



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Participación del sistema endocannabinoide hipotalámico como modulador del eje hipotálamo hipofisario gonadal durante un desafío inmunológico en ratas macho**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Lic. Pablo Nicolás Surkin**

Director de tesis: Dr. Javier Fernández-Solari

Directora Asistente: Dra. Andrea De Laurentiis

Consejero de Estudios: Dr. Matías Pandolfi

Lugar de trabajo: Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires y Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2019

Trabajos publicados relacionados con la presente tesis:

- Surkin PN, Brenhouse H, Deak T, Liberman AC, Lasaga M. Stress, alcohol and infection during early development: A brief review of common outcomes and mechanisms. *J Neuroendocrinol* 30(10):e12602, 2018.
- Surkin PN, Gallino SL, Luce V, Correa F, Fernandez-Solari J, De Laurentiis A. Pharmacological augmentation of endocannabinoid signaling reduces the neuroendocrine response to stress. *Psychoneuroendocrinology* 87:131-140, 2018.
- Surkin PN, Di Rosso ME, Correa F, Elverdin JC, Genaro AM, De Laurentiis A, Fernández-Solari J. Participation of hypothalamic CB1 receptors in reproductive axis disruption during immune challenge. *J Neuroendocrinol* 29(8). doi: 10.1111/jne.12499, 2017.

*A Carlitos*

## Participación del sistema endocannabinoide hipotalámico como modulador del eje hipotálamo hipofisario gonadal durante un desafío inmunológico en ratas macho

### Resumen

Se ha demostrado que un desafío inmunológico puede alterar la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y que el sistema endocannabinoide modula la producción de hormonas reproductivas. Sin embargo, se desconoce la participación del sistema endocannabinoide como mediador entre el desafío inmunológico y sus efectos sobre el eje reproductivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de los receptores cannabinoideos hipotalámicos en el control de la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-testicular en un modelo de desafío inmunológico agudo inducido con lipopolisacárido bacteriano (LPS) en ratas macho.

Se observó que el bloqueo farmacológico del receptor CB1 hipotalámico exacerba los efectos inflamatorios inducidos por LPS luego de 3 horas, aunque previenen algunos de los efectos disruptivos de la endotoxina sobre la producción de parámetros hormonales y neurohormonales del eje reproductivo. Por otro lado, si bien el antagonista del receptor TRPV1 hipotalámico no modifica la respuesta inflamatoria hipotalámica ni la disrupción hormonal sexual inducidas por el LPS, el bloqueo de estos receptores por sí mismo induce efectos proinflamatorios e inhibitorios de la producción de hormonas reproductivas. El mismo patrón neuroinmunoendocrino es observado luego del bloqueo farmacológico de los receptores CB2 hipotalámicos.

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que ciertos componentes del sistema endocannabinoide hipotalámico participan en la comunicación establecida entre el sistema inmune y el eje hipotálamo hipofisario testicular cuando se activa la respuesta inflamatoria aguda frente a un desafío inmunológico. Particularmente, los receptores CB1 hipotalámicos mediarían los efectos inhibitorios que produce la respuesta inflamatoria aguda sobre la liberación de neurotransmisores y hormonas del eje reproductivo. Asimismo, los receptores TRPV1 y CB2 participarían en la homeostasis de los sistemas inmunológico y reproductivo.

## *RESUMEN*

Palabras claves: sistema endocannabinoide, CB1 hipotalámico, CB2 hipotalámico, TRPV1 hipotalámico, desafío inmunológico, LPS, eje reproductivo, hormona liberadora de gonadotrofinas, hormona luteinizante, testosterona.

# Participation of the hypothalamic endocannabinoid system as a modulator of the hypothalamic hypophyseal gonadal axis during an immune challenge in male rats

## Summary

It is well known that an immune challenge alters the reproductive axis function, and that the endocannabinoid system modulates the production of reproductive hormones. However, it remains elusive whether the endocannabinoid system mediates the inhibitory effects of an immune challenge on sexual hormone production. The aim of the present study was to evaluate in male rats the participation of the hypothalamic cannabinoid receptors by a pharmacological blockade, on the activity of the hypothalamic-hypophyseal-testicular axis during an immune challenge.

Our results show that pharmacological blockade of the hypothalamic CB1 receptor exacerbates the inflammatory effects induced by LPS after 3 hours but prevents some of the disruptive effects on the production of hormonal and neurohormonal reproductive parameters. Furthermore, pharmacological blockade of the hypothalamic TRPV1 modifies neither the inflammatory effects induced by LPS in the hypothalamus nor the disruptive effects on the production of sexual hormones. Moreover, hypothalamic TRPV1 blockade by itself induces pro-inflammatory effects and inhibits reproductive hormone production. A similar pattern is observed by pharmacological blockade of the hypothalamic CB2 receptor.

Altogether, these results suggest that the endocannabinoid system in male rats participates in the communication between the immunological system and the reproductive axis during an immune challenge in physiological conditions. Particularly, hypothalamic CB1 receptors participate in the inhibitory effects of the reproductive axis during an immune challenge, whereas the hypothalamic TRPV1 and CB2 receptors maintain inflammatory and reproductive parameters in a steady state during basal conditions.

*ABSTRACT*

Keywords: endocannabinoid system, hypothalamic CB1, hypothalamic CB2, hypothalamic TRPV1, immune challenge, LPS, reproductive axis, gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone, testosterone.

## *AGRADECIMIENTOS*

### Agradecimientos

Al Dr. Javier Fernández-Solari, mi 3er padre, quien me recibió a los 23 años con la misma calidez y cariño que transmite a día de hoy. Por acompañarme en este viaje de aprendizaje con paciencia y afecto, por enseñarme a ser una persona independiente y a soñar que siempre se puede. Por el abrazo a los gritos que nos dimos llorando el día que nos salió la aceptación de la reconsideración de la beca.

A la Dra. Andrea De Laurentiis, por recibirme siempre con los brazos abiertos, a quien también le debo mucho de lo que aprendí en lo académico y lo personal. Por acompañarme siempre con paciencia en cada experimento, por el día que nos quedamos hasta altas horas de la noche tratando de marcar hormonas para el RIA, por alentarme siempre a buscar salir del molde. Por velar junto a Javi por mi futuro académico y profesional. Por el afecto.

A Julia Astrauskas y a Ezequiel Ríos, dos pilares incondicionales para el desarrollo de mi tesis, con quienes estaré eternamente agradecido. Por aguantarme el día de los experimentos, por ayudarme cuando las cosas no salían, por sacarme una sonrisa cuando el estrés me desbordaba, por la compañía.

A mis compañeros de laboratorio, César, Noe, Gastón, Flor, Ganna y Agus. Por los momentos compartidos, por las charlas, los chistes, los almuerzos y las cenas. Por hacerme sentir el privilegio de querer ir a trabajar.

Al Dr. Juan Carlos Elverdin, quien hace 5 años me propuso apostar por esta hermosa locura de realizar un doctorado en biología en FOUBA. Por apostar siempre por la ciencia, por la rebeldía de alentar a la investigación en un país que apuesta por la fuga de cerebros y el vaciamiento científico, por proteger a los becarios de un sistema que nos vulnera cada día más. Por velar por el bienestar académico de la cátedra.

A la Cátedra de Fisiología y su personal docente y no docente, quienes me hicieron sentir parte de la casa y me trataron con mucho cariño y respeto.

Al Dr. Fernando Correa, una gran persona, un gran profesional y un gran consejero que me ayudó en los momentos de duda. Por alentarme siempre a apostar a más. Al CEFYBO



## *AGRADECIMIENTOS*

y a su personal que me recibieron con las puertas abiertas, a la Dra. Eva Wertheimer por la ayuda y los consejos, a Juli y Ángela por las charlas y la compañía.

A la Dra. Ana Genaro y la Dra. Emilia Di Rosso por permitirme conocer su hermoso grupo de trabajo y por la ayuda con las PCR, siempre con paciencia y cariño.

A la Universidad de Buenos Aires por aportarme la formación intelectual necesaria y subsidios para poder realizar este trabajo.

Al CONICET por otorgarme la beca y subsidios que me permitieron realizar esta tesis.

Al Dr. Alexander S. Kauffman, quien me permitió realizar una pasantía en su laboratorio con mucha cordialidad y le dio un salto de calidad al trabajo que venimos realizando. A la fundación Wood-Whelan que financió el proyecto.

A los amigos de la facu: Nahue, Maga, y Majo. Por las noches de catarsis, por la compañía, la risa, la comprensión y el cariño.

A mis amigos de la infancia: Mica, Emi, Gime, Geri, Her, Flor, Eze, Male, Mati, Budy, Maña, Fede. Por tenernos para recordarnos quienes somos, por ser tan distintos y tan iguales. A sus parejas y sus hijos por hacernos felices.

A la Dra. Verónica Vega, por enseñarme a convivir con esta afección llamada “millennial”.

A Meli por darme tanto amor, por apoyarme y acompañarme en los proyectos, por estar conmigo en las buenas y en las malas. Te amo. Gracias también a toda la familia hermosa de la cual me hiciste parte.

A mis viejos, Silvana y Jorge. Por bancarme en todas siempre, por estar siempre a mi lado, por acompañarme en mis proyectos incondicionalmente, por el amor. A Anto y a Carlitos por quererme como a un hijo más. A Carlitos por el día en que le rayé el auto y me enseñó a tomar una pausa y mirar atrás antes de ir para adelante, estando adentro o afuera de un auto. A mi hermana Nadia, mi compañera incondicional, por el amor mutuo. A mis hermanas Cintia y Sonia, a mis hermanos Martín y Javier por los momentos vividos.

## ABREVIATURAS

### Abreviaturas

<b>2-AG</b> , 2-araquidonilglicerol	<b>GnRHn</b> , neurona liberadora de la hormona liberadora de gonadotrofinas
<b>ACTH</b> , adrenocorticotropina	<b>GnRHR</b> , receptor de la hormona liberadora de gonadotrofinas
<b>ADN</b> , ácido desoxirribonucleico	<b>GPCRs</b> , receptor acoplado a proteína G
<b>ADNc</b> , ácido desoxirribonucleico complementario	<b>HPA</b> , eje hipotálamo hipofisario adrenal
<b>AEA</b> , anandamida	<b>HPG</b> , eje hipotálamo hipofisario gonadal
<b>AH</b> , adenohipófisis	<b>HPT</b> , eje hipotálamo hipofisario testicular
<b>AM251</b> , antagonista del receptor CB1	<b>Icv</b> , intracerebroventricular
<b>AM630</b> , antagonista del receptor CB2	<b>IL-1<math>\beta</math></b> , interleukina 1 beta
<b>AMPAr</b> , receptor de glutamato no NMDAr	<b>Il1<math>\beta</math></b> , ARNm codificante para interleukina 1 beta
<b>ANOVA</b> , análisis de la varianza	<b>Ip</b> , intraperitoneal
<b>AR</b> , receptor de andrógenos	<b>HIS</b> , hibridación <i>in situ</i>
<b>ARN</b> , ácido ribonucleico	<b>KissI</b> , ARNm codificante para kisspeptina
<b>ARNc</b> , ácido ribonucleico complementario	<b>LH</b> , hormona luteinizante
<b>ARNm</b> , ácido ribonucleico mensajero	<b>LHCGR</b> , receptor de LH
<b>ARNt</b> , ácido ribonucleico de transferencia	<b>LOX</b> , lipoxigenasa
<b>AVP</b> , arginina vasopresina	<b>LPS</b> , lipopolisacárido
<b>AVPV</b> , área antero ventro periventricular	<b>MAGL</b> , monoacilglicerol lipasa
<b>BHE</b> , barrera hematoencefálica	<b>NA</b> , noradrenalina
<b>CB1</b> , receptor de cannabinoides tipo 1	<b>NADA</b> , N-araquidonil dopamina
<b>CB2</b> , receptor de cannabinoides tipo 2	<b>NKB</b> , neurokinina B
<b>COX-2</b> , ciclooxigenasa-2	<b>NMDAr</b> , receptor de glutamato no AMPAr
<b>CPZ</b> , capsazepina-antagonista del receptor TRPV1	<b>NO</b> , óxido nítrico
<b>CRF</b> , hormona liberadora de corticotropina	<b>NOS</b> , óxido nítrico sintasa
<b>DAG</b> , diacilglicerol	<b>ObR</b> , receptor de leptina
<b>DIG</b> , digoxigenina	<b>PAMP</b> , patrones moleculares asociados a patógenos
<b>DMN</b> , núcleo dorsomedial del hipotálamo	<b>PCR</b> , reacción en cadena de la polimerasa
<b>eCB</b> , endocannabinoide	<b>PEA</b> , palmitoiletanolamida
<b>ELISA</b> , ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	<b>PPAR</b> , proliferadores de peroxisomas
<b>EM</b> , eminencia media	<b>PRR</b> , receptores de reconocimiento de patrones
<b>ES</b> , error estándar	<b>RFRP</b> , péptido relacionado a las RF amidas
<b>FAAH</b> , amida hidrolasa de ácidos grasos	<b>Rfrp3</b> , ARNm codificante para el péptido relacionado a las RF amida tipo 3
<b>FSH</b> , hormona folículo estimulante	<b>RIA</b> , radioinmunoensayo
<b>GABA</b> , ácido $\gamma$ -aminobutírico	<b>ROS</b> , especies reactivas del oxígeno
<b>GnRH</b> , hormona liberadora de gonadotrofinas	<b>SEC</b> , sistema endocannabinoide
<b>Gnrh</b> , ARNm codificante para la hormona liberadora de gonadotrofinas	

## ABREVIATURAS

**SNC**, sistema nervioso central  
**TLR**, receptores tipo Toll  
**TNF $\alpha$** , factor de necrosis tumoral alfa  
**Tnfa**, ARNm codificante para el factor de necrosis tumoral alfa

**TRPV1**, canal de potencial transitorio vanilloide tipo 1  
**VMN**, núcleo ventromedial del hipotálamo  
 **$\Delta^9$ THC**,  $\Delta^9$ -Tetrahidrocannabinol

Índice

1.	Introducción.....	2
1.1.	El sistema hipotálamo hipofisario testicular.....	2
1.1.1.	Papel del hipotálamo en el eje reproductivo.....	2
1.1.1.1.	Vías neuronales moduladoras de la liberación de GnRH.....	6
1.1.1.1.1.	GABA .....	6
1.1.1.1.2.	Glutamato.....	7
1.1.1.1.3.	Taquiquininas, Noradrenalina, Óxido nítrico, $\beta$ -endorfina.....	7
1.1.1.1.4.	RFRP-3 .....	8
1.1.1.1.5.	Kisspeptina.....	8
1.1.1.1.6.	Señalización molecular por células gliales .....	9
1.1.1.2.	Hormonas metabólicas que controlan la actividad de GnRHn .....	10
1.1.2.	Papel de la hipófisis en el eje reproductivo .....	10
1.1.2.1.	Los gonadotropos .....	13
1.1.3.	El Testículo.....	14
1.2.	Inflamación.....	16
1.2.1.	Neuroinflamación .....	16
1.2.2.	Efectos de un desafío inmunológico sobre el eje HPT .....	17
1.3.	Sistema endocannabinoide .....	19
1.3.1.	Endocannabinoides .....	20
1.3.2.	Receptores de Cannabinoides .....	21
1.3.2.1.	Receptores clásicos: CB1 y CB2.....	21
1.3.2.2.	TRPV1.....	23
1.3.2.3.	Otros receptores.....	25
1.3.3.	Biosíntesis y metabolismo de los eCBs.....	26
1.3.4.	Características farmacológicas de los eCBs .....	27
1.3.5.	SEC e inflamación .....	28
1.3.6.	Relación entre el SEC y el eje HPT.....	30
1.4.	Relación entre la inflamación, el SEC y el eje HPT.....	31
2.	Hipótesis y Objetivos .....	34
2.1.	Hipótesis .....	34
2.2.	Objetivo general .....	34
2.3.	Objetivos específicos.....	34
3.	Materiales y Métodos .....	37
3.1.	Animales.....	37
3.2.	Drogas.....	37
3.3.	Diseño experimental.....	38
3.4.	Determinación de $TNF\alpha$ .....	39
3.5.	Real-time PCR.....	40
3.6.	Determinación de LH por radioinmunoensayo .....	42
3.6.1.	Marcación de LH .....	42
3.6.2.	Metodología del RIA de LH.....	42
3.7.	Determinación de GnRH por RIA .....	43
3.7.1.	Marcación de la hormona .....	43
3.7.2.	Metodología del RIA de GnRH.....	43
3.8.	Determinación de Testosterona por ELISA .....	44
3.9.	Hibridación <i>in situ</i> de CB1 .....	44
3.10.	Evaluación estadística de los resultados.....	46
4.	Resultados.....	48

## ÍNDICE

4.1.	Parámetros neuroinmunoendocrinos en el modelo de desafío inmunológico	48
4.2.	Participación del receptor hipotalámico CB1	52
4.2.1.	Participación del receptor CB1 hipotalámico en la expresión de citoquinas en el modelo de desafío inmunológico.	52
4.2.2.	Participación del receptor CB1 hipotalámico sobre parámetros del eje reproductivo en el modelo de desafío inmunológico	53
4.3.	Participación del receptor TRPV1 hipotalámico	60
4.3.1.	Participación del receptor TRPV1 hipotalámico en la expresión de citoquinas en el modelo de desafío inmunológico	60
4.3.2.	Participación del receptor TRPV1 hipotalámico sobre parámetros del eje reproductivo en el modelo de desafío inmunológico	61
4.4.	Participación del receptor hipotalámico CB2	63
4.4.1.	Participación del receptor CB2 hipotalámico en la expresión de citoquinas en el modelo de desafío inmunológico	63
4.4.2.	Participación del receptor CB2 hipotalámico sobre parámetros del eje reproductivo en el modelo de desafío inmunológico	65
5.	Discusión	69
5.1.	El eje HPT durante el desafío inmunológico	69
5.2.	SEC y citoquinas proinflamatorias.	71
5.3.	Inhibición del HPT mediada por el SEC.	74
6.	Conclusión	85
7.	Referencias bibliográficas	87

# **1. INTRODUCCIÓN**

### 1. Introducción

#### 1.1. El sistema hipotálamo hipofisario testicular

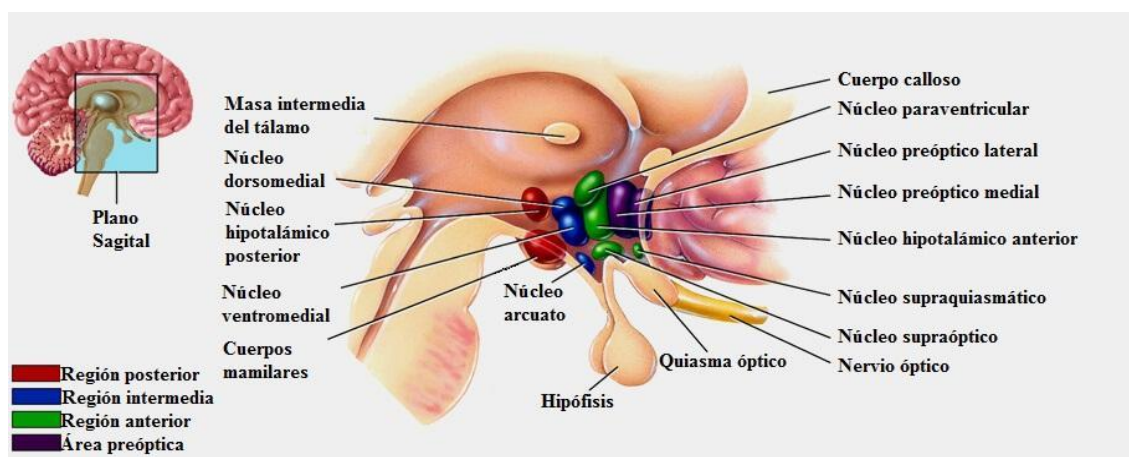
En los mamíferos, la adquisición de caracteres sexuales secundarios, la función reproductiva y el envejecimiento se encuentran regulados por la actividad del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (HPG). Este eje está conformado por órganos localizados en diferentes regiones del organismo que se comunican entre sí de forma sincronizada a partir de la producción de neurohormonas y hormonas. Su actividad se encuentra dirigida principalmente por neuronas localizadas en el hipotálamo, capaces de sintetizar la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH). Durante la infancia tardía y pre-pubertad la actividad de estas neuronas es muy baja y se encuentra inhibida por mecanismos inherentes al Sistema Nervioso Central (SNC) y en menor medida por mecanismos dependientes de esteroides sexuales (Grumbach 2002). Sin embargo, a partir de factores genéticos y ambientales (Sisk y Foster 2004), las neuronas liberadoras de GnRH (GnRHn) comienzan a activarse liberando grandes cantidades de esta hormona (principalmente durante la noche) hacia los vasos portales que la vehiculizan hacia la adenohipófisis. Allí, las células gonadotropas responden a GnRH liberando la Hormona Luteinizante (LH) y la Hormona Folículo Estimulante (FSH) hacia el torrente sanguíneo, ejerciendo efectos directos y sexo-específicos sobre las gónadas. Estos últimos órganos son los que mayores diferencias cito-arquitectónicas presentan entre machos y hembras, lo que da lugar a diferenciarlas en testículos y ovarios, respectivamente. Por lo tanto, el eje HPG en hembras es denominado eje HP ovárico y en machos, eje HP testicular (HPT). En los mamíferos macho, LH y FSH son capaces de activar la producción testicular de esteroides sexuales y la espermatogénesis, dando inicio a la pubertad (Grumbach 2002) y al período fértil del macho, que se mantendrá mientras la actividad del eje HPT se encuentre adecuadamente regulada (Moenter y col. 2003).

##### 1.1.1. Papel del hipotálamo en el eje reproductivo

El hipotálamo es una porción minoritaria del cerebro que posee funciones fundamentales para la supervivencia asociadas al control de la homeostasis a partir de señales endocrinas y viscerales autonómicas. Se localiza en la región ventral del diencefalo, por debajo del tálamo, entre el borde caudal de los cuerpos mamilares y el

## INTRODUCCIÓN

quiasma óptico, y se comunica en su región ventral con la hipófisis a través de la eminencia media (EM) (Fig 1.1). Según su ubicación puede ser dividido en dos zonas laterales y una zona media: Esta última se clasifica a su vez, en dirección rostro-caudal, en tres regiones: anterior (o supraóptica), intermedia (o tuberal) y posterior (o mamilar) (Carpenter 1985). La región anterior está compuesta por los núcleos anterior, supraóptico y paraventricular; la región intermedia está compuesta por los núcleos dorsomedial (DMN), ventromedial (VMN) y arcuato; y la región posterior está compuesta por los núcleos posteriores y mamilares (Fig 1.1). Al área preóptica también se la considera estructural y funcionalmente parte del hipotálamo aunque deriva del cerebro anterior.



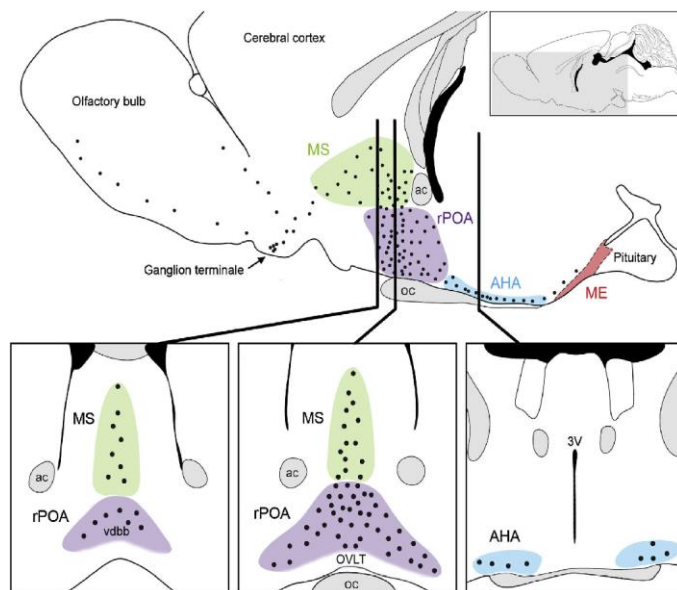
**Figura 1.1.** Diagrama esquemático de los núcleos hipotalámicos. Los núcleos de la región anterior se muestran en verde, los de la región intermedia en azul, los de la región posterior en rojo, y el área preóptica en violeta. Adaptado de <https://www.humanbrainfacts.org/hypothalamus.php> (último acceso 14/01/2019).

El consenso general indica que la actividad hipotalámica es suficiente para el control de la secreción de gonadotrofinas a nivel hipofisario, a partir de la actividad neurosecretora de aproximadamente 1500-2000 GnRHn (Wray 2001). Se ha demostrado que la inyección intrahipotalámica de GnRHn inmovilizadas en ratones con hipogonadismo puede restaurar las funciones reproductivas de los mismos (Silverman y col. 1992). Aunque pueden distinguirse zonas de mayor densidad de GnRHn en el área preóptica y en sitios adyacentes a la zona más anterior del hipotálamo (Knobil 1990) (Fig 1.2), en la mayoría de los mamíferos la localización de los cuerpos neuronales de las GnRHn es difusa y no se circunscribe a un solo núcleo, encontrándose incluso en zonas alejadas del hipotálamo como el cuerpo caloso y el giro cingulado. Sin embargo estas



## INTRODUCCIÓN

localizaciones “aberrantes” serían debidas a señales migratorias anómalas que ocurren durante el desarrollo (Schwartz y col. 2004).



**Figura 1.2.** Distribución de las GnRHn en el cerebro de ratón. Los diagramas muestran la distribución de las GnRHn (puntos negros) en los planos sagitales (arriba) y coronales (abajo). El continuum de GnRHn se extiende desde el bulbo olfatorio a través de la EM, aunque la gran mayoría de las GnRHn se encuentran dentro de tres regiones anatómicas definidas en el cerebro: la población medial septal, la población rostral del área preóptica, y la región caudal anterior del área hipotalámica. Las proyecciones se dirigen mayoritariamente a la EM. Abreviaturas: ac, comisura anterior; oc, quiasma óptico; vdbb, brazo vertical de la banda diagonal de Broca; OVLt, órgano vasculoso de la lámina terminalis; 3V, tercer ventrículo; MS, zona medial septal; rPOA, zona rostral del área preóptica; AHA, zona anterior caudal hipotalámica; ME, eminencia media. Extraído de Herbison (2006).

La forma de las GnRHn es en general bipolar, aunque esto depende de la zona del cerebro en la que se localicen. Sus dendritas, que alcanzan los  $2000\mu\text{m}$ , suelen converger en zonas específicas, lo que favorece al desarrollo de respuestas sincronizadas (Campbell y col. 2009). La mayor parte de las sinapsis ocurren en estos largos procesos dendríticos en comparación con la baja cantidad que ocurren en sus somas (Campbell y col. 2009) y suelen estar en íntimo contacto con células gliales que modulan la eficiencia de los *inputs* aferentes de GnRHn (García-Segura, Lorenz, y DonCarlos 2008). Las proyecciones neuronales se dirigen mayoritariamente (50-70%) hacia la zona externa de la EM donde se encuentran los vasos portales que vehiculizan la GnRH liberada hacia la hipófisis. En menor proporción, las proyecciones se dirigen a otras zonas como el complejo amigdalino cortical, hipocampo, neocorteza y áreas cerebrales relacionadas al procesamiento

## INTRODUCCIÓN

olfativo, entre otras (Herbison 2006). Sorprendentemente, las proyecciones hacia la EM no son axonales sino dendríticas, capaces de recibir *inputs* sinápticos a lo largo de su trayectoria mientras propagan potenciales de acción, por lo cual conservan algunas propiedades axonales (Herde y col. 2013). Una vez en la EM, estas “dendritas” se dividen en varios procesos símil axonales que se proyectan hacia los vasos portales. La liberación de GnRH hacia estos vasos no es directa sino que está mediada por tanicitos y astrocitos (Durrant y Plant 1999).

En algunos mamíferos placentarios como musarañas y primates se ha encontrado que las GnRHn son capaces de producir dos variantes del neuropéptido, denominados GnRH I y II (Urbanski 2012). GnRH I actúa principalmente a nivel hipofisario regulando el control central de la reproducción mientras que GnRH II se encuentra distribuido de forma dispersa por el SNC actuando como neurotransmisor o neuromodulador (Kah y col. 2007). En ratas y ratones, la evidencia sobre el rol de esta variante en los procesos reproductivos es muy escasa (Herbison 2006; Urbanski 2012), de modo que se suele denominar como generalidad GnRH al decapeptido correspondiente a GnRH I (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>), que es el predominante. La transcripción del gen codificante para GnRH produce un transcripto maduro de 560 bases (*Gnrh*) y sus niveles pueden verse alterados por diferentes estímulos (Gore y Roberts 1997; Sagrillo y col. 1996). Se ha estimado que una sola GnRHn contiene más de 1000 *Gnrh* (Maurer y Wray 1999), de los cuales entre el 30 y 40% se localizan permanentemente en el núcleo (Jakubowski y Roberts 1994) generando un pool de transcripto listo para ser translocado al citoplasma de ser necesario (Gore y Roberts 1997). La traducción de *Gnrh* genera una prohormona de 92 aminoácidos, que es procesada a una estructura de 10 aminoácidos (Wetsel y Srinivasan 2002) mientras viaja por las dendritas y dentro de las terminales nerviosas (Herbison 2006), aunque se desconoce si el procesamiento enzimático representa un evento regulatorio de la biosíntesis de GnRH. El decapeptido maduro se co-secreta con un péptido asociado de 56 aminoácidos que deriva de la misma preprohormona (Sakar y Mitsugi 1990) y cuya función no ha sido totalmente dilucidada, aunque se cree que participa en la regulación de la secreción de LH, FSH y prolactina (Miliar, Wormald, y Milton 1986; Nikolics y col. 1985).

