



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires

TESIS DOCTORAL

**ACCIÓN DEL FOTOPERÍODO SOBRE LA MODULACIÓN DEL
EJE REPRODUCTIVO EN LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS
DE SUDAMÉRICA (*Lagostomus maximus*)**

AUTOR

Lic. Santiago Elías Charif

DIRECTORA

Dra. Verónica Berta Dorfman

CO-DIRECTOR

Dr. Alfredo Daniel Vitullo

LUGAR DE DESARROLLO

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos,
Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD) - Universidad
Maimónides

Ciudad Autónoma de Buenos Aires - **Noviembre 2017**

Agradecimientos

- *A mis padres, Claudia e Ismael, y a Alba. Ellos son la fuerza y la razón de mi vida. Les agradezco el haberme enseñado a trabajar duro, a ser honesto, ético y solidario, y a luchar por lo que deseo.*
- *Al Dr. Edgar Kornisiuk, por alimentar mi vocación docente e introducirme en las neurociencias. Agradezco su buena voluntad y predisposición en todas las ocasiones a las que acudí a él.*
- *A la Dra. Candela González, por haberme enseñado la técnica de PCR Cuantitativa, por su infinita generosidad y por su amistad.*
- *A la Dra. Verónica Dorfman por haberme dado una vez más la oportunidad de trabajar en su equipo, por su compromiso diario, la paciencia invaluable y la libertad de trabajo.*
- *Al Dr. Alfredo Vitullo por su continua buena predisposición, por permitirme ser parte del CEBBAD y así desarrollar esta Tesis Doctoral.*
- *Al CONICET por haberme otorgado la beca que me permitió desarrollar esta Tesis Doctoral.*
- *A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires y a la Escuela de Graduados "Dr. Ernesto G. Capaul" por permitirme realizar el doctorado y por la amabilidad a la hora de resolver dudas.*
- *Al IByME, especialmente a las Dras. Victoria Lux-Lantos, Noelia Di Giorgio, Silvia Bianchi y Marina Fernandez, así como a todo su equipo, por haberme permitido realizar la técnica de radioinmunoensayo. Les agradezco su paciencia, preocupación y generosidad.*
- *A la Universidad Maimónides y a la Fundación Científica Felipe Fiorellino por la formación académica, el espacio, los recursos y el apoyo brindados para poder desarrollar este trabajo.*
- *A los integrantes del CEBBAD, con especial mención a Pablo, Alejandra, Constanza, Mariela, Nicolás, Noelia, Laura, al Laboratorio de Antropología Biológica, al Laboratorio de Señalización en Melanoma, al Laboratorio de Aptámeros y al Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción (donde se realizó este trabajo).*
- *Al CIDME, en especial a Sergio Ferraris y Fernando Lange por su colaboración.*
- *A Grisel Clausi Schettini, Sol Clausi y Santiago Cicculi por su apoyo técnico.*
- *Al ECAS y al Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires por su colaboración.*
- *A Gastón y Gerónimo, partícipes esenciales de este trabajo y amigos incondicionales.*
- *A mis amigos de siempre (Emanuel, Paula, Dalia) y a los que me dio el CEBBAD (Andrea, Belén, Ivonne, Valeria, Victoria, Vanina, Sofía, Clara, Alejandro, Santiago) por la diversión diaria, por su incondicionalidad y por motivarme.*

MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|---------|
| 1. ABREVIATURAS | pág. 19 |
| 2. RESÚMENES | pág. 13 |
| 2.1 RESUMEN EN ESPAÑOL | pág. 14 |
| 2.2 RESUMEN EN INGLÉS | pág. 16 |
| 3. INTRODUCCIÓN | pág. 18 |
| 3.1 EL EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIO-GONADAL (H.H.G.) | pág. 19 |
| 3.1.1 El hipotálamo y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) | pág. 20 |
| 3.1.2 La hipófisis y las gonadotropinas | pág. 25 |
| 3.1.3 El ovario y los esteroides sexuales | pág. 26 |
| a. Fase folicular del ciclo reproductor femenino | pág. 27 |
| b. Fase lútea del ciclo reproductor femenino | pág. 29 |
| 3.1.4 Retroalimentación hormonal ovárica sobre hipotálamo e hipófisis | pág. 30 |
| 3.2 EL FOTOPERÍODO AMBIENTAL Y LA MELATONINA | pág. 33 |
| 3.2.1 Síntesis de melatonina | pág. 35 |
| 3.2.2 Los receptores de melatonina | pág. 36 |
| 3.3 EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: UN RELOJ CIRCADIANO CENTRAL | pág. 38 |
| 3.3.1 El núcleo supraquiasmático y el control de la reproducción | pág. 39 |
| 3.4 EL MODELO DE ESTUDIO: LA VIZCACHA. | pág. 40 |
| 4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS | pág. 43 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | pág. 45 |
| 5.1 ÉTICA | pág. 46 |
| 5.2 CAPTURA Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES | pág. 46 |
| 5.3 ANESTESIA, EUTANASIA Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS | pág. 47 |
| 5.3.1 Criterios de disección de los órganos | pág. 47 |
| 5.4 ENFOQUES EXPERIMENTALES | pág. 48 |
| 5.4.1 Primer enfoque experimental: Disponibilidad lumínica y modulación del eje H.H.G. | pág. 48 |
| 5.4.2 Segundo enfoque: Modulación de GnRH por melatonina | pág. 49 |
| 5.4.3 Tercer enfoque: Modulación de GnRH por interacción de melatonina con E ₂ | pág. 49 |
| 5.5 TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y DE ANÁLISIS | pág. 50 |
| 5.5.1 Sincronización del ciclo estral de la vizcacha | pág. 50 |
| 5.5.2 Estudios del ARNm | pág. 51 |
| 5.5.2.1 Extracción y cuantificación de ARN | pág. 51 |
| 5.5.2.2 Síntesis de ADNc | pág. 51 |
| 5.5.2.3 Diseño de primers | pág. 52 |

| | | |
|------------|---|---------|
| 5.5.2.4 | <i>Secuenciación del ARNm de la prepro-hormona liberadora de gonadotrofinas (prepro-GnRH)</i> | pág. 53 |
| 5.5.2.5 | <i>PCR cuantitativa (Real Time PCR)</i> | pág. 54 |
| 5.5.3 | Western blot | pág. 56 |
| 5.5.3.1 | <i>Extracción y cuantificación de proteínas</i> | pág. 56 |
| 5.5.3.2 | <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) e inmunodetección de proteínas</i> | pág. 56 |
| 5.5.4 | Determinación de niveles séricos de 17 β -estradiol, progesterona, melatonina y cortisol | pág. 57 |
| 5.5.5 | Ensayo de pulsatilidad de GnRH en explantos de hipotálamo | pág. 57 |
| 5.5.6 | Ensayo de pulsatilidad de LH en explantos de hipófisis. | pág. 60 |
| 5.5.7 | Radioinmunoensayo (RIA) | pág. 60 |
| 5.5.8.1 | <i>Extracción de proteínas</i> | pág. 60 |
| 5.5.8.2 | <i>Determinación de GnRH</i> | pág. 61 |
| 5.5.8.3 | <i>Determinación de LH sérica</i> | pág. 62 |
| 5.5.8 | Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia con microscopía confocal. | pág. 62 |
| 5.5.9.1 | <i>Procesamiento de los tejidos</i> | pág. 63 |
| 5.5.9.2 | <i>Inmunohistoquímica</i> | pág. 63 |
| 5.5.9.3 | <i>Inmunofluorescencia con microscopía confocal</i> | pág. 63 |
| 5.5.8.4 | <i>Cuantificación de folículos antrales y cuerpos lúteos</i> | pág. 64 |
| 5.5.9 | Análisis de imágenes | pág. 65 |
| 5.5.10 | Análisis estadístico | pág. 65 |
| 6. | RESULTADOS | pág. 66 |
| 6.1 | SECUENCIACIÓN DE LA PREPRO-HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (PREPRO-GnRH) DEL HIPOTÁLAMO DE <i>L. maximus</i> | pág. 67 |
| 6.2 | PRIMER ENFOQUE EXPERIMENTAL: DISPONIBILIDAD LUMÍNICA Y MODULACIÓN DEL EJE H.H.G. | pág. 71 |
| 6.2.1 | Descripción, localización y variaciones de los componentes del sistema melatoninérgico central a lo largo del ciclo reproductivo de la vizcacha | pág. 71 |
| 6.2.1.1 | <i>Inmunolocalización de AANAT en la glándula pineal de la vizcacha</i> | pág. 71 |
| 6.2.1.2 | <i>Expresión de AANAT en la glándula pineal a lo largo del ciclo reproductivo de la vizcacha</i> | pág. 74 |
| 6.2.1.3 | <i>Inmunolocalización de MT₁ y MT₂ y estudio de la co-localización con GnRH en el hipotálamo de la vizcacha</i> | pág. 74 |

| | |
|---|----------|
| 6.2.1.4 <i>Expresión de MT₁ y MT₂ en el hipotálamo a lo largo del ciclo reproductivo de la vizcacha</i> | pág. 79 |
| 6.2.2 Efecto del fotoperíodo sobre el eje reproductivo en hembras no preñadas no ovulando | pág. 80 |
| 6.2.3 Efecto del fotoperíodo sobre el eje reproductivo en hembras no preñadas con inducción de la ovulación | pág. 84 |
| 6.3 MODULACIÓN DE GnRH Y DE LH POR MELATONINA | |
| 6.3.1 Efecto de la melatonina sobre la pulsatilidad de GnRH en explantos de hipotálamo | pág. 89 |
| 6.3.2 Efecto de la melatonina sobre la pulsatilidad de LH en la hipófisis | pág. 92 |
| 6.4 MODULACIÓN DE GnRH POR INTERACCIÓN DE MELATONINA CON E₂ | pág. 93 |
| 6.4.1 Efecto del neuroestradiol sobre la pulsatilidad de GnRH | pág. 93 |
| 6.4.2 Efecto del neuroestradiol en presencia de la melatonina sobre la pulsatilidad de GnRH | pág. 95 |
| 6.4.3 Efecto combinatorio de la melatonina y el estradiol sobre GnRH, y estudio de su vía de acción | pág. 97 |
| 7. DISCUSIÓN | pág. 101 |
| 7.1 EL ARNm DE LA PREPRO-HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS HIPOTALÁMICA (PREPRO-GnRH) DE <i>L. maximus</i> | pág. 102 |
| 7.2 EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA MELATONINÉRGICO A LO LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO DE <i>L. maximus</i> | pág. 103 |
| 7.3 LA MELATONINA Y SU EFECTO SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH Y LH EN <i>L. maximus</i> | pág. 108 |
| 7.4 EL NEUROESTRADIOL Y LA MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GnRH EN <i>L. maximus</i> | pág. 109 |
| 7.5 EFECTO DEL NEUROESTRADIOL EN PRESENCIA DE MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH EN <i>L. maximus</i> | pág. 110 |
| 7.6 EFECTO DEL ESTRADIOL SISTÉMICO SOBRE LA ACCIÓN DE LA MELATONINA Y SU RELACIÓN CON LA SECRECIÓN DE GnRH EN <i>L. maximus</i> | pág. 111 |
| 7.7 LA DISPONIBILIDAD LUMÍNICA Y LA ACTIVIDAD DEL EJE H.H.G. EN <i>L. maximus</i> | pág. 112 |
| 8. CONCLUSIONES | pág. 116 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | pág. 119 |
| 10. ANEXO | pág. 159 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|---------|
| FIGURA 1. EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIO-GONADAL | pág. 19 |
| FIGURA 2. REGIONES CEREBRALES Y NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS | pág. 21 |
| FIGURA 3. CICLOS HORMONALES EN EL HUMANO Y LOS ROEDORES | pág. 28 |
| FIGURA 4. ESTADÍOS DE LA FOLICULOGÉNESIS | pág. 30 |
| FIGURA 5. VÍA DE ACCIÓN DEL ESTÍMULO LUMÍNICO | pág. 34 |
| FIGURA 6. ETAPAS DE LA SÍNTESIS DE LA MELATONINA | pág. 36 |
| FIGURA 7. HEMBRA ADULTA DE VIZCACHA (<i>Lagostomus maximus</i>) | pág. 41 |
| FIGURA 8. CARACTERÍSTICAS DEL OVARIO DE <i>L. maximus</i> | pág. 64 |
| FIGURA 9. AMPLIFICACIÓN DE GnRH | pág. 68 |
| FIGURA 10. SECUENCIA DEL ARNm DE LA GnRH HIPOTALÁMICA DE <i>L. maximus</i> | pág. 69 |
| FIGURA 11. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DEL ARNm DE LA GnRH DE <i>L. maximus</i> | pág. 70 |
| FIGURA 12. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA DE LA GLÁNDULA PINEAL DE <i>L. maximus</i> | pág. 72 |
| FIGURA 13. INMUNOLocalIZACIÓN DE AANAT EN LA GLÁNDULA PINEAL DE LA VIZCACHA | pág. 73 |
| FIGURA 14. EXPRESIÓN DE AANAT Y NIVELES SÉRICOS DE MELATONINA A LO LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO DE LA VIZCACHA | pág. 74 |
| FIGURA 15. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA DEL HIPOTÁLAMO DE <i>L. maximus</i> | pág. 75 |
| FIGURA 16. CO-LOCALIZACIÓN DE GnRH Y MT ₁ EN EL HIPOTÁLAMO DE <i>L. maximus</i> | pág. 77 |
| FIGURA 17. CO-LOCALIZACIÓN DE GnRH Y MT ₂ EN EL HIPOTÁLAMO DE <i>L. maximus</i> | pág. 78 |
| FIGURA 18. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA HIPOTALÁMICOS A LO LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO DE LA VIZCACHA | pág. 78 |
| FIGURA 19. EXPRESIÓN DE AANAT EN LA GLÁNDULA PINEAL EN VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | pág. 80 |
| FIGURA 20. EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE GnRH, MT ₁ Y MT ₂ EN VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | pág. 81 |

| | |
|---|----------------|
| FIGURA 21. EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE RE α Y RE β EN VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | <i>pág. 82</i> |
| FIGURA 22. EXPRESIÓN ADENOHIPOFISARIA DE MT ₁ Y MT ₂ Y NIVELES SÉRICOS DE LH EN VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | <i>pág. 83</i> |
| FIGURA 23. VARIACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y DEL SISTEMA MELATONINÉRGICO EN EL OVARIO DE VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | <i>pág. 84</i> |
| FIGURA 24. EXPRESIÓN DE AANAT EN LA GLÁNDULA PINEAL EN VIZCACHAS NP _i EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | <i>pág. 85</i> |
| FIGURA 25. EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE GnRH, MT ₁ Y MT ₂ EN VIZCACHAS NP _i EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | <i>pág. 86</i> |
| FIGURA 26. EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE RE α Y RE β EN VIZCACHAS NP _i EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | <i>pág. 87</i> |
| FIGURA 27. EXPRESIÓN ADENOHIPOFISARIA DE MT ₁ Y MT ₂ Y NIVELES SÉRICOS DE LH EN VIZCACHAS NP _i EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | <i>pág. 87</i> |
| FIGURA 28. VARIACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y DEL SISTEMA MELATONINÉRGICO EN EL OVARIO DE VIZCACHAS NP _i EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | <i>pág. 88</i> |
| FIGURA 29. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE GnRH HIPOTALÁMICA EN VIZCACHAS NPNO | <i>pág. 88</i> |
| FIGURA 30. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE GnRH HIPOTALÁMICA EN VIZCACHAS NP _i | <i>pág. 91</i> |
| FIGURA 31. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE LH HIPOTALÁMICA EN VIZCACHAS NPNO | <i>pág. 92</i> |
| FIGURA 32. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE LH HIPOFISARIA EN VIZCACHAS NP _i | <i>pág. 93</i> |
| FIGURA 33. MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GnRH POR NEUROESTRADIOL | <i>pág. 94</i> |
| FIGURA 34. EFECTO DE LA MELATONINA EN PRESENCIA DEL NEUROESTRADIOL SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH | <i>pág. 96</i> |
| FIGURA 35. EFECTO DE LA MELATONINA Y EL ESTRADIOL SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH | <i>pág. 98</i> |

| | |
|--|-----------------|
| FIGURA 36. EFECTO DE LA VÍA DE ACCIÓN DEL ESTRADIOL EN PRESENCIA DE MELATONINA, SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH | <i>pág. 100</i> |
| FIGURA 37. NIVELES SÉRICOS DE CORTISOL EN VIZCACHAS NPNO Y NP _i EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS | <i>pág. 161</i> |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------------|
| TABLA 1. UBICACIÓN NEUROANATÓMICA Y ESTRUCTURA DE GnRH EN VERTEBRADOS | <i>pág. 23</i> |
| TABLA 2. PRIMERS EMPLEADOS EN PCR CUANTITATIVA | <i>pág. 55</i> |
| TABLA 3. ANTICUERPOS PRIMARIOS EMPLEADOS | <i>pág. 57</i> |
| TABLA 4. ANTICUERPOS SECUNDARIOS EMPLEADOS | <i>pág. 57</i> |
| TABLA 5. DROGAS UTILIZADAS PARA LOS ENSAYOS DE PULSATILIDAD DE GnRH Y LH | <i>pág. 59</i> |
| TABLA 6. PORCENTAJE DE HOMOLOGÍA DEL ARNM DE GnRH DE <i>L. maximus</i> CON OTRAS ESPECIES | <i>pág. 71</i> |
| TABLA 7. SECUENCIA Y HOMOLOGÍA DE LOS AMPLICONES DE PCR | <i>pág. 160</i> |
| TABLA 8. REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS | <i>pág. 161</i> |

ABREVIATURAS

1

- %:** Porcentaje.
- °C:** Grado centígrado.
- μl:** Microlitro.
- μm:** Micrómetro.
- μM:** Micromolar.
- ¹²⁵I:** Isótopo radioactivo yodo 125.
- A:** Adenina.
- AACD:** L-aminoácido aromático decarboxilasa.
- AANAT:** Arilalquilamina N-acetiltransferasa.
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc:** Ácido desoxirribonucleico copia.
- AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico.
- ANOVA:** Análisis de varianza.
- APO:** Área preóptica del hipotálamo.
- ARC:** Núcleo arqueado del hipotálamo.
- Arg:** Arginina
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- ARNr:** Ácido ribonucleico ribosomal.
- Asn:** Asparagina
- Asp:** Aspartato
- AVPV:** Núcleo anteroventral periventricular.
- BH4:** Tetrahidrobiopterina
- BKR:** Buffer Krebs-Ringer.
- BSA:** Albúmina sérica bovina.
- c.p.m.:** Cuentas por minuto.
- C:** Citosina.
- CCAC:** Consejo Canadiense de Protección de los Animales.
- CEBBAD:** Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico.
- CHO:** Línea celular de ovario de hamster chino.
- CICUAE:** Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación.
- CICUAL:** Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.
- CIDME:** Centro de Investigación y Desarrollo en Medicina Experimental.
- CL:** Cuerpo lúteo.
- CL2:** Cuerpo lúteo secundario.
- cm:** Centímetro.
- CREB:** Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc.
- CTL:** Grupo control.
- D.O.:** Densidad óptica.
- DAB:** 3,3'-diaminobencidina.
- DEPC:** Dietilpirocarbonato.
- dL:** Decilitro.
- dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato.
- DTT:** Ditiotreitól.
- E₂:** 17β-estradiol.
- EA:** Albúmina de Huevo.
- ECAS:** Estación de Cría de Animales Silvestres.
- eCG:** Gonadotropina coriónica equina.
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- EM:** Eminencia media del hipotálamo.
- ERE:** Elemento de respuesta a estrógenos.
- F:** Forward.
- FA:** Folículo antral.
- FAtar:** Folículo antral tardío.
- FAtem:** Folículo antral temprano.
- FSH:** Hormona folículo estimulante.
- G:** Guanina.
- GABA:** Ácido γ-aminobutírico.
- GAP:** Peptido asociado a la hormona liberadora de gonadotropinas.
- GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
- Gln:** Glutamina.
- Glu:** Glutamato.
- Gly:** Glicina.
- GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas.
- H.H.G.:** Hipotalámico-hipofisario-gonadal.

hCG: *Gonadotropina coriónica humana.*

HCl: *Ácido clorhídrico.*

HIOMT: *Hidroxindol O-metiltransferasa.*

His: *Histidina*

HMB: *Hipotálamo medio-basal.*

HRP: *Peroxidasa extraída del rábano.*

IByME: *Instituto de Biología y Medicina Experimental.*

IF: *Inmunofluorescencia.*

IgG: *Inmunoglobulina G.*

IHQ: *Inmunohistoquímica.*

IIIIV: *Tercer ventrículo.*

Ile: *Isoleucina.*

INTA: *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.*

K185: *N-butanoil 2-(5,6,7-trihidro-11-metoxibenzo[c]ciclohept[2,1-a]indol-13-il) etanamina (Antagonista del receptor de melatonina 2).*

KCl: *Cloruro de potasio.*

kDa: *Kilodalton.*

KH₂PO₄: *Fosfato de potasio monobásico.*

Kiss: *Kisspeptina.*

Leu: *Leucina.*

LH: *Hormona luteinizante.*

Lys: *Lisina.*

M: *Molar.*

m³: *Metro cúbico.*

mAmp: *Miliampere.*

Md: *Médula del ovario.*

Met: *Metionina.*

mg: *Miligramo.*

MgCl₂: *Cloruro de magnesio.*

ml: *Mililitro.*

mm³: *Milímetro cúbico.*

MPP: *Metil-piperidino-pirazol (Antagonista del receptor de estrogénos α).*

MT₁: *Receptor de melatonina 1.*

MT₂: *Receptor de melatonina 2.*

MT₃: *Receptor de melatonina 3.*

N: *Normal.*

Na₂HPO₄: *Fosfato disódico.*

NaCl: *Cloruro de sodio.*

NaH₂PO₄: *Fosfato monosódico.*

NaHCO₃: *Bicarbonato de sodio.*

NCBI: *Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos.*

NDM: *Núcleo dorsomedial del hipotálamo.*

ng: *Nanogramos.*

NIH: *Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos.*

nm: *Nanómetro.*

NPeV: *Núcleo periventricular del hipotálamo.*

NPI: *Hembras no preñadas con sincronización del ciclo estral por inducción de la ovulación.*

NPNO: *Hembras no preñadas no ovulantes.*

NPO: *Hembras no preñadas ovulantes.*

nPRE: *Elemento negativo de respuesta a progesterona.*

NPV: *Núcleo paraventricular del hipotálamo.*

NPY: *Neuropéptido Y.*

NSO: *Núcleo supraóptico del hipotálamo.*

NSQ: *Núcleo supraquiasmático del hipotálamo.*

nt: *Nucleótido*

NVM: *Núcleo ventromedial del hipotálamo.*

OSC: *grupo expuesto a oscuridad.*

p/v: *Relación peso sobre volumen.*

P₄: *Progesterona.*

pb: *Pares de bases.*

PBS: *Buffer fosfato salino.*

PCR: *Reacción en cadena de la polimerasa.*

PFA: *Paraformaldehído.*

pg: *Picogramos.*

Phe: Fenilalanina.

PKA: Proteína quinasa A.

PKC: Proteína quinasa C.

PLC: Fosfolipasa C.

PMED: Hembras con preñez media.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PMSG: Gonadotropina de suero de yegua preñada.

PPT: 1,3,5-tris(4-hidroxifenil)-4-propil-1H-pirazol (Agonista del receptor de estrógenos α).

PRA: Receptor de progesterona A.

PRB: Receptor de progesterona B.

Prepro-GnRH: Prepro-hormona liberadora de gonadotropinas.

Pro: Prolina.

PRs: Receptores de progesterona.

PTEM: Hembras con preñez temprana.

PTER: Hembras con preñez a término.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

R: Adenina o guanina.

R (primers): Reverse.

REs: Receptores de estrógenos.

RE α : Receptor de estrógenos α .

RE β : Receptor de estrógenos β .

RFSH: Receptor de la hormona foliculo estimulante.

RGnRH: Receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas.

RIA: Radioinmunoensayo.

RLH: Receptor de la hormona luteinizante.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

seg: Segundo.

Ser: Serina.

S-NAT: Serotonina N-acetiltransferasa.

T: Timina.

TBE: Buffer tris/ácido bórico/ácido etilendiaminotetraacético.

TPH: Tryptófano hidroxilasa.

Trp: Tryptófano

Tyr: Tirosina.

U: Unidades.

UI: Unidades internacionales.

UTR: Región no traducida.

UV: Ultravioleta.

Val: Valina

WAY-200070: 7-bromo-2-(4-hidroxifenil)-1,3-benzoxazol-5-ol (Antagonista del receptor de estrógenos β).

Y: Citosina o timina.

RESÚMENES

2

2.1 RESUMEN EN CASTELLANO

El control estacional de la reproducción a través de la información fotoperiódica se basa en la melatonina como mensajero clave que actúa sobre los componentes del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (H.H.G.). Esta hormona es producida en la glándula pineal por la enzima AANAT, y se une a los receptores MT_1 y MT_2 del hipotálamo, hipófisis y ovario, modulando la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona luteinizante (LH) y los esteroides sexuales estradiol y progesterona, respectivamente. La vizcacha de las llanuras de Sudamérica (*Lagostomus maximus*) posee caracteres reproductivos únicos, como poliovulación natural de hasta 800 oocitos por ciclo estral, inhibición de la atresia folicular, una preñez prolongada con reabsorción embrionaria selectiva y reclutamiento folicular, y una pseudo-ovulación con generación de cuerpos lúteos accesorios durante la gestación. Presenta dos períodos reproductivos al año, siendo el que va de abril a agosto más eficiente que el que abarca de octubre a febrero. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del fotoperíodo sobre el funcionamiento del eje H.H.G. de la vizcacha. En primer lugar se determinó la secuencia del ARNm de la prepro-GnRH hipotalámica. Se encontraron dos isoformas que difieren únicamente en el largo de la secuencia 5'-UTR. La variante de GnRH determinada fue mGnRH, y presentó un alto grado de conservación entre caviomorfos emparentados, mientras que la secuencia del péptido asociado a GnRH (GAP) mostró alta una variabilidad. El análisis de la expresión del sistema melatoninérgico a lo largo del ciclo reproductivo de la vizcacha arrojó como resultado la co-localización de GnRH con ambos receptores de melatonina en núcleos hipotalámicos que controlan la reproducción, el área preóptica y los núcleos supraóptico y supraquiasmático. Además, se determinó un incremento de la expresión de AANAT y de los niveles de melatonina conforme progresa la gestación, y los menores niveles de MT_1 y MT_2 hipotalámicos se registraron en la etapa media de la preñez. Esto indicaría que el sistema melatoninérgico contribuye al mantenimiento de la extensa gestación de la vizcacha. El efecto de la disponibilidad lumínica se determinó en vizcachas en fase folicular y en fase lútea inducida. En el primer caso, la exposición continua a la luz redujo los niveles séricos de melatonina pero incrementó la expresión de AANAT y en el ovario aumentó el número de folículos antrales y de cuerpos lúteos, los niveles de progesterona y la expresión de MT_2 , mientras que la oscuridad constante incrementó los niveles de GnRH y MT_1 , los niveles séricos de estradiol y la expresión de MT_1 en el ovario. En animales en fase lútea, la luz incrementó los niveles de melatonina y de LH, mientras que la oscuridad estimuló la expresión de AANAT y del MT_1 hipotalámico. Estos resultados indicarían que los desajustes fotoperiódicos y hormonales alteran la respuesta del hipotálamo, de la hipófisis y del ovario de manera diferencial en función de la etapa del ciclo estral. La expresión hipotalámica de los receptores de estrógenos α (RE α) y β (RE β) también varió con la disponibilidad lumínica;

en animales en fase folicular se observó un incremento de los niveles de RE α con la luz y un aumento de RE β con la oscuridad. Por otro lado, en animales en fase lútea, la luz constante aumentó la expresión hipotalámica del RE β . En ensayos de pulsatilidad, se observó que la melatonina estimula la secreción de GnRH y de LH en hembras con ovulación inducida. Asimismo, se determinó el efecto inhibitorio del neuroestradiol sobre la secreción de GnRH, mientras que la incubación con melatonina revirtió ese efecto. Por otro lado, la incubación conjunta de melatonina con estradiol o con un agonista del RE β incrementó la liberación de GnRH, sugiriendo que la interacción de melatonina y estradiol resulta necesaria para la actividad del eje H.H.G. En conclusión, este es el primer trabajo que demuestra que en la vizcacha, la regulación de cada órgano a través de la información fotoperódica, así como su respuesta a la melatonina y el contexto hormonal del ciclo estral, confluyen en la modulación del eje reproductivo de manera de ajustar el inicio de la actividad del eje H.H.G. con la estación más favorable para la reproducción. Esta regulación particular, dependiente de la etapa del ciclo estral y de la disponibilidad lumínica, demuestra la relevancia de la información ambiental para llevar a cabo una gestación exitosa y remarca la importancia de esta especie como un valioso modelo de regulación neuroendócrina de la reproducción en mamíferos.

2.2 RESUMEN EN INGLÉS

The seasonal control of reproduction through the photoperiodic information relies on melatonin as the key messenger acting on the components of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (H.H.G.). This hormone is produced in the pineal gland by the enzyme AANAT, and binds to the MT₁ and MT₂ receptors of the hypothalamus, pituitary and ovary, where it modulates the secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), luteinizing hormone (LH) and the sex steroids estradiol and progesterone, respectively. The South American plains vizcacha (*Lagostomus maximus*) shows unique reproductive features, such as natural polioovulation of up to 800 oocytes per estral cycle, inhibition of follicular atresia, a prolonged pregnancy with selective embryo reabsorption and follicular recruitment, and pseudo-ovulation with generation of accessory corpora lutea accessories during pregnancy. It displays two reproductive periods per year, being the one from April to August more efficient than the one from October to February. The aim of this work was to study the influence of the photoperiod on the vizcacha's H.H.G. axis functioning. First, the mRNA sequence of hypothalamic prepro-GnRH was determined. Two isoforms that differ in the length of the 5'-UTR sequence were found. The GnRH variant determined was mGnRH, and showed a high degree of conservation among related caviomorphs, while the sequence of the GnRH-associated peptide (GAP) showed high variability. The analysis melatoninergic system expression throughout the reproductive cycle of the vizcacha resulted in the co-localization of GnRH with both melatonin receptors in hypothalamic nuclei that modulate reproduction, the preoptic area and the supraoptic and suprachiasmatic nuclei. In addition, an increase in AANAT expression and melatonin levels was determined as pregnancy progressed, and the lowest levels of hypothalamic MT₁ and MT₂ were registered at mid-pregnancy. This would indicate that the melatoninergic system contributes to the maintenance of the extensive gestation of the vizcacha. The effect of light availability was determined in vizcachas at the follicular phase and at the induced luteal phase. In the first case, continuous exposure to light reduced serum levels of melatonin but increased the expression of AANAT and increased the number of antral follicles and corpora lutea, progesterone levels and MT₂ expression in the ovary, while constant darkness increased GnRH and MT₁ levels, serum estradiol levels and MT₁ expression in the ovary. In animals at luteal phase, light increased melatonin and LH levels, while darkness stimulated the expression of AANAT and hypothalamic MT₁. These results would indicate that the photoperiodic and hormonal imbalances differentially alter the response of the hypothalamus, pituitary and ovary depending on the stage of the estrous cycle. Hypothalamic expression of the estrogen receptors α (RE α) and β (RE β) also varied with light availability; at the follicular phase, an increase in RE α levels was observed with light and an increase in RE β with darkness. On the other hand, in animals at luteal phase, constant light increased the hypothalamic expression of RE β . In pulsatility assays, it was observed that melatonin stimulates GnRH and LH secretion

in females with induced ovulation. Also, the inhibitory effect of neuroestradiol on GnRH secretion was determined, while the incubation with melatonin reversed this effect. On the other hand, the joint incubation of melatonin with estradiol or with an RE β agonist increased GnRH release, suggesting that the interaction of melatonin and estradiol is necessary for the activity of the H.H.G. axis. In conclusion, this is the first work that shows that in the vizcacha the regulation of each organ through photoperiodic information, as well as its response to melatonin and the hormonal context of the estrous cycle, converge in the modulation of the reproductive axis in a way to adjust the beginning of the activity of the H.H.G. axis with the most favorable season for reproduction. This particular regulation, dependent on the stage of the estrous cycle and on the light availability, demonstrates the relevance of environmental information for carrying out a successful gestation and highlights the importance of this species as a valuable model of neuroendocrine regulation of reproduction in mammals.

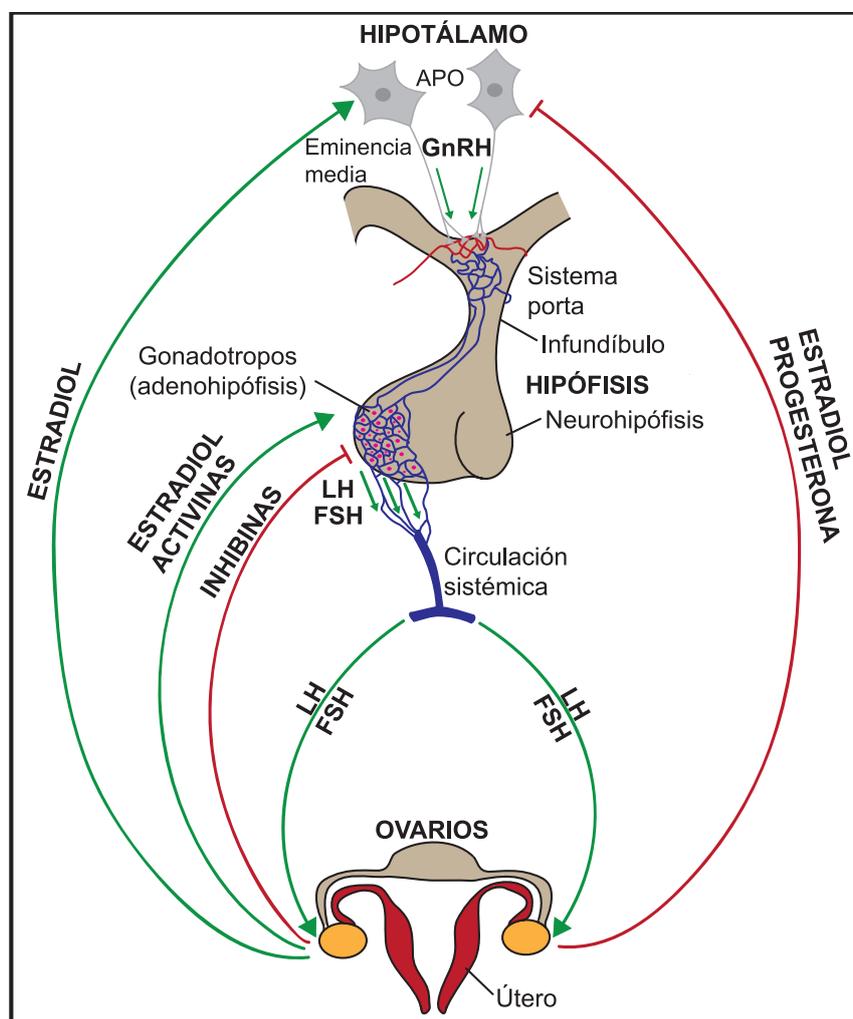
INTRODUCCIÓN

3

3.1 EL EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIO-GONADAL (H.H.G.)

El control del proceso reproductivo en todas sus fases requiere de un centro integrador que vincule la información proveniente de los sistemas nervioso y endócrino. El hipotálamo es la estructura que lleva a cabo dicha función, pues está integrado por neuronas productoras y secretoras de “neurohormonas”, generalmente peptídicas. Estas proteínas o polipéptidos pueden ser liberadas hacia el sistema porta hipofisario, donde viajarán hacia la adenohipófisis y allí estimularán o inhibirán la secreción de hormonas hipofisarias hacia la circulación sistémica.

FIGURA 1. EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIO-GONADAL



La regulación de la reproducción resulta de una compleja interacción entre el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, así como de las hormonas que secretan, y de los efectos de las mismas. APO: área preóptica del hipotálamo. GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas. LH: hormona luteinizante. FSH: hormona folículo estimulante. Flechas verdes y con punta: retroalimentación positiva. Flechas rojas truncadas: retroalimentación negativa. Adaptado de Strauss y Barbieri (2009).

Por otro lado, algunas neurohormonas se liberan directamente a la circulación sistémica desde la neurohipófisis, región hipofisaria que se compone principalmente de células gliales de sostén y los axones de las neuronas hipotalámicas productoras de estas hormonas (por ejemplo, vasopresina y oxitocina). Una vez liberadas a la circulación sistémica, las neurohormonas harán blanco en órganos específicos y modularán su actividad. En el caso de la modulación del proceso reproductivo de las hembras, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) hipotalámica estimula la secreción de las gonadotropinas hipofisarias hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). Éstas, a su vez, actuarán sobre el ovario induciendo durante la fase folicular la foliculogénesis, la secreción de factores de efecto de retroalimentación positiva (estradiol e inhibinas) y la ovulación, así como la luteinización y la consecuente secreción de factores inhibitorios (estradiol, progesterona e inhibinas) de la actividad hipotalámica e hipofisaria (fase lútea) (**Figura 1**). De esta manera, la regulación de la actividad del eje reproductivo determinará el momento preciso de reclutamiento y desarrollo folicular, ovulación, esteroidogénesis, gestación y parto (Snell, 2007).

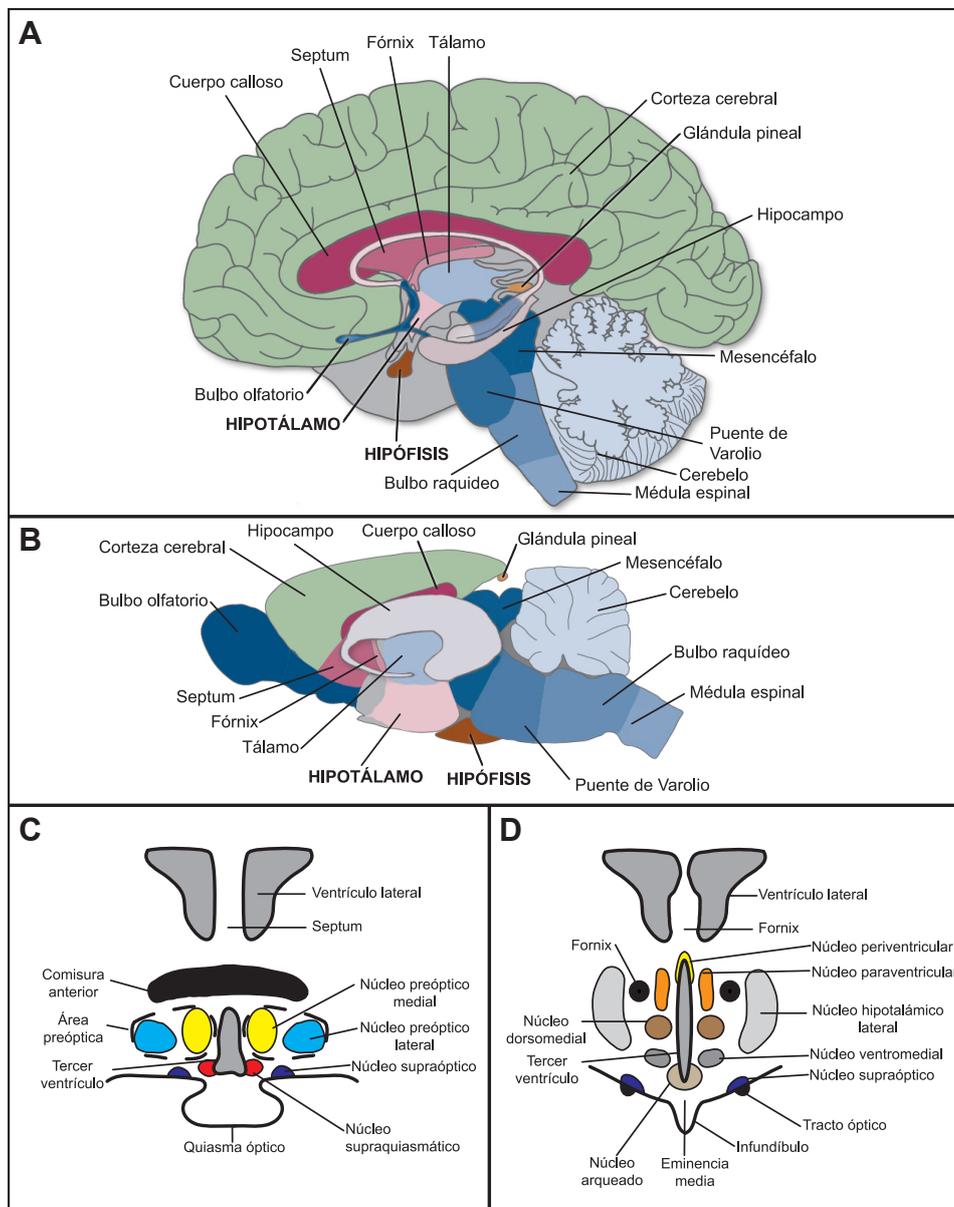
3.1.1 El hipotálamo y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

El hipotálamo es una estructura bilateral diencefálica que se localiza debajo del tálamo formando el piso y la parte inferior de las paredes laterales del tercer ventrículo; está limitado en su parte rostral por el quiasma óptico, en la región caudal por los cuerpos mamilares y lateralmente por la cápsula interna (Lammers y Lohman, 1974; Snell, 2007). Este órgano neuroendócrino está constituido por diversos núcleos (conjunto de somas de células nerviosas agrupados íntimamente, con un límite definido) y áreas (somas neuronales reunidos de manera menos concentrada), siendo algunos partícipes en la regulación de la actividad del eje H.H.G. mediante señalización por neurohormonas (Lammers y Lohman, 1974) (**Figura 2**).

La señal clave que inicia la cascada de hormonas que coordinan la fisiología reproductiva es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), un decapeptido ampliamente distribuido en el reino animal y cuya secuencia es altamente conservada. Dada la presencia de alguna forma de GnRH en todos los vertebrados e invertebrados, tanto en tejidos nerviosos como en otros, la expresión de sus receptores en tejidos reproductivos y no reproductivos, y el alto grado de conservación de sus formas, se considera que este péptido ha existido al menos desde hace 500 millones de años y que desde entonces ha sido clave en las funciones reproductivas y comportamentales asociadas (Dubois y col., 2002).

GnRH fue caracterizada por primera vez en el hipotálamo de cerdo (Matsuo y col., 1971) y de oveja (Burgus y col., 1972), denominándose GnRH de mamífero o mGnRH (*mammalian GnRH*). Posteriormente se encontraron dos variantes de esta hormona en el cerebro

FIGURA 2. REGIONES CEREBRALES Y NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS



Esquema comparativo de un corte sagital del cerebro humano (A) y de un roedor (B), donde se destacan la localización del hipotálamo y la hipófisis. C. Representación esquemática de un corte coronal del hipotálamo anterior humano, destacando la presencia de los núcleos preóptico medial, lateral, supraóptico y supraquiasmático, así como el área preóptica. D. Representación esquemática de un corte coronal del hipotálamo medio-basal humano, destacando la ubicación de los núcleos paraventricular, periventricular, lateral, dorsomedial, ventromedial, supraóptico, arqueado y la eminencia media. *Adaptado de Lechan y Toni (2016).*

de gallina, que fueron nombradas cGnRH-I (hipotalámica) y cGnRH-II (mesencefálica) (Miyamoto y col., 1982, 1984). Hasta la fecha, han sido descritas 44 variantes distintas de GnRH (18 de ellas presentes en vertebrados), y en su mayoría han sido nombradas a partir de la especie donde fueron encontradas (Kah y col., 2007; Roch y col., 2014) (Tabla 1). Estos péptidos comparten ciertas características: están compuestos por 10 aminoácidos,

con los residuos 1, 4, 9 y 10 conservados y los extremos amino- (con piroglutamato ó “pGlu”) y carboxi-terminales modificados (por amidación ó “NH₂”) (Guilgur y col., 2006).

Se establecieron diferentes nomenclaturas conforme se complejizaba la diversidad de esta hormona (Dubois y col., 2002); a los fines de simplificar y combinar la localización en el cerebro con la función, la especie en la que se presenta y el tipo de péptido del que se trata, Fernald y White (1999) definieron los sistemas GnRH1, GnRH2 y GnRH3. Existe un cuarto linaje o grupo denominado GnRH4, el cual está integrado por las variantes presentes en la lamprea (*Petromyzon marinus*) pero esta categoría se basa en análisis filogenético y no considera la localización anatómica ni la función del péptido (Kavanaugh y col., 2008). La mayoría de los vertebrados presenta los sistemas GnRH1 y GnRH2, mientras que GnRH3 ha sido solo encontrada en peces teleósteos (Kah y col., 2007). Las formas presentes en el sistema GnRH1 son las que muestran mayor variación en su secuencia entre los vertebrados; se expresan en neuronas del área preóptica que emiten proyecciones hacia la eminencia media (EM) hipotalámica, desde donde se secretará hacia el sistema porta hipofisario para modular la síntesis y liberación de gonadotrofinas entre otras hormonas (Somoza y col., 2002). El mesencéfalo expresa las formas del sistema GnRH2 en neuronas del tegmento que se proyectan hacia la región posterior del cerebro y contactan al tercer ventrículo. Entre las funciones de este péptido se encuentra la de regular la ingesta alimenticia, el balance energético y la conducta sexual, probablemente actuando como un neurotransmisor o neuromodulador que intervendría en el balance entre la supervivencia y la reproducción (Millar y col., 2001; Kauffman y Rissman, 2004; Kauffman y col., 2006). Finalmente, GnRH3 se encuentra en el bulbo olfatorio, en neuronas de similar origen embriológico a las del sistema GnRH1, las cuales emiten prolongaciones hacia el telencéfalo principalmente (Okubo y col., 2006). Los péptidos de este grupo influyen la conducta sexual (construcción de nidos, agresividad y desove) y el procesamiento sensorial de señales relacionadas con el estado reproductivo (White y col., 1995).

La mayoría de los vertebrados expresa más de una forma de GnRH en el cerebro, encontrándose hasta 3 en peces teleósteos (Somoza y col., 2002). Todas son codificadas por genes diferentes de organización conservada (de 4 exones y 3 intrones), y se originan a partir de precursores denominados prepro-GnRH, los cuales comparten una estructura común: un péptido señal de 20-25 residuos, el péptido GnRH de 10 aminoácidos, un sitio de procesamiento enzimático de 3 residuos (Gly-Lys-Arg) y un péptido asociado a GnRH (*GnRH-associated peptide* o GAP) de 40-50 aminoácidos de extensión (Guilgur y col., 2006; Kah y col., 2007); una vez separadas por clivaje enzimático, GnRH y GAP son co-secretadas a la circulación portal hipofisaria (Clarke y col., 1987). La transcripción del gen de las GnRH hipotalámicas (GnRH-I) puede ser modulada por diversas moléculas. Tanto el estradiol como la progesterona regulan su transcripción (según la fase

del ciclo estral), actuando mediante la unión de sus receptores con secuencias localizadas en el promotor del gen de GnRH que se denominan “elemento de respuesta a estrógenos” (ERE) o “elemento negativo de respuesta a progesterona” (nPRE, por sus siglas en inglés),

TABLA 1. UBICACIÓN NEUROANATÓMICA Y ESTRUCTURA DE GnRH EN VERTEBRADOS

| TIPO | LOCALIZACIÓN | SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS | REFERENCIA |
|-----------------------------------|------------------------------------|--|--------------------------------|
| <i>Mamífero</i> (mGnRH) | Hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂ | Matsuo y col. (1971) |
| <i>Pollo-I</i> (cGnRH-I) | Hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu- Gln -Pro-Gly-NH ₂ | Miyamoto y col. (1983) |
| <i>Rana</i> (frGnRH) | Hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu- Trp -Pro-Gly-NH ₂ | Yoo y col. (2000) |
| <i>Dorada</i> (sbGnRH) | Hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu- Ser -Pro-Gly-NH ₂ | Powell y col. (1994) |
| <i>Salmón</i> (sGnRH) | Bulbo olfatorio, hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly- Trp-Leu -Pro-Gly-NH ₂ | Sherwood y col. (1983) |
| <i>Corégono</i> (wfGnRH) | Hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly- Met-Asn -Pro-Gly-NH ₂ | Adams y col. (2002) |
| <i>Cobayo</i> (gpGnRH) | Hipotálamo | pGlu- Tyr -Trp-Ser-Tyr-Gly- Val -Arg-Pro-Gly-NH ₂ | Jiménez-Liñán y col. (1997) |
| <i>Medaka</i> (mdGnRH) | Hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser- Phe -Gly-Leu-Ser-Pro-Gly-NH ₂ | Okubo y col. (2000) |
| <i>Pollo-II</i> (cGnRH-II) | Mesencéfalo | pGlu-His-Trp-Ser- His -Gly- Trp-Tyr -Pro-Gly-NH ₂ | Miyamoto y col. (1984) |
| <i>Pez gato</i> (cfGnRH) | Hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser- His -Gly-Leu- Asn -Pro-Gly-NH ₂ | Ngamvongchon y col. (1992) |
| <i>Arenque</i> (hgGnRH) | Hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser- His -Gly-Leu- Ser -Pro-Gly-NH ₂ | Carolsfeld y col. (2000) |
| <i>Mielga</i> (dfGnRH) | Bulbo olfatorio, hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser- His -Gly- Trp-Leu -Pro-Gly-NH ₂ | Lovejoy y col. (1992) |
| <i>Lamprea-I</i> (IGnRH-I) | Hipotálamo | pGlu-His-Trp-Ser- His-Asp-Phe-Lys -Pro-Gly-NH ₂ | Sherwood y col. (1986) |
| <i>Lamprea-II</i> (IGnRH-II) | Hipotálamo, regiones olfatorias | pGlu-His-Trp-Ser- His -Gly- Trp-Phe -Pro-Gly-NH ₂ | Kavanaugh y col. (2008) |
| <i>Lamprea-III</i> (IGnRH-III) | Hipotálamo | pGlu-His- Tyr -Ser- Leu-Glu-Trp-Lys -Pro-Gly-NH ₂ | Sower y col. (1993) |
| <i>Pez espinoso</i> | Cerebro completo | pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly- Asn -Arg-Pro-Gly-NH ₂ | Shao y col. (2015) |
| <i>Celacanto</i> | SD | pGlu- Tyr -Trp-Ser- Asp -Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂ | Roch y col. (2014) |
| <i>Tiburón elefante</i> | SD | pGlu-His-Trp-Ser- Ile-Asp-Asn -Arg-Pro-NH ₂ | Nock y col. (2011) |

Localización en el sistema nervioso central y secuencia de aminoácidos de las diferentes variantes de GnRH presentes en vertebrados, con mGnRH como referencia. Se indica en negrita la variación en aminoácidos. SD: sin datos hasta la fecha. *Adaptado de Dubois y col. (2002), Kah y col. (2007), Chen y Fernald (2008) y Roch y col. (2014).*

respectivamente (Kim y col., 1989; Toranzo y col., 1989; Radovick y col., 1991; Kepa y col., 1996). Además, en la línea celular neuronal GT1-7, la cual secreta GnRH y expresa los receptores de melatonina, se ha observado un efecto negativo sobre la expresión del ácido

ribonucleico mensajero (ARNm) de GnRH-I por parte de la melatonina, cuyos receptores se unen a una secuencia potenciadora (enhancer) del gen (Roy y col., 2001; Gillespie y col., 2004). Experimentos *in vitro* con hipotálamos de rata han demostrado que la melatonina estimula la secreción de GnRH con un marcado ritmo circadiano (Richardson y col., 1982; Rasmussen, 1987). Por otro lado, moléculas como el ácido γ -aminobutírico (GABA) y kisspeptina han demostrado inducir la transcripción del ARNm de mGnRH (Leonhardt y col., 1995; Kang y col., 1995; Novaira y col., 2009).

Las neuronas productoras de las formas del sistema GnRH1 varían en número (de 1000 a 1500) y localización dentro del hipotálamo según la especie; la rata posee el mayor número de somas de estas neuronas en el área preóptica (APO) del hipotálamo anterior (Setalo y col., 1976; Silverman y col., 1987), pero también posee una pequeña población en el hipotálamo medio basal (HMB) (Ohkura y col., 1991). Por otro lado, en las ovejas (Lehman y col., 1986), cabras (Hamada y col., 1992) y primates (Silverman y col., 1977), los somas de neuronas GnRH se localizan principalmente en el HMB. Varias señales centrales y periféricas modulan la actividad de estas células, siendo algunas estimulantes (noradrenalina, kisspeptina, neuropéptido Y, glutamato), otras inhibitorias (β -endorfina, progesterona, interleuquinas) o con efecto dual (estradiol) (Tsutsumi y Webster, 2009). Las señales positivas inducen la secreción de GnRH, que puede darse de manera pulsátil (Knobil, 1980) o en "oleada" (Moenter y col., 1991). Esta última es la requerida para inducir la liberación preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) y sufre estimulación mediante los estrógenos provenientes del folículo ovárico maduro (Maeda y col., 2010). La ritmicidad pulsátil de GnRH, en cambio, estimula la secreción tónica de LH y de la hormona folículo-estimulante (FSH), y es regulada negativamente por los estrógenos (Moenter y col., 1992). La actividad coordinada de las neuronas del sistema GnRH1 regula la liberación pulsátil de GnRH (Wray, 2001). Esta particularidad fue inicialmente descrita en fragmentos hipotalámicos aislados y en cultivos de neuronas hipotalámicas (Terasawa, 1998; Woller y col., 1998; Vazquez-Martinez y col., 2001). La frecuencia de los pulsos de GnRH regula selectivamente la expresión de las subunidades β específicas de cada gonadotropina y con ello la secreción de su proteína; pulsos de alta frecuencia, con más de un pulso por hora en el humano, por ejemplo, estimulan la transcripción y secreción de LH, y pulsos menos frecuentes, por ejemplo, 1 pulso cada 2-3 horas en el humano, inducen la expresión y liberación de FSH (Dalkin y col., 1989; Kaiser y col., 1997). En comparación a la secreción constante, la liberación episódica de la GnRH hipotalámica evitaría una desensibilización de la hipófisis al decapeptido o un desbalance de los niveles de ARNm y proteína de las gonadotropinas (Thompson y Kaiser, 2014). La secreción pulsátil de GnRH por parte de neuronas hipotalámicas se da en ausencia de otros tipos celulares, y es altamente dependiente de calcio, como se comprobó mediante experimentos en cultivos de líneas de neuronas inmortalizadas (Krsmanovic y col., 1999, 2001, 2003). Adicionalmente,

se ha determinado que la expresión del gen de GnRH-I también es pulsátil, encontrándose íntimamente asociada a la secreción episódica de su proteína (Nuñez y col., 1998; Vazquez-Martinez y col., 2002), y se estableció una correspondencia entre los pulsos de LH y los de GnRH, mediante el registro de actividad eléctrica de neuronas del APO (Colombo y col., 1974); por ello, la secreción episódica de LH medida en circulación periférica ha sido tomada históricamente como parámetro que refleja los pulsos de liberación de GnRH al sistema porta hipofisario (Knobil, 1990). Finalmente, la expresión de receptores de GnRH en neuronas hipotalámicas productoras de este deca péptido, y el efecto estimulante de estas células con GnRH o sus agonistas, indicaría la existencia de un sistema de regulación autócrina de la neurosecreción en dichas neuronas (Romanelli y col., 2004).

