
- **Ca<sup>++</sup>:** Calcio
- **CCH:** Genes controlados por los genes reloj
- **cDNA:** DNA complementario
- **CkIe:** Caseín-kinasa Ie
- **Clock:** Gen *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*
- **Cry:** Gen Criptocromo
- **CFS:** Líquido encefaloraquideo
- **DAG:** Diacilglicerol
- **Dyn:** Dinorfina A
- **Erk:** extracellular-signal-regulated kinases
- **ER $\alpha$ :** Receptor estrogénico alfa
- **FSH:** Hormona foliculoestimulante
- **g:** Gramos
- **GCS:** Ganglio cervical superior
- **GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas
- **GPCR:** Receptor acoplado a proteína G
- **GTP:** Guanosina-5'-trifosfato
- **HHG:** Hipotálamo-hipófisis-gonadal

- **HIOMT:** Hidroxiindol-orto-metil transferasa
- **HK-1:** Hemokinina-1
- **HRP:** peroxidasa de rábano picante
- **5-HTP:** 5-hidroxitriptófano
- **L:** Luz
- **LH:** Hormona luteinizante
- **LL:** Luz continua
- **LL+MEL:** Luz continua más la administración de melatonina
- **LO:** Luz-Oscuridad
- **IHC:** Análisis inmunohistoquímico
- **IHH:** Hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático
- **IP3:** Inositol trifosfato
- **K<sup>+</sup>:** Potasio
- **KNDy:** Kiss1/NKB/Dyn
- **KOR:** Receptor opioide kappa
- **Kps:** Kisspeptinas
- **MAPKs:** Quinasas activadas por mitógenos
- **MT1, MT2 Y MT3:** Receptores de melatonina
- **n:** Número
- **NA:** Noradrenalina
- **NAS:** N-acetilserotonina
- **NKA:** Neuroquinina A
- **NKB:** Neuroquinina B
- **NK1R, NK2R y NK3R:** receptores de taquiquinas
- **NSQ:** Núcleo supraquiasmático
- **O:** Oscuridad
- **Per:** Gen Period
- **PIN-X:** pinealectomía materna
- **PIP2:** Bifosfato de fosfatidilinositol
- **PKC:** Protein quinasa C
- **PLC:** Fosfolipasa C
- **POA:** Área preóptica

- **PPT:** Preprotaquiquina
- **PVDF:** fluoruro de polivinilideno
- **Rev erb  $\alpha$ :** Gen Rev erb alfa
- **RNS:** Especies reactivas de nitrógeno
- **ROR/RZR:** Familia de receptores de melatonina *Retinoid Orphan Receptor / Retinoid Z receptor.*
- **ROS:** Especies reactivas de oxígeno
- **RP3V:** Zona periventricular del tercer ventriculo
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **T:** Periodo
- **TAC3:** Gen de la NKB
- **TBST:** Tris-Buffered Saline y Tween 20
- **TPH1:** Triptófano hidroxilasa 1
- **Trp:** Triptófano
- **VIP:** Péptido intestinal vasoactivo

## INTRODUCCIÓN

### 1. CRONOBIOLOGÍA

En 1950 se iniciaron los primeros estudios científicos relacionados con la influencia estacional, los horarios y los ritmos en los seres humanos gracias a las investigaciones de Colin Pittendrigh en EEUU y de Jürgen Aschoff en Alemania. Sentando las bases de la ciencia denominada “Cronobiología” (García-Maldonado y cols., 2011).

La cronobiología es la disciplina que estudia la organización temporal de los seres vivos, sus alteraciones y los mecanismos que la regulan. Estudia cómo se producen los ritmos biológicos y su aplicación en biología y medicina. El término proviene etimológicamente del griego: *Kronos* (tiempo), *bios* (vida) y *logos* (conocimiento) (Cardinali y cols., 1994; Madrid y Rol del Lama, 2006).

### 2. SISTEMA CIRCADIANO

En 1959, F.Halberg dio el nombre de “circadianos” a aquellos ritmos que se dan con una periodicidad de 24 horas, pudiendo presentar en condiciones constantes una duración mínima de 20-22 horas y máxima de 26-28 horas (Cardinali y cols., 1994; Aguilar-Roblero y cols., 2004).

Todo sistema circadiano debe tener, como mínimo, tres elementos: un marcapasos (reloj biológico) que genere oscilaciones, una o varias vías de entrada o vía aferente (sincronizadores o *zeitgeber*) y una estructura de salida o vía efectora por la que se hace evidente el ritmo (ritmo manifiesto) (Ilustración 1). El principal reloj biológico es el núcleo supraquiasmático (NSQ) (Fuentes-Arderiu, 1998). Debemos de diferenciar entre la principal entrada del sistema que es la luz y otros sincronizadores no fóticos como pueden ser los alimentos o la temperatura. La secreción de melatonina es el principal ritmo circadiano. Hay que tener en cuenta las interacciones entre los diferentes elementos, que pueden ser más importantes que los elementos en sí. Las entradas y salidas pueden interactuar produciéndose así un enmascaramiento (Cardinali y cols., 1994; Boden y Kennaway, 2006).



*Ilustración 1:* Principales componentes del sistema circadiano. Incluyendo las relaciones entre ellos.

Las características fundamentales del reloj circadiano y en consecuencia de los ritmos circadianos son tres (Madrid y Rol del Lama, 2006):

- **Carácter endógeno:** Es la capacidad de un organismo determinado de generar ritmos por el mismo, sin la necesidad de cambios externos.
- **Sincronización:** Esta capacidad permite que los organismos que se encuentran bajo condiciones ambientales rítmicas cambien el valor del período de su ritmo endógeno y adopten el mismo período que el medio ambiente con una relación estable de fase.
- **Compensación de los cambios de temperatura,** el reloj circadiano mantiene un periodo muy similar cuando se mide a distintas temperaturas ambientales. Esta compensación no implica que los ritmos sean insensibles a los cambios de temperatura.

### 2.1 Carácter endógeno de los ritmos circadianos

Como hemos mencionado anteriormente los ritmos circadianos presentan una naturaleza endógena, dependen de un reloj interno en lugar del medio externo.

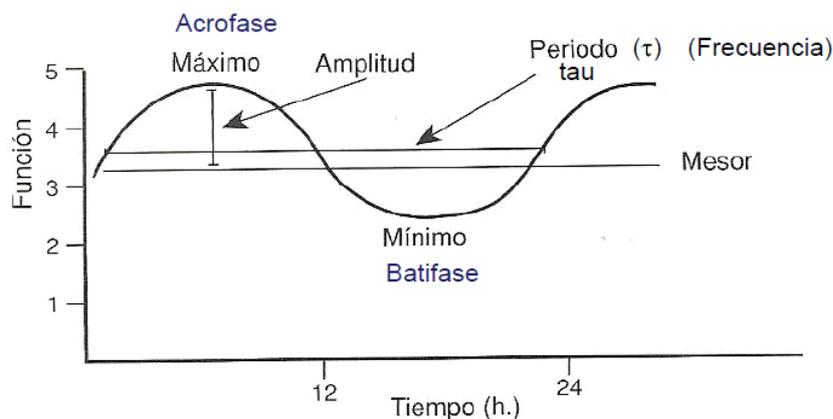
Cuando mantenemos aislados a los animales, es decir, sin señales procedentes del medio externo; la ausencia de los sincronizadores permite que se manifieste el ritmo biológico con el periodo propio del oscilador endógeno. En este caso decimos que el ritmo está en **curso libre** o "*free running*" y designamos su periodo con la letra griega Tau ( $\tau$ ), 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”. Si eliminamos el factor ambiental y el ritmo no entra en curso libre se dice que hay un enmascaramiento (Cardinali y cols., 1994; Arendt y Skene, 2005).

### 3. RITMOS BIÓLOGICOS: Definición y clasificación

Como hemos mencionado anteriormente la cronobiología estudia cómo se producen los ritmos y su aplicación en nuestra vida. Se entiende como ritmo biológico toda oscilación cíclica de una variable biológica que se repite en el tiempo a intervalos regulares. Los ritmos biológicos son generados por los relojes biológicos, el principal se encuentra en el sistema nervioso central (SNC) (García-Maldonado y cols., 2011).

Todos los procesos rítmicos tienen una serie de factores o de características: periodo, máximos, mínimos, amplitud, media y frecuencia (Ilustración 2) (Cardinali y cols., 1994):



*Ilustración 2:* Parámetros que definen un ritmo circadiano. La duración del ciclo completo es de aproximadamente 24h (Cardinali y cols., 1994).

- **Periodo (T):** Es el intervalo de tiempo entre dos puntos iguales del ritmo, se expresa en unidades de tiempo y se corresponde con el inverso de la frecuencia. Se denomina como T (periodo del ritmo manifiesto) o t (periodo del ritmo endógeno).
- **Amplitud (A):** Es la diferencia entre el valor máximo y mínimo del ritmo. También se puede calcular como la diferencia entre el máximo o el mínimo y el valor medio de una oscilación.
- **Valor medio o mesor:** Es el valor medio de la variable a lo largo de un periodo.

- **Fase:** Es el valor de una variable en un momento dado. Podemos distinguir dos fases, la *acrofase*, que es el momento en el que la variable alcanza el valor máximo y la *batifase*, que es el punto en el que la variable tiene el valor mínimo.

	Frecuencia alta ( $\tau < 0.5$ h)	Frecuencia media ( $0.5\text{h} < \tau < 6$ días)	Frecuencia baja ( $\tau > 6$ días)
Periodos	$\tau = 0.10$ s $\tau = 0.01$ s	Ultradiano $\tau = 0.5\text{-}20\text{h}$ <b>Circadiano</b> $\tau = 20\text{-}28\text{h}$ Infradiano $\tau > 28\text{h}$ Circamareal $\tau = 12\text{h}$	Circaseptano $\tau = 7$ días Circadiseptano $\tau = 14$ días Circavigintano $\tau = 20$ días Circatrigintano $\tau = 30$ días Circanual $\tau = 1$ año
Ritmos en:	ECG EEC Respiración Peristalsis	Sueño-vigilia Reposo-actividad Mov. oculares Composición sangre, orina Procesos metabólicos	Apareamiento Migración menstruación

*Ilustración 3:* Frecuencia de los ritmos biológicos (Cardinali y cols., 1994).

Los ritmos biológicos suelen clasificarse en función de su periodo, es decir, de la frecuencia con que se repite cada ciclo (Ilustración 3). Se pueden distinguir, los ritmos biológicos con una periodicidad de aproximadamente 24 horas (ritmos circadianos) y aquellos con periodicidad menor (ritmos ultradianos) o mayor (ritmos infradianos) a la diaria (Cardinali y cols., 1994; García-Fernández, 1998).

- Los **circadianos** son aquellos ritmos cuyo periodo varía entre 20 y 28 horas. Estos ritmos han sido los más estudiados ya que se encuentran presentes en muchos procesos metabólicos y funciones fisiológicas del organismo. El ritmo sueño-vigilia o el de la presión arterial son dos buenos ejemplos de ritmo circadiano.
- Los **ultradianos** tienen una frecuencia superior a la diaria; presentan una periodicidad inferior a las 20 horas. Estos ritmos se encuentran en las ondas del electroencefalograma o en las fases del sueño, por ejemplo.
- Los **infradianos** tienen una frecuencia inferior a la diaria, con una periodicidad superior a las 28 horas. En estos últimos se encuentran los ritmos circalunares (periodo~28 días), los circaanuales (periodo~365 días) y los circaseptanos (periodo ~7 años). El ciclo menstrual y la migración, son otros ejemplos de ritmos infradianos.

Los diferentes tipos de ritmos coexisten en los distintos niveles de organización biológica. La duración y las características del ciclo están relacionadas con las necesidades del organismo en determinados procesos y funciones para conseguir la máxima eficiencia biológica (Fuentes-Arderiu, 1998).

#### 4. RELOJ CIRCADIANO: NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (NSQ)

El sistema circadiano es responsable de la regulación de una amplia variedad de ritmos fisiológicos y de comportamiento. El sistema circadiano de mamíferos se organiza de una manera jerárquica. En la parte superior de esta jerarquía se encuentra el NSQ. Su función es orquestar todos los ritmos circadianos conocidos (Ko y Takahashi, 2006).

En los mamíferos el NSQ está localizado en el hipotálamo anterior, en el área preóptica mediobasal, justo en la unión del diencefalo y el telencefalo y directamente sobre el quiasma óptico (Reiter y cols., 2013).

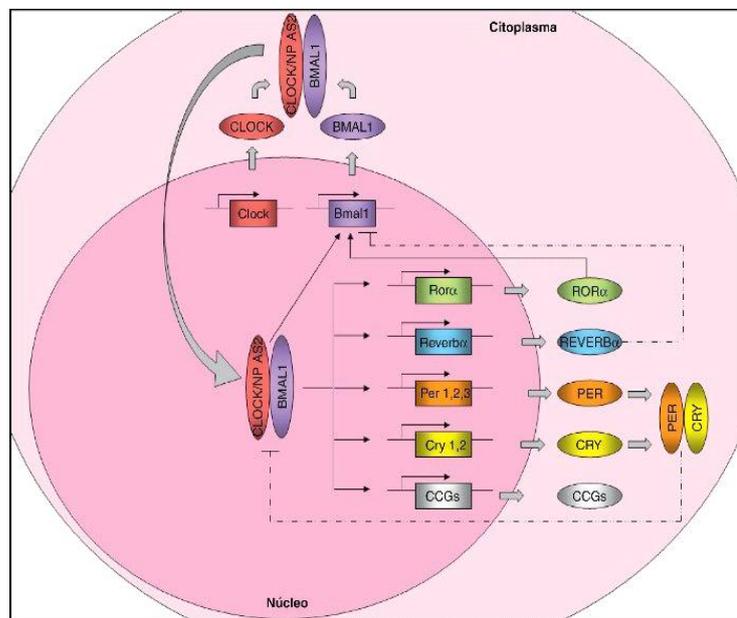
Está constituido por una gran cantidad de células gliales y neuronas, células que expresan una ritmicidad endógena muy precisa en su funcionamiento. Las neuronas del NSQ expresan diversas sustancias neuroactivas, principalmente péptidos, que se distinguen en dos poblaciones neuronales: una ventrolateral caracterizada por la presencia del péptido intestinal vasoactivo (VIP) y otra dorsomedial que presenta vasopresina. La mayoría de las neuronas sintetizan el neurotransmisor GABA. Cada neurona del NSQ tiene la maquinaria molecular necesaria para generar ritmicidad circadiana (Klein y cols., 1991).

El ritmo circadiano de la actividad de las neuronas del NSQ es consecuencia de la oscilación de un conjunto de genes “reloj” como *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal1*, Caseína-kinasa I $\alpha$  (*Ck1 $\alpha$* ) y *Rev-Erb*. Dicha oscilación controla la expresión de los genes “reloj” en un periodo de 24 horas (Seron-Ferre y cols., 2007; Hernández-Rosas y Santiago-García, 2010).

El mecanismo molecular del reloj circadiano central y los osciladores circadianos periféricos (Ilustración 4), involucra la interacción de señales positivas y negativas que regulan la transcripción rítmica de los genes reloj. Este grupo de genes se encarga de controlar la actividad circadiana en todos los seres vivos (Reppert y Weaver, 2002; Hernández-Rosas y Santiago-García, 2010). La expresión de estos genes se regula por dos asas de retroalimentación transcripción- traducción. El asa de señales positivas está

controlada por los genes *Clock* y *Bmal1*, mientras que el asa negativa por los genes *Per* y *Cry* (Viswambharan y cols., 2007; Li y cols., 2012).

Los genes reloj clave son *Bmal1* y *Clock*, actúan como elementos positivos. Sus productos génicos forman un heterodímero que se une a una secuencia génica específica, conocida como “E-box” (CACGTG/T), en la región promotora de otros genes reloj como *per1*, *per2*, *cry1* y *cry2* induciendo su expresión, dichos genes actúan como elementos negativos. Los productos de los genes *per* y *cry* forman heterodímeros, que son fosforilados por las quinasas caseína  $\epsilon$  y  $\delta$ . Los dímeros fosforilados son más estables que los no fosforilados, además son capaces de ser translocados al núcleo donde inhiben su propia transcripción al desplazar el complejo clock-Bmal1 de E-box (Boden y Kennaway, 2006; Sellix y Menaker; Gómez-Abellán y cols., 2012).



**Ilustración 4:** El mecanismo molecular del reloj circadiano central y los osciladores circadianos periféricos (Gómez-Abellán y cols., 2012)

El periodo de la oscilación parece depender de la tasa de degradación de las proteínas reloj, dicha degradación está relacionada de forma inversa a la formación y fosforilación de los dímeros y su translocación hacia el núcleo (Leloup y Goldbeter, 2003).