En cuanto al patrón de producción de potenciales de acción y la consecuente liberación de GnRH, se ha detectado que las GnRHn producen disparos espontáneos de distinto tipo, aunque los que predominan son los pulsátiles que consisten en varios disparos separados por períodos silentes (Constantin y col. 2012). Las GnRHn aisladas de su citoarquitectura

## INTRODUCCIÓN

producen potenciales de acción con un patrón errático (Kuehl-Kovarik y col. 2002) de modo que se considera que existe un sistema generador de pulsos que las sincroniza, y su composición no se ha caracterizado con exactitud aunque se supone que forman parte de una compleja red neuronal y glial asociada a la liberación de GnRH. Si bien muchos *inputs* hacia GnRHn son capaces de modular su liberación, la mayoría de ellos tienen efectos moduladores sutiles, y sólo algunos de ellos poseen una fuerza moduladora robusta, como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glutamato, noradrenalina (NA), y otros neuropeptidos como kisspeptina, neurokinina B, neuropéptido Y, y el péptido relacionado con la amida RF3 (RFRP-3). Incluso se ha demostrado que la misma GnRH afecta de modo autocrino o paracrino la actividad de las GnRHn, ya que poseen receptores para el neuropéptido que ellas sintetizan (Han y col. 2010; Xu y col. 2008; Herbison 2006). El estado metabólico también es un factor influyente de la actividad del eje reproductivo en general y de la función de GnRH en particular (Fernandez-Fernandez y col. 2006; Tena-Sempere 2007). De hecho, numerosas hormonas participan en la comunicación entre los centros reproductivos y el estado metabólico, como leptina, ghrelina e insulina.

### 1.1.1.1. Vías neuronales moduladoras de la liberación de GnRH

#### 1.1.1.1.1. GABA

Según estudios electrofisiológicos y genéticos, todas las GnRHn poseen receptores ionotrópicos de tipo GABA<sub>A</sub> y aproximadamente 90% de las GnRHn se ven influenciadas por receptores GABA<sub>B</sub> (Herbison y Moenter 2011; Zhang y col. 2009). Las neuronas liberadoras de GABA se han encontrado en el área anteroventral periventricular (AVPV), área preóptica lateral y núcleo supraquiasmático (Christian y Moenter 2007; Liu y col. 2011; Penatti y col. 2010). La influencia de la activación de GABA<sub>A</sub> sobre las GnRHn en la adultez no es del todo clara, aunque existe un mayor consenso a considerar que la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> es excitatoria sobre las GnRHn (Constantin, Iremonger, y Herbison 2013; Herbison y Moenter 2011). Respecto a GABA<sub>B</sub>, se ha demostrado que la activación de estos receptores inhibe la excitabilidad de las GnRHn (Liu y Herbison 2011; Zhang y col. 2009). En particular, se ha encontrado que la señalización de GABA<sub>A</sub> predomina a nivel del soma de GnRHn, mientras que la de GABA<sub>B</sub> es mayoritaria en las dendritas (Constantin y col. 2012).

### 1.1.1.1.2. Glutamato

El glutamato es un neurotransmisor estimulador que, a nivel hipotalámico, se produce en los núcleos arcuato, supraquiasmático, supraóptico y paraventricular, así como en el área preóptica, aunque hasta el momento sus *inputs* hacia GnRHn sólo se han reportado en el AVPV (Liu y col. 2011). Los receptores sobre los que actúa el glutamato pueden ser divididos en dos grandes grupos: los ionotrópicos como el de *N*-metil-D-aspartato (NMDAr), el de kainato y el de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPAr); y los metabotrópicos. De ellos, la mayoría de las GnRHn poseen AMPAr, aunque también se han reportado niveles detectables de NMDAr. Respecto a su modo de acción, se ha determinado que la regulación de la secreción de GnRH inducida por glutamato se lleva a cabo en las terminales nerviosas de GnRHn, donde se localizan fundamentalmente sus receptores (López, Donoso, y Negro-Vilar 1992).

### 1.1.1.1.3. Taquiquininas, Noradrenalina, Óxido nítrico, $\beta$ -endorfina

Otras vías neuronales moduladoras de GnRHn involucran a las taquiquininas, NA, óxido nítrico (NO) y  $\beta$ -endorfinas. Las taquiquininas son péptidos que participan en el control de diversas funciones reproductivas, actuando en cada una de las estaciones del eje reproductivo (Lasaga y Debeljuk 2011). A nivel hipotalámico se han descrito diversos efectos de ciertos integrantes de esta familia sobre la actividad de las GnRHn, como neurokinina B (NKB), sustancia P y neuropéptido Y (Herbison 2006; Lasaga y Debeljuk 2011; Ruiz-Pino y col. 2012; Shughrue, Lane, y Merchenthaler 1996). Por otro lado, las neuronas productoras de NA del tronco encefálico forman parte de la red neuronal de GnRHn y ejercen efectos inhibitorios sobre la excitabilidad de GnRHn (Campbell y Herbison 2007). En cuanto al NO, es una molécula mensajera gaseosa que cumple roles importantes en los sistemas inmune y neuronal, y es producida a partir de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), cuya isoforma mayoritaria en el hipotálamo se denomina nNOS por su localización neuronal. (Bhat y col. 1996). Si bien no se expresa en las GnRHn, sí lo hace en otras neuronas que la rodean y contactan en la EM y POA (Bhat y col. 1995; Grossman y col. 1994; Herbison y col. 1996), estimulando

## INTRODUCCIÓN

la liberación de GnRH (Farkas y col. 2018). Por último, la  $\beta$ -endorfina ejerce efectos inhibitorios sobre la secreción pulsátil de GnRH (Dudás y Merchenthaler 2004) a partir de su unión al receptor opioide  $\mu$ , e incluso se ha reportado que tal efecto estaría mediado por una inhibición de la actividad de la nNOS en la vecindad neuronal de GnRH y una modificación en la actividad de las neuronas productoras de GABA (Faletti y col. 1999).

### 1.1.1.1.4. RFRP-3

Existe una familia de péptidos con un C-terminal de motivo LPXRF amida (donde X = leucina o glutamina), denominados péptidos relacionados a las RF amidas (RFRP). Tsutsui y col., (2000) encontraron en aves un péptido capaz de inhibir la liberación de LH, al que denominaron hormona inhibitoria de gonadotrofinas. Posteriormente se encontraron péptidos homólogos de la familia de las RFRP en mamíferos denominados RFRP-1 y RFRP-3 (Hinuma y col. 2000; Ukena y col. 2002), cuyas neuronas se localizan alrededor del DMN del hipotálamo (Poling y col. 2012; Yano y col. 2003). Se han encontrado neuronas RFRP-3 positivas rodeando a las GnRHn que expresan el receptor de RFRP-3, Grp147 (Poling y col. 2012), y sus efectos sobre la excitabilidad de GnRHn son inhibitorios (Ducret, Anderson, y Herbison 2009). El rol fisiológico de estas proyecciones sobre el eje reproductivo parece estar asociado al estrés (Kirby y col. 2009).

### 1.1.1.1.5. Kisspeptina

La kisspeptina es el mayor activador de la excitabilidad de GnRHn descubierto hasta el momento (Han y col. 2005). Los somas de las neuronas que la producen se localizan mayoritariamente en el área preóptica (dentro del núcleo AVPV y la región periventricular rostral del tercer ventrículo) y el núcleo arcuato (Kauffman y col. 2007). Las proyecciones que se dirigen a diferentes núcleos cerebrales (Desroziere y col. 2010) están involucradas en la regulación de funciones límbicas y en la secreción de gonadotrofinas. Particularmente dentro del núcleo arcuato existen neuronas que co-expresan el ARNm de kisspeptina (*Kiss1*), NKB y dinorfina en una misma neurona, por lo que se las denomina neuronas KNDy (Lehman, Coolen, y Goodman 2010). Respecto a sus efectores, aproximadamente el 85% de las GnRHn expresan el receptor de kisspeptina en la adultez (Irwig y col. 2004) y, a pesar de reportarse efectos directos de

## INTRODUCCIÓN

kisspeptina sobre la liberación de GnRH, se ha sugerido que tal efecto podría estar mediado por el NO (Hanchate y col. 2012; Pielecka-Fortuna, Chu, y Moenter 2008). La distribución neuronal, además de diferir entre especies, es sexo específica, encontrándose entre 10 y 20 veces más neuronas de este tipo en hembras que en machos en la región periventricular rostral del tercer ventrículo (Kauffman y col. 2007), estando relacionadas con el inicio de la pubertad en ratas (Desroziere y col. 2012) y al mecanismo de retroalimentación positivo que ejerce el estradiol en hembras y que precede al pico ovulatorio de LH (Clarkson y col. 2009). Además, los efectos de estradiol en el núcleo arcuato ejercen retroalimentación negativa sobre la actividad de las neuronas productoras de kisspeptina (Mittelman-Smith y col. 2012), mecanismo que sólo ocurre en hembras.

### 1.1.1.1.6. Señalización molecular por células gliales

La actividad de las GnRHn es modulada por astrocitos y microglía a través de interacción física y química. Se ha reportado que el 90% de las GnRHn contactan a través de sus somas con células gliales (Jennes, Stumpf, y Sheedy 1985), aunque no se ha encontrado correlación entre la actividad de las GnRHn y el grado de contacto con ellas (Jansen y col. 2003). En particular, los astrocitos son responsables de la recaptación de glutamato cuya concentración excesiva puede resultar tóxica para el SNC (Brown 1999). Respecto a la señalización molecular, se ha establecido que los astrocitos y tanicitos que rodean a las GnRHn secretan prostaglandina E<sub>2</sub>, que actúa como un gliotransmisor excitatorio y cuya liberación puede verse estimulada por NO (Clasadonte y col. 2011). Asimismo, los niveles intrahipotalámicos de interleukina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) modulan los niveles del ARNm de GnRH y de su receptor (GnRHR) (Kang y col. 2000), mientras que el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) inhibe la función de GnRHn y su capacidad de responder a kisspeptina (Fernández-Solari y col. 2006; Sarchielli y col. 2017), lo cual muestra que el balance de citoquinas controlado principalmente por las células de la glía es importante para la función de GnRHn.

### 1.1.1.2. Hormonas metabólicas que controlan la actividad de GnRHn

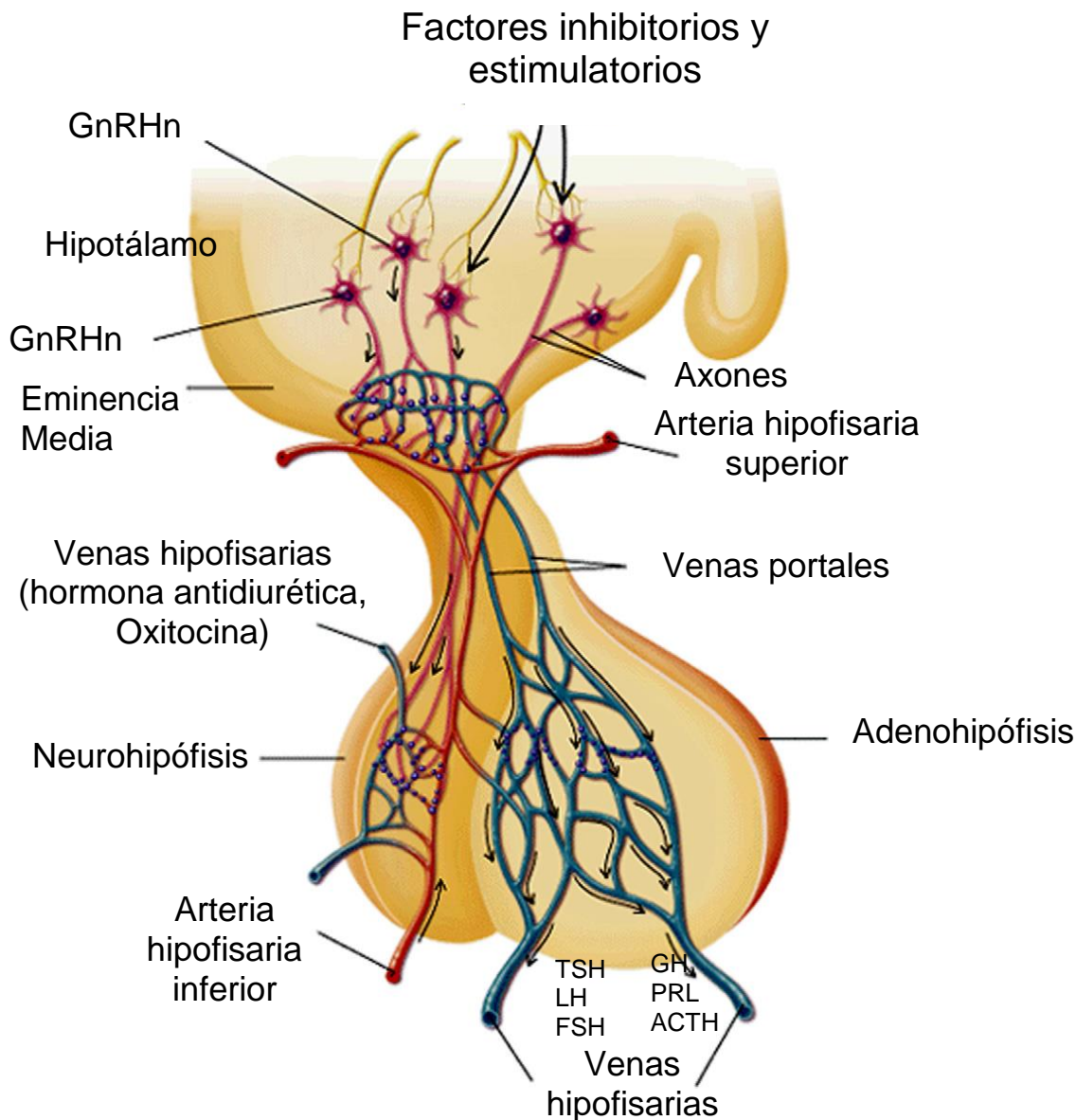
La leptina es el producto hormonal mayoritario del tejido adiposo y funciona como un vínculo integrador entre la cantidad de grasa corporal y varios ejes neuroendocrinos, incluyendo el reproductivo (Moschos, Chan, y Mantzoros 2002). Su rol es estimulador sobre la función reproductiva, encontrándose bajos niveles de LH e infertilidad en ratones obesos con fallas en la producción de leptina (Zhang y col. 1994). Sus efectos sobre GnRH son indirectos ya que no se ha encontrado expresión del receptor de leptina en las GnRHn (Louis y col. 2011; Quennell y col. 2009).

El principal regulador de la síntesis de leptina es la insulina. Esta hormona pancreática posee un rol principalmente estimulador sobre el eje reproductivo, encontrándose hipogonadismo y obesidad hiperfágica en ratones con ausencia de receptores de insulina en neuronas del SNC (Brüning y col. 2000). Además, altos niveles de insulina incrementan la secreción de LH independientemente de la concentración de glucosa (Burcelin y col. 2003).

Otra hormona metabólica que participa en el control de la función de GnRHn es la ghrelina, que a partir de su producción en el estómago participa como un factor orexigénico regulando la homeostasis de glucosa y leptina y la producción de insulina. A nivel reproductivo inhibe la producción de LH (Martini y col. 2006) y de testosterona (Sirotkin y col. 2008).

### 1.1.2. Papel de la hipófisis en el eje reproductivo

La hipófisis es una glándula endocrina que se ubica por debajo de la base del cerebro en una cavidad del hueso esfenoides denominada “silla turca”. Se comunica con el hipotálamo a través de la EM, que posee un sistema porta capaz de movilizar los productos de secreción neurohormonal desde el hipotálamo hacia la hipófisis (Fig 1.3) (Guillemin 1978; Krsmanovic y col. 2009).



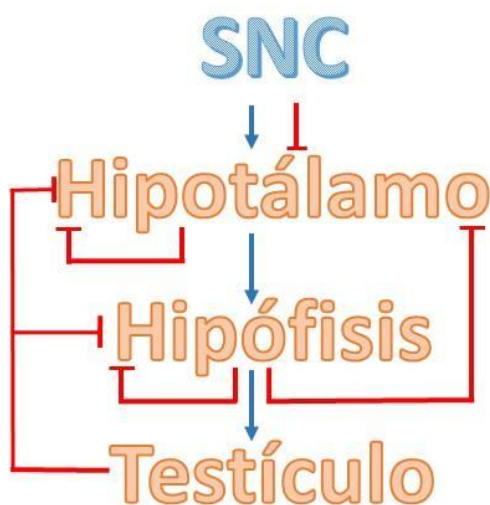
**Figura 1.3.** Relación estructural y funcional endocrina y neuroendocrina entre el hipotálamo y la hipófisis. Las neuronas hipotalámicas que producen GnRH proyectan sus “axones” a través de la EM hacia sus terminales, liberando la neurohormona hacia la circulación portal hipofisaria. Esta red de vasos localizada en la EM, recorre el lóbulo anterior de la hipófisis, que estimulan a los gonadotropos a la secreción de LH y FSH. Adaptado de Melmed S. (2010).

La EM se ubica por fuera de la barrera hematoencefálica (BHE) y en su zona más proximal al hipotálamo en el piso del tercer ventrículo existen uniones fuertes que previenen el intercambio de moléculas de gran tamaño entre el líquido cefalorraquídeo y los espacios extracelulares de la EM (Knigge y Scott 1970). La hipófisis de roedores está compuesta por tres lóbulos: anterior (o adenohipófisis), intermedio y posterior (o neurohipófisis). Mientras que los dos primeros tienen el mismo origen embriológico (la región oral del ectodermo), la neurohipófisis es una extensión ventral del hipotálamo



## *INTRODUCCIÓN*

(Melmed S. 2010). La neurohipófisis está formada por las proyecciones axónicas provenientes del hipotálamo, cuyas neuronas secretan arginina vasopresina (AVP) y oxitocina directamente hacia la circulación sistémica. El lóbulo intermedio se ubica entre el lóbulo anterior y posterior, y contiene sólo células productoras de melanotropinas en roedores. Por su parte, la adenohipófisis (AH) contiene 5 linajes celulares secretores diferentes: los corticotropos productores de adrenocorticotropinas (ACTH), los somatotropos productores de la hormona de crecimiento, los lactotropos productores de prolactina, los tirotropos productores de tirotropina y los gonadotropos productores de LH y FSH. Los axones de las neuronas hipofisiotrópicas (incluyendo las GnRHn) alojadas en el hipotálamo se proyectan a través de la zona interna de la EM hacia su zona más externa donde se encuentra el sistema circulatorio porta-hipofisario, y es allí donde son volcados los productos de secreción de esas neuronas (cuyas terminales axónicas están en íntimo contacto con los capilares fenestrados del endotelio) y luego vehiculizados hacia la AH (Knigge y Scott 1970). Los productos de secreción de las células endocrinas de la AH se vuelcan a la circulación sistémica, donde alcanzan su órgano blanco provocando efectos específicos. La secreción hormonal hipofisaria está regulada a tres niveles: hipotalámico a partir de los neuropéptidos liberados a la circulación porta-hipofisaria, intrahipofisario a partir de señales autocrinas y paracrinas como hormonas, citoquinas y factores de crecimiento, y de retroalimentación a partir de ciertas hormonas secretadas por los órganos blanco de la hipófisis que pueden modular la actividad tanto hipofisaria como hipotalámica (Melmed S. 2010) (Fig 1.4).



**Figura 1.4.** Las tres estaciones que regulan la función del eje HPT. Los conectores de flecha azules muestran señales estimuladoras y los conectores rectos en rojo señales inhibitorias. Adaptado de Melmed S. (2010).

### 1.1.2.1. Los gonadotropos

Los gonadotropos son células pertenecientes a la AH capaces de responder a GnRH - estimulando la síntesis y secreción de gonadotrofinas, y constituyen entre un 7 y un 15% de las células de la AH. Tienen forma oval o irregular, con un núcleo prominente, y pueden ser monohormonales (30%) o bihormonales (70%) (Melmed S. 2010). Se ha establecido que en la rata la cantidad de gonadotropos varían de acuerdo a la edad, sexo, y estatus hormonal (Horvath y Kovacs 1988). La GnRH que llega a la AH produce sus efectos biológicos a partir del GnRHR, una proteína de 327 aminoácidos que forma parte de la familia de los receptores acoplados a proteína G y se encuentra presente tanto en la hipófisis como en otros tejidos del cerebro y del sistema reproductor (Millar y col. 2004). La mayoría de los mamíferos poseen 2 tipos de GnRHR denominados GnRHR I y GnRHR II, donde la última variante se encuentra silenciada en varias especies o es sólo susceptible al ligando GnRH II (McArdle y Roberson 2015). A pesar de ser GPCR, los GnRHR pueden dimerizar e incluso se ha visto que la agregación de receptores favorece la secreción de gonadotrofinas (Janovick y Conn 1996). Se ha establecido que la naturaleza pulsátil de liberación de GnRH (de aproximadamente 0.83 pulsos/hora en machos intactos) es necesaria para la secreción pulsátil de LH ya que la liberación continua de GnRH produce desensibilización de los GnRHR debido a su internalización

## INTRODUCCIÓN

celular, dejando consecuentemente de responder al estímulo (Melmed S. 2010). También se ha observado que la sensibilidad a GnRH puede verse aumentada si la estimulación de sus receptores es baja, lo cual demuestra que los gonadotropos pueden adaptarse a un rango amplio de condiciones ambientales (McArdle y Roberson 2015). Estudios de Wildt y col. (1981), demuestran que las frecuencias de pulsos de GnRH rápidas correlacionan con la secreción de LH por parte de los gonadotropos, mientras que pulsos más lentos favorecen la secreción de FSH.

En cuanto a las gonadotropinas, LH y FSH pertenecen a una familia de hormonas glicoproteicas heterodiméricas con dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es igual en toda la familia de hormonas glicoproteicas en cuanto a su secuencia peptídica primaria, mientras que la subunidad  $\beta$  posee una secuencia de aminoácidos diferente para cada molécula, que le confiere especificidad biológica. Aunque las subunidades individuales pueden encontrarse libres y sin asociación en la hipófisis, sólo tienen actividad biológica al heterodimerizar (Fares 2006). El principal órgano blanco de LH y FSH en machos es el testículo, donde LH estimula en las células de Leydig la producción de testosterona, esencial para el mantenimiento de la espermatogénesis, masculinización y mantenimiento de caracteres sexuales secundarios masculinos (Wu, Wan, y Lee 2007; Themmen y Huhtaniemi 2000). Por otro lado, en el macho FSH actúa sobre las células de Sertoli activando vías de señalización que dan soporte al proceso de la producción de espermatozoides, además de estimular la producción de proteínas como la inhibina (Melmed S. 2010).

### 1.1.3. El Testículo

Las gónadas son los órganos que durante el desarrollo fetal provocan la diferenciación sexual primaria de un individuo (Shaughnessy 2015). Las gónadas masculinas están constituidas por los testículos, que forman parte del tracto reproductor masculino junto al epidídimo, el conducto deferente, las glándulas accesorias (vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y próstata), y el pene. A nivel estructural, el testículo está formado por una túnica albugínea en su región más externa e internamente se compone de tejido intersticial y túbulos seminíferos. El tejido intersticial contiene vasos sanguíneos y linfáticos, macrófagos y células de Leydig (cuya función principal es la producción de testosterona), mientras que los túbulos seminíferos contienen células germinales y de Sertoli (cuya

## INTRODUCCIÓN

función principal es la de brindar soporte estructural y nutricional durante el proceso de espermatogénesis).

La acción de LH está mediada por la unión a su receptor, el LHCGR (del inglés luteinizing hormone–chorionic gonadotropin receptor), que activa la producción de enzimas necesarias para la biosíntesis de testosterona a partir del colesterol. El LHCGR, al igual que el GnRHR, es un receptor de siete pasos de membrana de la familia de las GPCR que está presente principalmente en células de Leydig, pero también en otros tejidos como la vesícula seminal, piel, glándulas adrenal y tiroideas, y cerebro (Dufau y Tsai-Morris 2007).

La testosterona es una hormona esteroidea cuya importancia fue demostrada en experimentos donde se utilizaron ratones con espermatogénesis impedida por fallas en la producción de gonadotrofinas que revirtieron ese cuadro mediante la administración exógena del andrógeno (Spaliviero y col. 2004). Una vez secretada por las células de Leydig, la testosterona actúa de forma paracrina permitiendo el progreso de la meiosis de las células germinales y la liberación de espermátidas maduras (Sharpe 1994). Sus acciones están mediadas por el receptor de andrógenos, de localización intracelular y activable por la unión a ligando que se encuentra presente en células germinales, de Sertoli y de Leydig, entre otros (Wang y col. 2009). De la testosterona circulante un 2% se encuentra en forma libre y biodisponible, mientras que el 98% restante se encuentra unida a una globulina (Simoni y col. 2012).

Tanto los estrógenos como los andrógenos gonadales afectan la producción de gonadotrofinas directa- e indirectamente mediante sus efectos sobre la secreción de GnRH. Los efectos sobre las GnRHn también pueden ser indirectos, ya que se han encontrado receptores de esteroides sexuales en múltiples tipos neuronales río arriba de GnRHn (Blaustein 2010). Particularmente, los estrógenos y andrógenos gonadales liberados al torrente sanguíneo ejercen retroalimentación negativa a través de la inhibición en la síntesis del ARNm codificante para las subunidades  $\beta$  de LH y FSH, y también sobre la liberación de GnRH a través de mecanismos hipotalámicos que involucran a neuronas kisspeptidérgicas (Dungan, Clifton, y Steiner 2006; Finkelstein y col. 1991; Gharib y col. 1990; Stephens y col. 2015). Además de esteroides, existen péptidos gonadales que actúan de forma hormonal modulando la actividad del eje reproductivo, como la inhibina, la folistatina y la activina. Mientras que la activina estimula la síntesis y secreción de FSH (Welt y col. 2002), la inhibina y la folistatina inhiben su secreción (Ueno y col. 1987) y sólo de forma modesta la de LH. Es por ello

## INTRODUCCIÓN

que se considera que estos tres péptidos son relativamente selectivos para FSH en términos de sus efectos sobre la producción de gonadotrofinas. Además, la inhibina actúa principalmente de forma endocrina a diferencia de la activina que lo hace principalmente de forma autocrina y paracrina (Gregory y col. 2005) estimulando la proliferación de las células de Sertoli y la espermatogénesis (Xia y Schneyer 2009). Asimismo, la producción de inhibina se ve estimulada por la acción de gonadotrofinas (Melmed S. 2010).

### 1.2. Inflamación

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño a sus células y tejidos vascularizados causado por algún tipo de noxa de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Normalmente se trata de una respuesta reparadora que implica un considerable gasto de energía metabólica ya que requiere de la coordinación de una gran cantidad de mediadores que se organizan en complejas redes reguladoras. El proceso inflamatorio se inicia mediante la activación de receptores cuya respuesta da lugar a la producción de lotes específicos de mediadores (como citoquinas, prostaglandinas, interleukinas, etc.) que tienen como función alterar el estado de células, tejidos y órganos de manera tal que puedan adaptarse a ese daño infringido por un inductor para luego poder repararse. La respuesta busca controlar y neutralizar al agente agresor a partir de la activación, proliferación y cambios en el metabolismo de una serie de células y tejidos que forman parte de sistemas de órganos como el inmunológico, cardiovascular y SNC. En particular, la respuesta inflamatoria aguda involucra el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos, que facilitan la reparación del organismo a la injuria.

#### 1.2.1. Neuroinflamación

La neuroinflamación es un proceso inflamatorio que tiene lugar en el cerebro producto de una infección, daño o trauma que provoca la activación inmune. En particular, el sistema inmune innato en el SNC provoca modificaciones del microambiente tisular a partir de cambios en la expresión génica y diferenciación celular. Tales cambios provocan por un lado modificaciones en la permeabilidad de la BHE permitiendo una fuerte infiltración de monocitos/macrófagos y neutrófilos sanguíneos proinflamatorios en el

## INTRODUCCIÓN

SNC (Kho, Glass, y Graham 2017), lo cual conlleva a cambios en la actividad de células endoteliales, gliales y neuronas. En particular, la microglía es capaz de activarse presentando un fenotipo fagocítico y ramificado capaz de producir especies reactivas del oxígeno (ROS), citoquinas, glutamato y proteasas (van Rossum y Hanisch 2004). Un actor clave en los procesos inflamatorios que repercuten en el SNC es la familia de receptores tipo Toll (TLRs), que son lipoproteínas transmembrana de tipo 1 implicadas en el reconocimiento de motivos microbianos conservados (Moynagh 2005) y cuya respuesta puede ser beneficiosa o perjudicial dependiendo de la fuerza y el tiempo de la señal de activación. Las células del sistema inmune innato expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), donde la señalización intracelular desencadenada conduce a la transcripción de mediadores inflamatorios que coordinan la eliminación de patógenos y células infectadas (Akira, Uematsu, y Takeuchi 2006). Los TLRs son un tipo particular de PRR que han sido involucrados en la detección de estructuras específicas de etiología viral, microbiana, parasitaria, micótica e incluso a señales de peligro endógenas (Kawai y Akira 2006). La activación de TLRs es un importante inductor de la neuroinflamación a través de la producción de citoquinas, NO y quimioquinas (Lehnardt 2010). Se han identificado 10 tipos de TLR en humanos que reconocen distintos grupos de patrones moleculares, entre los que se encuentran los TLR4 capaces de reconocer lipopolisacáridos (LPS) bacterianos y que están presentes en la superficie celular de neuronas y células gliales (Nishimura y Naito 2005).