3.1.2 La hipófisis y las gonadotropinas

La glándula pituitaria o hipófisis se ubica sobre una hendidura en el hueso esfenoides de la base del cráneo. La conexión con el hipotálamo es anatómica y funcional, a través del tallo infundibular que parte de la EM. Se distinguen dos lóbulos, denominados pars distalis (conocido como adenohipófisis o hipófisis anterior) y pars tuberalis (que integra la neurohipófisis o hipófisis posterior). Las células productoras de LH y FSH, denominadas gonadotropas, se localizan principalmente en la pars distalis y representan entre el 10% y el 15% de la adenohipófisis, en humano y rata respectivamente (Childs y col., 1983; Manjithaya y Dighe, 2006; Perez-Castro y col., 2012). Su actividad se ve regulada por la GnRH hipotalámica (que llega mediante el sistema porta-hipofisario), por factores ováricos como el estradiol y la progesterona, y mediante un control intrapituitario.

Las gonadotropinas LH y FSH son glicoproteínas heterodiméricas, formadas por dos subunidades unidas no covalentemente: una subunidad α común (que también está presente en la gonadotropina coriónica humana, o hCG) y una subunidad β particular de cada hormona, la cual es codificada por un gen diferente, y le confiere especificidad biológica (Combarnous, 1988; Dufau, 1998). Únicamente el heterodímero $\alpha\beta$ posee actividad biológica (Pierce y Parsons, 1981), siendo la misma determinada en gran parte por la presencia de oligosacáridos unidos al esqueleto proteico (Mullen y col., 2013). Una vez secretadas al torrente sanguíneo, LH y FSH viajarán hacia el ovario, donde modularán las diferentes etapas del su ciclo a través de la activación de receptores específicos de membrana. Estos receptores de hormonas glicoproteicas integran la familia de receptores acoplados a proteínas G, se encuentran glicosilados, y están compuestos por dos unidades funcionales: un gran dominio extracelular de unión a la hormona y 7 módulos transmembrana que anclan a esta estructura a la célula y transducen la señal iniciada en el dominio extracelular mediante la activación de proteínas G acopladas al extremo carboxi-terminal (McFarland y col., 1989; Simoni y col., 1997). El

receptor de FSH (RFSH) es expresado únicamente por las células de la granulosa (desde el estadio folicular primordial) y tanto la activina como FSH regulan su expresión de una manera dosis-dependiente, pero con efectos opuestos (Yamamoto y col., 1992; Nakamura y col., 1993; Oktay y col., 1997). De hecho, se ha descrito una drástica disminución en la expresión del RFSH luego de la administración *in vivo* de FSH o de hCG, ambas en dosis ovulatorias (Nakamura y col., 1991; Hsueh y LaPolt, 1992; LaPolt y col., 1992). La activación del RFSH inicia el proceso de reclutamiento y maduración folicular, principalmente a través de la inducción de la expresión del receptor de LH (RLH) y de la enzima aromatasas (Zelevnik y col., 1981; Zelevnik, 2004). El primer evento tiene lugar de manera constitutiva en las células de la teca y está restringido a las células de la granulosa sólo en los folículos preovulatorios (Binder y col., 2014). Como resultado, estas células serán receptivas a LH y también a hCG, pues es capaz de unirse al RLH con alta afinidad por su semejanza estructural con LH (Dufau, 1998). Esto daría lugar a una posterior ovulación, y, además, a un aumento en la secreción de estrógenos, que a su vez inhibirá la liberación de FSH. Por otro lado, tanto los elevados niveles preovulatorios de LH como la administración de dosis farmacológicas de hCG disminuyen drásticamente la expresión del RLH a partir de un control post-transcripcional que involucra la degradación de su ARNm (Nair y col., 2002).

3.1.3 El ovario y los esteroides sexuales.

Los ovarios son estructuras bilaterales localizadas en la cavidad peritoneal. Se los considera los órganos reproductivos femeninos dadas sus funciones principales: gametogénica y esteroidogénica. La primera consiste en procesos de selección y maduración folicular y la consecuente liberación de la gameta femenina, el oocito. La segunda implica la síntesis y liberación de esteroides sexuales que regulan de manera positiva y negativa el funcionamiento del hipotálamo y la hipófisis, y con ello, la actividad ovárica.

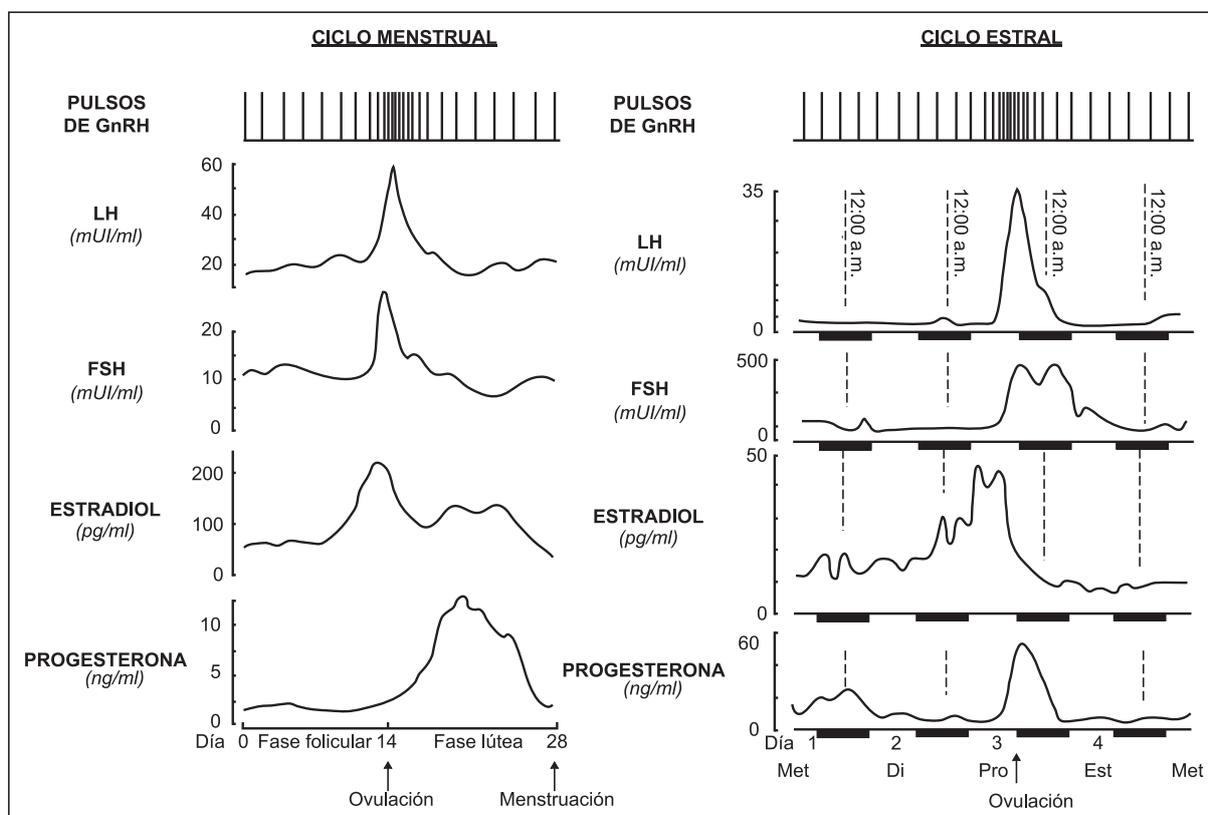
El desarrollo ovárico comienza con la migración de las células germinales primordiales epiblasticas hacia la gónada en formación. Una vez allí, colonizarán por expansión mitótica la estructura, y se denominarán oogonias. Luego, las células somáticas de la gónada rodearán a las oogonias, conformando folículos ováricos primordiales (**Figura 4**). Estas estructuras constan entonces de un oocito rodeado por una capa única de células de la granulosa; su formación tiene lugar en la última mitad del desarrollo fetal humano y los primeros días post-parto en el ratón (Eppig, 2001), y su función es nutricional, esteroidogénica, de sostén y madurativa (Hirshfield, 1991). Luego, las oogonias cesarán su actividad mitótica e iniciarán la meiosis, para quedar detenidas en la etapa de profase I. Este proceso ocurre en simultáneo con la atresia de células germinales, siendo ésta responsable de la brusca reducción su número durante la vida temprana (Edson y col., 2009). El proceso meiótico se reasume en la

pubertad, cuando el hipotálamo y la hipófisis comienzan a ejercer su función reproductiva a través de la secreción de hormonas, la cual gobernará el funcionamiento ovárico determinando ciclos menstruales hasta la menopausia (en el humano) y ciclos estrales hasta la senescencia reproductiva (en roedores y otros mamíferos) (**Figura 3**).

a. Fase folicular del ciclo reproductor femenino

Los folículos primordiales son reclutados por un mecanismo intraovárico independiente de gonadotropinas. Como resultado, la morfología de las células de la granulosa cambia de aplanada a cuboide y aumenta su número de capas. De esta manera, se establece el folículo primario, cuyas células de la granulosa empezarán a expresar el RFSH (Erickson, 2004) (**Figura 4**). En paralelo, el oocito comienza a crecer y a diferenciarse, activando la maquinaria transcripcional y sintetizando proteínas estructurales. La transición hacia el estadio de folículo secundario implica la adquisición de una segunda capa de células de la granulosa cuboides por mitosis, y el desarrollo de una capa de células de la teca y de pequeños vasos sanguíneos (**Figura 4**). El oocito alcanza su máximo tamaño y el crecimiento folicular se vuelve dependiente de FSH. En este momento, la creciente concentración de esta hormona alcanza un valor umbral crítico necesario para la maduración folicular (Edson y col., 2009; Raju y col., 2013). La respuesta a FSH estimula la expresión de RLH, en un principio en las células de la granulosa y de la teca, y luego relegada a estas últimas conforme progresa la fase folicular. La función esteroideogénica de esta fase es explicada por la teoría de “dos células, dos gonadotropinas”, que sostiene que FSH induce la expresión de la enzima aromatasa en las células de la granulosa, pero éstas no pueden sintetizar el sustrato de esta enzima, los andrógenos. En respuesta al estímulo por LH, las células de la teca sintetizarán la maquinaria enzimática para producir los andrógenos que les proveerán a las células de la granulosa que, mediante conversión por aromatasa, producirán y liberarán estrógenos al torrente sanguíneo (Jamnongjit y Hammes, 2006; Raju y col., 2013). La maduración del folículo secundario genera un folículo terciario, que se diferencia por la presencia de una cavidad entre las células de la granulosa, denominada antro (**Figura 4**). Este proceso de cavitación no depende de gonadotropinas, pero sí de factores ováricos como la activina, proteína que estimula la secreción hipotalámica de GnRH, hipofisaria de FSH e induce la expresión del receptor de GnRH (RGnRH) en la pituitaria (Gregory y Kaiser, 2004). La acumulación de líquido en el antro y el desplazamiento del complejo oocitario hacia un extremo caracteriza a esta estructura como folículo terciario tardío o de Graaf. Éstos pueden diferenciarse en “sanos” o “atrésicos”, siendo los primeros los que alcanzarán el estadio preovulatorio gracias a un proceso de crecimiento y desarrollo asincrónico entre los folículos, lo que genera un pool heterogéneo (Erickson, 2004). El reclutamiento de folículos sanos en cohortes implica cambios morfológicos iniciados por un pequeño aumento en los niveles plasmáticos de FSH, tales como incrementos en la acumulación de líquido antral y en la proliferación celular. La

FIGURA 3. CICLOS HORMONALES EN EL HUMANO Y LOS ROEDORES



Variaciones en el patrón de liberación pulsátil de GnRH hipotalámica, de las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH y de las hormonas ováricas estradiol y progesterona a lo largo del ciclo menstrual femenino humano (A) y del ciclo estral de un roedor (B). Tanto los niveles séricos de LH, FSH, estradiol y progesterona como el patrón representativo de pulsatilidad de GnRH se muestran en función del tiempo durante ciclo. Se indican los eventos de ovulación y menstruación en el humano, y las etapas del ciclo estral (metestro, diestro, proestro, estro), el horario y el momento de ovulación en el roedor. Met: metestro. Di: diestro. Pro: proestro. Est: estro. *Adaptado de Scharfman y MacLusky (2008).*

cohorte secreta inhibina y estradiol, los cuales generan una reducción en los niveles de FSH. Esto desencadena la selección de folículos “dominantes” mediante atresia. Éstos crecerán hasta alcanzar un tamaño ovulatorio, en número de 1 o más dependiendo de la especie (Gregory y Kaiser, 2004; Edson y col., 2009). La exposición prolongada a niveles elevados de estradiol (producto del aumento en la expresión de la aromatasa) y de inhibina sintetizados por los folículos dominantes, inhibirán la secreción de FSH, prepararán al útero para ser receptivo, e incrementarán la frecuencia pulsátil de GnRH y de LH (Edson y col., 2009; Beshay y Carr, 2013). Previo a la ovulación, LH induce la síntesis de progesterona desde las células de la granulosa, la cual causará una disminución dramática en los niveles de estradiol y un aumento de los niveles de FSH (Erickson, 2004). Este evento induce la expresión del receptor de LH en las células de la granulosa y libera al oocito de las conexiones foliculares. Finalmente, los niveles de LH (y de RLH en las células de la granulosa) alcanzan un máximo o pico, desencadenando la finalización de la meiosis I y el arresto en metafase de la meiosis

II en el oocito y su extrusión del folículo, proceso conocido como “ovulación” (Hirshfield, 1991; Eppig, 2001; Reed y Carr, 2015).

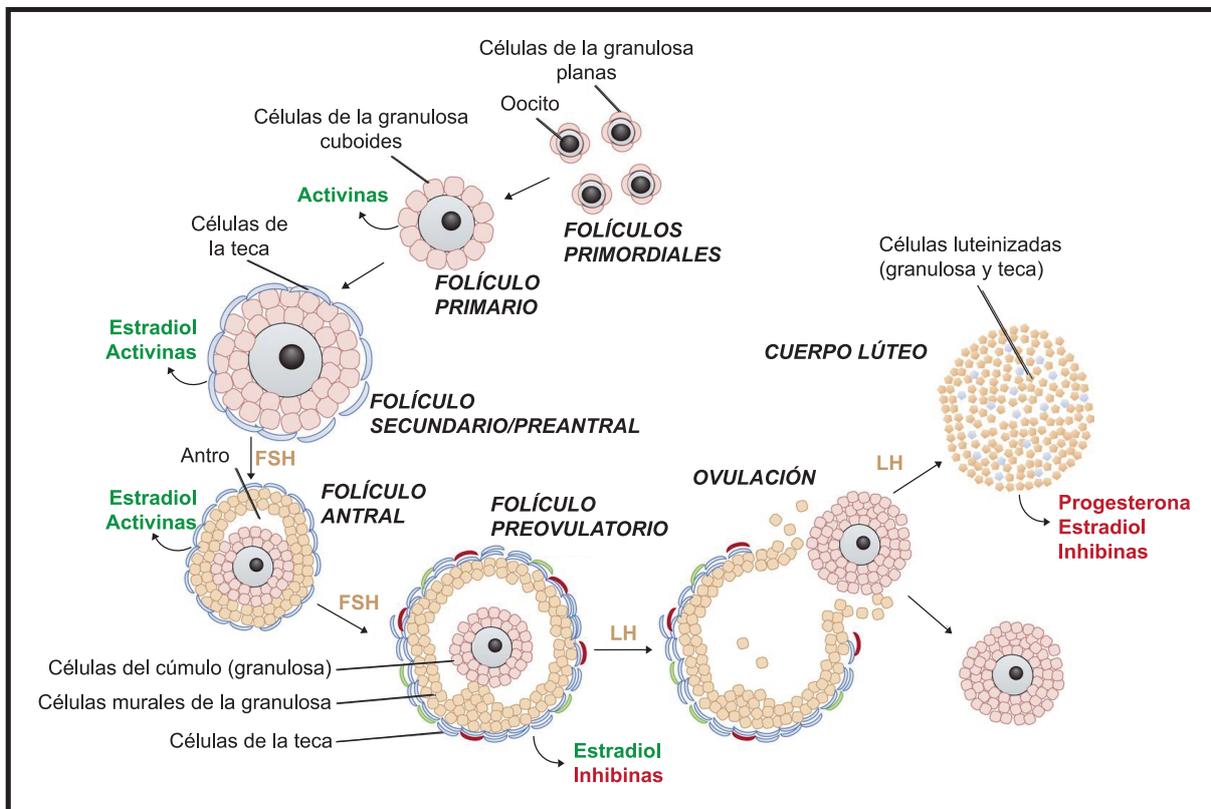
b. Fase lútea del ciclo reproductor femenino

Luego de la expulsión del oocito, las paredes del folículo ovulatorio colapsan y se pliegan, mientras que tiene lugar una angiogénesis capilar. Las células de la granulosa remanentes se combinan con las células de la teca y del estroma ovárico, formándose así el cuerpo lúteo (Reed y Carr, 2015) (**Figura 4**). Esta es una estructura transitoria que secreta principalmente progesterona (y en menor medida estrógenos), y su función es preparar al endometrio para la posible implantación de un óvulo fertilizado. Además, participa en la regulación del desarrollo de la glándula mamaria, modula la conducta reproductiva en hembras, e inhibe la secreción de GnRH y FSH. Tanto los niveles de progesterona como los de estradiol sufren un incremento en la mitad de la fase lútea; la secreción de estas hormonas es episódica, y en primates se correlaciona con los pulsos de liberación de LH (Fraser y col., 1986; Filicori y col., 1984) (**Figura 3**). Contrariamente, en la oveja y en la vaca requiere de niveles basales de LH, siendo prácticamente independiente de ella (McNeilly y col., 1992; Peters y col., 1994). En roedores pequeños, la sobrevivencia y funcionamiento del cuerpo lúteo depende principalmente del reflejo neuroendócrino inducido por el macho en el momento de la cópula (Stouffer y Hennebold, 2014).

La vida media del cuerpo lúteo depende de un sostén continuo por parte de LH. Puede durar desde 1 día como sucede en algunos roedores, hasta 6 meses en algunos caninos (Strauss y Barbieri, 2009). En el humano, su función decaerá al final de la fase lútea a menos que ocurra un embarazo; al principio de la gestación, la gonadotropina coriónica interactúa con el RLH y promueve el mantenimiento del cuerpo lúteo, y con ello la secreción de progesterona y la inhibición hipotalámica-hipofisaria. El caballo y los primates son los únicos mamíferos en los que se ha descrito el gen para la gonadotropina coriónica; particularmente, la gonadotropina coriónica equina (eCG) posee una vida media mayor que LH, y estimula la foliculogénesis y el desarrollo de cuerpos lúteos accesorios durante la gestación (Maston y Ruvolo, 2002; Murphy, 2012).

Conforme progresa la gestación, la secreción placentaria de progesterona reemplazará a la de origen lúteo. Si no tiene lugar la preñez, el cuerpo lúteo degenera mediante un proceso de luteólisis y forma un tejido cicatrizal denominado cuerpo albicans. La concomitante reducción de los niveles de progesterona estimula el desprendimiento del recubrimiento endometrial uterino (menstruación), remueve la inhibición hipotalámica-hipofisaria y así se reanuda la secreción pulsátil de GnRH y de LH, y con ello el ciclo ovárico-hormonal (Reed y Carr, 2015).

FIGURA 4. ESTADÍOS DE LA FOLICULOGÉNESIS



Esquema de las principales etapas de la foliculogénesis. El proceso inicia con el reclutamiento de folículos primordiales, y su progresión involucra un aumento en el número de capas de células de la granulosa, cambios en su morfología, la aparición de las células de la teca y la secreción de estradiol y activinas (en verde), factores que ejercerán una retroalimentación positiva en hipotálamo e hipófisis. La última fase de la foliculogénesis es dependiente de FSH y LH (en verde), culminando en la liberación del oocito (ovulación), la luteinización del folículo y la secreción de factores que ejercerán una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis (progesterona, estradiol e inhibinas, en rojo). *Adaptado de Georges y col. (2014).*

3.1.4 Retroalimentación hormonal ovárica sobre hipotálamo e hipófisis.

Los esteroides gonadales ejercen retroalimentación sobre el hipotálamo y la hipófisis, funcionando como señales que transmiten la información acerca del estado ovárico al sistema neuroendócrino que modula la reproducción. A su vez, este sistema procesa la información y ajusta sus secreciones en función de las necesidades del ovario (Strauss y Barbieri, 2009). Los estrógenos (estradiol, estrona y estriol) informan acerca del estado de los folículos en desarrollo, y la progesterona marca el momento de la ovulación e indica el estado del cuerpo lúteo.

Los estrógenos actúan por unión a los receptores homónimos nucleares α (RE α) y β (RE β), y de membrana (GPR30). Este último activa vías no genómicas que, en el hipotálamo, permiten efectuar respuestas rápidas que desencadenarán cambios comportamentales

vinculados con la conducta reproductiva (Strauss y Barbieri, 2009). RE α y RE β consisten en dos monómeros idénticos, cada uno compuesto por las regiones A, B, C, D, E, y F, en sentido N-terminal a C-terminal siendo la región más conservada entre ambos receptores el dominio C, que participa en la dimerización y la localización nuclear (Saunders, 1998). Estos receptores pueden formar homo- o heterodímeros, interactuar con secuencias ERE y regular la expresión de genes en el hipotálamo que son críticos para la reproducción, como es el caso del receptor de progesterona (Kelly y col., 2005). En el hipotálamo el estradiol ejerce un efecto bimodal directo sobre las neuronas GnRH, que involucraría regiones hipotalámicas diferentes y procesos independientes. La acción negativa del estradiol se produciría en el núcleo arqueado (ARC) y en la EM mientras que la retroalimentación positiva tendría lugar en el APO y el núcleo supraquiasmático (NSQ). Cabe aclarar que el estradiol también modula a las neuronas GnRH de manera indirecta mediante la modulación de neuronas que expresan kisspeptina (Kiss). Estas células se ubican en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) y en el ARC, y promueven la liberación de GnRH por las células homónimas que expresan el receptor de Kiss (Pielecka-Fortuna y col., 2008). En la mayoría de los mamíferos se ha descrito que las neuronas GnRH no expresan RE α , mientras que las neuronas Kiss sí lo hacen; por lo tanto, Kiss actuaría como mediador en la retroalimentación por estrógenos sobre las neuronas GnRH (Herbison y Theodosis, 1992; Herbison y Pape, 2001; Franceschini y col., 2006). Sin embargo, algunos trabajos describen la expresión del RE α en neuronas GnRH del APO de la rata (Butler y col., 1999) y en líneas celulares que expresan GnRH (Shen y col., 1998; Roy y col., 1999). En esta línea, cabe destacar que nuestro equipo de trabajo ha demostrado la expresión de RE α en neuronas GnRH del APO medial y NSQ en la vizcacha de las llanuras de Sudamérica (Inserra y col., 2017). Se hipotetizó que la acción directa del E $_2$, a través del RE α en neuronas GnRH, representaría una estrategia reproductiva diferencial en la vizcacha para garantizar la síntesis de GnRH durante la preñez, donde estas neuronas sentirían el estradiol circulante (Dorfman y col., 2016; Inserra y col., 2017). Los efectos de los estrógenos en la hipófisis varían con la especie. En humanos han sido descritas respuestas antagónicas del estradiol sobre la secreción de gonadotropinas, observándose por un lado una reducción de la sensibilidad de LH y FSH a GnRH (Rossmanith y col., 1994; Shaw y col., 2010), y por otro una estimulación de la liberación de FSH y LH (Monroe y col., 1972). En la rata, el estradiol estimula la secreción de LH (Legan y col., 1975; Yin y col., 2002) pero no de FSH (Strobl y Levine, 1988; Bhatnagar y col., 1993), mientras que en las ovejas ejerce una acción inhibitoria sobre FSH, induce la liberación de LH, e incrementa la respuesta hipofisaria a GnRH por aumento en la expresión de los RGnRH (Nett y col., 1984, 2002; Gregg y col., 1990).

La progesterona de origen lúteo modula diferentes regiones del cerebro, a través de su unión a sus receptores. Existen dos formas de receptores nucleares/citoplasmáticos denominados

PRA y PRB (éste último de mayor extensión que el primero), mientras que en el humano se presenta una tercer isoforma que modularía la actividad transcripcional de los otros dos receptores (Wei y col., 1990, 1996), y se ha descrito la existencia receptores de membrana cuya acción es no genómica (Krebs y col., 2000; Zhu y col., 2003). PRA y PRB son codificados por el mismo gen pero se transcriben a partir de promotores diferentes y su traducción inicia en sitios diferentes del ARNm (Conneely y col., 1987). Estos receptores pueden regularse entre sí, habiéndose descrito la supresión de la expresión de PRB por PRA (Gao y col., 2000). Además, ambas isoformas pueden ser moduladas por estradiol (como se mencionó anteriormente). Su estructura general consiste en una región N-terminal variable, un dominio conservado de unión al ADN, una región bisagra y un dominio de unión al ligando (Conneely y col., 1987). Se ha descrito la localización hipotalámica de PRs en el APO y los núcleos ventromedial (NVM), dorsomedial (NDM) y ARC (Kato y col., 1994; Auger y De Vries, 2002). Allí, la progesterona disminuye la frecuencia de los pulsos de liberación de GnRH (Karsch y col., 1987; Wu y col., 1994; Skinner y col., 1998), aunque no altera la transcripción su gen (Robinson y col., 2000). En la hipófisis, la progesterona reduce la frecuencia de pulsos de LH y modula la expresión del RGnRH pero no la elimina. Por ejemplo, en la oveja, la progesterona previene el efecto estimulante del estradiol sobre la expresión del RGnRH (Sealfon y col., 1990; Turzillo y col., 1998). Los PRs modulan también la conducta reproductiva, dado que se observó que facilita el comportamiento de lordosis en ratas hembras (Blaustein y Mani, 2007).

Además de la acción del estradiol ovárico, el hipotálamo se ve modulado por estradiol de síntesis local, denominado neuroestradiol. La enzima aromatasa hipotalámica convierte andrógenos (androstenediona o testosterona) en estrógenos (estradiol o estrona). Éstos son secretados al espacio extracelular, donde alcanzan concentraciones locales 100 veces mayores e independientes a la de los estrógenos ováricos circulantes (Terasawa y Kenealy, 2012). La conversión local dentro o cerca de las células blanco es necesaria para la diferenciación cerebral, el control sobre las gonadotropinas, el dimorfismo y la conducta sexuales, como plantea la "hipótesis de aromatización" (Naftolin y col., 1975, 1977; Arnold y Gorski, 1984; Naftolin y MacLusky, 1984; Naftolin, 1994; Breedlove, 1992). Se ha descrito la localización de la aromatasa en el hipotálamo, tanto en neuronas (somas, procesos neuronales, botones sinápticos y terminales presinápticas) como en células de la glía (Naftolin y col., 1996; Stanic y col., 2014). La glía sintetiza estrógenos en respuesta al daño por isquemia, integrando un mecanismo de neuroprotección y recuperación neuronal (Carswell y col., 2005), mientras que el neuroestradiol de origen neuronal ejercería función de neurotransmisor (Balthazart y Ball, 2006). De hecho, el comportamiento reproductivo puede ser regulado por cambios rápidos en la disponibilidad de neuroestradiol gracias a la veloz modulación (minutos a segundos) que puede sufrir la enzima (Balthazart y col., 2001, 2006; Cornil y col., 2005, 2006; Cornil y Charlier, 2010), pues es poco probable que los cambios en la síntesis de estrógenos ováricos sean

tan dinámicos como para explicar las respuestas fisiológicas rápidas en el cerebro (Balthazart y Ball, 2006). A nivel reproductivo, el neuroestradiol causa una acción excitatoria inmediata sobre las neuronas GnRH, a través de la activación de receptores de membrana (Terasawa y Kenealy, 2012). Hasta el momento, no existen trabajos que determinen si el neuroestradiol afecta directamente la síntesis de GnRH hipotalámica en mamíferos. Se ha descrito en primates que la secreción de GnRH desde la EM puede ser regulada de manera positiva mediante neuroestradiol (Kenealy y col., 2013). Por otro lado, el mismo grupo de trabajo ha observado que los niveles de estrona y estradiol sintetizados localmente disminuyen previo al inicio de la pubertad, con un consecuente aumento en la liberación de GnRH (Kenealy y col., 2016). Esto representaría un mecanismo de inhibición central de la liberación de GnRH hasta el inicio de la pubertad, presumiblemente por estimulación mediante neuroestradiol de neuronas GABAérgicas y que expresan neuropéptido Y (NPY) (Keen y col., 1999). Una vez iniciada la actividad esteroideogénica ovárica en la pubertad, los niveles de neuroestradiol serían modulados por el estradiol gonadal mediante la regulación de la expresión de la aromatasas; esto implicaría una interacción entre ellos bajo ciertas condiciones fisiológicas, resultando en efectos positivos o negativos sobre la liberación de GnRH (Roselli y col., 1997; Kenealy y col., 2013).

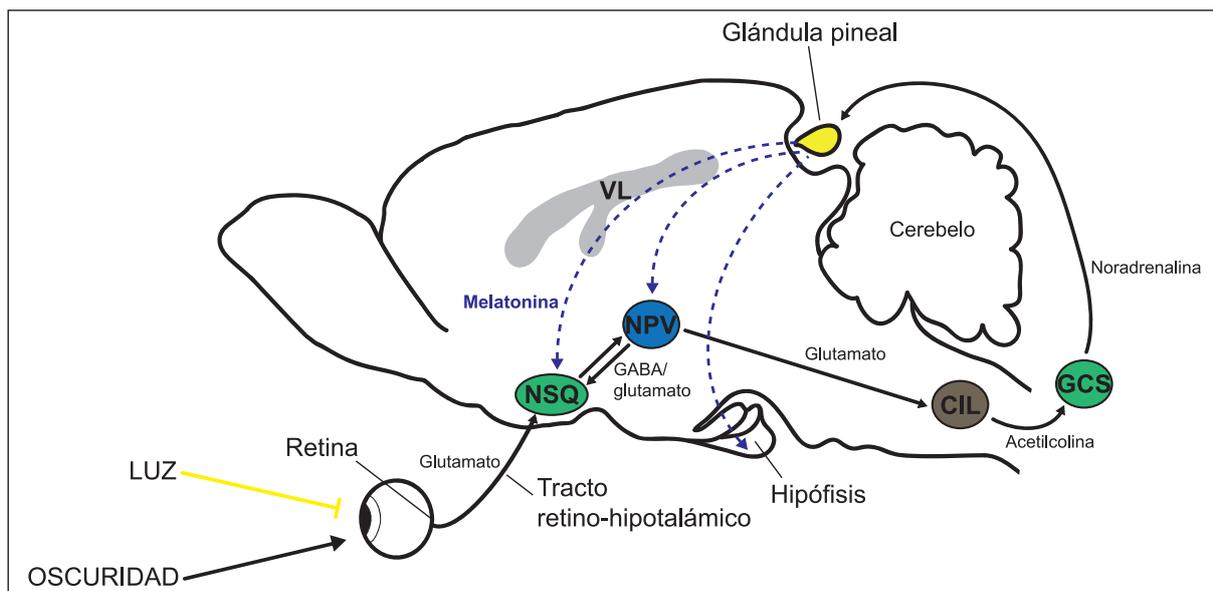
3.2 EL FOTOPERÍODO AMBIENTAL Y LA MELATONINA

El fotoperíodo es la duración relativa de los períodos de luz y de oscuridad a la que está expuesto un animal (Wehr, 1991). Constituye la principal información ambiental que indica la época del año y la estación venidera, a diferencia de otras características como las precipitaciones o la temperatura. Dicha señal es traducida e interpretada por una vía neuroendócrina: la luz ambiental es detectada por las células ganglionares de la retina, que envían la información hacia el NSQ a través del tracto retinohipotalámico, de allí viaja al núcleo paraventricular (NPV), y luego, vía la columna de células intermediolaterales hacia el ganglio cervical superior cuyas fibras noradrenérgicas conectan con la glándula pineal (Berson y col., 2002; Pandi-Perumal y col., 2008) (**Figura 5**). En ausencia de luz, neuronas glutamatérgicas del NSQ estimulan al NPV, induciendo la síntesis y secreción de la hormona melatonina (Aleandri y col., 1996); en presencia de luz, la vía se encuentra inhibida por efecto de neuronas GABAérgicas provenientes del NSQ, y no tienen lugar la síntesis y liberación de melatonina (Kalsbeek y col., 1999, 2000). Sin embargo, existen otros factores que modulan el contenido de melatonina, incluyendo al estradiol y la progesterona (Houssay y Barcelo, 1972; Cardinali y col., 1987).

La melatonina deriva del aminoácido triptófano, y es sintetizada por los pinealocitos de la glándula pineal. Este órgano presenta varias formas, localizaciones y modos de regulación entre los diferentes *phyla*. La secreción de melatonina ocurre durante la fase oscura del

fotoperíodo (noche subjetiva), y su amplitud se correlaciona con la duración de la misma, persistiendo por 8 horas, hasta que decae una vez iniciada la mañana y permanece en niveles bajos por 16 horas más (Witt-Enderby y col., 2003). El efecto de esta hormona sobre la actividad del eje reproductivo es especie-específico. Por ejemplo, en las hembras de oveja, la melatonina induce la secreción de la hormona luteinizante (LH), pero solamente si representa un pulso característico de un fotoperíodo corto (otoño/invierno) (Bittman y col., 1985). Contrariamente, en el hámster, cuya reproducción ocurre en meses de días largos (primavera/verano), la melatonina ejerce un efecto inhibitorio en la actividad del eje H.H.G. El humano, la rata y el ratón son casos donde la reproducción no tiene lugar de manera estacional; en estas especies, la melatonina inhibe la actividad del eje reproductivo (Aleandri y col., 1996; Prendergast y col., 2001). Por lo tanto, existen especies reproductoras de día largo (fotoperíodo positivas) y reproductoras de día corto (fotoperíodo negativas). En los animales de reproducción estacional, el eje H.H.G. únicamente se activa cuando inicia la época reproductiva y el control de su actividad asegura que la descendencia nazca en el momento más favorable, cuando los recursos son más abundantes.

FIGURA 5. VÍA DE ACCIÓN DEL ESTÍMULO LUMÍNICO



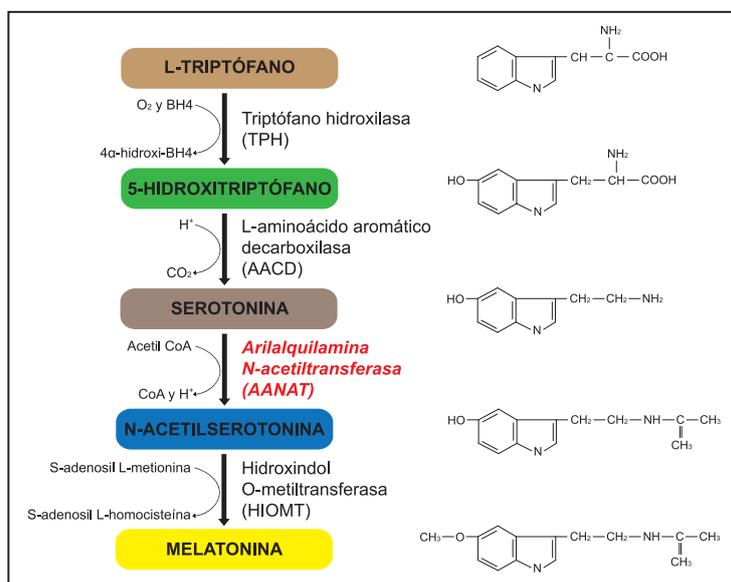
Esquema de la vía de acción del estímulo lumínico sobre el control de la síntesis de melatonina. En presencia de luz (por ejemplo, a la mañana), la señal glutamatérgica desde el tracto retino-hipotalámico estimula la actividad inhibitoria del núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalámico que a su vez, mediante el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA), inhibirá la acción estimulante del núcleo paraventricular (NPV). En consecuencia, afectará negativamente a las células de la columna intermediolateral (CIL) de la médula espinal, al ganglio cervical superior (GCS) y la glándula pineal no secretará melatonina. En ausencia de luz (por ejemplo, durante la noche), las neuronas glutamatérgicas del NSQ estimularán la acción estimulante del NPV, y con ello, la secreción de melatonina. Flechas negras continuas: vía nerviosa. Flechas discontinuas azules: vía sanguínea. Flecha amarilla troncada: efecto inhibitorio de la luz. *Adaptado de Richter y col. (2004) y Borjigin y col. (2012).*

3.2.1 Síntesis de melatonina.

El aminoácido esencial L-triptófano es el sustrato inicial para la síntesis de melatonina; la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) lo metaboliza a 5-hidroxitriptófano y éste es convertido a serotonina por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AACD). Las enzimas más importantes de esta vía son la arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), denominada también serotonina N-acetiltransferasa (S-NAT), que transfiere un grupo acetilo del acetil coenzima A a la serotonina, obteniéndose N-acetilserotonina, y la hidroxindol O-metiltransferasa (HIOMT), que convierte N-acetilserotonina en melatonina (Simonneaux y Ribelayga, 2003; Lewczuk y col., 2014) (**Figura 6**). Debido a que en la mayoría de las especies la luz determina los cambios en la actividad de AANAT, y que éstos se asemejan a las variaciones en la producción de melatonina, esta enzima es considerada como la limitante para la síntesis de esta hormona y demuestra la precisión de la glándula pineal como transductor endócrino (Klein y Weller, 1972; Klein y col., 1997). Los peces presentan múltiples genes para esta enzima, resultado de duplicaciones génicas durante la divergencia de teleósteos y tetrápodos, y se expresan diferencialmente en la glándula pineal, la retina y el cerebro, mientras que en aves y mamíferos existe un solo gen para la enzima, y se expresa en la glándula pineal, la retina y el ovario (Falcon y col., 2010; Zilberman-Peled y col., 2011; Sakaguchi y col., 2013).

En los roedores, la regulación de la transcripción del gen de AANAT determina el ritmo de síntesis de melatonina; se ha observado que existen diferencias drásticas en los niveles de su ARNm entre el día y la noche, y que su acumulación es directamente correspondida con aumentos en los niveles y actividad enzimáticos. A esta modulación se le suma un vertiginoso control post-transcripcional que involucra mecanismos de estabilización y de proteólisis (por ejemplo, ante la exposición a la luz). Gracias a una veloz degradación enzimática, la síntesis de melatonina puede disminuir muy rápidamente sin perturbar los niveles de su ARNm, hecho que tiene lugar en momentos cercanos al fin de la fase oscura (Klein y Weller, 1972; Borjigin y col., 1995; Roseboom y col., 1996; Maronde y col., 1999). Otro tipo de control tiene lugar en los ungulados (ovinos y bovinos) y en el humano, en los que se observó que los niveles de ARNm de AANAT varían mínimamente entre el día y la noche. Esto se explica a partir de que su gen sufre una transcripción constitutiva, seguida por una síntesis proteínica de manera continua y la inmediata destrucción de la misma mediante proteólisis proteosomal. Ante un estímulo adrenérgico (por ejemplo, al inicio de la fase oscura), la enzima AANAT sufre un proceso de protección contra la proteólisis, acumulándose y aumentando su actividad. Esto indica, además, que en estas especies los mecanismos transcripcionales no son relevantes en cuanto a la regulación de la síntesis de melatonina (Coon y col., 1995; Klein y col., 1997).

FIGURA 6. ETAPAS DE LA SÍNTESIS DE LA MELATONINA



La síntesis de melatonina en la glándula pineal involucra al aminoácido esencial L-triptófano como sustrato inicial, y una serie de pasos de conversión enzimática. La enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT, en rojo) está sujeta a regulación por el fotoperíodo ambiental, por lo que es considerada limitante de la vía. Una vez sintetizada, la melatonina es secretada principalmente al torrente sanguíneo. *Adaptado de Simmoneaux y Ribelayga (2003) y Lewczuk y col. (2014).*

3.2.2 Los receptores de melatonina.

Se han descrito tres receptores de membrana que unen melatonina: MT_1 , MT_2 y MT_3 . Los dos primeros son receptores acoplados a proteína G presentes en la mayoría de las especies de mamíferos (exceptuando a la oveja y el hámster, que carecen de expresión de MT_2), y poseen funciones relacionadas y no relacionadas con la reproducción. El tercero pertenece a la familia de las quinonas reductasas, se expresa en aves, peces y anfibios, y su acción está ligada al sistema inmunológico. Existen, además, tres miembros pertenecientes a la subfamilia RZR/ROR de receptores huérfanos nucleares ($ROR\alpha$, $RZR\beta$ y $ROR\gamma$) que actúan como factores de transcripción reguladores de la expresión de diversos genes no relacionados con el control de la reproducción. Por último, se ha descrito un receptor relacionado a melatonina (*melatonin-related receptor* o GPR50), el cual, si bien no puede unir melatonina, se encuentra estructuralmente relacionado a MT_1 y MT_2 , y presenta una función inhibitoria de MT_1 (Reppert y col., 1996; Levoe y col., 2006).

De los 3 receptores de membrana capaces de unir melatonina, MT_1 es el más ubicuo; en el sistema nervioso, su expresión ha sido reportada en hipotálamo, cerebelo, hipocampo, corteza cerebral, hipófisis y en estructuras ováricas, entre otros (Ayre y Pang, 1994; Niles y col., 1999; Clemens y col., 2001; Soares y col., 2003; Dubocovich y col., 2010). El gen que lo codifica se localiza en el cromosoma 4 en humano, en el cromosoma 8 en ratón y en el

cromosoma 26 en la oveja (Slaugenhaupt y col., 1995; Roca y col., 1996; Messer y col., 1997). La activación de MT_1 resulta en efectos diversos, tales como vasoconstricción, inhibición del disparo neuronal y cambio de fase en los ritmos de actividad circadiana. La variedad de sus respuestas podría atribuirse a que este receptor puede unir diferentes proteínas G (Brydon y col., 1999a; Witt-Enderby y col., 2001). El mecanismo de acción intracelular consiste en la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, afectando así a la cascada de transducción de señales mediada por AMPc, con disminución de la actividad de la proteína quinasa A (PKA) y por consiguiente de la fosforilación de CREB (Reppert y col., 1994; Witt-Enderby y col., 1998). Por otro lado, la activación de este receptor puede estimular una vía de transducción dependiente de fosfolipasa C (PLC), con activación de la proteína quinasa C (PKC), y puede modular la actividad de las quinasas JNK y MAP. Además, se ha demostrado que MT_1 regula la actividad de canales iónicos específicos (Jiang y col., 1995; Geary y col., 1998; Brydon y col., 1999b). Esto es de particular relevancia en cuanto a la modulación de núcleos neuronales involucrados en el control de la reproducción, como sucede con el núcleo supraquiasmático hipotalámico (Vanecek y col., 1987). En cuanto al receptor MT_2 , el gen que lo codifica en el humano se ubica en el cromosoma 11, mientras que en el ratón se encuentra en el cromosoma 9; si bien no se ha determinado experimentalmente la ubicación del gen que codifica para MT_2 en la oveja, existen indicios de su expresión, a muy bajo nivel, a partir de experimentos con radioligandos selectivos (Legros y col., 2016), PCR (Cogé y col., 2009) y mediante inmunohistoquímica (Casao y col., 2012). Tanto el hámster sirio como el siberiano carecen de un receptor MT_2 funcional debido a la presencia de dos mutaciones sin sentido en la región codificante (transformándolo así en un pseudogen) (Weaver y col., 1996). En el resto de las especies, MT_2 se expresa en el NSQ, retina, riñón, ovario, vasos cardíacos y cerebelo (Witt-Enderby y col., 2003; Dubocovich y col., 2010). Dentro de sus funciones tisulares se encuentran la vasodilatación, inhibición de la liberación de dopamina en la retina, y cambio de fase en los ritmos circadianos de disparo neuronal (Dubocovich y col., 2010). Se ha descrito que puede tener lugar la formación de homo- y heterodímeros de los receptores de MT_1 y MT_2 , con afinidad diferente de acuerdo a su combinación, lo que representaría un mecanismo regulatorio de los efectos de la melatonina (Ayoub y col., 2002; Hirsch-Rodriguez y col., 2007). Esto es de particular importancia en células que en su estado nativo co-expresan MT_1 y MT_2 , como neuronas de la corteza cerebral occipital o los pinealocitos, estructuras donde la proporción de estos receptores se ve afectada en patologías como la Enfermedad de Alzheimer o ante un tratamiento prolongado con antidepresivos (Brunner y col., 2006; Imbesi y col., 2006a; Imbesi y col., 2006b; Imbesi y col., 2008).

La regulación de la expresión y el funcionamiento de los receptores de melatonina puede ser homóloga (esto es, por la misma melatonina) o heteróloga (por otros estímulos como el estradiol o el fotoperíodo) (Witt-Enderby y col., 2003). Tanto en líneas celulares como en

el NSQ, la exposición prolongada a la melatonina (como sucede en durante la secreción nocturna) desencadena un proceso de desensibilización e internalización de MT_2 (Gerdin y col., 2004a). En el caso de MT_1 , la desensibilización ocurre frente a concentraciones suprafisiológicas de melatonina, pero no tiene lugar la internalización del receptor (Gerdin y col., 2004b). La sensibilidad de los receptores ante la melatonina es mayor durante las horas de luz, mientras que por la noche, cuando los niveles de melatonina son elevados, la potencia de los receptores disminuye, probablemente por los procesos de desensibilización, internalización y desacople de sus efectores (Witt-Enderby y col., 2003). Este mecanismo permite un ajuste rápido y fino ante las oscilaciones de los niveles de melatonina (por ejemplo, en la transición noche-amanecer). El fotoperíodo es un factor importante en la modulación de los receptores de melatonina, y actúa de manera tejida y especie-específica. En el hámster siberiano (una especie altamente fotoperiódica) los niveles proteicos de los receptores de melatonina en el NSQ son independientes de los ciclos luz/oscuridad. Contrariamente, en la rata (una especie no fotoperiódica) la luz incrementa la densidad de los receptores en el NSQ, permaneciendo disminuída en la noche incluso en animales pinealectomizados; esto implicaría una regulación endógena de los receptores independiente de melatonina (Gauer y col., 1992; Masson-Pévet y col., 2000). Se ha descrito que, en la pars tuberalis del hámster siberiano, la luz incrementa la expresión del ARNm y proteína de MT_1 , mientras que en la rata las oscilaciones circadianas en los niveles de MT_1 dependen de la melatonina, pues se observó que la densidad de sus receptores es baja cuando los niveles de melatonina son elevados en la noche y se anulan con la pinealectomía o con la exposición a luz constante (Gauer y col., 1992, 1993, 1994; Masson-Pévet y col., 2000; Poirel y col., 2002; Sallinen y col., 2005; Waly y col., 2015). Por último, los estrógenos regulan la expresión de los receptores de melatonina; en el ovario de rata se ha determinado una reducción en la expresión de MT_1 luego de la exposición a estradiol (Clemens y col., 2001), mientras que en el hipotálamo ha sido descrito que el estradiol reestablece los niveles de los receptores de melatonina luego de una ovariectomía (Laudon y Zisapel, 1987; Zisapel y col., 1987). En líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), el estradiol afecta diferencialmente a los receptores de melatonina, en las que activa a MT_1 y atenúa su efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc, e incrementa la densidad de MT_2 (Masana y col., 2005).

3.3 EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: UN RELOJ CIRCADIANO CENTRAL.

Todos los órganos poseen un mecanismo endógeno rítmico que modula su funcionamiento a través del control de la transcripción, traducción y degradación de un grupo de proteínas “reloj”, cuya periodicidad es de 24 horas (Reppert y col., 2002). A su vez, en los mamíferos esta ritmicidad circadiana es sincronizada por la acción de un grupo de neuronas marcapasos

centrales localizadas en NSQ hipotalámico. El NSQ es una estructura bilateral, pareada y ovalada, cuya localización es lateral e inmediata al tercer ventrículo, y abarca toda la extensión rostrocaudal del quiasma óptico (Cassone y col., 1988; Morin y col., 2013). Como característica general, distintiva y conservada entre los grupos de mamíferos, presenta dos subdivisiones anatómicas (un “núcleo” y una “corteza” interconectados, que expresan marcadores distintivos), y está compuesto por neuronas compactas de diámetro pequeño y de organización densa (Welsh y col., 2010). La actividad de estas células es espontánea, siendo mayor durante el día, y puede ser modulada por diferentes estímulos externos (principalmente la luz ambiental) e internos (por ejemplo, la melatonina de origen pineal).

3.3.1 El núcleo supraquiasmático y el control de la reproducción.

La ovulación es regulada a nivel central por el NSQ, el cual, mediante proyecciones hacia el APO, modula la actividad de las neuronas GnRH, que a su vez emiten proyecciones hacia el NSQ (Jennes y Stumpf, 1980; Merchenthaler y col., 1984; Van der Beek y col., 1997). De esta manera, existe una reciprocidad de modulación entre el eje reproductivo y el sistema regulador del ciclo circadiano (Van der Beek y col., 1997).

La activación del eje reproductivo en un momento dado, depende de la combinación de niveles hormonales propicios con la actividad eléctrica neuronal por encima de los niveles basales, dependiendo ello de la información que proviene del ambiente. Este balance implica que si bien los niveles adecuados de estrógenos y progesterona generan un ambiente óptimo para la liberación de GnRH, es necesaria una señal temporal desde el NSQ para gatillar la liberación de esta hormona y alcanzar los niveles requeridos para estimular la oleada de LH (Everett y Sawyer, 1950; Miller y Takahashi, 2014). Por otro lado, se ha demostrado que la secreción de GnRH hipotalámica se da sólo si el estradiol se encuentra presente, y por un período mayor a 24 horas y menor a 48 horas. Esto se debe a una variación en la actividad eléctrica del NSQ y por lo tanto de las neuronas GnRH, causada por un incremento de la expresión de canales iónicos de membrana (Chapell y col., 2000; Funabashi y col., 2000). Asimismo, se observó que el efecto de la progesterona luteal sobre estas neuronas depende de la duración de la exposición previa a estrógenos, y que los pulsos de GnRH continúan a lo largo del proestro, incrementándose conforme progresa el ciclo estral (Chapell y col., 2000). De esto se desprende que la respuesta al estradiol por parte de las neuronas GnRH depende de los niveles presentes de esa hormona esteroidea, y que la misma reside en la modulación del patrón circadiano de actividad neuronal, permitiendo así que ocurran oleadas hormonales definidas en el tiempo.

3.4 EL MODELO DE ESTUDIO: LA VIZCACHA.

Lagostomus maximus (vizcacha de las llanuras de Sudamérica) es un roedor caviomorfo que pertenece al suborden Hystriognathi, que integra junto con los géneros *Lagidium* (vizcacha de la montaña) y *Chinchilla* (chinchilla) la familia Chinchillidae (Llanos y Crespo, 1952; Weir, 1970). Su distribución abarca la región de las Pampas y las regiones semiáridas del Monte y Chaqueña de Argentina, y sur de Bolivia y Paraguay (Cabrera y Yepes, 1960; Cabrera, 1961; Weir, 1970; Redford y Eisenberg, 1992). Este roedor forma colonias (compuestas por 1 a 3 machos adultos, el cuádruple de hembras adultas y las crías en desarrollo) que habitan bajo tierra en un sistema de madrigueras comunales conectadas por galerías denominado “vizcachera”, ubicada hasta más de 2 metros de profundidad (Llanos y Crespo, 1952; Jackson y col., 1996). Los animales emergen de ella al anochecer, desarrollan su actividad durante la noche (alimentándose de la vegetación circundante) y regresan al amanecer (Llanos y Crespo, 1952; Branch, 1993; Weir, 1971b). La esperanza de vida de la vizcacha se estima de 7 a 8 años, y las hembras son sexualmente activas a los 153.7 ± 3.4 días de edad (Weir, 1971b). Su reproducción es estacional con un ciclo estral de entre 40 y 45 días, iniciándose con la perforación de una membrana de oclusión vaginal, y la duración de la apertura vaginal por aproximadamente 7 días; el apareamiento se evidencia por la presencia de sangre en la abertura vaginal y la aparición de un tapón copulatorio o la observación de espermatozoides en el extendido vaginal (Weir, 1971b). Además, tienen lugar 2 ciclos reproductivos, uno principal (de marzo a septiembre, con apareamiento entre marzo y abril) y uno de menor actividad (de octubre a febrero, con apareamiento en octubre) (Weir, 1970; Weir, 1971b; Jackson, 1989; Branch y col., 1993). La gestación tiene una duración media de 153.7 ± 0.5 días y las crías nacen desarrolladas (cubiertas de pelo y con los ojos abiertos), las cuales lactarán durante las primeras dos semanas (Weir, 1970). Puede presentar un estro post-parto que depende de la sobrevivencia y lactancia de las crías. Si éstas mueren, el estro tiene lugar aproximadamente a los 17 ± 3.6 días posteriores, pero la aparición del estro se dilata si ocurre el amamantamiento (a los 55.9 ± 3.7 días) (Weir, 1970, 1971b).