Algunos componentes del reloj molecular, tales como *Rev-erb-a*, *Bmal1* y *Clock* también inducen otra serie de genes, denominados genes controlados por los genes reloj (CCH), que no están directamente involucrados en la maquinaria del reloj, pero pueden inducir la expresión de muchos genes diana (Gómez-Abellán y cols., 2012).

## 5. RELOJES SECUNDARIOS

Después de estudiar la existencia del reloj principal, NSQ y de los genes reloj, se estudió la presencia de genes reloj en tejidos periféricos. Tras la realización de numerosos estudios, se observó la presencia de genes reloj en otros tejidos, así como una expresión rítmica en ellos. Los tejidos periféricos reciben el nombre de osciladores circadianos secundarios. Uno de los primeros tejidos en el que se vio fue en el mamario y seguidamente en otros tejidos como: el hígado, el corazón, los pulmones, los riñones, placenta, entre otros. Todos estos tejidos periféricos tienen que estar sincronizados con el reloj principal, NSQ, bien por señales neuronales o humorales. Pueden ser regulados también por otros factores externos además de la luz, como la ingesta de alimentos (Hernández-Rosas y Santiago-García, 2010; Seron-Ferre y cols., 2012).

Los tejidos periféricos pueden funcionar de manera independiente del NSQ, ya que estos siguen teniendo ritmicidad, aunque se produzca una lesión en el NSQ. Sin embargo, estos ritmos periféricos acabarán desincronizándose entre sí pudiendo llegar a causar múltiples patologías. Esta desalineación interna es especialmente perjudicial porque los relojes circadianos periféricos regulan directamente hasta un 5 a 20 % del genoma (Voigt y cols., 2013).

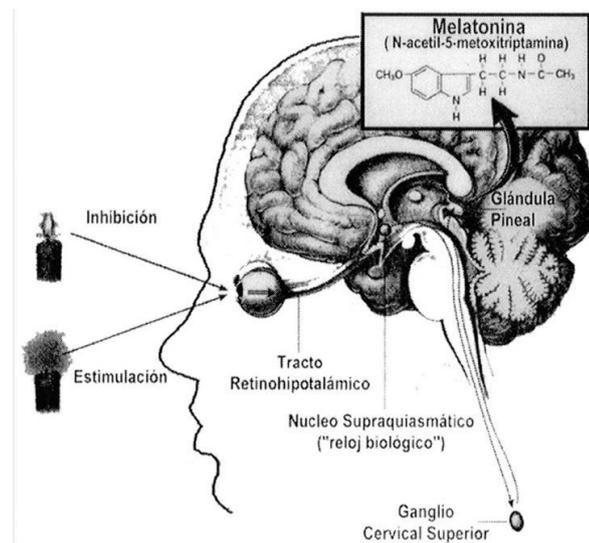
## 6. GLÁNDULA PINEAL

La glándula pineal es un transductor neuroendocrino que se localiza en la porción dorsal de la unión entre el mesencéfalo y el diencefalo. Esta unida al techo del diencefalo mediante un pequeño tallo que en su base presenta la intrusión del tercer ventrículo en el llamado receso pineal. La mayor parte del parénquima de la pineal está constituido por los pinealocitos (Aguilar-Roblero, 2004).

Su función principal es traducir la información de luz y oscuridad a todo el organismo mediante la síntesis y secreción de melatonina (Borjigin y cols., 2012). La regulación funcional de la pineal depende principalmente de su inervación simpática (Collin y Voisin, 1989).

La glándula pineal es uno de los órganos que recibe una entrada neuronal del NSQ. Las neuronas del NSQ sincronizan su actividad con el ciclo día-noche. La cantidad de luz ambiental es detectada en la retina por fotoreceptores circadianos diferentes a los que intervienen en la visión. Los fotoreceptores circadianos son un tipo especial de células ganglionares que poseen el fotopigmento melanopsina, y que se

caracterizan por tener un campo receptivo visual muy amplio y codificar la cantidad de luz (Rollag, 2003; Reiter, 2009). La información viaja a través del tracto retino-hipotalámico, que conecta la retina con el NSQ. Desde el NSQ va a otro núcleo del hipotálamo como es el área tuberal medial. Luego va al hipotálamo lateral. Dentro del hipotálamo, viaja de unos núcleos hipotalámicos a otros. El impulso irá de unas neuronas a otras hasta que abandona el hipotálamo, desciende a lo largo del tronco del encéfalo hacia la medula espinal. Una vez allí la información nerviosa asciende otra vez hacia el encéfalo, dirigiéndose a un ganglio periférico, ganglio cervical superior (GCS) y desde ahí fibras nerviosas postgangliónicas se dirigirán finalmente a la glándula pineal. Para que funcione correctamente, la inervación de la glándula tiene que estar intacta (Ilustración 5), (Møller y Baeres, 2002; Reiter, 2011).



*Ilustración 5:* Inervación de la Glándula Pineal (Díaz-López, 2001)

Durante la noche, el NSQ envía un impulso neuronal que provoca la descarga de noradrenalina (NA) de las terminales nerviosas, que actúa sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la membrana del pinealocito causando un aumento de AMPc intracelular. Este aumento de AMPc incrementa la producción y liberación de melatonina por la glándula pineal asociado con la oscuridad (Ceinos y cols., 2004; Reiter y cols., 2011).

La actividad de la glándula pineal está regulada por el fotoperiodo, dicha regulación fotoperiódica resulta de gran importancia en la adaptación del sujeto con su medio ambiente, en particular, respecto a las funciones reproductoras (Klein y cols., 1991).

## 7. MELATONINA

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina o N- [2- (5-metoxi-1H-indol-3-il) etil] acetamida) es una molécula altamente conservada a lo largo de la evolución. Fue descubierta originalmente hace cincuenta años por el dermatólogo estadounidense Aaron Lerner y cols., (1958). Es una neurohormona sintetizada y secretada por la noche, principalmente por la glándula pineal (Reiter, 1991). Aunque también hay otros sitios adicionales en los que se produce como la retina, glándula de Harder, intestino, médula ósea, plaquetas, y la piel, aunque a diferencia de la glándula pineal, no la producen de manera rítmica. La melatonina producida por la glándula pineal se libera al líquido cefalorraquídeo (CSF) y a la circulación sanguínea (Zawilska y cols., 2009).

El ritmo circadiano de síntesis y secreción de melatonina por la glándula pineal es común en todas las especies de vertebrados, su producción decae a medida que se envejece y su ritmo se atenúa. Es por eso, que en individuos envejecidos no hay una clara diferencia entre las concentraciones de melatonina noche-día (Reiter y cols., 2011). Se cree que esto es debido a la reducción de la potencia de la señal nerviosa con la edad, se produce una pérdida de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la membrana de los pinealocitos (Madrid y Rol del Lama, 2006).

Además de la edad, el ritmo circadiano de la melatonina está influenciado por las estaciones del año, en verano el comienzo de la secreción de melatonina se adelanta mientras que en invierno se atrasa (Levitan, 2007). Otros factores que afectan al ritmo circadiano de la melatonina, son el ciclo menstrual, el tiempo diario de exposición al sol, consumo de algunos fármacos, así como el estrés o el ejercicio (Ariznavarreta y cols., 2002).

### 7.1 Funciones

La melatonina es conocida por modular algunas funciones fisiológicas como la temperatura corporal, el sueño/vigilia, metabolismo energético y la termorregulación, así como la carcinogénesis y la regulación del sistema inmunitario (Prunet-Marcassus y cols., 2003). Además la melatonina puede actuar contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) debido a su efecto antioxidante (Chuffa y cols., 2011; Reiter y cols., 2009). También tiene importancia en la sincronización de las actividades reproductivas en especies reproductoras estacionales (Reiter y cols., 2009).

Además de tener un papel importante en la pubertad y en la reproducción, debido a que actúa a nivel del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal (HHG) (Kennaway, 2005).

Se ha determinado la expresión de receptores de melatonina en las neuronas GnRH y en diferentes células del aparato reproductor como las células de la granulosa del ovario. El NSQ envía señales a las neuronas GnRH que permiten que se produzca el pico de LH cuando los niveles de estrógenos son altos, lo que conduce a la ovulación. Además la expresión de los genes reloj en los diferentes niveles del eje permiten que se produzca de forma sincronizada la secreción pulsátil de las hormonas y prepara al ovario para la ovulación (Sellix y Menaker, 2010). Los niveles de melatonina en el ovario presentan variaciones en función del momento del día, de modo similar a lo que ocurre en la glándula pineal (Tamura y cols., 2014). La principal función de la melatonina en relación con la reproducción es la estimulación ovárica, ciclicidad estral y foliculogénesis. La melatonina protege al óvulo para que llegue en buen estado y no sea dañado por los radicales libres. En la formación del cuerpo lúteo, la melatonina también tiene su influencia ya que afecta a la síntesis de progesterona (Chuffa y cols., 2011).

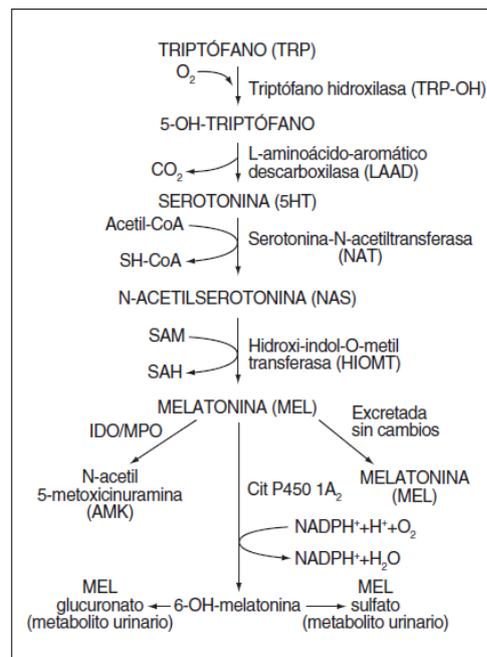
Por otro lado, la melatonina juega un papel muy importante en la pubertad, estudios de Murcia-García y cols., (2002), proponen que la melatonina es la hormona que a elevadas concentraciones durante el periodo prepuberal pueden ayudar a mantener el eje HHG en un estado quiescente ya que a mayores niveles de melatonina los niveles de LH, FSH y testosterona serán más bajos, aunque durante la noche se observa una disminución en los niveles de dicha hormona en ciertos estadios del desarrollo.

Debido a su naturaleza lipofílica puede atravesar todas las barreras entre ellas la placentaria de esta forma puede llegar a la placenta y ejercer doble función, por un lado la protección del feto frente al estrés y también un papel como agente cronobiótico. Tanto si actúa a un nivel u a otro, puede influir en el desarrollo posnatal de la descendencia (Tamura y cols., 2008).

## 7.2 Biosíntesis

La velocidad de formación de melatonina depende de la actividad de dos enzimas: la serotonina N-acetiltransferasa (AANAT) (Kim y cols., 2005; Chatteraj y cols., 2009) y en menor medida, de la triptófano hidroxilasa (TPH1), que controla la disponibilidad de la serotonina. Además también se ha demostrado que las funciones nutricionales,

como la disponibilidad de triptófano (Trp), ácido fólico y vitamina B6 también pueden afectar en la producción de melatonina (Zamilska y cols., 2009). La melatonina se sintetiza a partir del aminoácido Trp, los pinealocitos son los encargados de recoger este Trp de la sangre. El Trp va a sufrir una hidroxilación por el enzima TPH1 dando lugar a 5-hidroxitriptófano (5-HTP), esta enzima requiere un cofactor, tetrahidrobiopterina (BH4). El producto de esta reacción da lugar a la serotonina mediante una descarboxilación llevada a cabo por la enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilasa. La serotonina es transformada en N-acetilserotonina (NAS) por la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT) y a continuación la N-acetilserotonina es metilada a melatonina en una reacción catalizada por la hidroxindol-orto-metiltransferasa (HIOMT) o N-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT) (Ceinos y cols., 2004; Pandi-Perumal y cols., 2007; Chatteraj y cols., 2009; Domínguez-Rodríguez y cols., 2009; Zamilska y cols., 2009) (Ilustración 6).

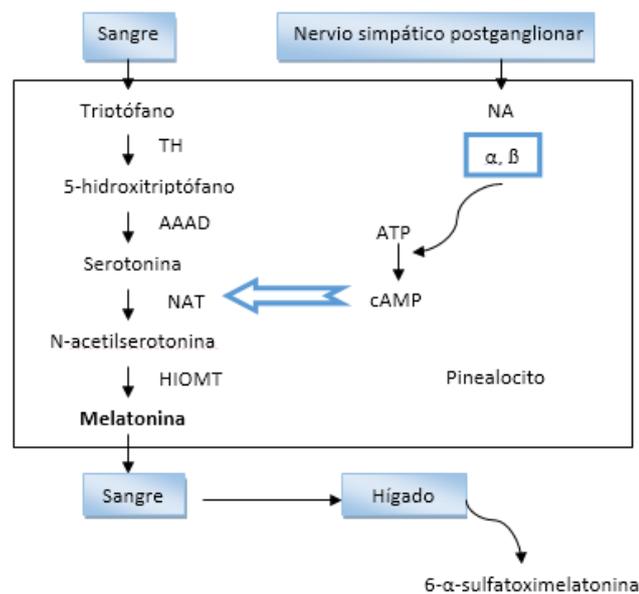


**Ilustración 6:** Síntesis de melatonina a partir de Trp (Domínguez-Rodríguez y cols., 2009)

Los niveles de melatonina en sangre se encuentran bajos durante el día, produciéndose un aumento de sus niveles durante la noche “noche biológica”. Los máximos niveles de melatonina se alcanzan en el plasma a las 2:00-3:00 am (Arendt y Skene, 2005; Pandi-Perumal y cols., 2007). No solo la melatonina presenta una ritmicidad circadiana con niveles máximos durante la noche, sino que también las enzimas AANAT e HIOMT la presentan (Zamilska y cols., 2009; Borjigin y cols., 2012). Por el contrario, los altos niveles de serotonina en la glándula pineal son

detectados durante el día, si estamos expuestos a luz por la noche el proceso se detiene en la serotonina, solo continua cuando estamos en oscuridad. Todo ello debido a que el enzima AANAT se produce por la noche. Mientras que por el día la actividad de esta enzima es muy baja debido a los bajos niveles que presenta, limitando así la producción de melatonina (Kim y cols., 2005).

El ritmo de secreción del mRNA de AANAT está regulado por el circuito nervioso que dirige la actividad circadiana en la glándula pineal (Klein, 1985; Roseboom y cols., 1996). Las fibras postganglionares procedentes del GCS liberan NA, que actúa sobre los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos incrementando los niveles de AMPc. AMPc aumenta los niveles de mRNA AANAT mediante la fosforilación de proteinquinasa dependientes de AMPc. La exposición a la luz durante la noche, bloquea la liberación de NA al espacio extracelular de la glándula pineal (Reiter y cols., 2011; Cipolla-Neto y cols., 2014) (Ilustración 7).



*Ilustración 7:* Síntesis de melatonina en el pinealocito.

La melatonina es capaz de actuar sobre los osciladores periféricos, principalmente mediante el control del ciclo circadiano de transcripción/traducción de los genes del reloj periférico (Alonso-Vale y cols., 2008; Archer y cols., 2014). Esto hace que la melatonina sea uno de los cronobióticos más importantes, ya que participa directamente en la coordinación temporal de fenómenos fisiológicos y de comportamiento (Arendt y Skene, 2005).

### 7.3 Receptores

Los efectos de la melatonina están ligados a la unión de esta molécula a sus respectivos receptores de membrana o, indirectamente, con los receptores huérfanos nucleares de la familia ROR $\alpha$  / RZR. En mamíferos se han descrito 3 subtipos de receptores: MT1, MT2 Y MT3 (Dubocovich y cols., 2003; Slominski y cols., 2012). El aislamiento del cDNA del primer receptor de melatonina fue realizado por Ebisawa y cols., (1994), fue clonado a partir de cDNA obtenido de una línea celular de melanóforos de la piel de *Xenopus leavis*, esto mostró la presencia de tres receptores de melanina diferentes: Mel1a (se conoce actualmente como MT1), Mel1b (conocido actualmente como MT2) y Melc (Sólo se ha encontrado en mamíferos). (Reppert y cols., 1995a; Reppert y cols., 1995b). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G con siete regiones transmembrana (GPCR) y ejercen su acción mediante la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), lo que conlleva a una disminución del AMPc. Por otro lado, tenemos el receptor MT3, cuya activación estimula la hidrólisis del fosfoinositol y a diferencia de los otros receptores no es un GPCR (Dubocovich y cols., 2003).