### 1.2.2. Efectos de un desafío inmunológico sobre el eje HPT

Ante un desafío inmunológico inducido por endotoxinas ocurren cambios metabólicos que son requeridos de manera inmediata para la supervivencia, lo cual resulta en una merma de ciertas funciones que quedan momentáneamente relegadas, como la actividad locomotora, el apetito y el comportamiento sexual, permitiendo que el organismo se enfoque en la recuperación a un daño.

El LPS es un constituyente de la membrana externa en las bacterias Gram negativas, y su sola presencia en un organismo es capaz de inducir inflamación y activar los mecanismos de respuesta a infecciones bacterianas y sepsis independientemente de la

## INTRODUCCIÓN

presencia de un microorganismo patógeno, estimulando la producción de citoquinas a nivel periférico y central, incluyendo IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (Matsuwaki y col. 2003; Watanobe y Hayakawa 2003). A nivel reproductivo, se ha demostrado en ratas que la administración sistémica de LPS, al igual que la administración intracerebroventricular (icv) de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , es capaz de suprimir la frecuencia pulsátil de LH (Ebisui y col. 1992; Yoo, Nishihara, y Takahashi 1997). Incluso se ha demostrado que en el hipotálamo son estas dos citoquinas las responsables de inhibir el eje reproductivo, y no así IL-6 (Watanobe y Hayakawa 2003).

Tanto un desafío inmunológico como la respuesta al estrés evocan efectos similares sobre la actividad del eje reproductivo. Los eventos de estrés en general activan al eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA), que involucra la secreción de dos neuropéptidos a nivel de la región parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo: la hormona liberadora de corticotropina (CRF) y AVP. Estos dos factores se liberan a la circulación porta-hipofisaria, actuando conjuntamente en los corticotropos hipofisarios que responden liberando ACTH a la circulación sistémica. Esta hormona, a su vez, es capaz de estimular la secreción de cortisol (en humanos) o corticosterona (en rata y ratón) desde la corteza adrenal provocando diversos efectos a nivel de sus órganos blanco e inhibiendo la propia liberación de ACTH y CRF a través de un mecanismo de retroalimentación negativo.

Si bien un desafío inmunológico es capaz de provocar un aumento en la producción de corticosterona, se ha demostrado que esta hormona no participa en la inhibición de LH inducida por LPS en ratas (Watanobe y Habu 2003), aunque se ha postulado que CRF sí participaría en tal efecto (Li y col. 2006). Además, las lesiones neurotóxicas del núcleo central de la amígdala (que contiene una gran población de neuronas liberadoras de CRF) atenúan los efectos disruptivos de la endotoxina (Lin y col. 2011), que a su vez están mediados por la acción de GABA sobre los GABA<sub>A</sub> (Lin y col. 2012). Aunque se ha demostrado que IL-1 $\beta$  es capaz de aumentar los niveles de CRF a nivel del líquido cefalorraquídeo en primates (Xia y col. 1996), los antagonistas del receptor de IL-1 $\beta$  bloquean sólo parcialmente los efectos de LPS, sugiriendo que los efectos disruptivos de la endotoxina involucran a otras citoquinas (Xiao, Xia-Zhang, y Ferin 2000). También se ha encontrado que el LPS es capaz de provocar una disminución tanto en los niveles del ARNm codificantes para *Kiss1* y *Kiss1r* (Pinilla y col. 2012) como en los de la proteína kisspeptina (Matsuyama y col. 2011), y que estos efectos se ven acompañados por una disminución en la secreción de LH (Kinsey-Jones y col. 2009).

## INTRODUCCIÓN

A nivel gonadal se ha demostrado que luego de 3 horas de la administración sistémica de LPS, los niveles plasmáticos de testosterona disminuyen (O'Bryan, Schlatt, Phillips, De Kretser, & Hedger, 2000). Tal efecto ocurre a diferentes niveles, ya que por un lado el LPS disminuye los niveles de LH (Herman y col. 2013) pero por otro lado la endotoxina es capaz de alterar directamente la producción de andrógenos por parte de las células de Leydig a partir de un aumento en la producción local de  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$  (Loveland y col. 2017). Se ha reportado que los efectos disruptivos del LPS sobre los niveles de testosterona retornan a valores normales al cabo de 72 horas, observándose además una reorganización del epitelio del tubo seminífero (independiente de los cambios androgénicos) que puede observarse recién a las 12 horas post-LPS (O'Bryan, Schlatt, Phillips, De Kretser, & Hedger, 2000).

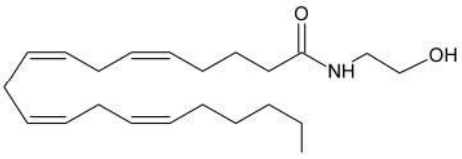
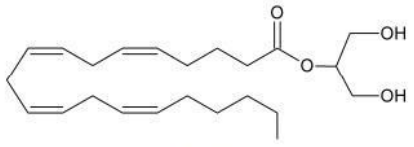
### 1.3. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema de señalización complejo que interviene en múltiples procesos biológicos y que actúa como un modulador de amplio espectro. Este sistema está compuesto de receptores específicos e inespecíficos de cannabinoides, sus ligandos endógenos conocidos como endocannabinoides (eCB), las enzimas que catalizan su síntesis y degradación y las moléculas transportadoras responsables de su captación celular. Sus componentes utilizan los mecanismos biológicos básicos de transducción de señales y mediante numerosas interacciones son capaces de regular la fisiología del SNC y del periférico. Dado el amplio espectro de vías de señalización que puede modular y la diversidad de tejidos y órganos en los que tiene actividad, este sistema está implicado en diversos procesos importantes en el desarrollo embrionario y en la vida postnatal, como la plasticidad y el desarrollo neuronal, el aprendizaje y la memoria, la inflamación, la regulación del apetito y el metabolismo, la reproducción y la respuesta al estrés, entre muchas otras (Drumond, Madeira, y Fonseca 2017; Goodman y Packard 2015; Hillard, Beatka, y Sarvaideo 2016; Kirkham y col. 2002; Maccarrone 2009; Di Marzo y col. 1998; Mazier y col. 2015; Schlicker y Kathmann 2001; Turcotte y col. 2015).



### 1.3.1. Endocannabinoides

Actualmente, bajo el término “cannabinoides” se agrupan numerosas sustancias con estructuras químicas diferentes pero que tienen en común la capacidad de actuar a nivel de algunos de los elementos constituyentes del SEC. Con el objetivo de diferenciarlos se los clasificó en "fitocannabinoides" (procedentes de la planta *Cannabis* spp como el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ THC), cannabinol y cannabidiol) (Tsatsakis y col. 2000), “endocannabinoides” (eCBs, ligandos de receptores cannabinoides producidos endógenamente por células de invertebrados y vertebrados) y "cannabinoides sintéticos" (desarrollados artificialmente en el laboratorio). Todos los eCBs son compuestos de naturaleza lipídica derivados de ácidos grasos poliinsaturados, siendo los más estudiados la araquidoniletanolamida o anandamida (AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Cascio y Marini 2015) (Fig 1.5), ambos derivados del ácido araquidónico, un compuesto precursor de numerosas moléculas endógenas como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos. Se han observado, además, que otros ácidos grasos  $\omega$ -6 son capaces de interactuar con los receptores de cannabinoides con diferente potencia y eficacia, como la *O*-araquidonil etanolamina (Viroadamina) (Porter y col. 2002), la *N*-araquidonil dopamina (NADA) (Huang y col. 2002) y el 2-araquidonilglicerol éter (2-AGE o Noladin éter) (Hanus y col. 2001).

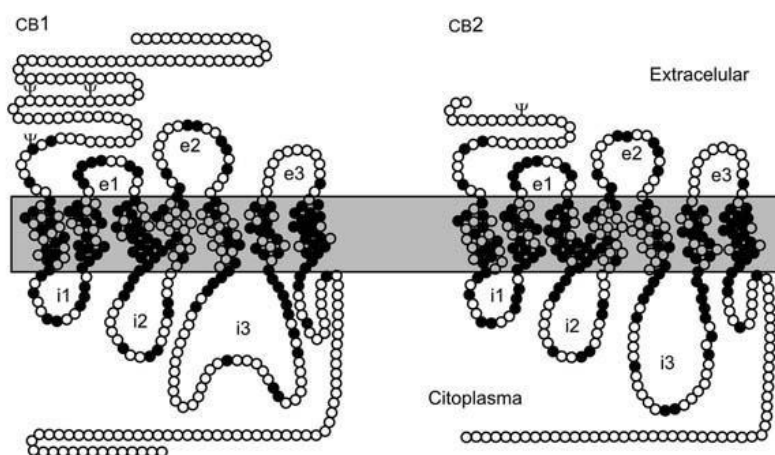
Compuesto	Targets
 <p>AEA</p>	<p>CB1 CB2 TRPV1 PPAR<math>\alpha</math> PPAR<math>\gamma</math> GPR55</p>
 <p>2-AG</p>	<p>CB1 CB2 TRPV1</p>

**Figura 1.5.** Estructura química de los principales eCBs y sus respectivos targets moleculares. Adaptado de Fezza y col. (2014).

### 1.3.2. Receptores de Cannabinoides

#### 1.3.2.1. Receptores clásicos: CB1 y CB2

Los receptores CB1 y CB2 pertenecen a la gran superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Consisten en una única cadena polipeptídica con siete dominios de  $\alpha$ -hélices transmembrana conectadas por tres *loops* intracelulares (i1-i3) y tres extracelulares (e1-e3), con su C-terminal ubicado intracelularmente y su N-terminal glicosilado en la región extracelular (Fig. 1.6). Presentan un 48% de homología entre sí y un 68% de homología entre sus regiones transmembrana. Se acoplan principalmente a proteínas  $G_{i/o}$  aunque también se ha descrito que en algunas situaciones pueden señalar vía proteínas  $G_s/G_q$  (Galve-Roperh y col. 2013; Mackie 2008). Estos dos receptores pueden actuar tanto de forma independiente como cooperativa en diferentes poblaciones neuronales y gliales, e incluso sus efectos pueden ser opuestos.

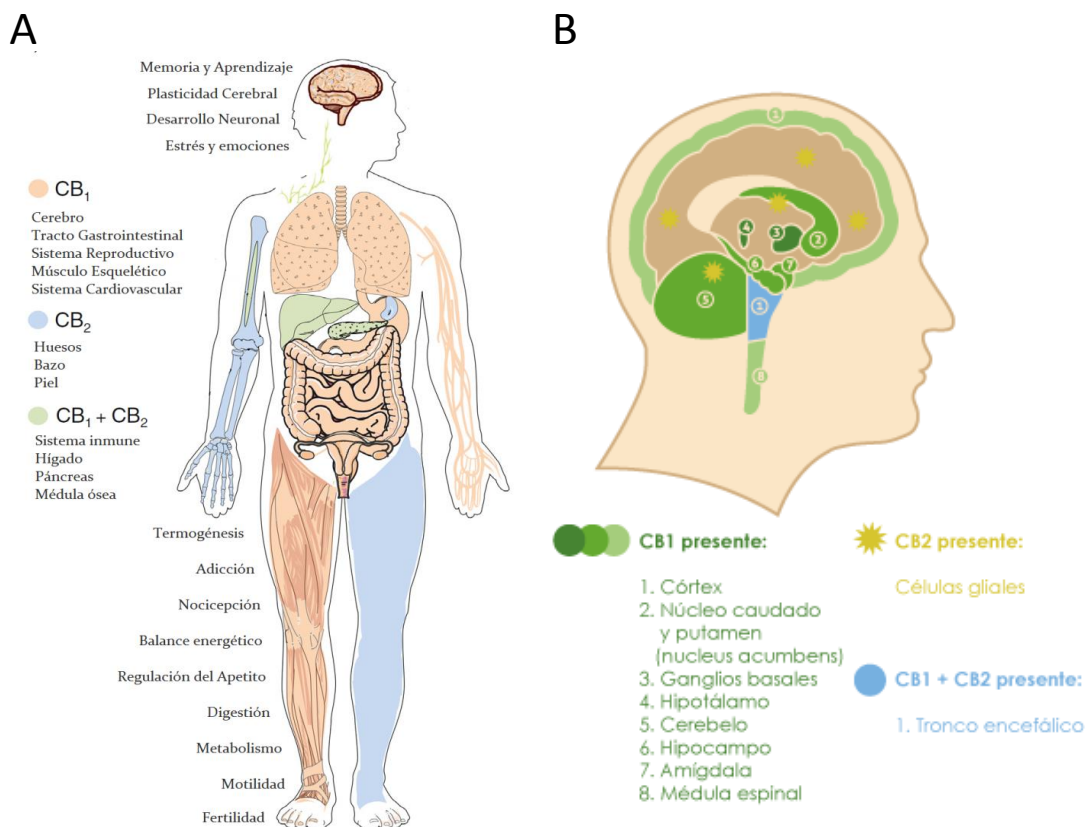


**Figura 1.6.** Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2. Círculos negros representan aminoácidos comunes a los dos receptores, correspondientes al 48% de homología. Ψ representan sitios de glicosilación, mientras que i1, i2, i3 representan a los loops intracelulares y e1, e2, e3 los extracelulares. Adaptado de Shire y col. (1996).

El CB1 se encuentra principalmente en la membrana presináptica de las neuronas modulando la liberación de diversos neurotransmisores, motivo por el cual se considera a los eCB como mensajeros retrógrados (Castillo y col. 2012; Ishac y col. 1996). En particular, la liberación de eCBs por parte de una neurona postsináptica provoca una

## INTRODUCCIÓN

activación de los CB1 presinápticos, desencadenando una inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje, reduciendo la liberación de neurotransmisores tanto excitatorios (como glutamato) como inhibitorios (como GABA). Sin embargo, los CB1 también pueden expresarse a nivel postsináptico formando heterodímeros en asociación con otros GPCRs. Sin embargo, aún no está dilucidado cómo actúan estas estructuras *in vivo* y cómo le confieren al receptor diferentes actividades farmacológicas y estructurales asociadas a sus ligandos (Ferré y col. 2010; Przybyla y Watts 2010). CB1 se encuentra además en células no neuronales del cerebro, como las células de la glía, promoviendo la modulación de la producción de neurotransmisores en la vecindad neuronal, además de ejercer efectos específicos sobre la fisiología de estos tipos celulares (Oliveira da Cruz y col. 2016; Stella 2010). En mamíferos el receptor CB1 es especialmente abundante en áreas del SNC implicadas en el control de la actividad motora (cerebelo), memoria y aprendizaje (corteza, hipocampo, sustancia negra), percepción sensorial (tálamo) y diversas funciones autónomas y endocrinas (hipotálamo, médula adrenal) (Herkenham y col. 1991; Moldrich y Wenger 2000; Ong y Mackie 1999; Tsou y col. 1998) (Fig. 1.7B). Se expresan en menor medida en todos los tejidos periféricos (Fig 1.7A) y su activación contribuye a la regulación de la motilidad intestinal, fertilidad, termogénesis, metabolismo, diferenciación de mioblastos y protección del sistema cardíaco, entre otros (Alger y Tang 2012; Iannotti, Di Marzo, y Petrosino 2016; Kirilly, Gonda, y Bagdy 2012). Con respecto al receptor CB2, una de las funciones fisiológicas más importantes es su papel en el control de la actividad del sistema inmune, ya que participa en la activación y migración de los leucocitos, regulando así las respuestas inflamatorias (Malan y col. 2003; Whiteside, Lee, y Valenzano 2007). En contraste con CB1, la expresión de CB2 en el cerebro es muy baja. Su presencia en neuronas aún sigue siendo discutida por la comunidad científica, aunque hay consenso acerca de su expresión en microglía y astrocitos (Demuth y Molleman 2006; Stella 2010). Los receptores CB2 se expresan abundantemente en las células que pertenecen al sistema inmune tales como monocitos/macrófagos, y linfocitos B y T, donde su activación, en conjunto con otros mecanismos, reduce la liberación de citoquinas proinflamatorias y/o factores linfoangiogénicos (Matias y Di Marzo 2007; Staiano y col. 2016). Por otra parte, los receptores CB2 también están presentes en otros órganos periféricos y células que juegan un papel en la respuesta inmune, incluyendo el bazo, las amígdalas, el timo, y células como mastocitos, queratinocitos, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Campora y col. 2012; Galiegue y col. 1995; Iannotti y col. 2016; Ständer y col. 2005) (Fig. 1.7A).



**Figura 1.7.** Distribución de los receptores CB1 y CB2 en el cuerpo humano. (A) CB1 y CB2 presentan una localización distinta en el organismo, lo que determina, junto con las vías de señalización en la que participan, las funciones en las cuales están involucrados. (B) Diferencias de expresión de CB1 dentro de las distintas regiones del cerebro. Colores más oscuros reflejan mayores niveles de expresión. Imagen A extraída de Aizpurua-Olaizola y col. (2017), imagen B extraída de Fundación-canna: <https://www.fundacion-canna.es/el-sistema-endocannabinoide-figura-2> (último acceso 15/01/2019).

### 1.3.2.2. TRPV1

El canal de potencial transitorio tipo 1 (TRPV1), también conocido como receptor de capsaicina o receptor vanilloide tipo 1, se encuentra dentro de la gran familia de canales TRP (del inglés *Transient Receptor Potential Cation Channel*), perteneciendo particularmente a la subfamilia de canales TRPV. De manera similar a todos los TRP, el TRPV1 es un canal catiónico con seis dominios transmembrana y un bucle entre el segmento S5 y S6 donde se encuentra la región del poro (Fig. 1.8) (Pedersen, Owsianik, y Nilius 2005). Las mutaciones en algunos de estos sitios están vinculadas con



## INTRODUCCIÓN

neuronas sensoriales, sino también en neuronas cerebrales y en células no neuronales, incluyendo células epiteliales, endoteliales, gliales, de músculo liso, dendríticas, linfocitos, queratinocitos, osteoclastos, hepatocitos, fibroblastos y células  $\beta$  pancreáticas (Edwards 2014; Nagy y col. 2014; Starowicz, Cristino, y Di Marzo 2008). Cabe destacar que en varios tipos celulares donde se expresa TRPV1 también se expresan CB1 y/o CB2. Esta colocación da lugar a varios tipos de *cross-talk* intracelular (Di Marzo y Cristino 2008; De Petrocellis y Di Marzo 2009), con importantes consecuencias funcionales para aquellos ligandos que activan ambos tipos de receptores, dado que la actividad de CB2 y, en particular la de CB1, pueden afectar fuertemente a TRPV1 (Fioravanti y col. 2008; Hermann y col. 2003). En las neuronas sensoriales, los canales TRPV1 funcionan como integradores moleculares de múltiples tipos de estímulos que contribuyen a generar y transmitir el dolor. En las neuronas del SNC se expresan tanto pre- como post-sinápticamente, donde actúan regulando la fuerza sináptica (Cristino y col. 2006; Edwards 2014) y participando en la modulación del dolor, la ansiedad, depresión y emesis, por lo general induciendo efectos opuestos a los ejercidos por los receptores CB1 en el mismo contexto (Chahl 2011; Starowicz y col. 2008).

### 1.3.2.3. Otros receptores

Recientemente se ha descubierto otro receptor de cannabinoides, el GPR55, un receptor huérfano asociado a proteína G, el cual comparte solo un 13.5% de la secuencia identificada para CB1 y 14.4% de la de CB2 (Ryberg y col. 2007). El receptor GPR55 está vinculado a una serie de eventos de señalización que incluyen la liberación de  $Ca^{2+}$ , la activación de los factores de transcripción CREB y NF- $\kappa$ B, del factor nuclear de células T activadas y la fosforilación de ERK1/2 MAPK (Pertwee 2007). Por otro lado, los eCBs también son ligandos potenciales de los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) (Stahel y col. 2008), cuyos efectos involucran la regulación del apetito, la lipólisis, la neuroprotección, la analgesia y la inflamación (Fu y col. 2003; Guzmán y col. 2004; LoVerme y col. 2005; Sun y col. 2006).

### 1.3.3. Biosíntesis y metabolismo de los eCBs.

Se considera que los eCBs son sintetizados e inmediatamente liberados hacia el espacio sináptico ya que no existe evidencia de su almacenamiento en vesículas secretoras, y además la mayoría de las enzimas que los producen se encuentran en la membrana plasmática. Por otro lado, los eCBs actúan sobre sus receptores sólo localmente, posiblemente debido a su alta lipofilia, y son inactivados de inmediato bajo condiciones fisiológicas. De hecho, la expresión de sus receptores es indicador de la especificidad de acción mientras que la localización de las enzimas de degradación indica la duración de su acción (Katona y Freund 2014). Este tipo de mecanismos permite al SEC adaptarse rápidamente a cambios en las condiciones (Pagotto y col. 2006). La biosíntesis de AEA se produce a través de al menos tres rutas biosintéticas distintas, mientras que la de 2-AG se produce principalmente a partir de la hidrólisis del diacilglicerol (DAG) (Bisogno y col. 1999; Hashimoto y col. 2005; Maejima y col. 2005). La señalización desencadenada por los eCBs finaliza con el transporte de los mismos hacia el interior de la célula y su posterior degradación. A pesar del extenso conocimiento que se tiene acerca del metabolismo del AEA y 2-AG por las diversas enzimas intracelulares descritas hasta el momento, todavía no se conoce con exactitud como los eCBs atraviesan la membrana plasmática. No obstante, se han propuesto varios modelos para la recaptación de AEA. La hipótesis más aceptada actualmente es la de transporte mediado por un transportador de membrana de endocannabinoides, el cual también sería el responsable de la recaptación de 2-AG. (Fegley y col. 2004; Hillard y Jarrahian 2003; Kaczocha y col. 2006; Yates y Barker 2009).

La AEA y el 2-AG se hidrolizan principalmente por dos serina hidrolasas: amidasa de ácidos grasos (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL). Aunque AEA representa el sustrato preferencial de FAAH, esta también puede hidrolizar a 2-AG (Maione y col. 2006) y otros *N*-aciletanolaminas de cadena larga como oleoiletanolamida y PEA (Saghatelian y col. 2004), además de otras amidas de ácidos grasos (Labar y Michaux 2007). Los productos de estas reacciones de hidrólisis no activan a los receptores de cannabinoides, por lo que pueden reciclarse de nuevo en sus respectivas rutas biosintéticas (Di Marzo, De Petrocellis, y Bisogno 2001). Alternativamente a las rutas de hidrólisis, los eCBs también son sustratos de enzimas que pueden oxigenarlos. Estas vías

## INTRODUCCIÓN

catabólicas conducen a la producción de nuevos metabolitos biológicamente activos. Tanto AEA como 2-AG pueden ser metabolizados por LOXs y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), u oxidados por el citocromo P450 (Cascio y Marini 2015; Di Marzo 2008). Algunos productos de estas reacciones son ligandos de los receptores CB1, CB2, PPARs y TRPV1 (Pacher y Kunos 2013; Stella 2009). Por lo tanto, los resultados obtenidos utilizando inhibidores de FAAH/MAGL o ratones deficientes de estas enzimas son complejos de analizar, dado que los efectos observados no son causados solamente por el aumento de los niveles de eCBs, sino que también son consecuencia de los diversos metabolitos biológicamente activos que se produjeron en las distintas vías.

### 1.3.4. Características farmacológicas de los eCBs

La AEA comparte muchas propiedades farmacológicas con el  $\Delta^9$ THC, tanto a nivel del SNC como de órganos periféricos, actuando como un agonista parcial de CB1, como un agonista parcial débil de CB2 y como agonista de TRPV1 (Pertwee y col. 2010; Van Der Stelt y col. 2005). Inicialmente se creía que dentro del cerebro, los niveles más altos de AEA se correspondían con áreas que también presentaban una elevada densidad de receptores de cannabinoides como el hipocampo, la corteza o el estriado (Felder y col. 1996). Actualmente se sabe que en condiciones basales, la AEA está presente en cantidades muy bajas en el cerebro independientemente de la densidad de sus receptores y que su síntesis y liberación, al igual que para todos los eCBs, se da “bajo demanda” tras una estimulación fisiológica o patológica (Cascio y Marini 2015; Maejima y col. 2005; du Plessis, Agarwal, y Syriac 2015; Zoerner y col. 2011).

Los niveles de 2-AG son, por lo general, marcadamente más altos que los de AEA en los mismos tejidos, valores que pueden llegar a ser hasta 200 veces mayores (Sugiura y col. 2002). El 2-AG actúa como un agonista completo de los receptores de cannabinoides, y se ha propuesto como el principal agonista endógeno para los receptores CB1 y CB2 (Pertwee y col. 2010). El 2-AG, además de actuar como un eCB, es también un intermediario importante en el metabolismo de lípidos y, por lo tanto, sus concentraciones fisiológicas no reflejan sólo la cantidad necesaria para activar sus receptores. De hecho, el 2-AG ha sido considerado como un producto de degradación de los fosfolípidos de inositol y como una posible fuente de ácido araquidónico en las células estimuladas (Di Marzo y Petrosino 2007).



## INTRODUCCIÓN

Como se mencionara anteriormente, una de las funciones más importantes y estudiadas de ambos eCBs es la señalización retrógrada que inhibe la liberación pre-sináptica de glutamato y GABA (Elphick 2012; Vaughan y Christie 2005). Si bien la señalización retrógrada es el principal mecanismo por el cual los eCBs regulan la función sináptica, existe una visión actual más compleja que incluye otros mecanismos de acción de los eCBs como la señalización autocrina y la modulación de funciones pre- y postsinápticas por una señalización a través de astrocitos (Castillo y col. 2012).

### 1.3.5. SEC e inflamación

Entre los procesos inflamatorios y el SEC existe una comunicación bidireccional, ya que por un lado un aumento de citoquinas es capaz de provocar una mayor producción de endocannabinoides (Wolfson y col. 2013), y por otro lado el SEC modula la producción de citoquinas proinflamatorias (More y col. 2013). En la mayoría de las perturbaciones fisiológicas y patológicas estudiadas se ha demostrado que el SEC desempeña un papel pro-homeostático, facilitado por el hecho de ser los eCBs mediadores locales biosintetizados y liberados bajo demanda, permitiendo entonces activar sus dianas sólo cuándo y dónde sea necesario.

Modelos *in vitro* de células cultivadas o tejidos incubados con LPS muestran que tanto los cannabinoides exógenos como endógenos interfieren con la producción de óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias (Cabral y Marciano-Cabral 2005; Guzman 2005; Klein 2005; Mestre y col. 2005; More y col. 2013; Rieder y col. 2010; Xu y col. 2007). Asimismo, experimentos *in vivo* muestran una prevención del SEC en la acumulación de citoquinas proinflamatorias en sangre y cerebro de ratón luego de la administración intraperitoneal (ip) e icv de LPS (Roche y col. 2006; Marchalant, Rosi, y Wenk 2007; Napimoga y col. 2009; Raborn y Cabral 2010; Roth, Castaneda, y Kiertscher 2015). Se ha demostrado que la activación de las células del sistema inmune aumenta la expresión de CB2 en macrófagos (Carlisle y col. 2002) y células microgliales (Maresz y col. 2005), mientras que la administración de LPS *in vivo* puede modificar la concentración de los eCBs mediante la activación de TLR4. En distintos tipos celulares se observó que los niveles de FAAH y MAGL disminuyen en respuesta al LPS, lo que conlleva a un aumento de AEA en macrófagos y células mononucleares plasmáticas (Pestonjamas y Burstein 1998; Varga y col. 1998; Wolfson y col. 2013) y 2-AG en el bazo y en macrófagos

## INTRODUCCIÓN

plasmáticos (Szafran y col. 2015; Varga y col. 1998), respectivamente. Por lo tanto, puede concluirse que ante una señal de peligro las células del sistema inmune innato incrementan la producción de eCBs y la expresión de sus receptores.

Como consecuencia de la síntesis de eCBs a demanda, sus niveles en los tejidos se alteran muy a menudo (y la actividad de sus dianas se modifica) en casi todos los trastornos crónicos, lo que puede ocasionar, ya sea una respuesta adaptativa dirigida a restaurar la homeostasis o un mecanismo desadaptativo que eventualmente contribuye a los síntomas o al progreso de la enfermedad. En los trastornos neurodegenerativos, los eCBs actúan sobre los CB1 en neuronas glutamatérgicas con el objetivo de reducir la excitotoxicidad y también sobre las GABAérgicas vecinas controlando la neurotransmisión de GABA, desfavoreciendo un perfil proinflamatorio (Chiarlone y col. 2014; Gentile y col. 2016). La actividad de CB2 parece producir efectos opuestos dependiendo la etapa en la que esté transcurriendo una determinada enfermedad. En condiciones normales, los receptores CB2 no se expresan en grandes cantidades en el SNC, sino que su expresión aumenta considerablemente en las células microgliales y astrocitos que se activan durante condiciones neuroinflamatorias. En una primera etapa, esta activación de CB2 puede causar efectos antiinflamatorios, reduciendo la liberación de citoquinas, pero luego de un tiempo, la respuesta se torna proinflamatoria, reclutando células inmunes de la sangre cuando se interrumpe la BHE (Miller y Stella 2008). Incluso se ha demostrado que la integridad y función de la BHE, esencial para la neuroprotección, se encuentra bajo control de señales mediadas por CB1 y CB2 (Fujii y col. 2014). Por estas razones, tanto agonistas como antagonistas podrían ser beneficiosos para tratar las consecuencias inflamatorias de los desórdenes neurodegenerativos. Los antagonistas de TRPV1 y CB2 podrían ser útiles en etapas tardías (Starowicz, Nigam, y Di Marzo 2007) mientras que los agonistas de CB1, los inhibidores de la hidrólisis eCBs y, en algunos casos, los antagonistas CB1 (posiblemente mediante la desensibilización indirecta de los receptores TRPV1) podrían ser eficaces tanto en la fase inicial como en la tardía (Di Marzo 2008).