La fisiología reproductiva de la hembra de la vizcacha fue descrita inicialmente por Weir en la década de 1970, a partir de estudios minuciosos de una colonia desarrollada en Inglaterra a partir de animales nativos de Argentina. En su trabajo de 1971 describe un útero bicorne, con una vagina alargada y sellada en la vulva por una membrana de oclusión, y la presencia de un tabique longitudinal que divide a la vagina desde su extremo superior; los ovarios, aplanados y en forma de “hoja” según la autora, presentan una superficie sumamente invaginada y convoluta (Weir, 1971a), lo que permitiría albergar un gran número de células germinales (Jensen y col., 2006). *L. maximus* exhibe poliovulación masiva natural, y libera hasta 800 oocitos por ciclo estral, la mayor tasa ovulatoria descrita hasta el momento

FIGURA 7. HEMBRA ADULTA DE VIZCACHA (*Lagostomus maximus*)

La vizcacha de las llanuras de Sudamérica (*Lagostomus maximus*) es un roedor histricomorfo de hábitos nocturnos, cuya distribución abarca Paraguay, Bolivia y Argentina. En nuestro país, la subespecie utilizada en el presente trabajo (*Lagostomus maximus maximus*) habita en las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Entre Ríos, Corrientes y Santa Fe. Las hembras adultas tienen un peso promedio de 4 kilogramos y una longitud promedio de 64.1 centímetros. Adaptado de Llanos y Crespo (1952) y Jackson y col. (1996). Fotografía cortesía de Ramiro Comisso (Aurora del Palmar, Colón, Provincia de Entre Ríos, Argentina, 2015).

para un mamífero (Weir, 1971a, 1971b; Jackson y col., 1996). Además, se ha descrito una implantación tardía de hasta 6 embriones por cuerno uterino, de los cuales sobrevivirán sólo los dos embriones implantados más cerca del cérvix, mientras que el resto sufrirá un proceso de reabsorción progresiva selectiva alrededor del día 70 de gestación (Weir, 1971b; Roberts y Weir, 1973; Jensen y col., 2008). Otras particularidad reproductiva de este animal es la supresión constitutiva de la atresia folicular por apoptosis (Jensen y col., 2006; Leopardo y col., 2011; Inserra y col., 2014), la formación continua de folículos pre-ovulatorios durante la preñez y un evento de pseudo-ovulación a la mitad de la gestación (alrededor del día 100 de gestación), con generación de cuerpos lúteos secundarios accesorios que retienen el oocito y presentan actividad esteroideogénica (Jensen y col., 2008; Dorfman y col., 2013; Fraunhofer Navarro, 2014). Esto se opone a lo descrito clásicamente en la mayoría de las hembras de mamíferos, donde el funcionamiento del eje H.H.G. sufre un proceso de inhibición o desactivación durante la gestación, debido a la acción de neurotransmisores como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Adler y Crowley, 1986; Herbison y Dyer, 1991) y a esteroides sexuales ováricos como la progesterona y el estradiol (Wildt y col., 1981; Beshay y Carr, 2013). Debido al extenso período gestacional de la vizcacha, los cuerpos lúteos secundarios formados durante la preñez aportarían niveles significativos de progesterona que impedirían la reabsorción de todos los fetos (Jensen y col., 2008). Nuestro grupo de trabajo ha descrito

la expresión de GnRH en diversos núcleos y áreas hipotalámicas, como el APO, NSQ y el núcleo supraóptico (NSO), así como en varicosidades axónicas en el APO, NVM, ARC y EM (Dorfman y col., 2011; Inserra y col., 2017). Particularmente, el NSO de la vizcacha (al igual que lo descrito en el cerdo, otro mamífero poliovulador) presenta inmunorreactividad para GnRH, a diferencia de lo que sucede en otros mamíferos (Kineman y col., 1988; Dorfman y col., 2011, 2013; Inserra y col., 2017). Además, hemos demostrado la presencia de receptores de hormonas esteroideas (PRs, RE α y RE β) en neuronas GnRH del APO, NSQ y NSO, hecho significativo que difiere de lo descrito para el resto de los mamíferos, e indicaría la existencia de una vía de regulación directa para la expresión de GnRH en el hipotálamo de la vizcacha (Dorfman y col., 2013; Inserra y col., 2017). Esta modulación particular posibilitaría la rápida reactivación del eje reproductivo durante la preñez, lo cual sería fundamental para lograr una gestación prolongada exitosa. La drástica disminución de la progesterona sérica alrededor del día 70 de gestación marcaría dos etapas bien definidas durante la preñez, eliminando la retroalimentación negativa por progesterona. Esto permitiría, a su vez, el aumento de los niveles séricos de FSH, E₂ y LH a partir del día 90 de gestación, la ovulación y formación de nuevos cuerpos lúteos entre los días 100 y 120 de gestación, y la producción de una nueva oleada progesterona de origen lúteo, que se mantiene elevada hasta el final de la preñez. En esa etapa, los niveles séricos de progesterona descienden pronunciadamente, gatillando el parto (Fraunhoffer y col., 2017)

En base a las características endócrinas únicas y particulares que presenta la vizcacha, ésta representa un modelo valioso para el estudio de mecanismos alternativos de regulación neuroendócrina de la reproducción. Dada su particular fisiología, este animal permitiría ahondar en los factores que modulan la actividad del eje H.H.G., el proceso ovulatorio y la fertilidad, así como determinar su rol respecto de otras estrategias reproductivas diferentes a las comúnmente descritas y aceptadas en mamíferos.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4

El objetivo general de este trabajo fue **estudiar la influencia del fotoperíodo sobre el funcionamiento del eje H.H.G. de la vizcacha, con el fin de comprender las bases neuroendócrinas que posibilitan la poliovulación y la pseudo-ovulación durante la gestación.**

Para ello se plantearon y llevaron a cabo los siguientes objetivos particulares y sus respectivas hipótesis de trabajo:

1. Determinar la secuencia nucleotídica codificante de la prepro-hormona liberadora de gonadotrofinas (prepro-GnRH) en el hipotálamo de la vizcacha.
 - ▶ *Hipótesis particular: la secuencia nucleotídica del ARN mensajero de la prepro-hormona liberadora de gonadotrofinas (prepro-GnRH) hipotalámica de la vizcacha sería similar a la de otros roedores emparentados.*
2. Identificar variaciones en el nivel de expresión de las hormonas GnRH hipotalámica, LH, FSH, E_2 y P_4 relacionadas con la disponibilidad de luz/oscuridad.
 - ▶ *Hipótesis particular: los niveles de las hormonas hipotalámicas (GnRH), hipofisarias (LH y FSH) y ováricas (E_2 y P_4) variarían en función de la disponibilidad lumínica.*
3. Investigar la expresión de MT_1 , MT_2 , $RE\alpha$, $RE\beta$, RLH, AANAT y los niveles séricos de melatonina, en el hipotálamo, la hipófisis, la glándula pineal y los ovarios durante la preñez y su relación con la disponibilidad lumínica.
 - ▶ *Hipótesis particular: los niveles de expresión de los receptores MT_1 y MT_2 , de AANAT y de melatonina variarían a lo largo de la gestación en todo el eje reproductivo, así como en función de la disponibilidad lumínica.*
4. Estudiar la acción de melatonina sobre la secreción de GnRH y LH en cultivos de explantos hipotalámicos e hipofisarios, respectivamente, suplementados con melatonina o con antagonistas de sus receptores.
 - ▶ *Hipótesis particular: en la vizcacha, la liberación de GnRH hipotalámica y de LH hipofisaria se vería afectada por acción de la melatonina.*
5. Estudiar la interacción entre melatonina y estrógenos sobre la síntesis y liberación pulsátil de GnRH
 - ▶ *Hipótesis particular: la liberación de GnRH hipotalámica de vizcacha estaría modulada por la acción combinada de melatonina y estrógenos.*

MATERIALES Y MÉTODOS

5

5.1 ÉTICA

Los protocolos experimentales desarrollados fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (con fecha de aprobación 23/11/2015), y por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de la Universidad Maimónides (Resolución N° 7/2013). La manipulación y sacrificio de los animales fueron realizados en conformidad con los estándares internacionales de uso de animales de experimentación, definidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) (NIH 1985, NRC 2011) y en la Guía para el Uso y Cuidado de Animales Silvestres del Consejo Canadiense de Protección de los Animales (CCAC, 2003). Los procedimientos fueron diseñados para optimizar las muestras y minimizar el número de los animales empleados y su sufrimiento. Los tejidos que no se usaron para el desarrollo del presente trabajo, como el útero, músculo, las mamas, cerebros, embriones y otras glándulas, fueron utilizados por otros miembros del equipo de investigación.

5.2 CAPTURA Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES

Se utilizaron vizcachas hembras adultas, provenientes de una población natural establecida en la Estación de Cría de Animales Silvestres (ECAS, Villa Elisa, Buenos Aires), dependiente de la Dirección de Flora y Fauna del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires (Argentina), con quien la Universidad Maimónides ha establecido un convenio de colaboración. Los animales fueron capturados a campo mediante el uso de trampas de captura viva ubicadas en los accesos de las vizcacheras, por personal entrenado del ECAS, y se albergaron en jaulas dentro de un corral, donde fueron alimentadas con fardo de alfalfa y agua y cuidadas, hasta el momento del traslado hacia la Universidad Maimónides. El traslado se realizó en jaulas para ovejas con reja frontal, tapadas con una lona (de manera de evitar el stress lumínico del transporte) dentro de una camioneta con aire acondicionado. Al llegar al Centro de Investigación y Desarrollo de Modelos Experimentales (CIDME) de la Universidad Maimónides, los animales se alojaron en una sala exclusiva para vizcachas con un sistema de extracción de aire continua, temperatura ambiental de 23-25°C y condiciones lumínicas de 14 horas de luz tenue y 10 horas de luz azul (luz de luna), salvo que se indique lo contrario. Dentro de la sala, las vizcachas se ubicaron en jaulas de 1 m³ de capacidad que pueden albergar hasta 4 animales, con un sector oscuro para simular la vida subterránea, y con una bandeja removible con cama de material absorbente para su limpieza diaria. En el caso del alojamiento de animales en época de preñez a término, se realizaron modificaciones a la jaula de manera de contar con una cama de viruta sobre un piso sólido y liso, para favorecer el bienestar de las

crías que pudieran nacer en cautiverio, asegurándose que los elementos utilizados no tengan sectores cortopunzantes que puedan dañar a los animales. La alimentación consistió en agua *ad libitum*, granos de maíz secos y fardo de alfalfa, frutas, y vegetales, complementándose con alimento balanceado para conejos durante la época de gestación. A menos que se indique lo contrario, los animales fueron sacrificados 48 horas luego de su arribo a las instalaciones, con el fin de disminuir el stress ocasionado por el traslado y el cambio de hábitat.

5.3 ANESTESIA, EUTANASIA Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intramuscular de 13.5 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Holliday Scott S.A., Buenos Aires, Argentina) y 0.6 mg/kg de clorhidrato de xilacina (Laboratorios Richmond, Buenos Aires, Argentina), entre las 10 am y las 12 pm. Una vez anestesiados, se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena cava inferior, que fueron preservadas en tubos heparinizados para determinaciones serológicas posteriores. Posteriormente, los animales fueron sacrificados con una inyección intracardíaca de 0.5 ml/kg de Euthanyle® (pentobarbital sódico y difenilhidantoína sódica, Brouwer S.A., Buenos Aires, Argentina) y decapitados para la extracción inmediata del cerebro, la hipófisis y los ovarios. Según el requerimiento de la técnica, algunos tejidos fueron fijados en una solución fría de paraformaldehído (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos) al 4% en buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) para posteriores estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia; otros tejidos se congelaron inmediatamente con hielo seco, y fueron almacenados a -80°C hasta su utilización para el análisis de proteínas o ácidos nucleicos, o colocados en tubos tipo Eppendorf con 1 ml de buffer frío para los ensayos de pulsatilidad. La edad de los animales se determinó mediante el peso del cristalino seco, según Jackson (1986). Debido a que los animales fueron capturados a campo, los grupos de vizcachas utilizados en los diversos enfoques experimentales fueron homogéneos, de acuerdo a su tamaño, edad y peso corporal.

5.3.1 Criterios de disección de los órganos

Para los ensayos de pulsatilidad, el hipotálamo se diseccionó siguiendo anteriormente los bordes anterior, posterior y lateral del quiasma óptico, y posteriormente por los cuerpos mamilares, según Dorfman y col. (2013). Para los ensayos que requirieron congelamiento del tejido, el hipotálamo anterior fue separado siguiendo el borde anterior y lateral del quiasma óptico, y posteriormente por la línea que pasa por delante del infundíbulo. En ambos casos, se consideró una profundidad de 4 milímetros. Una vez separado el cerebro, se expuso la hipófisis en el cráneo, la cual se extrajo de la silla turca previa remoción de la capa de tejido conjuntivo que la cubría. La glándula pineal fue extraída luego de la remoción de los lóbulos

occipitales cerebrales y de la separación del vaso sanguíneo que la alimenta. Los ovarios fueron extraídos mediante disección de los ligamentos y del oviducto, e inspeccionados macroscópicamente en búsqueda de estigmas ovulatorios, y luego fueron almacenados en función de la técnica a desarrollar.

5.4 ENFOQUES EXPERIMENTALES

5.4.1 Primer enfoque: Disponibilidad lumínica y modulación del eje H.H.G

Con el fin de determinar la influencia del fotoperíodo sobre la actividad del eje reproductivo de la vizcacha, se dispuso de dos grupos experimentales:

1. Hembras no preñadas no ovulando (NPNO, capturadas en septiembre) y hembras gestantes capturadas en las fases de preñez temprana (PTM, abril), preñez media (PMED, julio) y preñez a término (PTER, agosto). La edad gestacional se estimó de acuerdo al mes de captura y el estado de desarrollo fetal, según lo descrito por Leopardo y col. (2011). Las capturas fueron planificadas para lograr la obtención de animales representativos de las diferentes fases, considerando la descripción de Llanos y Crespo (1952) y la experiencia de nuestro grupo de trabajo sobre el modelo animal (Jensen y col., 2006, 2008; Dorfman y col., 2011, 2013; Leopardo y col., 2011; Willis, 2011; Gonzalez y col., 2012; Halperin y col., 2013; Fraunhofer y col., 2017; Inserra y col., 2014, 2017). En estos animales se estudió la expresión de la enzima AANAT en la glándula pineal y de los receptores de melatonina hipotalámicos (ambos a nivel de ARNm y proteína), y se determinaron los niveles séricos de melatonina. Se trabajó con un $n = 20$ (5 animales por grupo experimental), considerando a las vizcachas capturadas para este trabajo y el tejido previamente recolectado y almacenado por otras líneas de trabajo del laboratorio.
2. Hembras adultas no preñadas no ovulando (NPNO) capturadas en septiembre. Los animales se separaron equitativamente en tres grupos experimentales ($n = 15$, 5 animales por grupo experimental), siguiendo el protocolo de trabajo descrito por Guzmán y col. (1980): 1) animales expuestos a un fotoperíodo de 12 horas de luz tenue seguidas de 12 horas de luz de luna (grupo Control), 2) animales expuestos a iluminación continua (grupo Luz), y 3) animales en oscuridad constante (grupo Oscuridad). Luego de 15 días, las vizcachas fueron sacrificadas como se indicó anteriormente. Para conocer el efecto de la disponibilidad lumínica directamente sobre la ovulación, el mismo diseño experimental se desarrolló en hembras adultas con inducción de ovulación (NPi, ver *Sincronización del ciclo estral de la vizcacha*, en la sección **Materiales y Métodos**), contando con un $n = 15$ (5 animales por grupo experimental). En el caso de los animales sometidos a oscuridad continua, los procedimientos de alimentación, limpieza y manipulación fueron realizados en oscuridad, con iluminación tenue mediante una lámpara roja (Guzmán y col., 1980).

Durante el traslado de los animales anestesiados hacia el sector de eutanasia, se les cubrieron los ojos para evitar alteración de los resultados por efecto de la luz ambiental. Tanto en los animales NPNO como NPi se estudió la expresión de AANAT, de GnRH hipotalámica, de los receptores de melatonina hipotalámicos, hipofisarios y ováricos, de RE α y RE β hipotalámicos y del RLH ovárico. Asimismo, se determinaron los niveles séricos de LH, de melatonina, de cortisol (para descartar el efecto del estrés lumínico, ver sección **Anexo**), de E₂ y P₄, y el número de folículos antrales o preantrales y cuerpos lúteos mediante la observación de cortes histológicos de ovarios teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina (ver *Cuantificación de folículos antrales y cuerpos lúteos*, en la sección **Materiales y Métodos**).

5.4.2 Segundo enfoque: Modulación de GnRH y de LH por melatonina

Para estudiar si la melatonina influye en la secreción de GnRH, y si actúa diferencialmente de acuerdo a la fase del ciclo estral, se utilizaron hembras adultas NPNO (consideradas en fase folicular, n = 8) y NPi (con sincronización del ciclo estral como se detalló anteriormente y consideradas en fase lútea, n = 16). Luego del sacrificio de los animales, se extrajo el hipotálamo y se determinó la liberación de GnRH mediante la incubación del órgano en buffer BKR (grupo Control), o suplementado con melatonina 2.5 μ M sólo (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos), combinada con K185 10 μ M (inhibidor del receptor MT₂, Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos), o combinada con luzindole 10 μ M (inhibidor del receptor MT₁, Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos). Las concentraciones empleadas se basaron en las utilizadas en trabajos previos (Isobe y col., 2001; Roy y Belsham, 2002; Kelestimura y col., 2012). Por otro lado, se determinó el efecto de la melatonina sobre la liberación de LH y si actúa diferencialmente de acuerdo a la fase del ciclo estral, mediante incubación de hipófisis de hembras NPNO y NPi con buffer BKR (grupo Control) o suplementado con melatonina 2.5 μ M (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos). El dosaje hormonal de GnRH y de LH se realizó mediante radioinmunoensayo (RIA).

5.4.3 Tercer enfoque: Modulación de GnRH por interacción de melatonina con E₂

Mediante ensayos de pulsatilidad y la determinación hormonal por RIA, se estudió el efecto combinado de la melatonina con E₂ sobre la liberación de GnRH hipotalámica. Para ello, se utilizaron hembras NPi cuyos hipotálamos se incubaron en las siguientes condiciones:

- ◆ Estudio del efecto del neuroestradiol sobre GnRH:
 - ▶ **Tratamiento Control (n = 4):** incubación en buffer BKR.
 - ▶ **Tratamiento Letrozole (n = 4):** incubación en buffer BKR suplementado con letrozole

10 μM (inhibidor de la enzima aromatasa). La concentración empleada se basó en la utilizada en trabajos previos (Sonne-Hansen y Lykkesfeldt, 2005; Lu y col., 2012).

- ◆ Estudio de la vía de acción del neuroestradiol en presencia de melatonina:
 - ▶ **Tratamiento Melatonina ($n = 4$)**: incubación en buffer BKR suplementado con melatonina 2.5 μM .
 - ▶ **Tratamiento Melatonina + Letrozole ($n = 4$)**: incubación en buffer BKR suplementado con melatonina 2.5 μM y letrozole 10 μM .
 - ▶ **Tratamiento Melatonina + Antagonistas de los receptores de estrógenos (REs) ($n = 4$)**: incubación en buffer BKR suplementado con melatonina 2.5 μM , MPP 10 μM (antagonista del $\text{RE}\alpha$) y ciclofenil 10 μM (antagonista del $\text{RE}\beta$). Las concentraciones empleadas se basaron en las utilizadas en trabajos previos (Kuo y col., 2010; Ng y col., 2009).
- ◆ Estudio del efecto combinatorio melatonina y estradiol sobre GnRH, y su vía de acción:
 - ▶ **Tratamiento Control ($n = 4$)** incubación en buffer BKR.
 - ▶ **Tratamiento Melatonina ($n = 4$)**: incubación en buffer BKR suplementado con melatonina 2.5 μM .
 - ▶ **Tratamiento Estradiol ($n = 4$)**: incubación en buffer BKR suplementado con estradiol 10 nM. La concentración empleada se basó en la utilizada en trabajos previos (Matthews y col., 2006; Yewade y col., 2009).
 - ▶ **Tratamiento Melatonina con Estradiol ($n = 4$)**: incubación en buffer BKR suplementado con melatonina 2.5 μM y estradiol 10 nM.
 - ▶ **Tratamiento Melatonina + Agonista de $\text{RE}\alpha$ (PPT) + Antagonista del $\text{RE}\beta$ (ciclofenil) ($n = 4$)**: incubación en buffer BKR suplementado con melatonina 2.5 μM , PPT 10 μM y ciclofenil 10 μM . Las concentraciones empleadas se adaptaron de las utilizadas en trabajos previos (Kraichely y col., 2000; Arreguin-Arevalo y col., 2007; Hu y col., 2008).
 - ▶ **Tratamiento Melatonina + Agonista del $\text{RE}\beta$ (WAY-200070) + Antagonista del $\text{RE}\alpha$ (MPP) ($n = 4$)**: incubación en buffer BKR suplementado con melatonina 2.5 μM , WAY-200070 10 μM y MPP 10 μM . La concentración de WAY-200070 se adaptó de la utilizada en trabajos previos (Lattrich y col., 2004; Serova y col., 2010; Clipperton-Allen y col., 2011).

5.5 TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y DE ANÁLISIS

5.5.1 Sincronización del ciclo estral de la vizcacha

Con el fin de sincronizar el ciclo estral de los animales según el requerimiento experimental, se indujo la ovulación en hembras adultas no preñadas capturadas en septiembre siguiendo el protocolo descrito por Willis (2011). Brevemente, mediante inyección intramuscular se administraron diariamente 250 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG, Novormon 5000,

Syntex, Argentina) durante tres días consecutivos. Al cuarto día, se inyectó una única dosis de 1000 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Ovusyn 5000, Syntex, Argentina). Los animales fueron sacrificados 5 u 11 días después de la última inyección (para ensayos de pulsatilidad o de fotoperíodo, respectivamente).

5.5.2 Estudios del ARNm

5.5.2.1 Extracción y cuantificación de ARN

Tanto la mesada de trabajo como el material a utilizar fueron rociados con RNaseZap® (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos), y se dejó actuar durante 10 minutos para inhibir RNasas. Luego, el material fue enjuagado con abundante agua destilada y se dejó secar. Los tejidos congelados fueron homogeneizados en 1 ml de TRIzol® (Invitrogen, California, Estados Unidos) y centrifugados a 10000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se separó y conservó. Se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 12500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. La fase superior acuosa fue separada e incubada a 4°C con 500 µl de isopropanol durante 10 minutos; luego, se procedió a centrifugar a 7500 r.p.m. por 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se descartó por inversión. Se realizaron dos lavados del pellet obtenido con adición de 1 ml de etanol 75%, mezclado y centrifugado a 7500 r.p.m. por 10 minutos a 4°C. El etanol se descartó por inversión, se dejó evaporar el resto presente a temperatura ambiente, y se agregaron 20 µl de agua DEPC para resuspender el pellet. El ARN total obtenido se almacenó a -20°C. La concentración de ARN fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm (Genequant, Amersham Biosciences, Reino Unido) y su integridad fue determinada en un gel de agarosa (Genbiotech, Argentina) al 1% en buffer TBE 1X (Tris 0.09 M, ácido bórico 0.045 M y EDTA 0.05 M; pH 8.3), con GelRed® (Biotium, California, Estados Unidos) como intercalante. La integridad del ARN se corroboró por la presencia de las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal (ARNr).

5.5.2.2 Síntesis de ADNc

3 µg de ARN total fueron tratados con 1 µl de DNasa I (Invitrogen, California, Estados Unidos), 1 µl de buffer de reacción 10X (Invitrogen, California, Estados Unidos) y agua DEPC hasta un volumen de 10 µl, durante 30 minutos a 37°C. La reacción fue detenida con 1 µl de EDTA 25 mM (Invitrogen, California, Estados Unidos) durante 10 minutos a 65°C. La retrotranscripción del ARN se realizó incubando el producto de la reacción de DNasa con 1.5 µl de *random primers* 50 µM (Applied Biosystems, California, Estados Unidos), 1 µl de retrotranscriptasa RevertAid® M-MuLV (200 U/µl, Fermentas, Massachusetts, Estados Unidos), 4 µl de buffer First Strand® 5X (Fermentas, Massachusetts, Estados Unidos), 2 µl de una solución de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs 10 mM, Invitrogen, California, Estados Unidos) y 0.5 µl de inhibidor de RNasas RNaseOut® (40 U/µl, Fermentas, Massachusetts, Estados Unidos)

en un volumen final de reacción de 20 μ l. La reacción fue llevada a cabo a 72°C durante 10 minutos seguido de 42°C durante 60 minutos, y fue detenida por calentamiento a 70°C durante 10 minutos. El ADNc fue conservado a -20°C. Como control negativo, se llevó a cabo la reacción omitiendo la retrotranscriptasa, donde la ausencia de ADN amplificado por PCR indicó el aislamiento de ARN libre de ADN genómico.

5.5.2.3 *Diseño de primers*

Mediante los programas informáticos Bioedit (Ibis Biosciences, California, Estados Unidos) y OligoCalc (versión 3.27, Northwestern University, Illinois, Estados Unidos) se alinearon las secuencias para un ARNm de interés, provenientes de diferentes especies de roedores y de humano, y sobre regiones conservadas, se diseñaron *primers* para PCR no cuantitativa con el objetivo de obtener un amplicón de extensión que permitiera el diseño de *primers* específicos para PCR cuantitativa. Una vez determinados los parámetros óptimos y la identidad de los *primers* por análisis con el algoritmo BLAST (NCBI, NIH, Maryland, Estados Unidos), los mismos fueron construidos por Invitrogen (Life Technologies, California, Estados Unidos), resuspendidos en agua con DEPC en una concentración de 100 μ M y almacenados a -80°C hasta su utilización. A continuación, se realizó una PCR no cuantitativa, incubando 2 μ l de ADNc con 5 μ l de buffer para Taq Polimerasa (10X, Fermentas, Massachusetts, Estados Unidos), 4 μ l de $MgCl_2$ (25 mM, Fermentas, Massachusetts, Estados Unidos), 5 μ l de una solución de dNTPs (10 mM, Invitrogen, California, Estados Unidos), 2.5 μ l de una solución de *primer forward* (10 μ M), 2.5 μ l de una solución de *primer reverse* (10 μ M), y 1.25 μ l de Taq Polimerasa (1 U/ μ l, Fermentas, Massachusetts, Estados Unidos), y agua con DEPC hasta completar un volumen de reacción final de 50 μ l. Los parámetros de ciclado fueron: 2 minutos a 95°C seguido por una ronda de PCR de 40 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de *annealing* específica de cada par de *primers* y 30 segundos a 72°), y finalmente por un paso final de 5 minutos a 72°C. Los controles negativos realizados en paralelo consistieron en la omisión de ADNc o de *primers*. Los productos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X, junto con una escalera de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, California, Estados Unidos). Las bandas obtenidas fueron escindidas del gel, purificadas con el kit de extracción de gel MinElute® (Qiagen, Hilden, Alemania), y secuenciadas con el dispositivo 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) por la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Argentina). La identidad de la secuencia y el porcentaje de homología se determinó con el algoritmo BLAST algoritmo BLAST (NCBI, NIH, Maryland, Estados Unidos). Para el diseño de *primers* para PCR cuantitativa de GnRH, la secuencia utilizada como molde fue la obtenida en vizcacha por RACE PCR. En el caso de MT_1 y GAPDH se utilizaron los *primers* diseñados para PCR no cuantitativa, y para MT_2 y AANAT, se diseñaron *primers* específicos sobre la secuencia obtenida en vizcacha (de

manera “anidada”), procediendo a secuenciar y a analizar la identidad del nuevo producto de la manera anteriormente especificada (**Tabla 7**, sección **Anexo**).

5.5.2.4 Secuenciación del ARNm de la prepro-hormona liberadora de gonadotropinas (prepro-GnRH)

Mediante la técnica de 5'- y 3'-RACE PCR se amplificó la secuencia del ARNm de la prepro-GnRH hipotalámica de vizcacha. Para cada extremo, 3 µg de ARN total fue retrotranscripto utilizando el kit GeneRacer® (L1500, Invitrogen, Life Technologies, Estados Unidos). Para el extremo 5', el ARN fue defosforilado por incubación con 1 µl de RNase Out® (40 U/µl), 1 µl de fosfatasa intestinal de ternero (CIP, 10 U/µl), 1 µl de CIP Buffer 10X y agua DEPC hasta un volumen de 10 µl, por 1 hora a 50°C. El ARN obtenido fue precipitado con una mezcla de fenol-cloroformo y lavado con etanol 70%. Para remover el *Cap* ubicado en el extremo 5', el ARNm defosforilado se incubó con 1 µl de RNase Out® (40 U/µl), 1 µl de pirofosfatasa ácida de tabaco (TAP, 0.5 U/µl) y 1 µl de buffer TAP, por 1 hora a 37°C. Luego, se procedió a precipitar el ARN con una mezcla de fenol-cloroformo y se realizó un lavado con etanol 70%. Para ligar el ARNm obtenido con el GeneRacer® oligo RNA, se incubaron 7 µl del ARNm con 0.25 µg de GeneRacer® oligo RNA, 1 µl de buffer ligasa 10X, 1 µl de ATP (10 mM), 1 µl de RNase Out® (40 U/µl) y 1 µl de ligasa de RNA T4 (5 U/µl), durante 1 hora a 37°C. El ARNm ligado fue precipitado con fenol-cloroformo y lavado con etanol 70%. Luego, 10 µl del ARNm ligado fueron retrotranscriptos por incubación con 1 µl de GeneRacer® Oligo dT primer (50 µM), 1 µl de dNTPs (10 mM), 4 µl de DTT (0.1 M), 1 µl del inhibidor de RNasas RNase Out® (40 U/µl), y 1 µl de retrotranscriptasa Superscript III® (200 U/µl), por 1 hora a 50°C. A continuación se agregó 1 µl de RNasa H (2 U/µl) y se dejó actuar por 20 minutos a 37°C. Se utilizó como control ARN de células HeLA. Luego de cada paso, se confirmó la integridad del ARN mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. La amplificación de la prepro-GnRH se llevó a cabo incubando 2 µl de cada ADN copia (ADNc) obtenido, con 3 µl de *primer 5'* GeneRacer® (10 µM) y 1 µl de un *primer reverse* específico (10 µM) para el extremo 5', o con 3 µl de *primer 3'* GeneRacer® (10 µM) y 1 µl de un *primer forward* específico para el extremo 3', añadiendo 5 µl de buffer de PCR para Taq Polimerasa 10X (Fermentas, Massachusetts, Estados Unidos), 1 µl de mix de dNTPs (10 mM), 1.25 µl de Taq Polimerasa (1 U/µl, Fermentas, Massachusetts, Estados Unidos), 4 µl de MgCl₂ (25 mM) y agua DEPC hasta un volumen final de 50 µl. Se diseñaron *primers forward* y *reverse* específicos mediante el alineamiento de secuencias publicadas de los ARNm de la prepro-GnRH de chinchilla (*Chinchilla lanigera*, secuencia de referencia del NCBI **XM_005373712.1**), cobayo (*Cavia porcellus*, secuencia de referencia del NCBI **NM_001172956.1**), degú (*Octodon degus*, secuencia de referencia del NCBI **XM_004630672.1**), ratón (*Mus musculus*, secuencia de referencia del NCBI **NM_008145.2**), rata (*Rattus norvegicus*, secuencia de referencia del NCBI **NM_012767.2**) y de dos isoformas presentes en *Homo sapiens* (secuencias de referencia del NCBI **NM_000825.3**

y **NM_001083111.1**), que difieren en la región 5' no traducida (5'-UTR). Utilizando el programa informático Bioedit (versión 7.2.5, Ibis Biosciences, Carlsbad, California), se alinearon las secuencias, se determinaron los fragmentos homólogos conservados, y sobre ellos fueron diseñados los *primers*. Los parámetros de ciclado fueron: 2 minutos a 94°C seguido por una primer ronda de PCR de 5 ciclos (30 segundos a 94°C y 1 minuto a 72°C), luego por una segunda ronda de 5 ciclos (30 segundos a 94°C y 1 minuto a 70°C), seguido por una tercer ronda de 25 ciclos (30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 68°C y 1 minuto a 72°C), y finalmente por un paso final de 10 minutos a 72°C. Los controles negativos realizados en paralelo consistieron en la omisión de ADNc o de *primers*. Los productos amplificados se resolvieron en un gel de agarosa al 1.5% y su presencia fue detectada con un transiluminador ultravioleta (Labnet DyNALight TM-26, Estados Unidos). Las bandas obtenidas fueron escindidas del gel, purificadas con el kit de extracción de gel MinElute® (Qiagen, Hilden, Alemania), y secuenciadas con el dispositivo 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) por la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Argentina). El ensamblado de las secuencias 3' y 5' se realizó con el programa informático Bioedit (versión 7.2.5, Ibis Biosciences, Carlsbad, California). La determinación de las diferentes regiones del ARNm de la prepro-GnRH de vizcacha se realizó por comparación con secuencias publicadas de roedores emparentados evolutivamente cercanos (chinchilla, cobayo y degú) y evolutivamente lejanos (ratón y rata) y dos isoformas de secuencia presentes en el humano, cuyas secuencias de referencia del NCBI se mencionan anteriormente. El alineamiento se realizó con el programa Bioedit (versión 7.2.5, Ibis Biosciences, Carlsbad, California), y el porcentaje de homología se calculó utilizando el programa DnaSP (versión 5.1.0.1, Universidad de Barcelona, España; Rozas, 2009) y el algoritmo BLAST (NCBI, NIH, Maryland, Estados Unidos).

5.5.2.5 PCR cuantitativa (Real Time PCR)

Se incubaron 5 µl de ADNc con 6 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Reino Unido) y una mezcla de *primers forward* y *reverse* 0.3 µM (Invitrogen, Life Technologies, California, Estados Unidos). Las características de los primers utilizados así como de los parámetros de ciclado se exponen en la **Tabla 2**. El ciclado y las determinaciones cuantitativas se realizaron con un ciclador Stratagene MPX500 (Stratagene, California, Estados Unidos). Para confirmar la especificidad de la señal, los resultados fueron validados en base a la calidad de las curvas de disociación generadas al finalizar la corrida. Para cada gen analizado, se utilizó la expresión del gen constitutivo de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como normalizador. La determinación de la existencia de diferencias cuantitativas significativas en la expresión de los genes analizados fue realizada con el modelo matemático de Pfaffl (2001). La relación de expresión se determinó para cada muestra mediante la fórmula: $(E_{\text{blanco}})^{\Delta Cq(\text{blanco})} / (E_{\text{GAPDH}})^{\Delta Cq(\text{GAPDH})}$, donde "E" es la eficiencia del par de primers y

“ ΔCq ” = $Cq_{(\text{normalización de ADNc})} - Cq_{(\text{ADNc experimental})}$. La eficiencia de amplificación de cada juego de primers se calculó a partir de la pendiente de una curva de amplificación estándar de función log (ng de cDNA) por reacción contra el valor Cq ($E = 10^{-1/(\text{pendiente})}$). Las pendientes de valor 2 ± 0.1 y las eficiencias entre 80% y 120% se consideraron óptimas. Cada muestra fue analizada por triplicado y se emplearon controles negativos para monitorear casos de contaminación con ADN. La pureza de los productos amplificados fue corroborada en un gel de agarosa al 2% (Genbiotech, Argentina) y detectada con un transiluminador de luz UV (Labnet DyNALight TM-26, Estados Unidos). Las bandas de los productos amplificados fueron escindidas y los productos fueron purificados empleando el kit de extracción MinElute® (Qiagen, Hilden, Alemania). Los amplicones purificados fueron secuenciados por la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Argentina), empleando un secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Se empleó el software Bioedit (Ibis Biosciences, California, Estados Unidos) para alinear las secuencias obtenidas con las correspondientes de ratón, rata

TABLA 2. PRIMERS EMPLEADOS EN PCR CUANTITATIVA

| BLANCO | PRIMERS (5'-3') | ESPECIE | PRODUCTO | CICLADO |
|-----------------------|--|---|----------|---|
| GnRH | F: CAGCACTGGTCCTATGGG TTGCC R: TTCCTCTTCAATCAGACG TTCC | Vizcacha (exón 2 y 4) | 189 pb | - 1 ciclo de 10 min. a 95°C - 40 ciclos (15 seg. a 95°C, 30 seg. a 60°C, 30 seg. a 72°C) |
| MT₁ | F: GACTTCAGGAAYTTTGTC ACC* R: GGCAGCTGTTGAARTAG GCCA* | Ratón (exón 2) Rata (sec. codif.) Chinchilla (sec. codif.) Humano (exón 2) Oveja (sec. codif.) | 145 pb | - 1 ciclo de 10 min. a 95°C - 35 ciclos (15 seg. a 95°C, 30 seg. a 55°C, 30 seg. a 72°C) |
| MT₂ | F: GGCTCTTTGTCAGCT ACTTCC R: GAAGTTCTGGTTCAGGAG CCCAT | Ratón (exón 1 y 2) Rata (sec. codif.) Humano (exón 1 y 2) Oveja (sec. codif.) | 83 pb | - 1 ciclo de 10 min. a 95°C - 45 ciclos (15 seg. a 95°C, 30 seg. a 60°C, 30 seg. a 72°C) |
| AANAT | F: GATCGAGCGGGAAGCCT TTATCTC R: GGATGAGATCCGGCACT TCCTG | Ratón (exón 2 y 3) Rata (sec. codif.) Rata topo desnuda (sec. codif.) Degú (sec. codif.) Cobayo (sec. codif.) Chinchilla (sec. codif.) | 73 pb | - 1 ciclo de 10 min. a 95°C - 45 ciclos (15 seg. a 95°C, 30 seg. a 60°C, 30 seg. a 72°C) |
| GAPDH | F: CCAGAACATCATCCCTG CAT R: AGGAAGTGCCGGATCT CATCC | Ratón (exón 5) | 67 pb | - 1 ciclo de 10 min. a 95°C - 40 ciclos (15 seg. a 95°C, 30 seg. a 60°C, 30 seg. a 72°C) |

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas. MT₁: receptor de melatonina 1. MT₂: receptor de melatonina 2. AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa. GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Sec. codif.: secuencia codificante. F: *primer forward*. R: *primer reverse*. Pb: pares de bases. Min: minuto. Seg: segundo. °C: grado centígrado. En la secuencia de nucleótidos, *R: A o G; Y: C o T.

y cobayo. El rango de homología entre las secuencias de vizcacha y las de las otras especies fue determinado aplicando el software DNAsp (versión 5.1.0.1, Universidad de Barcelona, España; Rozas, 2009).

5.5.3 Western blot

5.5.3.1 *Extracción y cuantificación de proteínas*

La región anterior del hipotálamo, la glándula pineal y una porción de 3 mm³ de ovario se homogeneizaron mecánicamente a 4°C en buffer RIPA (1:3 p/v; PBS 0.1 M con IGEPAL 1%, deoxicolato de sodio 0.5% y dodecilsulfato sódico 0.1%; pH 7.4) suplementado con inhibidores de proteasas (aprotionina 0.1 µM, leupeptina 0.1 µM, pepstatina 0.1 µM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.2 mM). Los homogenatos se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. En el caso de las glándulas pineales, los homogenatos fueron concentrados con columnas Amicon® Ultra-0.5 3K (MD Millipore Corporation, Massachusetts, Estados Unidos). La concentración proteica de las muestras se determinó mediante el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como standard.

5.5.3.2 *Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) e inmunodetección de proteínas*

Se desnaturalizaron 30 µg de proteínas junto con buffer muestra 4X (Tris-HCl 1 M con SDS 10%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0.1% y 2-mercaptoetanol 0.15%; pH 6.8) y luego fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS, incluyendo un gel concentrador al 4% (29:1 acrilamida:bisacrilamida, Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos), y utilizando un buffer Tris-glicina (0.25 M; pH 8.3) en una celda de electroforesis Mini-PROTEAN II® Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos). Luego, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de 0.2 mm de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, EMD Millipore Corporation, Massachusetts, Estados Unidos) o de nitrocelulosa, según la disponibilidad, a 300 mA durante 1 hora a 4°C. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a sitios vacíos, la membrana fue bloqueada con una mezcla de leche descremada en polvo al 5% en PBS 0.1 M y Tween-20 0.1%, durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. La membrana se incubó con anticuerpo primario específico para la proteína de interés (**Tabla 3** y **Tabla 7** de la sección **Anexo**) diluido en PBS 0.1 M-Tween 20 0.1%-leche en polvo descremada 5%, a 4°C durante 24-48 hs. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas en PBS 0.1M-Tween 20 0.1% durante media hora, con cambios cada 5 minutos, en agitación a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó con anticuerpo secundario anti IgG especie-específica acoplado a HRP (**Tabla 4**), diluido en PBS 0.1 M-Tween 20 0.1%-leche en polvo descremada 5%. El revelado se realizó con el

sistema ECL Plus (GE Healthcare Ltd., Amersham Place, Buckinghamshire, Reino Unido), y se empleó el fotodocumentador ImageQuant 350 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) para la digitalización de las bandas obtenidas. El peso de las bandas de proteína se estimó utilizando una escalera de proteínas comercial (PageRuler®, Fermentas UAB, Vilnius, Lituania). La densidad óptica de la banda de la proteína de interés se normalizó al valor

TABLA 3. ANTICUERPOS PRIMARIOS EMPLEADOS

| BLANCO | ANTICUERPO | ORIGEN | MARCA | DILUCIÓN DE USO |
|-------------------------------------|------------|--------|---|----------------------|
| <i>GnRH</i> | MAB5456 | Ratón | Millipore (Massachusetts, Estados Unidos) | IF 1:200 |
| <i>AANAT</i> | PA1-760 | Conejo | Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos) | WB 1:500 IF 1:500 |
| <i>MT₁</i> | ab87639 | Cabra | Abcam (Massachusetts, Estados Unidos) | WB 1:200 IF 1:200 |
| <i>MT₂</i> | ab192662 | Conejo | Abcam (Massachusetts, Estados Unidos) | WB 1:200 IF 1:200 |
| <i>REα</i> | sc-7207 | Conejo | Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, Estados Unidos) | WB 1:100 |
| <i>REβ</i> | ab3577 | Conejo | Abcam (Massachusetts, Estados Unidos) | WB 1:300 |
| <i>RLH</i> | sc-25828 | Conejo | Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, Estados Unidos) | WB 1:500 |
| <i>α-tubulina</i> | sc-5286 | Ratón | Santa Cruz Biotechnology Inc. (Texas, Estados Unidos) | WB 1:1000 |
| <i>β-actina</i> | A5441 | Ratón | Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) | WB 1:6000 |

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas. AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa. MT₁: receptor de melatonina 1. MT₂: receptor de melatonina 2. RE α : receptor de estrógenos α . RE β : receptor de estrógenos β . RLH: receptor de LH. WB: western-blot. IF: inmunofluorescencia.

TABLA 4. ANTICUERPOS SECUNDARIOS EMPLEADOS

| ANTICUERPO | ORIGEN | MARCA | DILUCIÓN DE USO |
|---|---------|---|-----------------|
| Anti IgG de conejo HRP (170-6515) | Cabra | Bio-Rad Laboratories (California, Estados Unidos) | WB 1:3000 |
| Anti IgG de cabra HRP (PI-9500) | Caballo | Vector Laboratories (California, Estados Unidos) | WB 1:3000 |
| Anti IgG de ratón HRP (172-1011) | Cabra | Bio-Rad Laboratories (California, Estados Unidos) | WB 1:3000 |
| Anti IgG de conejo biotilado (PK-6101) | Cabra | Vector Laboratories (California, Estados Unidos) | IHQ 1:200 |
| Fluoresceína anti IgG de ratón (FI-2000) | Caballo | Vector Laboratories (California, Estados Unidos) | IF 1:300 |
| Alexa Fluor 555 anti IgG de conejo (A31572) | Burro | Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos) | IF 1:300 |
| Alexa Fluor 555 anti IgG de cabra (A21432) | Burro | Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos) | IF 1:300 |

IgG: inmunoglobulina G. HRP: peroxidasa extraída del rábano. IF: inmunofluorescencia. IHQ: inmunohistoquímica. WB: western-blot.

de la densidad óptica de la banda correspondiente del control de carga proteica (β -actina o α -tubulina), utilizando los software ImageJ (versión 1.51j8, NIH, EEUU) e Image Studio (versión 5.2, LI-COR, EEUU).

5.5.4 Determinación de niveles séricos de 17 β -estradiol, progesterona, melatonina y cortisol

Las muestras de sangre fueron heparinizadas y se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta observarse la separación del suero. Luego, se procedió a centrifugarlas a 3000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente, y el suero obtenido se alicuotó y almacenó a -20°C . Los niveles séricos de E_2 , P_4 y melatonina fueron estimados mediante el uso de los kits de ELISA EIA 2693, EIA 1561 y EIA 1431, respectivamente (DRG Instruments GmbH, Alemania). La concentración de cortisol se determinó en suero con el kit de ELISA DiaSource KAPDB270 (DIASource ImmunoAssays S.A., Bélgica). El rango de detección del inmunoensayo en fase sólida abarcó un rango de 16-2000 pg/ml de E_2 , 0,18-40 ng/ml de P_4 , 1.6-300 pg/ml de melatonina y 0.4-60 $\mu\text{g/dL}$ de cortisol. La lectura de las soluciones fue realizada a 450 nm (E_2 , P_4 y cortisol) o a 405 nm (melatonina) con un espectrofotómetro para microplacas (μ Quant, Bio-tek Instruments Inc., Winooski, Vermont, Estados Unidos) y fue correlacionada a la inversa de la concentración de la respectiva hormona en la muestra. El cálculo de las concentraciones de las muestras se realizó tomando como referencia las curvas de calibración provistas por el fabricante. Para calcular el blanco se reemplazó la muestra y la hormona marcada por agua. Todos los animales utilizados fueron analizados. Los resultados de la determinación de cortisol sérico se muestran en la **Figura 37** en la sección **Anexo**.

5.5.5 Ensayo de pulsatilidad de GnRH en explantos de hipotálamo

La modulación de la pulsatilidad de GnRH bajo diferentes drogas del sistema melatoninérgico y de la vía de los estrógenos (detalladas en la **Tabla 5**) fue estudiada *ex vivo* empleando un método previamente descrito por Catalano y col. (2010). Los cerebros se diseccionaron para la obtención de los explantos de hipotálamo; los mismos fueron pesados y preservados por 1 hora en 500 μl de buffer Krebs-Ringer (BKR) (NaCl 115 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, CaCl_2 2.56 mM, HEPES 16 mM, NaHCO_3 20 mM, BSA 0.1% y glucosa 25 mM; pH 7.4) refrigerado. Luego, los hipotálamos fueron preincubados, en tubos Eppendorf gelatinizados, con 500 μl de BKR por 30 minutos a 37°C . A continuación, el BKR se descartó y los hipotálamos se incubaron en BKR fresco por 6 horas a 37°C . En intervalos de 7.5 minutos se recolectó el medio de cada muestra en tubos preparados con gelatina 0.1% y bacitracina 2.5 mM (B0125-250KU, Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos), y se reemplazó por medio fresco (condiciones Control). Con el fin de estudiar la modulación de la secreción de GnRH

por diferentes factores, el BKR fue suplementado con diversos agentes, solos o combinados, como se indica en la **Tabla 5** y en el *Tercer enfoque* detallado en la sección **Materiales y Métodos**. Todos los medios recolectados fueron almacenados a -20°C hasta su utilización. La concentración de GnRH fue determinada por radioinmunoensayo (RIA). Los parámetros pulsátiles de GnRH fueron estimados empleando los algoritmos computarizados del programa informático Cluster 8 (Pulse_XP) desarrollado por Veldhuis y Johnson (1986). Se utilizó una configuración de clúster 2x2 y un estadístico de 2 para los picos ascendentes y descendentes para mantener la tasa de error por falsos positivos y falsos negativos por debajo del 10%

TABLA 5. DROGAS UTILIZADAS PARA LOS ENSAYOS DE PULSATILIDAD DE GnRH Y LH

| GRUPO | TRATAMIENTO | MARCA |
|---|--|--|
| MELATONINA | - Melatonina 2.5 μM | Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) (Cat. N° M5250) |
| MELATONINA+ LUZINDOLE | - Melatonina 2.5 μM - Luzindole 10 μM (antagonista de MT_1) | Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) (Cat. N° L2407) |
| MELATONINA+ K185 | - Melatonina 2.5 μM - K185 10 μM (antagonista de MT_2) | Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) (Cat. N° K1888) |
| LETROZOLE | - Letrozole 10 μM (inhibidor de aromatasa) | Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) (Cat. N° L6545) |
| MELATONINA+ LETROZOLE | - Melatonina 2.5 μM - Letrozole 10 μM | |
| MELATONINA + ANTAGONISTAS REs | - Melatonina 2.5 μM - MPP 10 μM (antagonista del $\text{RE}\alpha$) - Ciclofenil 10 μM (antagonista del $\text{RE}\beta$) | Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) (Cat. N° M7068) Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) (Cat. N° C3490) |
| ESTRADIOL | - Estradiol 10 nM | Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) (Cat. N° C3490) |
| MELATONINA + ESTRADIOL | - Melatonina 2.5 μM - Estradiol 10 nM | |
| MELATONINA + AGONISTA $\text{RE}\alpha$ + ANTAGONISTA $\text{RE}\beta$ | - Melatonina 2.5 μM - PPT 10 μM (agonista del $\text{RE}\alpha$) - Ciclofenil 10 μM | Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) (Cat. N° H6036) |
| MELATONINA + AGONISTA $\text{RE}\beta$ + ANTAGONISTA $\text{RE}\alpha$ | - Melatonina 2.5 μM - WAY-200070 10 μM (agonista del $\text{RE}\beta$) - MPP 10 μM | Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, Estados Unidos) (Cat. N° W1520) |

K185: N-butanoil 2-(5,6,7-trihidro-11-metoxibenzo[c]ciclohept[2,1-a]indol-13-il)etanamina. PPT: 1,3,5-tris(4-hidroxifenil)-4-propil-1H-pirazol. MPP: metil-piperidino-pirazol. WAY-200070: 7-bromo-2-(4-hidroxifenil)-1,3-benzoxazol-5-ol.

(Martínez de la Escalera y col., 1992). Los parámetros de la secreción hormonal pulsátil analizados fueron el número medio de pulsos, el intervalo medio entre pulsos, la duración media de cada pulso, la altura media del pulso y la secreción total en 6 hs. de incubación.

5.5.6 Ensayo de pulsatilidad de LH en explantos de hipófisis.

La modulación de la liberación de LH bajo la acción de melatonina se estudió con el mismo sistema y protocolo que para el ensayo de pulsatilidad *ex vivo* de GnRH. Brevemente, los cerebros de hembras NPNO y NPi fueron removidos, para poder separar la hipófisis, pesarla e incubarla con BKR sólo (condición Control) o suplementado con melatonina 2.5 μ M (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos) (**Tabla 5**). En intervalos de 7.5 minutos se recolectó el medio de cada muestra en tubos preparados con gelatina 0.1% y bacitracina 2.5 mM (B0125-250KU, Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos) y se reemplazó por el medio fresco correspondiente. Todos los medios recolectados fueron almacenados a -20°C hasta su utilización. La concentración de LH fue determinada por radioinmunoensayo (RIA). Los parámetros pulsátiles de LH fueron estimados empleando los algoritmos computarizados del programa informático Cluster 8 (Pulse_XP) desarrollado por Veldhuis y Johnson (1986). Se utilizó una configuración de clúster 2x2 y un estadístico de 2 para los picos ascendentes y descendentes para mantener la tasa de error por falsos positivos y falsos negativos por debajo del 10% (Martínez de la Escalera y col., 1992).

5.5.7 Radioinmunoensayo (RIA)

5.5.7.1 Extracción de proteínas

Las secciones anteriores de los hipotálamos fueron homogeneizadas por separado en 100 μ l de HCl 0.1 N, y los homogenatos se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C . Los sobrenadantes se recuperaron y conservaron a -20°C . El contenido proteico de cada muestra se determinó por el método de Bradford (1976).

5.5.7.2 Determinación de GnRH

La concentración de GnRH en los homogenatos de hipotálamo anterior o de los medios recuperados del ensayo de pulsatilidad fue determinada por RIA, siguiendo el protocolo previamente descrito para ratón (Di Giorgio y col., 2013), y que fue puesto a punto y validado para vizcacha (Dorfman y col., 2013). Cada muestra se analizó por duplicado. GnRH se marcó radioactivamente con ^{125}I (NEZ 033H Iodine 125, Perkin Elmer, Life and Analytical Science, Massachusetts, Estados Unidos) de acuerdo al método cloramina-T (Greenwood y col., 1963). 20 μ l de sobrenadante hipotalámico o 200 μ l de medio de los ensayos de pulsatilidad fueron incubados toda la noche en tubos tipo Khan con 100 μ l de un anticuerpo anti-GnRH

policlonal, preparado en conejo (HU60, que reconoce GnRH1 y GnRH2, dilución final 1:50000), gentilmente donado por el Dr. Urbanski (Division of Neuroscience, Oregon National Primate Research Center), 100 μ l de GnRH marcada radioactivamente, en una dilución del rango de 9000-12000 cuentas por minuto (c.p.m.), y buffer RIA (Na_2HPO_4 50 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, azida sódica 15 mM y BSA 0.5%; pH 7.6) hasta un volumen final de 500 μ l. Al día siguiente, las muestras fueron incubadas con 2 ml de etanol absoluto helado (-20°C) para precipitar el complejo anticuerpo-hormona, durante 30 minutos a 4°C . Luego, las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C , se descartó el sobrenadante por inversión y se dejó secar los *pellets* a temperatura ambiente. Las c.p.m. de los pellets fueron estimadas empleando un contador gamma (Cobra II Gamma Counter 5010, Packard, Estados Unidos). Se construyó una curva de calibración de 11 puntos de concentraciones conocidas de GnRH por duplicado, incluyendo 2 tubos de cuentas totales (consistiendo en únicamente 100 μ l de GnRH marcada, con un rango de 9000 a 12000 c.p.m.), 4 máximos (100 μ l de anticuerpo junto con 100 μ l de GnRH marcada y 300 μ l de buffer RIA) y 2 puntos de reacción inespecífica (100 μ l de GnRH marcada y 400 μ l de buffer RIA). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 7.2% y 11.6%, respectivamente. El límite de detección fue 1.5 pg. Los resultados del contenido de GnRH hipotalámica se expresaron como el cociente entre el valor de GnRH obtenido por RIA y el contenido proteico de cada muestra determinado por el método de Bradford (1976), en pg/ μ g de proteína total. En el caso de los ensayos de pulsatilidades, el cociente obtenido se relativizó al peso en miligramos (mg) del hipotálamo incubado, expresándose el resultado como pg/mg de tejido. Esta técnica se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Victoria Lux-Lantos en el IByME (Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Argentina).

5.5.7.3 Determinación de LH sérica

La concentración de LH sérica o en el medio recuperado del ensayo de pulsatilidad se estimó utilizando los kits del National Hormone and Pituitary Program del National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Disease de los Estados Unidos. LH se marcó radioactivamente con ^{125}I (NEZ 033H Iodine 125, Perkin Elmer, Life and Analytical Science, Massachusetts, Estados Unidos) de acuerdo al método cloramina-T (Greenwood y col., 1963), y según descripciones previas (Catalano y col., 2010; Di Giorgio y col., 2013). En tubos de vidrio de hemólisis se incubaron durante toda la noche (a temperatura ambiente) 50 μ l de suero o 10 μ l de medio de los ensayos de pulsatilidad junto con albúmina de huevo (EA) al 1% (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos) en PBS 0.01 M (3.43 ml de NaH_2PO_4 0.5 M, 17.14 ml de Na_2HPO_4 0.5 M., 8.74 gr. de NaCl, y 0.2 gr. de azida sódica; pH 7.4), 100 μ l de un anticuerpo anti-LH-S11 de rata (AFPC697071P) en PBS 0.01 M con EDTA disódico dihidrato 50 mM y suero normal de conejo al 0.25% (dilución del anticuerpo: 1:980000), y 100 μ l de LH marcada radioactivamente (15000-20000 c.p.m.), hasta un volumen final de 400 μ l. Al día siguiente, a cada tubo se le

agregaron 500 µl de una dilución 1:980 de un anticuerpo anti-conejo (provisto gentilmente por la Dra. Lux-Lantos) disuelto en PBS 0.01 M y polietilenglicol 8% (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos). Se dejó actuar durante 2 horas a temperatura ambiente y luego por una hora más a 4°C. A continuación, los tubos fueron centrifugados durante 30 minutos a 3000 r.p.m. a temperatura ambiente, y el sobrenadante líquido fue descartado por aspiración. Las c.p.m. de los pellets fueron estimadas empleando un contador gamma (Cobra II Gamma Counter 5010, Packard, Estados Unidos). Se construyó una curva de calibración de 10 puntos de concentraciones conocidas de LH por duplicado, incluyendo 2 tubos de cuentas totales (consistiendo en únicamente 100 µl de LH marcada, con un rango de 15000 a 20000 c.p.m.), 4 máximos (200 µl de PBS 0.01 M-EA 1%, 100 µl de anticuerpo primario, 100 µl de LH marcada y 500 µl de anticuerpo secundario) y 2 puntos de reacción inespecífica (200 µl PBS 0.01 M-EA 1%, 100 µl de buffer PBS 0.01 M-EDTA 50 mM-suero normal de conejo 0.25%, 100 µl de LH marcada y 500 µl de anticuerpo secundario). La sensibilidad del ensayo fue de 0,31 ng/ml. Los coeficientes de variación intra e inter-específicos fueron 7,2% y 11,4%, respectivamente. Se empleó un pool de homogenatos de hipófisis con alto contenido de LH para preparar una curva de calibración para vizcacha, cuyo paralelismo con el estándar de rata fue confirmado (Dorfman y col., 2013). Los resultados del contenido de LH sérica se expresaron en ng/ml; en el caso de los ensayos de pulsatilidad, los resultados se relativizaron al peso en mg de la hipófisis incubada, expresándose el valor en ng/mg de tejido. Esta técnica se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Victoria Lux-Lantos en el IByME (Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Argentina).