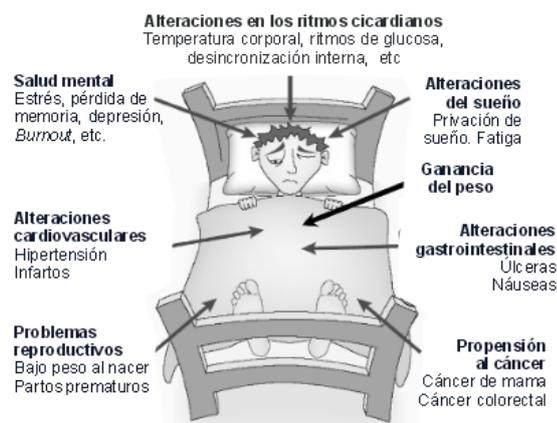
El receptor MT1 se expresa en la placenta, en el cerebro, sistema cardiovascular (incluyendo los vasos sanguíneos periféricos, aorta y corazón), sistema inmunológico, testículos, ovario, piel, hígado, riñón, la corteza suprarrenal, la retina, el páncreas y el bazo. En el cerebro, el receptor se encuentra predominantemente en el hipotálamo, cerebelo, hipocampo, sustancia negra y el área tegmental ventral. El receptor MT2 se ha encontrado en el sistema inmunológico, hipotálamo, hipófisis retina, los vasos sanguíneos, los testículos, los riñones, el tracto gastrointestinal, las glándulas mamarias, el tejido adiposo, y la piel. Mientras que los niveles más altos de MT3 se encontraron en el hígado y los riñones con cantidades moderadas en el corazón, el tejido adiposo y el cerebro, también en la retina de conejo (Slominski y cols., 2012; Zawilska y cols., 2009).

## 8. EL PROBLEMA DE LA LUZ DURANTE LA NOCHE

Durante muchos años los astrónomos han estado preocupados con la utilización de la luz tras la puesta del sol ya que hoy en día se sabe que la luz por la noche tiene un efecto fisiológico en humanos y seguramente también traiga consigo consecuencias fisiopatológicas. A lo largo de la evolución, la luz estuvo más o menos restringida a las

horas de luz solar, lo que ya no ocurre en las sociedades desarrolladas. Con la llegada de la electricidad, la luz artificial se ha convertido en un contaminante muy importante. Un efecto claro que tiene la luz durante la noche, es reducir la capacidad de producción de melatonina por la glándula pineal (Navara y Nelson, 2007; Fonken y Nelson, 2011; Dominoni y cols., 2013). Muchas personas cuando se levantan encienden la luz durante la noche, esto afecta al ritmo circadiano de melatonina, produciendo una disminución de sus niveles durante el periodo en el que deberían ser elevados y nuestro cerebro interpreta como si fuera ya de día. El resultado es que las células periféricas van a recibir una información inadecuada del momento del día y de su duración, produciéndose cronodisrupción (Reiter y cols., 2011).

La cronodisrupción se ha definido como una alteración relevante del funcionamiento del sistema circadiano; es decir, del orden temporal interno de los ritmos circadianos bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento. Estudios epidemiológicos muestran una relación entre la cronodisrupción y el aumento en la incidencia de síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, deterioro cognitivo, trastornos afectivos, alteraciones del sueño, algunos tipos de cáncer y envejecimiento acelerado (Delgado-Salgado y cols., 2009; Ortiz-Tudela y cols., 2012) (Ilustración 8). En nuestra sociedad, la cronodisrupción se produce principalmente por la exposición a luz durante la noche, aunque otras situaciones como el jet-lag, el trabajo a turnos, la ingesta de alimentos durante la noche o la privación de sueño provocan cronodisrupción (Garaulet y Gómez-Abellán, 2013).



*Ilustración 8:* Enfermedades asociadas a la desincronización de los ritmos circadianos (Delgado-Salgado y cols., 2009)

Por lo tanto, breves intervalos de luz durante la noche pueden reducir los niveles de melatonina hasta niveles similares a los que se producen por el día. El grado de supresión de la producción de melatonina por la exposición a la luz durante la noche depende de la luminosidad y de la longitud de onda. Las longitudes de onda que producen mayor inhibición son aquellas que tienen un rango de 470-475 nm, es decir, la luz azul, debido a la mayor sensibilidad de las células ganglionares de la retina a este tipo de luz que a otras, como por ejemplo a la luz roja. La exposición a largos pulsos de luz durante la noche presenta efectos más perjudiciales que pulsos cortos de luz (Navara y Nelson, 2007; Dominoni y cols., 2013).

Además, el restablecer la síntesis de melatonina tras la exposición a la luz durante la noche parece depender del momento de la fase de oscuridad en el que se produce la exposición. Si esta exposición se produce en la primera mitad, los niveles nocturnos de melatonina se pueden restablecer, por el contrario, si se producen en la segunda mitad, no se puede restablecer (Madrid y Rol del Lama, 2006).

Como consecuencia de la exposición de luz durante la noche, se produce una alteración en el NSQ, principal reloj principal, esto conduce a una desincronización de los relojes secundarios, dando lugar a multitud de consecuencias a nivel fisiológico, entre las más importantes se encuentran la aparición de tumores y la influencia en la obesidad (Fonken y Nelson, 2011; Reiter y cols., 2011).

También se ve afectada la reproducción; La supresión de la melatonina materna durante el embarazo afecta al feto, ocasionándole problemas fisiológicos durante la edad adulta. Así como un mayor riesgo de aborto involuntario, parto prematuro y bajo peso al nacer (Méndez y cols., 2012). Además un aumento en los parámetros inflamatorios, estrés oxidativo, y los niveles de homocisteína. Los niveles elevados de homocisteína se han asociado con riesgos de preeclampsia y parto prematuro, y con un defecto del tubo neural, y bajo peso al nacer en los bebés (Rajendiran y cols., 2015).

## 9. INFLUENCIA DE LA MELATONINA EN LOS DESCENDIENTES

La melatonina, debido a su naturaleza lipofílica tiene la capacidad de atravesar cualquier barrera biológica, entre ellas la placenta. Klein en 1972 descubrió en ratas, en el día 18 de preñez que tras la administración exógena de melatonina, está fue detectada en diversos órganos de sus respectivos fetos, poniendo así de manifiesto que la melatonina puede jugar un papel importante en la fisiología del feto. Durante la vida

fetal, cuando la vía neural que conecta la retina con el NSQ, aún no está formada, la melatonina materna cede información al NSQ fetal en desarrollo, la comunicación materno-fetal, permite que el feto reciba información del exterior hasta que su retina sea funcional en la vida postnatal y permita la transmisión de la señal luminosa hacia el NSQ (Reppert y Weaver, 1995).

La melatonina materna puede afectar al desarrollo posnatal del eje neuroendocrino-reproductor en la descendencia. Se ha demostrado que la melatonina puede actuar sobre el feto, tanto a nivel de desarrollo somático, como el hormonal durante la vida postnatal (Tamura y cols., 2008; Reiter y cols., 2013).

En diferentes estudios se ha demostrado que la glándula pineal materna y la melatonina tienen un papel en la percepción prenatal de la duración del día. La pinealectomía materna (PIN-X) impidió la influencia del fotoperíodo prenatal en el peso gonadal y el peso corporal de las crías. Mientras que la administración de melatonina en animales PIN-X imitaba el efecto del fotoperíodo prenatal en el peso testicular y peso corporal (Weaver y Reppert, 1986).

Además, la alta solubilidad de la melatonina permite que sea fácil su acceso al interior de las células y fluidos corporales. En estudios con ovejas preñadas se vio que el patrón de la melatonina en la circulación fetal sigue el ritmo circadiano de la melatonina materna. En ovejas PIN-X, no se observaron concentraciones plasmáticas maternas y fetales. Esto indica que la glándula pineal materna es la fuente principal del ritmo diurno de la melatonina en el plasma materno y fetal (McMillen y Nowak, 1989).

Los resultados de diferentes experimentos realizados en madres control, madres PIN-X o madres tratadas con melatonina durante el embarazo indican que el tratamiento con melatonina influyen en la ontogenia postnatal de las gonadotropinas y prolactina. El efecto de la melatonina en la descendencia fue más evidente durante la etapa de la pubertad, mientras que el efecto de la PIN-X era más aparente durante el periodo juvenil. Todo esto sugiere que la melatonina materna afectar directa o indirectamente a las crías durante el desarrollo temprano (Bellavia y cols., 2006; Torres-Farfan y cols., 2006).

## 10. KISSPEPTINA

### 10.1 KISS1/KISS1R

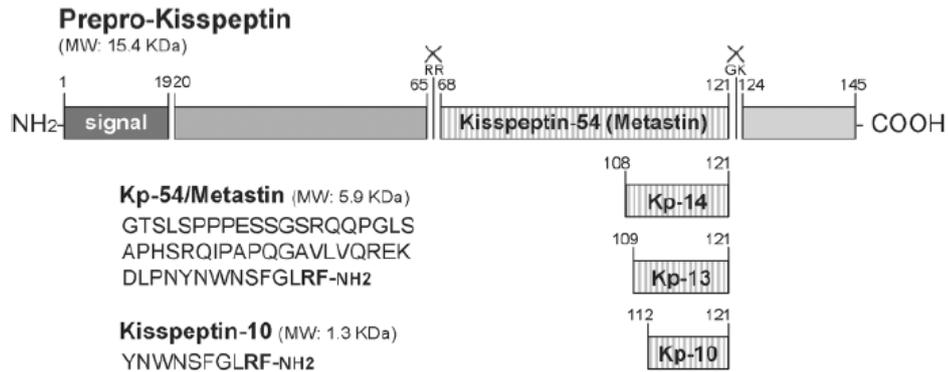
El mRNA de *Kiss1* fue descubierto por Lee y cols., (1996), se encontró que se sobreexpresaba en células del melanoma que presentan baja actividad metastática. En un principio el gen *Kiss1* era considerado como un supresor de metástasis (Rhie, 2013). Por esta razón, el producto proteico de dicho gen recibió originalmente el nombre de metastina (Gianetti y Seminara, 2008).

En 1999 el receptor GPR54 fue descubierto como un receptor huérfano en el cerebro de rata. Es un receptor GPCR con siete dominios transmembrana y con cierta similitud a receptores de galanina. Posteriormente, se denominó variable GPR54, AXOR12, hOT7T175 y HH8 (Beltramo y cols., 2013; Tng, 2015). Sin embargo, no fue hasta el año 2001 cuando se vinculó dicho receptor, a los productos del gen *Kiss1* (Kotani y cols., 2001; Rhie, 2013). Los productos génicos de *Kiss1* se conocen colectivamente como kisspeptins (kps) (Göttsh y cols., 2009).

La expresión del sistema KISS1/KISS1R se encuentra en una gran diversidad de especies y sobre todo en el ser humano. En humanos, se expresa mayoritariamente en placenta, testículo, páncreas, hígado, intestino delgado y en distintas áreas del SNC. En las ratas se encuentra sobre todo en el cerebelo, ovario, colon y placenta (Kotani y cols., 2001; Tng, 2015).

### 10.2 Estructura

El gen *Kiss1* se localiza en el cromosoma 1q32 y tiene cuatro exones, los dos primeros no se traducen (Skorupskaite y cols., 2014). El gen *Kiss1* codifica el precursor pre-pro-kisspeptina, un péptido que comprende 145 aminoácidos (Ilustración 9), que mediante un proceso proteolítico diferencial origina un conjunto de productos peptídicos, los denominados kps. Esta proteólisis da lugar a fragmentos de diferentes longitudes; El principal fragmento es la Kisspeptina-54 (kp-54) o metastina, es el más abundante en la circulación y recibe ese nombre debido a su implicación en tumores. Dicho fragmentos se puede escindir en péptidos de menor tamaño, Kisspeptina-14 (kp-14), Kisspeptina-13(kp-13) y Kisspeptina-10 (kp-10). Estos fragmentos comparten 10 aminoácidos de la región C-terminal (motivo RFamida), que presentan un motivo característico Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (Tena- Sempere, 2006; Roa y cols., 2011; Clarke y cols., 2015).



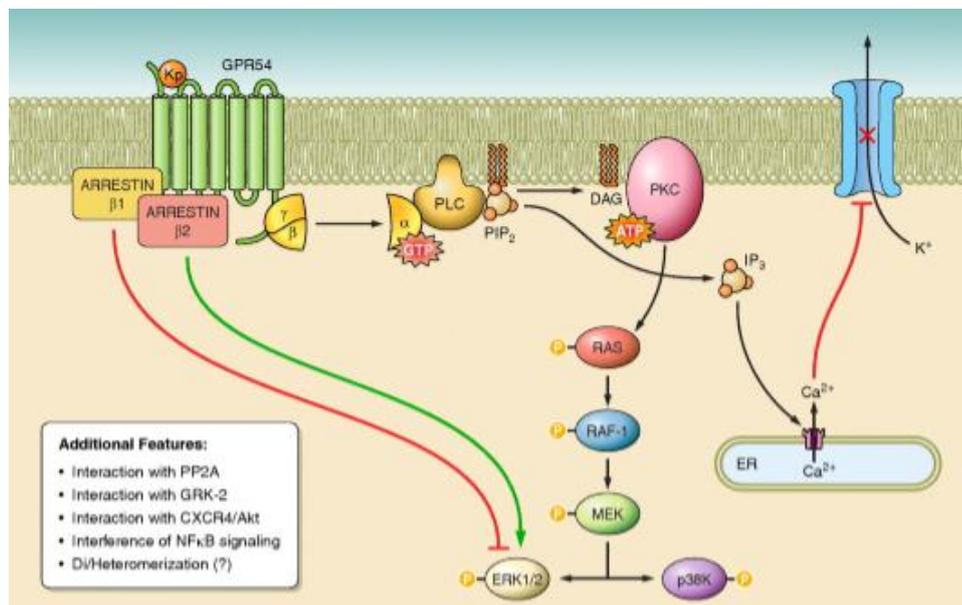
*Ilustración 9:* Formas estructurales de kps humanas (Tena- Sempere, 2006)

A pesar de que en un principio KISS1 y GPR54 eran estudiados en diferentes tipos de cánceres, estudios funcionales han sugerido que este sistema puede presentar funciones biológicas distintas a la supresión de metástasis, ya que la expresión de *GPR54* y en menor medida, del gen *Kiss1* puede verse en diversos tejidos humanos y de roedores normales, es decir, que no presentan metástasis. Por lo tanto, la expresión del gen *GPR54* se distribuye ampliamente, con niveles máximos de mRNA en placenta, páncreas, glándula pituitaria, médula espinal y las diferentes áreas del cerebro, incluyendo el hipotálamo. Además, la expresión de gen *Kiss1* se demostró en placenta humana y, a niveles más bajos, en el testículo y el intestino delgado. También fue detectado mRNA del gen *Kiss1* en el cerebro humano (Rhie, 2013). Esto sugiere la posible participación del sistema KISS1 / GPR54 en diversos sistemas biológicos.

### 10.3 Mecanismo de acción

La unión de la Kisspeptina a su receptor (KISS1R) va a desencadenar una variedad de cascadas de señalización (Ilustración 10). Cuando se une al receptor se activa una proteína G (G<sub>q</sub> / 11  $\alpha$ ), dependiente de GTP, la unión activa dicha proteína y hace que esta se escinda en sus tres subunidades. Se separa por un lado la subunidad  $\alpha$  y por otro la  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  se desplaza por la bicapa lipídica hasta activar la fosfolipasa C (PLC), al activarla estimula la transformación de bifosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). La presencia de IP<sub>3</sub> produce el aumento de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, favoreciendo la salida de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos celulares (desde el RE hacia el citoplasma fundamentalmente). Como consecuencia de este aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, se bloquean los canales de K<sup>+</sup> de la membrana, impidiendo su entrada al citoplasma. Esto hace que se aumente la positividad en la cara interna de la membrana, produciéndose así

una despolarización de la membrana celular que genera un potencial de acción (Muir y cols., 2001; Pinilla y cols., 2012; Clarke y cols., 2015). Este potencial de acción genera un impulso nervioso que activa las neuronas de GnRH e incrementa su síntesis y la posterior modulación de la hormona luteinizante (LH) y la liberación de la hormona folículo-estimulante (FSH) Además, el aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  junto con la presencia de DAG, produce la activación de la proteína kinasa C (PKC) que induce la fosforilación de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), tales como ERK1 / 2 y p38. Además, la activación de GPR54 recluta arrestina- $\beta 1$  y - $\beta 2$ , que también van a modular el receptor de señalización, aunque de manera opuesta. Mientras que arrestina- $\beta 1$  disminuye la fosforilación de ERK mediada por GPR54, arrestina- $\beta 2$  la aumenta. La activación del receptor también se ha demostrado que desencadena la formación de ácido araquidónico (Pinilla y cols., 2012; Tng, 2015).