Se cree que las acciones neuroprotectoras del SEC son mediadas a través de una variedad de mecanismos, que incluyen acciones anti-oxidantes, inhibición del flujo de  $Ca^{2+}$  mediado por NMDAr e inhibición de la liberación de glutamato (Fernández-Ruiz, Romero, y Ramos 2015; Köfalvi y col. 2007). Los cannabinoides actúan sobre las neuronas y células de la glía inhibiendo la liberación de moléculas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y NO (Cabral, Harmon, y Carlisle 2001; Puffenbarger, Boothe, y Cabral

## INTRODUCCIÓN

2000) y aumentando la liberación de las citoquinas antiinflamatorias IL-4, IL-10 (Klein y col. 2000) e IL-1ra (Molina-Holgado y col. 2003).

En síntesis, los efectos beneficiosos del SEC en la neuroinflamación se deben a la inhibición de la producción de mediadores proinflamatorios, aumento de la producción de factores antiinflamatorios, inhibición del reclutamiento de microglía y aumento de la supervivencia de astrocitos y oligodendrocitos.

### 1.3.6. Relación entre el SEC y el eje HPT

El SEC participa en la modulación del eje reproductivo a nivel de cada uno de los órganos que lo componen. En líneas generales, su actividad es inhibitoria. A nivel hipotalámico, los estudios abocados a la influencia del SEC sobre las GnRHn son escasos y se circunscriben al estudio del efecto de la administración de fitocannabinoides como el  $\Delta^9$ THC (Rettori y col. 1990; Wenger y col. 1987). Se desconoce el mecanismo preciso por el cual los cannabinoides afectan la actividad de las GnRHn, pero se ha demostrado la expresión de receptores de cannabinoides en varias neuronas moduladoras de la actividad de GnRH como las GABAérgicas y las secretoras de ghrelina (Farkas y col. 2010, 2013). Además, en estudios con GnRHn inmortalizadas se encontró expresión de CB1 (Gammon y col. 2005). Se ha demostrado que el tratamiento crónico con cannabinoides disminuye la expresión del receptor de GnRH en gonadotropos y de LH en gónadas (Banerjee y col. 2011), provocando además una menor liberación de LH (Marks 1973; Murphy y col. 1990). Oláh y col. (2008) sugieren, mediante tratamientos farmacológicos con antagonistas de receptores cannabinoides, que la inhibición sobre LH estaría mediada por CB1 y TRPV1. A nivel testicular, la administración de cannabinoides no sólo suprime la producción de testosterona (Banerjee y col. 2011), sino que puede inducir regresión testicular (Mandal y Das 2009). Wenger y col. (2001) demostraron que, si bien la administración de AEA es capaz de inhibir la secreción de LH y testosterona en animales de cepa silvestre, ratones transgénicos carentes de CB1 también presentan niveles hormonales disminuidos, sugiriendo que, a pesar de que la AEA sea inhibitoria, todos los componentes del SEC son necesarios para una correcta función del eje reproductivo.

### 1.4. Relación entre la inflamación, el SEC y el eje HPT

Existe una relación de regulación recíproca entre el sistema inmune y el neuroendocrino. La administración experimental de LPS, empleado como noxa en modelos que estudian los mecanismos neuroinmunoendocrinos involucrados en procesos inflamatorios, generalmente va acompañada de alteraciones en el eje reproductivo, principalmente a partir de un aumento hipotalámico en los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (Watanobe y Hayakawa 2003). Por otro lado, la presencia de CB1 y CB2, así como la producción de eCBs en linfocitos y macrófagos, ha sugerido que el SEC opera de manera activa en el sistema inmune. Se ha reportado que la AEA inhibe la producción de NO y TNF $\alpha$  en astrocitos de ratón estimulados con LPS (Ortega-Gutiérrez, Molina-Holgado, y Guaza 2005).

El LPS activa mecanismos inhibitorios de la liberación de GnRH similares a los descritos para los cannabinoides (Feleder y col. 1996) y, teniendo en cuenta que la producción de endocannabinoides aumenta en presencia de LPS, es probable que el mecanismo de inhibición de la liberación de GnRH provocado por la administración de LPS involucre, al menos en parte, al SEC. Dados los efectos inmunosupresores ejercidos por los eCBs, el incremento de los mismos inducido por LPS podría resultar en una respuesta fisiológica para atenuar los efectos nocivos desencadenados durante el proceso inflamatorio, aún cuando esto conlleve a una inhibición del eje reproductivo.

El único antecedente que evidencia la participación del SEC hipotalámico como mediador de los efectos disruptivos del LPS sobre la función reproductiva hipotalámica fue reportado por nuestro grupo de trabajo, demostrando que el TNF $\alpha$  *in vitro* reduce la liberación de GnRH estimulada por forskolina en fragmentos hipotalámicos, y que este efecto es prevenido si los receptores CB1 son previamente bloqueados por AM251, un antagonista selectivo este receptor (Fernández-Solari y col. 2006). Estos resultados sugieren que la inhibición de GnRH que tiene lugar en condiciones inflamatorias es mediada, al menos parcialmente, por el SEC.

Con la finalidad de aportar elementos al conocimiento de los efectos neuroinmunoendocrinos del SEC, en el presente trabajo de tesis estudiamos la participación de los receptores de cannabinoides hipotalámicos CB1, CB2 y TRPV1 sobre

## *INTRODUCCIÓN*

la inhibición del eje reproductivo en un modelo *in vivo* de inflamación aguda inducida por LPS.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2. Hipótesis y Objetivos

### 2.1. Hipótesis

El SEC participa en la respuesta inflamatoria hipotalámica, por lo que el bloqueo de los receptores cannabinoideos hipotalámicos altera la producción de citoquinas proinflamatorias, y esta alteración repercute indirectamente en la síntesis de hormonas y neuropéptidos producidos por los distintos órganos del eje HPT, actuando sobre la red neuronal que modula la actividad de las GnRHn.

### 2.2. Objetivo general

Si bien se han estudiado por separado los efectos inhibitorios del desafío inmunológico sobre el eje HPT y la participación del SEC en la regulación neuroendocrina de este eje, no se encuentran en la literatura trabajos que aborden la posible participación de componentes del SEC hipotalámico como mediadores de los efectos de un desafío inmunológico sobre el eje HPT. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue estudiar la participación de los receptores de cannabinoideos hipotalámicos como intermediarios entre los procesos inflamatorios y los cambios neuroendocrinos del eje HPT.

### 2.3. Objetivos específicos

1. Determinar los niveles del ARNm de las citoquinas proinflamatorias  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$ , las cuales modulan la liberación de GnRH en el hipotálamo de ratas sometidas a un desafío inmunológico inducido por LPS, con o sin el bloqueo farmacológico de los receptores hipotalámicos CB1, CB2 y TRPV1.

2. Estudiar la actividad neuroendocrina del eje HPT en ratas sometidas a un desafío inmunológico inducido por LPS con o sin bloqueo farmacológico de los receptores hipotalámicos CB1, CB2 y TRPV1, determinando los niveles hipotalámicos de GnRH, y los niveles séricos de LH y testosterona.

3. Determinar los niveles hipotalámicos del ARNm de los neuropéptidos kisspeptina y RFRP-3, moduladores de la actividad de GnRHn, en ratas sometidas a LPS con o sin bloqueo farmacológico de los receptores hipotalámicos CB1, CB2 y TRPV1.

## *HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*

4. Establecer si la participación de los receptores hipotalámicos de cannabinoides en el control de la actividad del eje HPT es directa o indirecta, determinando los niveles del ARNm de CB1 en las neuronas kisspeptidérgicas y RFRP-3 positivas en condiciones basales o de desafío inmunológico.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Animales

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley obtenidas del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UBA). De peso corporal entre 250-300g, fueron alojadas en grupos de 4-6 por jaula en el bioterio de la cátedra de Fisiología de la Facultad de Odontología (UBA). El mismo está iluminado artificialmente con un fotoperiodo de 12 hs (07:00-19:00hs.) y a una temperatura controlada de 20-24°C, teniendo en todo momento los animales libre acceso a alimento balanceado y agua. Para la realización de los experimentos, se dividió las ratas al azar en diferentes grupos. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Odontología de la (UBA), realizados de acuerdo con la Declaración de Helsinki y también en concordancia con la “Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” (NIH) (revisión 2011).

#### 3.2. Drogas

Las drogas fueron obtenidas de Sigma Co. (St. Louis, MO, USA) incluyendo el LPS bacteriano (*Escherichia coli* serotipo 0055:B5). El antagonista de receptores CB1 (AM251) [N-(piperidin-1-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-chlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide], el antagonista de receptores TRPV1 (capsazepina) [N-(4-Chlorophenethyl)-7,8-dihydroxy-1,3,4,5-tetrahydro-2H-benzocazepine-2-carbothioamide] y el antagonista de receptores CB2 (AM630) [2-methyl-3-(4-methoxybenzoyl)-6-iodo-1-(2-morpholinoethyl)-1H-indole] fueron obtenidos de Tocris (Ellisville, MO, USA). Los insumos para PCR fueron adquiridos de Promega Corporation (Madison, WI, USA). La GnRH para yodación y estándares fue adquirida de Península Laboratories, Inc., División de Bachem (San Carlos, CA, USA). La LH para yodación y estándares fue adquirida del Dr. A. F. Parlow (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Torrance, CA, USA). El <sup>125</sup>Iodo fue adquirido de PerkinElmer Life and Analytical Science (Boston, MA, USA).

### 3.3. Diseño experimental

Para evaluar la participación de los receptores hipotalámicos del SEC como mediadores de la actividad del eje HPT durante un desafío inmunológico, los animales fueron tratados el día del experimento con LPS (5 mg/kg, *Escherichia coli* serotipo 0055:B5) por vía ip disuelto en NaCl 0.9% estéril, o directamente con su vehículo como control de la administración ip. Al cabo de 90 ó 180 minutos, las ratas fueron sacrificadas por decapitación, el hipotálamo extraído rápidamente y refrigerado a -80°C. Se recolectó además sangre troncal, la cual fue centrifugada a 3000 rpm a 4°C durante 20 min. El suero así obtenido fue separado del coágulo y fue conservado a -80°C. A fin de administrar las drogas a través del ventrículo lateral del cerebro, una semana antes del experimento se implantaron cánulas de acero inoxidable. Para ello, los animales fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina (70 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y colocados en un dispositivo estereotáxico. Las coordenadas relativas a la línea interaural (A-P: 0.6 mm; L: -2 mm; D-V: -3.2 mm) fueron tomadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson 2007). Las drogas administradas vía icv en los distintos experimentos fueron AM251, AM630 o capsazepina (en todos los casos 500 ng/5 µl NaCl 0.9% estéril) o sus respectivos vehículos (5 µl de NaCl 0.9% estéril). Estas drogas se administraron 15 minutos antes de la administración ip de LPS (5mg/kg). La concentración de los antagonistas fue definida en base a estudios previos que han demostrado el bloqueo de sus respectivos receptores (Fernandez-Solari y col. 2009; Limebeer y col. 2010; Rivas y col. 2017; Sartim y col. 2018; Scorticati y col. 2004; Werner y Koch 2003). Para asegurarnos que los fármacos administrados llegaran correctamente al hipotálamo, se realizó una puesta a punto del procedimiento estereotáxico, en la cual los animales fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico y tratados vía icv con azul de metileno diluido en solución salina. Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los cerebros que fueron seccionados en un vibrátomo para determinar bajo lupa que el ventrículo lateral y el hipotálamo hubieran recibido el colorante. Si bien nos aseguramos que las drogas administradas por vía icv accedieran al hipotálamo, no podemos descartar que otras áreas cercanas a los ventrículos laterales hayan recibido trazas de los fármacos administrados Aún cuando estas drogas pueden atravesar la BHE, las mismas fueron administradas icv en concentraciones y volúmenes adecuados para el

## MATERIALES Y MÉTODOS

bloqueo de los receptores hipotalámicos, pero insuficientes para provocar efectos sistémicos (McLaughlin y col. 2003; Rezende y col. 2012).

En cada experimento los animales fueron divididos en 4 grupos (5 ratas por grupo): (i) ratas control que recibieron solución salina vía ip e icv; (ii) ratas a las que se le administró solución salina vía ip y un antagonista de receptores de cannabinoides vía icv (AM251, AM630, o capsazepina); (iii) ratas que recibieron LPS vía ip y solución salina vía icv; (iv) ratas que recibieron LPS vía ip y antagonista vía icv.

### 3.4. Determinación de TNF $\alpha$

La concentración sérica de TNF $\alpha$  se determinó mediante ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) específico para TNF $\alpha$  de rata, usando anticuerpos y estándares obtenidos de BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación MaxiSorp de 96 pocillos (Nalgene Nunc International, Nueva York, EE.UU.) con anticuerpo de capturas anti-TNF $\alpha$  de rata (dilución 1: 250 en buffer de carbonato de sodio 0,1 M; pH 9,5) y se las dejó incubando durante la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas cinco veces con buffer de lavado/dilución (0,05% de Tween-20 en PBS, pH 7,0) y bloqueadas a temperatura ambiente durante 1 hora con diluyente de ensayo (PBS con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, pH 7,0). Después de 5 lavados, se añadieron las muestras o los patrones (0-2000 pg/ml) y las placas fueron incubadas durante una noche a 4°C. Al cabo de ese término, se realizaron cinco lavados y se añadió a cada pocillo el anticuerpo de detección biotinilado anti-TNF $\alpha$  específico de rata (dilución 1:250 en diluyente de ensayo). Se llevó a cabo otra incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizacon cinco lavados y se añadió a cada pocillo la estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (dilución 1:250 en diluyente de ensayo) y se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas siete veces más y se añadió a cada pocillo la solución de revelado (solución de sustrato de tetrametilbenzidina), incubándose las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Al final del período de incubación, se añadieron 50  $\mu$ l de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M por pocillo para detener la reacción y facilitar el desarrollo del color. La absorbancia se leyó inmediatamente a 450 nm en un lector de microplacas (Modelo 3550, BIO-RAD Laboratories, California, EE.UU.). Los niveles de TNF $\alpha$  se expresaron en pg/ml.

### 3.5. Real-time PCR

Para realizar las extracciones del ARNm, los tejidos fueron homogeneizados en RNAzol de acuerdo a las instrucciones del producto (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA). Luego de la extracción, el ADN genómico fue digerido con una DNasa durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se inactivó la enzima y se procedió a cuantificar el ARN a través de la medición de absorbancia a 260 nm. A fin de detectar posibles contaminaciones, se evaluó también la relación entre las absorbancias de 260 y 280 nm. Las muestras utilizadas en todos los casos presentaron una relación 260/280 entre 1.7 y 2.1, indicando que las muestras tenían alta pureza. A fin de evaluar la integridad del ARN, 3 µg de ARN total de cada muestra fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente se realizó una retrotranscripción del ARN para obtener el ADNc. Para ello, en cada reacción se colocó muestra, H<sub>2</sub>O, hexámeros aleatorios, dNTPs (Invitrogen) y se incubaron por 5 minutos a 65° C. A continuación fueron enfriados y se les agregó “Buffer First Strand”, DTT, e inhibidor de RNasa (RNasin, Genbiotech). Los tubos fueron colocados en un termociclador (Applied Biosystem Veriti Thermal Cycler) por 2 minutos a 37°C. Al cabo de ese tiempo fueron enfriados nuevamente y se les agregó la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). A continuación fueron colocados nuevamente en el termociclador con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37 °C y 15 minutos a 70 °C. El ADNc obtenido se guardó a -20°C hasta ser usado. Como control negativo se realizó una transcripción reversa sin enzima para descartar la presencia de ADN genómico en las muestras. Las reacciones de PCR en Tiempo Real se llevaron a cabo en un termociclador ABI7500 (Applied Biosystems) usando el kit comercial Mezcla Real 2x (Roche) que contiene Sybr Green y ROX. Cada reacción fue realizada por triplicado, en un volumen final de 20 µl, utilizando como templado 4 µl de ADNc diluido (dilución 1:10 de la reacción de transcripción reversa). Al inicio de la reacción de PCR se desnaturalizó el ADNc a 95°C durante 5 min. Esto fue seguido por 40 ciclos de 10 seg a 95°C, 15 seg a 60°C (según el par de primers) y 20 seg de extensión a 72°C. La detección de los productos de PCR se realizó finalizados los 20 seg de extensión de cada ciclo, mediante la medición de la fluorescencia originada por la unión del agente intercalante a ADN doble cadena. Con el objetivo de verificar que la fluorescencia medida sea originada por un solo

## MATERIALES Y MÉTODOS

producto de PCR, y no por la presencia de productos inespecíficos, finalizados los 40 ciclos de PCR, las reacciones fueron sometidas a un protocolo de disociación por calor (Ririe, Rasmussen, y Wittwer 1997). Las secuencias de los primers fueron diseñadas usando el software Primer Express 1.5 (PE Biosystems) o el IDT Primer Quest, que incorpora el software Primer3 (versión 2.2.3) (Integrated DNA Technologies). Los primers fueron localizados preferentemente en uniones exón-exón o dos exones que tuvieran un intrón entre medio para evitar que se transcriba el ADN genómico y diseñados de manera que los amplicones tuvieran 50-300 pb de longitud (Tabla 3.1). Los oligonucleótidos utilizados en estos ensayos fueron comprados a Life Technologies o Biodynamics. Como puesta a punto del método, se realizaron curvas de diluciones seriadas 1:10 de las muestras con cada par de primers para evaluar la eficiencia de la reacción para las condiciones determinadas. Se consideraron adecuadas aquellas condiciones en las cuales la curva presentaba una eficiencia de 90%-105%. Todas las muestras de ADNc de hipotálamo fueron comparadas contra el gen de referencia L32, un gen normalizador. Para el análisis de los resultados y el cálculo de las diferencias entre tratamientos se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen 2001).

Gen	Secuencias	T° Annealing	Amplicón (pb)
<i>Tnfa</i>	Fw: 5'-GATCGGTCCCAACAAGGAGG-3' Rv: 5'-CTTGGTGGTTTGCTACGACG-3'	60	137
<i>Il1β</i>	Fw: 5'-ACCCAAGCACCTTCTTTTCCTT-3' Rv: 5'-TGCAGCTGTCTAATGGGAACAT-3'	60	106
<i>Gnrh</i>	Fw: 5'-TGGTATCCCTTTGGCTTTCACA-3' Rv: 5'-CTCCTCCTTGCCCATCTCTTG-3'	60	188
<i>Kiss1</i>	Fw: 5'-CTGAACCCACAGGCCAACAGT-3' Rv: 5'-AAGGAGTTCAGTTGTAGGCTG-3'	60	253
<i>Rfrp3</i>	Fw: 5'-CTGAACCCACAGGCCAACAGT-3' Rv: 5'-AAGGAGTTCAGTTGTAGGCTG-3'	60	93
<i>L32</i>	Fw: 5'-TGGTCCACAATGTCAAGG-3' Rv: 5'-CAAACAGGCACACAAGC-3'	60	197

**Tabla 3.1. Primers utilizados para la determinación de neuropéptidos y citoquinas en el hipotálamo.** Se muestra el gen, la secuencia en sentido 5' a 3', los pares de bases del amplicón y la temperatura de annealing o hibridación.

### 3.6. Determinación de LH por radioinmunoensayo

La determinación de LH en los experimentos en los que se utilizó TRPV1 como antagonista fue realizada en bajo el servicio de la Dra. Bettina Lacau (IBYME-CONICET), mientras que en los experimentos que utilizaron CB2 como antagonista la hormona fue medida en colaboración con el grupo de la Dra. Lux-Lantos (IBYME-CONICET). En ambos casos el protocolo de marcación y medición de la hormona se encuentra previamente descrito (Di Giorgio 2013), utilizando un contador gamma Packard (Palo Alto, CA, EEUU). La determinación de LH en los experimentos en que se utilizó el antagonista CB1 se describe a continuación.

#### 3.6.1. Marcación de LH

Para la marcación de LH se utilizó el método de cloramina T. Brevemente, a una alícuota de LH (2.5 µg / 30 µl) se le agregaron 30 µl de buffer fosfato 0,5 M pH 7.5. A esta mezcla se le agregó 1 mCi de <sup>125</sup>I y 10 µl de cloramina T (30 µg/10 µl en buffer PBS 0.05 M pH 7.5). Se dejó reaccionar durante 60 segundos en agitación. La reacción se detuvo con 25 µl de metabisulfito de sodio (2.5 mg/ml de buffer 0.05 M pH 7.5). A continuación, se sembró la mezcla sobre una columna de Bio-Gel (P-60) y se usó PBS EDTA 0.05M como buffer de elusión. Se recolectaron fracciones de 0.5 ml en tubos que contenían 100 µl de buffer de LH. Entre los tubos 4 y 5 se observa el pico de la hormona marcada. Se determinó que tubo contenía mayor cantidad de cuentas y se utilizó esa fracción para calcular la cantidad óptima de cuentas por minuto a utilizar en el radioinmunoensayo (RIA).

#### 3.6.2. Metodología del RIA de LH

La concentración sérica de LH fue determinada por RIA en PBS (pH 7.6), conteniendo BSA 1% como diluyente y [<sup>125</sup>I]-LH como trazador (10000 cpm/tubo). Se utilizó como patrón la preparación estándar de LH de rata NIH-rLH-RP-2. El anticuerpo anti-LH fue disuelto en buffer PBS-EDTA 0.025 M. Esta mezcla fue mantenida a 4°C durante 72 horas y la reacción fue detenida mediante el agregado de suero anti-gamma globulina de

## MATERIALES Y MÉTODOS

conejo obtenido en oveja diluido 1:20 en buffer PBS y 1 ml de polietilenglicol 6%. Las muestras fueron centrifugadas a 3200 rpm durante 30 minutos y la radioactividad del precipitado determinada en un contador gamma Cobra II (Packard, Palo Alto, CA, EEUU). Los reactivos que se utilizaron fueron antisuero anti-LH de rata (NIDDK-anti-rLH-SII), antígeno (NIDDK-2LH-I-9) y estándar de referencia (NIDDK-2LH-RP3), los cuales fueron comprados a NIH Pituitary, Hormone and Antisera Center, Harbor-UCLA Medical Center (Torrance, CA). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 3.6 y 6.6 %, respectivamente. Las muestras fueron medidas por duplicado, y la concentración sérica de LH fue expresada como ng/ml.

### 3.7. Determinación de GnRH por RIA

#### 3.7.1. Marcación de la hormona

Para la marcación de GnRH se utilizó el método de cloramina T. Brevemente, a una alícuota de GnRH (5 µg/5 µl) se le agregaron 25 µl de buffer fosfato 0.5 M pH 7.5. A esta mezcla se le agregó 1 mCi de <sup>125</sup>I y 10 µl de cloramina T (1 mg/ml en buffer PBS 0.05 M pH 7.5). Se dejó reaccionar 13 segundos en agitación. La reacción se detuvo con 25 µl de metabisulfito de sodio (2.5 mg/ml de buffer 0.05 M pH 7.5). Luego se sembró la mezcla sobre una columna CMC-52, colectando fracciones de 2 ml en tubos que contenían 1 ml de buffer de GnRH. Los primeros 5 tubos fueron eluidos con buffer de acetato de amonio 0.002 M pH 4.5. Luego se cambió por acetato de amonio 0.2 M para todos los tubos siguientes. En los primeros 5 tubos se colectó el <sup>125</sup>I libre mientras que la hormona marcada eluyó entre los tubos 10-12. Para la realización de los RIAs se utilizó la hormona marcada alojada en el tubo que mostró mayor cantidad de cuentas.

#### 3.7.2. Metodología del RIA de GnRH

Para la determinación se utilizó un antisuero policlonal anti-GnRH altamente específico, donado por la Dra. Ayala Barnea (Universidad de Texas, South Western Medical Center at Dallas, Tx, USA). Los estándares fueron reconstituidos en buffer GnRH (PBS 0.01 M, NaCl 17 %, gelatina 2 %, merthiolate (timerosal) 20 %, EDTA 18.6 %). Se incubaron los estándares y las muestras con antisuero anti-GnRH durante 3 hs a temperatura ambiente. La dilución de trabajo del antisuero fue determinada a través de



un ensayo de unión. Luego del agregado del trazador radioactivo (aprox. 10.000 dpm/100  $\mu$ l  $^{125}$ I-GnRH), la incubación se continuó por 20 hs a temperatura ambiente. Las formas unida y libre se separaron mediante el agregado de 1 ml de etanol absoluto en baño de hielo, agitación intensa y posterior centrifugación durante 30 minutos a 3000 rpm y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se contó la radioactividad contenida en el pellet en un contador gamma Cobra II. La sensibilidad del ensayo fue de 0.2 pg por tubo y la curva estándar mantiene la linealidad hasta 100 pg / tubo de GnRH. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 7 % y 9 %, respectivamente. Las muestras fueron medidas por duplicado. Los resultados fueron expresados como pg de GnRH/hipotálamo.

### 3.8. Determinación de Testosterona por ELISA

Los niveles séricos de testosterona total fueron determinados utilizando un kit específico de ELISA de rata (DRG instruments GmbH, Marburg, Germany). Resumidamente, cada pocillo recubierto con un anticuerpo monoclonal fue tratado con estándar (0-16 ng/ml) o muestra. A continuación, se añadió a cada pocillo testosterona conjugada con una peroxidasa de rábano durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los pocillos fueron lavados 3 veces con un buffer de lavado (0.05% Tween- 20 en PBS, pH 7.0) y tratados con una solución de tetrametilbenzina durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M y la absorbancia fue determinada a 450nm en un lector de microplacas (Modelo 3550, BIO-RAD Laboratories, California, EE.UU.). La sensibilidad y el coeficiente de variación del ensayo fue de 0.083 ng/ml y 3.59%, respectivamente. Los niveles séricos de testosterona fueron expresados como ng/ml.

### 3.9. Hibridación *in situ* de CB1

Para determinar si las neuronas kisspeptidérgicas, las neuronas RFRP-3 positivas y las GnRHn expresan el receptor de CB1, se cortaron los cerebros congelados en un criostato en secciones coronales de 20  $\mu$ m abarcando el área preóptica, el DMN y el núcleo arcuato hipotalámico. A continuación fueron montados sobre portaobjetos positivados y guardados a -70°C. A fin de realizar el ensayo de hibridación, las muestras fueron tratadas en formaldehído al 4%, pretratados con anhídrido acético, enjuagados 2 veces en SSC

## MATERIALES Y MÉTODOS

(citrato de sodio, cloruro de sodio), se removieron los lípidos con cloroformo, se deshidrataron en distintas concentraciones de etanol y se secaron al aire. Se trabajó con ribosondas antisentido de *Kiss1*, *Gnrh* o *Rfrp3* (0.04 pmol/ml) marcadas con digoxigenina (DIG) a partir de *DIG labelling mix* (Roche), que fueron proveídas gentilmente por el Dr. Alexander S. Kauffman, (UCSD, CA, USA), y además con otra radiosonda ( $^{33}\text{P}$ ) antisentido de *Cb1* (0,05 pmol/ml) que fue proveída gentilmente por el Dr. Hui-ling Wang (NIH, Baltimore, MD 21224, USA). Las ribo- y radiosondas fueron combinadas con ARNt desnaturalizadas por calor para el bloqueo de sitios inespecíficos de unión, y se disolvieron juntas en buffer de hibridización. Esta mezcla de sondas se aplicó a los portaobjetos (100  $\mu\text{l}$ /porta) y se hibridizaron a 55°C durante una noche en cámara húmeda. Luego, se lavaron en SSC 4X, fueron tratadas con ARNasa durante 30 minutos a 37°C y finalmente lavados con el buffer de la ARNasa, sin la enzima, durante 30 min a 37°C. A continuación de un lavado en SSC 2X a temperatura ambiente, los portaobjetos se lavaron en SSC 0,1X a 62 °C, se deshidrataron en distintas concentraciones de etanol, se incubaron en buffer de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (Roche, dilución 1:500). Los portaobjetos se lavaron en buffer y se incubaron con el sustrato de la fosfatasa alcalina de Vector Red (Vector labs, CA) por 1 h a temperatura ambiente. Se dejaron secar al aire, se los sumergió en emulsión Kodak NTB, se los guardó a 4°C y se los reveló 7-10 días después, momento en el que se les colocó el cubreobjetos. Los cortes de cerebro fueron analizados en un sistema de procesamiento de imágenes automático (Dr. Don Clifton, University of Washington) por una persona ciega al tratamiento. El *software* del procesador de imágenes permite contabilizar el número de puntos blancos (correspondientes a la hibridación con la ribosonda *Cb1*) en un área de interés, de modo que se puede determinar la densidad de *Cb1* tanto en cada célula DIG-positiva (la que hibrida con *Kiss1*, *Gnrh* o *Rfrp3*, detectables en color rojo mediante microscopio de fluorescencia) como en el fondo. De esta manera, se puede establecer una relación de *Cb1* célula/fondo (Di Giorgio y col. 2014). Se consideró *Cb1* positiva a cada célula cuya relación fuera mayor a 3, de modo que se pudo calcular el porcentaje de células *Rfrp3/Cb1* positivas en el DMN y el porcentaje de células *Gnrh/Cb1* positivas en animales tratados vía ip con LPS o su vehículo. Del mismo modo, se comparó la densidad de *Cb1* en el VMN entre ambos grupos. Los ensayos fueron realizados con la colaboración del Dr. Alexander Kauffman, UCSD, CA, USA.