5.5.8 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia con microscopía confocal.

5.5.8.1 *Procesamiento de los tejidos*

Una vez removidos, los cerebros fueron diseccionados coronalmente en bloques de 5 milímetros (mm) de espesor (conteniendo el hipotálamo completo y la glándula pineal) y fijados en PFA 4% disuelto en PBS 0.1 M (pH 7.4, 4°C), por 72 horas. Luego, se lavaron en PBS 0.1 M y se procedió a su deshidratación por incubación en soluciones de concentraciones crecientes de etanol (70, 80 95 y 100%), seguido por una inmersión en xilol y finalmente se embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor en la región cerebral que contiene al hipotálamo y la glándula pineal, y los mismos se montaron en portaobjetos positivados. Una de cada 10 secciones se separó y se tiñó mediante la técnica de Nissl con el objeto de localizar e identificar los núcleos hipotalámicos, de acuerdo a descripciones previas (Dorfman y col., 2011) o con hematoxilina para visualizar núcleos celulares. Se utilizaron cerebros de 4 hembras NPNO.

5.5.8.2 *Inmunohistoquímica*

Para determinar si la glándula pineal de la vizcacha expresa la enzima AANAT, se realizó la técnica de inmunohistoquímica. Para ello, secciones a la altura de la glándula pineal fueron desparafinadas con xilol y rehidratadas por incubación con una serie de concentraciones decrecientes de etanol (100, 95 y 70%), agua destilada y PBS 0.1 M. Luego, se realizó la recuperación antigénica mediante incubación de los cortes en buffer citrato (citrato de sodio 10 mM con Tritón al 2%; pH 6) durante 20 minutos a 100°C, seguido de 20 minutos de enfriado a temperatura ambiente. A continuación, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena mediante incubación de los cortes en una solución de peróxido de hidrógeno al 2% en metanol durante 20 minutos. Para aumentar la especificidad de la reacción, las secciones fueron bloqueadas con una solución al 10% de suero normal de cabra, en PBS 0.1 M con Tween 20 0.2% (pH 7.4), durante una hora a temperatura ambiente. Los cortes fueron incubados toda la noche con anticuerpo anti-AANAT hecho en conejo (**Tabla 3** y **Tabla 7** de la sección **Anexo**) diluido en PBS 1 M con Tritón 2% (pH 7.4) y suero normal de cabra al 1%. La especificidad del anticuerpo fue corroborada en secciones histológicas adyacentes por omisión del anticuerpo primario o mediante la pre-adsorción del anticuerpo por su péptido bloqueante comercial. La inmunorreactividad fue desarrollada incubando las secciones con un anticuerpo anti-conejo biotinilado (**Tabla 4**) durante 1 hora a temperatura ambiente, y amplificada por incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Vectastain® Elite kit, Vector Laboratories, California, Estados Unidos) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue visualizada con 3,3'-diaminobencidina (DAB) intensificada con sulfato de amonio y níquel (DAB kit®, Vector Laboratories, California, Estados Unidos), que produce una marca de color negro. Por último, las secciones fueron deshidratadas mediante incubación con una serie de concentraciones crecientes de etanol (70, 95 y 100%), se sumergieron brevemente en Neo-Clear® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), y fueron cubiertas con cubreobjetos.

5.5.8.3 *Inmunofluorescencia con microscopía confocal*

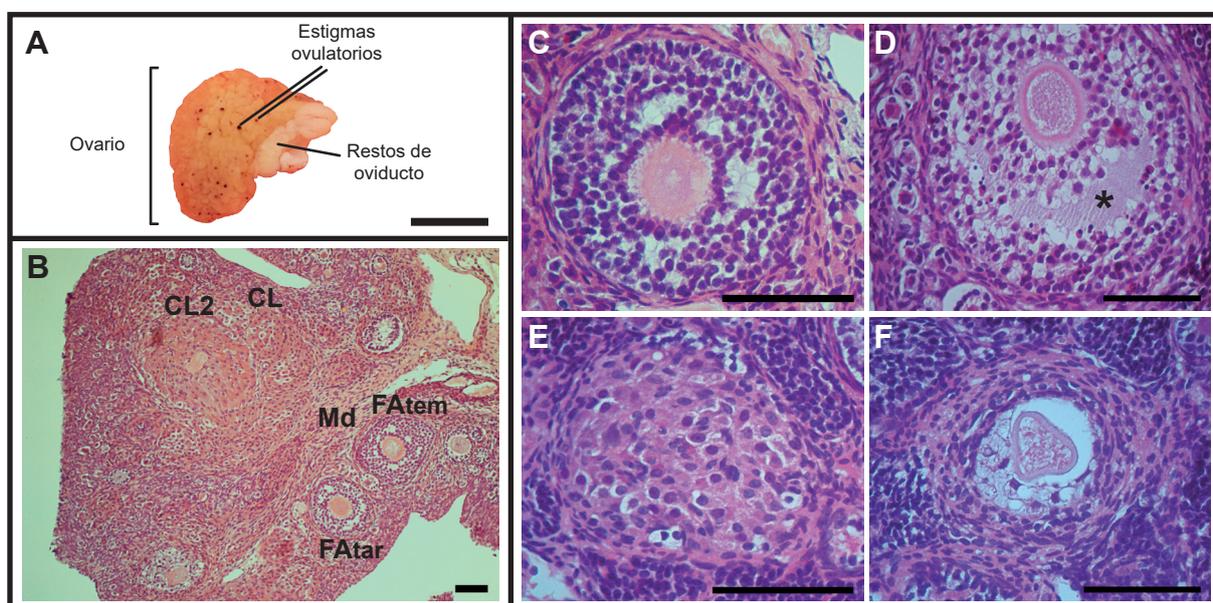
Para determinar la presencia de los receptores MT_1 y MT_2 en el hipotálamo y si existe co-localización con GnRH, los tejidos se procesaron del mismo modo que para inmunohistoquímica, omitiendo el bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena. El ensayo se realizó en 3 días y cada anticuerpo se incubó independientemente. Las secciones se incubaron toda la noche los anticuerpos primarios anti-GnRH y anti-receptor MT_1 , o anti-GnRH y anti-receptor MT_2 (en las concentraciones indicadas en la **Tabla 3**, con más información en la **Tabla 7** de la sección **Anexo**) y al día siguiente se incubó con anticuerpos secundarios especie-específicos marcados con los fluorocromos Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Life Technologies, Nueva York, Estados Unidos), en las condiciones detalladas en la **Tabla 4**. La especificidad del anticuerpo fue corroborada en secciones histológicas adyacentes por omisión del anticuerpo primario (para MT_1 y MT_2) o mediante la pre-adsorción del anticuerpo

por su péptido bloqueante comercial (para GnRH, L7134, Sigma-Aldrich Inc., Missouri, Estados Unidos). Finalmente, las secciones fueron cubiertas con cubreobjetos utilizando el medio de montaje para fluorescencia Vectashield® (Vector Laboratories, California, Estados Unidos).

5.5.8.4 Cuantificación de folículos antrales y cuerpos lúteos

La determinación de los grupos de trabajo, así como la evaluación del estado ovárico en los animales del ensayo de fotoperíodo incluyó el estado ovulatorio y el grado de desarrollo folicular en base a descripciones previas (Leopardo y col, 2011; Dorfman y col., 2013; Inserra y col., 2014; Fraunhofer Navarro, 2014). En los animales del ensayo del fotoperíodo, se determinó la abundancia relativa de los folículos antrales (tempranos y tardíos, éstos últimos con un mayor grado de desarrollo del antro) y de cuerpos lúteos (primarios y secundarios) en secciones histológicas de ovario teñidas con hematoxilina y eosina. Aquellos cuerpos lúteos con retención del oocito fueron clasificados como cuerpos lúteos secundarios, según descripciones previas (Rowlands y Weir, 1974; Dorfman y col., 2013). La cuantificación consistió en el recuento bajo microscopio óptico del número de estructuras presentes por campo a una magnificación de 10X (Flamini y col., 2009; Fraunhofer y col., 2017). Se evaluaron 10 campos diferentes por corte (correspondientes a la corteza del ovario) evitando la superposición de los mismos, en 3 cortes por ovario separados 50 µm entre sí. En los 30 campos evaluados únicamente se contabilizaron los folículos antrales (tempranos y tardíos) y cuerpos lúteos

FIGURA 9. CARACTERÍSTICAS DEL OVARIO DE *L. maximus*



A. Fotografía de un ovario aislado de vizcacha, donde puede observarse su morfología aplanada e invaginada, con abundantes estigmas ovulatorios. **B.** Imagen histológica representativa de un corte longitudinal de ovario de vizcacha en la que se aprecian diferentes estadios de la foliculogénesis y así como la estructura del órgano. **C.** Imagen histológica representativa de un folículo antral temprano, donde se observa la existencia de espacios internos, que luego conformarán el antro. **D.** Imagen histológica representativa de un folículo antral tardío, donde

se observa la presencia definida del antro (indicado con un asterisco). **E.** Imagen histológica representativa de un cuerpo lúteo primario. **F.** Imagen histológica representativa de un cuerpo lúteo secundario, con retención del oocito. CL: cuerpo lúteo primario. CL2: cuerpo lúteo secundario. FAtem: folículo antral temprano. FAtar: folículo antral tardío. Md: médula. B-F: tinción con hematoxilina y eosina. Barras de escala: A: 1 cm; B: 100 μm ; C, D, E y F: 50 μm .

(primarios y secundarios) debido a que son las estructuras que en otras especies presentan mayor actividad esteroideogénica respecto de los estadios previos de la foliculogénesis (Edson y col., 2009), y no se diferenció entre estructuras saludables y atrésicas. Los estadios foliculares estudiados se muestran en la **Figura 9**. Los resultados obtenidos se expresaron como el promedio de la suma de cada estructura identificada en los 10 campos de cada corte evaluado, a partir del empleo de la siguiente fórmula:

$$\bar{X}_{\text{número de cada estructura}} = \frac{(\sum Xn)_{C1} + (\sum Xn)_{C2} + (\sum Xn)_{C3}}{3}$$

Donde Xn es el número de folículos antrales o cuerpos lúteos correspondientes a cada campo (n) y Cn es el corte al que pertenecen esos campos.

5.5.9 Análisis de imágenes

Las imágenes de inmunohistoquímica fueron capturadas con un microscopio óptico (BX40, Olympus Optical Corporation, Tokio, Japón), acoplado a una cámara digital (390CU 3.2 Megapixel CCD Camera, Micrometrics, España), mediante el programa informático Micrometrics SE P4 (Standard Edition Premium 4, Micrometrics, España). Las secciones se seleccionaron cuidadosamente para obtener regiones hipotalámicas comparables y las imágenes fueron tomadas bajo condiciones de captura estandarizadas para evitar factores de variabilidad externa. Los análisis de co-localización se realizaron con un microscopio láser con el programa informático EZ-C1 (EZ-C1 Software v3.9, Nikon Ltd., Londres, Reino Unido). Se utilizó el programa informático de edición de imágenes Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems Inc., Ontario, Canadá) para el ajuste digital del brillo y contraste de las imágenes.

5.5.10 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error standard de la media (SEM) de cada grupo experimental. La existencia de diferencias significativas en comparaciones de sólo 2 grupos se determinó mediante una prueba de t para muestras independientes; para la comparación de más de 2 grupos, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un Test de de Comparaciones Múltiples de Newman-Keuls. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., California, Estados Unidos). Las diferencias fueron consideradas significativas para el valor $p < 0.05$.

RESULTADOS

6

6.1 SECUENCIACIÓN DE LA PREPRO-HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (PREPRO-GnRH) DEL HIPOTÁLAMO DE *L. maximus*.

Mediante la técnica de 5'- y 3'-RACE PCR, la secuenciación de los productos obtenidos y el análisis de su identidad y homología, se caracterizó al ARNm que codifica para el precursor de GnRH hipotalámico, denominado prepro-GnRH (**Figura 9**). El estudio reveló la presencia de dos secuencias: una de 526 pares de bases (pb) y otra de 492 pb. La diferencia entre ellas radica en una sección de 34 nucleótidos (nt) ubicada en la región no traducida del extremo 5' (5'-UTR). El marco abierto de lectura abarca 279 nt y codifica para una secuencia de 92 aminoácidos, conservada en ambas isoformas. Su estructura comprende un péptido señal inicial de 69 nt, seguida por la secuencia de 30 nt correspondiente a la GnRH de mamífero o mGnRH, y una secuencia de 168 nt equivalente al péptido asociado a GnRH o GAP, ambas separadas por una región de 9 nt que codifica para 3 aminoácidos que integran un sitio de clivaje enzimático. El péptido señal comienza con el codón inicial ATG y la secuencia de GAP finaliza con el codón de terminación TAA. La región no traducida del extremo 3' consta de 154 nt, e incluye una señal de poliadenilación AGTAAA (ubicada a 3 nt del extremo 5' de la cola de Poli A) y una secuencia ATTTA. Las secuencias nucleotídicas de ambas isoformas de mGnRH de *L. maximus* fueron cargadas en la base de datos Gen-Bank (Números de Acceso **KT003537** y **KT336553**) (**Figura 10**).

La secuencia de ARNm obtenida fue alineada con las secuencias de prepro-GnRH previamente descritas para otros roedores, observándose un alto grado de homología entre ellas (**Figura 11** y **Tabla 6**). Se determinó un 92% de similitud con la prepro-GnRH completa de *C. lanigera*, 87% con *C. porcellus*, 88% con *O. degus*, 81% con *R. norvegicus*, 81% con *M. musculus* y 81% con ambas isoformas de *H. sapiens*. La región correspondiente al péptido de GnRH de vizcacha mostró un 93.3% de homología con la variante mGnRH clásica, mientras que la secuencia de GAP exhibió la mayor homología (93.57%) con la correspondiente de *C. lanigera*. La ubicación de la secuencia de poliadenilación de *L. maximus* coincide con la descrita para *C. porcellus*. La secuencia de aminoácidos de GnRH deducida para vizcacha sería idéntica a la determinada en *C. lanigera*, *O. degus*, *M. musculus*, *R. norvegicus* y *H. sapiens*. La comparación con la secuencia de *C. porcellus* reveló una sustitución T x C en el primer nucleótido del segundo codón, y una sustitución G x T en el primer nucleótido del séptimo codón, mientras que se observaron tres sustituciones de nucleótidos al compararla con la secuencia de *H. sapiens* (**Figura 11-B** y **Tabla 6**). El trabajo completo fue publicado en la revista *General and Comparative Endocrinology* (Charif y col., 2016).

FIGURA 9. AMPLIFICACIÓN DE GnRH

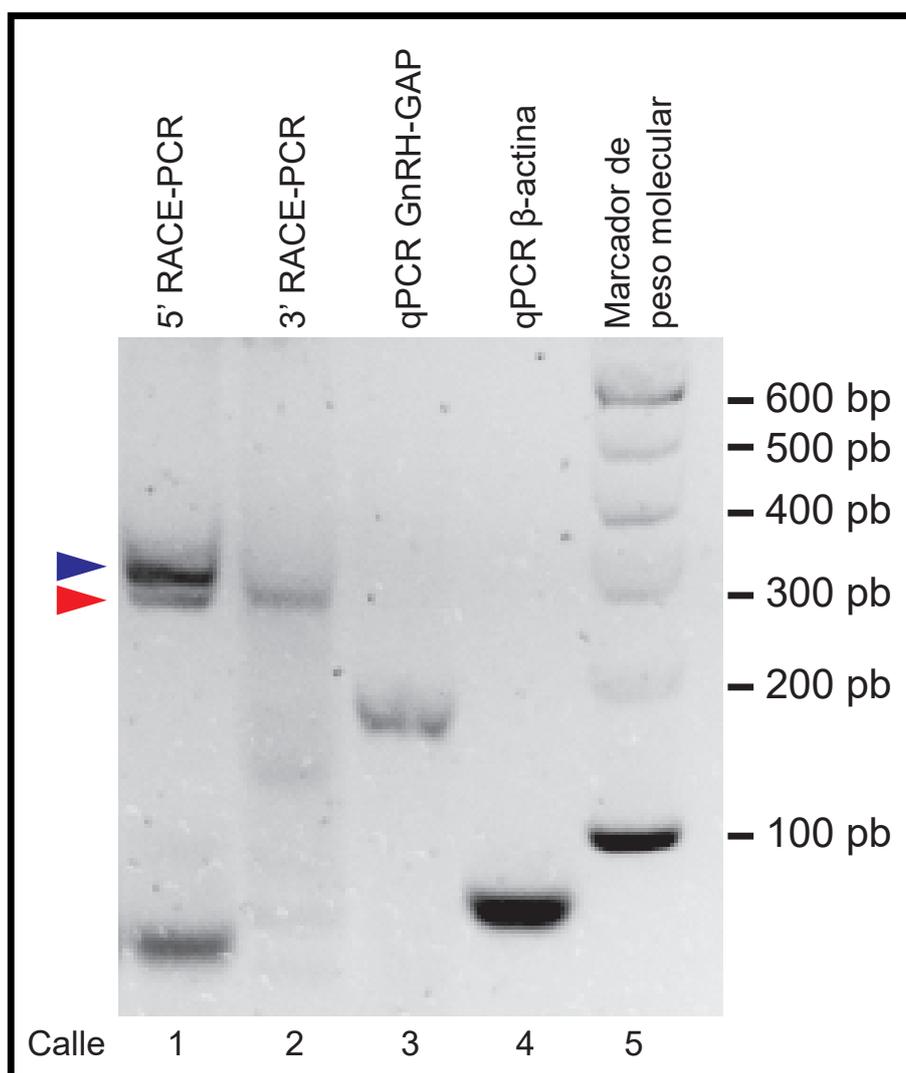
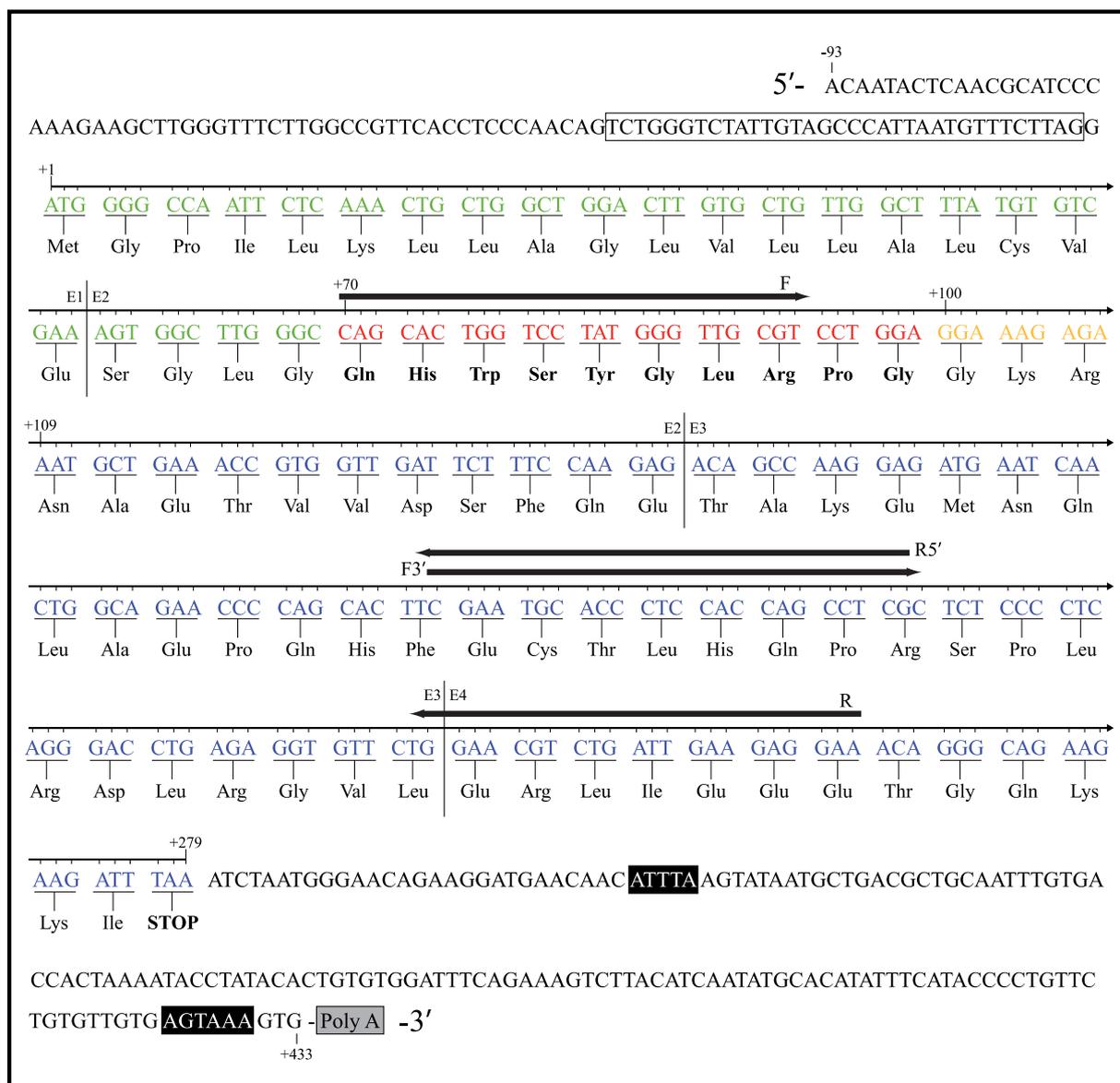
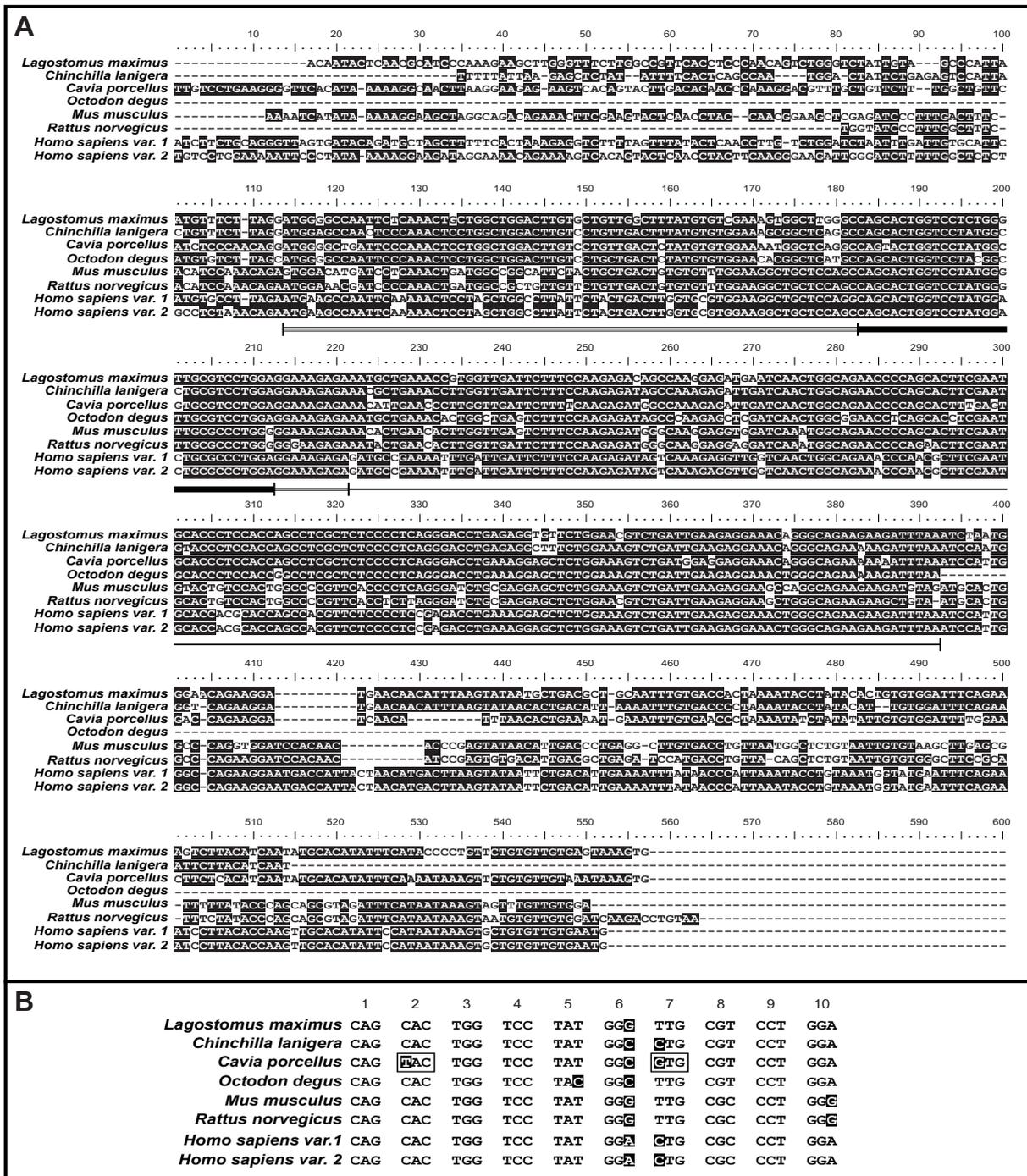


Imagen representativa de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% de los amplicones obtenidos. Se indican la posición del producto de 5' RACE-PCR correspondiente a la variante corta (punta de flecha roja) y a la variante larga (punta de flecha azul) de GnRH. Calle 1: producto de 5' RACE-PCR. Calle 2: producto de 3' RACE-PCR. Calle 3: producto de PCR cuantitativa (*qPCR*) de GnRH-GAP. Calle 4: producto de PCR cuantitativa (*qPCR*) de β -actina. Calle 5: marcador de peso molecular de ADN (100 pb). *Adaptado de Charif y col. (2016).*

FIGURA 10. SECUENCIA DEL ARNm DE LA GnRH HIPOTALÁMICA DE *L. maximus*

Secuencia completa del cDNA y aminoacídica deducida de la prepro-GnRH hipotalámica de la vizcacha. Verde: péptido señal. Rojo: GnRH. Naranja: sitio de clivaje enzimático. Azul: GAP. Negro: 5'- y 3'-UTRs. La región 5'-UTR se indica con números negativos y representa a la isoforma larga, mientras que los nucleótidos ausentes en la isoforma corta se muestran recuadrados. Los números de los nucleótidos se indican encima de la secuencia. El codón de inicio del marco abierto de lectura se indica como +1. La región correspondiente a GAP termina en el nucleótido 279 con el codón TAA. La señal de poli-adenilación y la secuencia ATTTA se remarcan en negro, en el extremo 3'. Las flechas sobre la secuencia indican la ubicación de los *primers forward* (F) y *reverse* (R) utilizados para amplificar el fragmento de GnRH-GAP específico de vizcacha, y de los primers específicos utilizados en la RACE-PCR (siendo R5' el *primer reverse* y F3' el *primer forward*). La secuencia deducida de aminoácidos se indica debajo de los codones; los aminoácidos predichos correspondientes a GnRH se muestran en negrita. Los límites exón-exón deducidos se indican como En. Adaptado de Charif y col. (2016).

FIGURA 11. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DEL ARNm de GnRH DE *L. maximus*



A. Alineamiento de la secuencia obtenida de la prepro-GnRH en vizcacha con aquella de chinchilla (*C. lanigera*), cobayo (*C. porcellus*), degú (*O. degus*), ratón (*M. musculus*), rata (*R. norvegicus*) y humano (*H. sapiens*, isoformas 1 y 2 de GnRH1). Para maximizar la homología, las secuencias se alinearon de acuerdo a las secuencias de GnRH. Los nucleótidos se numeraron respecto del primer nucleótido de la secuencia de cobayo, y los números se indican en la parte superior de las secuencias. La secuencia 5'-UTR en humano en ambas secuencias muestra únicamente la región 3' de cada una. Los nucleótidos homólogos se indican sombreados en negro. La línea triple indica el péptido señal, la línea gruesa muestra la secuencia de GnRH. La línea doble indica la secuencia del

sitio de clivaje enzimático. La línea delgada muestra la secuencia de GAP. **B.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de GnRH de *L. maximus*, *C. lanigera*, *C. porcellus*, *O. degus*, *M. musculus*, *R. norvegicus* y *H. sapiens*. Los nucleótidos no homólogos se indican sombreados con negro, y los codones que codifican para aminoácidos diferentes se remarcan con un cuadrado. El número de codones se muestra encima de las secuencias. *Adaptado de Charif y col. (2016).*

TABLA 6. PORCENTAJE DE HOMOLOGÍA DEL ARNm DE GnRH DE *L. maximus* CON OTRAS ESPECIES

| ESPECIE | <i>Lagostomus maximus</i> | | |
|--------------------------------|---------------------------|----------|---------|
| | PREPRO-GnRH (%) | GnRH (%) | GAP (%) |
| <i>Mus musculus</i> | 81.00 | 93.33 | 82.46 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | 81.00 | 93.33 | 83.63 |
| <i>Cavia porcellus</i> | 87.00 | 90.00 | 87.62 |
| <i>Octodon degus</i> | 88.00 | 93.33 | 88.30 |
| <i>Chinchilla lanigera</i> | 92.00 | 93.33 | 93.57 |
| <i>Homo sapiens</i> variante 1 | 81.00 | 93.33 | 83.63 |
| <i>Homo sapiens</i> variante 2 | 81.00 | 93.33 | 83.63 |

La información expuesta en la tabla fue adaptada de Charif y col. (2016)

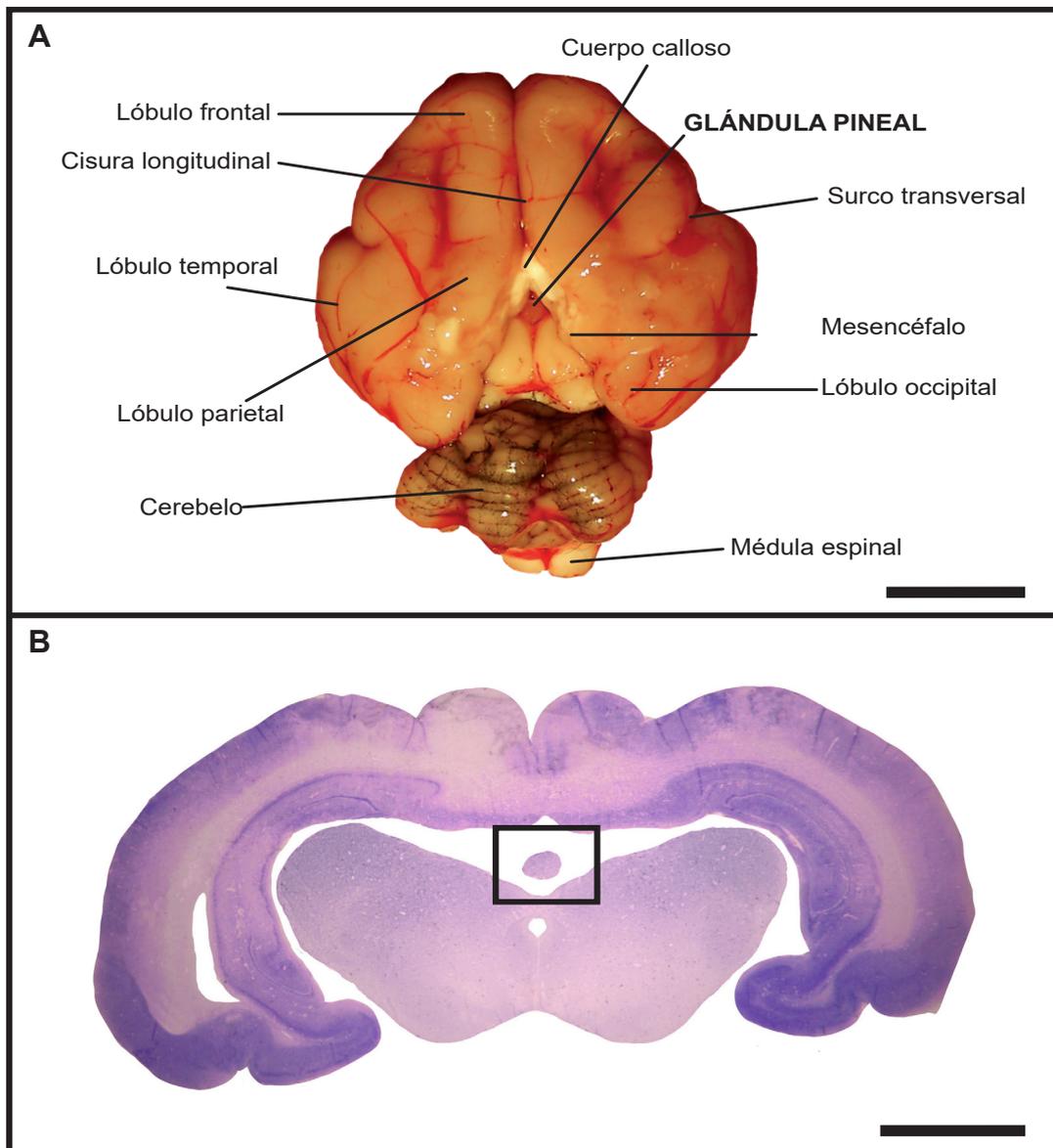
6.2 DISPONIBILIDAD LUMÍNICA Y MODULACIÓN DEL EJE H.H.G.

6.2.1 Descripción, localización y variaciones de los componentes del sistema melatonérgico central a lo largo del ciclo reproductivo de la vizcacha.

6.2.1.1 *Inmunolocalización de AANAT en la glándula pineal de la vizcacha*

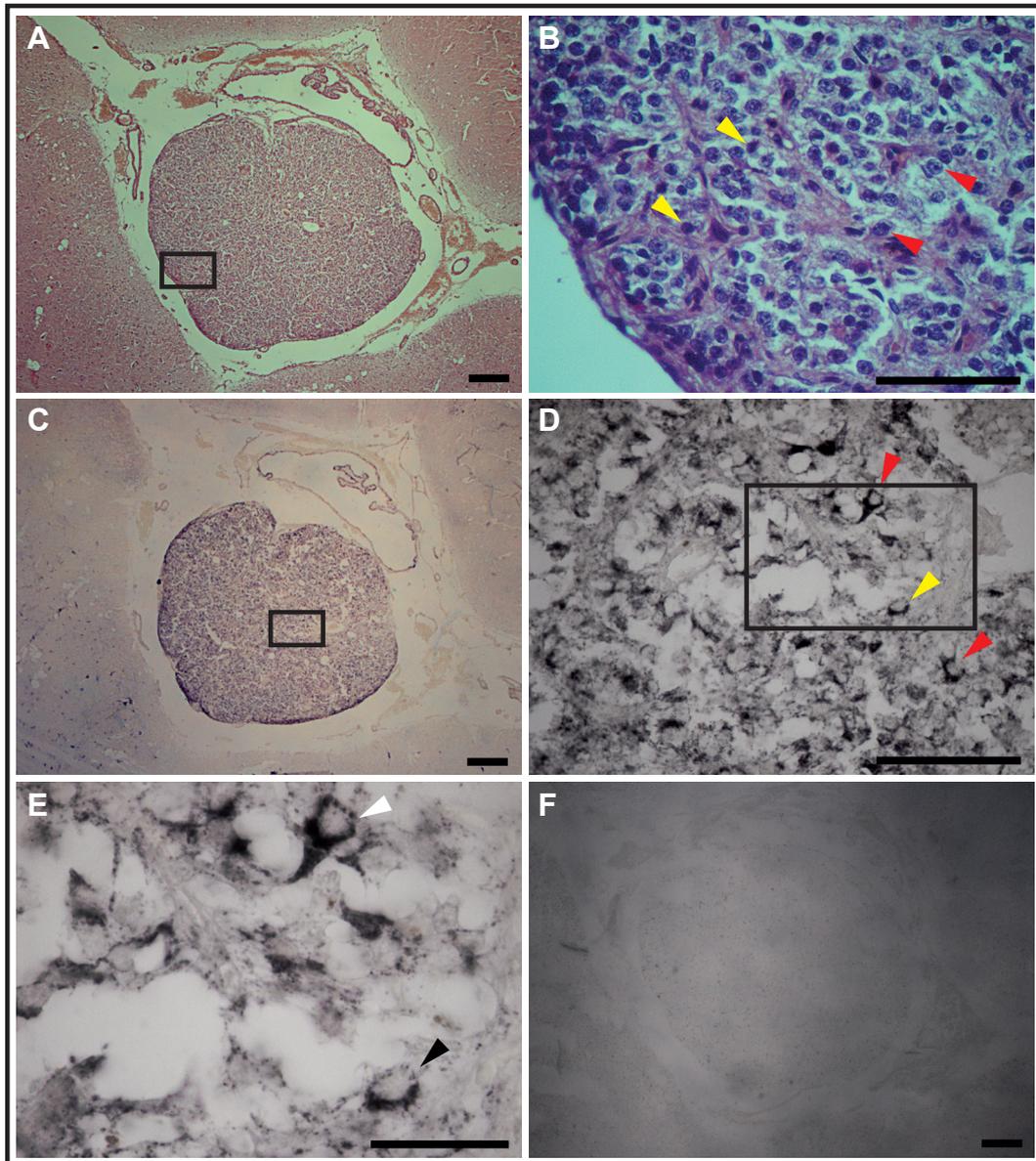
La **Figura 12** muestra la localización anatómica (**A**) e histológica (**B**) de la glándula pineal en el cerebro de la vizcacha, la cual tiene forma ovoide, se encuentra libre sobre el mesencéfalo y está cubierta por sustancia blanca y los lóbulos occipitales. La tinción mediante hematoxilina y eosina de cortes histológicos coronales del cerebro a la altura de la glándula pineal permitió distinguir dos tipos celulares en este órgano según sus características nucleares: células con núcleo redondeado, de gran tamaño, con cromatina poco densa y dispersa, y nucléolo prominente, y otras células con núcleo ovoide, pequeño, con cromatina densa y homogénea (**Figura 13-A y B**). Asimismo, mediante la técnica de inmunohistoquímica, se observó marca inmunopositiva citoplasmática para AANAT en células dispersas de forma aleatoria por toda la glándula pineal de la vizcacha (**Figura 13-C, D y E**). Se pudieron distinguir dos tipos celulares inmunomarcados: un conjunto de células de morfología irregular estrellada, con algunos procesos inmunorreactivos, y otro grupo de células de forma esférica u ovalada.

FIGURA 12. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA DE LA GLÁNDULA PINEAL DE *L. maximus*



A. Fotografía de la vista dorsal de un cerebro de hembra de vizcacha, donde se destaca la localización *in situ* de la glándula pineal (los lóbulos occipitales han sido desplazados para permitir su observación). Barra de escala: 1 cm.

B. Imagen histológica representativa de un corte coronal de cerebro de vizcacha a la altura de la glándula pineal, teñido con la técnica de Nissl (*adaptado de Schmidt, 2013*). Barra de escala: 5 mm

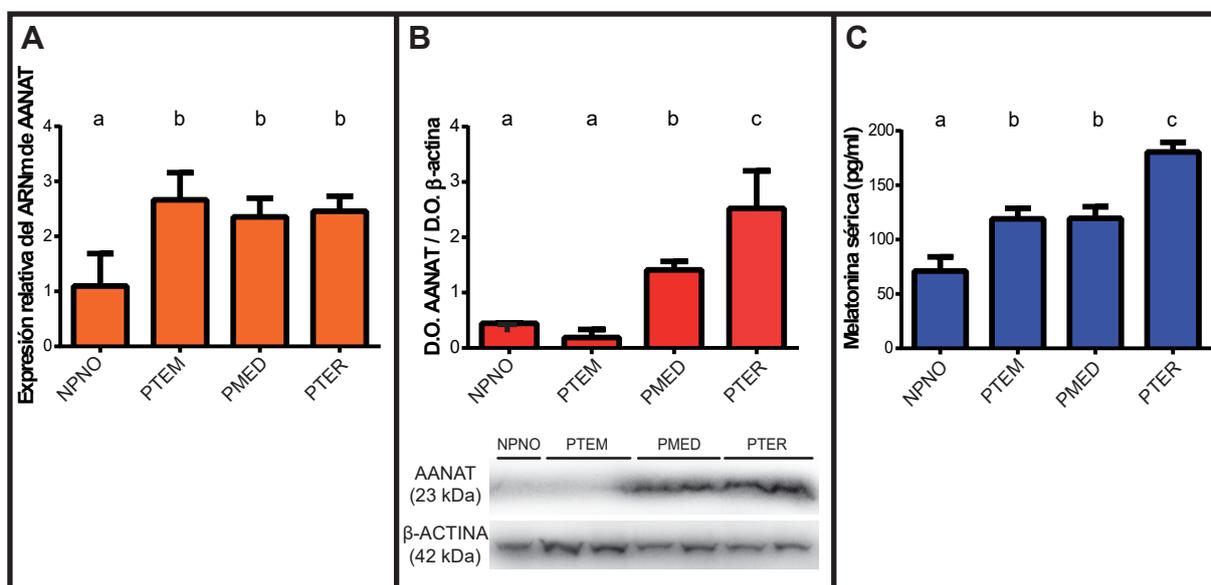
FIGURA 13. INMUNOLocalIZACIÓN DE AANAT EN LA GLÁNDULA PINEAL DE LA VIZCACHA

A. Imagen histológica representativa de un corte coronal de cerebro de vizcacha a la altura de la glándula pineal, teñido con hematoxilina y eosina. **B.** Detalle del área indicada por el recuadro negro en **A**, donde se pueden distinguir dos tipos celulares según su morfología nuclear: un grupo con núcleo grande, redondo, de cromatina pálida y nucleolo prominente (indicado con una punta de flecha roja), y otro con núcleo ovalado, con cromatina densa y homogénea (destacado con una punta de flecha amarilla). **C.** Imagen representativa de una inmunohistoquímica para AANAT en un corte coronal de la glándula pineal de la vizcacha. **D.** Detalle del área indicada por el recuadro negro en **C**, donde se muestran dos células con marca citoplasmática positiva para AANAT, de morfología distinta, indicadas por las puntas de flecha roja y amarilla. **E.** Detalle del área indicada por el recuadro negro en **D**, donde se observa una célula inmunopositiva para AANAT de morfología irregular (punta de flecha blanca) y otra célula inmunopositiva para AANAT con morfología esférica regular (punta de flecha negra). **F.** Imagen histológica representativa de una control negativo (por omisión del anticuerpo primario) para la inmunohistoquímica de AANAT en un corte coronal de cerebro de vizcacha a la altura de la glándula pineal. Barras de escala: B, D, E: 50 μm ; A, C, F: 200 μm .

6.2.1.2 Expresión de AANAT en la glándula pineal a lo largo del ciclo reproductivo de la vizcacha

La cuantificación de la expresión del ARNm de AANAT en la glándula pineal mediante PCR Cuantitativa arrojó como resultado que durante la gestación sus niveles fueron significativamente mayores respecto del grupo NPNO y se mantuvieron sin variaciones (**Figura 14-A**). Asimismo, la expresión de la proteína AANAT y de los niveles séricos de melatonina aumentaron de manera significativa ($p < 0.05$) conforme progresa la gestación, alcanzando un valor máximo en los animales con preñez a término (PTER), en relación a los animales en preñez temprana (PTEM) y media (PMED) y los animales NPNO (**Figura 14-B y C**).

FIGURA 14. EXPRESIÓN DE AANAT Y NIVELES SÉRICOS DE MELATONINA A LO LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO DE LA VIZCACHA

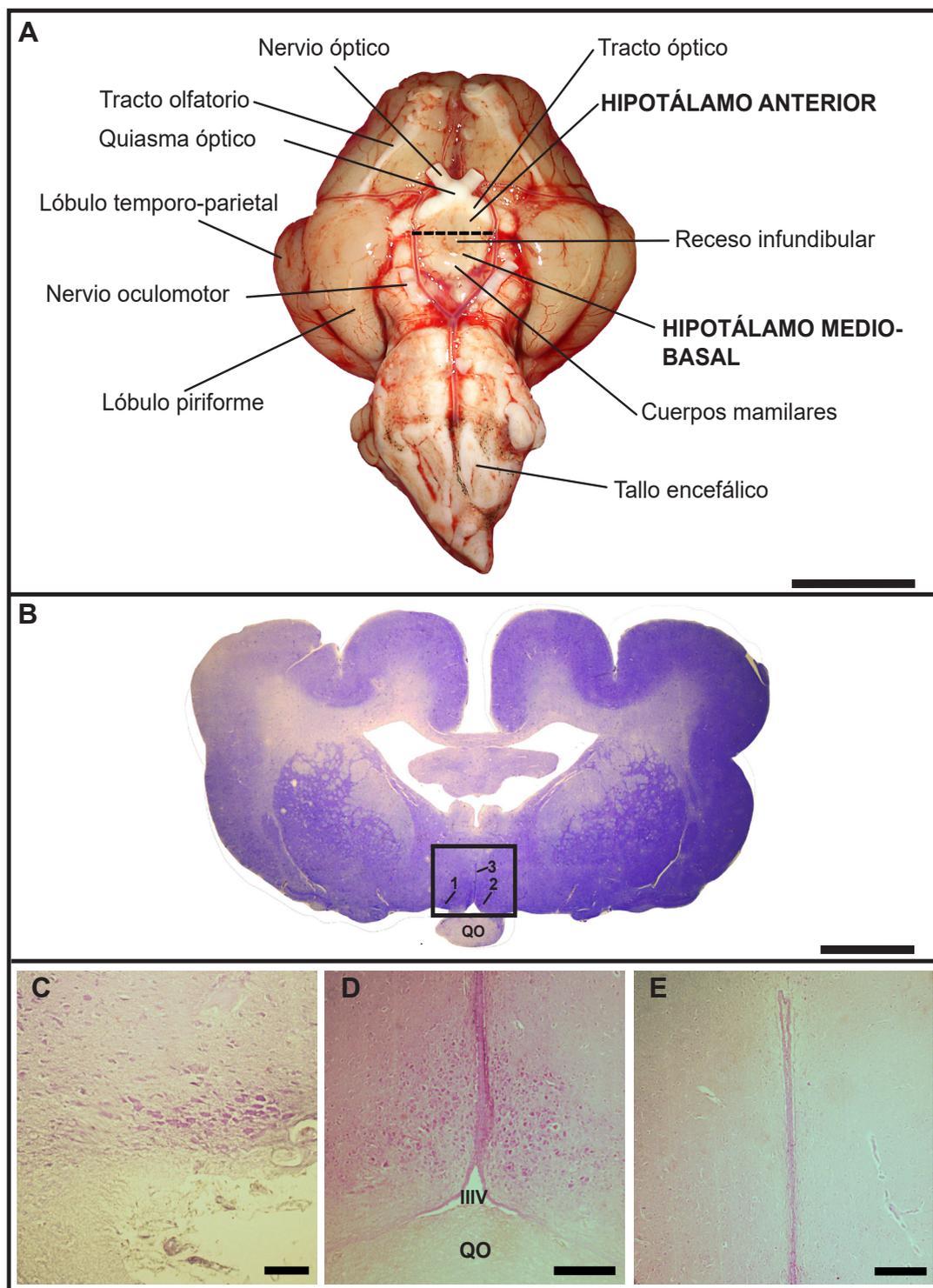


A. Expresión del ARNm de AANAT, determinada por PCR Cuantitativa. **B.** Expresión de la proteína AANAT, determinada por Western Blot. **C.** Niveles séricos de melatonina (pg/ml), determinados por ELISA. NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. PTEM: vizcachas en fase temprana de la gestación. PMED: vizcachas en fase media de la gestación. PTER: vizcachas con preñez a término. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.2.1.3 Inmunolocalización de MT_1 y MT_2 y estudio de la co-localización con GnRH en el hipotálamo de la vizcacha.

La **Figura 15-A** muestra la ubicación ventral del hipotálamo *in situ*, indicando su porción anterior y posterior, así como los límites que se describen en el apartado *Criterios de disección de los órganos* en la sección **Materiales y Métodos**. En la **Figura 15-B** puede observarse la localización histológica del NSQ, NSO y NPeV en el hipotálamo anterior de la vizcacha (delimitado por el recuadro negro). En la **Figura 15-C, D y E** se muestra la estructura de cada núcleo en cortes histológicos coronales a la altura del hipotálamo teñidos con la técnica de Nissl. El estudio por inmunofluorescencia con microscopía confocal de la localización de los

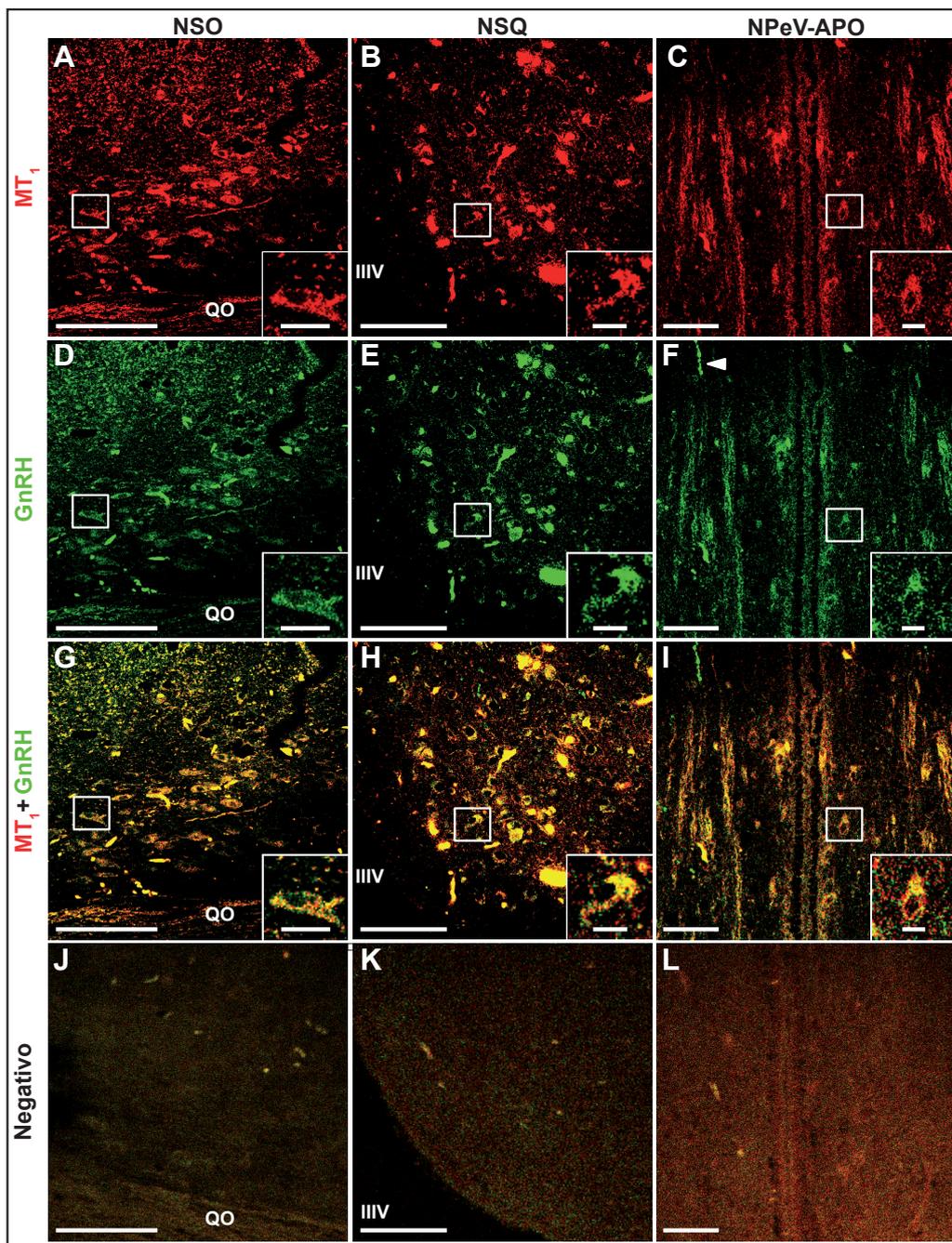
FIGURA 15. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA E HISTOLÓGICA DEL HIPOTÁLAMO DE *L. maximus*



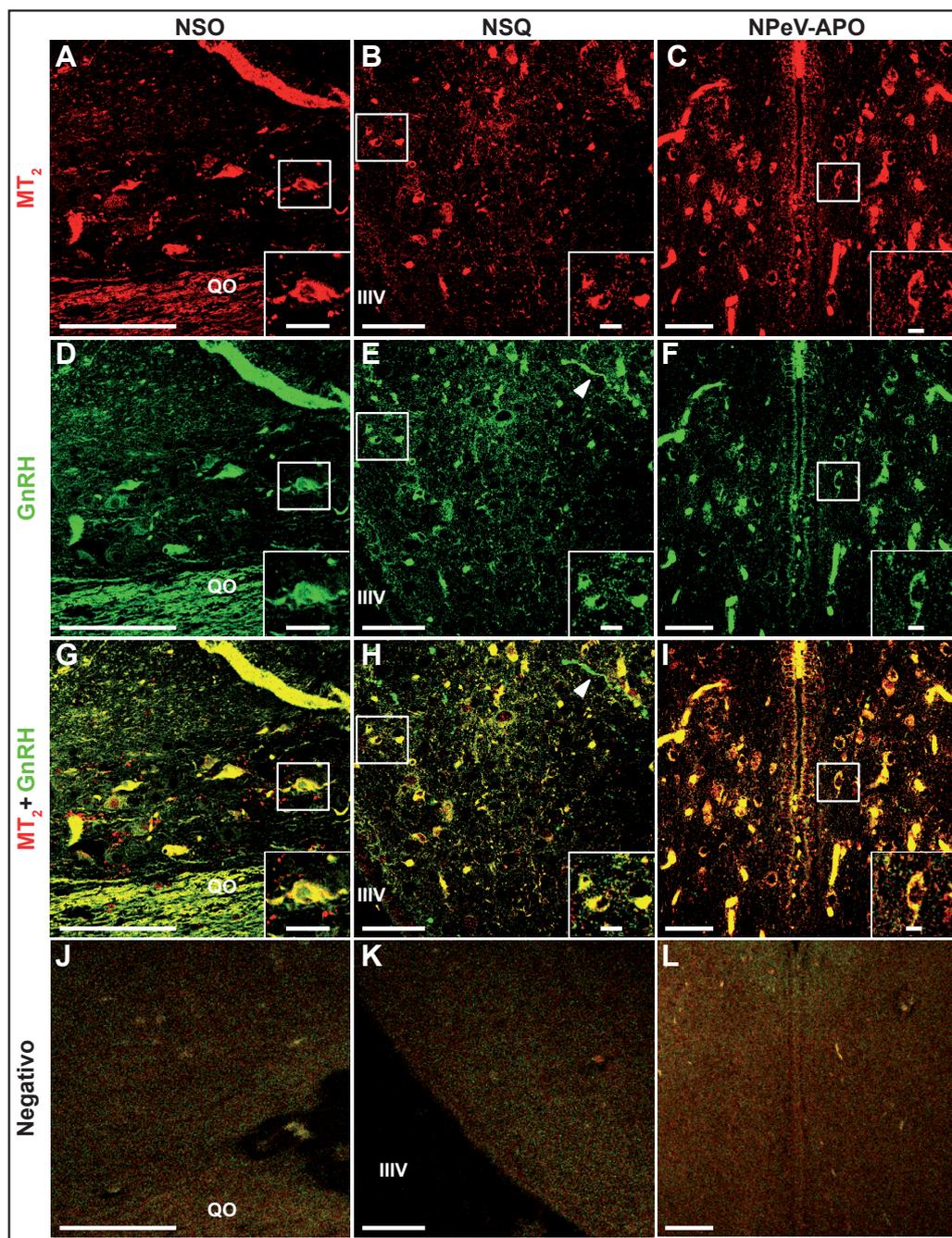
A. Fotografía de la vista ventral de un cerebro de hembra de vizcacha, donde se observa la localización *in situ* del hipotálamo. La línea discontinua indica el límite entre hipotálamo anterior e hipotálamo medio-basal. Barra

de escala: 1 cm. **B.** Imagen histológica representativa de un corte coronal de cerebro de vizcacha a la altura del hipotálamo (delimitado por el recuadro negro), teñido con la técnica de Nissl. Se observa la ubicación de los núcleos supraóptico (1), supraquiasmático (2) y periventricular (3). Barra de escala: 5 mm. *Adaptado de Schmidt (2013).* **C.** Imagen histológica representativa de un corte coronal de cerebro de vizcacha a la altura del núcleo supraóptico hipotalámico, teñido con la técnica de Nissl. Barra de escala: 50 μm . **D.** Imagen histológica representativa de un corte coronal de cerebro de vizcacha a la altura del núcleo supraquiasmático hipotalámico, teñido con la técnica de Nissl. Barra de escala: 200 μm . **E.** Imagen histológica representativa de un corte coronal de cerebro de vizcacha a la altura del núcleo periventricular hipotalámico, teñido con la técnica de Nissl. Barra de escala: 200 μm . IIIV: tercer ventrículo. QO: quiasma óptico.

receptores de melatonina en el hipotálamo y su co-localización con GnRH, permitió determinar que el NSQ, el NSO y el NPeV-APO expresan MT_1 (**Figura 16-A, B, y C**) y MT_2 (**Figura 16-A, B y C**), observándose marca inmunopositiva para ambos receptores en la membrana plasmática de los somas neuronales (como muestran los insertos de las **Figuras 16 y 17**). La marca inmunopositiva para GnRH se observó en neuronas de los 3 núcleos analizados (**Figura 16-D, E y F**), y todas las células inmunopositivas para GnRH presentaron co-expresión de MT_1 (**Figura 16-G, H e I**) y de MT_2 (**Figura 17-G, H e I**). No se observó marca positiva para los dos receptores de melatonina en neuritas, mientras que se determinó inmunorreactividad para GnRH en varicosidades axónicas de neuronas del NPeV-APO (**Figura 16-F**) y del NSQ (**Figura 17-D**).