*Ilustración 10:* Mecanismo de acción del receptor de Kisspeptina (Pinilla y cols., 2012)

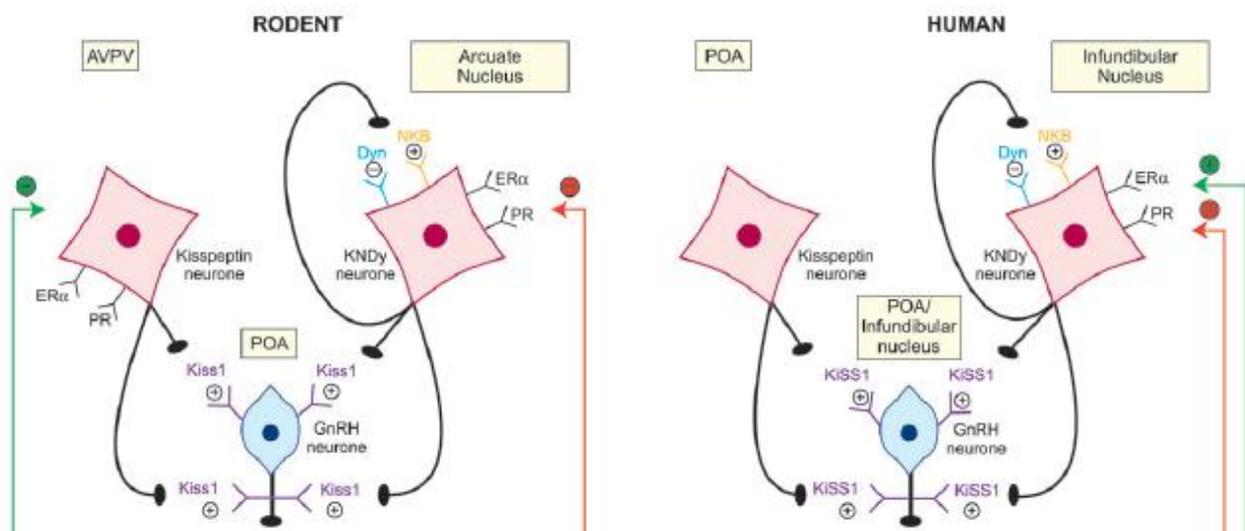
#### 10.4 Primeras evidencias de la importancia del sistema KISS1/GPR54

Los primeros hallazgos de la dimensión reproductiva del sistema KISS1 / GPR54 se llevaron a cabo en el 2003. En este año, se presentaron dos informes independientes uno llevado a cabo por de Roux y cols., (2003) y otro por Seminara y cols., (2003), en los cuales se documentaba la presencia de deleciones y mutaciones que inactivan el gen *GPR54* en aquellos pacientes que sufren hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (IHH) una condición caracterizada por los esteroides sexuales y los niveles de gonadotropinas bajos. En estos pacientes la síntesis de GnRH hipotalámica así como la

migración neural se mantenían intactas. Esto se confirmó posteriormente en ratones que presentaban una mutación en el gen *Kiss1*. GPR54 y ratones deficientes en *Kiss1* muestran un fenotipo prácticamente idéntico. Todo esto hizo pensar que el gen y su receptor tienen algo que ver con la reproducción. Y que el fallo no estaba en las neuronas GnRH, si no que estaba en un nivel superior. Se hicieron estudios de hibridación *in situ* y de análisis inmunohistoquímico (IHC), mediante los cuales en 2005 se demostró la existencia de poblaciones neuronales *Kiss1* en el hipotálamo (García-Galiano y cols., 2011).

### 10.5 Localización de las neuronas Kisspeptina

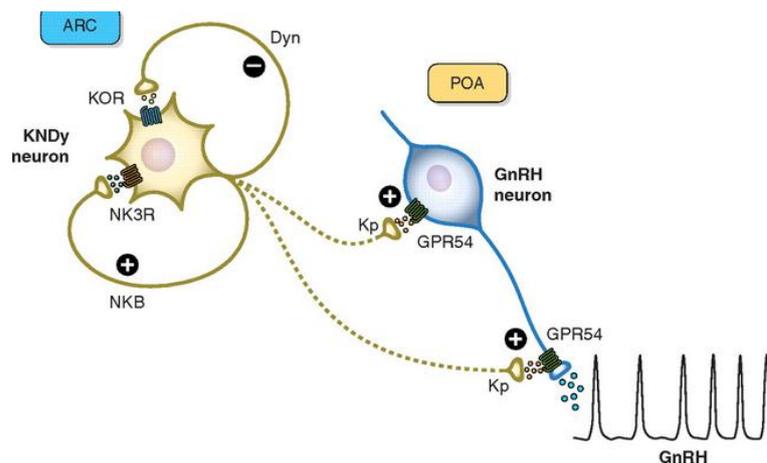
La expresión de *KISS1* y su receptor se ha demostrado en dos grandes poblaciones neuronales en el hipotálamo de roedores: en el núcleo arcuato (ARC) y en el núcleo periventricular anteroventral (AVPV). En los seres humanos y primates, el mRNA de *Kiss1* se expresa predominantemente en el núcleo infundibular (equivalente al ARC de roedores) y se ha detectado una segunda población de neuronas *Kiss1* en el área preóptica (POA) (Göttsch y cols., 2004; Skorupskaite y cols., 2014) (Ilustración 11). Hay un claro dimorfismo sexual en las neuronas *Kiss1* del núcleo AVPV, con muchas más neuronas en las mujeres que en los hombres. Una evidencia más reciente es el dimorfismo sexual en neuronas *Kiss1* de la zona periventricular del tercer ventrículo (RP3V) y el infundíbulo de los seres humanos (Hrabovszky y cols., 2010).



**Ilustración 11:** La ubicación de las poblaciones neuronales que expresan *KISS1* dentro del hipotálamo, en roedores y en seres humanos. Modificado de Skorupskaite y cols., 2014

### 10.6 Co-transmisores de la señalización de Kisspeptina

Una característica de las neuronas Kiss1 que ha surgido en los últimos años es el hecho de que se coexpresan otros neuropéptidos con funciones en el control de la secreción de GnRH y gonadotropinas (Ilustración 12). Las diferentes investigaciones han permitido la identificación de neuroquinina B (NKB) y dinorfina A (Dyn) como co-transmisores, y potenciales auto-reguladores, de las neuronas Kiss1. De hecho el término KNDy, lo que significa Kiss1/NKB/Dyn, se ha propuesto como un nombre para esta población de neuronas Kiss1 que parece estar ubicado de forma selectiva en la región ARC/infundibular. Por el contrario, las neuronas Kiss1 del núcleo AVPV carecen de la co-expresión de NKB y/o Dyn (García-Galiano y cols., 2011). NKB pertenece a la familia de las taquiquinas, que incluye también la neuroquinina A (NKA), la sustancia P, y hemokinin-1 (HK-1), así como los neuropeptidos K y  $\gamma$ . Han sido identificados hasta el momento tres receptores para taquiquinas: NK1R, NK2R y NK3R; La NKB activa preferente NK3R. El gen que codifica la NKB se denomina *TAC3* en los seres humanos y en roedores *Tac2*, mientras que el NK3R es codificado por el gen *TACR3/Tacr3* (Pinilla y cols., 2012; Clarke y cols., 2015). La Dyn es un péptido opiáceo endógeno que se une al receptor opiáceo kappa (KOR). Mientras que la NKB es un estímulo excitatorio, la Dyn es un estímulo inhibitorio de la liberación de Kisspeptina en el hipotálamo (Clarke y cols., 2015; Tng, 2015).



*Ilustración 12:* Co-transmisores de la señalización de Kisspeptina (Pinilla y cols., 2012)

## 10.7 Funciones

En la actualidad se reconocen múltiples funciones de las kps, entre las que se encuentran:

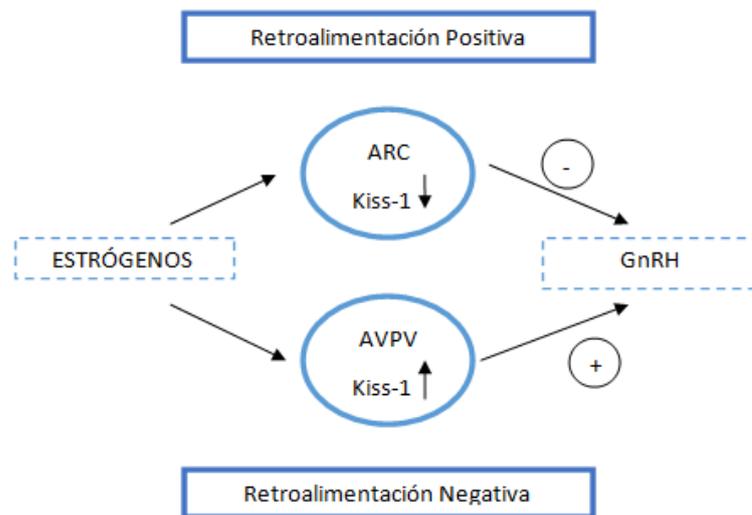
### Regulación de la GnRH

La Kisspeptina activa directamente las neuronas GnRH del hipotálamo, causando la estimulación de la secreción de GnRH, que a su vez provoca la liberación de LH y FSH por la hipófisis. Además, numerosos estudios han demostrado que la respuesta a Kisspeptina en términos de LH y FSH es dependiente de la dosis (Rhie, 2013; Skorupskaite y cols., 2014). En particular, la liberación de FSH parece ser aproximadamente 100 veces menos sensible al efecto estimulador de Kisspeptina que la LH en gran variedad de animales (Tena-Sempere, 2006). 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 (Messenger y cols., 2005). La diferencia entre la secreción de LH y FSH mediada por Kisspeptina es desconocida, se cree que está relacionada con el patrón de liberación de la GnRH y las diferentes acciones de regulación de los factores periféricos (Navarro y cols., 2005).

### Control de la retroalimentación positiva y negativa de estrógenos

La secreción de GnRH se encuentra regulada por esteroides sexuales a través de retroalimentación positiva y negativa (Ilustración 13), pero se desconoce cuáles son los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a esta regulación. Las neuronas GnRH no expresan receptor estrogénico alfa ( $ER\alpha$ ) ni receptor androgénico (AR), lo que sugiere que otras neuronas sensibles a esteroides intermediarían este mecanismo (Smith y cols., 2005). Diversos estudios en diferentes animales, ambos sexos, diferentes momentos del desarrollo y en diferentes núcleos hipotalámicos, han vinculado a la Kisspeptina en el control de la regulación, ya que esta sí presenta ambos receptores (Calé y cols., 2011). Se ha visto que, el núcleo ARC está principalmente vinculado a la retroalimentación negativa mediada por los estrógenos en hembras y por estrógenos y andrógenos en los machos. Por lo tanto, cuando los estrógenos se unan al ER en las neuronas Kiss1 del núcleo ARC o el núcleo infundibular, inhibirán la Kisspeptina y posteriormente la liberación de GnRH. Por el contrario, el núcleo AVPV se vincula a la retroalimentación positiva que los estrógenos ejercen sobre el eje, responsable del inicio

de la pubertad y de la generación del pico de LH preovulatorio en hembras (Smith y cols., 2005; Calé y cols., 2011).



*Ilustración 13:* Retroalimentación estrógenos/ GnRH.

#### Papel en el inicio de la pubertad

El papel indispensable del sistema KISS1/GPR54 en el control de la pubertad se dio a conocer por los hallazgos iniciales de la falta o retraso de madurez sexual en los seres humanos y los ratones que tenían mutaciones que inactivaban al gen *GPR54* (de Roux y cols., 2003; Seminara y cols., 2003). En la rata, tanto machos como hembras mostraban un claro incremento de los niveles de mRNA de *GPR54* y *Kiss1*, coincidiendo con el inicio de la pubertad (Navarro y cols., 2005). Esto se confirmó más tarde en primates, en la que la expresión del mRNA de *Kiss1* y *GPR54* aumentaba durante la transición a la pubertad. Esto sugiere que hay un aumento de la señalización de Kisspeptina en el momento de la pubertad, causado por una mayor expresión de *Kiss1* y *GPR54* (Rhie, 2013). Por el contrario, la ausencia o retraso de la pubertad está asociado con mutaciones el receptor KISS1R lo que indica que las kps son necesarias para el correcto inicio de la pubertad (Silveira y cols., 2010).

#### En el embarazo

Durante el embarazo se produce un aumento dramático en los niveles circulantes de Kisspeptina, derivado principalmente de la placenta que expresa tanto *Kiss1* como *Kiss1R*. La Kisspeptina puede estar implicada en la regulación de la invasión trofoblástica durante el primer trimestre, cuando la Kisspeptina plasmática es elevada (Janneau y cols., 2002; Horikoshi y cols., 2003). Esto sugiere que la Kisspeptina tiene

un papel importante en el control de la invasión trofoblástica durante la formación de la placenta, posiblemente mediante la regulación inhibidora de metaloproteasas (Gianetti y Seminara, 2008). Diversos estudios han relacionado los niveles de Kisspeptina y la disfunción placentaria, como la preclampsia, y la restricción del crecimiento intrauterino (Clarke y cols., 2015). También se han encontrado niveles de Kisspeptina relativamente bajos en mujeres embarazadas con diabetes mellitus tipo 1 (Cetkovic y cols., 2012). Así como los niveles de Kisspeptina placentaria son más bajos en mujeres con abortos involuntarios, siendo esta un nuevo marcador para identificar a las mujeres embarazadas asintomáticas con un mayor riesgo de abortos espontáneos (Park y cols., 2012).

#### En el metabolismo

La actividad de las neuronas Kiss1 está influenciada por el peso corporal, la nutrición, el metabolismo y las señales hormonales y esto a su vez afecta a la fertilidad (Clarke y cols., 2015). Se planteó la hipótesis de que la leptina puede constituir una relación entre la nutrición y la fertilidad. Sin embargo, las neuronas GnRH carecen de receptores para la insulina. Por lo tanto, la Kisspeptina está implicada como intermediario entre la señalización de la leptina y la función de la GnRH, ya que las neuronas Kiss1 presentan receptores para leptina. Por lo tanto, es probable que la leptina active las neuronas de GnRH a través de la estimulación de las neuronas Kiss1 (Rhie, 2013). La leptina es una hormona peptídica secretada por los adipocitos, al aumentar sus niveles debido a un periodo de ayuno reduce los niveles periféricos de gonadotropinas, disminuye la expresión de *Kiss1* y aumenta la proporción de receptores GPR54 presentes a nivel hipotalámico. Al reducir la secreción de gonadotropinas, se ve afectada la función reproductiva (Castellano y cols., 2005).

## 11. NEUROQUININA B (NKB)

La NKB forma parte de la familia de las taquiquinas, junto con la sustancia P, NKA, HK-1 y varias formas de endokininas (EKS) (Hu y cols., 2014). Erspamer en 1981 describió otros péptidos pertenecientes a esta familia en especies no mamíferas: Fisalemina, Eledoisina y Kassinina.

Todas las taquiquininas presentan un grupo amida en el extremo carboxiloterminial y la secuencia común: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, hasta completar los 10-11 aminoácidos que generalmente posee la estructura y el extremo aminoterminial distinto para cada péptido. La secuencia carboxílica es esencial para la interacción y la activación del receptor, mientras que el extremo amino define la especificidad al subtipo de receptor (Krause y cols., 1992).

Se generan a partir de una proteína precursora o preprotoquinina (PPT) codificada por el gen PPT. El mRNA original para PPT, da lugar a tres mRNA diferentes: PPT  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Las taquiquinas se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos, principalmente en el cerebro y en el intestino. Las taquiquininas juegan un papel importante en la secreción de hormonas hipofisarias, ejerciendo su función a nivel de hipotálamo e hipófisis (Kotani y cols., 1986; Krause y cols., 1987).

Los genes de las taquiquininas dan lugar a diferentes productos génicos, como el *TAC1* que da lugar a la sustancia P y la NKA, el gen *TAC3* (*TAC2* en roedores) que codifica NKB y *TAC4* que codifica HK-1 y EKS. *TAC1* y *TAC3* se detectaron principalmente en estructuras neuronales del sistema SNC. Mientras que *TAC4* en tejidos no neuronales como el bazo, estómago o pulmón (Hu y cols., 2014). Los péptidos presentan funciones importantes como neurotransmisores, hormonas neuroendocrinas y reguladores autocrinos/paracrinos (Satake y cols., 2013).