### 3.10. Evaluación estadística de los resultados.

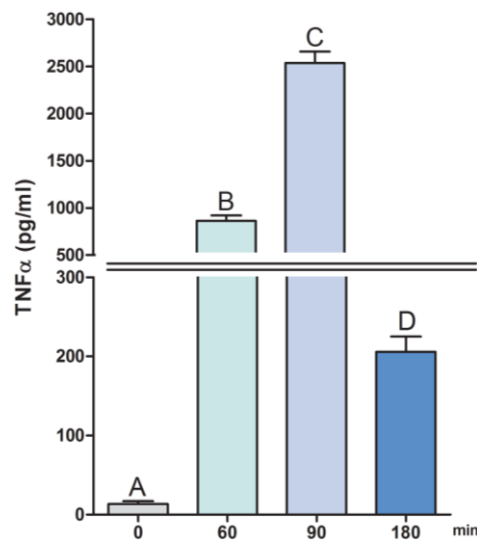
Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desvío estándar. Los datos fueron procesados utilizando el programa de acceso libre InfoStat (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba). La normalidad y la homogeneidad de varianzas para los conjuntos de datos fueron testeadas mediante los tests de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. En caso de no cumplirse estos supuestos, se transformaron los datos. La significancia de las diferencias observadas entre las medias fue determinada mediante análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores (factor LPS y factor antagonista), seguido por el test de Tukey en caso de ser necesario. En los casos que la transformación no haya conseguido que se cumplan los supuestos, se llevó a cabo el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por el test de Wilcoxon–Mann–Whitney. La comparación de sólo 2 grupos experimentales se realizó mediante el test *t* de student. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor  $P < 0.05$ . Cada determinación se realizó al menos por duplicado en grupos de animales diferentes. Las figuras representan resultados de experimentos individuales.

## **4. RESULTADOS**

## 4. Resultados

### 4.1. Parámetros neuroinmunoendocrinos en el modelo de desafío inmunológico

Como se mencionara en la introducción, la actividad del eje reproductivo puede verse alterada en condiciones inflamatorias inducidas por un desafío inmunológico. Primeramente estudiamos, en nuestro modelo de desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip), el momento a partir del cual el incremento en los niveles séricos e hipotalámicos de citoquinas proinflamatorias conduce a la inhibición del eje reproductivo. Como puede observarse en la figura 4.1, la administración de LPS provocó un aumento de la concentración sérica de TNF $\alpha$  a partir de los 30 minutos, alcanzando su pico máximo de concentración a los 90 minutos post-LPS y manteniéndose elevada al menos hasta los 180 minutos con respecto a los niveles basales de esta citoquina.

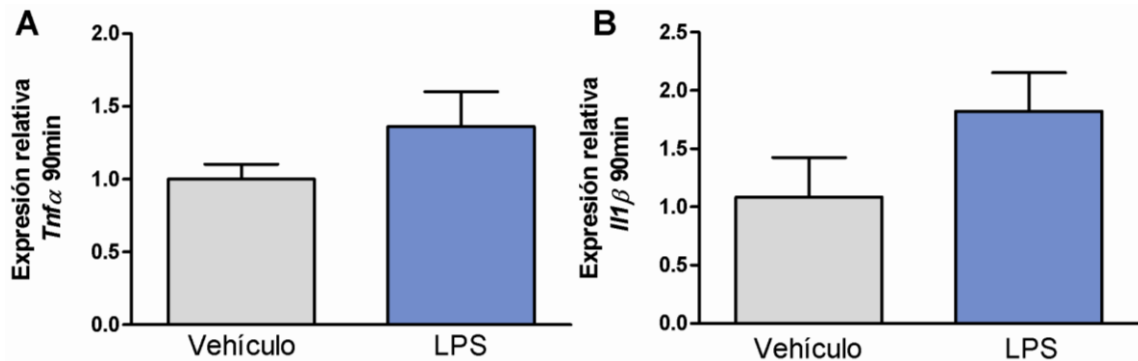


**Figura 4.1. Concentración sérica de TNF $\alpha$  a distintos tiempos post-LPS.** Se extrajo sangre de animales a distintos tiempos respecto a la administración de LPS y se determinó mediante ELISA la concentración de TNF $\alpha$  en suero. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=7 para cada grupo. El análisis mediante ANOVA de una vía se realizó sobre la raíz cuadrada de los datos para el cumplimiento de los supuestos requeridos, obteniéndose diferencias significativas entre los grupos ( $F_{3, 27}=493.58$ ,  $P<0.0001$ ). Las diferencias entre cada uno de los grupos fueron estudiadas mediante análisis *post-hoc* y se muestran en el gráfico, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

A partir de estos resultados, evaluamos los niveles del ARNm de *Tnfa* e *Il1 $\beta$*  hipotalámicos a los 90 minutos post-LPS. A diferencia de lo observado a nivel sistémico,

## RESULTADOS

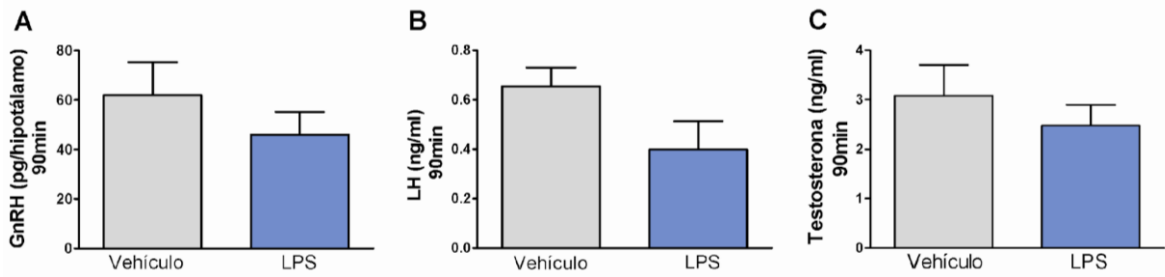
el LPS no alteró significativamente el estado inflamatorio hipotalámico a ese tiempo, al menos en cuanto a la síntesis de mensajero de las citoquinas proinflamatorias estudiadas (Fig 4.2).



**Figura 4.2 Determinación de los niveles del ARNm de citoquinas proinflamatorias en hipotálamo a los 90 minutos post-LPS.** Los niveles del ARNm de *Tnfα* (A) e *Il1β* (B) fueron determinados mediante qPCR a partir de los hipotálamos de ratas tratadas con LPS o su vehículo por vía ip. Se muestra el resultado del análisis por  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando como gen normalizador el *L32*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student no mostró diferencias significativas (*Tnfα*,  $t_8=1.28$ ,  $P=1.28$ ; *Il1β*,  $t_8=1.54$ ,  $P=0.16$ ).

Si bien no observamos inducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias en el hipotálamo a los 90 minutos post-LPS, estudiamos la actividad del eje reproductivo a ese tiempo, dado que el LPS puede provocar alteraciones en la permeabilidad de la BHE, permitiendo el ingreso de leucocitos y factores proinflamatorios desde la periferia hacia el SNC que pueden alterar las funciones hipotalámicas antes de inducirse la respuesta inflamatoria propiamente dicha. Los resultados indicaron que el LPS tampoco modificó los niveles de GnRH, LH, ni testosterona a los 90 minutos (Fig 4.3).

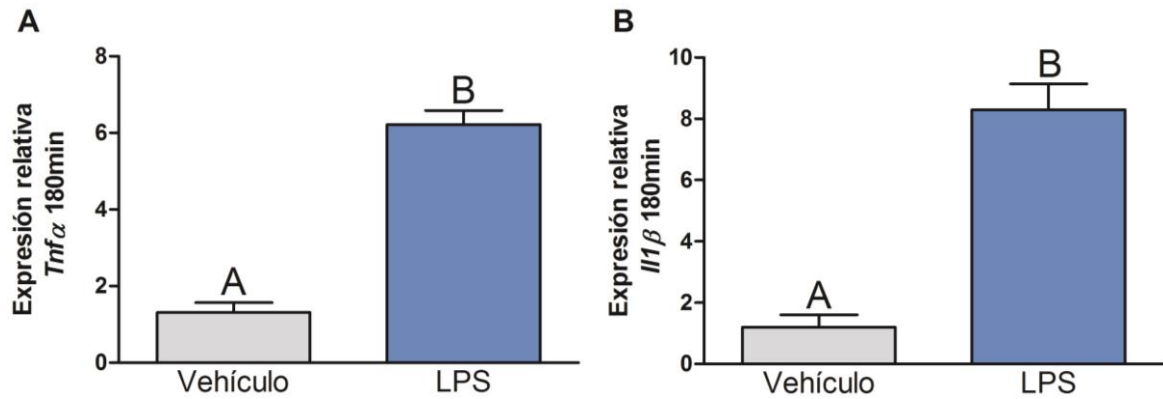
## RESULTADOS



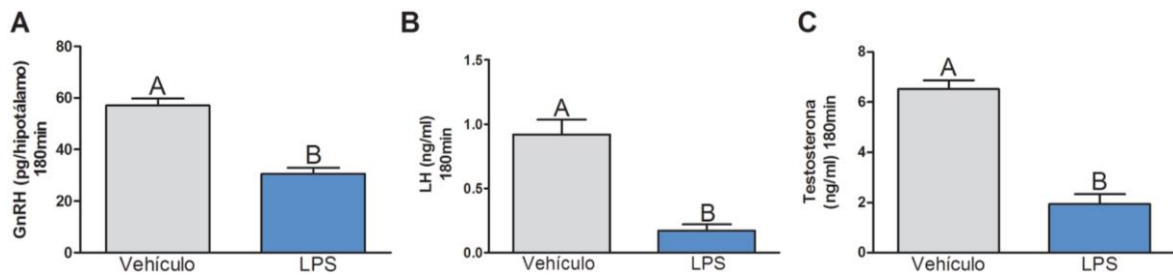
**Figura 4.3. Determinación de los niveles de hormonas del eje reproductivo a los 90 minutos post-LPS.** El contenido hipotalámico de GnRH (A) y la concentración sérica de LH (B) fueron determinados por radioinmunoensayo y la concentración sérica de testosterona (C) por ELISA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES;  $n=5$  para cada grupo. El análisis estadístico mediante la prueba  $t$  de Student no mostró diferencias significativas (GnRH,  $t_8=0.99$ ,  $P=0.35$ ; LH,  $t_8=1.85$ ,  $P=0.10$ ; testosterona,  $t_8=0.80$ ,  $P=0.44$ ).

Dado que no evidenciamos alteraciones en la actividad del eje HPT a los 90 minutos post-LPS, estudiamos los mismos parámetros a los 180 minutos. A diferencia de lo observado a los 90 minutos post-LPS, a los 180 minutos se encontró un aumento significativo en los niveles hipotalámicos del ARNm de *Tnfa* e *Il1 $\beta$*  (Fig 4.4), junto con una disminución significativa del contenido de GnRH. A nivel sérico, los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de LH y testosterona (Fig 4.5). A partir de estos resultados, estudiamos la participación del SEC hipotalámico en los mecanismos que conducen la inhibición del eje HPT a los 180 minutos post-LPS.

## RESULTADOS



**Figura 4.4. Determinación de los niveles del ARNm de citoquinas proinflamatorias en hipotálamo a los 180 minutos post-LPS.** Los niveles del ARNm de *Tnfα* (A) e *Il1β* (B) fueron determinados mediante qPCR a partir de los hipotálamos de las ratas tratadas con LPS o su vehículo por vía ip. Se muestra el resultado del análisis por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando como gen normalizador el *L32*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student mostró diferencias significativas (*Tnfα*,  $t_8=11.08$ ,  $P<0.0001$ ; *Il1β*,  $t_8=5.66$ ,  $P=0.0002$ ) donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).



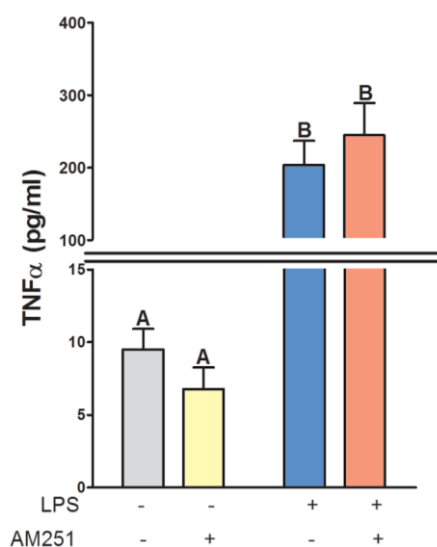
**Figura 4.5. Determinación de los niveles de hormonas del eje reproductivo a los 180 minutos post-LPS.** El contenido hipotalámico de GnRH (A) y la concentración sérica de LH (B) fueron determinados por radioinmunoensayo y la concentración sérica de testosterona (C) por ELISA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES. \*\*\* $P<0.001$  respecto a vehículo; n=5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student mostró diferencias significativas (GnRH,  $t_8=7.36$ ,  $P=0.0001$ ; LH,  $t_8=5.97$ ,  $P=0.0003$ ; testosterona,  $t_8=9.02$ ,  $P<0.0001$ ) donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).



## 4.2. Participación del receptor hipotalámico CB1

### 4.2.1. Participación del receptor CB1 hipotalámico en la expresión de citoquinas en el modelo de desafío inmunológico.

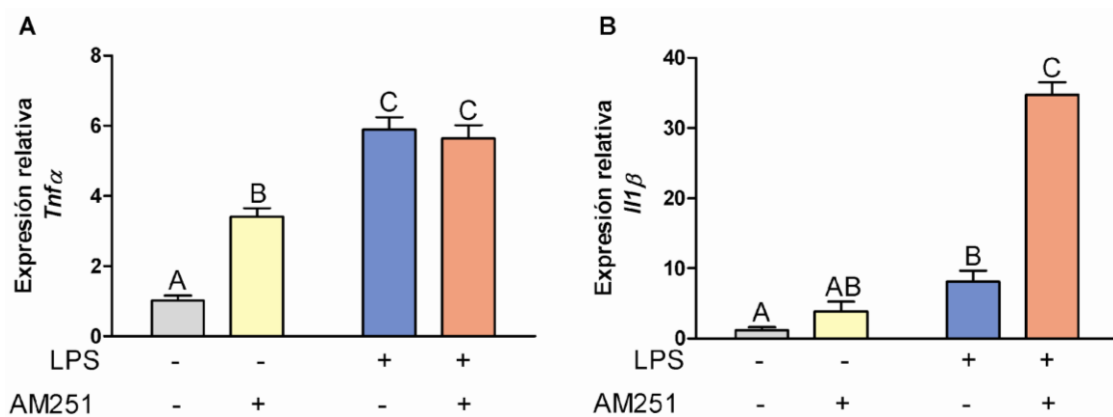
Con el objetivo de determinar la participación del receptor cannabinoide CB1 hipotalámico en la inhibición del eje reproductivo inducida por un desafío inmunológico con LPS, se administró endotoxina por vía ip a ratas previamente tratadas vía icv con AM251, el antagonista de receptores CB1. Determinamos la concentración sérica de TNF $\alpha$  (Fig 4.6), encontrando que el bloqueo farmacológico de CB1 hipotalámico no provocó cambios significativos en la concentración sérica de esta citoquina en los animales que recibieron LPS ni en los que recibieron su vehículo. Por lo tanto, el bloqueo hipotalámico de CB1 no modificó el efecto estimulador del LPS sobre los niveles séricos de TNF $\alpha$ .



**Figura 4.6. Concentración sérica de TNF $\alpha$  a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con AM251.** La concentración sérica de TNF $\alpha$  en ratas tratadas con AM251 (500ng/5 $\mu$ l, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip) fue determinada mediante ELISA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=5 para cada grupo. El análisis mediante el test de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los grupos ( $H=12.96$ ,  $P=0.0047$ ). Se estudiaron las diferencias entre cada uno de los grupos mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

## RESULTADOS

Evaluamos el efecto del bloqueo de los CB1 hipotalámicos sobre los niveles del ARNm de *Tnf $\alpha$*  e *Il1 $\beta$*  incrementados por el desafío inmunológico (Fig 4.7). Los resultados indicaron que tanto el bloqueo de los CB1 como la administración de LPS incrementaron los niveles hipotalámicos del ARNm de *Tnf $\alpha$* . Sin embargo, el aumento inducido por LPS fue significativamente mayor al provocado por AM251. Además, el bloqueo de CB1 no modificó el efecto estimulador inducido por el LPS. Respecto a los niveles hipotalámicos del ARNm de *Il1 $\beta$* , el bloqueo farmacológico de los CB1 no tuvo efecto *per se* pero exacerbó significativamente el aumento inducido por la endotoxina.



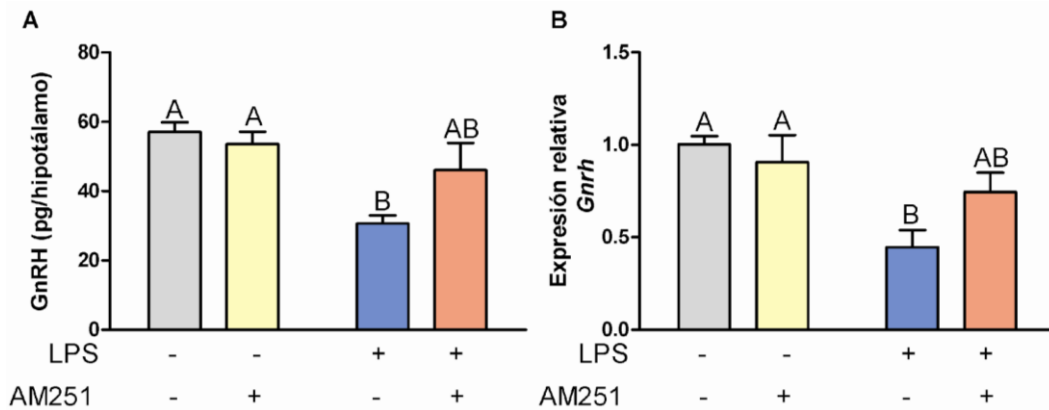
**Figura 4.7. Niveles del ARNm de citoquinas hipotalámicas a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con AM251.** Los niveles del ARNm de *Tnf $\alpha$*  (A) e *Il1 $\beta$*  (B) fueron determinados mediante qPCR a partir de hipotálamos de ratas tratadas con AM251 (500ng/5 $\mu$ l, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Se muestra el resultado del análisis por  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando a *L32* como gen normalizador. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=5 para cada grupo. El análisis estadístico mostró interacción de factores para ambos parámetros (ANOVA *Tnf $\alpha$* <sub>interacción</sub>:  $F_{1,18}=16.08$ ,  $P=0.0007$ ; *Il1 $\beta$* <sub>interacción</sub>,  $F_{1,18}=64.98$ ,  $P<0.0001$ ). Se estudiaron las diferencias cada parámetro medido entre los grupos mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

### 4.2.2. Participación del receptor CB1 hipotalámico sobre parámetros del eje reproductivo en el modelo de desafío inmunológico

Con el propósito de estudiar la posible participación del receptor cannabinoide CB1 hipotalámico como mediador de la inhibición del eje reproductivo inducida por un desafío inmunológico, se determinó la producción hipotalámica de GnRH cuantificando la

## RESULTADOS

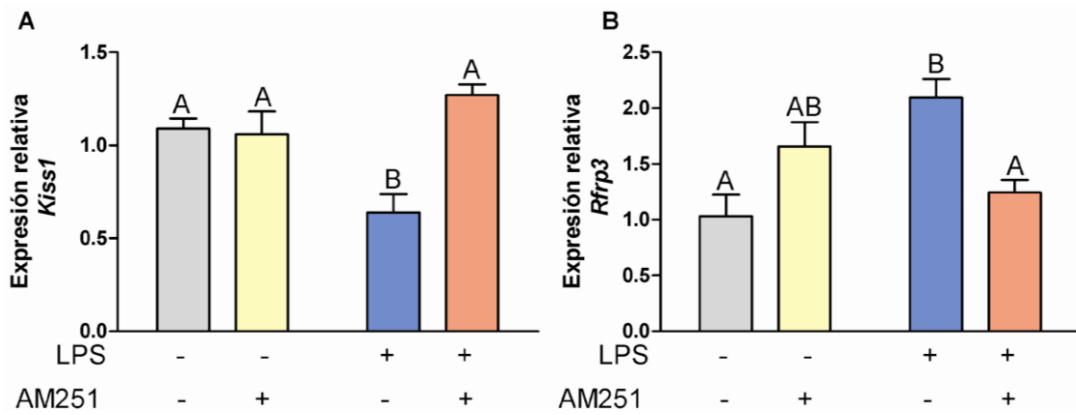
cantidad relativa de su ARNm y el contenido del decapeptido (Fig 4.8). Ambas determinaciones evidenciaron una disminución de la producción hipotalámica de GnRH durante el desafío inmunológico, la cual dejó de observarse con el bloqueo de los CB1 hipotalámicos.



**Figura 4.8. Producción hipotalámica de GnRH a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con AM251.** Los niveles proteicos de GnRH (A) fueron determinados mediante radioinmunoensayo y su ARNm (B) por qPCR a partir de los hipotálamos de ratas tratadas con AM251 (500ng/5µl, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). En el caso de (B), se muestra el resultado del análisis por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando el *L32* como gen normalizador. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante ANOVA de los niveles proteicos no mostró interacción de factores ( $F_{1,18}=4.20$ ,  $P=0.057$ ) ni efectos principales del antagonista ( $F_{1,18}=1.66$ ,  $P=0.21$ ), pero sí del factor LPS ( $F_{1,18}=13.47$ ,  $P=0.0021$ ). El mismo patrón se observó en los niveles del ARNm de *Gnrh* (Interacción,  $F_{1,18}=3.13$ ,  $P=0.09$ ; Antagonista  $F_{1,18}=0.82$ ,  $P=0.37$ ; LPS  $F_{1,18}=10.38$ ,  $P=0.0047$ ). Las diferencias de cada parámetro medido entre los grupos fueron estudiadas mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

Además, dado que los neuropéptidos kisspeptina y RFRP-3 modulan la actividad de GnRH (Ducret, Anderson, y Herbison 2009; Han y col. 2005) y que su actividad puede verse alterada por LPS (Iwasa y col. 2014; Matsuyama y col. 2011), se midieron los niveles del ARNm de los neuropéptidos *Kiss1* y *Rfrp3* (Fig 4.9). Los resultados indicaron que los niveles del ARNm de *Kiss1* disminuyeron significativamente durante el desafío inmunológico y que dicho efecto fue completamente prevenido por el bloqueo concomitante de los CB1. Respecto al ARNm de *Rfrp3*, el desafío inmunológico provocó un incremento significativo de sus niveles, que fue prevenido por el bloqueo de los receptores CB1 hipotalámicos.

## RESULTADOS

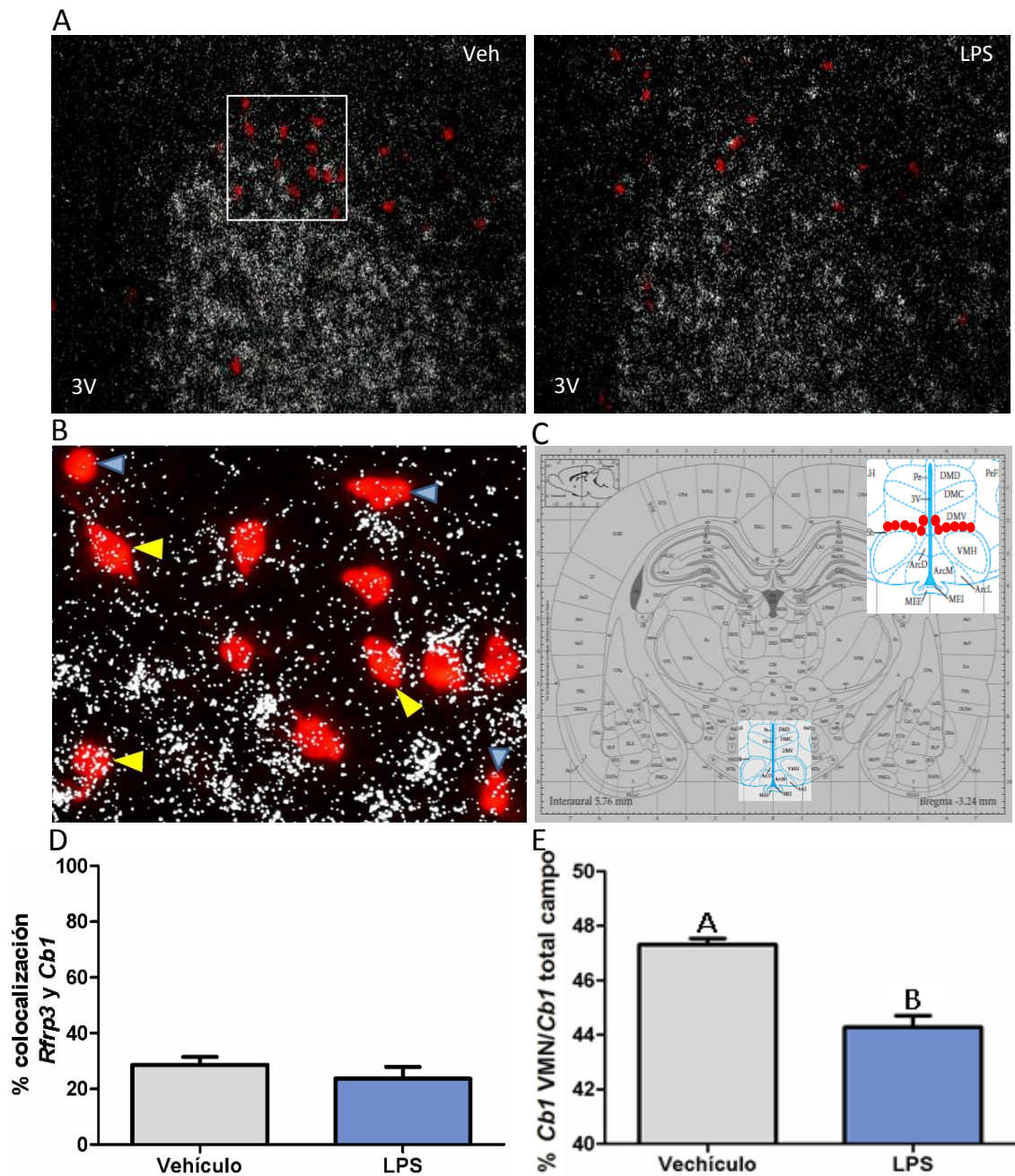


**Figura 4.9. Determinación de neuropéptidos hipotalámicos regulatorios de la actividad de GnRHn a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con AM251.** Los niveles del ARNm de *Kiss1* (A) y *Rfrp3* (B) fueron determinados mediante qPCR a partir de los hipotálamos de ratas tratadas con AM251 (500ng/5µl, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Se muestra el resultado del análisis por  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando el *L32* como gen normalizador. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=5-4 para cada grupo. El análisis estadístico mediante ANOVA mostró interacción de factores significativa tanto para *Kiss1* como para *Rfrp3* ( $Kiss1_{interacción}$ ,  $F_{1,17}=8.07$ ,  $P=0.012$ ;  $Rfrp3_{interacción}$ ,  $F_{1,17}=17.43$ ,  $P=0.0008$ ). Se estudiaron las diferencias de cada parámetro medido entre los grupos mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

Con el fin de profundizar aún más en el estudio de la participación del receptor CB1, evaluamos si el efecto observado se produce directamente en las neuronas productoras de cada uno de los neuropéptidos hipotalámicos evaluados que controlan el eje HPT o indirectamente vía la activación de otras neuronas y/o células gliales. Para ello, se evaluó el grado de expresión del ARNm de *Cbl* en las neuronas productoras de RFRP-3, kisspeptina y GnRH mediante hibridación *in situ* (HIS), y adicionalmente, se estudiaron eventuales modificaciones en su colocalización luego del desafío inmunológico. A nivel del DMN del hipotálamo, donde se encuentran las neuronas RFRP-3 positivas, se encontró un 30% de expresión del ARNm para *Cbl*. Además, no se modificó significativamente el número de células que coexpresan *Rfrp3/Cbl* en animales sometidos a un desafío inmunológico al cabo de 180 minutos post-LPS (Fig 4.10). Un análisis cualitativo de las imágenes obtenidas evidenció que las neuronas que expresan *Rfrp3* se disponen en las adyacencias de un área que posee una alta expresión del receptor *Cbl* y se corresponde con la localización del núcleo VMN hipotalámico. Evaluamos entonces, mediante HIS, la expresión del ARNm para el receptor CB1 transcurridos 180 minutos del desafío inmunológico en este núcleo (Fig 4.10). El análisis estadístico indicó

## RESULTADOS

que el LPS disminuyó significativamente la expresión del ARNm de *Cb1* en el núcleo VMN.