FIGURA 16. CO-LOCALIZACIÓN DE GnRH Y MT_1 EN EL HIPOTÁLAMO DE *L. maximus*

Inmunofluorescencia y co-localización por microscopía confocal de GnRH (verde) y MT_1 (rojo) en núcleo supraquiasmático (NSQ) (A, D, G, J), núcleo supraóptico (NSO) (B, E, H, K) y núcleo periventricular-área preóptica (NPeV-APO) (C, F, I, L) en hipotálamo de hembra de vizcacha no preñada no ovulando (NPNO). La co-localización (MT_1 + GnRH) se observa en color amarillo (G, H, I). Los insertos corresponden al detalle recuadrado en cada fotografía. IIIIV: tercer ventrículo. QO: quiasma óptico. La punta de flecha blanca indica una varicosidad inmunorreactiva para GnRH en NePV-APO. Los controles negativos (J, K, L) corresponden a incubación con los anticuerpos secundarios, con omisión del anticuerpo primario. Barras de escala: 50 μ m. Barra de escala de insertos: 10 μ m.

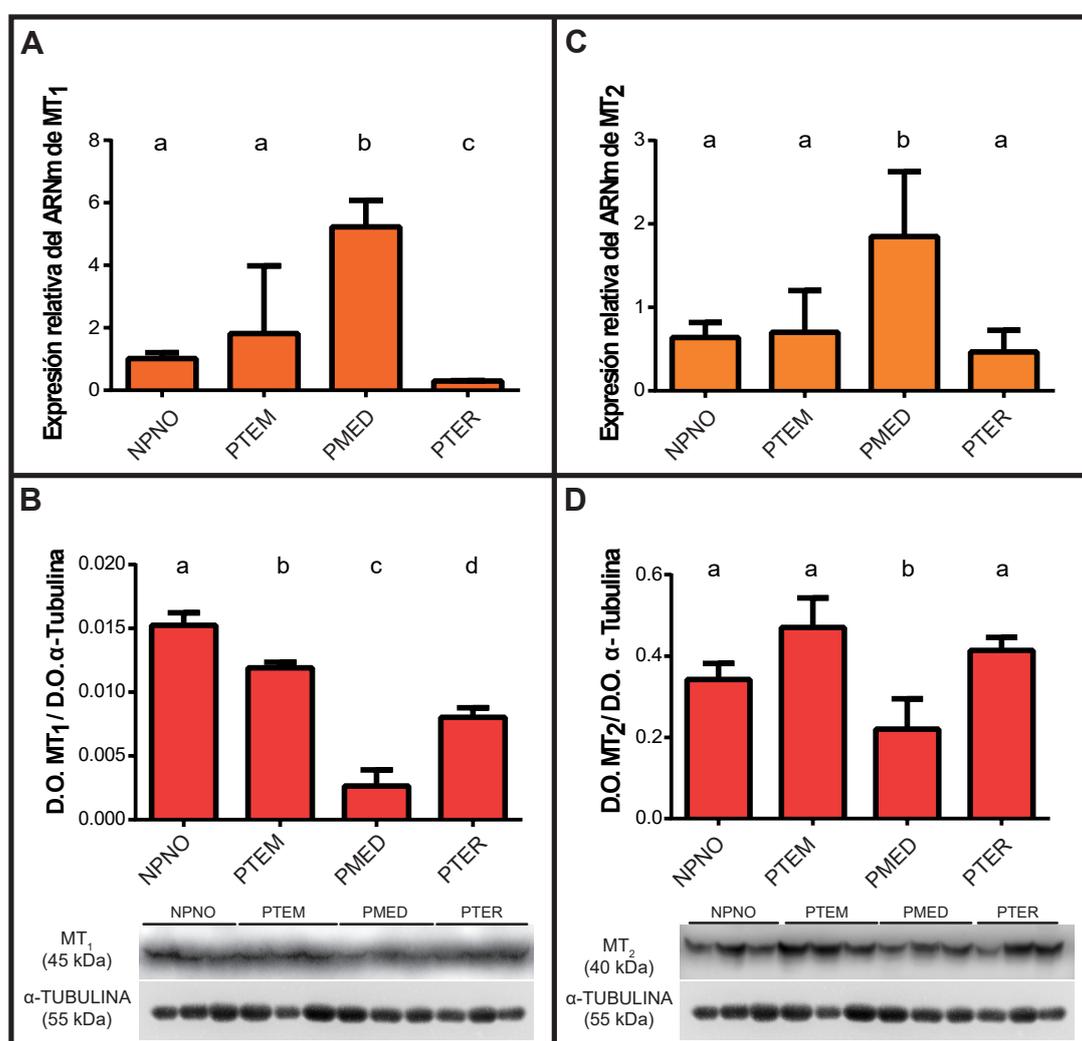
FIGURA 17. CO-LOCALIZACIÓN DE GnRH Y MT_2 EN EL HIPOTÁLAMO DE *L. maximus*

Inmunofluorescencia y co-localización por microscopía confocal de GnRH (verde) y MT_2 (rojo) en núcleo supraquiasmático (NSQ) (A, D, G, J), núcleo supraóptico (NSO) (B, E, H, K) y núcleo periventricular-área preóptica (NPeV-APO) (C, F, I, L) en hipotálamo de hembra de vizcacha no preñada no ovulando (NPNO). La co-localización (MT_2 + GnRH) se observa en color amarillo (G, H, I). Los insertos corresponden al detalle recuadrado en cada fotografía. IIIIV: tercer ventrículo. QO: quiasma óptico. La punta de flecha blanca indica una varicosidad inmunorreactiva para GnRH en NePV-APO. Los controles negativos (J, K, L) corresponden a incubación con los anticuerpos secundarios, con omisión del anticuerpo primario. Barras de escala: 50 μ m. Barra de escala de insertos: 10 μ m.

6.2.1.4 Expresión de MT_1 y MT_2 en el hipotálamo a lo largo del ciclo reproductivo de la vizcacha

Se observaron variaciones de la expresión de los receptores de melatonina a lo largo de la gestación (**Figura 18**). El patrón de expresión de los ARNm de MT_1 y de MT_2 resultó similar, con niveles significativamente mayores en PMED en relación a los otros grupos ($p < 0.05$) (**Figura 18-A y C**). Llamativamente, la expresión proteínica de ambos receptores no se correlacionó con la de su ARNm, ni fue similar entre ellos. En PMED se detectaron los niveles más bajos de proteína MT_1 y MT_2 respecto con los otros grupos ($p < 0.05$) (**Figura 18-B y D**).

FIGURA 18. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA HIPOTALÁMICOS A LO LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO DE LA VIZCACHA



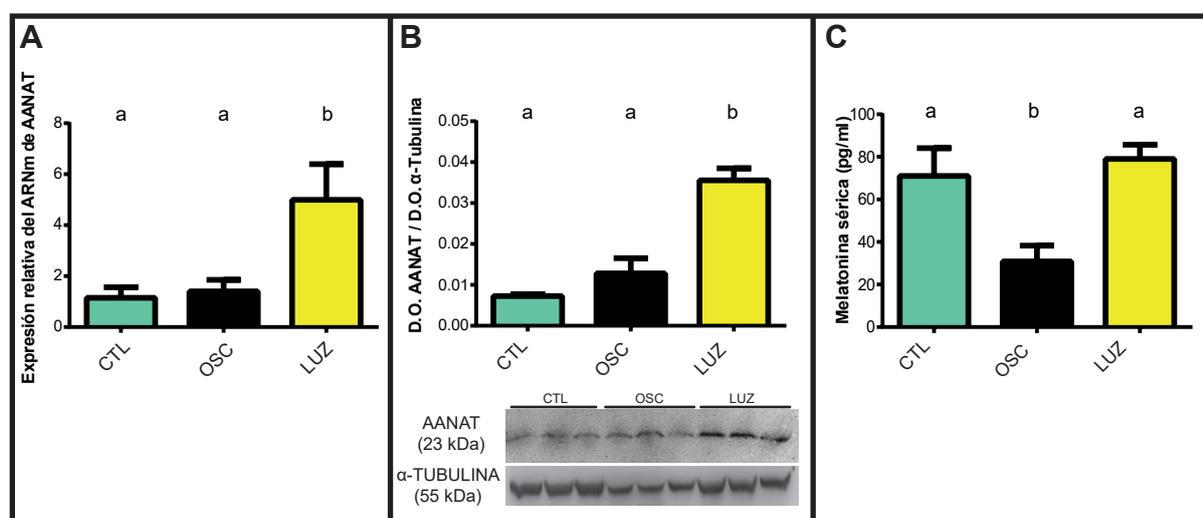
A. Expresión del ARNm de MT_1 , determinada por PCR Cuantitativa. **B.** Expresión proteínica de MT_1 , determinada por Western Blot. **C.** Expresión del ARNm de MT_2 , determinada por PCR Cuantitativa. **D.** Expresión proteínica de MT_2 , determinada por Western Blot. NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. PTEM: vizcachas en fase temprana de la gestación. PMED: vizcachas en fase media de la gestación. PTER: vizcachas con preñez a término. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.2.2. Efecto del fotoperíodo sobre el eje reproductivo en hembras no preñadas no ovulando

Se estudió el efecto de la luz u oscuridad continuos sobre la actividad del eje reproductivo y algunos componentes del sistema melatoninérgico de la vizcacha. Para ello, se expuso a hembras capturadas en época de anestro (NPNO) durante 15 días a luz continua (grupo Luz), oscuridad continua (grupo Oscuridad) o a un fotoperíodo regular de 12 horas de luz tenue y 12 horas de luz tipo luna (grupo Control).

Mediante PCR Cuantitativa, se estimaron los niveles de expresión del ARNm de AANAT en la glándula pineal. Como resultado, se observó un aumento significativo en los animales expuestos a luz constante, respecto de los tratamientos Control y Oscuridad ($p < 0.05$) (**Figura 19-A**). El análisis de la expresión de la proteína AANAT por la técnica de Western Blot arrojó el mismo patrón de variación (**Figura 19-B**). Sin embargo, los niveles séricos de melatonina, determinados con la técnica de ELISA, fueron significativamente menores en los animales del tratamiento Oscuridad en comparación los restantes tratamientos ($p < 0.05$) (**Figura 19-C**).

FIGURA 19. EXPRESIÓN DE AANAT EN LA GLÁNDULA PINEAL EN VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS

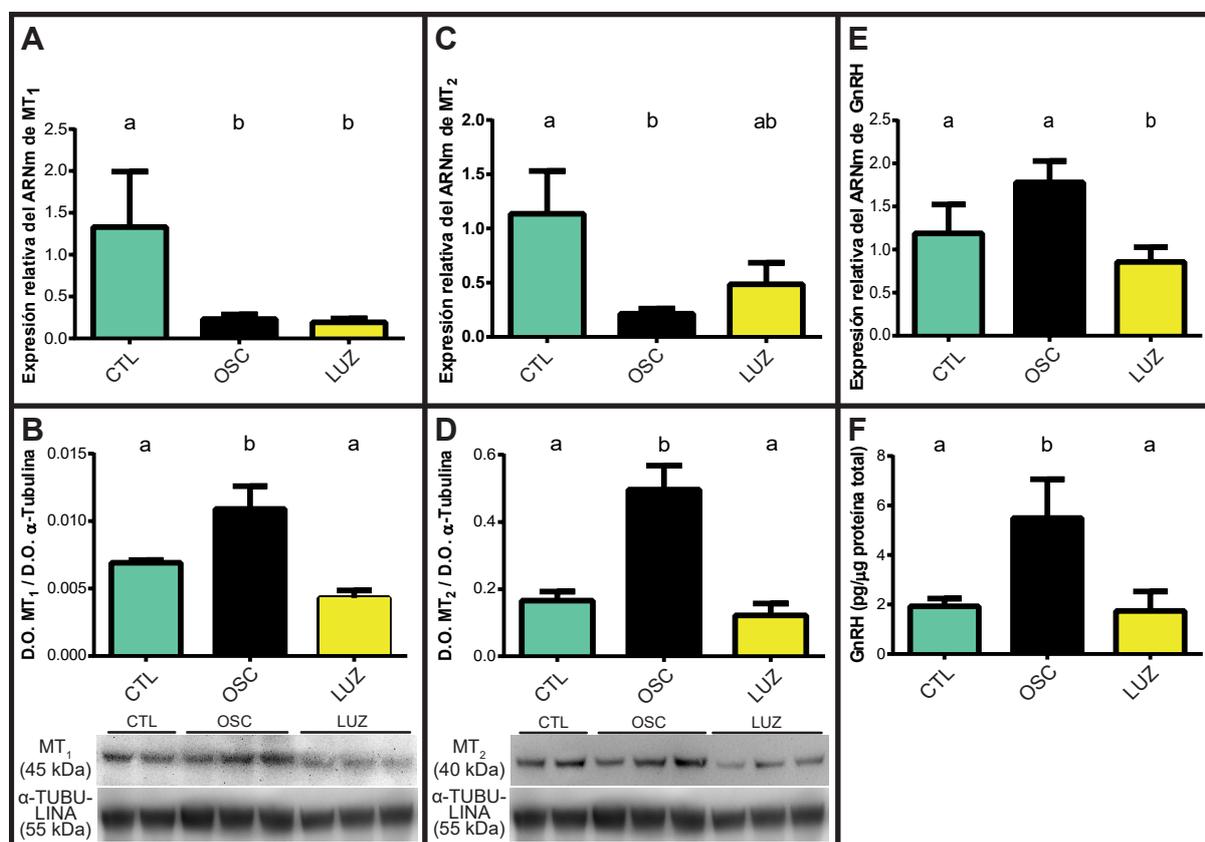


Expresión del ARNm de AANAT en la glándula pineal determinada por PCR Cuantitativa (**A**), expresión proteínica de AANAT en la glándula pineal determinada por Western Blot (**B**) y niveles séricos de melatonina (pg/ml) estimados por ELISA (**C**), de hembras de vizcacha NPNO expuestas a luz continua (LUZ), oscuridad continua (OSC) o 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (CTL). NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

El efecto de la luz o de la oscuridad constantes durante 15 días se evaluó, además, en los tres niveles del eje reproductivo (hipotalámico, hipofisario y ovárico), y se estudió la expresión de los receptores de melatonina MT_1 y MT_2 así como los niveles de las hormonas moduladoras del eje y la dinámica ovárica.

A nivel hipotalámico, tanto la luz como la oscuridad continuas redujeron significativamente los niveles del ARNm de ambos receptores de melatonina con respecto al grupo Control ($p < 0.05$) (**Figura 20-A y C**). Sin embargo, la expresión proteínica no siguió el mismo patrón, observándose mayores niveles de expresión de MT_1 y de MT_2 en los animales sometidos a oscuridad constante, relación a los restantes tratamientos ($p < 0.05$) (**Figura 20-B y D**). Respecto de la GnRH hipotalámica, los niveles de expresión de su ARNm disminuyeron significativamente en el grupo "Luz" con respecto a los grupos Control y Oscuridad (**Figura 20-E**). El patrón de expresión proteínica de GnRH resultó similar al del ARNm, identificándose un aumento significativo en los animales sometidos a oscuridad constante con respecto a los otros grupos ($p < 0.05$) (**Figura 20-F**).

FIGURA 20. EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE GnRH, MT_1 Y MT_2 EN VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS

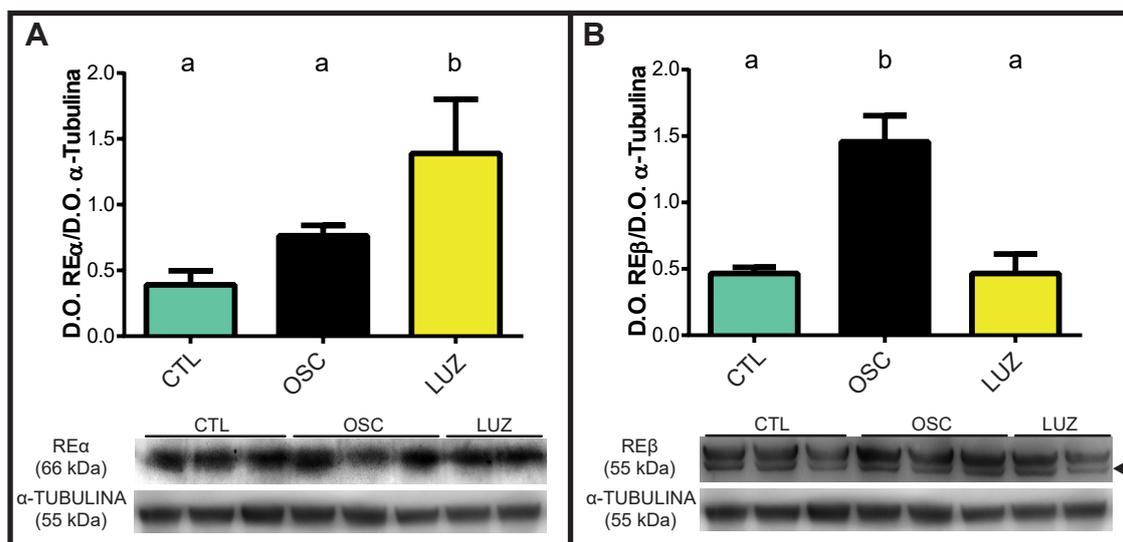


Análisis de los niveles de expresión hipotalámica del ARNm (**A**) y proteína (**B**) de MT_1 , del ARNm (**C**) y proteína (**D**) de MT_2 , y del ARNm (**E**) y proteína (**F**) GnRH en hembras de vizcacha NPNO expuestas a luz continua (LUZ), oscuridad continua (OSC) o 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (CTL). La expresión del ARNm se estimó mediante PCR Cuantitativa y la expresión proteínica se estimó con la técnica de Western Blot o por RIA. NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

En los mismos animales se estudió, mediante la técnica de Western Blot, la expresión hipotalámica de los receptores de estrógenos α ($RE\alpha$) y β ($RE\beta$) (**Figura 21**). Como resultado,

se observó un aumento significativo de la expresión del RE α en el grupo Luz (**Figura 21-A**), mientras que RE β mostró sus niveles más elevados en el grupo Oscuridad, en comparación con los restantes grupos (**Figura 21-B**).

FIGURA 21. EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE RE α Y RE β EN VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS

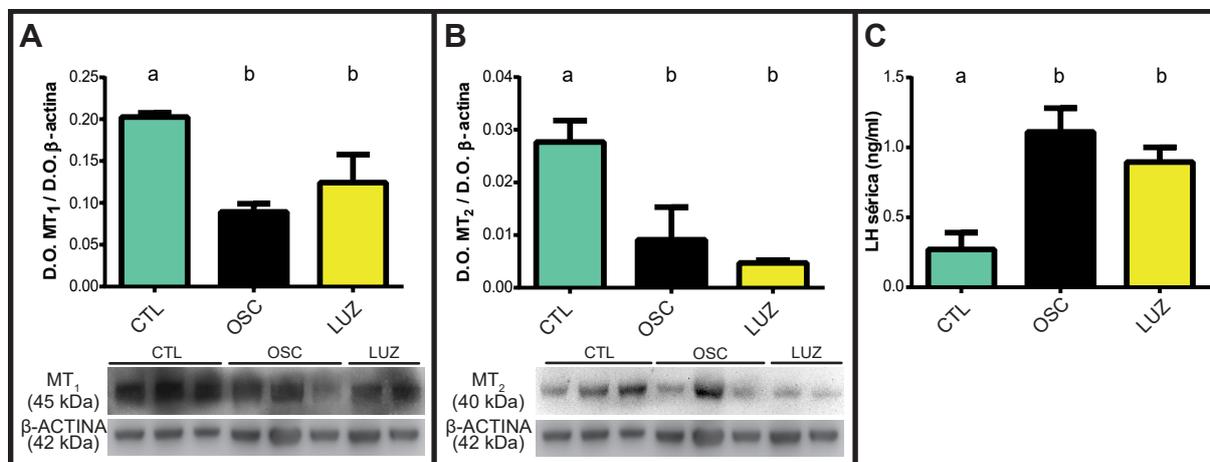


Análisis de los niveles de expresión hipotalámica (mediante Western Blot) del RE α (**A**) y del RE β (**B**) en hembras de vizcacha NPNO expuestas a luz continua (LUZ), oscuridad continua (OSC) o 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (CTL). La punta de flecha negra indica la banda analizada, correspondiente al RE β de 66 kDa. NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

La cuantificación de los niveles de LH sérica en estos grupos mediante RIA mostró un incremento significativo de sus niveles en los animales de los grupos Luz y Oscuridad respecto del tratamiento Control ($p < 0.05$) (**Figura 22-A**). Por otro lado, la expresión proteínica de los receptores MT $_1$ y MT $_2$ en la adenohipófisis fue significativamente menor en los animales expuestos a luz u oscuridad constantes, comparado con los animales del grupo Control ($p < 0.05$) (**Figura 22-B y C**).

A nivel ovárico, se observó que los niveles proteínicos de MT $_1$ aumentaron significativamente en los animales expuestos a oscuridad constante, con respecto a los grupos Control y Luz ($p < 0.05$) (**Figura 23-A**), mientras que la expresión de la proteína MT $_2$ sufrió una reducción significativa en los animales del tratamiento Oscuridad cuando se comparó con los restantes tratamientos ($p < 0.05$) (**Figura 23-B**). Por otro lado, la expresión del receptor de LH (RLH) siguió el mismo patrón que MT $_1$, registrándose un incremento significativo de sus niveles en los animales expuestos a oscuridad constante, respecto a los grupos Control y Luz ($p < 0.05$) (**Figura 23-C**). El estudio de la dinámica ovárica reveló un incremento significativo en el número de folículos antrales y de cuerpos lúteos, en los animales del tratamiento Luz respecto

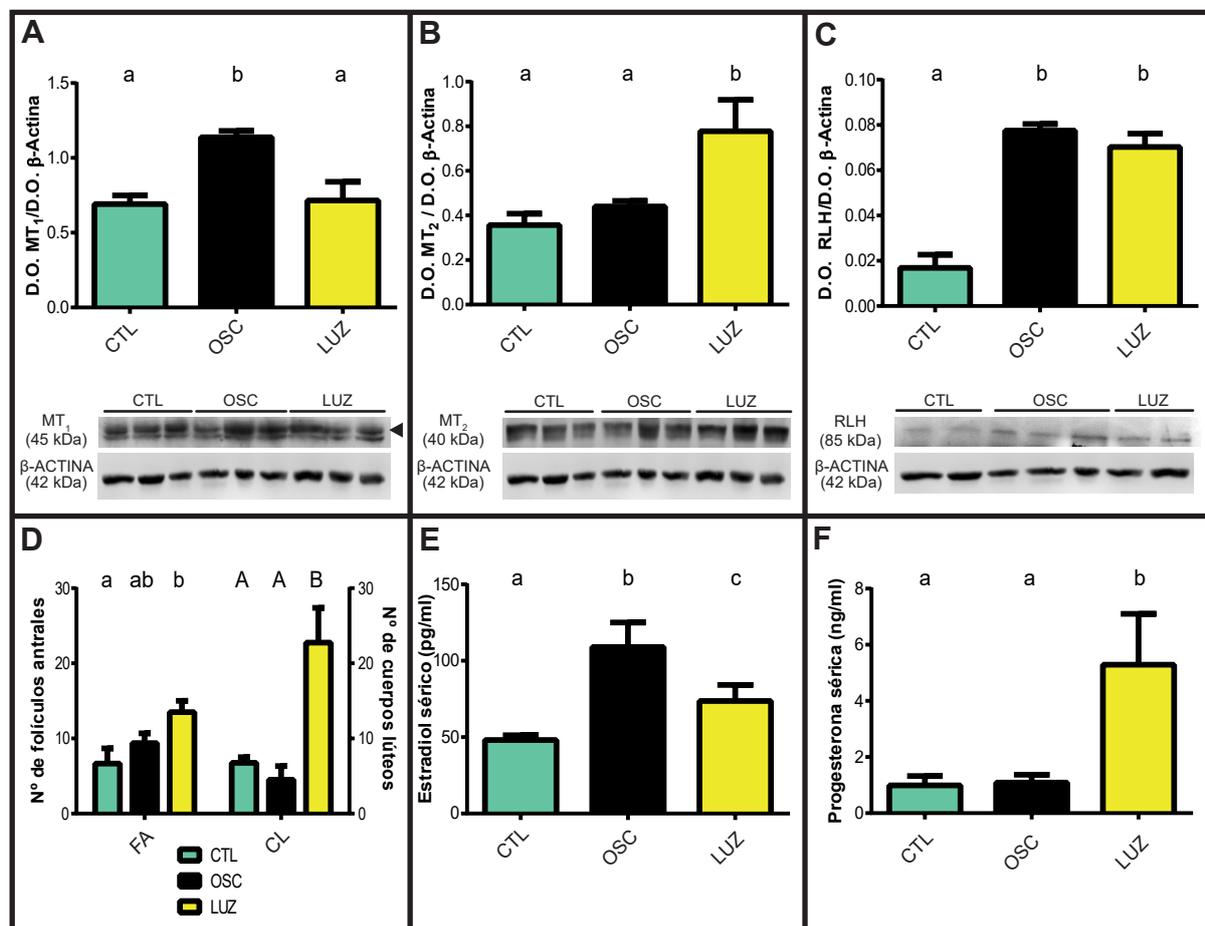
FIGURA 22. EXPRESIÓN ADENOHIPOFISARIA DE MT_1 Y MT_2 Y NIVELES SÉRICOS DE LH EN VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES RÉGIMENES LUMÍNICOS



Análisis de los niveles de expresión adenohipofisaria de las proteínas MT_1 (A) y MT_2 (B) y estimación de los niveles séricos de LH (ng/ml) (C) en hembras de vizcacha NPNO expuestas a luz continua (LUZ), oscuridad continua (OSC) o 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (CTL). La expresión proteínica se determinó mediante la técnica de Western Blot y los niveles séricos de LH se estimaron con la técnica de ELISA. NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

a los otros dos grupos ($p < 0.05$) (Figura 23-D). En este análisis, se determinó mediante ELISA que la concentración sérica de E_2 sufrió un incremento significativo en los animales expuestos a oscuridad constante, respecto a los animales de los restantes tratamientos ($p < 0.05$) (Figura 23-E). Asimismo, los niveles más elevados de P_4 sérica fueron encontrados en los animales del grupo Luz, en comparación con los grupos Oscuridad y Control (Figura 23-F).

FIGURA 23. VARIACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y DEL SISTEMA MELATONINÉRGICO EN EL OVARIO DE VIZCACHAS NPNO EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS



En ovarios de vizcachas NPNO expuestas a diferentes regímenes lumínicos se determinaron la expresión proteínica de MT₁ (A), de MT₂ (B) y del RLH (C), el número de folículos antrales (FA) y de cuerpos lúteos (CL) (D) y los niveles séricos de estradiol (E) y de progesterona (F). CTL: vizcachas expuestas a fotoperíodo de 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad. LUZ: vizcachas expuestas a luz continua. OSC: vizcachas expuestas a oscuridad continua. Los niveles de expresión proteínica de MT₁, MT₂ y RLH se estimaron con la técnica de Western Blot. La determinación sérica de los niveles hormonales se realizó mediante la técnica de ELISA. La cuantificación de los folículos y cuerpos lúteos se realizó sobre cortes histológicos de ovarios teñidos con hematoxilina y eosina. NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

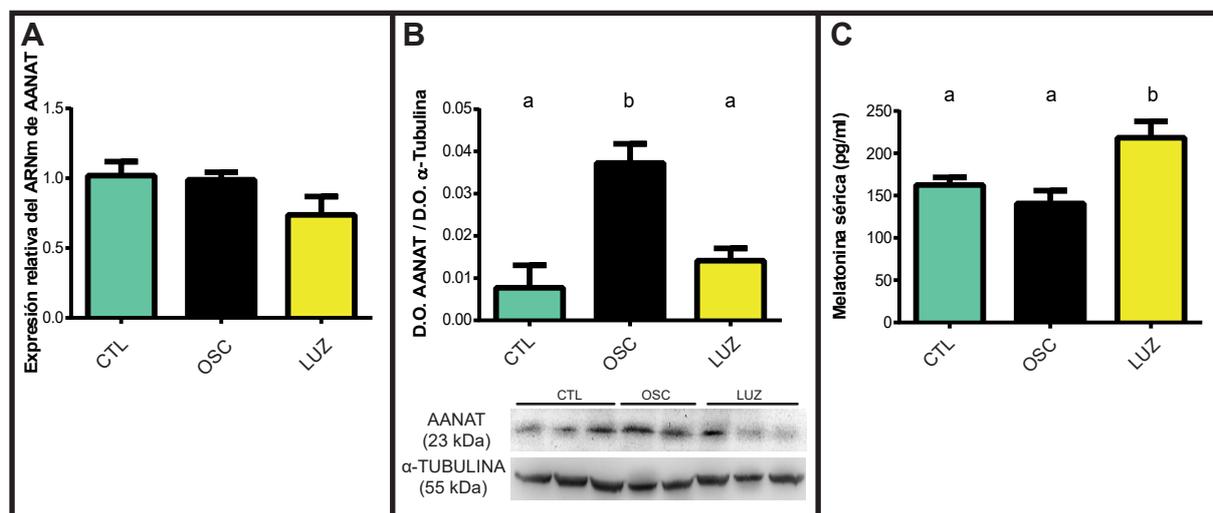
6.2.3 Efecto del fotoperíodo sobre el eje reproductivo en hembras no preñadas con inducción de la ovulación

Se estudió el efecto de la disponibilidad lumínica sobre la actividad del eje reproductivo y los componentes del sistema melatoninérgico en vizcachas en fase lútea, la cual se logró mediante la inducción de la ovulación (NPI) con el protocolo descrito en el apartado *Sincronización del ciclo estral de la vizcacha* en la sección **Materiales y Métodos**. En simultáneo, se las expuso

durante 15 días continuamente a luz (grupo Luz), oscuridad (grupo Oscuridad) o a un o a un fotoperíodo regular (grupo Control).

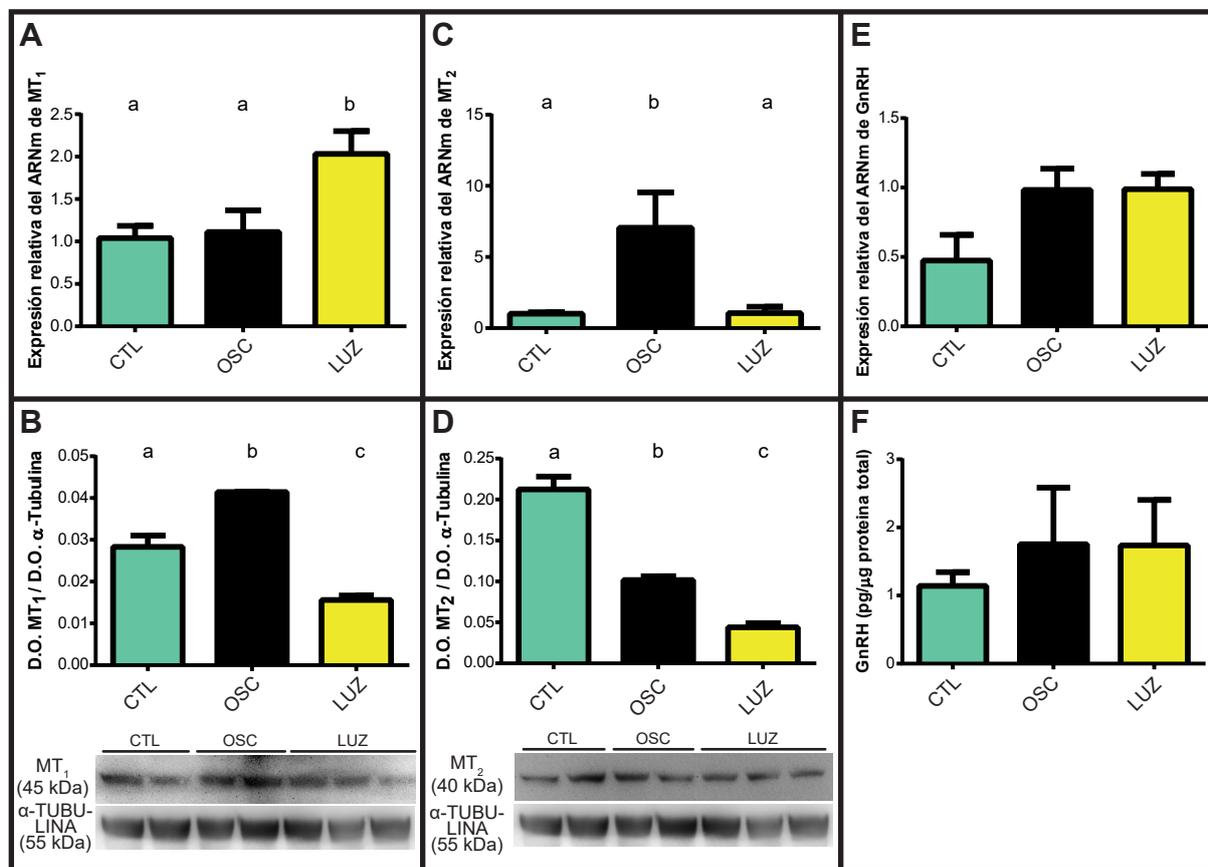
Llamativamente, no se observó correlación entre la expresión del ARNm y de la proteína de AANAT en la glándula pineal, y los niveles séricos de melatonina. La cuantificación de la expresión del ARNm de AANAT no mostró diferencias significativas entre los tres tratamientos (**Figura 24-A**). Sin embargo, sus niveles proteínicos aumentaron significativamente en los animales del grupo Oscuridad, respecto de los otros dos grupos ($p < 0.05$) (**Figura 24-B**). Contrariamente, la concentración sérica de melatonina se incrementó de manera significativa en los animales expuestos a luz constante, en comparación con los expuestos a oscuridad continua y a un fotoperíodo regular ($p < 0.05$) (**Figura 24-C**).

FIGURA 24. EXPRESIÓN DE AANAT EN LA GLÁNDULA PINEAL EN VIZCACHAS NPI EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS



Expresión del ARNm de AANAT en la glándula pineal determinada por PCR Cuantitativa (**A**), expresión proteínica de AANAT en la glándula pineal determinada por Western Blot (**B**) y niveles séricos de melatonina (pg/ml) estimados por ELISA (**C**), de hembras de vizcacha NPI expuestas a luz continua (LUZ), oscuridad continua (OSC) o 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (CTL). NPI: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

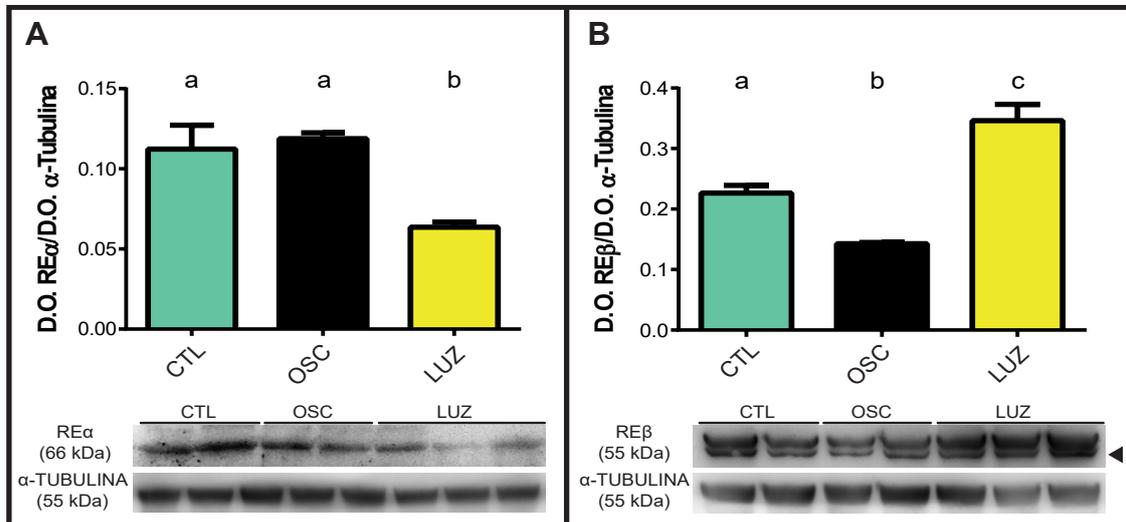
En cuanto a la expresión de los receptores de melatonina hipotalámicos, no se observó un patrón entre ellos en todos los niveles de análisis. El grupo del tratamiento de luz constante mostró un incremento significativo en expresión del ARNm de MT_1 (**Figura 25-A**) mientras que la expresión proteica fue significativamente más elevada en el grupo Oscuridad, en comparación con los correspondientes grupos restantes (**Figura 25-B**). El transcripto de MT_2 se expresó en niveles significativamente mayores en las vizcachas expuestas a oscuridad constante (**Figura 25-C**); sin embargo, su expresión proteínica de sufrió una reducción significativa en los grupos Oscuridad y Luz respecto de los animales del grupo Control ($p < 0.05$) (**Figura 25-D**). Sorpresivamente, tanto los niveles de ARNm de GnRH como de su

FIGURA 25. EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE GnRH, MT₁ Y MT₂ EN VIZCACHAS NPi EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS

Análisis de los niveles de expresión hipotalámica del ARNm (A) y proteína (B) de MT₁, del ARNm (C) y proteína (D) de MT₂, y del ARNm (E) y proteína (F) de GnRH en hembras de vizcacha NPi expuestas a luz continua (LUZ), oscuridad continua (OSC) o 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (CTL). La expresión del ARNm se estimó mediante PCR Cuantitativa y la expresión proteínica se estimó con la técnica de Western Blot o por RIA. NPi: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

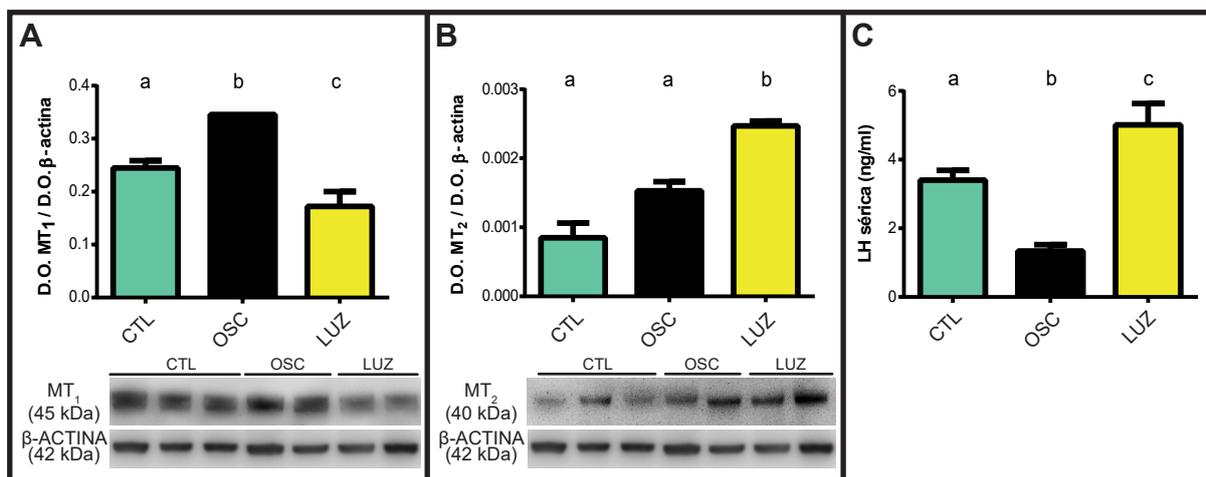
proteína hipotalámica no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos (Figura 25-A y B). En estos animales también se analizó la expresión hipotalámica de RE α y RE β , mediante la técnica de Western Blot. Como resultado, se observó que los niveles del RE α disminuyeron significativamente en los animales del grupo Luz ($p < 0.05$) (Figura 26-A); de manera opuesta, la expresión proteínica del RE β fue significativamente más elevada en este grupo, en comparación con los restantes tratamientos ($p < 0.05$) (Figura 26-B).

En la adenohipófisis, el receptor MT₁ mostró niveles proteínicos significativamente mayores en los animales del tratamiento Oscuridad (Figura 27-A), mientras que la expresión de MT₂ se incrementó significativamente en los animales expuestos a luz continua, respecto de los restantes grupos ($p < 0.05$) (Figura 27-B). Finalmente, los animales del grupo Luz exhibieron

FIGURA 26. EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE RE α Y RE β EN VIZCACHAS NPI EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS

Análisis de los niveles de expresión hipotalámica (mediante Western Blot) del RE α (**A**) y del RE β (**B**) en hembras de vizcacha NPI expuestas a luz continua (LUZ), oscuridad continua (OSC) o 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (CTL). La punta de flecha negra indica la banda analizada, correspondiente al RE β de 66 kDa. NPI: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

los mayores niveles de LH sérica, mientras que el grupo Oscuridad mostró una reducción significativa de los mismos ($p < 0.05$) (**Figura 27-A**).

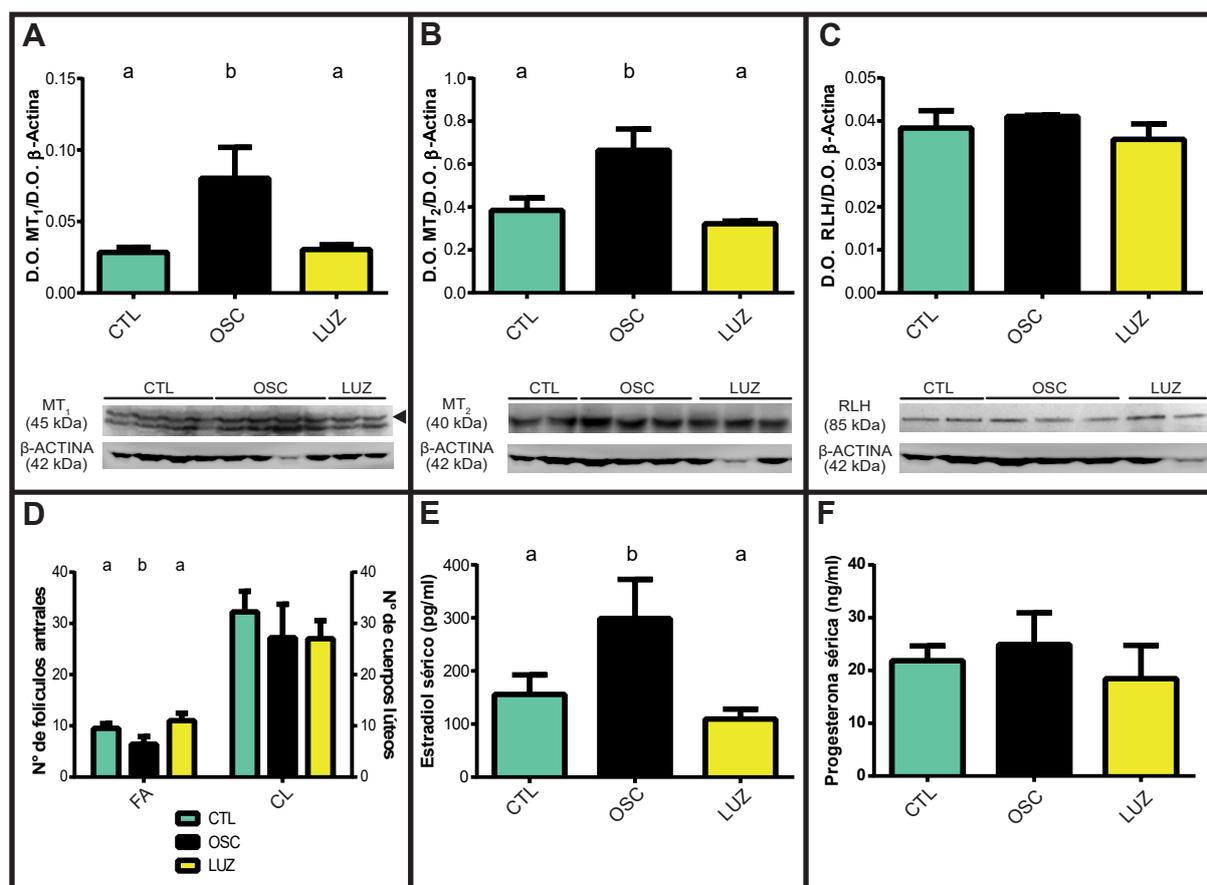
FIGURA 27. EXPRESIÓN ADENOHIPOFISARIA DE MT $_1$ Y MT $_2$ Y NIVELES SÉRICOS DE LH EN VIZCACHAS NPI EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS

Análisis de los niveles de expresión adenohipofisaria de las proteínas MT $_1$ (**A**) y MT $_2$ (**B**) y estimación de los niveles séricos de LH (ng/ml) (**C**) en hembras de vizcacha NPI expuestas a luz continua (LUZ), oscuridad continua (OSC) o 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (CTL). La expresión proteínica se determinó mediante la técnica de Western Blot y los niveles séricos de LH se estimaron con la técnica de ELISA. NPI: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el ovario, la expresión de MT_1 y MT_2 aumentó significativamente en los animales expuestos a oscuridad constante, respecto de los restantes grupos ($p < 0.05$) (**Figura 28-A y B**), mientras que los niveles de RLH no variaron entre los tratamientos (**Figura 28-C**). Por otro lado, los animales del grupo Oscuridad exhibieron una reducción significativa en el número de folículos antrales cuando se comparó con el de los animales de los grupos Control y Luz ($p < 0.05$) (**Figura 28-D**). Llamativamente, no se encontraron diferencias significativas en el número de cuerpos lúteos entre los tratamientos. La estimación de los niveles séricos de las hormonas ováricas arrojó como resultado un aumento significativo de la concentración de E_2 en los animales expuestos a oscuridad constante (**Figura 28-E**) mientras que los niveles de P_4 no variaron significativamente entre los tratamientos (**Figura 28-F**).

Cabe aclarar que en ambos estudios, no se observaron variaciones significativas en los niveles de cortisol, entre los tres tratamientos (ver sección **Anexo**). Asimismo, se intentó determinar la concentración sérica de FSH por ELISA y posteriormente por RIA pero no fue posible.

FIGURA 28. VARIACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y DEL SISTEMA MELATONINÉRGICO EN EL OVARIO DE VIZCACHAS NP1 EXPUESTAS A DIFERENTES REGÍMENES LUMÍNICOS



En ovarios de vizcachas NP1 expuestas a diferentes regímenes lumínicos se determinaron la expresión proteínica de MT_1 (**A**), de MT_2 (**B**) y del RLH (**C**), el número de folículos antrales (FA) y de cuerpos lúteos (CL) (**D**) y los niveles

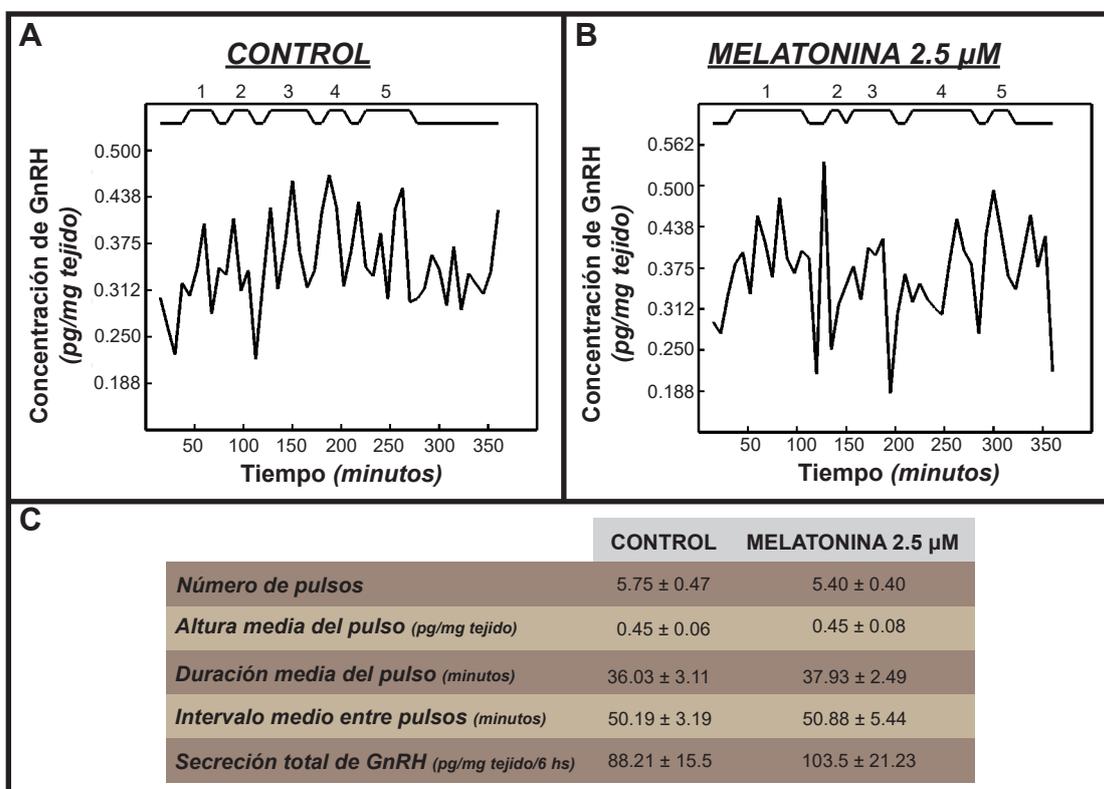
séricos de estradiol (**E**) y de progesterona (**F**). CTL: vizcachas expuestas a fotoperíodo de 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad. LUZ: vizcachas expuestas a luz continua. OSC: vizcachas expuestas a oscuridad continua. Los niveles de expresión proteínica de MT₁, MT₂ y RLH se estimaron con la técnica de Western Blot. La determinación sérica de los niveles hormonales se realizó mediante la técnica de ELISA. La cuantificación de los folículos y cuerpos lúteos se realizó sobre cortes histológicos de ovarios teñidos con hematoxilina y eosina. NPi vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. D.O.: densidad óptica. kDa: kilodaltons. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.3 Modulación de GnRH y de LH por melatonina

6.3.1 Efecto de la melatonina sobre la pulsatilidad de GnRH en explantos de hipotálamo

Para determinar la influencia de la melatonina sobre la secreción de GnRH, y si ello depende de la fase del ciclo estral, se incubaron hipotálamos de hembras adultas NPNO (en fase folicular) y NPi (en fase lútea) con melatonina y antagonistas de sus receptores, y se determinó la pulsatilidad de GnRH. La **Figura 29** presenta perfiles representativos del patrón de liberación *ex vivo* de GnRH en explantos hipotalámicos de hembras NPNO, incubados con BKR (**Figura 29-A**) o con melatonina (**Figura 29-B**). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de secreción de GnRH analizados, entre los tratamientos (**Figura 29-C**).