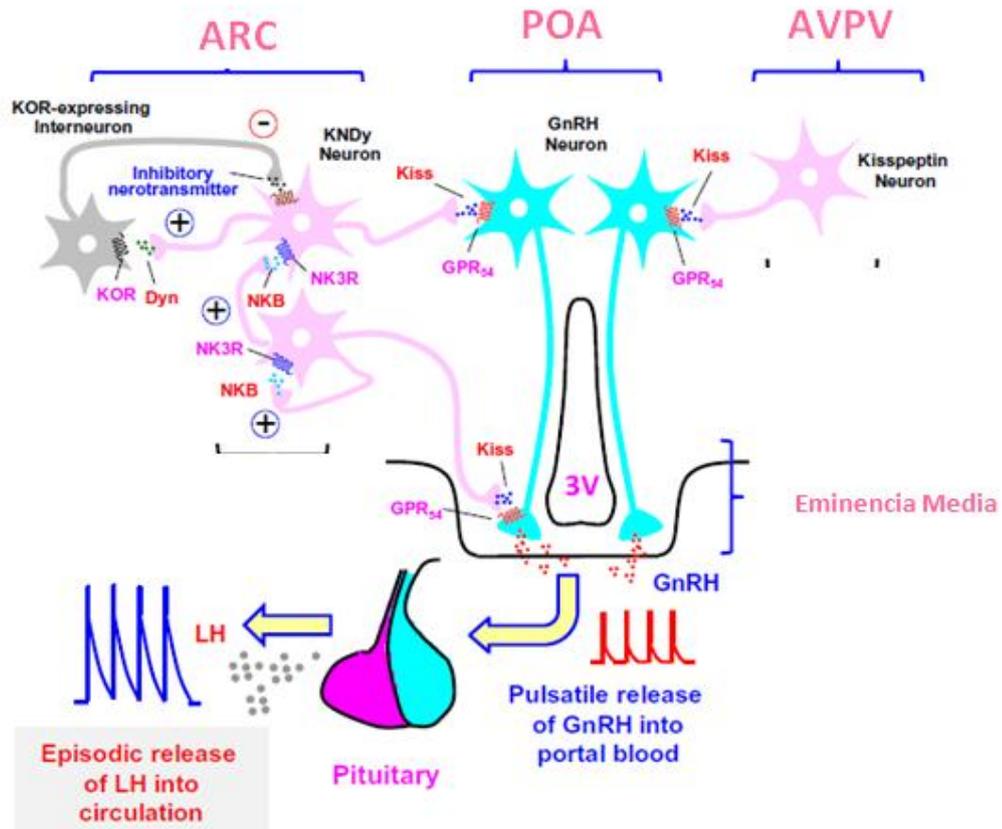
Las funciones fisiológicas de las taquiquininas están medidas a través de tres subtipos de receptores: NK1R, NK2R y NK3R, que son receptores GPCR del grupo rodopsina clase I (Satake y cols., 2013). La estructura aleatoria de las taquiquininas puede adoptar una configuración helicoidal, cuando el péptido se encuentra cerca de la membrana plasmática de la célula diana (Grace y cols., 2003). No todos los receptores se unen con la misma afinidad. Así pues, la sustancia P es el ligando más afín del receptor NK1R, la NKA del receptor NK2R y la NKB a su receptor NK3R (Almeida y cols., 2004).

La NKB a diferencia de la Kisspeptina sólo se encuentra en el núcleo ARC, en una subpoblación de neuronas KNDy. Dichas neuronas coexpresan Kisspeptina, NKB y Dyn (Hua y cols., 2014). Estos tres péptidos parecen operar conjuntamente como moduladores clave de la secreción de GnRH, se cree que las neuronas KNDy sirven como un marcapasos central que impulsa la secreción pulsátil de GnRH y la liberación de gonadotropina (Goodman y cols., 2007) y también muestran cambios marcados en su actividad debido al cambio de esteroides gonadales.

Además de sus funciones a nivel central, Kisspeptina y NKB participan en la regulación de las funciones reproductivas. Ambas están presentes en placenta, el ovario, los testículos y la próstata (Pinto y cols., 2012).

En los últimos años, el producto del gen *TAC3*, la NKB ha surgido como un regulador clave en las funciones reproductoras de mamíferos, sobre todo en el control de la pulsatilidad de la GnRH en el hipotálamo. La participación de *TAC3* en la función reproductiva fue demostrada por mutaciones en NKB o NK3R. Dichas mutaciones producían HHI o incluso infertilidad en humanos (Hu y cols., 2014). La expresión de NKB y NK3R se puede utilizar como marcador de la maduración sexual durante la pubertad. La interrupción del sistema NKB/NK3R tiende a inhibir la pubertad en humanos y en modelos animales (Topaloglu, 2010). En adultos, la NKB actúa a nivel del eje HHG, su principal función es la regulación neuroendocrina de la pulsatilidad de GnRH en el hipotálamo. La regulación se lleva a cabo a través de una subpoblación de neuronas KNDy (Lehman y cols., 2010; Navarro, 2012).

Al parecer, la liberación local de NKB puede activar la expresión de NK3R en las neuronas KNDy y el posterior aumento de Kisspeptina que estimula la secreción de GnRH en la eminencia media del hipotálamo. Esto puede ejercer luego funciones reproductivas mediante la regulación de la liberación pulsátil de LH (*Ilustración 14*) (Hu y cols., 2014).



*Ilustración 14:* “Neuronas KNDy” modelos para la regulación de GnRH. Modificado de Hu y cols., 2014

Además de NK3R, expresado fundamentalmente en las neuronas KNDy estudios recientes han demostrado que NK1R y NK2R también participan en la activación de NKB dentro del núcleo ARC (De Croft y col., 2013).

## JUSTIFICACIÓN

En la sociedad actual, “sociedad de 24 horas”, nos vemos sometidos a un exceso de luz, especialmente durante la noche. Esta situación genera una alteración en el funcionamiento de nuestro reloj biológico y por lo tanto de los ritmos circadianos, siendo esta una de las causas que está detrás de patologías graves como el cáncer. No en vano, el riesgo de padecer ciertas enfermedades es mayor en trabajadores a turnos o trabajadores nocturnos. Estas situaciones generan una disrupción en nuestro sistema circadiano que, entre otros, puede afectar a la funcionalidad del sistema reproductor ya que es especialmente sensible.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1. Hipótesis

La exposición a luz continua durante la vida intrauterina afecta la posterior expresión de KISS1 y NKB durante la pubertad. El tratamiento con melatonina revierte dicho efecto.

### 2. Objetivos

1. Valorar la influencia de la exposición a luz continua de las madres durante la gestación sobre los niveles gonadales de los neuropéptidos KISS1 y NKB en sus descendientes durante la pubertad.
2. Estudiar la eficacia del tratamiento con el cronobiótico melatonina a lo largo de la gestación para restablecer la expresión de los neuropéptidos KISS1 y NKB en las gónadas de los descendientes durante la pubertad.
3. Valorar la influencia de la exposición a luz continua y la capacidad reparadora de la melatonina a lo largo de la gestación sobre otros indicadores como es el inicio de la AV en las hembras descendientes.
4. Valorar la influencia de la exposición a luz continua y la capacidad reparadora de la melatonina a lo largo de la gestación sobre el peso corporal de los descendientes en la pubertad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

Se han utilizado 24 ratas hembras y 4 machos de la cepa Wistar, criadas en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo. Las ratas tenían libre acceso a comida y bebida. La temperatura de la habitación fue constante, aproximadamente 23 grados. La humedad relativa fue del 65%. Se dispuso de manera aleatoria en la misma jaula dos hembras con un macho para conseguir la preñez de estas. Para confirmar la preñez, se realizaron frotis vaginales, preferentemente, por la mañana para detectar la presencia de espermatozoides en las hembras. Para la realización del frotis se usó una punta de pipeta y un chupo, así como suero salino. Y para detectar la presencia de espermatozoides en las diferentes muestras se usó un microscopio óptico. Se consiguió la preñez en 18 de ellas. Tras confirmar la preñez los animales se iban asignando de forma aleatoria a los siguientes grupos:

- Grupo Control (N=8) expuestos a un fotoperiodo normal
- Grupo LL (N=8) expuesto a luz continua de manera permanente, es decir, 24 horas de luz
- Grupo LL+MEL (N=8) expuesto a luz continua de manera permanente pero con una inyección diaria de melatonina a la misma hora (18:30h)

Las hembras que no consiguieron la preñez, así como los machos que se usaron fueron retirados del estudio.

### Procedimiento

Una vez que se han dividido los grupos de estudio, fueron expuestos a las condiciones correspondientes. Las ratas del grupo control presentan un fotoperiodo normal (12L: 12O) durante el desarrollo de la gestación, las luces se encienden a las 8:00h y se apagan a las 20:00h. A dicho grupo se le inyectó una solución vehículo que está formada por etanol y suero salino al 0,9%. Dicha inyección fue suministrada diariamente a la misma hora (18:00-18:30h). Las ratas pertenecientes al grupo LL que estaban en condiciones de luz continua, al igual que a las ratas del grupo control se les administró una inyección de la misma solución y a la misma hora. El último grupo, LL+MEL, las ratas se mantuvieron en condiciones de luz continua durante el desarrollo de la gestación. A dichas ratas se les inyectó una solución de melatonina. Se utilizó una

dosis de 250µg/100gr.P.C. La melatonina (Sigma Chemical, Co) se disolvió en etanol (0,1 ml aproximadamente), y suero salino al 0,9%. El tratamiento se administró mediante una inyección subcutánea diariamente durante la preñez al final de la fase luminosa del día, sobre las 18:30h aproximadamente. El volumen inyectado en los tres grupos se determinó en función del peso de la rata.

La administración de dichas disoluciones en cada uno de los grupos se realizó hasta el día en que se produjo el parto. Se determinó el número de días que duró la preñez de cada una de las hembras que forman los tres grupos. Así como el número y el sexo de las crías. Una vez que se produce el parto, los grupos que se encontraban expuestos a luz continua fueron cambiados a un fotoperiodo normal, ya que lo que se quiere estudiar es la influencia de la cronodisrupción solo durante la gestación.

El destete de las crías se produce a los 21 días, donde se separan de las madres. Además de separarlas de las madres, se separan por sexos, por un lado machos y por otro las hembras.

Las descendientes hembras han sido sacrificadas el día de la apertura vaginal (AV). A partir del día 30 de edad diariamente se comprobó si se había producido el inicio de la pubertad, el cual viene determinado por la presencia de AV. Se eligió la edad de 30 días para comenzar a estudiar la presencia de AV en base a la clasificación de Ojeda y cols., (1986), en la que los periodos del desarrollo de la rata son los siguientes:

PERIODO	DÍAS
<b>Neonatal</b>	Nacimiento- Día 7 de vida
<b>Infantil</b>	Día 8-21
<b>Juvenil o prepuberal</b>	Día 21-32
<b>Puberal</b>	Día 32- AV
<b>Adulto</b>	Desde el día de la AV

*Tabla 1:* Periodos del desarrollo de la rata hembra (Ojeda y cols., 1986)

Para estudiar la descendencia macho, se siguió igualmente la clasificación de Ojeda y cols., (1986), según la cual los periodos del desarrollo son los siguientes:

PERIODO	DÍAS
<b>Infantil</b>	Día 7-21
<b>Juvenil o prepuberal</b>	Día 21-35
<b>Puberal</b>	Día 35-55/60

**Tabla 2:** Periodos del desarrollo de la rata macho (Ojeda y cols., 1986)

En este caso se han utilizado machos de 55 días de edad.

El método de sacrificio utilizado fue por decapitación. Se diseccionaron los ovarios, en el caso de las hembras; y los testículos en el caso de los machos. Se eliminaron los restos de grasa asociados a los órganos del aparato reproductor femenino. Todo ellos se congelaron a -80 grados hasta la determinación de los neuropéptidos.

Antes de realizar el sacrificio se determinó el peso (g) de cada uno de los descendientes, para ver si hay variación en el peso en las diferentes edades y en los diferentes grupos.

#### Homogenización de la muestra

Se recuperan las muestras de tejido ovárico y testicular previamente conservadas a -80°C y se mantienen permanente en hielo para evitar la posible degradación proteica.

Se realiza la homogenización mecánica de ambos tejidos en Buffer Lysis-1 [Tris-HCl 50mM (pH 7,5), NaCl 150mM, Tritón X-100 1% y Agua miliq] + añadir en el momento de usar: [Sodium Fluoride (NaF) 10mM, ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM]. 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 minutos a 4 °C para eliminar el material insoluble. Concluida la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se deja en un tubo eppendorf. Se almacena a -20 °C hasta su cuantificación.

#### Cuantificación de proteína y Western Blot

La cantidad de proteína total de los extractos crudos, fue cuantificada por el método del Ácido Bicinchonínico (BCA), descrito por Smith y cols., (1985). Este método nos permite cuantificar la cantidad de proteína (µg/µl) que hay en una muestra de manera que podamos calcular las cantidades (µl) que necesitamos utilizar para una

determinada técnica, es este caso para el western blot. Para la realización del BCA, se usa un kit comercial “*Pierce BCA Protein Assay*” (Thermo Scientific).

Una vez cuantificadas las muestras, a 22 µg de proteína para los ovarios (en el caso del testículo a 40 µg), se le añaden 4 µl de tampón de carga para proteínas [60 mM Tris, HCl pH 6,8, 2% dodecilsulfato sódico (SDS), 2,5% glicerol, 2,5% β-mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol] y agua miliQ hasta 12µl en el caso de los testículos y hasta 30 µl en ovarios. Se desnaturalizan las muestras en el termociclador a 100 grados durante 5 minutos y posteriormente son separadas mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

La electroforesis fue llevada a cabo utilizando un aparato *Mini protean* (Bio-Rad, U.S.A) en geles de policrilamida al 13%. Una vez que ha concluido la separación en gel de las muestras, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore Corporation, Billerica MA), previamente activadas con metanol, siguiendo el método descrito por Towbin y cols., (1979), durante 80 minutos a un voltaje de 60V.

Una vez finaliza la transferencia, recortamos las membranas por el marker de 25 KDa, para eliminar las uniones inespecíficas del anticuerpo a las inmunoglobulinas y se incuban las dos partes durante 1h 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 5%, con el objetivo de minimizar las uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana.

Transcurrido este tiempo, se procede al lavado de la parte inferior de la membrana en TBST para eliminar el bloqueo y se incuba durante toda la noche a 4 °C y en agitación con una disolución del anticuerpo primario contra la proteína de interés. Los anticuerpos primarios usados fueron: Neurokinin B (L-16) (sc 14109, Santa Cruz Biotech, Inc) y KISS-1 (C-20) (sc 18134, Santa Cruz Biotech, Inc) a una concentración de 1:1000 en TBST con leche en polvo al 2,5%.

A la mañana siguiente, se retira el anticuerpo primario y se realizan varios lavados de las membranas con TBST durante 40 minutos, tras los cuales son incubados durante una hora a temperatura ambiente y en agitación, con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (sc-2020, Santa Cruz Biotech, Inc) a una concentración de 1:10.000 en TBST, al 2,5% 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).

Para la realización de la  $\beta$ actina (sc-47778, Santa Cruz Biotech, Inc), se incubaba la parte superior de la membrana con el anticuerpo específico, a una concentración de 1:3000 en TBST, durante 2h a 4 °C en agitación. En el caso de la  $\beta$ 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 se ha explicado anteriormente.

Cabe destacar que se han usado las mismas membranas de PVDF para la detección de ambos neuropéptidos. Una vez que se realiza la primera detección de proteínas, se incuban dichas membranas durante 35 minutos 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 realiza un lavado de las membranas con TBST y un bloqueo de las posibles uniones inespecíficas como el citado anteriormente. Se incubaba durante toda la noche a 4 °C y en agitación con el anticuerpo primario de la otra proteína de interés y a la mañana siguiente se realiza el mismo procedimiento que en el caso anterior y se procede a su revelado.

Para la cuantificación de las bandas se utiliza el programa IMAGE J.

### Análisis estadísticos

Los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar de la media. Para la realización de las gráficas y los cálculos pertinentes se ha utilizado el programa Microsoft Excell 2010.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa SPSS. Se determinó primeramente si los datos seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. En los casos en los que se confirmó la normalidad se llevó a cabo una comparación de medias mediante el test ANOVA. Y en los que no se confirmó la normalidad y por tanto no se pudo usar un test paramétrico, se realizó el test de Kruskal-Wallis para determinar si

había diferencias entre los tres grupos. En los casos en los que se confirmó la presencia de diferencias, se realizaron las comparaciones dos a dos de los diferentes grupos usando el test U de Mann Whitney o la prueba T para muestras independientes. En función de si previamente se había realizado un test no paramétrico o paramétrico, respectivamente.