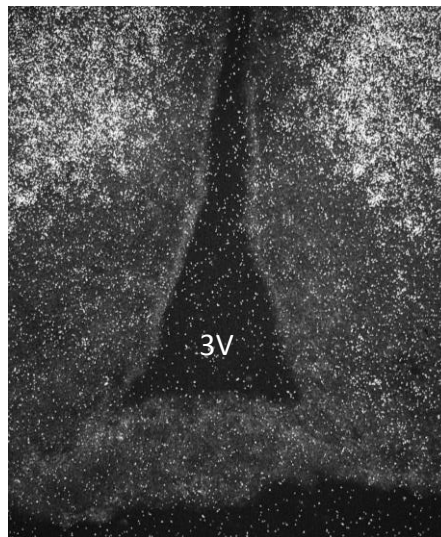
**Figura 4.10.** Nivel de colocalización del ARNm de *Cb1* en células que expresan ARNm de *Rfrp3* y patrón de expresión de *Cb1* en el VMN hipotalámico a los 180 minutos post-LPS.

(A) Imagen de microscopia de fluorescencia que muestra la expresión del ARNm de *Cb1* (puntos blancos) en células que expresan ARNm de *Rfrp3* (fluorescencia roja) en el DMN hipotalámico, determinado por HIS, en animales tratados con LPS o su vehículo. Se puede observar que las células *Rfrp3* positivas se disponen rodeando una zona de alta expresión de *Cb1*, que se corresponde con la ubicación del VMN hipotalámico. 3V: 3er ventrículo. El recuadro se muestra un amplificado en (B), con flechas amarillas que

## RESULTADOS

indican coexpresión de *Rfrp3/Cb1* y flechas azules que indican células *Rfrp3* sin expresión de *Cb1*. En (C) se muestra el esquema de un corte transversal de cerebro de rata en las coordenadas donde se realizó nuestro corte y se encuentran los núcleos arcuato y DMN (en el recuadro superior izquierdo se muestra su ubicación en un corte sagital). En celeste se observa la ubicación de estos núcleos, y aumentado en el cuadro superior derecho se muestra la disposición de las células *Rfrp3* positivas (círculos rojos) adyacentes al VMN. 3V: 3er ventrículo; ArcD, ArcM, ArcL: regiones dorsal, medial, y lateral del núcleo arcuato; DMD, DMC, DMV: regiones dorsal, central, y ventral del DMN; MEE, MEI: regiones externa e interna de la eminencia media; Pe: núcleo periventricular, VMH: núcleo ventromedial. Adaptado de Paxinos y Watson (2007). (D) Se observa que aproximadamente el 30% de las células *Rfrp3* positivas expresaron ARNm de *Cb1*, y que el tratamiento con LPS no modificó significativamente el número de células doble positivas *Rfrp3/Cb1*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES;  $n=6$  para cada grupo (Prueba *t* de Student, colocación  $t_{10}=1.00$ ,  $P=0.34$ ). (E) Figura de la cuantificación de células *Cb1* positivas. El tratamiento con LPS disminuyó significativamente la expresión de *Cb1* en el VMN hipotalámico. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ );  $n=5$  para cada grupo (Prueba *t* de Student, expresión *Cb1*,  $t_8=6.26$ ,  $P=0.0002$ ).

Analizando en detalle la zona del núcleo arcuato, donde se ubican las neuronas productoras de kisspeptina, se detectó una muy baja expresión del ARNm de *Cb1* en ambos grupos experimentales, de modo que descartamos la posibilidad de una modulación directa de los receptores CB1 sobre las neuronas kisspeptidérgicas (Fig 4.11).

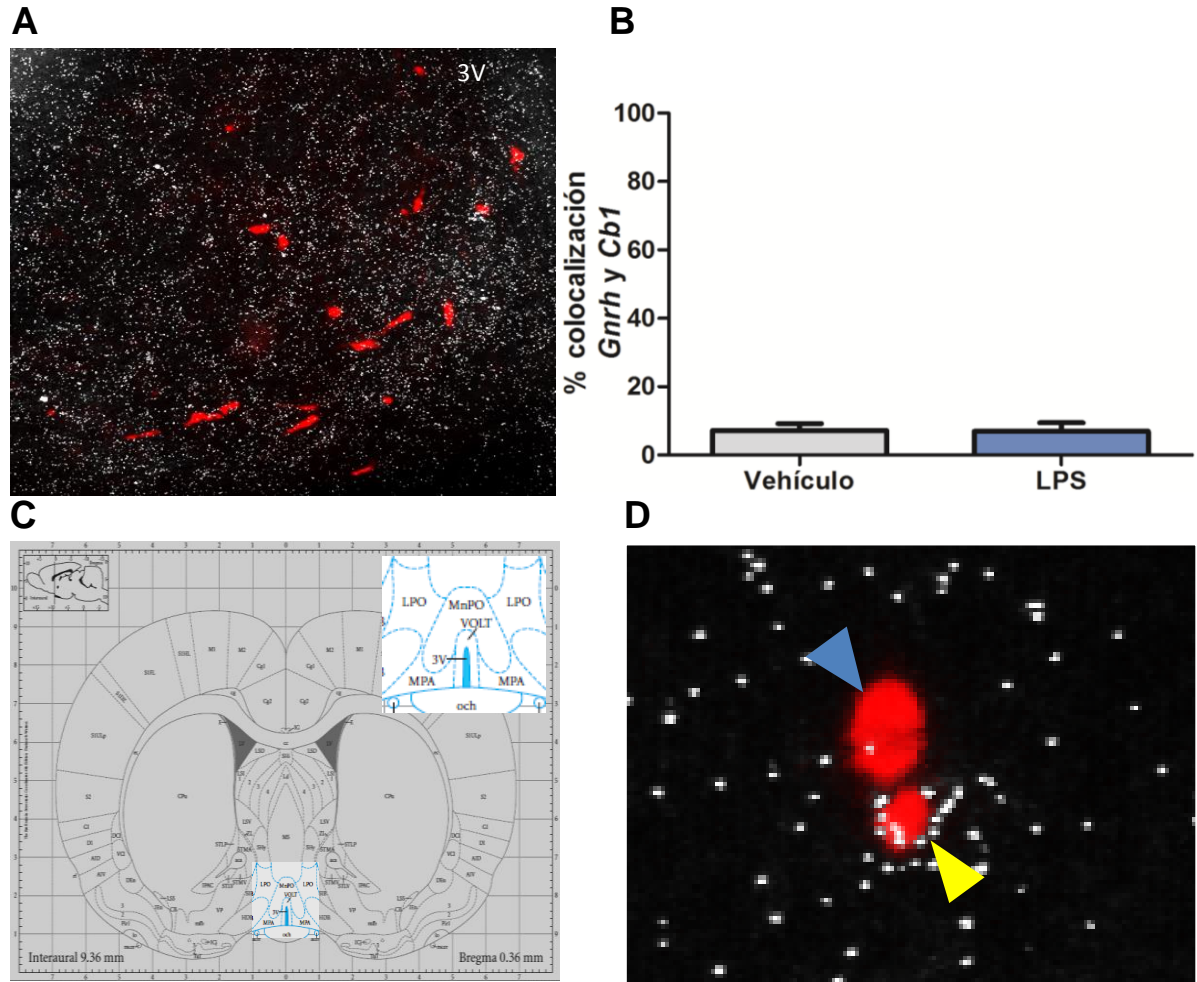


**Figura 4.11. Expresión de *Cb1* en el núcleo arcuato.** Imagen representativa de expresión del ARNm de *Cb1* (puntos blancos) en el núcleo arcuato, determinado por hibridación *in situ* en cortes de cerebro de ratas macho adultas. No se observa expresión de *Cb1* en la zona analizada. 3V: 3er ventrículo;  $n=6$  para cada grupo.



## RESULTADOS

A nivel del área preóptica, se encontró aproximadamente un 10% de colocación *Gnrh/Cb1*, y el análisis estadístico indicó que la expresión de *Cb1* en las células *Gnrh* positivas no se vio modificada por el tratamiento con LPS (Fig 4.12).

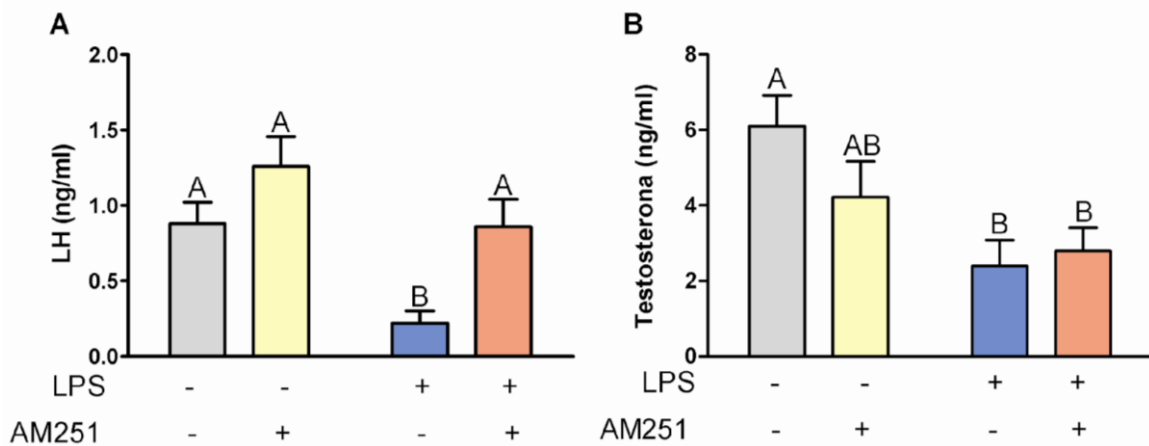


**Figura 4.12.** Nivel de colocación del ARNm de *Cb1* en células que expresan ARNm de *Gnrh* a los 180 minutos post-LPS. Imagen representativa (A) de la expresión del ARNm de *Cb1* (puntos blancos) en células que expresan ARNm de *Gnrh* (fluorescencia roja) en el área preóptica, determinada por hibridación *in situ* en cortes de cerebros de ratas macho adultas. (B) Cuantificación de la colocación *Cb1* en células *Gnrh* positivas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES;  $n=6$  para cada grupo. Aproximadamente el 10% de las células *Gnrh* positivas coexpresaron el ARNm de *Cb1*, mientras que la administración de LPS no modificó significativamente el número de células doble positivas *Gnrh/Cb1* (Prueba *t* de Student, colocación  $t_{10}=0.07$ ,  $P=0.94$ ). En (C) se muestra el esquema de un corte transversal de cerebro de rata en las coordenadas donde se realizó nuestro corte y se encuentra el área preóptica (en el recuadro superior izquierdo se muestra su ubicación en un corte sagital). En celeste se observa la ubicación de estos núcleos. 3V: 3er ventrículo; acer: arteria cerebral anterior; LPO: área preóptica lateral; MnPO: núcleo preóptico medio; MPA: área preóptica medial; och: quiasma óptico;

## RESULTADOS

VOLT: órgano vasculoso de la lámina terminal. Adaptado de Paxinos y Watson (2007). En (D) se muestra un ejemplo de dos células *Gnrh* positivas con (flecha amarilla) y sin expresión (flecha azul) de *Cbl*.

Una vez estudiada la participación del receptor hipotalámico CB1 sobre los principales neuropéptidos hipotalámicos que modulan al eje reproductivo, evaluamos el grado de alcance de los efectos del bloqueo del receptor CB1 hipotalámico, determinando los niveles séricos de LH y testosterona. De manera similar a lo observado con GnRH, la concentración sérica de LH se vio disminuida significativamente en respuesta al desafío inmunológico, mientras que el bloqueo de los CB1 hipotalámicos previno totalmente este efecto (Fig 4.13). Respecto a los niveles de testosterona, el desafío inmunológico redujo significativamente su concentración sérica, pero el bloqueo de los CB1 hipotalámicos no modificó este efecto inhibitorio. En conjunto, los resultados demuestran por primera vez la participación del receptor CB1 hipotalámico en los mecanismos que subyacen a la inhibición del eje HPT inducida por un desafío inmunológico en un modelo *in vivo*.



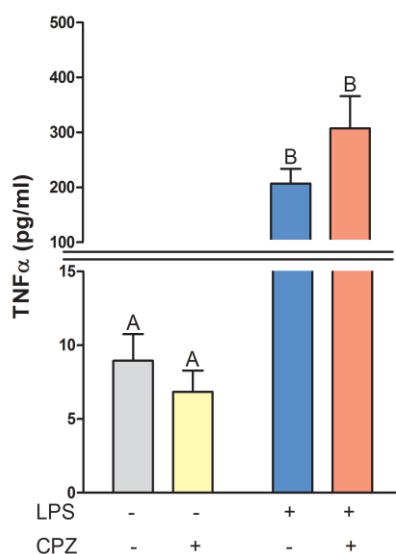
**Figura 4.13. Determinación de la concentración sérica de LH y testosterona a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con AM251.** La concentración sérica de LH (A) fue determinada mediante radioinmunoensayo y de testosterona (B) mediante ELISA, en ratas tratadas con AM251 (500ng/5µl, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=4-5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante ANOVA para LH no mostró interacción de factores significativa pero sí efectos principales significativos del factor LPS y el factor antagonista (LH<sub>interacción</sub>,  $F_{1,18}=0.69$ ,  $P=0.41$ ; LH<sub>LPS</sub>,  $F_{1,18}=11.47$ ,  $P=0.0038$ ; LH<sub>antagonista</sub>;  $F_{1,18}=10.62$ ,  $P=0.0049$ ). El análisis para testosterona no mostró interacción de factores ni efectos principales significativos del factor antagonista, pero sí efectos principales significativos del factor LPS (testosterona<sub>interacción</sub>,  $F_{1,17}=2.15$ ,  $P=0.162$ ; testosterona<sub>LPS</sub>,  $F_{1,17}=10.86$ ,  $P=0.0049$ ; testosterona<sub>antagonista</sub>;  $F_{1,17}=0.91$ ,  $P=0.35$ ). Las diferencias de cada parámetro medido entre los grupos fueron estudiadas mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).



### 4.3. Participación del receptor TRPV1 hipotalámico

#### 4.3.1. Participación del receptor TRPV1 hipotalámico en la expresión de citoquinas en el modelo de desafío inmunológico

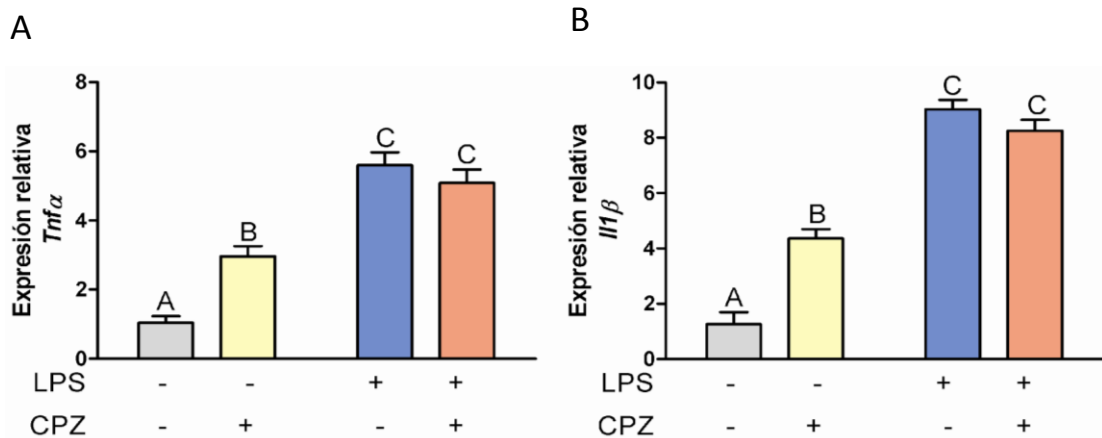
El receptor TRPV1 posee una alta expresión en el SNC, por lo que decidimos evaluar su participación en la inhibición el eje reproductivo durante un desafío inmunológico. Para ello administramos una inyección de LPS o su vehículo a ratas que habían recibido previamente via icv capsazepina (CPZ), un antagonista del receptor TRPV1. La determinación de la concentración sérica de TNF $\alpha$  se muestra en la figura 4.14. Los resultados indicaron que el bloqueo farmacológico de los receptores TRPV1 hipotalámicos no modificó el aumento de TNF $\alpha$  sistémico inducido por LPS.



**Figura 4.14. Concentración sérica de TNF $\alpha$  a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con CPZ.** La concentración sérica de TNF $\alpha$  fue determinada mediante ELISA en sueros de ratas tratadas vía icv con CPZ (500ng/5 $\mu$ l, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=4-5 para cada grupo. El análisis mediante el test de Kruskal-Wallis para TNF $\alpha$  indicó diferencias significativas entre los grupos ( $H=13.61$ ,  $P=0.0035$ ). Se estudiaron las diferencias entre cada uno los grupos mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

## RESULTADOS

Seguidamente, se evaluaron los niveles del ARNm de *Tnfa* e *Il1β* en el hipotálamo de ratas sometidas al desafío inmunológico y/o al bloqueo farmacológico de los TRPV1 (Fig 4.15). Los resultados indicaron que tanto en bloqueo de los TRPV1 como la administración de LPS incrementaron los niveles hipotalámicos del ARNm de *Tnfa* e *Il1β*. Sin embargo, el aumento inducido por LPS fue significativamente mayor que el provocado por CPZ. Asimismo, el bloqueo de TRPV1 no modificó el efecto estimulador del LPS.



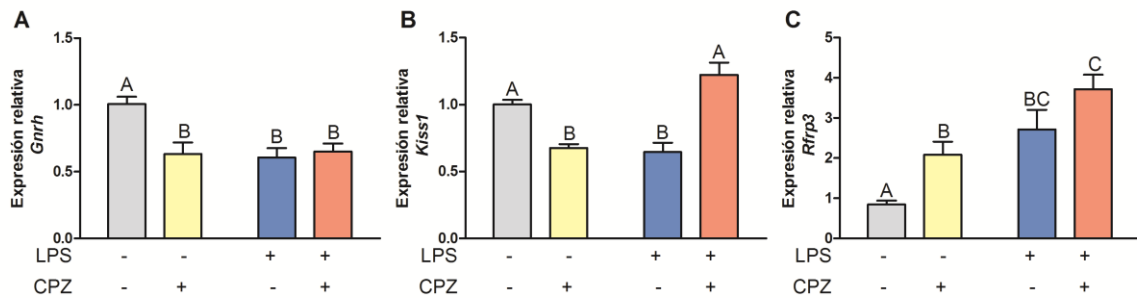
**Figura 4.15. Niveles del ARNm de citoquinas hipotalámicas a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con CPZ.** Los niveles del ARNm de *Tnfa* (A) e *Il1β* (B) fueron determinados mediante qPCR a partir de los hipotálamos de ratas tratadas con CPZ (500ng/5μl, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Se muestra el resultado del análisis por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando el *L32* como gen normalizador. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante ANOVA mostró una interacción de factores para ambos parámetros (*Tnfa*<sub>interacción</sub>:  $F_{1,18}=8.68$ ,  $P=0.0113$ ; *Il1β*<sub>interacción</sub>:  $F_{1,18}=23.43$ ,  $P=0.0002$ ). Las diferencias de cada parámetro medido entre los grupos fueron estudiadas mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

### 4.3.2. Participación del receptor TRPV1 hipotalámico sobre parámetros del eje reproductivo en el modelo de desafío inmunológico

Se evaluaron los niveles del ARNm de factores hipotalámicos que regulan la actividad del eje HPT (Fig 4.16), observando para *Gnrh* y *Kiss1* que tanto el desafío inmunológico como el bloqueo de los TRPV1 hipotalámicos disminuyeron sus niveles. El bloqueo de TRPV1 no modificó la inhibición en los niveles de *Gnrh* producida por el desafío

## RESULTADOS

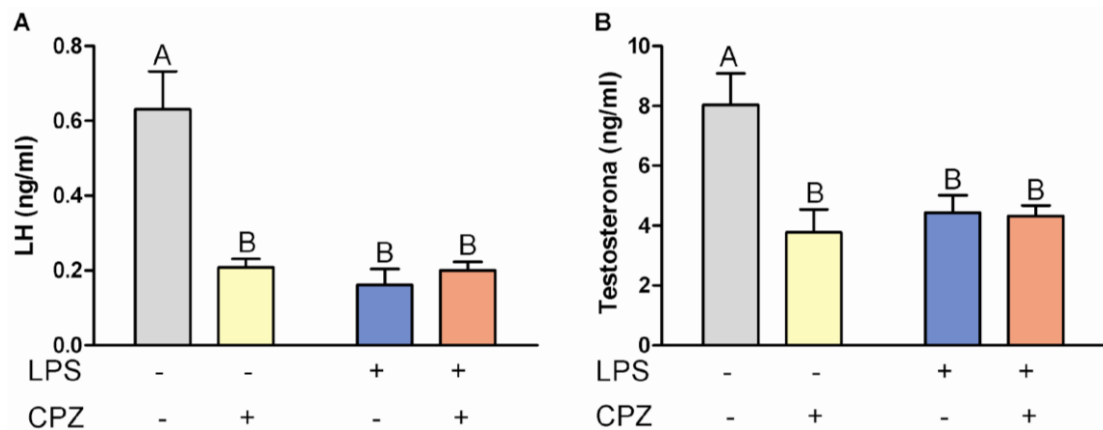
inmunológico, aunque previno los efectos inhibitorios sobre *Kiss1*. Por su parte, el ARNm del neuropéptido inhibitorio *Rfrp3* incrementó significativamente sus niveles tanto en respuesta al bloqueo farmacológico de los TRPV1 como al desafío inmunológico. La acción concomitante de ambas condiciones provocó un aumento significativamente mayor al observado en las ratas con bloqueo de TRPV1 exclusivamente.



**Figura 4.16. Niveles del ARNm de neuropéptidos hipotalámicos del eje reproductivo a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con CPZ.** Se determinaron los niveles del ARNm de *Gnrh* (A), *Kiss1* (B) y *Rfrp3* (C) mediante qPCR a partir de los hipotálamos de ratas tratadas con CPZ (500ng/5 $\mu$ l, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Se muestra el resultado del análisis por  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando el *L32* como gen normalizador. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=4-5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante ANOVA mostró interacción de factores significativa tanto para *Gnrh* como para *Kiss1* ( $Gnrh_{interacción}$ ,  $F_{1,18}=9.71$ ,  $P=0.006$ ;  $Kiss1_{interacción}$ ,  $F_{1,16}=40.91$ ,  $P<0.0001$ ). Respecto al análisis de *Rfrp3*, no se encontró una interacción significativa de factores, aunque se encontraron efectos principales significativos de los factores LPS y antagonista por separado ( $Rfrp3_{interacción}$ ,  $F_{1,18}=0.48$ ,  $P=0.49$ ;  $Rfrp3_{LPS}$ ,  $F_{1,18}=23.50$ ,  $P=0.0001$ ;  $Rfrp3_{antagonista}$ ,  $F_{1,18}=11.87$ ,  $P=0.0023$ ). Las diferencias de cada parámetro medido entre los grupos fueron estudiadas mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

Asimismo, determinamos la concentración sérica de LH y testosterona (Fig 4.17), observando que tanto el bloqueo farmacológico de los TRPV1 como el desafío inmunológico provocaron una disminución de la concentración sérica de ambas hormonas, y que el bloqueo del TRPV1 hipotalámico no modificó los efectos inhibitorios del LPS.

## RESULTADOS



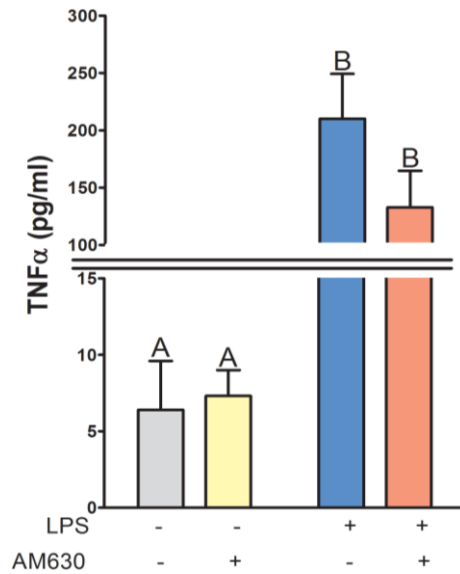
**Figura 4.17. Determinación de la concentración sérica de LH y testosterona a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con CPZ.** Se determinó la concentración sérica de LH (A) mediante radioinmunoensayo y la de testosterona (B) mediante ELISA, en ratas tratadas con CPZ (500ng/5µl, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=4-5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante ANOVA tanto para LH como para testosterona indicó una interacción de factores significativa ( $LH_{interacción}$ ,  $F_{1,16}=26.77$ ,  $P=0.0001$ ;  $testosterona_{interacción}$ ,  $F_{1,16}=6.16$ ,  $P=0.02$ ). Las diferencias de cada parámetro medido entre los grupos fueron estudiadas mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

### 4.4. Participación del receptor hipotalámico CB2

#### 4.4.1. Participación del receptor CB2 hipotalámico en la expresión de citoquinas en el modelo de desafío inmunológico

Dado que el receptor cannabinoide CB2 se expresa en las células de la glía del SNC, estudiamos su posible participación en el control de la producción hipotalámica de citoquinas proinflamatorias que inhiben la actividad del eje reproductivo. Para ello, se expuso a un desafío inmunológico a ratas machos que habían recibido previamente AM630 (un antagonista del receptor CB2) a nivel hipotalámico. La determinación de la concentración sérica de  $TNF\alpha$  se muestra en la figura 4.18. El análisis estadístico indicó que el bloqueo hipotalámico de los CB2 no modificó significativamente los niveles séricos de la citoquina ni en presencia ni en ausencia de LPS.

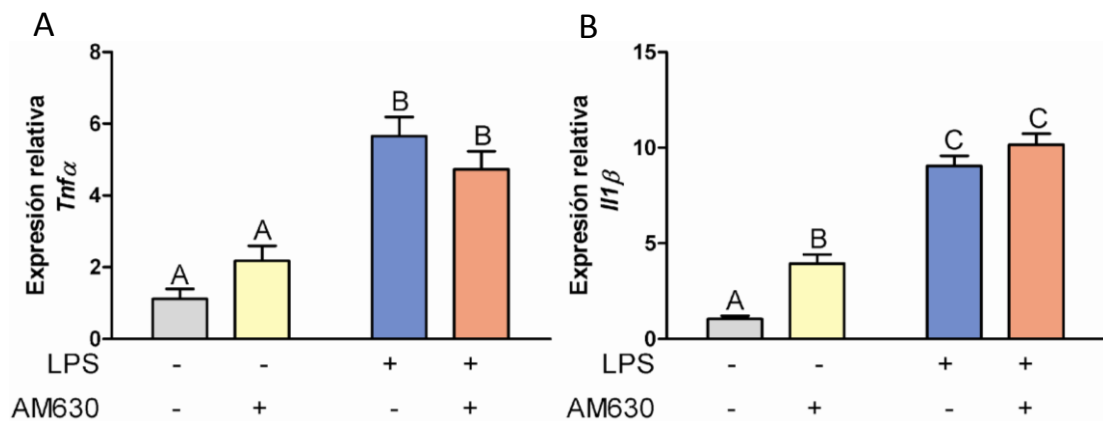
## RESULTADOS



**Figura 4.18. Concentración sérica de TNF $\alpha$  a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con AM630.** Se determinó la concentración sérica de TNF $\alpha$  mediante ELISA en ratas tratadas con AM630 (500ng/5 $\mu$ l, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=5 para cada grupo. El análisis mediante el test de Kruskal-mostró diferencias significativas entre los grupos ( $H=10.14$ ,  $P=0.017$ ). Las diferencias entre cada uno los grupos fueron estudiadas mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

Adicionalmente, se determinaron los niveles del ARNm para *Tnfa* e *Il1 $\beta$*  en el hipotálamo de estos animales. Los resultados indicaron que el desafío inmunológico incrementó significativamente los niveles de ambos parámetros y que el bloqueo de los receptores CB2 hipotalámicos en ausencia de LPS aumentó significativamente los niveles de *Il1 $\beta$* . La acción conjunta de ambos tratamientos no mostró efectos distintos al inducido sólo por la endotoxina respecto a los niveles de mensajero de ambas citoquinas (Fig 4.19).