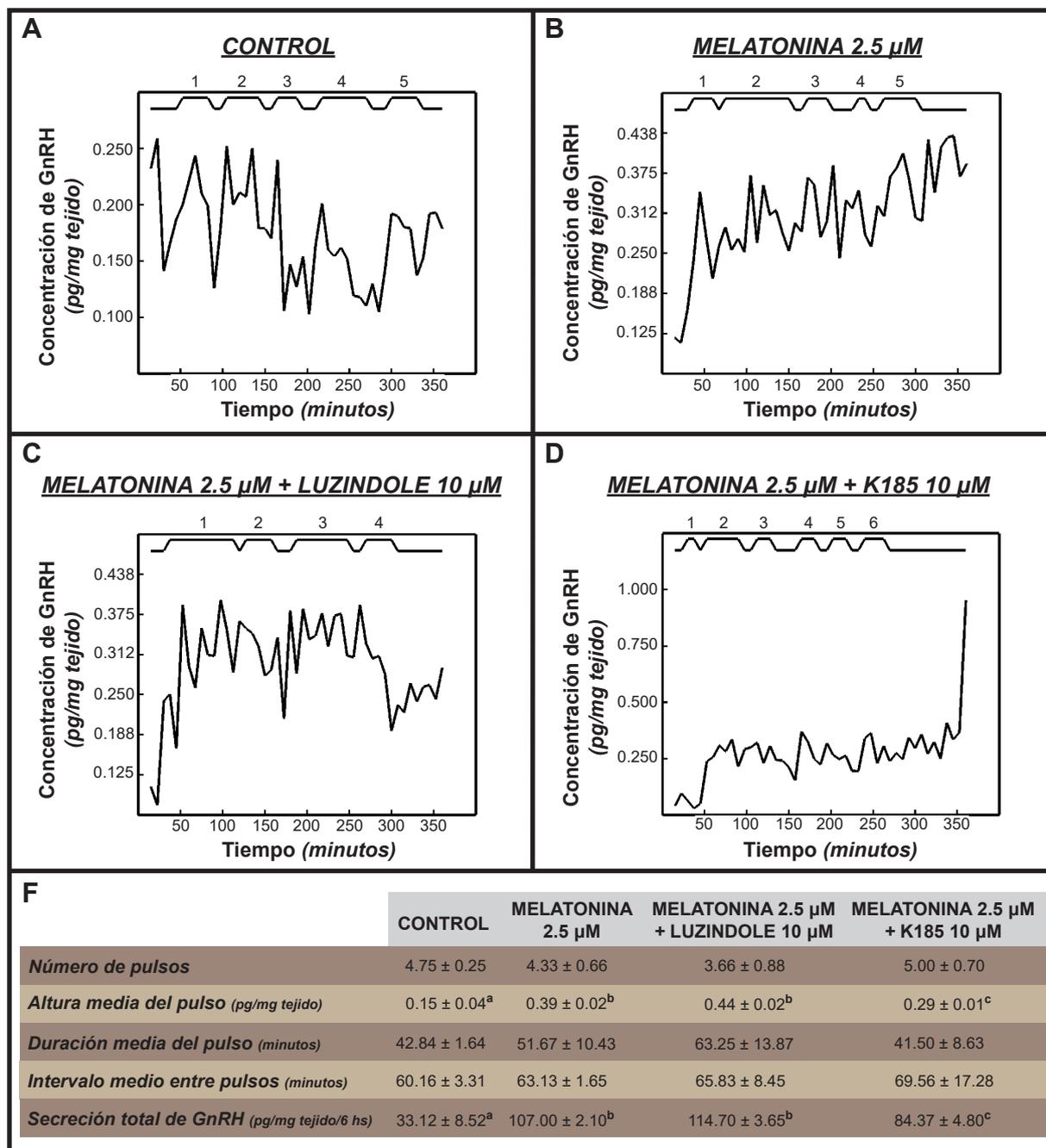
FIGURA 29. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE GnRH HIPOTALÁMICA EN VIZCACHAS NPNO



Imágenes representativas del patrón pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en explantos

hipotalámicos de vizcachas NPNO incubados con BKR **(A)** o con melatonina 2.5 μ M **(B)**. Los números sobre los gráficos indican el orden temporal de los pulsos. **C.** Resultados del análisis de los parámetros de secreción pulsátil de GnRH hipotalámica en cada tratamiento. NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

La **Figura 30** muestra perfiles representativos del patrón de liberación de GnRH en explantos hipotalámicos de hembras sincronizadas tratados *ex vivo* con BKR (Control) **(Figura 30-A)**, melatonina sola **(Figura 30-B)**, combinada con luzindole (inhibidor del receptor MT_1 , **Figura 30-C**) o combinada con K185 (inhibidor del receptor MT_2 , **Figura 30-D**). Los resultados del análisis de los parámetros de pulsatilidad se muestran en la **Figura 30-E**. El tratamiento con melatonina incrementó significativamente la altura media de los pulsos y la secreción total de GnRH en 6 hs de incubación, en comparación con los tratamientos Control y Melatonina + K185 ($p < 0.05$). La combinación Melatonina + K185 causó una reducción significativa de la altura media de los pulsos y la secreción total de GnRH, respecto de los restantes tratamientos ($p < 0.05$). No se observaron variaciones significativas en los restantes parámetros analizados, entre los tratamientos experimentales.

FIGURA 30. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE GnRH HIPOTALÁMICA EN VIZCACHAS NP_i

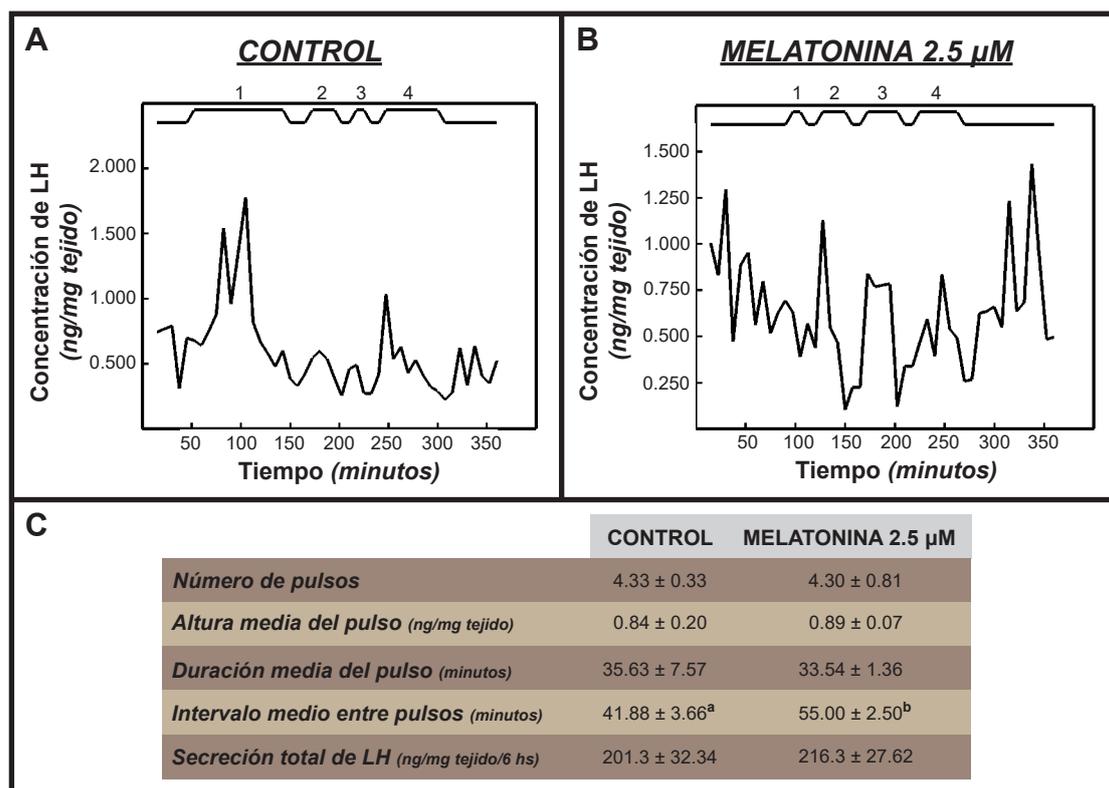
Imágenes representativas del patrón pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en explantos hipotalámicos de vizcachas NP_i incubados con BKR (**A**), con melatonina 2.5 μM sola (**B**), combinada con luzindole (inhibidor de MT₁) (**C**) o combinada con K185 (inhibidor de MT₂) (**D**). Los números sobre los gráficos indican el orden temporal de los pulsos. **E**. Resultados del análisis de los parámetros de secreción pulsátil de GnRH hipotalámica en cada tratamiento. NP_i: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.3.2 Efecto de la melatonina sobre la pulsatilidad de LH en la hipófisis

El efecto de la melatonina sobre la secreción de LH se estudió por incubación de las hipófisis con BKR o con melatonina. La cuantificación de la concentración de LH se realizó mediante la técnica de RIA y se analizaron los parámetros de secreción de esta hormona.

La **Figura 31** presenta perfiles representativos del patrón de liberación *ex vivo* de LH en explantos hipofisarios de hembras NPNO incubados con BKR (Control) (**Figura 31-A**) o con melatonina (**Figura 31-B**). Se observó un aumento la duración media entre pulsos bajo el tratamiento con melatonina, respecto del tratamiento Control ($p < 0.05$) (**Figura 31-C**), mientras que no se encontraron diferencias significativas debido al efecto de la melatonina en los restantes parámetros de secreción de LH analizados.

FIGURA 31. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE LH HIPOFISARIA EN VIZCACHAS NPNO

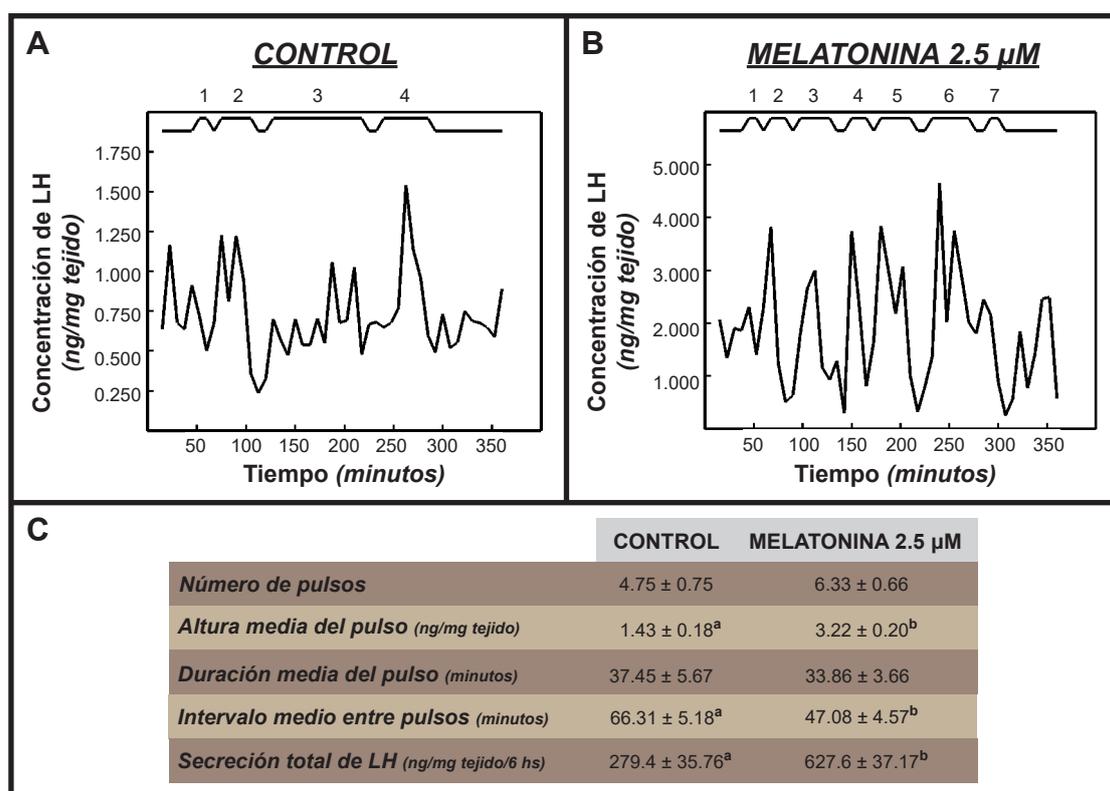


Imágenes representativas del patrón pulsátil de la hormona luteinizante (LH) en explantos hipofisarios de vizcachas NPNO incubados con BKR (**A**) o con melatonina 2.5 µM (**B**). Los números sobre los gráficos indican el orden temporal de los pulsos. **C.** Resultados del análisis de los parámetros de secreción pulsátil de LH hipofisaria en cada tratamiento. NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

La **Figura 32** presenta perfiles representativos del patrón de liberación de LH de hipófisis de

hembras en fase lútea (NPi) incubadas con BKR (Control) (**Figura 32-A**) o con melatonina (**Figura 32-B**). Como resultado, se registró un incremento significativo en la altura media del pulso y en la secreción total de LH (**Figura 31-C**), y una disminución en el intervalo medio entre pulsos, por efecto de la melatonina en relación al tratamiento Control ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas por efecto de la melatonina en los restantes parámetros de secreción de LH analizados.

FIGURA 32. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE LH HIPOFISARIA EN VIZCACHAS NPi



Imágenes representativas del patrón pulsátil de la hormona luteinizante (LH) en explantos hipofisarios de vizcachas NPi incubados con BKR (**A**) o con melatonina 2.5 µM (**B**). Los números sobre los gráficos indican el orden temporal de los pulsos. **C.** Resultados del análisis de los parámetros de secreción pulsátil de LH hipofisaria en cada tratamiento. NPi: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

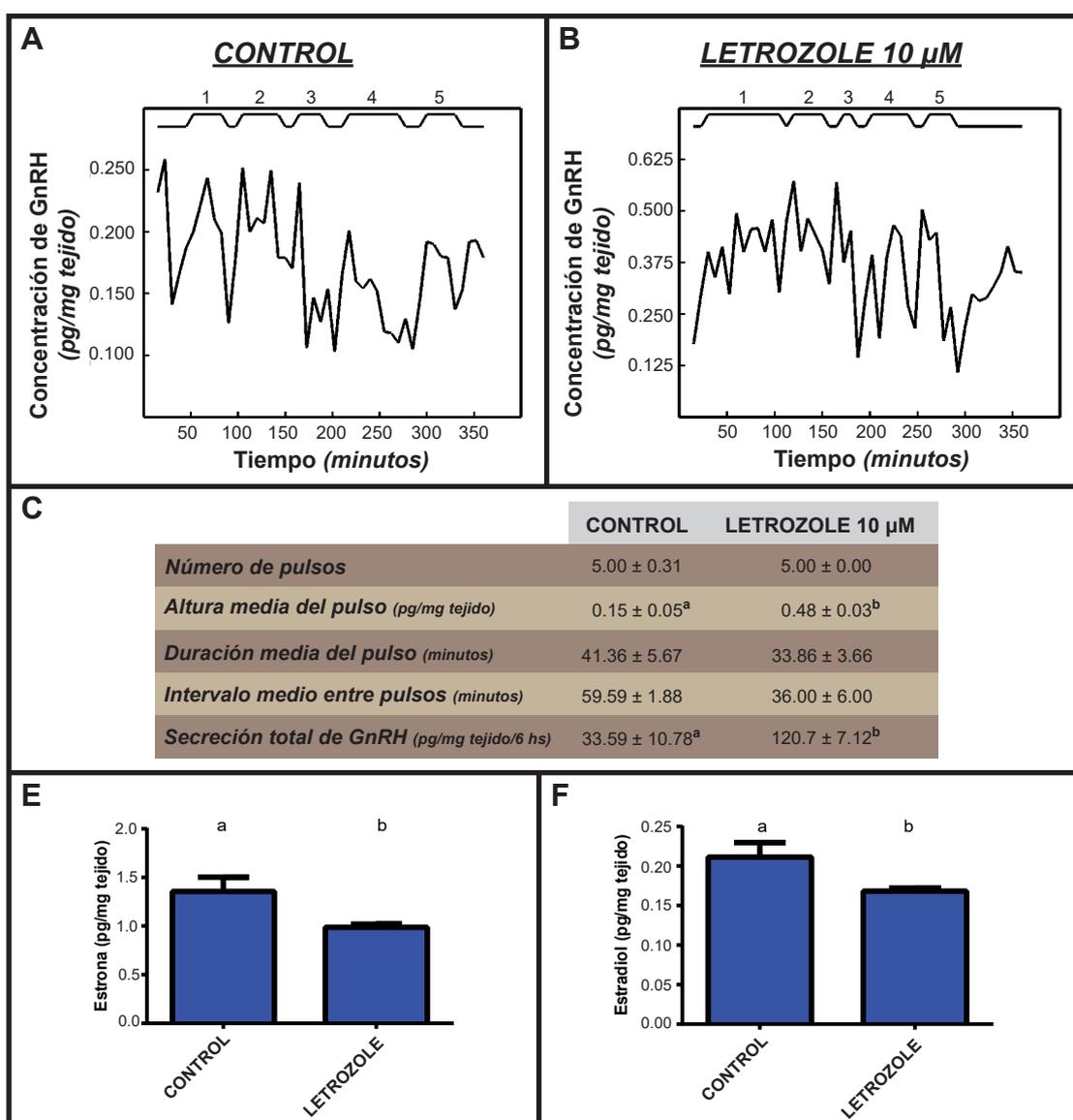
6.4 Modulación de GnRH por interacción de melatonina con E₂

6.4.1 Efecto del neuroestradiol sobre la pulsatilidad de GnRH

Para determinar el rol del estradiol de síntesis local (neuroestradiol) en la secreción hipotalámica de GnRH, se incubaron hipotálamos de hembras adultas NPi con BKR o con letrozole (inhibidor de la enzima aromatasa, que convierte andrógenos en estrógenos), se determinaron los

perfiles de secreción de GnRH (**Figura 33-A** para el tratamiento Control y **Figura 33-B** para el tratamiento con letrozole) y se compararon los parámetros de la pulsatilidad de GnRH. Como resultado, se observó un incremento significativo en la altura media del pulso y en la secreción total de GnRH en el tratamiento con letrozole respecto del tratamiento Control ($p < 0.05$) (**Figura 33-C**), mientras que los restantes parámetros no variaron significativamente. Para confirmar que este efecto resulte de la inhibición de aromatasa, mediante ELISA se estimó la concentración de estradiol y estrona en cada pico de pulsatilidad de GnRH. Se observaron niveles significativamente menores de ambas hormonas ante el tratamiento con letrozole en relación al grupo Control ($p < 0.05$) (**Figura 33-D y E**). El trabajo completo fue

FIGURA 33. MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GnRH POR NEUROESTRADIOL



Imágenes representativas del patrón pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en explantos

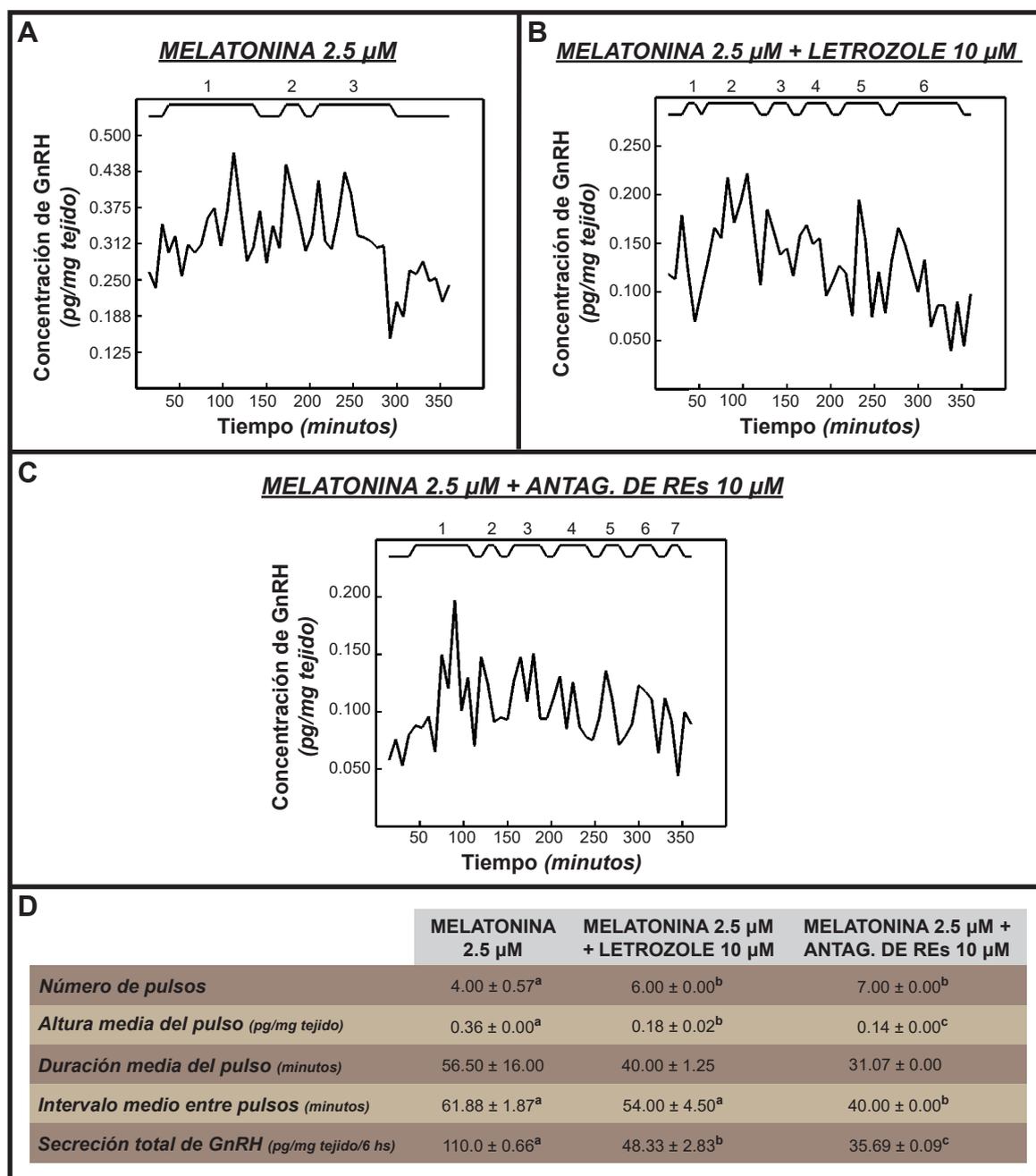
hipotalámicos de vizcachas NPi incubados con BKR **(A)** o con letrozole 10 μ M (inhibidor de aromatasa) **(B)**. Los números sobre los gráficos indican el orden temporal de los pulsos. **C.** Resultados del análisis de los parámetros de secreción pulsátil de GnRH hipotalámica en cada tratamiento. **D.** Producción local de estradiol (pg/mg tejido). **E.** Producción local de estrona (pg/mg de tejido) en cada tratamiento. NPi: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$). *Adaptado de Charif y col. (2017).*

publicado en la revista *Physiological Reports* (Charif y col., 2017).

6.4.2 Efecto del neuroestradiol en presencia de la melatonina sobre la pulsatilidad de GnRH

Con el fin de evaluar la acción del neuroestradiol en presencia del neuroestradiol en presencia de melatonina se incubaron hipotálamos de hembras en fase lútea (NPi) con melatonina sola, combinada con letrozole, o combinada con un antagonista del RE α (MPP) y un antagonista del RE β (ciclofenil). La cuantificación de la concentración de GnRH se realizó con la técnica de RIA y se analizaron los parámetros de secreción de esta hormona.

La **Figura 34** presenta perfiles representativos del patrón de liberación de GnRH en explantos hipotalámicos de hembras NPi incubados con melatonina sola (**Figura 34-A**), combinada con letrozole (**Figura 34-B**) o combinada con los antagonistas de los receptores de estrógenos (REs) (**Figura 34-C**). Los tratamientos Melatonina + Letrozole y Melatonina + Antagonistas de REs mostraron un incremento significativo en el número de pulsos y una reducción en la altura media del pulso y en la secreción total de GnRH, en comparación con el tratamiento Melatonina ($p < 0.05$). Asimismo, se registró una reducción en el intervalo medio entre pulsos cuando se incubó el explanto con melatonina en presencia de los agentes MPP y ciclofenil, los cuales bloquean la acción del neuroestradiol vía RE α y RE β (**Figura 34-D**).

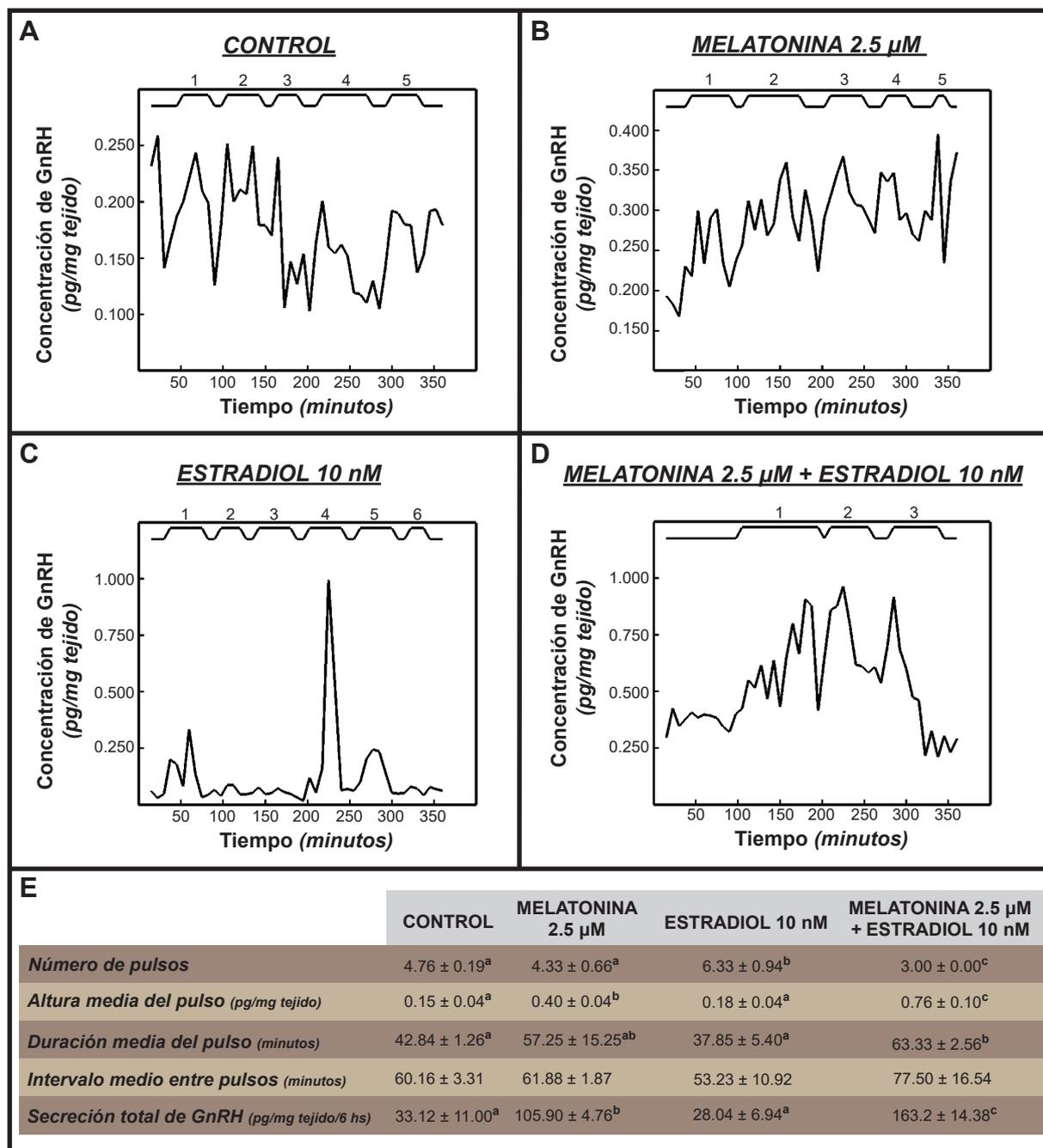
FIGURA 34. EFECTO DE LA MELATONINA EN PRESENCIA DEL NEUROESTRADIOL SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH

Imágenes representativas del patrón pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en explantos hipotalámicos de vizcachas NPi incubados con melatonina 2.5 μ M sola (**A**), combinada con letrozole 10 μ M (**B**) o combinada con MPP 10 μ M y ciclofenil 10 μ M (antagonistas de RE α y RE β , respectivamente) (**C**). Los números sobre los gráficos indican el orden temporal de los pulsos. **C.** Resultados del análisis de los parámetros de secreción pulsátil de GnRH hipotalámica en cada tratamiento. Antag.: antagonistas. NPi: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

6.4.3 Efecto combinatorio de la melatonina y el estradiol sobre GnRH, y estudio de su vía de acción

Se determinó el efecto combinatorio de melatonina y E_2 sobre la liberación de GnRH, mediante la incubación de hipotálamos de hembras sincronizadas con BKR (Control), con melatonina sola, con E_2 solo, o con melatonina y E_2 . La cuantificación de la concentración de GnRH se realizó con la técnica de RIA y se analizaron los parámetros de secreción de esta hormona.

La **Figura 35** presenta perfiles representativos del patrón de liberación de GnRH en explantos hipotalámicos de hembras NPi incubados con BKR (**Figura 35-A**), con melatonina (**Figura 35-B**), con E_2 (**Figura 35-C**) o con melatonina y E_2 combinados (**Figura 35-D**). El análisis de los parámetros pulsátiles, expuesto en la **Figura 35-E**, arrojó como resultado una reducción significativa en el número de pulsos de GnRH debido al tratamiento con melatonina y estradiol, respecto de los restantes grupos ($p < 0.05$). Asimismo, esta combinación causó un incremento significativo en la altura y duración medias del pulso, y en la secreción total de GnRH, en comparación con los tratamientos Control, Melatonina, y Estradiol ($p < 0.05$). Finalmente, el tratamiento con melatonina aumentó significativamente la altura media del pulso y la secreción total de GnRH únicamente respecto a los valores obtenidos en los tratamientos Control y Estradiol.

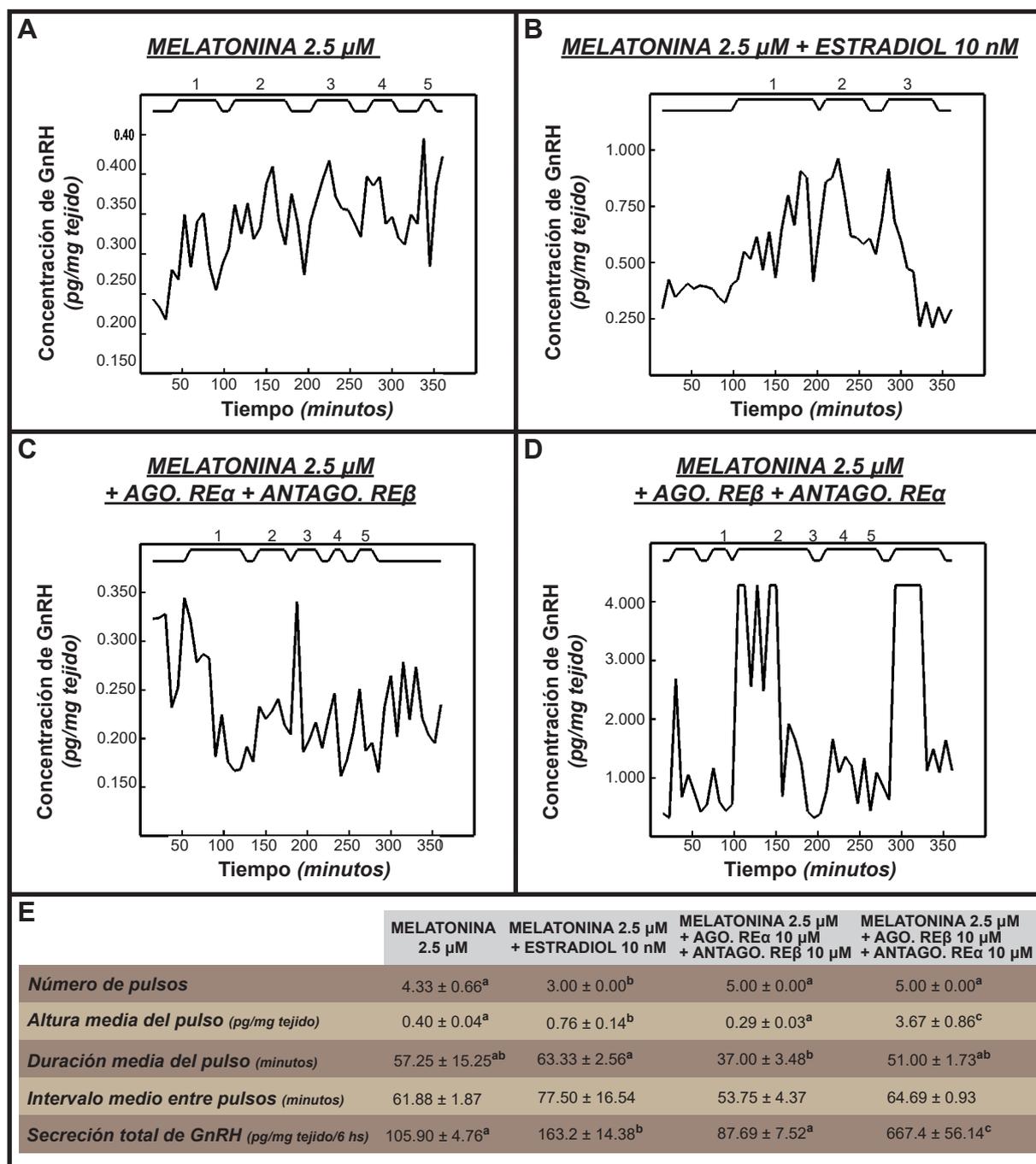
FIGURA 35. EFECTO DE LA MELATONINA Y EL ESTRADIOL SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH

Imágenes representativas del patrón pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en explantos hipotalámicos de vizcachas NPi incubados con BKR (A), con melatonina 2.5 μ M (B), con estradiol 10 nM (C) o con la combinación de melatonina 2.5 μ M y estradiol 10 nM (D). Los números sobre los gráficos indican el orden temporal de los pulsos. E. Resultados del análisis de los parámetros de secreción pulsátil de GnRH hipotalámica en cada tratamiento. NPi: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

En otro experimento, se analizó la vía de acción del E_2 en presencia de melatonina, y el efecto resultante sobre la secreción de GnRH. Para ello, se incubaron hipotálamos de hembras NPi con melatonina sola, combinada con E_2 , combinada con PPT y con ciclofenil (agonista del $RE\alpha$ y antagonista del $RE\beta$, respectivamente) o combinada con WAY-200070 y con MPP (agonista del $RE\beta$ y antagonista del $RE\alpha$, respectivamente). La cuantificación de la concentración de GnRH se realizó con la técnica de RIA y se analizaron los parámetros de secreción de esta hormona.

La **Figura 36** presenta perfiles representativos del patrón de liberación de GnRH en explantos hipotalámicos de hembras NPi incubados con melatonina sola (**Figura 36-A**), combinada con E_2 (**Figura 36-B**), combinada con PPT y ciclofenil (**Figura 36-C**) o combinada con WAY-200070 y MPP (**Figura 36-D**). Los resultados del análisis de los parámetros pulsátiles se muestran en la **Figura 36-E**. Se registró una disminución significativa en el número de pulsos en el tratamiento Melatonina + Estradiol respecto de los otros tratamientos ($p < 0.05$). Al incubar explantos hipotalámicos con la combinación de melatonina, agonista del $RE\alpha$ y antagonista del $RE\beta$, se redujo significativamente la duración media del pulso respecto del tratamiento Melatonina + Estradiol ($p < 0.05$), en el cual ambos REs permanecieron activos. Por otro lado, la incubación con melatonina más el agonista del $RE\beta$ y el antagonista del $RE\alpha$ causó un incremento significativo en la altura media del pulso y en la secreción total de GnRH al compararse con los restantes tratamientos ($p < 0.05$).

FIGURA 36. EFECTO DE LA VÍA DE ACCIÓN DEL ESTRADIOL EN PRESENCIA DE MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH



Imágenes representativas del patrón pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en explantos hipotalámicos de vizcachas NPi incubados con melatonina 2.5 μ M sola (**A**), combinada con estradiol 10 nM (**B**), combinada con PPT y con ciclofenil (agonista del RE α y antagonista del RE β , respectivamente) (**C**) o combinada con WAY-200070 y con MPP (agonista del RE β y antagonista del RE α , respectivamente) (**D**). Los números sobre los gráficos indican el orden temporal de los pulsos. **E.** Resultados del análisis de los parámetros de secreción pulsátil de GnRH hipotalámica en cada tratamiento. Ago: agonista. Antago: antagonista. NPi: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

7

El funcionamiento del eje reproductivo es sincronizado con la información fotoperiódica proveniente del ambiente mediante la hormona melatonina, que es secretada por la glándula pineal durante la noche y actúa mediante los receptores MT_1 y MT_2 . En especies que se reproducen en invierno (reproductores de día corto o de fotoperíodo negativo) el efecto de la melatonina es pro-gonadotrópico, estimulando así la actividad del hipotálamo y la hipófisis. El presente trabajo constituye el primer análisis neuroendócrino de la acción del fotoperíodo y de la melatonina sobre la actividad del eje reproductivo de la vizcacha. Además, se describió por primera vez la secuencia del ARNm del precursor de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), denominado prepro-GnRH, así como el grado de homología de sus principales regiones entre especies evolutivamente cercanas y otras más lejanas. Finalmente, se estudió la secreción de GnRH en función de la interacción con los estrógenos de síntesis local y sistémico con la melatonina.

7.1 EL ARNm DE LA PREPRO-HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS HIPOTALÁMICA (PREPRO-GnRH) DE *L. maximus*.

La descripción de la secuencia nucleotídica completa de la prepro-GnRH hipotalámica de *L. maximus* permitió determinar que la misma pertenece a la variante mGnRH, y que su estructura aminoacídica deducida posee los tres componentes clásicos de las prepro-GnRH: un péptido señal, el decapeptido GnRH y GAP (Adelman y col., 1986). La comparación de la secuencia de *L. maximus* con aquellas presentes en otras especies arrojó como resultado la predicción de 4 exones (Tsai y Zhang, 2008), siendo el primero el que contendría la región 5'-UTR. El hallazgo de dos isoformas del ARNm de este neuropéptido que difieren en la región 5'-UTR, si bien inesperado, podría reflejar diferentes procesos de regulación post-transcripcional. A pesar de que no se pudo determinar si las isoformas difieren en sus funciones, los resultados de la electroforesis en gel de agarosa revelaron que el transcrito corto es menos abundante que el transcrito largo; esto podría implicar un equilibrio dinámico entre estabilidad del ARNm y la eficiencia traduccional. El origen de las isoformas a partir de promotores alternativos presentes en un mismo gen no pudo ser establecido; sin embargo, esto ha sido reportado para otros factores reguladores del sistema nervioso central como la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), que exhibe transcritos con distintas regiones 5'-UTR que no afectan la secuencia proteínica codificante y que son generados por promotores alternativos (Wang y col., 1999). La existencia de diferentes 5'-UTRs podría representar sitios de acción para diferentes factores celulares específicos que modularían la eficiencia traduccional en una determinada condición endócrina. En la vizcacha, esto podría suceder durante la gestación, la ovulación o la lactancia.

GnRH ha mostrado un alto grado de conservación entre caviomorfos emparentados, como

la chinchilla, el degú y el cobayo, y un menor grado de homología con otros roedores lejanamente emparentados como el ratón y la rata (Kochman, 2012). Particularmente, la secuencia peptídica permanece invariable, con excepción del cobayo (Jiménez-Liñán y col., 1997), destacando la importancia del rol conservado de GnRH en la regulación del eje H.H.G., durante los 500 millones de años de evolución de los vertebrados (Adams y col., 2002; Millar y col., 2004). La secuencia de la GnRH de la vizcacha se correspondió completamente con la variante de mamífero (mGnRH), y se observaron sustituciones silenciosas en su secuencia respecto de la de especies evolutivamente emparentadas. Además, la secuencia nucleotídica de GAP exhibió el mayor grado de similitud con la de chinchilla, la especie evolutivamente más cercana. Las diferencias en la longitud de GAP han sido previamente reportadas para las prepro-gonadotropinas de GnRH1 y GnRH2, existiendo una secuencia más corta para el primero (Chen y Leung, 2005). GAP es co-secretado con GnRH desde la eminencia media y puede inhibir la secreción de prolactina y estimular la liberación de LH y FSH, aunque de manera menos efectiva que GnRH (Wetsel y Srinivasan, 2002). El rango de variabilidad entre las especies determinado para GAP sugeriría diferencias en la bioactividad de este péptido entre las especies. Considerando lo anterior, el alto grado de conservación entre las especies confirma nuevamente la relevancia de esta hormona para garantizar la reproducción.

7.2 EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA MELATONINÉRGICO A LO LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO DE *L. maximus*.

Este trabajo describe por primera vez la localización de la enzima AANAT y la histología celular de la glándula pineal de la vizcacha. Los resultados histoquímicos observados coinciden con lo reportado por Cernuda-Cernuda y col. (2003), quienes distinguen dos tipos celulares según su morfología nuclear: pinealocitos tipo I (células con núcleo redondeado, de gran tamaño, con cromatina poco densa y dispersa, y nucléolo prominente) y tipo II (células con núcleo ovoide, pequeño, con cromatina densa y homogénea). Asimismo, se pudo distinguir la marca inmunopositiva citoplasmática para AANAT en dos tipos celulares: células irregulares estrelladas con procesos, y células esféricas. Esto coincide con lo descrito clásicamente en mamíferos (Gunasegaran, 2010). La actividad de AANAT fue determinada en este trabajo a partir de la detección sérica de melatonina, y junto con los resultados de la modulación de la liberación de GnRH por melatonina permite afirmar que la glándula pineal de la vizcacha cumple un rol clave en el control de la actividad reproductiva de *L. maximus*. Ello se asocia con las variaciones histofisiológicas estacionales en la glándula pineal a lo largo del año, la cual muestra períodos de máxima actividad en invierno y de mínima actividad en verano (Pelzer y col., 1989; Cernuda-Cernuda y col., 2003; Busolini y col., 2017). A diferencia de los trabajos anteriores, el presente estudio se basó en el análisis exhaustivo de la expresión del sistema melatoninérgico a lo largo de todo el ciclo reproductivo de la vizcacha, y demostró

la existencia de variaciones en la expresión de sus componentes. Esto sería necesario para determinar el momento y duración del ciclo reproductivo de la vizcacha (Fuentes y col., 2004). Las diferencias observadas en el patrón de expresión del ARNm de AANAT y de su proteína, donde los niveles del mensajero son elevados y constantes durante la gestación, mientras la expresión de su proteína aumenta de manera escalonada, corresponderían a un desfase que ha sido reportado en otras especies, existiendo incluso variaciones especie-específicas. En la rata, se ha descrito un retraso entre el incremento nocturno del ARNm de AANAT y el de sus niveles proteínicos (Klein y col. 1997; Ganguly y col. 2002; Kim y col. 2005). En contraste, en primates y ungulados, la expresión de la proteína AANAT aumenta exclusivamente durante la noche, sin observarse variaciones en los niveles elevados del ARNm de AANAT (Stehle y col., 2001; Ganguly y col., 2002; Ackermann y col., 2006). La situación observada en la vizcacha parece ser similar a este último caso. La glándula pineal es esencial para la percepción de los cambios estacionales del fotoperíodo y, por lo tanto, determina el momento adecuado para la reproducción en especies estacionales como la vizcacha. Esto se debe a que la duración de la secreción de melatonina tiene un correlato proporcional a la duración de la noche, alcanzando un pico en el invierno. Dado que el ritmo circadiano de la secreción de melatonina refleja la variación en la expresión y actividad de AANAT (con un incremento sustancial de sus niveles en la fase oscura), diversos procesos intervienen en la modulación de la síntesis de melatonina. Una fina regulación de la degradación del ARNm de AANAT es esencial para el mantenimiento de las oscilaciones circadianas de sus niveles y de los de la proteína AANAT (Kim y col., 2005). Varios factores han sido identificados como reguladores de los niveles de esta enzima, como la proteína hnRNP Q. Su variación circadiana en la glándula pineal muestra niveles elevados de esta proteína durante la fase oscura, y causa efectos diferentes según a la región IRES (Internal ribosomal entry site o sitio interno de entrada al ribosoma) de las UTRs del ARNm a la que se una. Su acción sobre la 3'-UTR desencadena la degradación del ARNm en un contexto especie-específico, mientras que genera un incremento en la traducción de AANAT al unirse a la 5'-UTR durante la noche (Kim y col., 2007). Otra proteína que participa en la modulación de AANAT es ICER, cuyos niveles nocturnos modulan la tasa y la magnitud de la inducción de la melatonina en respuesta a señales adrenérgicas (Foulkes y col., 1997). La estabilidad de la proteína AANAT es un punto de regulación clave en roedores, primates y ungulados. En la rata, la síntesis de melatonina es además controlada por modulación de la tasa de degradación proteolítica de AANAT; este proceso se ve reducido ante estimulación adrenérgica, implicando un proceso de protección contra la proteólisis proteosómica, estabilizando así la enzima, y siendo ello responsable de su veloz degradación ante un estímulo lumínico repentino durante la fase oscura (Klein y col., 1997; Gastel y col., 1998; Schomerus y col., 2000). En los ungulados y en primates, dada la ausencia de regulación transcripcional de AANAT, el mecanismo modulador dominante es el control de la proteólisis de esta enzima (Schomerus y col., 2005). La fosforilación de AANAT

mediada por PKA permite su protección ante la degradación proteolítica y su activación, a través de la unión de las proteínas 14-3-3, que bloquean el acceso de enzimas proteolíticas e incrementan la afinidad de AANAT por la serotonina (el sustrato para la síntesis de melatonina). De esta manera, la fosforilación facilita la conversión de serotonina en N-acetilserotonina durante la fase oscura, cuando los niveles de serotonina son bajos (Fu y col., 2000; Ganguly y col., 2001; Klein y col., 2003). Por lo tanto, en la vizcacha el incremento de los niveles de AANAT durante la fase oscura del fotoperíodo se debería a dos procesos cooperativos descritos en otras especies: una regulación traduccional, en la que la síntesis proteínica es modulada por la unión de la proteína hnRNP Q (cuyos niveles son elevados en la noche) a la secuencia IRES de la 5'-UTR en el ARNm, y una regulación post-traduccional mediada por la fosforilación de la enzima a través de la señalización adrenérgica (Kim y col., 2005; Koch y col., 2003). Futuros estudios podrán dilucidar la modulación específica de la enzima AANAT en la glándula pineal de la vizcacha.

Existe una similitud general entre el patrón de expresión de AANAT (a nivel de ARNm y proteína) y el de melatonina sérica en la vizcacha. Los animales en anestro (NPNO) exhiben los menores niveles de melatonina sérica, mientras que, durante la gestación, se observa un aumento progresivo temporal de la concentración de melatonina hasta alcanzar su máximo nivel al final de la gestación, lo que indicaría un rol cada vez más importante de esta hormona conforme progresa la preñez. Coincidentemente, en la oveja ha sido descrito que, debido a alteraciones en la duración del fotoperíodo, la duración de los niveles elevados de melatonina se incrementa durante el estro y luego disminuyen marcadamente en el anestro (Rollag y col., 1978). En contraposición, en el humano se ha observado que durante la etapa menstrual los niveles de melatonina son más elevados que los registrados durante el momento del pico de LH y la consecuente ovulación (Wetterberg y col., 1976). Sin embargo, los niveles séricos de melatonina durante la gestación son más elevados que en mujeres no gestantes y, conforme progresa el embarazo, su concentración sigue aumentando hasta un pico máximo en las 32 semanas de gestación (Kivela, 1991; Nakamura y col., 2001). De hecho, la melatonina puede cruzar la barrera placentaria e ingresar a la circulación fetal, pudiendo así proveer de información fotoperiódica al feto y el ajuste de sus ciclos endógenos a las condiciones ambientales (como, por ejemplo, ritmos de la glándula adrenal) (Simonneaux, 2011). En el ratón (cuya reproducción no es estacional), la administración de melatonina en hembras gestantes incrementa los niveles de progesterona y de estradiol séricos, el número de cuerpos lúteos y el tamaño de la camada, así como la expresión de los receptores de melatonina en el útero (Guan y col., 2017; Zhang y col., 2017). En esta línea, varios trabajos han reportado los efectos beneficiosos de la melatonina sobre el desarrollo y funcionamiento normales de la placenta (vinculados con la expresión de los receptores de melatonina uterinos) y promoviendo el desarrollo embrionario tanto en ratón como en ovinos (Ishizuka y col., 2000;

Tamura y col, 2008; Tian y col., 2010; Sampaio y col., 2012). En la vizcacha, las variaciones en expresión de AANAT a lo largo de la gestación coincidiría con lo observado por Gil y col. (2005) para la misma especie. Sin embargo, y a diferencia de lo reportado en el presente estudio, no registraron variaciones en los niveles séricos de melatonina a lo largo de la gestación. Los niveles elevados de melatonina durante la preñez podrían, entonces, contribuir a un correcto desarrollo placentario y embrionario a lo largo del extenso período gestacional, representando la melatonina un factor relevante en la supervivencia de las crías. A nivel hipofisario, la melatonina regula directamente los niveles de prolactina, una hormona esencial para el mantenimiento de la gestación debido a que induce la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, estimula la implantación del blastocisto y la formación de la placenta (Das Chagas y col., 2015). Dado el progresivo desarrollo de la glándula mamaria de la vizcacha (Halperin y col., 2013) y el aumento de los niveles hipofisarios de prolactina descritos, ambos a lo largo de la gestación (Proietto, 2017), y el incremento de la melatonina sérica durante la misma, podría indicar que la melatonina en la vizcacha es necesaria para la remodelación mamaria, la preparación para el amamantamiento de las crías y la prolongación de la función esteroidogénica del cuerpo lúteo que permitiría llevar a cabo una gestación y parto exitosos. Esto diferiría del efecto inhibitorio de la melatonina sobre la secreción de prolactina descrito en animales cuya actividad reproductiva depende en algún grado del fotoperíodo, como la rata, la cabra y la oveja (Griffiths y col., 1987; Maeda y col., 1988; Malpoux y col., 1995).

La melatonina regula el desarrollo folicular ovárico. Esto se desprende de los reportes del contenido de esta hormona en el líquido folicular en el humano (Roosnberg y col., 1990), de la expresión de MT_1 , MT_2 y AANAT en los folículos ováricos de humano y rata (Itoh y col., 1999; Soares y col., 2003; Sakaguchi y col., 2013) y del efecto estimulante de la melatonina sobre la esteroidogénesis en la rata (Adriaens y col., 2006). Dado que en el presente trabajo se demostraron variaciones en la expresión de MT_1 y MT_2 en el ovario de vizcachas expuestas a diferentes regímenes lumínicos y en condiciones hormonales distintas, esta tesis abre un interrogante sobre la acción del sistema melatoninérgico en la dinámica ovárica de la vizcacha durante la gestación.

En este trabajo se determinó por primera vez la expresión de los receptores de melatonina en el hipotálamo de la vizcacha. Mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, hemos podido determinar la localización de MT_1 y MT_2 en los principales núcleos hipotalámicos vinculados con el control reproductivo en la vizcacha (como son el NSO, el NPeV-APO y el NSQ). En general, esta distribución coincide con lo reportado en varias especies (ver revisión de Masson-Pévet y col., 1994). Además, hemos demostrado que las neuronas GnRH de estos núcleos expresan ambos receptores de melatonina. La relevancia de este hecho recae en que no se ha descrito co-localización de GnRH con MT_1 o MT_2 en el hipotálamo de hembras

en otras especies, a excepción de la línea celular neuronal GT1-7 (Roy y col., 2001; Roy y Belsham, 2002; Ishii y col., 2009). Este hallazgo implicaría una modulación directa de la melatonina sobre el funcionamiento de las neuronas GnRH en la vizcacha, en función de la información fotoperiódica ambiental, de manera de efectuar una rápida activación del eje H.H.G tanto en la época de reproducción como en la fase media de la gestación. Asimismo, la expresión de los receptores de melatonina en el NSQ de la vizcacha coincide con lo demostrado por otros autores, (Reppert y col., 1988, 1994; Dubocovich y col., 1998), quienes han descrito su co-expresión en el humano con un rol mínimo de MT_2 sobre la regulación de la actividad del NSQ (Waly y Hallworth, 2015). Por otro lado, el hámster siberiano no expresa MT_2 , siendo las respuestas neuroendócrinas al fotoperíodo mediadas por MT_1 (Weaver y col., 1996; Prendergast, 2010). Sin embargo, en esta tesis hemos demostrado que el empleo de un antagonista de MT_2 (K185) en los ensayos de pulsatilidad de GnRH redujo la liberación de GnRH de manera significativa. Por lo tanto, en la vizcacha, MT_2 sí tendría un rol importante en la regulación neuroendócrina del eje reproductivo. Esto refuerza la idea de que existen diferencias entre las especies respecto de la función de los receptores MT_2 en las respuestas circadianas a la melatonina. Diversos trabajos reportaron que MT_1 y MT_2 se regulan diferencialmente dependiendo de la concentración de melatonina (fisiológica o suprafisiológica) y del tiempo de exposición (breve o prolongado) (ver revisión de Dubocovich y col., 2010). Los receptores de melatonina se activan ante concentraciones picomolares (por ejemplo, durante la mañana), e incluso pueden sufrir una desensibilización si la exposición a su ligando es prolongada (alrededor de 8 horas, el período de secreción nocturna normal de la melatonina) pero no así ante una exposición breve (Reppert y col., 1996; Dubocovich y col., 1997; Witt-Enderby y col., 2003; Gerdin y col., 2004a, 2004b). Asimismo, se ha reportado que la administración de dosis suprafisiológicas de melatonina eleva la concentración sérica necesaria para inducir la activación de los receptores, alterando su sensibilidad (Dollins y col., 1994; Karim y col., 1996). Sin embargo, en vizcachas en fase lútea no hemos observado esta desensibilización de los receptores de melatonina por exposición a concentraciones suprafisiológicas de su ligando, indicando la relevancia del ambiente hormonal en la respuesta de GnRH a la melatonina.