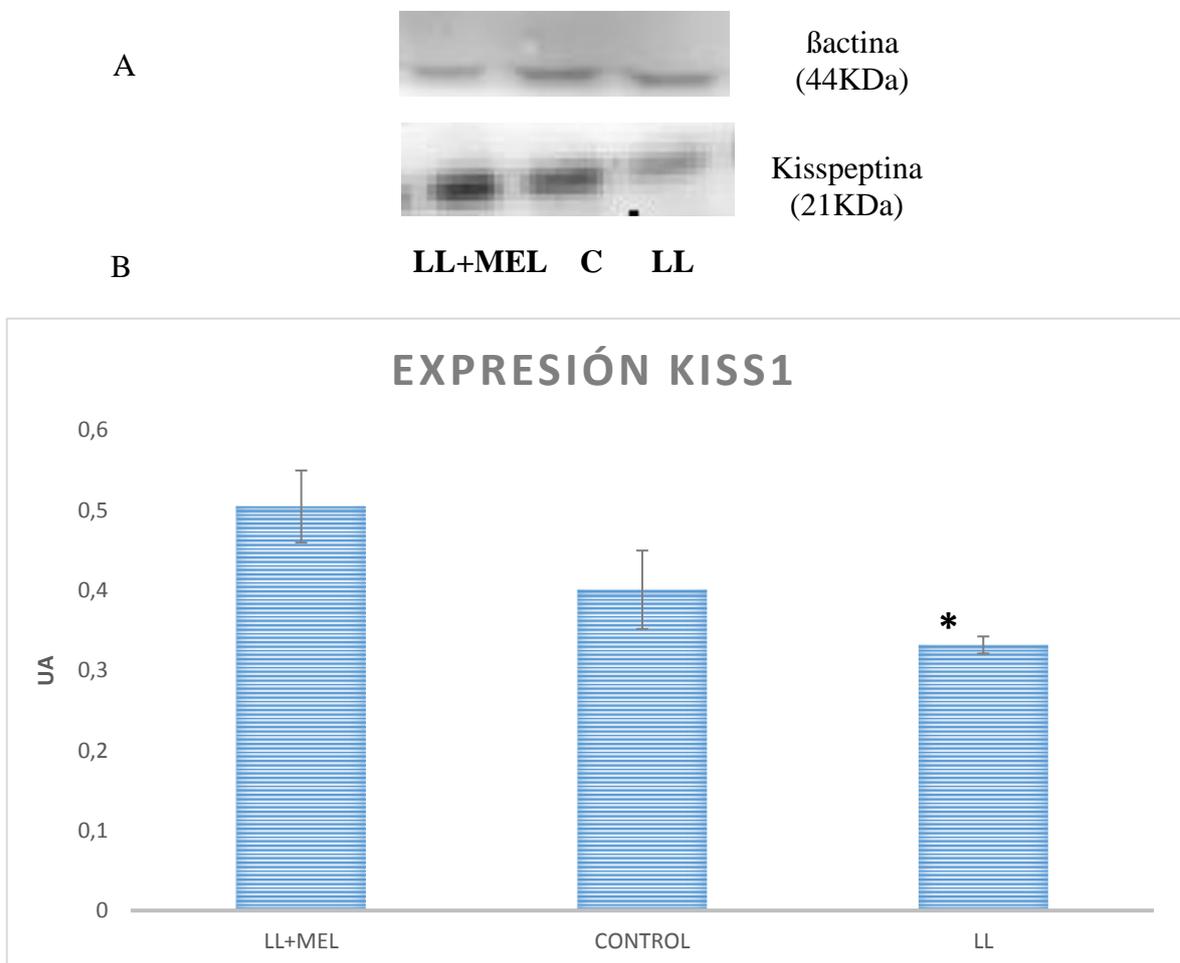
Se estableció un nivel de significación del 5%, considerando por tanto que hay diferencias estadísticamente significativas en aquellos valores en los que el grado de significación (p) sea menor de a 0,05.

## RESULTADOS

### MACHOS

#### Expresión de KISS1 en los testículos

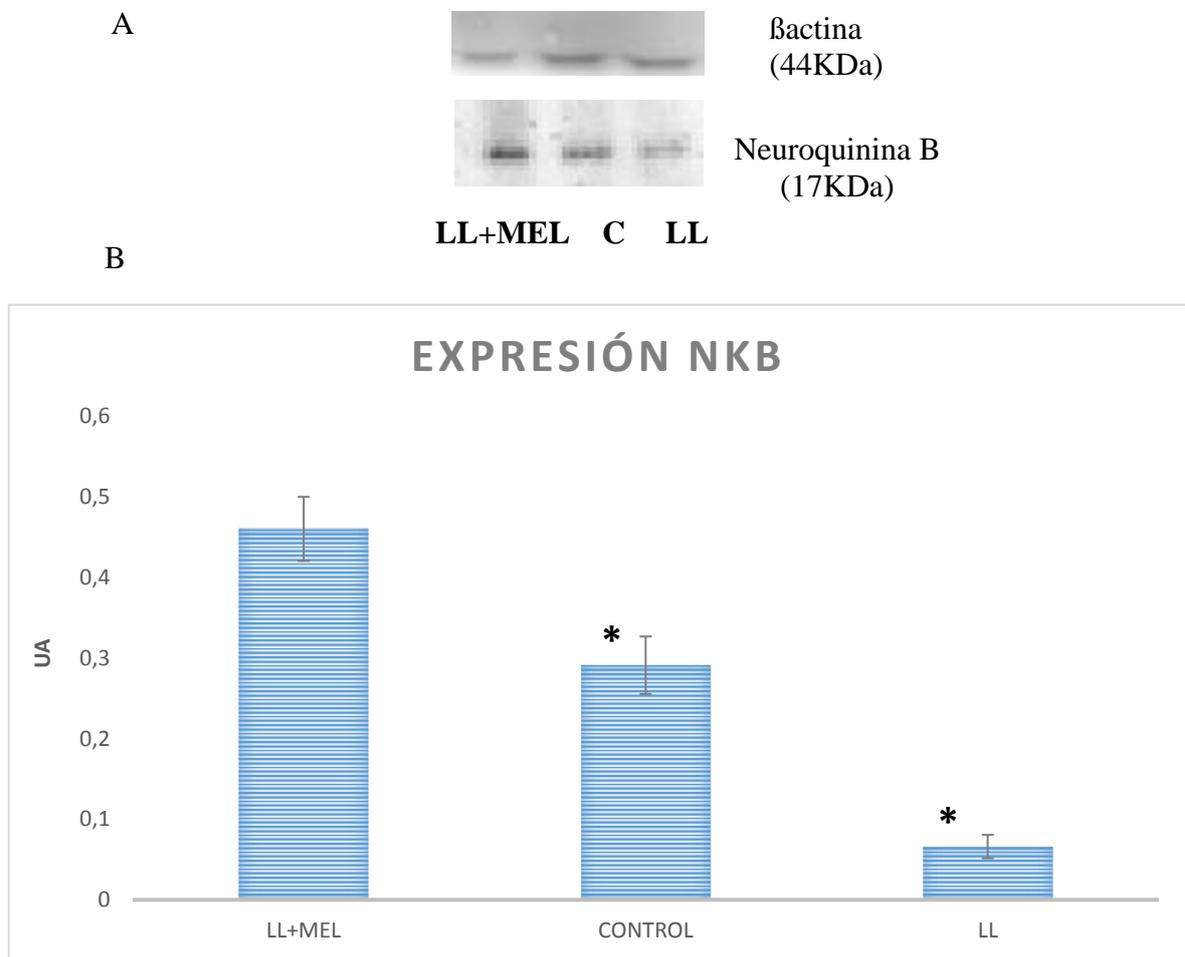
Los resultados de este estudio demuestran que la expresión proteica de KISS1 en los descendientes de madres LL, control y LL tratadas con melatonina durante la gestación, presenta variaciones. Siendo significativamente menor ( $p < 0,05$ ) esa expresión en los descendientes cuyas madres han estado sometidas a LL durante la gestación comparado con las del grupo control y LL tratadas con melatonina. Estas variaciones se pueden ver en la figura 1:



**Figura 1:** Resultados obtenidos tras la realización del Western blot. A) Bandas de 3 individuos, uno del grupo control (C), otro del grupo (LL) y otro del LL+MEL. Se muestran los valores de la  $\beta$ actina usados para normalizar. B) Se muestran los valores de KISS1 de las muestras de testículo ( $n=5$ ) de los descendientes de los tres grupos. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar de la media. \* $p < 0,05$  vs control y LL+ MEL

Expresión de NKB en los testículos

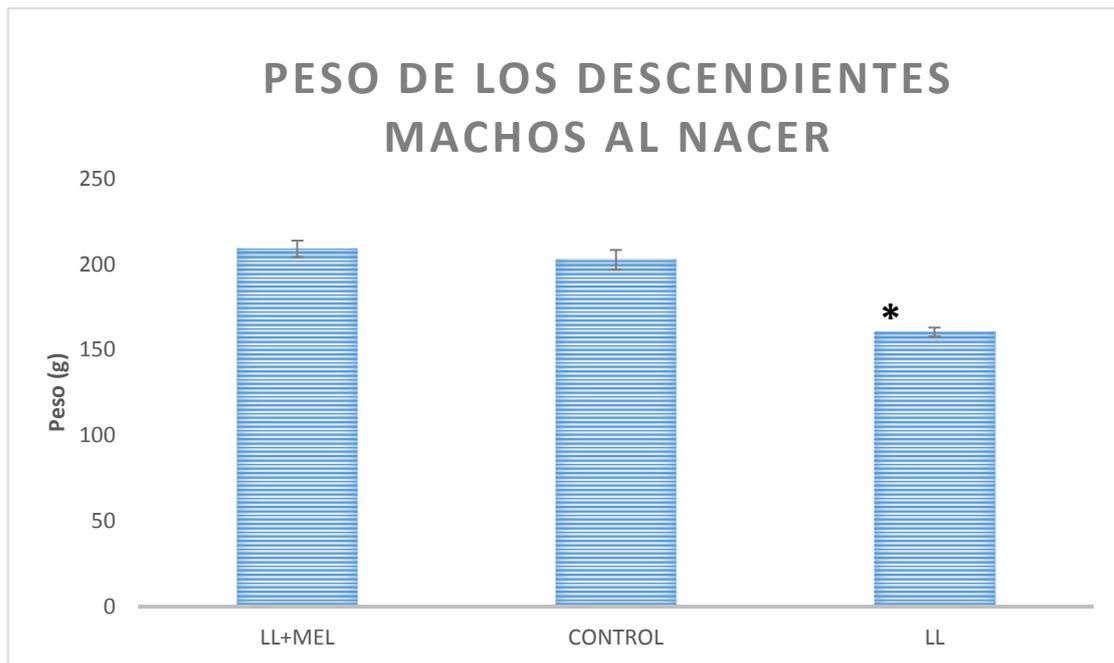
Los resultados de este estudio demuestran que la expresión proteica de la NKB en los descendientes de madres LL, control y LL tratadas con melatonina durante la gestación, presenta variaciones. Siendo significativamente menor ( $p < 0,05$ ) esa expresión en los descendientes cuyas madres han estado sometidas a LL durante la gestación comparado con las del grupo control y LL tratadas con melatonina y además los descendientes de madres expuestas a LL con tratamiento de melatonina muestran valores significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) que los controles. Estas variaciones se pueden ver en la figura 2:



**Figura 2:** Resultados obtenidos tras la realización del Western blot. A) Bandas de 3 individuos, uno del grupo control (C), otro del grupo (LL) y otro del LL+MEL. Se muestran los valores de la βactina usados para normalizar. B) Se muestran los valores de NKB de las muestras de testículo (n=5) de los descendientes de los tres grupos. Los valores representan la media ± error estándar de la media.\*  $p < 0,05$  LL vs control y LL+ MEL. \* $p < 0,05$  control vs. LL+MEL

### Pesos de los descendientes machos al nacer

En cuanto a los pesos que presentan los machos descendientes al nacer, los resultados de este estudio muestran que hay una variación en los pesos de los descendientes de madres LL, control y LL tratadas con melatonina durante la gestación. Siendo significativamente menor ( $p < 0,05$ ) ese peso al nacer en los descendientes cuyas madres han estado sometidas a LL durante la gestación comparado con los del grupo control y LL tratadas con melatonina. Estas variaciones las podemos ver en la figura 3:

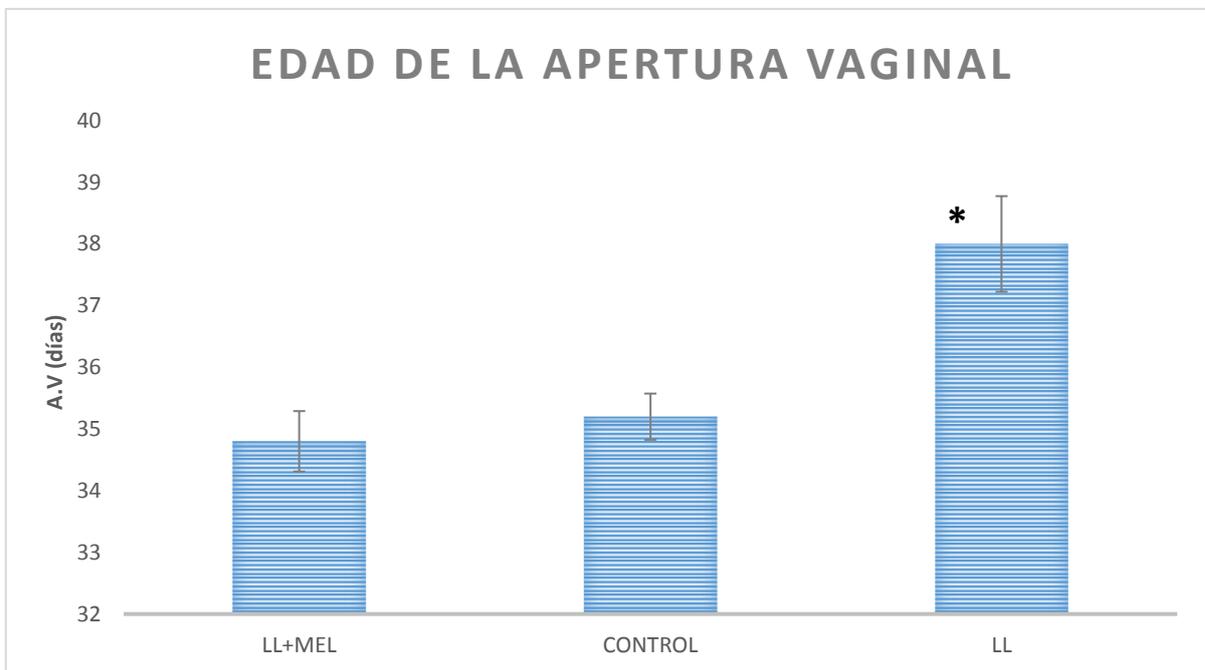


**Figura 3:** Peso de los descendientes al nacer de madres control, expuestas a LL y LL tratados con melatonina a lo largo de la gestación. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media (n=5) y \* $p < 0,05$  vs control y LL+MEL.

## HEMBRAS

## Edad de la AV

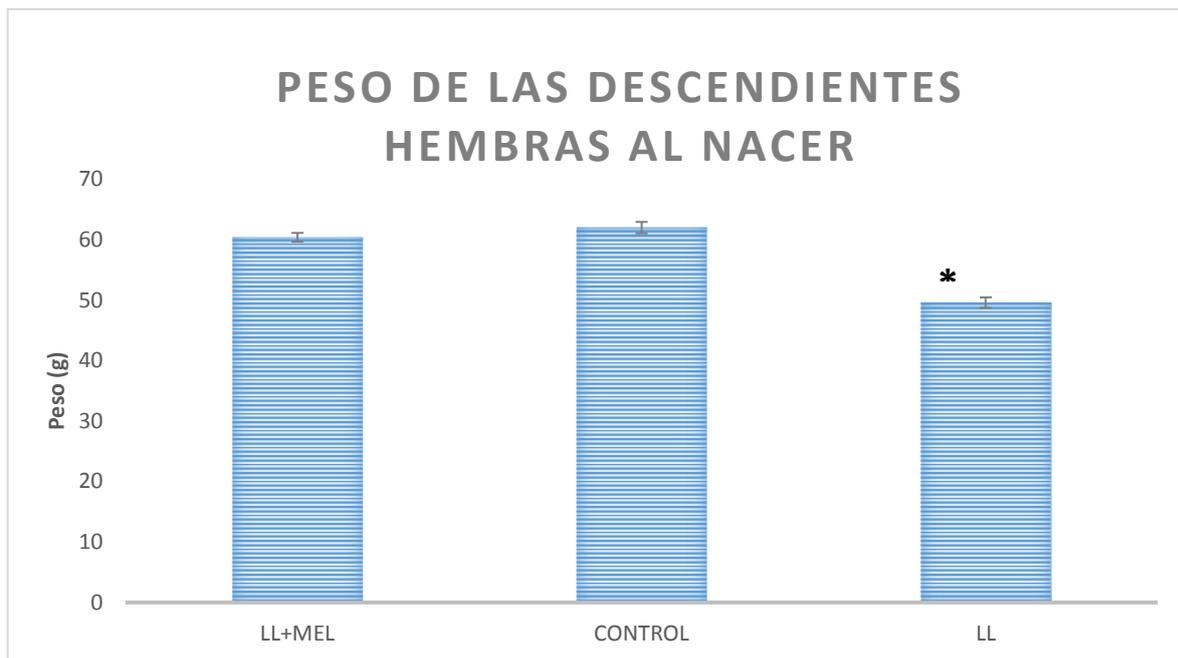
Respecto a la edad en la que se produjo la AV, los resultados de este estudio muestran que hay una variación en los días de la AV de los descendientes de madres LL, control y LL tratadas con melatonina durante la gestación. Siendo significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) la edad de la apertura vaginal en las descendientes cuyas madres han estado sometidas a LL durante la gestación comparado con los del grupo control y LL tratadas con melatonina. Estas variaciones las podemos ver en la figura 4:



**Figura 4:** Edad del inicio de la pubertad de las descendientes de madres control, expuestas a LL y LL tratados con melatonina a lo largo de la gestación. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media (n=5) y \* $p < 0,05$  vs control y LL+MEL.