## RESULTADOS

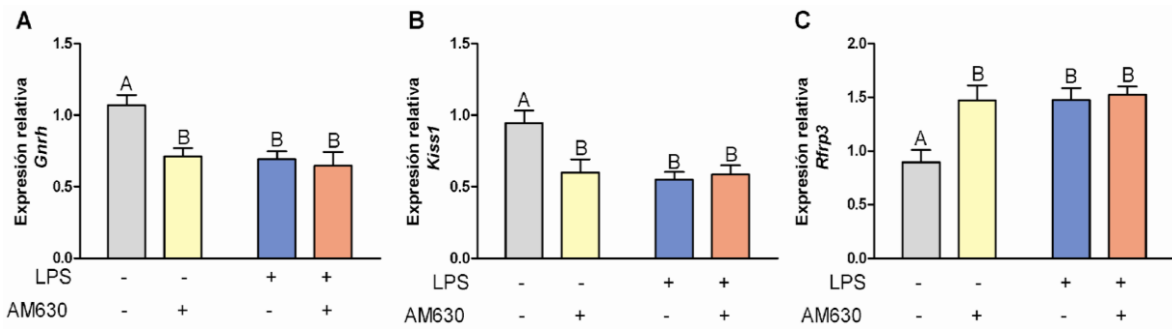


**Figura 4.19. Niveles del ARNm de citoquinas hipotalámicas a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con AM630.** Los niveles del ARNm de *Tnfα* (A) e *Il1β* (B) fueron determinados mediante qPCR a partir de los hipotálamos de ratas tratadas con AM630 (500ng/5μl, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Se muestra el resultado del análisis por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando el *L32* como gen normalizador. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante ANOVA para *Tnfα* no mostró interacción significativa de factores ni efectos principales significativos del factor antagonista, pero sí del factor LPS ( $Tnf\alpha_{interacción}$ :  $F_{1,17}=1.21$ ,  $P=0.29$ ;  $Tnf\alpha_{LPS}$ ,  $F_{1,17}=32.05$ ,  $P=0.0001$ ;  $Tnf\alpha_{antagonista}$ ,  $F_{1,17}=1.79$ ,  $P=0.20$ ). Respecto a *Il1β*, se encontró interacción significativa de factores ( $Il1\beta_{interacción}$ :  $F_{1,17}=59.27$ ,  $P<0.0001$ ). Las diferencias de cada parámetro medido entre los grupos fueron estudiados mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

### 4.4.2. Participación del receptor CB2 hipotalámico sobre parámetros del eje reproductivo en el modelo de desafío inmunológico

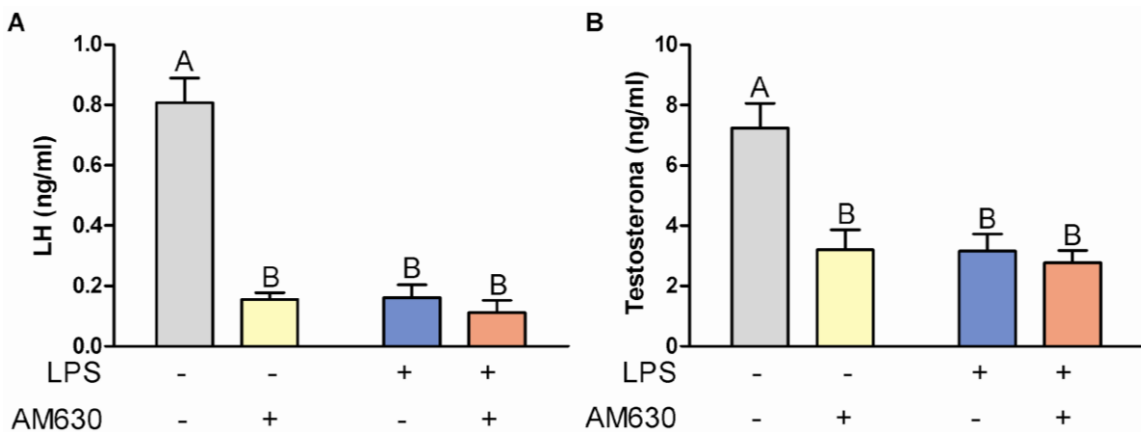
Los niveles relativos del ARNm de los neuropéptidos *GnRH* y *Kiss* disminuyeron significativamente tanto en respuesta al desafío inmunológico como al bloqueo farmacológico de los CB2, sin observarse efectos aditivos por acción concomitante de ambas condiciones (Fig 4.20). Por su parte, el ARNm del neuropéptido inhibitorio *Rfrp3* aumentó significativamente tanto en respuesta al bloqueo farmacológico de los CB2 como al desafío inmunológico. La acción concomitante de ambas condiciones tampoco mostró efectos aditivos.

## RESULTADOS



**Figura 4.20. Niveles de ARNm de neuropéptidos hipotalámicos que controlan el eje reproductivo a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con AM630.** Los niveles del ARNm de *Gnrh* (A), *Kiss1* (B) y *Rfrp3* (C) fueron determinados mediante qPCR a partir de los hipotálamos de ratas tratadas con AM630 (500ng/5µl, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Se muestra el resultado del análisis por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , utilizando el *L32* como gen normalizador. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=4-5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante ANOVA para los 3 parámetros indicó una interacción de factores significativa (*Gnrh*<sub>interacción</sub>,  $F_{1,16}=4.79$ ,  $P=0.049$ ; *Kiss1*<sub>interacción</sub>,  $F_{1,17}=6.12$ ,  $P=0.02$ ; *Rfrp3*<sub>interacción</sub>,  $F_{1,18}=5.12$ ,  $P=0.03$ ). Las diferencias de cada parámetro medido entre los grupos fueron estudiadas mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

A nivel hormonal, determinamos la concentración sérica de LH y testosterona (Fig 4.21), observando que tanto el desafío inmunológico como el bloqueo farmacológico de los CB2 disminuyeron significativamente la concentración sérica de ambas hormonas, aunque que el bloqueo de CB2 no modificó los efectos de LPS.



**Figura 4.21. Determinación de la concentración sérica de LH y testosterona a los 180 minutos post-LPS en ratas tratadas con AM630.** La concentración sérica de LH (A) fue determinada mediante radioinmunoensayo y la de testosterona (B) mediante ELISA, en ratas tratadas vía icv con AM630 (500ng/5µl, icv) y/o sometidas a un desafío inmunológico con LPS (5mg/kg, ip). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES; n=4-5 para cada grupo. El análisis estadístico mediante ANOVA tanto para LH como para testosterona indicó una interacción de factores significativa (LH<sub>interacción</sub>,  $F_{1,17}=36.87$ ,  $P<0.0001$ ; testosterona<sub>interacción</sub>,  $F_{1,16}=8.09$ ,  $P=0.013$ ). Se estudiaron las diferencias de cada

## *RESULTADOS*

parámetro medido entre los grupos mediante análisis *post-hoc*, donde letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



## **5. DISCUSIÓN**

## 5. Discusión

El eje reproductivo controla la reproducción, el desarrollo de los caracteres sexuales y el envejecimiento, pero adicionalmente establece una compleja comunicación con el sistema inmune (Harms, Ojeda, y McCann 1976). En el presente estudio hemos encontrado evidencias de la participación ciertos receptores de eCBs hipotalámicos en la actividad del eje reproductivo. En particular, los receptores CB2 y TRPV1 hipotalámicos actúan con mayor protagonismo en condiciones basales, mientras que el papel de los CB1 está más relacionado con los mecanismos regulatorios del eje HPT durante la activación del sistema inmune, favoreciendo una respuesta inflamatoria controlada que no provoque un daño tisular excesivo al hospedador. Como consecuencia, este tipo de respuesta altera el tono de las hormonas del eje HPT. Este mecanismo parecería ser crucial para la supervivencia, ya que permitiría redireccionar una mayor cantidad de energía disponible hacia el sistema inmune, favoreciendo la recuperación del organismo expuesto al desafío inmunológico.

### 5.1. El eje HPT durante el desafío inmunológico

Durante la puesta a punto del modelo experimental se trabajó con una dosis de 5mg/kg de LPS, de la cual se han reportado efectos disruptivos sobre la fisiología reproductiva sin provocar un cuadro irreversible de orden letal (Liew, Meachem, y Hedger 2007; Tavares y Miñano 2010). Los resultados obtenidos de la puesta a punto indicaron que el desafío inmunológico inducido por LPS provoca un aumento en los niveles séricos de TNF $\alpha$  a los 60 minutos (aprox. 1000 pg/ml), alcanzando valores más elevados a los 90 minutos (aprox. 2500 pg/ml) y más bajos a los 180 minutos (aprox. 200 pg/ml) post-LPS. Teniendo en cuenta los reportes previos que indican que esta citoquina participa en la inhibición de la liberación de GnRH (Fernández-Solari y col. 2006; Sarchielli y col. 2017; Watanobe y Hayakawa 2003) y dado que la actividad del eje reproductivo se encuentra orquestada principalmente por este neuropéptido (Silverman y col. 1992), estudiamos en principio el estado inflamatorio y neuroendocrino del hipotálamo a los 90 minutos post-LPS. En este contexto, el LPS no provocó cambios en la síntesis del ARNm de *Tnfa* e *Il1 $\beta$*  en el hipotálamo, ni tampoco en los niveles de GnRH. Debido a esto, y a pesar de que los niveles circulantes de TNF $\alpha$  fueron más bajos, estudiamos los mismos parámetros

## DISCUSIÓN

a los 180 minutos, encontrando un aumento hipotalámico en la síntesis del ARNm de *Tnfa* e *Il1β*, y una disminución en los niveles de GnRH. Estos resultados concuerdan con los de Kakizaki y col. (1999), quienes mostraron la existencia de un retraso en la respuesta inflamatoria hipotalámica respecto a la sistémica ante la administración ip de LPS. La inflamación sistémica puede modificar los niveles de citoquinas proinflamatorias en el SNC a través de al menos cuatro mecanismos que involucran aferencias vagales, señalización de células endoteliales cerebrales a partir de citoquinas periféricas, señalización de citoquinas desde órganos circunventriculares que carecen de capilares fenestrados y señalización inducida por la adhesión de leucocitos a través del endotelio vascular (D'Mello y Swain, 2017). Nuestros resultados indican que la síntesis *de novo* de citoquinas proinflamatorias en el hipotálamo no aumenta al menos hasta los 90 minutos post-LPS, observándose dicho aumento recién a los 180 minutos. Este aumento en la síntesis hipotalámica de citoquinas coincide con la disrupción en la producción de GnRH, de modo que parece haber una relación entre la síntesis *de novo* de moléculas proinflamatorias y la actividad neurohormonal del eje reproductivo. De todos modos, no puede descartarse que esto se deba adicionalmente a un ingreso de citoquinas desde la periferia a los 180 minutos pero no a los 90 minutos post-LPS. Futuros estudios son necesarios para confirmar los mecanismos específicos involucrados en la inhibición hipotalámica de las GnRHn durante un desafío inmunológico.

Encontramos que el desafío inmunológico provocó a los 180 minutos una disminución tanto en los niveles proteicos de GnRH como de su ARNm en el hipotálamo. Estos efectos son en parte directos, ya que un aumento de IL-1β inducido por LPS es capaz de interferir en la liberación de GnRH a nivel de los somas neuronales, que presentan receptores para la citoquina (Igaz y col. 2006; Wu y Wolfe 2012). Por otro lado, el LPS tiene efectos indirectos ya que puede intervenir en la actividad neuronal de otros factores río arriba de las GnRHn. Una de las dificultades de su estudio está dada por la gran cantidad de aferencias moduladoras que estas reciben, muchas de las cuales no han sido abordadas en nuestro estudio, como las de CRF o de GABA (Ciechanowska y col. 2011; Lin y col. 2012). Decidimos trabajar con los neuropéptidos kisspeptina y RFRP-3 debido a su reciente descubrimiento y, por lo tanto, a su menor caracterización durante los procesos inflamatorios respecto a otros neuropéptidos, además de la importancia que se les ha adjudicado sobre el control de la actividad de las GnRHn. Nuestros resultados indican que las neuronas kisspeptidérgicas y RFRP-3 positivas median, al menos parcialmente, los efectos indirectos del LPS ya que la endotoxina provocó una disminución de los

## DISCUSIÓN

niveles del ARNm de *Kiss1* y un aumento de los de *Rfrp3*. Si bien ya se había reportado la participación de kisspeptina y RFRP-3 en la disrupción del eje HPT en respuesta al LPS, la mayoría de estos estudios fueron realizados en hembras, en machos prepúberes o en adultos mediante la administración repetida de bajas dosis de LPS (Castellano y col. 2010; Iwasa y col. 2014; Munkhzaya y col. 2015; Murakami y col. 2008). Nuestro estudio es el primero en reconocer el efecto de una única dosis de LPS (5mg/kg) en ratas macho adultas sobre la síntesis de *Kiss1* y *Rfrp3*.

Nuestros resultados muestran que la disminución en los niveles hipotalámicos de GnRH a los 180 min post-LPS coincide con una disminución de los niveles plasmáticos de LH y testosterona. Si bien la actividad de los gonadotropos se encuentra principalmente regulada por GnRH, no podemos descartar que la inhibición del eje HPT durante el desafío inmunológico sea debida únicamente a una disminución de la producción de GnRH, sino también a una acción directa del LPS sobre los gonadotropos (Herman y col. 2013) y las gónadas (Allen y col. 2004).

### 5.2. SEC y citoquinas proinflamatorias.

En líneas generales, los resultados obtenidos muestran que el bloqueo farmacológico de los receptores cannabinoideos hipotalámicos provocó un aumento en los niveles basales de expresión de citoquinas, o bien exacerbó el aumento inducido por LPS. El antagonista/agonista inverso AM251 es 306 veces más selectivo por CB1 que por CB2 y no tiene afinidad por los receptores TRPV1 (Fawley, Hofmann, y Andresen 2014; Mani, Mitchell, y Malley 2001), de modo que descartamos que exista interacción cruzada del antagonista con otros receptores del SEC. Aunque la administración icv de AM251 no modificó los niveles séricos basales de TNF $\alpha$  ni los inducidos por LPS, a nivel hipotalámico el antagonista por sí mismo aumentó la síntesis basal de *Tnf $\alpha$*  y exacerbó la de *Il1 $\beta$*  inducida por LPS. Dado que la respuesta neuroinflamatoria se encuentra orquestada principalmente por células de la glía, y que estas células presentan una gran expresión de CB2, la mayor parte de los reportes acerca de los efectos de los eCBs y la participación del SEC sobre los procesos inflamatorios se adjudica principalmente a la activación de este receptor (Correa y col. 2005, 2009, 2010; Gui y col. 2013; Hernangómez y col. 2012). Sin embargo, se ha encontrado que los receptores CB1 también modulan la producción de citoquinas (Cabral, Harmon, y Carlisle 2001; Esposito

## DISCUSIÓN

y col. 2001). En particular, se ha demostrado que un aumento de los niveles de AEA, inducido por la administración sistémica de inhibidores de su recaptación o degradación, es capaz de prevenir parcialmente, vía CB1, los efectos del LPS sobre el aumento de IL-1 $\beta$  tanto a nivel hipotalámico como sérico (Kerr y col. 2012; Roche y col. 2008). Contrariamente, en el inicio de la respuesta inflamatoria, la AEA promueve un aumento en los niveles séricos de TNF $\alpha$  inducidos por LPS a través de la activación de los CB1 (De Laurentiis y col. 2010; Roche y col. 2008). Nuestros resultados mostraron que, en presencia de LPS, el bloqueo de CB1 exacerbó el aumento hipotalámico del ARNm de *Il1 $\beta$* , lo cual se condice con los reportes previos (Chiarlone y col. 2014; Gentile y col. 2016; Cabral, Harmon, y Carlisle 2001; Molina-Holgado y col. 2003), pero no modificó el de *Tnfa*. La falta de efectos del bloqueo de CB1 sobre el aumento de *Tnfa* inducido por LPS observado en nuestros experimentos puede deberse a que, teniendo en cuenta que AEA y 2-AG, a través de CB1, tienen efectos opuestos sobre la producción de *Tnfa* inducida por LPS (De Laurentiis y col. 2010; Roche y col. 2008; Costola-de-Souza y col. 2013; Kerr y col. 2013; Nomura y col. 2011), y que los dos eCBs son afines a CB1, el bloqueo del receptor prevendría tanto los efectos proinflamatorios de AEA como los antiinflamatorios de 2-AG, al menos a los tiempos estudiados en el presente trabajo. Por otro lado, observamos un aumento en los niveles de *Tnfa* inducido por AM251 en ausencia de LPS. Esto podría indicar que en el hipotálamo existe un tono endógeno antiinflamatorio de eCB que actuaría a través de los CB1. El principal eCB involucrado sería el 2-AG, ya que los niveles de AEA en condiciones basales son mucho menores (Sugiura y col. 2002). Este tono de 2-AG mantendría los niveles de citoquinas proinflamatorias en valores normales, las cuales se verían incrementadas si se bloquea el CB1. No obstante, no puede descartarse que los efectos proinflamatorios observados durante el bloqueo se deban a un efecto del AM251 como agonista inverso. De todos modos, el aumento de *Tnfa* inducido por AM251 no provocó cambios por sí mismo en los marcadores hipotalámicos del eje reproductivo. Esto podría deberse a que la principal citoquina responsable de la inhibición de la actividad de las GnRHn es la IL-1 $\beta$ , la cual no se vio modificada significativamente por el tratamiento con AM251 en ausencia de LPS. Futuros estudios son necesarios para dilucidar estos mecanismos proinflamatorios inducidos por el AM251 *per se*.

La capsazepina es un antagonista selectivo de receptores TRPV1 del cual no se ha reportado hasta el momento interacción con los receptores CB1 ni CB2. Los estudios previos acerca del papel de los receptores TRPV1 sobre la producción de citoquinas son

## DISCUSIÓN

contradictorios y difíciles de interpretar, ya que la acción de estos receptores depende de una amplia variedad de condiciones, como el tejido en el que se estudia su respuesta, la identidad y concentración de las citoquinas presentes al activarse los receptores, y los tiempos a los que se estudia su accionar (Devesa y col. 2011; Musumeci y col. 2011; Yoshida y col. 2016). Además, el rol que tienen los receptores TRPV1 sobre la producción de citoquinas depende de una amplia variedad de estímulos físicos y químicos, y su actividad puede verse modulada por la de otros receptores como CB1 y CB2 (Ambrosino y col. 2013; Di Marzo y Cristino 2008; Di Marzo y De Petrocellis 2010; Nagy y col. 2014; De Petrocellis y col. 2004; De Petrocellis y Di Marzo 2009; Van Der Stelt y col. 2005). Nuestros resultados experimentales mostraron que el bloqueo hipotalámico de TRPV1 no modificó los efectos proinflamatorios del LPS sobre la síntesis de *Tnfa* e *Il1β* a nivel hipotalámico. Sin embargo, el bloqueo hipotalámico del TRPV1 hipotalámico por sí mismo provocó un aumento en los niveles de *Tnfa* e *Il1β*. Al igual que lo observado para los niveles aumentados de *Tnfa* durante el bloqueo de la activación de CB1, esto podría indicar que la activación de TRPV1 es necesaria para mantener la expresión de marcadores proinflamatorios en niveles basales. Sin embargo, es posible que los efectos observados no estén mediados por AEA, ya que los niveles de este eCB en condiciones basales son bajos en el SNC, y los TRPV1 son susceptibles a la acción de muchos otros factores (Starowicz, Nigam, y Di Marzo 2007).

El AM630 es un antagonista de receptores CB2 con una selectividad 165 mayor por este receptor que por CB1. Se ha reportado afinidad por el receptor TRPV1, aunque a concentraciones más elevadas que las utilizadas en nuestros experimentos (Patil y col. 2011; Ross y col. 1999). Si bien es de esperar que el bloqueo de los receptores hipotalámicos CB2 exacerbe los efectos proinflamatorios inducidos por un desafío inmunológico, nuestros resultados mostraron que al menos a nivel de la síntesis del ARNm de *Tnfa* e *Il1β*, el AM630 no modificó los efectos del LPS. La mayor parte de los estudios previos que contemplan el uso de antagonistas de CB2 sobre los efectos del LPS, lo hacen estudiando la reversión de los efectos de un agonista de CB2 utilizado previamente (Correa y col. 2005, 2009, 2010; Ma y col. 2015; Kerr y col. 2013), Sin embargo, no son muchos los estudios que se enfoquen en los efectos de LPS en presencia del antagonista sin el agregado previo de agonistas de CB2. Los escasos reportes acerca de los efectos del bloqueo de CB2 en presencia de LPS no muestran cambios en el perfil inflamatorio (Ma y col. 2015; Kerr y col. 2013), lo cual se condice con nuestros resultados. Nuestros resultados muestran los efectos del antagonista luego de 3 horas de

## DISCUSIÓN

inducido el desafío inmunológico, de modo que no podemos descartar que estos receptores modulen la producción de citoquinas a tiempos más largos. Sorprendentemente, encontramos que a pesar de no modular los efectos del LPS, el bloqueo hipotalámico de CB2 por sí mismo fue capaz de provocar un aumento en los niveles hipotalámicos del ARNm de *Il1 $\beta$* . Estos resultados son novedosos ya que no encontramos reportes previos que estudien el efecto del bloqueo farmacológico de los CB2 hipotalámicos sobre la producción de citoquinas y sugieren la existencia de un tono endógeno basal que mantiene los niveles de IL-1 $\beta$  en valores normales, aunque son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.

### 5.3. Inhibición del HPT mediada por el SEC.

Los estudios que contemplan la respuesta de las GnRHn al efecto de los eCBs han mostrado la existencia de un dimorfismo sexual (Craft, Marusich, y Wiley 2013). Una posible explicación de este fenómeno está dada por la influencia que ejercen diversas hormonas sobre el SEC, especialmente los estrógenos (Craft, Marusich, y Wiley 2013). De hecho, el contenido cerebral de eCBs en ratas es dependiente del ciclo estral de las hembras (Bradshaw, et al., 2006). Asimismo, se ha demostrado que la densidad de los CB1 en el hipotálamo difiere entre machos y hembras (Rodríguez de Fonseca y col. 1994), y que el  $\Delta^9$ THC tiene estimula la producción de hormonas reproductivas en hembras, mientras que en machos su efecto es inhibitorio (Tavares y Miñano 2010). Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la AEA inhibe la liberación de GnRH en ratas macho, pero que estimula su liberación en ratas hembra ovariectomizadas y tratadas con estrógeno (Scorticati y col. 2004). Debido a que son más escasos los reportes en machos, y dado que nuestro grupo de trabajo tiene mayor experticia en la experimentación con este tipo de animales (De Laurentiis y col. 2010; Fernández-Solari y col. 2006; Scorticati y col. 2004), nuestro diseño experimental fue desarrollado en ratas macho.

Los resultados del presente estudio demuestran que la neuroinflamación inducida por la administración *in vivo* de LPS inhibe la liberación de GnRH, al menos parcialmente, a través de la activación hipotalámica de CB1. El tiempo de respuesta del hipotálamo a un desafío inmunológico parece ser crucial para entender los mecanismos que subyacen a la inhibición de la liberación de GnRH. Así, el LPS evidenció efectos disruptivos en este

## DISCUSIÓN

órgano recién a los 180 minutos post-LPS, cuando los niveles de expresión del ARNm de las citoquinas proinflamatorias hipotalámicas se vieron incrementados. Esto podría indicar que la síntesis de citoquinas hipotalámicas es necesaria para inducir efectos inhibitorios sobre la liberación de hormonas reproductivas. Nuestro grupo de trabajo ya había demostrado anteriormente que el LPS y el TNF $\alpha$  incrementan la actividad de la enzima AEA sintasa en modelos *in vitro*, y que el tratamiento con AM251 previene los efectos inhibitorios inducidos por TNF $\alpha$  sobre la liberación hipotalámica de GnRH, sugiriendo que estas citoquinas pueden inhibir la liberación de GnRH mediante la síntesis de eCBs (Fernández-Solari y col. 2006). Además, encontramos que otros factores moduladores de la liberación de GnRH son sensibles al bloqueo de CB1 por AM251, como las neuronas productoras de RFRP-3 y de kisspeptina. Estudios previos han demostrado que el LPS reduce los niveles de GnRH y LH, mediante la disminución de los niveles hipotalámicos de *Kiss1* y el aumento de *Rfrp3*, mientras que estos efectos son prevenidos a partir de la administración icv de kisspeptina (Castellano y col. 2010; Villanueva y col. 2009). Más aún, en experimentos de estrés por inmovilización aguda llevados a cabo en ratas se demostró que el AM251 previene la disminución de los niveles de *Kiss1*, sugiriendo que las neuronas kisspeptidérgicas son influenciadas por la activación de los receptores CB1 (Karamikheirabad y col. 2013). Por primera vez, los resultados de esta tesis muestran la respuesta de estas neuronas a la modulación de CB1 en animales sometidos a un desafío inmunológico con LPS. Las neuronas kisspeptidérgicas respondieron disminuyendo los niveles del ARNm de *Kiss1* a los 180 minutos post-LPS, efecto que fue prevenido mediante el bloqueo de los receptores CB1. Respecto a las neuronas RFRP-3 positivas, encontramos que el incremento de *Rfrp3* inducido por el LPS a los 180 minutos fue prevenido en presencia de AM251. Estos resultados sugieren que los eCBs modulan la actividad de diferentes neuronas involucradas en la modulación de la liberación de GnRH. Al observarse que en presencia del LPS el SEC modula la actividad de neuronas hipotalámicas asociadas a la reproducción, nos propusimos estudiar si tal acción era directa o indirecta, reconociendo el grado de colocalización del receptor CB1 en dichas neuronas. El estudio se llevó a cabo mediante HIS y no por inmunohistoquímica debido a que, si bien la segunda técnica tiene la ventaja de reconocer proteínas, la HIS es un ensayo mucho más sensible que permite cuantificar el grado de colocalización del ARNm codificante para las proteínas de interés y si el mismo cambia en respuesta a los distintos tratamientos. Nuestros resultados mostraron un moderado/bajo grado de colocalización (30%) entre *Cb1* y *Rfrp3*, y un bajo

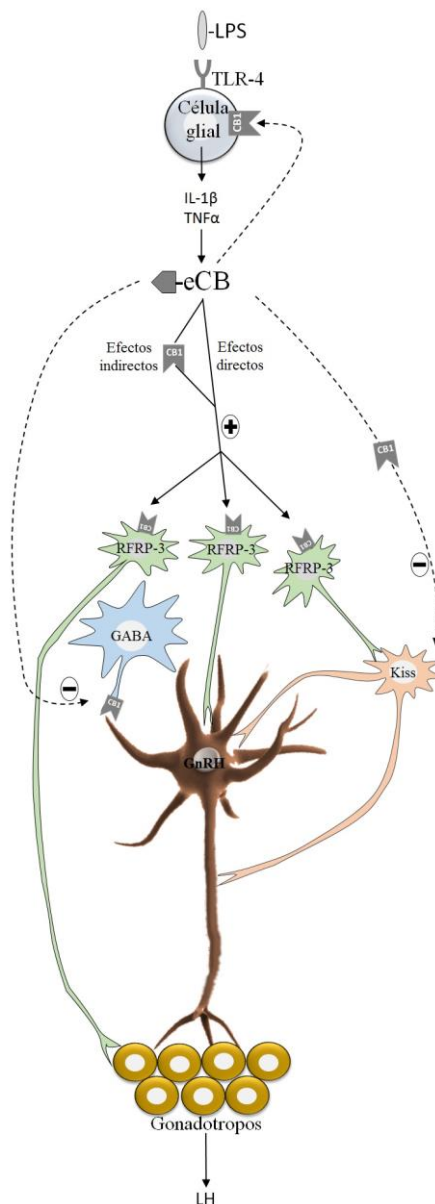


## DISCUSIÓN

grado de colocalización (10%) entre *Cbl* y *Gnrh*. Respecto a *Kiss1*, problemas metodológicos de la técnica de hibridación impidieron marcar sus neuronas en el núcleo arcuato, sin embargo el grado de expresión de *Cbl* en ese núcleo fue muy bajo como para considerar que puedan a llegar a encontrarse células *Cbl* positivas entre las neuronas kisspeptidérgicas. Por lo tanto descartamos la posibilidad de que las células kisspeptidérgicas expresen cantidades significativas de *Cbl*. Tampoco encontramos que el LPS modifique los bajos niveles de expresión del ARNm de este receptor en las GnRHn, las neuronas RFRP-3 positivas ni en el núcleo arcuato, de modo que nuestros resultados apoyan la hipótesis de una modulación indirecta de los eCBs (al menos vía CB1) sobre la síntesis de ARNm de los neuropéptidos reproductivos estudiados durante un desafío inmunológico. Sería apropiado estudiar el grado de expresión de *Cbl* en neuronas kisspeptidérgicas de zonas ajenas al núcleo arcuato, como por ejemplo el área preóptica. De todas formas, la cantidad de neuronas que expresan *Kiss1* en el área preóptica de ratas macho es muy baja, con menos de 10 neuronas en el AVPV comparado con hembras que poseen hasta más de 80 neuronas en esa zona (Kauffman y col. 2007). Es probable que la modulación ejercida por parte de los eCBs esté mediada por los CB1 localizados en otras células neuronales o de la glía, posiblemente del VMN. En tal sentido, estudios previos de otros grupos demostraron que el VMN es la zona hipotalámica con mayor expresión de CB1 (Mailleux y Vanderhaeghen 1992), y nuestros resultados mostraron que las células RFRP-3 positivas se disponen en la cercanía rodeándola en su región más dorsal. Funcionalmente, el VMN en su región dorsomedial participa en los mecanismos homeostáticos que modulan el balance energético (Kurrasch y col. 2007; McClellan, Parker, y Tobet 2006), siendo blanco de acción principalmente de la leptina (Patterson y col. 2011). Si bien se han encontrado efectos de esta hormona sobre la actividad neuroendocrina del eje reproductivo, sus receptores (ObR) no se encuentran en las GnRHn ni tampoco en las neuronas kisspeptidérgicas o RFRP-3 positivas (Louis y col. 2011; Poling y col. 2014). De modo que el mecanismo de acción de la leptina sobre estas neuronas podría estar mediado por células del VMN como neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, y astrocitos (Bosier y col. 2013; Reguero y col. 2011). Los efectos de la leptina y los inducidos por la señalización de CB1 están estrechamente relacionados, poseyendo funciones opuestas sobre múltiples procesos como la ingesta de alimentos, la inflamación, o la reproducción. Asimismo, se ha demostrado que un aumento de la producción de leptina disminuye la expresión de CB1 (Di Marzo y Matias 2005; Palomba y col. 2015; Steiner y col. 2004, 2011; Thanos y col. 2008). Sin embargo, se ha

## DISCUSIÓN

demostrado que en astrocitos hipotalámicos, el bloqueo farmacológico de CB1 provoca una disminución de la expresión de los ObR (Bosier y col. 2013). De modo que a pesar de tener efectos opuestos, la señalización de leptina podría necesitar de un tono basal de señalización de CB1 para producirse. Nuestros resultados mostraron que el LPS provoca una disminución de los niveles de *Cbl* en el VMN y, teniendo en cuenta que la endotoxina aumenta la producción de leptina (Sachot y col. 2004), es posible que el aumento del tono de esta hormona inducido por el desafío inmunológico disminuya los niveles de CB1 en el VMN. Considerando la cercanía entre las neuronas RFRP-3 positivas y el VMN, y que además existen neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas que se dirigen al VMN expresando CB1 en sus terminales sinápticas (Reguero y col. 2011), es posible que un aumento de leptina inducido por LPS estimule indirectamente a las neuronas RFRP-3 positivas (Poling y col. 2014). Sin embargo, en presencia de AM251, la señalización por CB1 se ve impedida, provocando un descenso en los niveles de ObR y por lo tanto el efecto estimulador de leptina sobre las RFRP-3 positivas se vería impedido. Mecanismos similares podrían operar sobre kisspeptina, ya que el núcleo arcuato recibe aferencias del VMN, y se han reportado efectos estimuladores de la leptina sobre la actividad neuronal en este núcleo (Irani y col. 2008). Además, los efectos sobre las neuronas RFRP-3 positivas pueden repercutir sobre la liberación de kisspeptina (Yeo y Colledge 2018), de modo que el patrón de producción de *Kiss1* observado con los distintos tratamientos podría deberse a cambios en el patrón de síntesis de *Rfrp3*. No descartamos la existencia de otros mecanismos que puedan operar en este sistema. De hecho Farkas y col. (2010) demostraron que las neuronas GABAérgicas que estimulan directamente la liberación de GnRH expresan CB1 en sus terminales presinápticas (Gammon y col. 2005). Dado que los endocannabinoides funcionan mayormente como mensajeros retrógrados y que el LPS aumenta la producción de eCBs, durante un desafío inmunológico el LPS podría provocar un aumento de la señalización de CB1 sobre neuronas GABAérgicas, inhibiendo su liberación espontánea y, por lo tanto, la consecuente estimulación sobre las GnRHn. Este mecanismo inhibitorio podría ser prevenido en presencia de AM251. La posible participación de los receptores CB1 sobre la modulación de GnRH se muestra en forma resumida en la figura 5.1. Futuros estudios son necesarios para dilucidar por completo los mecanismos que subyacen al control neuroendocrino de la reproducción mediados por CB1.