Sorpresivamente, el patrón de expresión hipotalámica de MT_1 y de MT_2 no fue similar al de su ligando. Para ambos receptores, se observó un incremento en los niveles de los ARNm correspondientes en la etapa media de la gestación, pero no se detectó un correlato con los niveles proteínicos. La expresión del ARNm de los receptores de melatonina podría seguir un patrón estacional inferido por la fecha de captura de los animales, sugiriendo la influencia de algún factor ambiental sobre la transcripción de sus genes (por ejemplo, la disponibilidad lumínica). Por otro lado, el patrón de expresión opuesto de la proteína respecto del ARNm podría evidenciar un mecanismo de regulación traduccional de la expresión de MT_1 y de

MT₂, en función de los niveles séricos de melatonina. Estos resultados sugerirían un sistema de modulación particular de la expresión de los receptores de melatonina, probablemente para mantener su sensibilidad ante los niveles crecientes de dicha hormona. Además, la melatonina puede modular los niveles de expresión de sus propios receptores. Gerdin y col. (2004a) postulan la existencia de un mecanismo compensatorio a partir del cual el incremento en el número de receptores de melatonina resultante de una exposición prolongada a su ligando representaría un sistema protector contra la desensibilización sostenida. La reducción en la expresión proteínica de ambos receptores de melatonina hacia la etapa media de la gestación podría representar un mecanismo fino de modulación basado en la reducción de la sensibilidad de los receptores de melatonina para poder seguir respondiendo ante elevados niveles de su ligando, como ha sido detallado anteriormente. Sin embargo, en la última etapa gestacional, donde los niveles de melatonina son los más elevados, no se observa una reducción máxima de la expresión de estos receptores. Esto haría suponer que la melatonina no regularía la expresión de sus receptores hipotalámicos en esta etapa de manera tan marcada en comparación con las otras fases de la gestación.

En conclusión, en la vizcacha el incremento de la expresión de AANAT y de la melatonina a lo largo de la gestación indicarían un rol relevante de la esta hormona en la regulación de la actividad del eje H.H.G. durante este proceso. Asimismo, el hipotálamo de la vizcacha expresa los receptores MT₁ y MT₂ en 3 núcleos vinculados con la reproducción (NSQ, NSO y NPeV-APO), y su co-expresión con GnRH en estas regiones indicaría una modulación directa sobre estas neuronas y con ello de la actividad del eje reproductivo. El aumento de los transcritos de MT₁ y de MT₂ en la etapa media de la gestación, y el patrón opuesto de expresión proteínica observado, evidenciarían un control traduccional ante los niveles elevados de melatonina, probablemente para mantener la sensibilidad de los receptores ante los mismos y así poder sensor las variaciones estacionales del fotoperíodo.

7.3 LA MELATONINA Y SU EFECTO SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH Y LH EN *L. maximus*.

Mediante ensayos de pulsatilidad hemos demostrado que tanto la liberación de GnRH como de LH son moduladas por la melatonina, y que su efecto depende principalmente de la fase del ciclo estral en la que se encuentra el animal. La disminución de la secreción de GnRH causada por el empleo de un antagonista del receptor MT₂ junto con melatonina, permitió observar que la secreción de GnRH estaría principalmente modulada a través de la unión de melatonina a este receptor. De esta manera, se refuerza la relevancia de MT₂ en esta especie. Cabe destacar que la similitud de los resultados de la incubación de hipotálamos con melatonina sola y junto con un antagonista del receptor MT₁ (luzindole) no implicaría

que este receptor no sea funcional o que no tenga relevancia en el control de la liberación de GnRH, sino que podría deberse a la utilización de una concentración insuficiente de este antagonista. Por otro lado, el efecto pro-gonadotrópico sobre el hipotálamo y la hipófisis de vizcacha se observó únicamente en animales con ovulación inducida (emulando la fase lútea del ciclo estral). Esta acción positiva de la melatonina se asemeja a lo reportado en ovejas en anestro (Nett y Niswender, 1982; Bittman y col., 1985; Malpaux y col., 2001). En estos animales (reproductores de día corto) y en el hámster (reproductor de día largo) se encontró que la pars tuberalis hipofisaria no interviene en los efectos de la melatonina sobre el eje reproductivo, mientras que la estimulación del HMB con esta hormona resultó en un aumento en la secreción de LH (Malpaux y col., 1994, 1995; Maywood y Hastings, 1995; Malpaux y col., 1998). En el hámster, además, la administración de melatonina revierte la regresión gonadal inducida por exposición a un fotoperíodo corto (Choi, 2013). Por otro lado, en la oveja, la frecuencia de liberación de LH aumenta si se le suministra melatonina emulando el patrón típico de los días cortos. De manera similar, los resultados observados en la vizcacha indicarían que el hipotálamo y la hipófisis representan sitios de acción centrales de la melatonina. En vizcacha, además, la melatonina modula a otros tipos celulares hipofisarios involucrados en la reproducción; ha sido demostrado que el número de lactotopos aumenta hacia el final de la gestación, indicando un probable efecto del fotoperíodo a través de la melatonina (Filippa y col., 2005; Filippa y Mohamed, 2010). En esta especie, además, se ha reportado que la melatonina estimula en la hipófisis la proliferación celular y altera la morfología hipofisaria de manera estacional y en función del estadio del ciclo reproductivo (Filippa y Mohamed, 2010; Rosales y col., 2010; Romera y col., 2010). Nuestro trabajo demostró, mediante los ensayos de pulsatilidad, que tanto el hipotálamo como la hipófisis presentan receptores de melatonina que regulan su funcionamiento alterando la sensibilidad de estos órganos a la melatonina; si bien la dosis de melatonina utilizada no logró activar la liberación de GnRH y LH en animales que se encontraban en fase folicular (NPNO), en la fase lútea tanto el hipotálamo como la hipófisis respondieron de manera pro-gonadotrópica, sugiriendo la necesidad de la acción previa o conjunta de algún factor sobre el hipotálamo y la hipófisis, como, por ejemplo, el estradiol (Chapell y col., 2000).

7.4 EL NEUROESTRADIOL Y LA MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GnRH EN *L. maximus*.

La inhibición de la enzima aromatasa resultó en un incremento de la liberación de GnRH, junto con una reducción en los niveles de estradiol y estrona locales. Estos cambios, similares a lo observado en la oveja (Kenealy y col., 2013) confirmarían la influencia del neuroestradiol sobre la liberación de GnRH, la cual sería modulada negativamente por el esteroide de síntesis local según lo observado como resultado de los ensayos de pulsatilidad. Las

variaciones rápidas de los niveles de neuroestradiol permitirían regular de manera veloz la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-ovárico en la vizcacha como parte de una estrategia reproductiva para incrementar los niveles locales del esteroide y asegurar la disponibilidad de GnRH durante la gestación. En esta línea, tanto un incremento en la expresión de la aromatasa hipotalámica como la retroalimentación positiva del estradiol sobre GnRH han sido confirmadas durante la gestación, cuando los niveles elevados de estradiol en la etapa media de la preñez se correlacionan con incrementos en el contenido de GnRH en el hipotálamo y de LH en suero (Charif y col., 2017; Inserra y col., 2017). Por otro lado, estudios desarrollados in vivo e in vitro han mostrado que los estrógenos disminuyen la expresión del gen de GnRH (Zoeller y Young, 1988; Wray y col., 1989; Wolfe y col., 1996; Spratt y Herbison, 1997). Este efecto bimodal característico del estradiol durante el ciclo estral de los mamíferos tiene lugar en diferentes localizaciones anatómicas, probablemente mediado por kisspeptina actuando de manera negativa en el ARC y ejerciendo una retroalimentación positiva en el núcleo AVPV (Radovick y col., 2012).

7.5 EFECTO DEL NEUROESTRADIOL EN PRESENCIA DE MELATONINA SOBRE LA SECRECIÓN DE GnRH EN *L. maximus*.

La presencia de melatonina junto con la ausencia de neuroestradiol modificó el perfil pulsátil de GnRH respecto del observado en los tratamientos separados con melatonina o con letrozole. En este caso, el aumento en la frecuencia de pulsos de liberación de GnRH y la disminución de los restantes parámetros podría representar un mecanismo compensatorio que garantizaría el funcionamiento del sistema pulsátil en situaciones de desajuste fisiológico (como por ejemplo, ante la inhibición de la síntesis de neuroestradiol, el bloqueo de sus sitios de unión, o ante concentraciones suprafisiológicas de melatonina). Además, la disminución de la cantidad de GnRH secretada en presencia de melatonina y de los antagonistas de los REs indicaría la acción del neuroestradiol a través de sus receptores nucleares clásicos, y que la acción progonadotrópica de la melatonina estaría favorecida por la presencia del neuroestradiol.

La variación estacional de la expresión de la enzima aromatasa ha sido descrita en aves y peces, pudiendo representar un ejemplo más de control de la disponibilidad del neuroestradiol asociado a la señal melatoninérgica en función de la información fotoperiódica (Pasmanik y Callard, 1988; Geraudie y col., 2011; Pintér y col., 2011). Esta situación también ha sido observada por nuestro laboratorio en estudios recientes realizados en vizcachas durante la gestación, la cual abarca el otoño y el invierno (Charif y col., 2017). A diferencia de lo que ocurre en *L. maximus*, se ha descrito en líneas celulares de glioma y de cáncer de mama que la melatonina (en dosis farmacológicas) actúa como un inhibidor de la enzima aromatasa tan potente como el letrozole (González y col., 2007; Martínez-Campa y col., 2009; Chottanapund

y col, 2014). Sin embargo, debe considerarse que estos trabajos realizados en líneas celulares no representan las condiciones fisiológicas que ocurren naturalmente en el organismo.

7.6 EFECTO DEL ESTRADIOL SISTÉMICO SOBRE LA ACCIÓN DE LA MELATONINA Y SU RELACIÓN CON LA SECRECIÓN DE GnRH EN *L. maximus*.

El número de pulsos de GnRH y la cantidad liberada son parámetros que se complementan, pero que responden diferente a la acción de melatonina y/o del estradiol. La incubación de hipotálamos con melatonina y estradiol en dosis suprafisiológicas incrementó significativamente la liberación total de GnRH con respecto al tratamiento con cada droga por separado. Sin embargo, redujo el número de pulsos de GnRH. Esto podría representar un mecanismo compensatorio de ambas hormonas para sostener la liberación eficiente de GnRH ante un desajuste hormonal, sugiriendo la necesidad de la acción de ambas hormonas para el correcto funcionamiento hipotalámico en el control del eje reproductivo. En rata y ratón, el efecto del estradiol sobre la liberación de GnRH es mediado principalmente por RE α (Herbison, 1998; Christian y col., 2008). Recientemente hemos descrito que en la vizcacha la variante de RE α sería crítica para la modulación de la retroalimentación sobre la expresión de la GnRH hipotalámica (Inserra y col., 2017). No obstante, dado que en este trabajo el empleo de un agonista del RE β en presencia de melatonina resultó en el incremento de todos los parámetros de secreción de GnRH y que ha sido descrito en otros roedores que RE β media las acciones rápidas de los estrógenos sobre las neuronas productoras de GnRH (Abrahám y col., 2003; Temple y col., 2004), en el hipotálamo de la vizcacha el RE β (en presencia de melatonina) permitiría una modulación inmediata de la secreción de GnRH, favoreciendo el funcionamiento del eje reproductivo. La interacción entre melatonina y estradiol también ocurre a nivel de sus receptores. En líneas celulares de cáncer de mama, la melatonina bloquea selectivamente la activación de RE α , impidiendo entonces la unión del complejo ligando-receptor a los sitios ERE (como, por ejemplo, el que está presente en el promotor del gen de GnRH) (del Río y col., 2004; Rato y col., 2009; Lopes y col., 2016). Si bien en este trabajo no se analizó la tasa de transcripción de la hormona liberadora de gonadotropinas, los resultados de nuestros ensayos de pulsatilidad indicarían que la melatonina no exhibe un efecto anti-estrogénico ni modificaría la activación de los REs hipotalámicos en la vizcacha. Finalmente, respecto de los receptores de melatonina, ha sido reportado que el estradiol es capaz de modular la respuesta del hipotálamo a la melatonina, mediante la regulación de la densidad de sus receptores (Zisapel y col., 1987). Las diferencias encontradas en la expresión de los receptores de melatonina hipotalámicos durante la gestación podrían estar directamente relacionadas con las variaciones en los niveles séricos de estradiol resultantes de la reactivación del eje reproductivo durante la preñez (Fraunhoffer y col., 2017; Inserra y col., 2017).

En resumen, la interacción de melatonina y estradiol resulta necesaria para la actividad del eje H.H.G., pues modula positivamente la liberación de GnRH de manera más marcada que lo observado con el empleo de estos agentes por separado. La acción del 17β -estradiol, en dosis suprafisiológicas, estaría principalmente mediada por el RE β en presencia de melatonina, implicando una modulación novedosa de la actividad del eje reproductivo que no ha sido descrita en otras especies.

7.7 LA DISPONIBILIDAD LUMÍNICA Y LA ACTIVIDAD DEL EJE H.H.G. EN *L. maximus*.

Hemos demostrado con este trabajo que la disponibilidad de luz modula la actividad del eje reproductivo de la vizcacha de manera diferencial según la fase del ciclo estral. Esta dinámica se ha observado en el humano, donde los niveles de melatonina son bajos en la fase preovulatoria y elevados en la fase lútea, sugiriendo que esta hormona tiene efectos variables que dependen de la fase del ciclo menstrual (Turi y Garzetti, 1993; Tang y col., 1998; Fernando y Rombauts, 2014). En vizcachas en fase folicular, la ausencia de luz estimuló la liberación de GnRH hipotalámica y de LH hipofisaria. Probablemente, en la naturaleza, la información fotoperiódica de los días cortos (esto es, durante otoño e invierno) estimule la actividad de hipotálamo e hipófisis. La vizcacha presenta dos períodos reproductivos al año, siendo el que se extiende entre los meses de abril a agosto más eficiente que el que abarca los meses de octubre a febrero (datos no publicados). En función de ello, y considerando que en Argentina el mes de abril tiene días con menor cantidad de horas con luz que octubre, los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que la información fotoperiódica de los días cortos (abril) estimularían la ovulación con mayor eficiencia de los días largos (octubre), iniciando así el ciclo estral en la vizcacha.

El incremento observado en la expresión de los receptores de melatonina hipotalámicos junto con una disminución en los niveles de su ligando en vizcachas expuestas a oscuridad constante, se opondría a lo observado en ratas expuestas a las mismas condiciones, donde ocurre una reducción en los niveles de estos receptores de manera independiente a las variaciones en los niveles de melatonina (Gauer y col., 1994; Waly y Hallworth, 2015). En el hipotálamo de la vizcacha, este mecanismo podría representar un sistema endógeno de modulación y rescate de la función reproductiva, donde una reducción de los niveles de melatonina sérica sería compensada con un incremento en la expresión proteínica de MT₁ y MT₂, de manera de asegurar la actividad hipotalámica en el período reproductivo. Diferencias en la regulación de la densidad de receptores de melatonina entre órganos y entre especies han sido previamente reportadas (Gauer y col., 1994). No obstante, en la fase lútea del ciclo estral de la vizcacha, la expresión de los receptores de melatonina hipotalámicos presenta

distinto patrón de variación, sugiriendo una regulación diferencial de cada tipo de receptor en función de la disponibilidad lumínica, contribuyendo a asegurar una respuesta del hipotálamo a la melatonina.

Sorpresivamente, la luz estimuló la actividad ovárica en vizcachas en fase folicular, inferida a partir de un aumento en el número de folículos antrales y cuerpos lúteos. Sin embargo, las diferencias de la secreción entre el estradiol y la progesterona frente a situaciones lumínicas opuestas podrían deberse al efecto del fotoperíodo sobre la actividad del eje reproductivo descrito a lo largo de esta tesis. No obstante, no debería descartarse la posibilidad de que la melatonina actúe a nivel ovárico. Esto se sustenta en los cambios observados en la expresión de los receptores MT_1 y MT_2 en el ovario de animales en fase folicular y en fase lútea expuestos a diferentes condiciones lumínicas. En las vizcachas en fase lútea, si bien los niveles de progesterona y LH no variaron con los tratamientos lumínicos, se observó un aumento en la concentración de estradiol en las vizcachas expuestas a oscuridad. Este resultado, junto con el aumento de la expresión de MT_1 y MT_2 por el tratamiento de oscuridad, refuerzan la idea de la acción de melatonina sobre la dinámica ovárica y la importancia de la interacción estrogénica y melatoninérgica. En relación a ello, en ovinos, bovinos y porcinos la melatonina estimula la síntesis y liberación de estradiol y progesterona en la células de la granulosa y el cuerpo lúteo (Webley y Luck, 1986; Durotoye y col., 1997; Tanavde y Maitra, 2003; He y col., 2016). Particularmente, en la oveja, la melatonina regula la foliculogénesis y la exposición a luz constante estimula la secreción de progesterona, pero sin cambios en los niveles de melatonina en todo el ciclo estral (Kennaway y col., 1983; Manca y col., 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las variaciones en el fotoperíodo, transmitidas mediante la melatonina, afectan directamente la dinámica y actividad ováricas. La sensibilidad a la disponibilidad lumínica tendría lugar tanto en la fase folicular como en la fase lútea, regulando la secreción de estradiol, mientras que la secreción de progesterona se vería particularmente modulada por el ambiente hormonal propio de estas fases.

El patrón de expresión opuesto de los receptores de estrógenos hipotalámicos representaría mecanismos diferentes de regulación de los REs ante fotoperíodos extremos. En concordancia, ha sido descrita en la APO de la oveja que un incremento en la expresión de los REs estaría vinculado al efecto inhibitorio de los estrógenos en animales expuestos a un fotoperíodo largo, siendo el $RE\alpha$ relevante para este efecto inhibitorio (Skinner y Herbison, 1997; Hardy y col., 2003). Por el contrario, en el hámster sirio, la exposición a un fotoperíodo corto reduce la expresión de estos receptores en el APO (Mangels y col., 1998). Asimismo, se ha descrito en el ratón que el $RE\alpha$ participaría en la regulación de la actividad circadiana mientras un mecanismo independiente de este receptor regularía la fase de los ritmos de actividad circadiana (Blattner y Mahoney, 2014). Además, la expresión del $RE\beta$ puede ser regulada

por proteínas del reloj circadiano hipotalámico, que a su vez depende de la información fotoperiódica (Cai y col., 2008). En función de los resultados obtenidos y considerando que la vizcacha es un roedor reproductor de día corto, la expresión hipotalámica de los REs sería modulada en parte por la disponibilidad lumínica en las fases del ciclo estral. Esto podría representar un nuevo nivel de control de la actividad del hipotálamo en el eje reproductivo, en el cual el fotoperíodo modularía la respuesta al estradiol en función de la disponibilidad de sus receptores.

En vizcachas en fase folicular, la disponibilidad lumínica modula la expresión de los componentes del sistema melatoninérgico, encontrándose además diferencias entre los órganos del eje H.H.G. Ante un desajuste extremo en el ciclo luz/oscuridad, la expresión de AANAT presentaría un patrón a nivel transcripcional y traduccional similar, mientras que la regulación en la actividad de la enzima sería el punto clave de modulación de los niveles de melatonina. La reducción de los niveles de esta hormona en los animales expuestos a oscuridad constante no se condice con lo reportado para otras especies reproductoras de día corto, en las que los elevados niveles de melatonina durante otoño-invierno estimulan la actividad del eje reproductivo (Karsch y col., 1993; Smith y Clarke, 2010; Vasantha, 2016). Si bien existen trabajos que reportan un aumento en la actividad de AANAT ante la exposición a oscuridad continua así como del peso de la glándula pineal, los mismos fueron realizados en ejemplares machos (Guzmán y col., 1983; Pelzer y col., 1989). Según lo observado en este estudio, la regulación particular en la densidad de cada tipo de receptor de melatonina en la vizcacha podría representar una respuesta diferente de cada órgano a la información fotoperiódica, de manera de posibilitar la activación y el funcionamiento del eje reproductivo ante cambios en los ciclos luz/oscuridad. Es posible que, en el hipotálamo de la vizcacha, la disponibilidad de los receptores de melatonina esté relacionada con los niveles de melatonina, mientras que en la hipófisis y en el ovario la expresión de MT_1 y de MT_2 dependa de los ciclos luz/oscuridad. De hecho, se ha descrito que la regulación diferencial circadiana de los receptores de melatonina del NSQ y de la pars tuberalis es, además, especie-específica (Gauer y col., 1994). Por lo tanto, el sistema melatoninérgico de la vizcacha sería flexible, de manera de ajustarse a la información lumínica ambiental a través de variaciones en la actividad del eje H.H.G. Por otro lado, en vizcachas en las que se emuló la fase lútea del ciclo estral, tanto los componentes del sistema melatoninérgico como del eje H.H.G. sufrieron variaciones en su expresión, en los diferentes órganos estudiados. Cabe destacar que el patrón de expresión hipotalámica de MT_1 y de MT_2 fue opuesto entre sí, a diferencia de lo observado en los animales en fase folicular. Notoriamente, la expresión de sus ARNm no se relacionó con la de sus proteínas. En este nuevo ambiente hormonal, el efecto de la disponibilidad lumínica modularía al eje reproductivo y al sistema melatoninérgico de manera particular y muy distinta a lo observado en animales en fase folicular. Esto podría implicar la

existencia de factores (endócrinos y/o neurales) específicos de la fase lútea, que modifican la acción de la melatonina y/o la respuesta ante ésta de algunos órganos del eje H.H.G. Comparando los resultados obtenidos en animales en fase folicular y en fase lútea, se destaca que únicamente los niveles de estradiol resultaron aumentados en los animales expuestos a oscuridad continua. Sorpresivamente, en animales con ovulación inducida, los tratamientos no modificaron el número de cuerpos lúteos, la concentración de progesterona o los niveles de GnRH hipotalámica, oponiéndose a lo descrito para ovejas en fase lútea en las que se observa un incremento de la expresión de GnRH hipotalámica por exposición a un fotoperíodo corto (Ciechanowska y col., 2008).

En conjunto, los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que los desajustes fotoperiódicos y hormonales alteran la respuesta del hipotálamo, de la hipófisis y del ovario de manera diferencial en función de la etapa del ciclo estral. Probablemente, la interacción entre la señalización fotoperiódica melatoninérgica y mediante los esteroides ováricos permita ajustar la función reproductiva en función de la información ambiental, conservar la actividad gametogénica y/o esteroidogénica y garantizar el éxito reproductivo de la vizcacha ante condiciones adversas.

CONCLUSIONES

8

El control estacional de la reproducción favorece la supervivencia de la especie, ajustando el proceso a la época del año más favorable para el desarrollo de las crías. La disponibilidad de luz es interpretada por un sistema neuroendócrino que ajusta la actividad del eje reproductivo. Este trabajo describe cómo el fotoperíodo modula a los componentes del eje reproductivo de *L. maximus* a través del sistema melatoninérgico. Además, demostramos que la melatonina modula la respuesta hipotalámica al estradiol y al neuroestradiol. En este animal la regulación particular de cada órgano a través de la información fotoperódica, así como su sensibilidad a la melatonina y el contexto hormonal del ciclo estral, confluyen en la modulación del eje H.H.G. de manera de ajustar el inicio de la actividad reproductiva a la estación más favorable. Esto permitiría mantener el funcionamiento del eje reproductivo ante desfasajes fotoperiódicos o endócrinos. De esta manera, cada factor contribuye al control de la peculiar actividad reproductiva de la vizcacha, posibilitando la reactivación del eje H.H.G y así sostener la extensa gestación. Por otro lado, se describió la co-expresión de GnRH y de ambos receptores de melatonina en los tres núcleos hipotalámicos implicados en la actividad reproductiva de la vizcacha y que la hipófisis y el ovario también expresan MT_1 y MT_2 . Asimismo, determinamos que MT_2 tiene un papel importante en la modulación de la liberación de GnRH hipotalámica mediada por melatonina. De esta manera se demuestra que a la autorregulación intrínseca o clásica del eje se le añade el control del fotoperíodo mediante la melatonina. Ésta, según los niveles hormonales dependientes de la fase del ciclo estral, alterará el funcionamiento del eje H.H.G. en relación a la disponibilidad lumínica (es decir, el fotoperíodo ambiental) permitiendo sincronizar la actividad reproductiva.

La reactivación del eje en la mitad de la gestación es un evento característico de *L. maximus* que requiere la estimulación veloz de las neuronas GnRH para que liberen esta hormona. En esta tesis se ha demostrado que la señalización parácrina y autócrina mediante el neuroestradiol es indispensable para el control hipotalámico central del reinicio de la actividad reproductiva. El estradiol de síntesis local, es producido por neuronas GnRH y no-GnRH a partir de la conversión de andrógenos en estrógenos por la enzima aromatasa. En nuestro laboratorio, determinamos que la expresión de esta enzima sufre un patrón de variaciones a lo largo de la gestación que acompañan las de GnRH y LH. Además de haber confirmado su localización hipotalámica en núcleos que intervienen en el control de la actividad endócrina reproductiva, mostramos el efecto modulador del neuroestradiol sobre la secreción de GnRH. Por otro lado, observamos que la melatonina modifica la respuesta de las neuronas GnRH al neuroestradiol y al estradiol sistémico, regulando así la liberación de GnRH, y, además, demostramos la relevancia del $RE\beta$ en esta situación. Por lo tanto, la melatonina, además de modular la actividad de los órganos del eje H.H.G. directamente, sería capaz de alterar la respuesta de estos al estradiol (local y sistémico) así como su vía de acción.

En esta tesis doctoral se muestra por primera vez la secuencia del ARNm del precursor de la GnRH hipotalámica de *L. maximus*, la cual codifica para la variante mGnRH y para GAP, se encuentra altamente conservada entre caviomorfos emparentados (chinchilla, degú, cobayo) y, en menor medida, entre roedores lejanamente emparentados (ratón, rata). La falta de variabilidad en su secuencia refuerza la idea del rol conservado de GnRH en la regulación del eje reproductivo.

En conclusión, los resultados de este trabajo destacan la relevancia del sistema melatoninérgico de la vizcacha como transductor de la información fotoperiódica ambiental, e indican que esta señalización modula la actividad del eje H.H.G. de la vizcacha en todos sus niveles, de manera directa e indirecta, interactuando con el estradiol y el neuroestradiol. En conjunto, su efecto final sería la activación del eje reproductivo y su modulación durante la extensa gestación para poder sostenerla de forma exitosa y contribuir a la supervivencia de la especie. Este control intrincado, dependiente de la etapa del ciclo estral y de la abundancia lumínica, se suma a lista de peculiaridades reproductivas descritas para este animal, un valioso modelo de regulación neuroendócrina de la reproducción en mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

9

Abdelgadir, S.E; Resko, J.A.; Ojeda, S.R.; Lephart, E.D.; McPhaul, M.J.; Roselli, C.E. (1994) Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. *Endocrinology*, 135: 395–401.

Abraham, I.M.; Han, S-K.; Todman, M.G.; Korach, K.S.; Herbison, A.E. (2003) Estrogen receptor beta mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *Journal of Neuroscience*, 23:5771–7.

Ackermann K.; Bux R.; Rub U.; Korf H.W.; Kauert G.; Stehle J.H. (2006). Characterization of human melatonin synthesis using autoptic pineal tissue. *Endocrinology*, 147: 3235–3242.

Adams, B.A.; Vickers, E.D.; Warby, C.; Park, M.; Fischer, W.H.; Craig, A.G.; Rivier, J.E.; Sherwood, N.M. (2002). Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biology of Reproduction*, 67: 232–239.

Adelman, J.; Mason, A.J.; Hayflick, J.S.; Seeburg, P.H. (1986). Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 83: 179–183.

Adler B. A.; Crowley W. R. (1986). Evidence for gamma-aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in the female rat. *Endocrinology*, 118: 91–97.

Adriaens, I.; Jacquet, P.; Cortvrindt, R.; Janssen, K.; Smits, J. (2006). Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. *Toxicology*, 228: 333-343.

Aleandri, V.; Spina, V.; Moirini, A. (1996). The pineal gland and reproduction. *Human Reproduction Update*, 2(3): 225-235.

Arnold, A.P.; Gorski, R.A. (1984). Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 7: 413-442.

Arreguin-Arevalo, J.A.; Davis, T.L.; Nett, T.M. (2007). Differential modulation of gonadotropin secretion by selective estrogen receptor 1 and estrogen receptor 2 agonists in ovariectomized ewes. *Biology of Reproduction*, 77: 320-328.

Auger, C.J.; De Vries, G.J. (2002). Progesterin receptor immunoreactivity within steroid-responsive vasopressin-immunoreactive cells in the male and female rat brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 14: 561–567.

Ayoub, M.A.; Couturier, C.; Lucas-Meunier, E.; Angers, S.; Fossier, P.; Bouvier, M.; Jockers, R. (2002). Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 21522–21528.

Ayre, E.A.; Pang, S.F. (1994). 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the testis and ovary: putative melatonin receptors in the gonads. *Biological Signals*, 3: 71-84.

Balthazart, J.; Baillien, M.; Ball, G.F. (2001). Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 79: 261–277.

Balthazart, J.; Baillien, M.; Ball, G.F. (2006). Rapid control of brain aromatase activity by glutamatergic inputs. *Endocrinology*, 147: 359–366.

Balthazart, J.; Ball, G.F. (2006). Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter?. *Trends in Neurosciences*, 29: 241-249.

Berson, D.M.; Dunn, F.A.; Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295: 1070-1073.

Beshay, V.E.; Carr, B.R. (2013). Hypothalamic-pituitary-ovarian axis and control of the menstrual cycle. En Falcone, T.; Hurd W.W. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*. Springer, Nueva York. Capítulo 2: 31-42.

Bhatnagar, A.S.; Batzl, C.; Häusler, A.; Noqués, V. (1993). The role of estrogen in the feedback regulation of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1-6): 161-166.

Binder, A.K.; Winuthayanon, W.; Hewitt, S.C.; Couse, J.F.; Korach, K.S. (2014). Steroid receptors in the uterus and ovary. En Plant, T. M.; Zeleznik, A.J. *Knobil & Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press, Estados Unidos. Octava edición. Capítulo 25, volumen 1: 1099-1193.

Bittman, E.L.; Dempsey, R.J.; Karsch, F.J. (1983). Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology*, 113(6): 2276-2283

Bittman, E.L.; Kaynard, A.H.; Olster, D.H.; Robinson, J.E.; Yellon, S.M.; Karsch, F.J. (2008). Pineal Melatonin Mediates Photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology*, 40(5): 409-418.

Blattner, M.S.; Mahoney, M.M. (2014). Estrogen receptor 1 modulates circadian rhythms in adult female mice. *Chronobiology International*, 31(5): 637-644.

Blaustein, J.D.; Mani, S. (2007). Feminine sexual behavior from the neuroendocrine and molecular neurobiological perspectives. En Blaustein, J.D. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: behavioral neurochemistry and neuroendocrinology*. Springer-Verlag, Berlín. Capítulo 3, volumen 21: 95-149.

Borjigin J.; Wang, M.M.; Snyder, S.H. (1995). Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Nature*, 378: 783-785.

Borjigin, J.; Zhang, L.S.; Calinescu, A.A. (2012). Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349: 13-19.

Branch, L. (1993). Social organization and mating system of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Journal of Zoology (London)*, 229: 473-491.

Breedlove, S.M. (1992). Sexual differentiation of the brain and behavior. En Becker, J.B.; Breedlove, S.M.; Crews, D. *Behavioral Endocrinology*. MIT Press, Massachusetts. Capítulo 2: 39-70.

Brunner, P.; Sözer-Topcular, N.; Jockers, R.; David, R.; Angeloni, D.; Fraschini, F.; Eckert, A.; Müller-Spahn, F.; Savaskan, E. (2006). Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *European Journal of Histochemistry*, 50(4): 311-316.

Brydon, L.; Petit, L.; de Coppet, P.; Barrett, P.; Morgan, P.J.; Donny Strosberg, A.; Jockers, R. (1999a). Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reproduction Nutrition Development*, 39(3): 315-324.

Brydon, L.; Roka, F.; Petit, L.; de Coppet, P.; Tissot, M.; Barrett, P.; Morgan, P.J.; Nanoff, C.; Strosberg, A.D.; Jockers, R. (1999b). Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via

G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Molecular Endocrinology*, 13(12): 2025-2038.

Busolini, F.I.; Rosales, G.J.; Filippa, V.P.; Mohamed, F.H. (2017). A seasonal and age-related study of interstitial cells in the pineal gland of male vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anatomical Record (Hoboken)*, 300(10): 1847-1857.

Butler, J.A.; Sjoberg, M.; Coen, C. (1999). Evidence for oestrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons. *Journal of Neuroendocrinology*, 11: 331-335.

Cabrera, A. (1961). Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*, Ciencias Zoológicas, 4: 309-732.

Cabrera, A.; Yepes, H. (1960). Mamíferos sudamericanos volúmenes 1 y 2. Ediar S.A., Buenos Aires.

Cai, W.; Rambaud, J.; Teboul, M.; Masse, I.; Benoit, G.; Gustafsson, J.A.; Delaunay, F.; Laudet, V.; Pongratz, I. (2008). Expression levels of estrogen receptor β are modulated by components of the molecular clock. *Molecular and Cellular Biology*, 28(2): 784-793.

Cardinali, D.P.; Vacas, M.I.; Sarmiento, M.I.K.; Etchegoyen, G.S.; Pereyra, E.N.; Chuluyan, H.E. (1987). Neuroendocrine integrative mechanisms in mammalian pineal gland: Effects of steroid and adenohipophysial hormones on melatonin synthesis in vitro. *Journal of Steroid Biochemistry*, 27(1-3): 565-571.

Carolsfeld, J.; Powell, J.F.; Park, M.; Fischer, W.H.; Craig, A.G.; Chang, J.P.; Rivier, J.E.; Sherwood, N.M. (2000). A novel form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in herring sheds light on evolutionary pressures. *Endocrinology*, 141: 505-512.

Carswell, H.V.; Dominiczak, A.F.; García-Segura, L.M.; Harada, N.; Hutchinson, J.B.; Macrae, I.M. (2005). Brain aromatase expression after experimental stroke: topography and time course. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 96(1): 89-91.

Casao, A.; Gallego, M.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Pérez-Pé, R.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. (2012). Identification and immunolocalisation of melatonin MT1 and MT2 receptors in *Rasa aragonesa* ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(7): 953.

Cassone, V.M.; Speh, J.C.; Card, J.P.; Moore, R.Y. (1988). Comparative anatomy of the

mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 3(1): 71-91.

Chapell, P.E.; Levine, J.E. (2000). Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. I. Role of hypothalamic progesterone receptors. *Endocrinology*, 141(4): 1477-1485.

Charif, S.E.; Inserra, P.I.F.; Di Giorgio, N.P.; Schmidt, A.R.; Lux-Lantos, V.; Vitullo, A.D.; Dorfman, V.B. (2016). Sequence analysis, tissue distribution and molecular physiology of the GnRH preprogonadotrophin in the South American plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *General and Comparative Endocrinology*, 232: 174-184.

Charif, S.E.; Inserra, P.I.F.; Schmidt, A.R.; Di Giorgio, N.P.; Cortasa, S.A.; Gonzalez, C.R.; Lux-Lantos, V.; Halperín, J.; Vitullo, A.D.; Dorfman, V.B. (2017). Local production of neuroestradiol affects gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion at mid-gestation in *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *Physiological Reports*, 5(16): e13439.

Chen, C.C.; Fernald, R.D. (2008). GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *Journal of Fish Biology*, 73: 1099-1120.

Cheng, C.K.; Leung, P.C.K. (2005). Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocrine Reviews*, 26: 283–306.

Childs, G.V.; Hyde, C.; Naor, Z.; Catt, K. (1983). Heterogeneous luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone storage patterns in subtypes of gonadotropes separated by centrifugal elutriation. *Endocrinology*, 113(6): 2120-2128.

Choi, D. (2013). Continuous melatonin attenuates the regressing activities of short photoperiod in male golden hamsters. *Development & Reproduction*, 2: 111-119.

Chottanapund, S.; Van Duursen, M.B.; Navasumrit, P.; Hunsonti, P.; Timtavorn, S.; Ruchirawat, M.; Van den Berg, M. (2014). Anti-aromatase effect of resveratrol and melatonin on hormonal positive breast cancer cells co-cultured with breast adipose fibroblasts. *Toxicology In Vitro*, 28(7): 1215-1221.

Christian, C.A., Glidewell-Kenney, C., Lameson, J.L., y Moenter, S.M. (2008). Classical estrogen receptor α signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. *Endocrinology*, 149(11): 5328-5334.

Chu, Z.; Andrade, J.; Shupnik, M.A.; Moenter, S.M. (2009). Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *Journal of Neuroscience*, 29(17): 5616-27

Ciechanowska, M.; Lapot, M.; Malewski, T.; Mateusiak, K.; Misztal, T.; Przekop, F. (2008). Expression of the GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the hypothalamus and of the GnRH-R gene in the anterior pituitary gland of anestrous and luteal phase ewes. *Animal Reproduction Science*, 108: 345-355.

Clarke, I.J.; Cummins, J.T.; Karsch, F.J.; Seeburg, P.H.; Nikolics, K. (1987). GnRH-associated peptide (GAP) is cosecreted with GnRH into the hypophyseal portal blood of ovariectomized sheep. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 143(3): 665-671.

Clemens, J.; Jarzynka, M.; Witt-Enderby, P. (2001). Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sciences*; 69(1): 27-35.

Clipperton-Allen, A.E.; Almey, A.; Melicherik, A.; Allen, C.P.; Choleris, E. (2011). Effects of an estrogen receptor alpha agonist on agonistic behaviour in intact and gonadectomized male and female mice. *Psychoneuroendocrinology*, 36: 981-995.

Cogé, F.; Guenin, S.; Fery, I.; Migaud, M.; Devavry, S.; Slugocki, C.; Legros, C.; Ouvry, C.; Cohen, W.; Renault, N.; Nosjean, O.; Malpoux, B.; Delagrangé, P.; Boutin, J. (2009). The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT2 receptor. *British Journal Of Pharmacology*, 158(5): 1248-1262.

Colombo, J.A.; Whitmoyer, D.I.; Sawyer, C.H. (1974). Local changes in multiple unit activity induced by electrochemical means in preoptic and hypothalamic areas in the female rat. *Brain Research*, 71: 35-45.

Combarnous, Y. (1988). Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reproduction Nutrition Development*. 28(2A): 211-228.

Conneely, O.M.; Maxwell, B.L.; Toft, D.O.; Schrader, W.T.; O'Malley, B.W. (1987). The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 149: 493-501.

Coon, S.L.; Roseboom, P.H.; Baler, R.; Weller, J.L.; Namboodiri, M.A.A.; Koonin, E.V.; Klein,

D.C. (1995). Pineal serotonin-N-acetyltransferase: Expression cloning and molecular analysis. *Science*, 270: 1681-1683.

Cornil, C.A.; Dalla, C.; Papadopoulou-Daifoti, Z.; Baillien, M.; Dejace, C.; Ball, G.F.; Balthazart, J. (2005). Rapid decreases in preoptic aromatase activity and brain monoamine concentrations after engaging in male sexual behavior. *Endocrinology*, 146: 3809–3820.

Cornil, C.A.; Ball, G.F.; Balthazart, J. (2006). Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from?. *Brain Research*, 1126: 2-26

Cornil, C.A.; Charlier, T.D. (2010). Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase. *Journal of Neuroendocrinology*, 22:664–673.

Dalkin, A.C.; Haisenleder, D.J.; Ortolano, G.A.; Ellis, T.R.; Marshall, J.C. (1989). The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, 125(2): 917-924.

Das Chagas, F.; Tenorio, A.M.; Simões, M.J.; Teixeira, V.W.; Teixeira, A.A.C. (2015). Effects of melatonin and prolactin in reproduction: a review of literature. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 61(3): 269-274.

Del Río, B.; García Pedrero, J.M.; Martínez-Campa, C.; Zuazual, P.; Lazo, P.S.; Ramos, S. (2004). Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor α via calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37): 38294-38302.

Den Boer, J.A.; Bosker, F.J.; Meesters, Y. (2006). Clinical efficacy of agomelatine in depression: the evidence. *International Clinical Psychopharmacology*, 21(Suppl. 1): S21–S24.

Di Giorgio, N.P.; Catalano, P.N.; López, P.V.; González, B.; Semaan, S.J.; López, G.C.; Kauffman, A.S.; Rulli, S.B.; Somoza, G.M.; Bettler, B.; Libertun, C.; Lux-Lantos, V. (2013). Lack of functional GABA_B receptors alters Kiss1, GnRH1 and Gad1 mRNA expression in the medial nasal hypothalamus at postnatal day 4. *Neuroendocrinology*, 98(3): 212-223.

Dollins, A.B.; Zhdanova, I.V.; Wurtman, R.J.; Lynch, H.J.; Deng, M.H. (1994). Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 91(5): 1824-1828.

Dorfman, V.B.; Fraunhoffer, N.; Inserra, P.I.F.; Loidl, C.F.; Vitullo, A.D. (2011). Histological characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus of the South American plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *Journal of Molecular Histology*, 42: 311-321.

Dorfman, V.B.; Saucedo, L.; Di Giorgio, N.P.; Inserra, P.I.F.; Fraunhoffer, N.; Leopardo, N.P.; Halperín, J.; Lux-Lantos, V.; Vitullo, A.D. (2013). Variation in progesterone receptors and GnRH expression in the hypothalamus of the pregnant South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia). *Biology of Reproduction*, 89(5): 115, 1-2.

Dorfman, V.B.; Inserra, P.I.F.; Leopardo, N.P.; Halperín, J.; Vitullo, A.D. (2016). The South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus*, as a valuable animal model for reproductive studies. *Journal of Science and Medicine - Anatomy and Physiology*, 1(1): 1004-1006.

Dubocovich, M.L.; Masana, M.I.; Iacob, S.; Sauri, D.M. (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 355(3): 365-75.

Dubocovich, M.L.; Delagrangé, P.; Krause, D.N.; Sugden, D.; Cardinali, D.P.; Olcese, J. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacological Reviews*, 63: 343-380.

Dubois, E.A.; Zandbergen, M.A.; Peute, J.; Goos, H.J.T. (2002). Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Research Bulletin*, 57(3/4): 413-418.

Dufau, M. (1998). The luteinizing hormone receptor. *Annual Review of Physiology*, 60: 461-496.

Durotoye, L.A.; Webley, G.E.; Rodway, R.G. (1997). Stimulation of the production of progesterone by the corpus luteum of the ewe by the perfusion of melatonin in vivo and by treatment of granulosa cells with melatonin in vitro. *Research in Veterinary Science*, 62: 87-91.

Edson, M.A.; Nagaraja, A.K.; Matzuk, M.M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, 30(6): 624-712.

Eppig, J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals.

Reproduction, 122: 829–838.

Erickson, G.F. (2004). Follicle growth and development. En Sciarra, J.J. Gynecology and Obstetrics CD-ROM. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia. Cuarta edición, volumen 5. Capítulo 12.

Everett, J.W.; Sawyer, C.H. (1950). A 24h periodicity in the “LH-release apparatus “ of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*, 46: 196-216.

Falcon, J.; Migaud, H.; Muñoz-Cueto, J.A.; Carrillo, M. (2010). Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 469–482

Fernald, R.D.; White, R.B. (1999). Gonadotropin-releasing hormone gene: phylogeny, structure and functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20: 224-240.

Fernando, S.; Rombauts, L. (2014). Melatonin: shedding light on infertility? - a review of the recent literature. *Journal of Ovarian Research*, 7: 98-111.

Filicori, M.; Butler, J.P.; Crowley Jr.; W.F. (1984). Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 73(60): 1638-1647.

Filippa, V.P.; Penissi, A.; Mohamed, F.H. (2005). Seasonal variations of gonadotropins in the pars distalis male viscacha pituitary. Effect of chronic melatonin treatment. *European Journal of Histochemistry*, 49(3): 291-300.

Filippa, V.P.; Mohamed, F.H. (2010). Morphological and morphometric changes of pituitary lactotrophs of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) in relation to reproductive cycle, age and sex. *Anatomical Record (Hoboken)*, 293(1): 150-161.

Flamini, M.A.; Barbeito, C.G.; Gimeno, E.J.; Portiansky, E.L. (2009). Histology, histochemistry and morphometry of the ovary of the adult plains viscacha (*Lagostomus maximus*) in different reproductive stages. *Acta Zoologica*, 90(4): 390-400.

Franceschini, I.; Lomet, D.; Cateau, M.; Delsol, G.; Tillet, Y.; Caraty, A. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters*, 401: 225-230.

Fraser, H.M.; Abbot, M.; Laird, N.C.; McNeilly, A.S.; Nestor Jr, J.J.; Vickory, B.H. (1986). Effects of an LH-releasing hormone antagonist on the secretion of LH, FSH, prolactin and ovarian steroids at different stages of the luteal phase in the stumptailed macaque (*Macaca artoides*). *Journal of Endocrinology*, 111: 83–90.

Fraunhoffer Navarro, N.A. (2014). Renovación de la masa germinal ovárica en un modelo animal poliovulatorio (*Lagostomus maximus*) y en la endometriosis ovárica humana. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Fraunhoffer, N.A.; Jensen, F.; Leopardo, N.; Inserra, P.I.F.; Abuelafia, A.M.; Espinosa, M.B.; Charif, S.E.; Dorfman, V.B.; Vitullo, A.D. (2017). Hormonal behavior correlates with follicular recruitment at mid-gestation in the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *General and Comparative Endocrinology*, 250: 162-174.

Fu, H.; Subramanian, R.R.; Masters, S.C. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40: 617–647.

Fuentes, L.; Muñoz, E.M.; Aguilera Merlo, C.; Domínguez, S.; Scardapane, L.; Piezzi, R.S. (2004). Bilateral enucleation and captivity influence the reproductive cycle of male vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 77(2): 321-331.

Funabashi, T.; Shinohara, K.; Mitsushima, D.; Kimura, F. (2000). Gonadotropin-releasing hormone exhibits circadian rhythm in phase with arginine-vasopressin in co-cultures of the female rat preoptic area and suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(6): 521-8.

Ganguly, S.; Gastel, J.A.; Weller, J.L.; Schwartz, C.; Jaffe, H.; Namboodiri, M.A.; Coon, S.L.; Hickman, A.B.; Rollag, M.; Obsil, T.; Beauverger, P.; Ferry, G.; Boutin, J.A.; Klein, D.C. (2001). Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3 binding switch in melatonin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 98: 8083–8088.

Ganguly S.; Coon S.L.; Klein D.C. (2002). Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: The critical role of serotonin acetylation. *Cell and Tissue Research*, 309: 127–137.

Gao, J.; Mazella, J.; Tang, M.; Tseng, L. (2000). Ligand-activated progesterone receptor isoform hPR-A is a stronger transactivator than hPR-B for the expression of IGFBP-1 (insulin-like

growth factor binding protein-1) in human endometrial stromal cells. *Molecular Endocrinology*, 14: 1954–61.

Gastel, J.A.; Roseboom, P.H.; Rinaldi, P.A.; Weller, J.L.; Klein, D.C. (1998). Melatonin production: proteosomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science*, 279: 1358– 1360.

Gauer, F.; Masson-Pévet, M.; Pévet, P. (1992). Pinealectomy and constant illumination increase the density of melatonin binding sites in the pars tuberalis of rodents. *Brain Research*, 575: 32-38.

Gauer, F.; Masson-Pévet, M.; Skene, D.J.; Vivien-Roels, B.; Pévet, P. (1993). Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology*, 57: 120–126.

Gauer, F.; Masson-Pévet, M.; Stehle, J.; Pévet, P. (1994). Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Research*, 641: 92–98.

Geary, G.G.; Duckles, S.P.; Krause, D.N. (1998). Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. *British Journal of Pharmacology*, 123: 1533–1540.

Georges, A.; Auguste, A.; Bessiére, L.; Vanet, A.; Todeschini, A.L.; Veitia, R.A. (2014). FOXL2: a central transcription factor of the ovary. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52: R17-R33.

Geraudie, P.; Hinfrey, N.; Gerbron, M.; Porcher, J.M.; Brion, F.; Minier, C. (2011). Brain cytochrome P450 aromatase activity in roach (*Rutilus rutilus*): seasonal variations and impact of environmental contaminants. *Aquatic Toxicology*, 105: 378–384.

Gerdin, M.J.; Masana, M.I.; Rivera-Bermúdez, M.A.; Hudson, R.L.; Earnest, D.J.; Gillete, M.U.; Dubocovich, M.L. (2004a). Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *The FASEB Journal*, 18: 1646-1656.

Gerdin, M.J.; Masana, M.I.; Dubocovich, M.L. (2004b). Melatonin-mediated regulation of human MT1 melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochemical Pharmacology*, 67: 2023-2030.

Gil, E.; Calderón, C.; Pelzer, L.; Dominguez, S.; Fogal, T.; Scardapane, L.; Piezzi, R.S. (2005). Morphological and biochemical study of the pineal gland of pregnant and non-pregnant female vizcachas (*Lagostomus maximus maximus*). *Neuroendocrinology Letters*, 26(5): 575-580.

Gillespie, J.M.; Roy, D.; Cui, H.; Belsham, D.D. (2004). Repression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression by melatonin may involve transcription factors COUP-TFI and C/EBP beta binding at the GnRH enhancer. *Neuroendocrinology*, 79: 63–72.

González, A.; Martínez-Campa, C.; Mediavilla, M.D.; Alonso-González, C.; Sánchez-Barceló, E.J.; Cos, S. (2007). Inhibitory effects of pharmacological doses of melatonin on aromatase activity and expression in rat glioma cells. *British Journal of Cancer*, 97(6): 755-760.

Gregg, D.W.; Allen, M.C.; Nett, T.M. (1990). Estradiol-induced increase in number of GnRH receptors in cultured ovine pituitary cells. *Biology of Reproduction*, 43: 1032–1036.

Gregory, S.J.; Kaiser, U.B. (2004). Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Seminars in Reproductive Medicine*, 22(3): 253-267.

Griffiths, D.; Bjørro, T.; Gautvik, K.; Haug, E. (1987). Melatonin reduces the production and secretion of prolactin and growth hormone from rat pituitary cells in culture. *Acta Physiologica Scandinavica*, 131: 43-49.

Guan, S.; Zie, L.; Ma, T.; Lv, D.; Jing, W.; Tian, X.; Song, Y.; Liu, Z.; Xiao, X.; Liu, G. (2017). Effects of melatonin on early pregnancy in mouse: involving the regulation of StAR, Cyp11a1, and Ihh expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 1637-1650.

Guilgur, L.G.; Moncaut, N.P.; Canário, A.V.M.; Somoza, G.M. (2006). Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(3): 272-283.

Gunasegaran, J.P. (2010). Pineal body (epiphysis). En Gunaseragan, J.P. *Textbook of histology and practical guide*. Elsevier Health Sciences, India. Segunda edición. Capítulo 17: 261-384.

Guzmán, J.A.; Piezzi, R.S.; Pelzer, L.E.; Domínguez, S.; Scardapane, L. (1983). Exposure to constant light increases pineal weight and RNA content in the pineal of the vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Acta Physiologica Latino Americana*, 33(2): 145-148.

Guzmán, J.A.; Pelzer, L.E.; Piezzi, R.S.; Scardapane, L.M.; Dominguez, S. (1980).

Hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT), catechol-O-methyltransferase (COMT) and histamine-N-methyltransferase (HNMT) in the pineal gland of the vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Journal of Neural Transmission*, 47(1): 23-28.

Halperin, J.; Dorfman, V.B.; Fraunhoffer, N.A.; Vitullo, A.D. (2013). Estradiol, progesterone and prolactin modulate mammary gland morphogenesis in adult female plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *Journal of Molecular Histology*, 44(3): 299-310.

Hamada, T.; Shimizu, T.; Ichikawa, M.; Mori, Y. (1992). Immunohistochemical study on gonadotropin-releasing hormone neurons in the Shiba goat brain. *Journal of Reproduction and Development*, 38: 133–142.

Hardy, S.L.; Anderson, G.M.; Valent, M.; Connors, J.M.; Goodman, R.L. (2003). Evidence that estrogen receptor alpha, but not beta, mediates seasonal changes in the response of the ovine retrochiasmatic area to estradiol. *Biology of Reproduction*, 68(3): 846-852.

He, Y-M.; Deng, H-H.; Shi, M-H.; Bodinga, B.M.; Chen, H-L.; Han, Z-S.; Jiang, Z-L.; Li, Q-W. (2016). Melatonin modulates the functions of porcine granulosa cells via its membrane receptor MT2 in vitro. *Animal Reproduction Science*, 172: 164-172.

Herbison A. E.; Dyer R. G. (1991). Effect on luteinizing hormone secretion of GABA receptor modulation in the medial preoptic area at the time of proestrous luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology*, 53: 317–320.

Herbison, A.E.; Theodosis, D.T. (1992). Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience*, 50: 283–298.

Herbison, A.E. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine Reviews*, 19: 302–330.

Herbison, A.E.; Pape, J.R. (2001). New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 22: 292–308.

Hirsch-Rodriguez, E.; Imbesi, M.; Manev, R.; Uz, T.; Manev, H. (2007). The pattern of melatonin receptor expression in the brain may influence antidepressant treatment. *Medical hypotheses*, 69: 120-124.

Hirshfield, A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124: 43-101.

Houssay, A.B.; Barcelo, A.C. (1972). Effects of estrogens and progesterone upon the biosynthesis of melatonin in the pineal gland. *Experientia*, 28(4): 478-479.

Hsueh, A.J.W.; LaPolt, P.S., (1992). Molecular basis of gonadotropin receptor regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 3: 164–170.

Hu, L.; Gustofson, R.L.; Feng, H.; Leung, P.K.; Mores, N.; Krsmanovic, L.Z.; Catt, K.J. (2008). Converse regulatory functions of estrogen receptor- α and - β subtypes expressed in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons. *Molecular Endocrinology*, 22(10): 2250-2259.

Imbesi, M.; Uz, T.; Manev, H. (2006a). The MT2 melatonin receptor knockdown enables nanomolar melatonin to increase BDNF protein content in primary neuronal cultures. *Society for Neuroscience Abstract*, 187: 17.

Imbesi, M.; Uz, T.; Yildiz, S.; Arslan, A.D.; Manev, H. (2006b). Drug- and region-specific effects of protracted antidepressant and cocaine treatment on the content of melatonin MT1 and MT2 receptor mRNA in the mouse brain. *International Journal of Neuroprotection and Neuroregeneration*, 2(3): 185–189.

Imbesi, M.; Uz, T.; Dzitoyeva, S.; Giusti, P.; Manev, H. (2008). Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT1 and MT2 melatonin receptors. *Brain Research*, 1227: 19-25.

Inserra, P.I.F.; Leopardo, N.P.; Willis, M.A.; Freysselinard, A.L.; Vitullo, A.D. (2014). Quantification of healthy and atretic germ cells and follicles in the developing and post-natal ovary of the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus*: evidence of continuous rise of the germinal reserve. *Reproduction*, 147(2): 199-209.

Inserra, P.I.F. (2016). Circuitos moduladores del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal en la vizcacha de las llanuras *Lagostomus maximus*: un mamífero con oogénesis continúa y ovulación durante la gestación. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Inserra, P.I.F.; Charif, S.E.; Di Giorgio, N.P.; Saucedo, L.; Schmidt, A.R.; Fraunhoffer, N.; Halperin, J.; Gariboldi, M.C.; Leopardo, N.P.; Lux-Lantos, V.; Gonzalez, C.R.; Vitullo, A.D.;

Dorfman, V.B. (2017). ER α and GnRH co-localize in the hypothalamic neurons of the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *Journal of Molecular Histology*, 48(3): 259-273.