### Pesos de las descendientes hembras al nacer

En cuanto a los pesos que presentan las hembras descendientes al nacer, los resultados de este estudio muestran que hay una variación en los pesos de las descendientes de madres LL, control y LL tratadas con melatonina durante la gestación. Siendo significativamente menor ( $p < 0,05$ ) ese peso al nacer en las descendientes cuyas madres han estado sometidas a LL durante la gestación comparado con los del grupo control y LL tratadas con melatonina. Estas variaciones las podemos ver en la figura 5:



**Figura 5:** Peso de las descendientes al nacer de madres control, expuestas a LL y LL tratadas con melatonina a lo largo de la gestación. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media (n=5) y \* $p < 0,05$  vs control y LL+MEL.

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que la exposición a luz continua durante la vida intrauterina afecta el desarrollo prostnatal de los descendientes, en un momento clave como es la pubertad, tanto en los descendientes machos como en las hembras.

En el caso de los machos, nuestros resultados muestran, por primera vez, que el efecto de la exposición a luz continua durante la vida intrauterina afecta a los niveles testiculares de los neuropéptidos, KISS1 y NKB, durante la pubertad.

En este sentido, los machos descendientes de madres expuestas a luz continua durante la gestación mostraron unos niveles de expresión de KISS1 significativamente menores que las controles. Indicando un retraso en el inicio de la pubertad, que deducimos basándonos en estudios previos realizados por otros autores que ponen de manifiesto un claro papel de la Kisspeptina sobre el inicio de la pubertad. Navarro y cols., (2004) encontraron en un estudio en ratas que el número de neuronas Kiss1 en el núcleo AVPV aumenta exponencialmente en el momento de la pubertad. Del mismo modo, estudios realizados en monos, en el momento de la pubertad muestran en los machos unos niveles de expresión hipotalámicos de KISS1 superiores a los encontrados en los individuos más jóvenes (Shahab y cols., 2005). Evidenciando, la estrecha relación entre Kisspeptina y pubertad, siendo este neuropéptido uno de los principales desencadenantes de la pubertad.

A pesar de esta relación bien conocida entre la Kisspeptina y la pubertad, nuestros resultados son novedosos ya que no existe ningún estudio previo que valore la influencia directa de la exposición de la luz sobre la expresión de KISS1 en el testículo y menos aún de la consecuencia de la exposición a luz continua durante la vida intrauterina sobre la expresión de este neuropéptido en testículo en el inicio de la pubertad.

La pubertad es un evento complejo dentro del desarrollo, que implica un conjunto de cambios en el organismo. Es un proceso regulado por señales endógenas y ambientales. Entre estas, podemos destacar las condiciones metabólicas y la cantidad de reservas energéticas presentes en el organismo, siendo estas esenciales en la sincronización de la pubertad (Pinilla y cols., 2012).

En nuestro caso, tratamos de relacionar los niveles testiculares de KISS1 con el peso corporal y encontramos que la exposición a luz continua durante la gestación conlleva a un menor peso corporal de los descendientes machos al nacer. Esto ocasiona, probablemente, insuficiencia en el metabolismo energético de dichos animales. Pudiendo ser una de las causas implicadas en el retraso de la pubertad, deducido por la baja expresión en el testículo de KISS1 en este grupo.

Las neuronas Kiss1 son sensibles al estado metabólico del organismo, debido a su estrecha relación con la leptina, proteína secretada principalmente por las células de la grasa. La cual ejerce su acción reguladora sobre la ingesta de alimentos y el metabolismo. Además se considera como el inductor metabólico de la pubertad (Castellano y cols., 2005).

Un balance energético negativo induce a la supresión del sistema KISS1/KISS1R, lo que conlleva al retraso de la pubertad (Sánchez-Garrido y Tena-Sempere, 2013). Estos estudios y nuestros resultados, nos hacen pensar que el bajo peso corporal al nacer de los machos cuyas madres han estado expuestas a luz continua durante la noche, se correlaciona con un balance energético negativo que afecta a la expresión de KISS1 sufriendo en consecuencia, una alteración en el inicio de la pubertad.

Si tenemos en cuenta el papel que desempeña el sistema circadiano sobre el metabolismo (Reiter y cols., 2011) y este a su vez, a través de la leptina regulando el sistema KISS1/KISS1R en su capacidad para inducir el momento de la pubertad, se puede pensar que la influencia del sistema circadiano sobre la pubertad puede ser ejercida a través del sistema KISS1/KISS1R.

Si bien, son necesarios más estudios para poder comprender mejor la influencia del sistema circadiano, sobre la pubertad, es probable, que la luz continua recibida durante la vida intrauterina afecte al balance energético de los fetos y este la secreción de leptina de manera rítmica. La cual actuaría sobre las neuronas Kiss1 provocando la secreción de KISS1 y la inducción de la pubertad.

La exposición continua a luz, impide la secreción de melatonina y en consecuencia podría afectar a la expresión de KISS1. Sugiriendo un mecanismo indirecto de la melatonina sobre la regulación del inicio de la pubertad, controlando la transcripción del gen que codifica KISS1 a nivel hipotalámico, y de esta manera inhibiendo la secreción de GnRH.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la capacidad de la melatonina para revertir el efecto de la exposición a luz continua durante el periodo fetal. De hecho, observamos que el tratamiento exógeno con melatonina durante la preñez hace que la descendencia de estas madres muestre una expresión de KISS1 igual a la del grupo control. Aquellos machos, cuyas madres han estado sometidas a luz durante la noche, no presentan los niveles adecuados de melatonina por lo que la expresión de KISS1 en estos descendientes es menor. Esto nos hace pensar que no presenta niveles adecuados para poder desencadenar la pubertad, ocasionando un retraso de la misma. Sin embargo, los descendientes de madres en luz continua que recibieron una dosis diaria de melatonina, muestran valores de KISS1 similares a los controles. Por lo tanto, la melatonina exógena es capaz de ejercer una influencia a largo plazo activando a las neuronas Kiss1 y aumentando la expresión de este neuropéptido, y en consecuencia, la secreción de GnRH que activaría al eje neuroendocrino-reproductor.

Los resultados de la expresión de NKB obtenidos son similares a los de KISS1, parece lógico ya que, ambos neuropéptidos se coexpresan en la misma región del hipotálamo. Concretamente en las neuronas KNDy de la región ARC/infundibular (García-Galiano y cols., 2011). De nuevo observamos una clara influencia de la exposición a luz continua durante toda la gestación sobre los niveles de NKB en el testículo de los machos descendientes de madres del grupo LL. Indicando que este neuropéptido es también importante para el inicio de la pubertad e indicando por otro lado, la importancia de unas buenas condiciones o hábitos de vida respecto al ciclo luz/oscuridad durante la gestación para prevenir futuras complicaciones en el desarrollo puberal de los descendientes.

En 2003, ya se había descrito el papel de la Kisspeptina en la pubertad. Sin embargo, no fue hasta el 2009, cuando se demostró que la NKB también juega un papel crítico para la maduración sexual. Se vio en pacientes hipogonadotrópicos, que presentaban mutaciones en el gen de la NKB y en los genes que codifican su receptor (Topaloglu y cols., 2009).

Estudios de True y cols., (2015) muestran como mutaciones en el gen de la NKB o en su receptor producen un retraso de la pubertad en ratones, debido a su influencia sobre la secreción de GnRH. Este retraso, es mucho más marcado en el caso de las hembras que en los machos.

Aunque el retraso de la pubertad es evidente en aquellos ratones carentes de NKB, este no fue tan grave como en el caso de ratones deficientes en KISS1. Esto sugiere que la NKB actúa a un nivel superior de la Kisspeptina, debido a que el bloqueo del receptor de la Kisspeptina impide la capacidad de NKB para estimular la liberación de GnRH (Ramaswamy y cols., 2011). Nuestros resultados corroboran estos datos, ya que encontramos que los niveles de expresión de NKB son menores que los de KISS1. Por otro lado, de nuevo encontramos la capacidad de la melatonina para revertir el efecto de la cronodisrupción durante la vida fetal, ya que los descendientes de estas madres presentan niveles de NKB incluso superiores a los del grupo control.

Respecto a las hembras descendientes el estudio fue más limitado, ya que solo disponemos de información respecto a un sencillo indicador del inicio de la pubertad como es la AV y el peso corporal. No obstante observamos que aquellas, cuyas madres estuvieron expuestas a luz continua durante la gestación mostraron un retraso en la pubertad deducido de la edad en la que aparece la AV. En las descendientes del grupo control, la edad de aparición de la AV fue de 35, 2 días coincidiendo con la esperada según Ojeda y cols., (1986), alrededor del día 35 de vida postnatal. Mientras que en las descendientes de madres expuestas a luz continua fue de 38 días.

La exposición a luz durante la noche o alargar las horas de exposición a luz al final del día genera cronodisrupción. Hoy en día se sabe, que en nuestra sociedad la cronodisrupción se produce principalmente por la exposición de la luz durante la noche, provocando así una alteración de los ritmos circadianos (Garaulet y Gómez-Abellán, 2013).

Al estar expuestos a luz durante la noche, se produce un descenso de los niveles de melatonina. Una vez iniciada la fase oscura, se produce una cascada de señalización que promueve la síntesis de AANAT. Dicho enzima solo se sintetiza durante la noche, y como consecuencia también la propia hormona. Al estar expuestos a luz durante la noche las células ganglionares de la retina reciben información inadecuada, interpretando que es de día, cuando es de noche. Se altera así el reloj principal o NSQ, y se desincronizan, a su vez, los relojes secundarios (Reiter y cols., 2011).

Los ritmos circadianos, no se establecen durante el periodo fetal, sino en el desarrollo postnatal, a lo largo de la infancia y por lo tanto, durante el periodo intrauterino o desarrollo fetal, la información fotoperiódica y en consecuencia la ritmicidad circadiana, se recibe a través de la placenta. Es decir, la ritmicidad del feto es

un reflejo de la ritmicidad de la madre y por lo tanto cualquier factor que genere cronodisrupción en la madre, la generará en el feto (Reppert y Weaver, 1995).

La cronodisrupción produce alteraciones a nivel reproductivo, ocasionando problemas fisiológicos durante la edad adulta. Una de las alteraciones que se produce en la descendencia debido a la exposición a luz durante la noche es la relacionada con la pubertad y el momento de su inicio (Reiter y cols., 2011). Esto se refleja, por ejemplo, en el estudio de Smith y Spencer (2012), donde las condiciones a las que se ven expuestas las madres durante la gestación pueden conducir a una alteración en el momento de inicio de la pubertad de los descendientes. Estudios previos de Waldhauser y cols., (1991), mostraron que las alteraciones en el ritmo de melatonina afectan al momento de inicio de la pubertad, pudiendo producir un adelanto o un retraso de esta. Nuestros resultados coinciden con los de Silman y cols., (1979), aportando de nuevo una vinculación entre el inicio de la pubertad y la melatonina, ya que la carencia de dicha hormona debida a la exposición de luz durante la noche, parece estar relacionada con este retraso.

El tratamiento diario con melatonina durante la preñez revierte en las hembras descendientes el efecto producido por la exposición continua a luz, ya que la edad a la que se presentó la AV es similar a la observada en el grupo control. Corroborando resultados similares hallados previamente, en los que se observó que el tratamiento con melatonina durante la preñez a madres pinealectomizadas provocaron un adelanto de la pubertad respecto a las descendientes de madres pinealectomizadas que no recibieron melatonina exógena (Colmenero y cols., 1994). La melatonina es el principal cronobiótico que sincroniza al reloj biológico, informando si es de día o de noche para mantener el llamado orden temporal interno. Como hemos mencionado anteriormente, la exposición continua a luz impide la síntesis de esta hormona y genera una alteración en el funcionamiento del reloj interno y en consecuencia en el de la descendencia.

Respecto al peso de las descendientes, nuestros resultados indican que la exposición a luz continua durante la gestación conduce a un menor peso de las descendientes al nacer, esto se corresponde con lo encontrado por otros autores quienes determinan que aquellas madres que están sometidas a luz durante la gestación tienen crías de menor peso, un menor número de crías por camada así como un mayor número de crías muertas al nacer (Amaral y cols., 2014). La melatonina administrada a las madres expuestas a luz continua durante la gestación hace que el peso de los

descendientes al nacer se normalice y alcance valores similares a los del grupo control. Dicha normalización fue descrita por Singh y cols., (2013), en dicho estudio no encontraron diferencias significativas en los pesos de las crías al nacer de los grupos control y las madres tratadas con melatonina.

Este menor peso en las descendientes, igual que sugerimos en el caso de los machos, hace que el metabolismo energético de estos animales sea insuficiente, debido a que los niveles de melatonina circulante no son los adecuados para que se produzca en el organismo un metabolismo energético eficiente. Y como consecuencia, se produce también un retraso de la pubertad.

En resumen, los resultados de este estudio, arrojan más información sobre la previamente conocida influencia de la cronodisrupción o alteración del ritmo diario de melatonina sobre la reproducción. Quedando demostrado como la exposición a luz de madres gestantes durante la noche, afecta al feto y en consecuencia al desarrollo postnatal de los descendientes y concretamente al momento del inicio de la pubertad, viéndose esto tras el análisis de la expresión proteica de dos neuropéptidos relacionados directamente con el inicio de la misma. Y como la melatonina es capaz de revertir estos efectos. La influencia de la cronodisrupción sobre los dos neuropéptidos a estudio sobre el testículo en la pubertad, no se había demostrado anteriormente.

## CONCLUSIONES

- 1) La cronodisrupción durante la vida intrauterina, altera la expresión de los neuropéptidos Kisspeptina y NKB en el testículo durante la pubertad.
- 2) La exposición a luz continua durante la vida intrauterina, conlleva en las hembras a un retraso en el inicio de la AV.
- 3) La exposición a luz continua durante la vida intrauterina afecta la evolución del peso corporal en la descendencia.
- 4) El tratamiento con melatonina revierte el efecto de la cronodisrupción por la exposición a luz continua.

## BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Roblero, R., Guadarrama, P., Mercado, C. et al., 2004. El Núcleo Supraquiasmático y la Glándula Pineal en la Regulación de los Ritmos Circadianos en Roedores. *Temas Selectos de Neurociencias III*, pp.321–330.

Almeida, T.A., Rojo, J., Nieto, P.M. et al., 2004. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity Relationships. *Current Medical Chemistry*, 11(15), pp. 2045–2081.

Alonso-Vale, M.I.C., Andreotti, S., Yuri-Mukai, P. et al., 2008. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. *Journal of Pineal Research*, 45(4), pp.422–429.

Amaral, F.G., Castrucci, A.M., Cipolla-Neto, J. et al., 2014. Environmental Control of Biological Rhythms: Effects on Development, Fertility and Metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(9), pp.603-612

Archer, S.N., Laing, E.E., Möller-Levet, C.S. et al., 2014. Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), pp.E682–E691.

Arendt, J. & Skene, D.J., 2005. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1), pp.25–39.

Ariznavarreta, C., Villanúa, M.A., Cardinali, D.P. et al., 2002. Ritmos Biológicos. En: El espectro bipolar. Palomo, T., Beninger, R.J., Jiménez-Arriero, M.A. & Huertas, E. (eds.), pp. 211-240. Editorial CYM, Madrid.

Bellavia, S. L., Carpentieri, A.R., Vaqué, A.M. et al., 2006. Pup circadian rhythm entrainment: effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiology & Behavior*, 89 (3), pp. 342–349.

Beltramo, M., Dardente, H., Cayla, X. et al., 2014. Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), pp.387–399.

Boden, M.J. & Kennaway, D.J., 2006. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction*, 132(3), pp.379–392.

Borjigin, J., Zhang, L.S. & Calinescu, A.A., 2012. Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349(1), pp.13–19.

Calé, J., Zalazar, M.C. & Faraj, G., 2011. Kisspeptinas : las protagonistas del eje gonadal. *Saegre*, XVIII(3), pp.5–12.

Cardinali, D.P., Jordá, M.P. & Sánchez-Barceló, E.J., 1994. Introducción a la cronobiología: Fisiología de los ritmos biológicos. Universidad de Cantabria. Caja Cantabria.

Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R. et al., 2005. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*, 146(9), pp.3917–3925.

Ceinos, R.M., Chansard, M., Revel, F. et al., 2004. Analysis of adrenergic regulation of melatonin synthesis in Siberian hamster pineal emphasizes the role of HIOMT. *NeuroSignals*, 13(6), pp.308–317.

Cetkovic, A., Miljic, D., Ljubic, A. et al., 2012. Plasma kisspeptin levels in pregnancies with diabetes and hypertensive disease as a potential marker of placental dysfunction and adverse perinatal outcome. *Endocrine Research*, 37(2), pp.78-88

Chattoraj, A., Liu, T., Zhang, L.S. et al., 2009. Melatonin formation in mammals: In vivo perspectives. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorder*, 10(4), pp.237-43.

Chuffa, L.G.A., Amorin, J.P.A., Teixeira, G.R. et al., 2011. Long-term melatonin treatment reduces ovarian mass and enhances tissue antioxidant defenses during ovulation in the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(3), pp.217–223.

Cipolla-Neto, J., Amaral, F.G., Afeche, S.C. et al., 2014. Melatonin, energy metabolism, and obesity: A review. *Journal of Pineal Research*, 56(4), pp.371–381.

Clarke, H., Dhillon, W.S., Jayasena, C.N. et al., 2015. Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)*, 30(2), pp.124–41.

Collin, J.P. & Voisin, P., 1989. Pineal transducers in the course of evolution: Molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. *Archives of Histology and Cytology*, 52, pp. 441-9.

Colmenero, M.D., Diaz, B., Moreno, M.L. et al., 1994. Effect of Continuous Light and Melatonin on the Sexual Maturation of the Female Rat. *Revista Española de Fisiología*. 50 (3), pp. 193-94.

De Croft, S., Boehm, U. & Herbison, A.E. et al., 2013. Neurokinin b activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse. *Endocrinology*, 154(8), pp.2750–2760.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C. et al., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), pp.10972–6.

Delgado-Salgado, R.C., Fuentes -Pardo, B. & Escobar-Briones, C. et al., 2009. La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta. *Salud Mental*, 32(1), pp.69–76.

Domínguez-Rodríguez, A., Samimi-Fard, S., Abreu-Gonzalez, P. et al., 2009. Melatonina y aterosclerosis coronaria. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*, 21(5), pp.247–256.

Dominoni, D.M., Goymann, W., Helm, B. et al., 2013. Urban-like night illumination reduces melatonin release in European blackbirds (*Turdus merula*): implications of city life for biological time-keeping of songbirds. *Frontiers in zoology*, 10(1), pp.60.

Dubocovich, M.L., Rivera-Bermudez, M.A., Gerdin, M.J. et al., 2003. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Frontiers in Bioscience*, 8, pp. 1093-1108.

Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R. et al., 1994. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13), pp.6133–7.

Erspamer, V., 1981. The tachykinin peptide family. *Trends Neuroscience*, 4, pp. 267-269

Fonken, L.K. & Nelson, R.J., 2011. Illuminating the deleterious effects of light at night. *F1000 medicine reports*, 3(September), p.18.

Fuentes-Arderiu., 1998. Bioquímica clínica y patología molecular II. Editorial Reverte.

Garaulet, M. & Gómez-Abellán, P., 2013. «Chronobiology and Obesity». *Nutrición Hospitalaria* 28 Suppl 5 (septiembre), pp.114-20

García-Galiano, D., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M., 2011. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: Developmental roles and major regulatory actions. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(1), pp.22–33.

García-Fernández, J.M.,1998. Los ritmos biológicos y sus fundamentos neurales. En: Manual de Neurociencia. Delgado-García, J.M., Ferrús ,A., Mora,F. & Rubia,F. (eds.), pp. 778-799. Síntesis, Madrid.

García-Maldonado, G., Sánchez-Juárez, I.G., Martínez-Salazar, G.I. et al., 2011. Cronobiología : Correlatos básicos y médicos. *Revista Medica del Hospital General de Mexico*, 74(2), pp.108–114.

Gianetti, E. & Seminara, S., 2010. Kisspeptin and KISS1R: a critical pathway in the reproductive system. *Reproduction*, 136(3), pp.295–301.

Gómez-Abellán, P., Madrid, J.A., Ordovás, J.M. et al., 2012. Aspectos cronobiológicos de la obesidad y el síndrome metabólico. *Endocrinología y nutrición : órgano de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición*, 59(1), pp.50–61.

Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T. et al., 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*, 148 (12), pp. 5752–5760.

Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T. et al., 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145(9), pp.4073–4077.

Gottsch, M.L., Clifton, D.K. & Steiner, R.A., 2009. From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, 30(1), pp.4–9.

Grace, R.C.R., Chandrashekar, I.R. & Cowsik, S.M., 2003. Solution structure of the tachykinin peptide eledoisin. *Biophysical journal*, 84(1), pp.655–64.

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

Horikoshi, Y., Matsumoto, H., Takatsu, Y. et al., 2003. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: Metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(2), pp.914–919.

Hrabovszky, E., Ciofi, P., Vida, B. et al., 2010. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *European Journal of Neuroscience*, 31(11), pp.1984–98

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

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

Janneau, J.L., Maldonado-Estrada, J., Tachdjian, G. et al., 2002. Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(11), pp.5336–5339.

Kennaway, D.J., 2005. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update*, 11(1), pp.91–101.

Kim, T.D., Kim, J.S., Kim, J.H. et al., 2005. Rhythmic Serotonin. *Society*, 25(8), pp.3232–3246.

Klein, D.C., 1972. Evidence for the placental transfer of <sup>3</sup>H-acetyl-melatonin. *Nature*, 237, pp. 117–118,

Klein, D.C., 1985. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found. Symp.* 117, pp.38–56.

Klein, D.C., Moore, R.Y., Reppert, S.M. et al., 1991. *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind’s Clock*. Oxford University Press. USA.

Ko, C.H. & Takahashi, J.S., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15(SUPPL. 2), pp.271–277.

Kotani, H., Hoshimaru, M., Nawa, H. et al., 1986. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(18), pp.7074–8.

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A. et al., 2001. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), pp.34631–34636.

Krause, J.E., Chirgwin, J.M., Carter, M.S. et al., 1987. Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(3), pp.881–5.

Krause, J.E., Takeda, Y. & Hershey, A.D., 1992. Structure, functions, and mechanisms of substance P receptor action. *Journal of investigative dermatology*, 98, pp.2S-7S

Lee, J.H., Miele, M. E., Hicks, D. J. et al., 1996. KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-suppressor Gene. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(23), pp.1731–1737.

Lehman, M.N., Coolen, L.M. & Goodman, R. L., 2010. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 151(8), pp. 3479–3489.

Leloup, J.C. & Goldbeter, A., 2003. Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), pp.7051–6.

Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y. et al., 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), pp.2587-2587.

Levitan, R.D., 2007. The chronobiology and neurobiology of winter seasonal affective disorder. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 9(3), pp.315–324.

Li, M.D., Li, C.M. & Wang, Z., 2012. The role of circadian clocks in metabolic disease. *The Yale journal of biology and medicine*, 85(3), pp.387–401.

Madrid, J.A. & de Lama, Á.R., 2006. Cronobiología básica y clínica. Editec@red

McMillen, I. C. & Nowak, R., 1989. Maternal pinealectomy abolishes the diurnal rhythm in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *Journal of Endocrinology*. **120**, pp. 459–464.

Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N. et al., 2012. Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS ONE*, 7(8).

Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D. et al., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), pp.1761–1766.

Møller, M. & Baeres F.M., 2002. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell and Tissue Research*, 309(1), pp.139-50.

Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A. et al., 2001. AXOR12, a Novel Human G Protein-coupled Receptor, Activated by the Peptide KiSS-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), pp.28969–28975.

Murcia- García, J., Muñoz-Hoyos, A., Molina-Carballo, A. et al., 2010. Pubertad y melatonina. *Anales de Pediatría*, 57(2), pp.121–126.

Navara, K.J. & Nelson, R.J., 2007. The dark side of light at night: Physiological, epidemiological, and ecological consequences. *Journal of Pineal Research*, 43(3), pp.215–224.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R. et al., 2004. 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*. 145(10), pp.4565-74.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R. et al., 2005. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 146(4), pp.1689–1697.

Navarro, V.M., 2012. New insights into the control of pulsatile GnRH release: The role of Kiss1/neurokinin B neurons. *Frontiers in Endocrinology*, 3(APR), pp.1–9.

Ojeda, S.R., Urbanski, H.F., Ahmed, C.E., 1986, 'The onset of female puberty: studies in the rat.' *Recent Progress in Hormone Research*, vol 42, pp. 385-442

Ortiz-Tudela, E., Bonmatí-Carrión, M., De la Fuente, M. et al., 2012. La cronodisrupción como causa de envejecimiento. *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia*, 47(4), pp.168–173.

Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Spence, D.W. et al., 2007. Role of the Melatonin System in the Therapeutic Implications, 21(12), pp.995–1018.

Park, D.W., Lee, S.K., Hong, S.R. et al., 2012. Expression of Kisspeptin and its Receptor GPR54 in the First Trimester Trophoblast of Women with Recurrent Pregnancy Loss. *American Journal of Reproductive Immunology*, 67(2), pp.132-9

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C. et al., 2012. Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. *Physiological Reviews*, 92(3), pp.1235–1316.

Pinto, F.M., Cejudo-Román, A., Ravina, C.G. et al., 2012. Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 35 (1), pp.63–73

Prunet-Marcassus, B., Desbazeille, M., Bros, A. et al., 2003. Melatonin Reduces Body Weight Gain in Sprague Dawley Rats with Diet-Induced Obesity. *Endocrinology*, 144(12), pp.5347–5352.

Ramaswamy, S., Seminara, S.B. & Plant, T.M. et al., 2011. Evidence from the agonadal juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) for the view that the action of neurokinin B to trigger gonadotropin-releasing hormone release is upstream from the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology*, 94 (3), pp. 237–245.

Rhie, Y.J., 2013. Kisspeptin/G protein-coupled receptor-54 system as an essential gatekeeper of pubertal development. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*. 1818(2), pp.55–59.

Roa, J., Navarro, V.M. & Tena-Sempere, M., 2011. Kisspeptins in Reproductive Biology: Consensus Knowledge and Recent Developments. *Biology of Reproduction*, 85(4), pp.650–660.

Reiter, R.J., 1991. Pineal Melatonin: Cell Biology of its Synthesis and of its Physiological Interactions. *Endocrine Reviews*, 12(2), pp.151-80

Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C. et al., 2009. Melatonin and reproduction revisited. *Biology of Reproduction*, 81(3), pp.445–56.

Reiter, R.J., Rosales-Corral, S., Coto-Montes, A. et al., 2011. The Photoperiod, Circadian Regulation and Chronodisruption: The Requisite Interplay between the Suprachiasmatic Nuclei and the Pineal and Gut Melatonin. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 62 (3), pp.269-74.

Reiter, R.J., Tan, D.X., Korkmaz, A. et al., 2013. Melatonin and Stable Circadian Rhythms Optimize Maternal, Placental and Fetal Physiology. *Human Reproduction Update*, 20(2), pp. 293-307

Rejendiran, S., Kumari, S., Nimesh, A. et al., 2015. Markers of oxidative stress in pregnant women with sleep disturbances. *Oman Medical Journal*, 30(4), pp.264–269.

Reppert, S.M. & Weaver, D.R., 1995. Melatonin madness. *Cell*, 83, pp.1059-1062.

Reppert, S.M. et al., 1995. Melatonin receptors are for the birds: Molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*, 15(5), pp.1003–1015.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., Cassone, V.W. et al., 1995. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), pp.8734–8.

Reppert, S.M. & Weaver, D.R., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901), pp.935-941.

Rollag, M.D., Berson, D.M. & Provencio, I., 2003. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *Journal of Biological Rhythms*, 18(3), pp.227–34.

Roseboom, P.H., Coon, S.L., Baler, R. et al., 1996. Melatonin Synthesis: Analysis of the More than 150-Fold Nocturnal Increase in Serotonin N-Acetyltransferase Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Pineal Gland. *Endocrinology*, 137 (7), pp. 3033-45.

Sanchez-Garrido, M.A. & Tena-Sempere, M., 2013. Metabolic control of puberty: Roles of leptin and kisspeptins. *Hormones and Behavior*, 64(2), pp. 187-94.

Satake, H., Aoyama, M., Sekiguchi, T. et al., 2013. Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein & Peptide Letters*, 20(6), pp. 615–627.

Sellix, M.T. & Menaker, M., 2010. Circadian clocks in the ovary. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(10), pp.628–636.

Seminara, S.B., Messager, S., Chatzidaki, E.E. et al., 2003. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *New England Journal of Medicine*, 349(17), pp.1614–1627.

Serón-Ferré, M., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L. et al., 2012. Circadian rhythms in the fetus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349(1), pp.68–75.

Serón-Ferré, M., Valenzuela, G.J. & Torres-Farfan, C., 2007. Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 81(3), pp.204–214.

Shahab, M., Mastronardi, C.A., Seminara, S.B. et al., 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 102(6), pp.2129–34.

Silman, R. E., Leone, R.M., Hooper, R.J. et al., 1979. Melatonin, the Pineal Gland and Human Puberty. *Nature*, 282 (5736), pp.301–3.

Silveira, L.G., Noel, S.D., Silveira-Neto, A.P. et al., 2010. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(5), pp.2276–2280.

Singh, H.J., Saleh, H.I., Gupalo, S. et al., 2013. Effect of Melatonin Supplementation on Pregnancy Outcome in Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley Rats. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 65 (2), pp.149–57.

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

Slominski, R.M., Reiter, R.J., Schlabritz-Loutsevitch, N. et al., 2012. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351(2), pp.152–166.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T. et al., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), pp. 76-85.

Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F. et al., 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of female mouse. *Endocrinology*, 146(9), pp.3686-3692

Smith, J.T. & Spencer, S.J., 2012. Prewaning over- and Underfeeding Alters Onset of Puberty in the Rat without Affecting Kisspeptin. *Biology of Reproduction*, 86 (5), pp. 1-8.

Tamura, H., Nakamura, Y., Terron, M.P. et al., 2008. Melatonin and pregnancy in the Human. *Reproductive Toxicology*, 25(3), pp.291-303.

Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T. et al., 2014. Melatonin and Female Reproduction. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(1), pp.1-11.

Tena-Sempere, M., 2006. GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human Reproduction Update*, 12(5), pp.631–639.

Tng, E., 2015. Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Medical Journal*, 56(12), pp.649–656.

Topaloglu, A.K., Reimann, F., Guclu, M. et al., 2009. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nature Genetics*, 41(3), pp. 354–358.

Topaloglu, A.K., 2010. Neurokinin B signaling in puberty: human and animal studies. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324, pp. 64–69.

Torres-Farfan, C., Rocco, H., Monsó, C. et al., 2006. Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus. *Endocrinology*, 147 (10), pp. 4618–4626.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 76(9), pp. 4350-4.

True, C., Alam, N., Cox, K. et al., 2015. Neurokinin B is critical for normal timing of sexual Maturation but dispensable for adult reproductive function in female mice. *Endocrinology*, 154 (6), pp. 1386-1397.

Viswambharan, H., Carvas, J.M., Antic, V. et al., 2007. Mutation of the circadian clock gene *Per2* alters vascular endothelial function. *Circulation*, 115(16), pp.2188–2195.

Voigt, R.M., Forsyth, C.B. & Keshavarzian, A. et al., 2013. Circadian Disruption. *Alcohol Research : Current Reviews*, 35(1), pp.87–96.

Waldhauser, F., Boepple, P.A., Schemper, M. et al., 1991. Serum Melatonin in Central Precocious Puberty Is Lower than in Age-Matched Prepubertal Children». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73 (4), pp. 793-96.

Weaver, D.R. & Reppert, S.M., 1986. Maternal melatonin communicates daylength to the fetus in Djungarian hamsters. *Endocrinology*, 119(6), pp.2861-3.

Wilkinson, M., Arendt, J., Bradtke, J. et al., 1977. Determination of a Dark-Induced Increase of Pineal N-Acetyl Transferase Activity and Simultaneous Radioimmunoassay of Melatonin in Pineal, Serum and Pituitary Tissue of the Male Rat. *The Journal of Endocrinology*, 72 (2), pp. 243-44.

Zawilska, J.B., Skene, D.J. & Arendt, J., 2009. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacological Reports*, 61(3), pp.383–410.