Ishii, H.; Sato, S.; Yin, C.; Sakuma, Y.; Kato, M. (2009). Cetrorelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist, induces the expression of melatonin receptor 1a in the gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line GT1-7. *Neuroendocrinology*, 90: 251-259.

Ishizuka, B.; Kuribayashi, Y.; Murai, K.; Amemiya, A.; Itoh, M.T. (2000). The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *Journal of Pineal Research*, 28: 48–51

Itoh, M.T.; Ishizuka, B.; Kuribayashi, Y.; Amemiya, A.; Sumi, Y. (1999). Melatonin its precursors and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Molecular Human Reproduction*, 5: 402-408.

Jackson, J.E.; Branch, L.C.; Villarreal, D. (1996). *Lagostomus maximus*. *Mammalian Species*, 543: 1-6.

Jamnongjit, M.; Hammes, S.R. (2006). Ovarian steroids: the good, the bad and the signals that raise them. *Cell cycle*, 5(11): 1178-1183.

Jennes, L.; Stumpf, W.E. (1980). LHRH-systems in the brain of the golden hamster. *Cell and Tissue Research*, 209: 239-256.

Jensen, F.C.; Willis, M.A.; Albamonte, M.S.; Espinosa, M.B.; Vitullo, A.D. (2006). Naturally suppressed apoptosis prevents follicular atresia and oocyte reserve decline in the adult ovary of *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *Reproduction*, 132(2): 301-308.

Jensen, F.C.; Willis, M.A.; Leopardo, N.P.; Espinosa, M.B.; Vitullo, A.D. (2008). The ovary of the gestating South American plains vizcacha (*Lagostomus maximus*): suppressed apoptosis and corpora lutea persistence. *Biology of Reproduction*, 79(2): 240-246.

Jiang, Z.G.; Nelson, C.S.; Allen, C.N. (1995). Melatonin activates an outward current and inhibits Ih in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Research*, 687: 125–132

Jiménez-Liñán, M.; Rubin, B.S.; King, J.C. (1997). Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. *Endocrinology*, 138: 4123–4130.

Kah, O.; Lethimonier, C.; Somoza, G.; Guilgur, L.G.; Vaillant, C.; Lareyre, J.L. (2007). GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative and evolutive perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 153: 346-364.

Kaiser, U.B.; Jakubowiak, A.; Steinberger, A.; Chin, W.W. (1997). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology*, 138(3): 1224-1231.

Kalsbeek, A.; Cutrera, R.A.; van Heerikhuize, J.; van Der Vliet, J.; Buijs, R.M. (1999). GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience*, 91(2): 453-461.

Kalsbeek, A.; Garidou, M.L.; Palm, I.F.; Van Der Vliet, J.; Simonneaux, V.; Pevet, P.; Buijs, R.M. (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *European Journal of Neuroscience*, 12: 3146-3154.

Kang, S.H.; Seong, J.Y.; Cho, S.; Cho, H.; Kim, K. (1995). Acute increase of GABAergic neurotransmission exerts a stimulatory effect on GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized, estrogen- and progesterone-treated adult female rats. *Neuroendocrinology*, 61: 486-492.

Karim, A.; Tolbert, D.; Cao, C. (2006). Disposition kinetics and tolerance of escalating single doses of ramelteon, a high-affinity MT1 and MT2 melatonin receptor agonist indicated for treatment of insomnia. *Journal of Clinical Pharmacology*, 46(2): 140-148.

Karsch, F.J.; Cummins, J.T.; Thomas, G.B.; Clarke, I.J. (1987). Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biology of Reproduction*, 36(5): 1207-1218.

Karsch, F.J.; Dahl, G.E.; Evans, N.P.; Manning, J.M.; Mayfield, K.P.; Moenter, S.M.; Foster, D.L. (1993). Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biology of Reproduction*, 49: 1377-1383.

Kato, J.; Hirata, S.; Nozawa, A.; Yamada-Mouri, N. (1994). Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Hormones and Behavior*, 28: 454-63.

Kauffman, A.S.; Rissman, E.M. (2004). The evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II modifies food intake. *Endocrinology*, 145(2): 685-691.

Kauffman, A.S.; Bojkowska, K.; Willis, A.; Rissman, E.F. (2006). Gonadotropin-releasing hormone-II messenger ribonucleic acid and protein content in the mammalian brain are modulated by food intake. *Endocrinology*, 147(11): 5069-5077.

Kavanaugh, S.I.; Nozaki, M.; Shower, S.A. (2008). Origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in vertebrates: identification of a novel GnRH in a basal vertebrate, the sea lamprey. *Endocrinology*, 149(8): 3860-3869.

Keen, K.L.; Burich, A.J.; Mitsushima, D.; Kasuya, E.; Terasawa, E. (1999). Effects of pulsatile infusion of the GABA(A) receptor blocker bicuculline on the onset of puberty in female rhesus monkeys. *Endocrinology*, 140(11): 5257-5266.

Kelly, M.J.; Ronnekleiv, O.K.; Eskay, R.L. (1984). Identification of estrogen-responsive LHRH neurons in the guinea pig hypothalamus. *Brain Research Bulletin*, 12: 399-407.

Kelly, M.J.; Qiu, J.; Rønnenkleiv, O.K. (2005). Estrogen signalling in the hypothalamus. *Vitamin and Hormones*, 71: 123-145.

Kenealy, B.P.; Kapoor, A.; Guerriero, K.A.; Keen, K.L.; Garcia, J.P.; Kurian, J.R.; Ziegler, T.E.; Terasawa, E. (2013). Neuroestradiol in the hypothalamus contributes to the regulation of gonadotropin-releasing hormone release. *Journal of Neuroscience*, 33(49): 19059-19051.

Kenealy, B.P.; Keen, K.L.; Kapoor, A.; Terasawa, E. (2016). Neuroestradiol in the stalk median eminence of female rhesus macaque decreases in association with puberty onset. *Endocrinology*, 157(1): 70-76.

Kepa, J.K.; Jacobsen, B.M.; Boen, E.A.; Prendergast, P.; Edwards, D.P.; Takimoto, G.; Wierman, M.E. (1996). Direct binding of progesterone receptor to nonconsensus DNA sequences represses rat GnRH. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 117: 27-39.

Kim, K.; Lee, B.J.; Park, Y.; Cho, W.K. (1989). Progesterone increases messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) level in the hypothalamus of ovariectomized estradiol-primed prepubertal rats. *Brain Research, Molecular Brain Research*. 6: 151-158.

Kim, T.D.; Kim, J.S.; Kim, J.H.; Myung, J.; Chae, H.D.; Woo, K.C.; Jang, S.K.; Koh, D.S.; Kim, K.T. (2005). Rhythmic serotonin N-acetyltransferase mRNA degradation is essential for the maintenance of its circadian oscillation. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 3232–3246.

Kineman, R.D.; Leshin, L.S.; Crim J.W.; Rampacek, G.B.; Kraeling, R.R. (1988). Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the forebrain of the pig. *Biology of Reproduction*, 39(3): 665-672.

Kivela, A. (1991). Serum melatonin during human pregnancy. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, 124: 233-237.

Klein, D.C.; Weller, J.L. (1972). Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science*, 177(4048): 532-533.

Klein, D.C.; Coon, S.L.; Roseboom, P.H.; Weller, J.L.; Bernard, M.; Gastel, J.A.; Zatz, M.; Iuvone, P.M.; Rodriguez, I.R.; Bégay, V.; Falcón, J.; Cahill, G.M.; Cassone, V.M.; Baler, R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Progress in Hormone Research*, 52: 307-358.

Klein, D.C.; Ganguly, S.; Coon, S.L.; Shi, Q.; Gaildrat, P.; Morin, F.; Weller, J.L.; Obsil, T.; Hickman, A.; Dyda, F. (2003). 14-3-3 proteins in pineal photoneuroendocrine transduction: how many roles?. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(4): 370-377.

Knobil, E. (1980). The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Progress in Hormone Research*, 36: 53–88.

Knobil, E. (1990). The GnRH pulse generator. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 163(5, parte 2): 1721-1727.

Koch, M.; Mauhin, V.; Stehle, J.H.; Schomerus, C; Korf, H.W. (2003). Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland. *Journal of Neurochemistry*, 85(1): 170-9.

Kochman, K. (2012). Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) structure and its receptor. *Journal of Animal and Feed Science*, 21: 3–30.

Kraichely, D.M.; Sun, J.; Katzenellenbogen, J.A.; Katzenellenbogen, B.S. (2000). Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor- α

and Estrogen receptor- β : correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology*, 141(10): 3534–3545.

Krebs, C.J.; Jarvis, E.D.; Chan, J.; Lydon, J.P.; Ogawa, S.; Pfaff, D.W. (2000). A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 97: 12816–12821.

Krsmanovic, L.Z.; Martinez-Fuentes, A.J.; Arora, K.K.; Mores, N.; Navarro, C.E.; Chen, H.C. Catt, K.J. (1999). Autocrine regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology*, 140: 1423–1431.

Krsmanovic, L.Z.; Mores, N.; Navarro, C.E.; Tomic, M.; Catt, K.J. (2001). Regulation of Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclase in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Molecular Endocrinology*, 15(3): 429–440.

Krsmanovic, L.Z.; Mores, N.; Navarro, C.E.; Arora, K.K.; Catt, K.J. (2003). An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 100(5): 2969–2974.

Kuo, J.; Hamid, N.; Bondar, G.; Prossnitz, E.R.; Micevych, P. (2011). Membrane estrogen receptors stimulate intracellular calcium release and progesterone synthesis in hypothalamic astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 30(39): 12950-12957.

Lammers, H.J.; Lohman, A.H. (1974). Structure and fibers connections of the hypothalamus in mammals. *Progress in Brain Research*, 41: 61-78.

LaPolt, P.S.; Tilly, J.L.; Aihara, T.; Nishimori, K.; Hsueh, A.J.W. (1992). Gonadotropin-induced up- and down-regulation of ovarian follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene expression in immature rats: effects of pregnant mare's serum gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and recombinant FSH. *Endocrinology*, 130: 1289–1295.

Latrich, C.; Schüler, S.; Häring, J.; Skrzypczak, M.; Ortmann, O.; Treeck, O. (2014). Effects of a combined treatment with tamoxifen and estrogen receptor β agonists on human breast cancer cell lines. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289(1): 163-171.

Laudon, M.; Zisapel, N. (1987). Impact of circulating estradiol on melatonin binding sites in

discrete areas of the female rat brain. *Brain Research*, 402: 146-150.

Lechan, R.M.; Toni, R. (2016). Functional anatomy of the hypothalamus and pituitary. En De Groot, L.J.; Chrousos, G.; Dungan, K.; Feingold, K.R.; Grossman, A.; Hershman, J.M.; Koch, C.; Korbonits, M.; McLachlan, R.; New, M.; Purnell, J.; Rebar, R.; Singer, F.; Vinik, A. *Endotext* (Internet). MDText.com, Inc., Massachussets.

[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279126/>] consultado el 4 de octubre de 2017.

Legan, S.J.; Coon, G.A.; Karsch, F.J. (1975). Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinology*, 96(1): 50-56.

Legros, C.; Brasseur, C.; Delagrangé, P.; Ducrot, P.; Nosjean, O.; Boutin, J.A. (2016). Alternative radioligands for investigating the molecular pharmacology of melatonin receptors. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 356(3): 681-692.

Lehman, M.N.; Robinson, J.E.; Karsch, F.J.; Silverman, A.J. (1986). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *Journal of Comparative Neurology*, 244: 19–35.

Leonhardt, S.; Seong, J.Y.; Kim, K.; Thorun, Y.; Wuttke, W.; Jarry, H. (1995). Activation of central GABAA-but not of GABAB-receptors rapidly reduces pituitary LH release and GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 61: 655–662.

Leopardo, N.P.; Jensen, F.; Willis, M.A.; Espinosa, M.B.; Vitullo, A.D. (2011). The developing ovary of the South American plains vizcacha, *Lagostomus maximus* (Mammalia, Rodentia): massive proliferation with no sign of apoptosis-mediated germ cell attrition. *Reproduction*, 141(5): 633-641.

Levoye, A.; Dam, J.; Ayoub, M.A.; Guillaume, J.; Couturier, C.; Delagrangé, P.; Jockers, R. (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *The EMBO Journal*, 25(13): 3012-3023.

Lewczuk, B.; Ziólkowska, N.; Prusik, M.; Przybylska-Gornowicz, B. (2014). Diurnal profiles of melatonin synthesis-related índoles, catecholamines and their metabolites in the duck pineal organ. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 12604-12630.

Llanos, A.C.; Crespo, J.A. (1952). Ecología de la vizcacha (*Lagostomus maximus maximus* Blainv.) en el nordeste de la provincia de Entre Ríos. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, 6(3-4): 289-378.

Lopes, D.A.; Trosko, J.E.; Tai, M-H.; Zuccari, D. (2016). Melatonin decreases estrogen receptor binding to estrogen response elements sites on the OCT4 gene in human breast cancer stem cells. *Genes & Cancer*, 7(5-6): 209-217.

Lovejoy, D.A.; Fischer, W.H.; Ngamvongchon, S.; Craig, A.G.; Nahorniak, C.S.; Peter, R.E.; Rivier, J.E.; Sherwood, N.M. (1992). Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 89: 6373–6377.

Lu, X.; Wu, Y.; Gao, X.H.; Wang, Y.W.; Wang, L.; Su, X.X. (2012). Effect of letrozole on estradiol production and P450 aromatase messenger RNA expression of cultured luteinized granulosa cells from women with and without endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98: 8131–135.

Maeda, K.; Mori, I.; Kano, Y. (1988). Involvement of melatonin in the seasonal changes of the gonadal function and prolactin secretion in female goats. *Reproduction Nutrition Development*, 131: 43-49.

Maeda, K.; Ohkura, S.; Uenoyama, Y.; Wakabayashi, Y.; Oka, Y.; Tsukamura, H.; Okamura, H. (2010). Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Research*, 1364: 103-115.

Malpoux, B.; Daveau, A.; Maurice, F.; Locatelli, A.; Thiéry, J.C. (1994). Evidence that melatonin binding sites in the pars tuberalis do not mediate the photoperiodic actions of melatonin on LH and prolactin secretion in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101: 625-632.

Malpoux, B.; Skinner, D.C.; Maurice, F. (1995) The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release, *Journal of Neuroendocrinology*, 7: 199-206.

Malpoux, B.; Daveau, A.; Maurice-Mandon, F.; Duarte, G.; Chemineau, P. (1998). Evidence that melatonin acts in the pre-mammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology*, 139: 1508-1516.

Malpoux, B.; Migaud, M.; Tricoire, H.; Chemineau, P. (2001). Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4): 336-347.

Manca, M.E.; Manunta, M.L.; Spezzigu, A.; Torres-Rovira, L.; Gonzalez-Bulnes, A.; Pasciu, V.; Leoni, G.G.; Succu, S.; Chesneau, D.; Naitana, S.; Berlinguer, F. (2014). Melatonin deprivation modifies follicular and corpus luteal growth dynamics in a sheep model. *Reproduction*, 147: 885-895.

Mangels, R.A.; Powers, B.J.; Blaustein, J.D. (1998). Effect of photoperiod on neural estrogen and progesterin receptor immunoreactivity in female Syrian hamsters. *Brain Research*, 796: 68-74.

Manjithaya, R.R.; Dighe, R.R. (2006). Regulation of gonadotropins synthesis. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 72(1): 1-12.

Maronde, E.; Pfeffer, M.; Olcese, J.; Molina, C.A.; Schlotter, F.; Dehghani, F.; Korf, H.W.; Stehle J.H. (1999). Transcription factors in neuroendocrine regulation: Rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *Journal of Neuroscience*, 19: 3326-3336.

Martínez-Campa, C.; González, A.; Mediavilla, M.D.; Alonso-González, C.; Alvarez-García, V.; Sánchez-Barceló, E.J.; Cos, S. (2009). Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 101(9): 1613-1619.

Masana, M.I.; Soares Jr.; M.; Dubocovich, M.L. (2005). 17 β -estradiol modulates hMT1 melatonin receptor function. *Neuroendocrinology*, 81(2): 87-95.

Masson-Pévet, M.; Gauer, F.; Schuster, C.; Guerrero, H.Y. (2000). Photic regulation of mt1 melatonin receptors and 2-iodomelatonin binding in the rat and Siberian hamster. *Biological Signals and Receptors*, 9: 188-196.

Maston, G.A.; Ruvolo, M. Chorionic gonadotropin has a recent origin within primates and an evolutionary history of selection. *Molecular Biology and Evolution*, 19(3): 320-335.

Matsuo, H.; Baba, Y.; Nair, N.M.G.; Arimura, A.; Schally, A.V. (1971). Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone: I. The proposed amino acid sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43: 1334-1339.

Matthews, J.; Wihlén, B.; Tujague, M.; Wan, J.; Ström, A.; Gustafsson, J-A. (2006). Estrogen receptor (ER) β modulates ER α -mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Molecular Endocrinology*, 20(3): 534-543.

Maywood, E.S.; Hastings, M.H. (1995). Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology*, 136: 144-153.

McFarland, K.C.; Sprengel, R.; Phillips, H.S.; Köhler, M.; Rosemblyt, N.; Nicolics, K.; Segaloff, D.L.; Seeburg, P.H. (1989). Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G-coupled receptor family. *Science*, 245: 494-499.

McNeely, M.J.; Soules, M.R. (1988). The diagnosis of luteal phase deficiency: a critical review. *Fertility and Sterility*, 50(1): 1-15.

McNeilly, A.S.; Crow, W.J.; Fraser, H.M. (1992). Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion by gonadotrophin-releasing hormone antagonist does not affect episodic progesterone secretion or corpus luteum function in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96: 865–874.

McNulty, S.; Ross, A.W.; Barrett, P.; Hastings, M.H.; Morgan, P.J. (1994). Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *Journal of Neuroendocrinology*, 6(5): 523–532.

Merchenthaler, I.; Gorcs, T.; Setalo, G.; Petrusz, P.; Flerko, B. (1984). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell and Tissue Research*, 237: 15-29.

Messer, L.; Wang, L.; Tuggle, C.; Yerle, M.; Chardon, P.; Pomp, D.; Womack, J.E.; Barendse, W.; Crawford, A.M.; Notter, D.R.; Rothschild, M.F. (1997). Mapping of the melatonin receptor 1a (MTNR1A) gene in pigs, sheep, and cattle. *Mammalian Genome*, 8(5): 368-370.

Millar, R.P.; Lowe, S.; Conklin, D.; Pawson, A.; Maudsley, S.; Troskie, B.; Ott, T.; Millar, M.; Lincoln, G.; Sellar, R.; Faurholm, B.; Scobie, G.; Kuestner, R.; Terasawa, E.; Katz, A. (2001). A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved Type II gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 9636–9641.

Millar, R.P.; Lu, Z.; Pawson, A.J.; Flanagan, C.A.; Morgan, K.; Maudsley, S.R.; Troskie, B.; Ott,

T., Millar, M.; Lincoln, G.; Sellar, R.; Faurholm, B.; Scobie, G.; Kuestner, R.; Terasawa, E.; Katz, A. (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Reviews*, 25: 235–275.

Miller, B.H.; Takahashi, J.S. (2014). Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology*, 4(195): 1-8.

Miyamoto, K.; Hasegawa, Y.; Igarashi, M.; Chino, N.; Sakakibara, S.; Kangawa, K.; Matsuo, H. (1983). Evidence that chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone is [Gln⁸] LHRH. *Life Sciences*, 32: 1341–1347.

Miyamoto, K.; Hasegawa, Y.; Nomura, M.; Igarashi, M.; Kangawa, K.; Matsuo, H. (1984). Identification of the second gonadotropin releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 81: 3874–3878.

Moenter, S.M.; Caraty, A.; Locatelli, A.; Karsch, F.J. (1991). Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a pre-ovulatory GnRH surge. *Endocrinology*, 129: 1175–1182.

Moenter, S.M.; Caraty, A.; Locatelli, A.; Karsch, F.J. (1991). Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a pre-ovulatory GnRH surge. *Endocrinology*, 129: 1175–1182.

Moenter, S.M.; Brand, R.C.; Karsch, F.J. (1992). Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology*, 130: 2978–2984.

Monroe, S.E.; Jaffe, R.B.; Rees Midgley Jr., A. (1972). Regulation of human gonadotropins. XII. Increase in serum gonadotropins in response to estradiol. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 34(2): 342-347.

Morin, L.P. (2013). Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology*, 243: 4-20.

Mullen, M.P.; Cooke, D.J.; Crow, M.A. (2013). Structure and functional roles of FSH and LH as glycoproteins regulating reproduction in mammalian species. En Vizcarra, J. *Gonadotropin*. InTechOpen, Estados Unidos. Primera edición. Capítulo 8: 155-180.

Murphy, B.D. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, 9(3): 223-230.

Naftolin, F.; Ryan, K.J.; Davies, I.J.; Reddy, V.V.; Flores, F.; Petro, Z.; Kuhn, M.; While, R.J.; Takaoka Wolin, L. (1975). The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Progress in Hormone Research*, 31: 295-314.

Naftolin, F.; Ryan, K.J.; Petro, Z. (1977). Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. *Endocrinology*, 90: 295-298.

Naftolin, F.; MacLusky, N.J. (1984). Aromatization hypothesis revisited. En Serio, M. *Differentiation: Basic and Clinical Aspects*. Raven Press, Nueva York. Pp. 79-81.

Naftolin, F. (1994). Brain aromatization of androgens. *Journal of Reproductive Medicine*, 39: 257-261.

Naftolin, F.; Horvath, T.L.; Jakab, R.L.; Leranthy, C.; Harada, N.; Balthazart, J. (1996). Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain. An immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinology*, 63: 149–155.

Nair, A.K.; Kash, J.C.; Peegel, H.; Menon, K.M.J. (2002). Post-transcriptional regulation of luteinizing hormone receptor mRNA in the ovary by a novel mRNA-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(24): 21468-21473.

Nakamura, K.; Minegishi, T.; Takakura, Y.; Miyamoto, K.; Hasegawa, Y.; Ibuki, Y.; Igarashi, M. (1991). Hormonal regulation of gonadotropin receptor mRNA in rat ovary during follicular growth and luteinization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 82: 259–263.

Nakamura, M.; Minegishi, T.; Hasegawa, Y.; Nakamura, K.; Igarashi, S.; Ito, I.; Shinozaki, H.; Miyamoto, K.; Eto, Y.; Ibuki, Y. (1993). Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expressions in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 133(2): 538-544.

Nakamura, Y.; Tamura, H.; Kashida, S.; Takayama, H.; Yagamata, Y.; Karube, A.; Sugino, N.; Kato, H. (2001). Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. *Journal of Pineal Research*, 30: 29-33.

Nett, T.M.; Niswender, G.D. (1982). Influence of exogenous melatonin on seasonality of

reproduction in sheep. *Theriogenology*, 17(6): 645-653.

Nett, T.M.; Crowder, M.E.; Wise, M.E. (1984) The role of estradiol in inducing an ovulatory-like surge of LH in sheep. *Biology of Reproduction*, 30: 1208–1215.

Nett, T.M.; Turzillo, A.M.; Baratta, M.; Rispoli, L.A. (2002). Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 33-42.

Ng, Y.; Wolfe, A.; Novaira, H.J.; Radovick, S. (2009). Estrogen regulation of gene expression in GnRH neurons. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 303(1-2): 25-33.

Ngamvongchon, S.; Lovejoy, D.A.; Fischer, W.H.; Craig, A.G.; Nahorniak, C.S.; Peter, R.E.; Rivier, J.E.; Sherwood, N.M. (1992). Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 3: 7–22.

Niles, L.; Wang, J.; Shen, L.; Lobb, D.; Younglai, E. (1999). Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 156(1-2): 107-110.

Novaira, H.J.; Ng, Y.; Wolfe, A.; Radovick, S. (2009). Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 311(1-2): 126-134.

Nuñez, L.; Faught, W.J.; Frawley, L.S. (1998). Episodic gonadotropin-releasing hormone gene expression revealed by dynamic monitoring of luciferase reporter activity in single, living neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 95: 9648-9653.

Ohkura, S.; Tsukamura, H.; Maeda, K. (1991). Effects of various types of hypothalamic deafferentation on luteinizing hormone pulses in ovariectomized rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 3: 503–508.

Oktay, K.; Briggs, D.; Gosden, R.G. (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82: 3748-3751.

Okubo, K.; Amano, M.; Yoshiura, Y.; Suetake, H.; Aida, K. (2000). A novel form of gonadotropin-

releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 276: 298–303.

Okubo, K.; Sakai, F.; Lau, E.L.; Yoshizaki, G.; Takeuchi, Y.; Naruse, K.; Aida, K.; Nagahama, Y. (2006). Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. Endocrinology, 147: 1076–1084.

Pandi-Perumal, S.R.; Trakht, I.; Srinivasan, V.; Spence, D.W.; Maestroni, G.J.M.; Zisapel, N.; Cardinali, D.P. (2008). Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. Progress In Neurobiology, 85(3): 335-353.

Pasmanik, M.; Callard, G.V. (1988). Changes in brain aromatase and 5-alpha-reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). Endocrinology, 122: 1349–1356.

Pelzer, L.E.; Guzmán, J.A. (1989). Pineal serotonin N-acetyltransferase and hydroxyndole O-methyltransferase activities in vizcacha (*Lagostomus maximus maximus*) maintained under various photoperiods. Acta Physiologica Et Pharmacologica Latinoamericana, 39(3): 299-305.

Perez-Castro, C.; Renner, U.; Haedo, M.R.; Stalla, G.K.; Arzt, E. (2012). Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology, Physiological Reviews, 92(1): 1-38.

Peters, K.E.; Bergfeld, E.G.; Cupp, A.S.; Kojima, F.N.; Mariscal, V.; Sanchez, T.; Wehrman, M.E.; Grotjan, H.E.; Hamernik, D.L.; Kittok, R.J.; Kinder, J.E. (1994). Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. Biology of Reproduction, 51: 1248–1254.

Pielecka-Fortuna, J.; Chu, Z.; Moenter, S.M. (2008). Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. Endocrinology, 149(4): 1979-1986.

Pierce, J.C.; Parsons, T.F. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. Annual Review of Biochemistry, 50: 465-495.

Pintér, O.; Péczely, P.; Zsebok, S.; Zelena, D. (2011). Seasonal changes in courtship behavior, plasma androgen levels and in hypothalamic aromatase immunoreactivity in male free-living European starlings (*Sturnus vulgaris*). General and Comparative Endocrinology, 172: 151-157.

Poirel, V.; Masson-Pévet, M.; Pévét, P.; Gauer, F. (2002). MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Research*, 946(1): 64-71.

Powell, J.F.F.; Zohar, Y.; Elizur, A.; Park, M.; Fischer, W.H.; Craig, A.G.; Rivier, J.E.; Lovejoy, D.A.; Sherwood, N.M. (1994). Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 12081–12085.

Prendergast, B.J.; Kriegsfeld, L.J.; Nelson, R.J. (2001). Photoperiodic polyphenisms in rodents: Neuroendocrine mechanisms, costs, and functions. *The Quarterly Review Of Biology*, 76(3): 293-325.

Prendergast, B.J. (2010). MT1 melatonin receptors mediate somatic, behavioral, and reproductive neuroendocrine responses to photoperiod and melatonin in siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology*, 151(2): 714–721.

Proietto, S. (2017). Estudio de la expresión de prolactina y LH hipofisarias y sus receptores ováricos en relación al ciclo reproductivo de la vizcacha de las llanuras de Sudamérica (*Lagostomus maximus*). Tesina de licenciatura. Universidad Maimónides.

Radovick, S.; Ticknor, C.M.; Nakayama, Y.; Notides, A.C.; Rahman, A.; Weintraub, B.D.; Cutler Jr., G.B.; Wondisford, F.E. (1991). Evidence for direct estrogen regulation of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *Journal of Clinical Investigation*, 88: 1649–1655.

Radovick, S.; Levine, J.E.; Wolfe, A. (2012). Estrogenic regulation of the GnRH neuron. *Frontiers in Endocrinology*, 3(52).

Raju, G.A.R.; Chavan, R.; Deenadayal, M.; Gunasheela, D.; Gutgutia, R.; Haripriya, G.; Govindarajan, M.; Patel, N.H.; Patki, A.S. (2013). Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: a review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6(4): 227-234.

Rasmussen, D.D. (1987). Diurnal modulation of rat hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by melatonin in vitro. *Journal of Endocrinological Investigation*; 16: 1-7.

Rato, A.G.; Pedrero, J.G.; Martínez, M.A.; Del Río, B.; Lazo, P.S.; Ramos S. (1999). Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *The FASEB Journal*, 13(8): 857-

868.

Redford, K.H.; Eisenberg, J.F. (1992). *Mammals of the Neotropics: The Southern cone*. The University of Chicago Press, Estados Unidos. Volumen 2 .

Reed, B.G.; Carr, B.R. (2015). *The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation*. En De Groot, L.J.; Chrousos, G.; Dungan, K.; Feingold, K.R.; Grossman, A.; Hershman, J.M.; Koch, C.; Korbonits, M.; McLachlan, R.; New, M.; Purnell, J.; Rebar, R.; Singer, F.; Vinik, A. *Endotext* (Internet). MDText.com, Inc., Massachussets.

[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/>] consultado el 4 de octubre de 2017.

Reppert, S.M.; Weaver, D.R.; Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 13(5): 1177-1185.

Reppert, S.M.; Weaver, D.R.; Ebisawa, T.; Mahle, C.D.; Kolakowski, L.F. (1996). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Letters*, 386(2-3): 219-224.

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

Richter, H.G.; Torres-Farfán, C.; Rojas-García, P.P.; Campino, C.; Torrealba, F.; Serón-Ferré, M. (2004). The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biological Research*, 37: 11-28.

Roberts, C.M.; Weir, B.J. (1973). Implantation in the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 33(2): 299-307.

Robinson, J.E.; Healey, A.E.; Harris, T.G.; Messent, E.A.; Skinner, D.C.; Taylor, J.A.; Evans, N.P. (2000). The negative feedback action of progesterone on luteinizing hormone release is not associated with changes in GnRH mRNA expression in the ewe. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(2): 121-129.

Roca, A.L.; Godson, C.; Weaver, D.R.; Reppert, S.M. (1996). Structure, characterization and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor [fe de erratas publicada en *Endocrinology* 138:2307, 1997]. *Endocrinology*, 137: 3469–3477.

Roch, G.J.; Busby, E.R.; Sherwood, N.M. (2014). GnRH receptors and peptides: skating

backwards. *General and Comparative Endocrinology*, 209: 118-134.

Romanelli, R.G.; Barni, T. Maggi, M.; Luconi, M.; Failli, P.; Pezzatini, A.; Pelo, E.; Torricelli, F.; Crescioli, C.; Ferruzzi, P.; Salerno, R.; Marini, M.; Rotella, C.M.; Vannelli, G.B. (2004). Expression and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in human olfactory GnRH-secreting neurons: an autocrine GnRH loop underlies neuronal migration. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 117–126.

Romeo, R.D.; Wade, J.; Venier, J.E.; Sisk, C.K. (1999). Androgenic regulation of hypothalamic aromatase activity in prepubertal y postpubertal male golden hamsters. *Endocrinology*, 140: 112-117.

Romera, E.P.; Mohamed, F.H.; Fogal, T.; Domínguez, S.; Piezzi, R.; Scardapane, L. (2010). Effect of the photoperiod and administration of melatonin on the pars tuberalis of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): an ultrastructural study. *Anatomical Record (Hoboken)*, 293(5): 871-878.

Roonnberg, L.; Kauppila, A.; LeppeAluoto, J.; Martikainen, H.; Vakkuri, O. (1990) Circadian and seasonal variation in human pre-ovulatory follicular fluid melatonin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 71: 492-496.

Rosales, G.J.; Busolini, F.I.; Mohamed, F.H.; Filippa, V.P. (2016). Effects of melatonin and gonadal androgens on cell proliferation in the pituitary of viscachas (*Lagostomus maximus maximus*). *Cell Proliferation*, 49(5): 644-653.

Roseboom, P.H.; Coon, S.L.; Baler, R.; McCune, S.K.; Weller, J.L.; Klein, D.C. (1996). Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleotide acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*, 137: 3033-3044.

Rossmannith, W.G.; Reichelt.; C.; Scherbaum, W.A. (1994). Neuroendocrinology of aging in humans: attenuated sensitivity to sex steroid feedback in elderly postmenopausal women. *Neuroendocrinology*, 59: 355–362.

Rowlands, I.W.; Weir, B.J. (1974). Reproductive characteristics of hystricomorph rodents. En Rowlands, I.W.; Weir, B.J. The biology of hystricomorph rodents. *Symposia of the Zoological Society of London*, 34. Academic Press, Londres. Número 34: 265-301.

Roy, D.; Angelini, N.L.; Belsham, D.D. (1999). Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor- α (ER α) and ER β - expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology*, 140: 5045-5053.

Roy, D.; Angelini, N.L.; Fujieda, H.; Brown, G.M.; Belsham, D.D. (2001). Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology*, 142: 4711-4720.

Roy, D.; Belsham, D.D. (2002). Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7 GnRH neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1): 251-258.

Sakaguchi, K.; Itoh, M.T. Takahashi, N.; Tarumi, W.; Ishizuka, B. (2013). The rat oocyte synthesises melatonin. *Reproduction, Fertility and Development*, 25: 674-682.

Sallinen, P.; Saarela, S.; Ilves, M.; Vakkuri, O.; Leppäluoto, J. (2005). The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sciences*, 76(10): 1123-1134.

Sampaio, R.V.; Conceição, D.S.B.; Moysés, S.M.; Sampaio, L.F.S.; Ohashi, O.M. (2012). MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10: 103.

Saunders, P.T.K. (1998). Oestrogen receptor beta (ER β). *Reviews of Reproduction*, 3: 164-171.

Scharfman, H.E.; MacLusky, N.J. (2008). Estrogen-growth factor interactions and their contributions to neurological disorders. *Headache*, 48: S77-S89.

Schmidt, A.R. (2013). Estudio anatómico e histológico del cerebro de la vizcacha de las llanuras de América del Sur (*Lagostomus maximus*) y su comparación con especies evolutivamente afines. Tesina de licenciatura. Universidad Maimónides.

Schomerus, C.; Korf, H.W.; Laedtke, E.; Weller, J.L.; Klein, D.C. (2000). Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *Journal of Neurochemistry*, 75: 2123-2132.

Sealfon, S.C.; Laws, S.C.; Wu, J.C.; Gillo, B.; Miller, W.L. (1990). Hormonal regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors and messenger RNA activity in ovine pituitary

culture. *Molecular Endocrinology*, 4: 1980-1987.

Serafini, G.; Pompili, M.; Girardi, P. (2013). Neuroplasticity as a new approach to the pathophysiology of depression and the role of modern antidepressant drugs. En Brahmachari, G. *Chemistry and Pharmacology of Natural Occurring Bioactive Compounds*. CRC Press, Estados Unidos. Capítulo 16: 421-425.

Serova, L.I.; Harris, H.A.; Maharjan, S.; Sabban, E.L. (2010). Modulation of responses to stress by estradiol benzoate and selective estrogen receptor agonists. *Journal of Endocrinology*, 205(3): 253-262.

Setalo, G.; Vigh, S.; Schally, A.V.; Arimura, A.; Flerko, B. (1976). Immunohistological study of the origin of LHRH-containing nerve fibers of the rat hypothalamus. *Brain Research*, 103: 597-602.

Shaw, N.D.; Histed, S.N.; Yang, S.J.; Lee, H.; Hall, J.E. (2010). Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(4): 1955-1961.

Shen, E.S.; Meade, E.H.; Pérez, M.C.; Deecher, D.C.; Negro-Vilar, A.; López, F.J. (1998). Expression of functional estrogen receptors and galanin messenger ribonucleic acid in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons: estrogenic control of galanin gene expression. *Endocrinology*, 139(3): 939-948.

Sherwood, N.M.; Eiden, L.; Brownstein, M.; Spiess, J.; Rivier, J.; Vale, W. (1983). Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 80: 2794-2798.

Silverman, A.J.; Antunes, J.L.; Ferin, M.; Zimmerman, E.A. (1977). The distribution of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the hypothalamus of the rhesus monkey. Light microscopic studies using immunoperoxidase technique. *Endocrinology*, 101: 134-142.

Silverman, A.J.; Jhamandas, J.; Renaud, L.P. (1987). Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *Journal of Neuroscience*, 7(8): 2312-2319.

Simoneaux, V. (2001). Naughty melatonin: how mothers tick off their fetus. *Endocrinology*, 152(5): 1734-1738.

Simmoneaux, V.; Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews*, 55: 325-395.

Simoni, M.; Gromoll, J.; Nieschlag, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 18(6): 739-773.

Skinner, D.C.; Herbison, A.E. (1997). Effects of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, and β -endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. *Endocrinology*, 138(6): 2585-2595.

Skinner, D.C.; Evans, N.P.; Delaleu, B.; Goodman, R.L.; Bouchard, P.; Caraty, A.; (1998). The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 95: 10978-10983.

Slaugenhaupt, S.A.; Roca, A.L.; Liebert, C.B.; Altherr, M.R.; Gusella, J.F.; Reppert, S.M. (1995). Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics*, 27(2): 355-357.

Smith, J.T.; Clarke, I.J. (2010). Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324, 102-109.

Snell, R. (2007). *Neuroanatomía Clínica*. Editorial Médica Panamericana, Madrid. Sexta edición. Capítulo 13: 413-428.

Soares, J.M. Jr, Masana, M.I.; Ersahin C.; Dubocovich, M.L. (2003). Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 306: 694-702.

Somoza, G.M.; Miranda, L.A.; Strobl-Mazulla, P.; Guilgur, L.G. (2002). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22(5/6): 589-609.

Sonne-Hansen, K.; Lykkesfeldt, A.E. (2005). Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 93: 25-34.

Sower, S.A.; Chiang, Y-C.; Lovas, S.; Conlon, J.M. (1993). Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology*, 132: 1125-1131.

Spratt, D. P.; Herbison, A.E. (1997). Regulation of preoptic area gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) mRNA expression by gonadal steroids in the long-term gonadectomized male rat. *Molecular Brain Research*, 47: 125-133.

Stanic, D.; Dubois, S.; Chua, H.K.; Tonge, B.; Rinehart, N.; Korne, M.K.; Boon, W.C. (2014). Characterization of aromatase expression in the adult male and female mouse brain. I. Coexistence with oestrogen receptors α and β , and androgen receptors. *PLOS ONE*, 9(3): e90451.

Stehle, J.H.; Von Gall, C.; Schomerus, C.; Korf, H.W. (2001). Of rodents and ungulates and melatonin: Creating an uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4): 312-325.

Stouffer, R.; Hennebold, J.D. (2014). Structure, function and regulation of the corpus luteum. En Plant, T. M.; Zeleznik, A.J. *Knobil & Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press, Estados Unidos. Octava edición. Capítulo 23, volumen 1: 1023-1073.

Strauss, J.F.; Barbieri, R.L. (2009). *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*. Saunders Elsevier, Filadelfia. Sexta edición. Capítulo 1: 3-33

Strobl, F.J.; Levine, J.E. (1988). Estrogen inhibits luteinizing hormone (LH), but not follicle-stimulating hormone secretion in hypophysectomized pituitary-grafted rats receiving pulsatile LH-releasing hormone infusions. *Endocrinology*, 123(1): 622-630.

Tamura, H.; Nakamura, Y.; Terron, M.P.; Flores, L.J.; Manchester, L.C.; Tan, D.X.; Sugino, N.; Reiter, R.J. (2008). Melatonin and pregnancy in the human. *Reproductive Toxicology*, 25: 291-303.

Tanavde, V.S.; Maitra, A. (2003). In vitro modulation of steroidogenesis and gene expression by melatonin: a study with porcine antral follicles. *Endocrine Research*, 29(4): 399-410.

Tang, P.; Chan, T.; Tang, G.; Pang, S. (1998). Plasma melatonin profile and hormonal interactions in the menstrual cycles of anovulatory infertile women treated with gonadotropins. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 45: 247-252.

Terasawa, E. (1998). Cellular mechanism of pulsatile LHRH release. *General and Comparative Endocrinology*, 112: 283-295.

Terasawa, E.; Noel, S.D.; Keen, K.L. (2009). Rapid action of oestrogen in luteinizing hormone-releasing hormone neurons: the role of GPR30. *Journal of Neuroendocrinology*, 21: 316-321.

Terasawa, E.; Kenealy, B.P. (2012). Neuroestrogen, rapid action of estradiol, and GnRH neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(4): 364-375.

Thompson, I.R.; Kaiser, U.B. (2014) GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 385(1-2): 28-35.

Tian, X.Z.; Wen, Q.; Shi, J.M.; Liang-Wang; Zeng, S.M.; Tian, J.H.; Zhou, G.B.; Zhu, S.E.; Liu, G.S. (2010). Effects of melatonin on in vitro development of mouse two-cell embryos cultured in HTF medium. *Endocrine Research*, 35(1): 17-23.

Toranzo, D.; Dupont, E.; Simard, J.; Labrie, C.; Couet, J.; Labrie, F.; Pelletier, G. (1989). Regulation of pro-gonadotropin-releasing hormone gene expression by sex steroids in the brain of male and female rats. *Molecular Endocrinology*, 3: 1748-1756.

Tsai, P.S.; Zhang, L. (2008). The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. *Biology of Reproduction*, 79: 798–805.

Tsutsumi, R.; Webster, N.J.G. (2009). GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrine Journal*, 59(6): 729-737.

Turi, A.; Garzetti, G.G. (1993). The pattern of melatonin in amenorrhic women affected by sterility. *Acta Europaea Fertilitatis*, 24: 71-74.

Turzillo, A.M.; Clapper, J.A.; Moss, G.E.; Nett, T.M. (1998). Regulation of ovine GnRH receptor gene expression by progesterone and oestradiol. *Journal of Reproduction and Fertility*, 113: 251-256.

Van der Beek, E.M.; Horvath, T.L.; Wiegant, V.M.; Van den Hurk, R.; Buijs, R.M. (1997). Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *Journal of Comparative Neurology*, 384: 569-579.

Vanecek, J.; Pavlík, A.; Illnerová, H. (1987). Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Research*, 435: 359-362.

Vasantha, I. (2016). Physiology of seasonal breeding: a review. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 7(3).

Vazquez-Martinez, R.; Shorte, S.L.; Faught, W.J.; Leamont, D.C.; Frawley, L.S.; Boockfor, F.R. (2001). Pulsatile exocytosis is functionally associated with GnRH gene expression in immortalized GnRH-expressing cells. *Endocrinology*, 142(12): 5364-5370.

Vazquez-Martinez, R.; Leclerc, G.M.; Wierman, M.E.; Boockfor, F.R. (2002). Episodic activation of the rat GnRH promoter: role of the homeoprotein oct-1. *Molecular Endocrinology*, 16: 2093-2100.

Waly, N.E.; Hallworth, R. (2015). Circadian pattern of melatonin MT1 and MT2 receptor localization in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal Of Circadian Rhythms*, 13(1).

Wang, Y.; Newton, D.C.; Robb, G.B.; Kau, C.L.; Miller, T.L.; Cheung, A.H.; Hall, A.V.; VanDamme, S.; Wilcox, J.N.; Marsden, P.A. (1999). RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 96: 12150-12155.

Weaver, D.R.; Liu, C.; Reppert, S.M. (1996). Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Molecular Endocrinology*, 10(11): 1478-1487.

Webley, G.E.; Luck, M.R. (1986). Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78: 711-717.

Wehr, T.A. (1991). The durations of human melatonin secretion and sleep respond to changes by the daylength (photoperiod). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73(6): 1276-1280.

Wei, L.L.; Gonzalez-Aller, C.; Wood, W.M.; Miller, L.A.; Horwitz, K.B. (1990). 5'-heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Molecular Endocrinology*, 4: 1833-1840.

Wei, L.L.; Hawkins, P.; Baker, C.; Norris, B.; Sheridan, P.L.; Quinn, P.G. (1996). An amino-

terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Molecular Endocrinology*, 10: 1379-1387.

Weir, B.J. (1970). The management and breeding of some more hystricomorph rodents. *Laboratory Animals*, 4: 83-97.

Weir, B.J. (1971a). The reproductive organs of the female plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 25(3): 365-373.

Weir, B.J. (1971b). The reproductive physiology of the plains viscacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 25(3): 355-363.

Welsh, D.K.; Takahashi, J.S.; Kay, S.A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual Review of Physiology*, 72: 551-577.

Wetsel, W.C., y Srinivasan, S. (2002). Pro-GnRH processing. *Progress in Brain Research*, 141: 221-241.

White, S. A.; Kasten, T. L.; Bond, C. T.; Adelman, J. P.; Fernald, R. D. (1995). Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 8363-8367.

Wildt, L.; Hutchison, J.S.; Marshall, G.; Pohl, C.R.; Knobil, E. (1981). On the site of action of progesterone in the blockade of the estradiol-induced gonadotropin discharge in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 109(4): 1293-1294.

Witt-Enderby, P.A.; Masana, M.I.; Dubocovich, M.L. (1998). Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology*, 139(7): 3064-3071.

Witt-Enderby, P.A.; Jarzynka, M.J.; Melan, M.A. (2001). Microtubules modulate melatonin receptor function. *Neuroscience Abstracts*, 27: 142.

Witt-Enderby, P.A.; Bennett, J.; Jarzynka, M.J.; Firestine, S.; Melan, M.A. (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sciences*, 72: 2183-2198.

Wolfe, A. M.; Wray, S.; Westphal, H.; Radovick, S. (1996). Cell-specific expression of the human gonadotropin-releasing hormone gene in transgenic animals. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 20018-20023.

Woller, M.; Nichols, E.; Herdendorf, T.; Tutton, D. (1998). Release of luteinizing hormone-releasing hormone from enzymatically dispersed rat hypothalamic explants is pulsatile. *Biology of Reproduction*, 59(3): 587-590.

Wray, S.; Zoeller, R.T.; Gainer, H. (1989). Differential effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in slice explant cultures prepared from specific rat forebrain regions. *Molecular Endocrinology*, 3: 1197-1206.

Wray, S. (2001). Development of luteinizing hormone releasing hormone neurones. *Journal of Neuroendocrinology*, 13: 3-11.

Wu, J.C.; Sealfon, S.C.; Miller, W.L. (1994). Gonadal hormones and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) alter messenger ribonucleic acid levels for GnRH receptors in sheep. *Endocrinology*, 134: 1846-1850.

Yamamoto, M.; Shima, K.; Nakano, R. (1992). Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Hormone Research in Paediatrics*, 37(Supl. 1): 5-11.

Yin, P.; Kawashima, K.; Arita, J. (2002). Direct actions of estradiol on the anterior pituitary gland are required for hypothalamus-dependent lactotrope proliferation and secretory surges of luteinizing hormone but not of prolactin in female rats. *Neuroendocrinology*, 75: 392-401.

Yoo, M.S.; Kang, H.M.; Choi, H.S.; Kim, J.W.; Troskie, B.E.; Millar, R.P.; Kwon, H.B. (2000). Molecular cloning, distribution and pharmacological characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone ([Trp8] GnRH) in frog brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 164(1-2): 197-204.

Zelevnik, A.J.; Schuler, H.M.; Reichert, L.E. Jr. (1981). Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology*, 109: 356-362.

Zelevnik, A.J. (2004). The physiology of follicle selection. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2: 31-38.

Zhang, L.; Zhang, Z.; Wang, F.; Tian, X.; Ji, P.; Liu, G. (2017). Effects of melatonin administration on embryo implantation and offspring growth in mice under different schedules of photoperiodic exposure. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15: 78-87.

Zhu, Y.; Rice, C.D.; Pang, Y.; Pace, M.; Thomas, P. (2003). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 100: 2231-2236.

Zilberman-Peled, B.; Bransburg-Zabary, S.; Klein, D.C.; Gothilf, Y. (2011). Molecular evolution of multiple arylalkylamine-N-acetyltransferase (AANAT) in fish. *Marine Drugs*, 9: 906-921.

Zisapel, N.; Shaharabani, M.; Laudon, M. (1987). Regulation of melatonin's activity in the female rat brain by estradiol: effects on neurotransmitter release and on iodomelatonin binding sites. *Neuroendocrinology*, 40: 207-216.

Zoeller, R. T.; Young, W.S. III (1988). Changes in cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding gonadotropin releasing hormone in the anterior hypothalamus of female rats during the estrous cycle. *Endocrinology*, 123: 1688-1689.

ANEXO

10

TABLA 7. SECUENCIA Y HOMOLOGÍA DE LOS AMPLICONES DE PCR

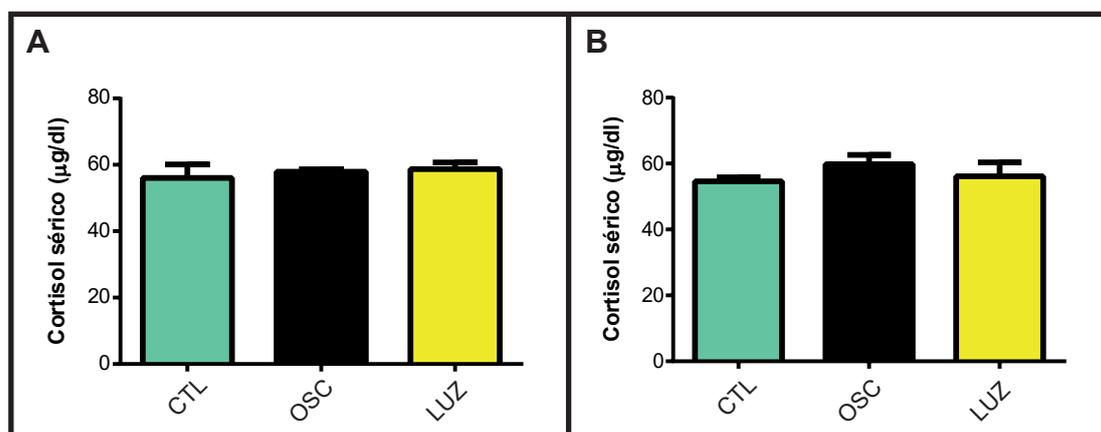
| BLANCO | SECUENCIA DEL AMPLICÓN (5'-3') | HOMOLOGÍA DEL AMPLICÓN | |
|-----------------------|---|---|---|
| AANAT | <p><i>PCR no cuantitativa:</i> TGTTTTNTCTGCGGCGCCACACA CTCCCTGCCAGTGAAATTCCTC CCTTTCCCGCGAGGATCAGTCAG TGTGTTGAGATCGAGCGGGAAG <u>CCTTTATCTCTGTCTCGGGCATCT</u> GCCCCCTGTACCTGGATGAGATC CGGCACTTCCTGTNGNTCC</p> <p><i>PCR cuantitativa:</i> GATCGAGCGGGAAGCCTTTATCT CTGTCTCGGGCATCTGCCCCCTG TACCTGGATGAGATCCGGCACTT CCTG</p> | Chinchilla: 99% Cobayo: 96% Humano: 93% Degú: 93% | Ratón: 90% Rata topo desnuda: 89% Rata: 89% |
| MT₁ | TGACTTCAGGAACCTTTGTCACCAT GTTTGTGGTTTTTGTACTTTTTGC CATTGCTGGGCTCCTCTAAACTT GCATCGGCCTCATTGTAGCCTCA GACCCTGCCAACATGGTGCCCAG GATCCCAGAATGGCTTCTTTGCC CTTA | Chinchilla: 97% Rata topo desnuda: 94% Degú: 94% Cobayo: 93% | Humano: 89% Ratón: 89% Rata: 83% |
| MT₂ | <p><i>PCR no cuantitativa:</i> ACGATATGCGCAGATGCAGTTGC TGGGCCCCCTCAACTGCATTGG CCTTATTGTTTGGGTCATAAACCA GAACAATGGCTCCCCAGATCCCA GAGGGGCTCTTTGTCACTAGCTA <u>CTTCCTTGCTTATTTCAATAGCTG</u> <u>CCTTAATGCTATTATCTATGGGCT</u> <u>CCTGAACCAGAACTTCCGCAGG</u> GAGTACAAGAGGATCA</p> <p><i>PCR cuantitativa:</i> GGCTCTTTGTCACTAGCTACTTCC TTGCTTATTTCAATAGCTGCCTTAA TGCTATTATCTATGGGCTCCTGAA CCAGAACTTC</p> | Chinchilla: 100% Cobayo: 95% Rata topo desnuda: 93% Degú: 91% | Humano: 89% Rata: 89% Ratón: 88% |
| GAPDH | CCAGAACATCATCCCTGCATCCA CCGGTGCTGCCAAGGCTGNTGG GCAAGGTCATCCCAGAGCTGAAC | Rata: 97% Ratón: 97% Degú: 96% Cobayo: 96% | Chinchilla: 93% Rata topo desnuda: 91% Humano: 91% |

Secuencia nucleotídica de los amplicones de AANAT, MT₁, MT₂ y GAPDH obtenidos por PCR no cuantitativa y cuantitativa. En las secuencias de PCR no cuantitativa se muestra subrayada la localización de los *primers* diseñados para PCR cuantitativa. Se indica la homología (%) del amplicón de PCR cuantitativa respecto de la misma secuencia de rata, ratón, degú, cobayo, chinchilla, rata topo desnuda y humano. N: base indeterminada.

TABLA 8. REACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS

| ANTICUERPO | ESPECIES EN LAS QUE SE DETECTÓ REACTIVIDAD |
|------------|---|
| MAB5456 | Rata, ratón, hamster, oveja, mono |
| PA1-760 | Rata |
| ab87639 | Humano |
| ab192662 | Humano |
| sc-7207 | Rata, ratón, humano, equinos, caninos, bovinos, porcinos |
| ab3577 | Rata, ratón, hamster, humano, oveja, cerdo, vaca, primates no humanos, babuino |
| sc-25828 | Rata, ratón, humano |
| sc-5286 | Rata, ratón, humano, caninos, bovinos, porcinos |
| A5441 | Rata, ratón, humano, bovinos, oveja, conejo, gato, perro, cobayo, gallina, carpa, sanguijuela |

MAB5456: anticuerpo contra GnRH. PA1-760: anticuerpo contra AANAT. ab87639: anticuerpo contra MT1. ab192662: anticuerpo contra MT2. sc-7207: anticuerpo contra RE α . ab3577: anticuerpo contra RE β . sc-25828: anticuerpo contra RLH. sc-5286: anticuerpo contra α -tubulina. A5441: anticuerpo contra β -actina. La información mostrada corresponde a la provista por el fabricante en la hoja de datos.

FIGURA 37. NIVELES SÉRICOS DE CORTISOL EN VIZCACHAS NPNO Y NPi EXPUESTAS A DIFERENTES RÉGIMENES LUMÍNICOS.

Niveles séricos de cortisol ($\mu\text{g/dl}$) en hembras de vizcacha NPNO (A) y NPi (B) expuestas a luz continua (LUZ), oscuridad continua (OSC) o 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad (CTL). La concentración de cortisol se estimó mediante ELISA. NPNO: vizcachas no preñadas no ovulando. NPi: vizcachas no preñadas con inducción de la ovulación. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).