**Figura 5.1. Esquema hipotético de la participación de los CB1 hipotalámicos sobre la modulación de GnRH.** Las GnRHn están bajo la influencia de una compleja red neuronal que involucra a neuronas kisspeptidérgicas, neuronas RFRP-3 positivas, neuronas GABAérgicas y células gliales, entre otras. Durante un desafío inmunológico las células gliales sintetizan citoquinas proinflamatorias que aumentan la producción de eCBs. Estos pueden actuar directamente sobre neuronas RFRP-3 positivas ya que expresan *Cb1* aunque en baja proporción. Sin embargo, la principal influencia de los CB1 sobre la producción de neuropéptidos reproductivos es indirecta ya que ni GnRHn ni las neuronas kisspeptidérgicas expresan *Cb1*. La influencia indirecta de los eCBs sobre los CB1 provoca una disminución en la síntesis de *Kiss1*, y *Gnrh*, y un aumento en la síntesis de *Rfrp3*. La activación de CB1 provoca además cambios en la actividad estimuladora de GABA, que se muestra en detalle en la figura 5.2. Como resultado de los cambios en la actividad de neuroendócrina, la liberación de LH por parte de los gonadotropos se ve disminuída.

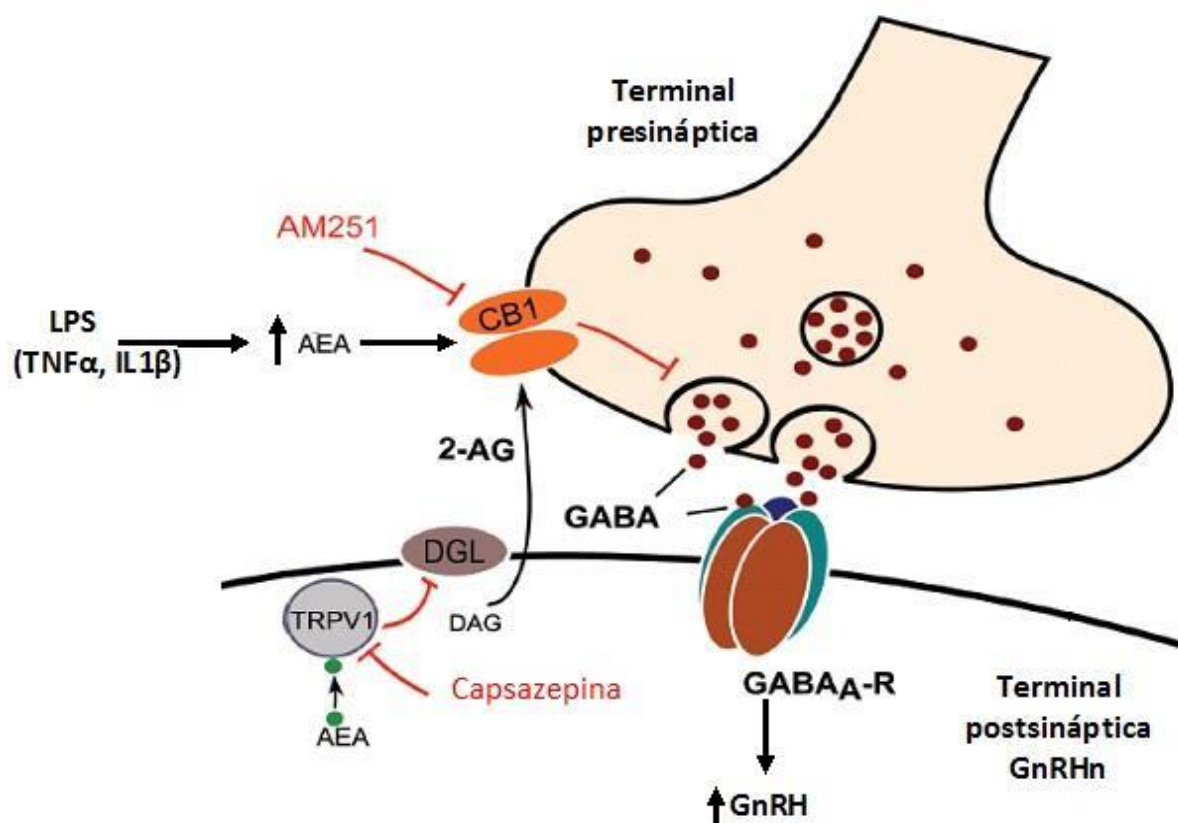
## DISCUSIÓN

Respecto a la producción de hormonas sexuales río abajo del hipotálamo, encontramos que los niveles plasmáticos de LH respondieron de forma similar a los neuropéptidos hipotalámicos, observándose concentraciones séricas menores de la hormona luego de los 180 minutos de administración de LPS y una prevención de esos cambios mediante el bloqueo hipotalámico de CB1. Los resultados muestran entonces que la participación de los CB1 hipotalámicos sobre el eje reproductivo no modula sólo a nivel hipotalámico, sino que sus efectos se manifiestan también en zonas más alejadas como la adenohipófisis. A pesar de que la concentración sérica de TNF $\alpha$  se vio incrementada a los 90 minutos post-LPS, la liberación de LH no se vio afectada, lo cual apoya los reportes previos que indican que el principal control de la actividad de LH está mediado por la actividad hipotalámica, aún en condiciones inflamatorias sistémicas (Silverman y col. 1992). Dado que se ha demostrado mediante inmunohistoquímica que los gonadotropos no expresan cantidades significativas de CB1, mientras que otras células de la adenohipófisis sí lo hacen (Pagotto y col. 2001), descartamos que el AM251 administrado vía icv pueda actuar directamente sobre la funcionalidad de los gonadotropos. Nuestros resultados muestran que el bloqueo hipotalámico de los CB1 revierte los efectos disruptivos de LPS sobre LH. Por otro lado, si bien el bloqueo farmacológico de los CB1 hipotalámicos previno la inhibición de GnRH y LH durante el desafío, no observamos efectos significativos del bloqueo sobre los niveles disminuídos de testosterona sérica inducidos por LPS. Estos resultados confirman que existen efectos directos del LPS sobre las gónadas no mediados por factores hipotalámicos, lo cual ya había sido reportado previamente (O'Bryan y col. 2000). En este contexto, no es posible estudiar el efecto de la modulación hipotalámica sobre los niveles de testosterona. Experimentos de administración de LPS o citoquinas proinflamatorias a nivel central permitirían evitar los efectos directos de la inflamación sistémica sobre las gónadas.

Los reportes previos acerca de la participación de los TRPV1 hipotalámicos sobre la actividad de las GnRHn son escasos. Por un lado, la AEA es el único ligando de eCB de TRPV1 conocido hasta el momento. Por otro lado, en condiciones basales los niveles de 2-AG son mucho mayores que los de AEA, aunque la producción de esta última puede aumentar en presencia de LPS. Nuestros resultados mostraron que durante un desafío inmunológico, el bloqueo de TRPV1 no modifica la síntesis del ARNm de *Gnrh*, *Kiss1* y *Rfrp3* pero sí lo hace en ausencia de LPS, de modo que los efectos observados por el bloqueo de TRPV1 no estarían mediados por AEA. Se ha reportado que en condiciones basales la producción neuronal de 2-AG es inhibida por la señalización de TRPV1

## *DISCUSIÓN*

intracelular (Lee y col. 2015). Por lo tanto, es posible en nuestro modelo que el bloqueo de TRPV1 provoque en las GnRHn un aumento en la liberación retrógrada de 2-AG a las neuronas presinápticas, como las GABAérgicas, inhibiendo la liberación de GABA y por lo tanto inhibiendo la estimulación de las GnRHn, lo cual ya fue reportado previamente (Farkas y col. 2016). En este escenario, la presencia de LPS debería provocar un aumento en el tono de AEA, que por un lado inhibe la liberación de 2-AG a través de los TRPV1 de las GnRHn, mientras que por otro lado estimula a los CB1 de la membrana presináptica de las neuronas GABAérgicas, inhibiendo también la estimulación de GnRHn. El bloqueo de TRPV1 no modificaría entonces los efectos del LPS ya que simplemente aumenta el tono retrógrado de 2-AG por parte de las GnRHn hacia las neuronas GABAérgicas, estimulando aún más a los CB1 presinápticos y manteniendo la inhibición provocada por LPS. El mecanismo propuesto se muestra en forma resumida en la figura 5.2.



**Figura 5.2. Esquema hipotético de la comunicación entre GnRHn y neuronas GABAérgicas mediada por CB1 y TRPV1.** Las GnRHn tienen receptores GABA<sub>A</sub> que al activarse estimulan la liberación de GnRH. El control del SEC sobre la sinapsis entre GnRHn y neuronas GABAérgicas involucra dos mecanismos en los que participan CB1 y TRPV1. Por un lado, 2-AG puede ser liberado por GnRH de forma retrógrada hacia el espacio sináptico, activando a los CB1 presinápticos y por lo tanto inhibiendo la estimulación GABAérgica de GnRHn. Por otro lado, la actividad basal de TRPV1 en las GnRHn inhibe la liberación retrógrada de 2-AG, de modo que la activación de TRPV1 previene el efecto inhibitorio de este eCB sobre CB1, aumentando la estimulación GABAérgica sobre GnRHn. Entonces, el bloqueo de TRPV1 con capsazepina aumenta la liberación retrógrada de 2-AG, que inhibe vía CB1 a la liberación presináptica de GABA y por lo tanto a la estimulación de las GnRHn. La estimulación de CB1 también puede inducirse por AEA, cuya concentración puede verse aumentada en presencia de LPS, mientras que el bloqueo de CB1 con AM251 previene dicho efecto. Flechas negras indican efectos estimulatorios, líneas rojas indican efectos inhibitorios. DAG: diacilglicerol; DGL: DAG lipasa; CB1: receptor de cannabinoides tipo 1; AM251: antagonista de CB1; 2-AG: 2-araquidonoilglicerol; GABA<sub>A</sub>-R: receptor GABA tipo A; TRPV1: receptor de potencial transitorio V1; AEA: anandamida; capsazepina: antagonista de TRPV1; LPS: lipopolisacárido; TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa; IL1 $\beta$ : interleukina 1 beta; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas. Adaptado de Farkas y col. (2016).

También observamos que los TRPV1 participan en la modulación de la actividad de las neuronas kisspeptidérgicas y RFRP-3 positivas. Problemas metodológicos en la

## DISCUSIÓN

marcación nos impidieron sintetizar las sondas adecuadas de *Trpv1* para determinar si el mensajero colocaliza con *Kiss1*, *Rfrp3* y *Gnrh*, de modo que desconocemos a partir de nuestros resultados si la modulación de TRPV1 se da directa o indirectamente sobre las neuronas de interés. Sorprendentemente, también encontramos que el bloqueo de TRPV1 previno los efectos del LPS sobre los niveles del ARNm de *Kiss1*, aunque esto no afectó los niveles de *Gnrh* ni los de LH. Desconocemos los mecanismos que puedan mediar en la participación de TRPV1 sobre la liberación de *Kiss1* y *Rfrp3*, ya que nuestros resultados son los primeros en reportar los efectos del bloqueo del receptor vanilloide hipotalámico sobre la actividad de las neuronas que producen tales neuropéptidos. Reportes previos evidenciaron que en el hipotálamo los niveles de expresión de TRPV1 son más elevados en el DMN y el núcleo paraventricular (Brown y col. 2013; Molinas y col. 2018; Feetham, O'Brien, y Barrett-Jolley 2018), de modo que los resultados obtenidos mediante el bloqueo del receptor podrían involucrar la participación de vasopresina y oxitocina, ya que se ha reportado que estas neuronas inervan a las kisspeptidérgicas (Williams y col. 2011; Yeo y Colledge 2018). Tampoco debe descartarse que el receptor vanilloide sea expresado en las neuronas RFRP-3 positivas, aunque teniendo en cuenta nuestros resultados los efectos de su activación deberían ser inhibitorios sobre los niveles de *Rfrp3*, lo cual se contradice con los reportes previos que sugieren que TRPV1 en el DMN modula a nivel excitatorio a las neuronas en las que se presenta (Molinas y col. 2018). Futuros estudios son necesarios para dilucidar en detalle los mecanismos que subyacen al control vanilloide de las neuronas RFRP-3 positivas y kisspeptidérgicas. Respecto a las hormonas río abajo de GnRH encontramos que los niveles de LH siguieron el mismo patrón que los neuropéptidos hipotalámicos, donde incluso los niveles de testosterona se vieron disminuidos mediante el bloqueo hipotalámico de TRPV1, lo cual muestra la influencia de estos receptores hipotalámicos en la modulación del eje reproductivo.

Los CB2 se encuentran distribuidos principalmente en los tejidos periféricos, particularmente en tejidos asociados a la respuesta inmunológica (Berdyshev 2000). A nivel del SNC se ha demostrado expresión de este receptor en el tallo encefálico, corteza y cerebelo (Van Sickle y col. 2005). A nivel hipotalámico, posee mucha menor expresión que los CB1, aunque es detectable en los núcleos ventromedial y arcuato (Gong y col. 2006). Se ha sugerido que las GnRHn expresan CB2, pero los estudios fueron realizados en líneas celulares (Gammon y col. 2005) o en hembras en diestro, donde se encontró aproximadamente que 1 de cada 4 células expresan a este receptor (Todman, Han, y Herbison 2005). Al igual que con TRPV1, el bloqueo farmacológico de CB2 provocó un

## DISCUSIÓN

aumento en la síntesis de *Il1 $\beta$*  y, teniendo en cuenta que las GnRHn expresan receptores para esta citoquina, es posible que la disminución observada de los niveles de *Gnrh* sea producto, al menos parcialmente, de un aumento de los niveles hipotalámicos de IL-1 $\beta$  inducidos por el bloqueo hipotalámico de CB2. Los reportes sobre el posible papel de CB2 sobre el VMN son muy escasos, encontrándose en individuos obesos que polimorfismos del gen que codifica para CB2 correlacionan con niveles más elevados de leptina y de triglicéridos (De Luis y col. 2017), mientras que otro estudio en ratones demostró que fallas en la producción de CB2 inducen aumentos en los niveles circulantes de leptina junto a un aumento en la ingesta de alimento (Agudo y col. 2010), un patrón característico de la desensibilización de los ObR, indicando fallas en la señalización de leptina. Dado que reportes previos indican que la señalización inducida por los ObR estimula la liberación de GnRH (Quennell y col. 2009), es posible que los niveles disminuidos de *Gnrh* observados en nuestros experimentos producto del bloqueo hipotalámico de CB2 puedan deberse a niveles de señalización de leptina disminuidos. Respecto al núcleo arcuato, se ha demostrado que los CB2 del SNC participan en la producción de POMC y neuropéptido Y en este núcleo (Romero-Zerbo y col. 2012). Dado que estos neuropéptidos participan en el control de GnRH (Roa y Herbison 2012), es posible que los efectos observados sobre GnRH por el bloqueo hipotalámico de CB2 estén mediados por ellos, aunque más estudios son necesarios para dilucidar estos mecanismos de forma precisa. A modo de síntesis, proponemos que es necesaria la existencia de una actividad basal de los TRPV1 y CB2 en el hipotálamo para mantener los niveles de hormonas reproductivas en valores adecuados, ya que el bloqueo hipotalámico estos receptores disminuyó los niveles de *Gnrh*, LH y testosterona. Estos efectos involucran al menos a los neuropéptidos kisspeptina y RFRP-3 sobre el control de las GnRHn, aunque no descartamos la participación de otros factores que se vean influenciados por los estos receptores hipotalámicos.



## **6. CONCLUSIÓN**

## 6. Conclusión

Los receptores hipotalámicos del SEC participan en los procesos neuroinflamatorios y en la actividad del eje HPT en condiciones basales y de desafío inmunológico. Mientras que CB2 y TRPV1 controlan la neuroinflamación y la actividad basal del HPT, CB1 lo hace en condiciones de desafío inmunológico y de manera indirecta, mediada por otras neuronas o células río arriba de las productoras de GnRH, kisspeptina y RFRP-3 positivas.

La comprensión del grado y la forma en que los distintos componentes del SEC participan del control del eje gonadal, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas, sienta las bases para el desarrollo de futuras terapéuticas que contribuyan mejorar la salud sexual y reproductiva de las poblaciones humanas.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. Referencias bibliográficas

- Agudo, J., M. Martín, C. Roca, M. Molas, A.S. Bura, A. Zimmer, F. Bosch, y R. Maldonado. 2010. "Deficiency of CB2 Cannabinoid Receptor in Mice Improves Insulin Sensitivity but Increases Food Intake and Obesity with Age." *Diabetologia* 53(12):2629–40.
- Aizpurua-Olaizola, O., I. Elezgarai, I. Rico-Barrio, I. Zarandona, N. Etxebarria, y A. Usobiaga. 2017. "Targeting the Endocannabinoid System: Future Therapeutic Strategies." *Drug Discovery Today* 22(1):105–10.
- Akira, S., S. Uematsu, y O. Takeuchi. 2006. "Pathogen Recognition and Innate Immunity." *Cell* 124(4):783–801.
- Alger, B.E. y A. Tang. 2012. "Do Cannabinoids Reduce Brain Power?" *Nat Neurosci* 15(4):499–501.
- Allen, J.A., T. Diemer, P. Janus, K.H. Hales, y D.B. Hales. 2004. "Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharide and Reactive Oxygen Species Inhibit Leydig Cell Steroidogenesis via Perturbation of Mitochondria." *Endocrine* 25(3):265–75.
- Ambrosino, P., M.V. Soldovieri, C. Russo, y M. Tagliamonte. 2013. "Activation and Desensitization of TRPV1 Channels in Sensory Neurons by the PPAR $\alpha$  Agonist Palmitoylethanolamide." *British Journal of Pharmacology* 168(6):1430–44.
- Banerjee, A., A. Singh, P. Srivastava, H. Turner, y A. Krishna. 2011. "Effects of Chronic Bhang (Cannabis) Administration on the Reproductive System of Male Mice." *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology* 92(3):195–205.
- Berdyshev, E.V. 2000. "Cannabinoid Receptors and the Regulation of Immune Response." *Chemistry and Physics of Lipids* 108(1–2):169–90.
- Bhat, G., V.B. Mahesh, C.A. Lamar, L. Ping, K. Aguan, y D.W. Brann. 1995. "Histochemical Localization of Nitric Oxide Neurons in the Hypothalamus: Association with Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and Co-Localization with N-Methyl-D-Aspartate Receptors." *Neuroendocrinology* 62:187–97.
- Bhat, G., V.B. Mahesh, K. Aguan, y D.W. Brann. 1996. "Evidence That Brain Nitric Oxide Synthase Is the Major Nitric Oxide Synthase Isoform in the Hypothalamus of the Adult Female Rat and That Nitric Oxide Potently Regulates Hypothalamic cGMP Levels." *Neuroendocrinology* 64:93–102.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bisogno, T., D. Melck, L. De Petrocellis, y V. Di Marzo. 1999. "Phosphatidic Acid as the Biosynthetic Precursor of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol in Intact Mouse Neuroblastoma Cells Stimulated with Ionomycin." *Journal of Neurochemistry* 72(5):2113–19.
- Blaustein, J.D. 2010. "The Year In Neuroendocrinology." *Molecular Endocrinology* 24(1):252–60.
- Bosier, B., L. Bellocchio, M. Metna-Laurent, E. Soria-Gomez, I. Matias, E. Hebert-Chatelain, A. Cannich, M. Maitre, T. Leste-Lasserre, P. Cardinal, J. Mendizabal-Zubiaga, M.J. Canduela, L. Reguero, E. Hermans, P. Grandes, D. Cota, y G. Marsicano. 2013. "Astroglial CB1cannabinoid Receptors Regulate Leptin Signaling in Mouse Brain Astrocytes." *Molecular Metabolism* 2(4):393–404.
- Bourinet, E., C. Altier, M.E. Hildebrand, T. Trang, M.W. Salter, y G.W. Zamponi. 2014. "Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling." *Physiological Reviews* 94(1):81–140.
- Brown, C.H., J.S. Bains, M. Ludwig, y J.E. Stern. 2013. "Physiological Regulation of Magnocellular Neurosecretory Cell Activity: Integration of Intrinsic, Local and Afferent Mechanisms." *J Neuroendocrinol* 25(8):678–710.
- Brown, DR. 1999. "Neurons Depend on Astrocytes in a Coculture System for Protection from Glutamate Toxicity." *Molecular and Cellular Neurosciences* 13(5):379–89.
- Brüning, J.C., D. Gautam, D.J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P.C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Müller-Wieland, y C.R. Kahn. 2000. "Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction." *Science* 289(5487):2122–25.
- Burcelin, R., B. Thorens, M. Glauser, R.C. Gaillard, y F.P. Pralong. 2003. "Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion from Hypothalamic Neurons: Stimulation by Insulin and Potentiation by Leptin." *Endocrinology* 144(10):4484–91.
- Cabral, G.A., K.N. Harmon, y S.J. Carlisle. 2001. "Cannabinoid-Mediated Inhibition of Inducible Nitric Oxide Production by Rat Microglial Cells: Evidence for CB1 Receptor Participation." *Neuroimmune Circuits, Drugs of Abuse, and Infectious Diseases* 493:207–14.
- Cabral, G.A. y F. Marciano-Cabral. 2005. "Cannabinoid Receptors in Microglia of the Central Nervous System: Immune Functional Relevance." *Journal of Leukocyte Biology* 78(6):1192–97.
- Campbell, R.E., G. Gaidamaka, S.K. Han, y A.E. Herbison. 2009. "Dendro-Dendritic Bundling and Shared Synapses between Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons."

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(26):10835–40.
- Campbell, R.E. y A.E. Herbison. 2007. “Definition of Brainstem Afferents to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in the Mouse Using Conditional Viral Tract Tracing.” *Endocrinology* 148(12):5884–90.
- Campora, L., V. Miragliotta, E. Ricci, L. Cristino, V. Di Marzo, F. Albanese, M. Federica Della Valle, y F. Abramo. 2012. “Cannabinoid Receptor Type 1 and 2 Expression in the Skin of Healthy Dogs and Dogs with Atopic Dermatitis.” *American Journal of Veterinary Research* 73(7):988–95.
- Carlisle, S.J., F. Marciano-Cabral, A. Staab, C. Ludwick, y G.A. Cabral. 2002. “Differential Expression of the CB2 Cannabinoid Receptor by Rodent Macrophages and Macrophage-like Cells in Relation to Cell Activation.” *International Immunopharmacology* 2(1):69–82.
- Carpenter, M.B. 1985. *Core Text of Neuroanatomy*. Williams & Wilkins.
- Cascio, M.G. y P. Marini. 2015. “Biosynthesis and Fate of Endocannabinoids.” *Handbook of Experimental Pharmacology* 231:39–58.
- Castellano, J.M., A.H. Bentsen, M. Romero, R. Pineda, F. Ruiz-Pino, D. Garcia-Galiano, M.A. Sánchez-Garrido, L. Pinilla, J.D. Mikkelsen, y M. Tena-Sempere. 2010. “Acute Inflammation Reduces Kisspeptin Immunoreactivity at the Arcuate Nucleus and Decreases Responsiveness to Kisspeptin Independently of Its Anorectic Effects.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 299(1):E54–61.
- Castillo, P.E., T.J. Younts, A.E. Chávez, y Y. Hashimoto-dani. 2012. “Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function.” *Neuron* 76(1):70–81.
- Chahl, L.A. 2011. “TRP Channels and Psychiatric Disorders.” *Adv Exp Med Biol*. 704:987–1009.
- Chiarlone, A., L. Bellocchio, C. Blázquez, E. Resel, E. Soria-Gómez, A. Cannich, J.J. Ferrero, O. Sagredo, C. Benito, J. Romero, J. Sánchez-Prieto, B. Lutz, J. Fernández-Ruiz, I. Galve-Roperh, y M. Guzmán. 2014. “A Restricted Population of CB1 Cannabinoid Receptors with Neuroprotective Activity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(22):8257–62.
- Christian, C.A. y S.M. Moenter. 2007. “Estradiol Induces Diurnal Shifts in GABA Transmission to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons to Provide a Neural Signal for Ovulation.” *Journal of Neuroscience* 27(8):1913–21.
- Ciechanowska, M., M. Łapot, T. Malewski, K. Mateusiak, T. Misztal, y F. Przekop. 2011. “Effects of Corticotropin-Releasing Hormone and Its Antagonist on the

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gene Expression of Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) and GnRH Receptor in the Hypothalamus and Anterior Pituitary Gland of Follicular Phase Ewes.” *Reproduction, Fertility and Development* 23(6):780–87.
- Clarkson, J., W.C. Boon, E.R. Simpson, y A.E. Herbison. 2009. “Postnatal Development of an Estradiol-Kisspeptin Positive Feedback Mechanism Implicated in Puberty Onset.” *Endocrinology* 150(7):3214–20.
- Clasadonte, J., P. Poulain, N.K. Hanchate, G. Corfas, S.R. Ojeda, y V. Prevot. 2011. “Prostaglandin E2 Release from Astrocytes Triggers Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuron Firing via EP2 Receptor Activation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(38):16104–9.
- Constantin, S., R. Piet, K. Iremonger, S. Hwa Yeo, J. Clarkson, R. Porteous, y A.E. Herbison. 2012. “GnRH Neuron Firing and Response to GABA in Vitro Depend on Acute Brain Slice Thickness and Orientation.” *Endocrinology* 153(8):3758–69.
- Constantin, S., K.J. Iremonger, y A.E. Herbison. 2013. “In Vivo Recordings of GnRH Neuron Firing Reveal Heterogeneity and Dependence upon GABAA Receptor Signaling.” *Journal of Neuroscience* 33(22):9394–9401.
- Correa, F., F. Docagne, L. Mestre, D. Clemente, M. Hernangómez, F. Loría, y C. Guaza. 2009. “A Role for CB2 Receptors in Anandamide Signalling Pathways Involved in the Regulation of IL-12 and IL-23 in Microglial Cells.” *Biochemical Pharmacology* 77(1):86–100.
- Correa, F., M. Hernangómez, L. Mestre, F. Loría, A. Spagnolo, F. Docagne, V. Di Marzo, C. Guaza. 2010. “Anandamide Enhances IL-10 Production in Activated Microglia by Targeting CB2 Receptors: Roles of ERK1/2, JNK, and NF- $\kappa$ B.” *Glia* 58(2):135–47.
- Correa, F., L. Mestre, F. Docagne, y C. Guaza. 2005. “Activation of Cannabinoid CB2receptor Negatively Regulates IL-12p40 Production in Murine Macrophages: Role of IL-10 and ERK1/2 Kinase Signaling.” *British Journal of Pharmacology* 145(4):441–48.
- Costola-de-Souza, C., A. Ribeiro, V. Ferraz-de-Paula, A.S. Calefi, T.P. Aloia, J.A. Gimenes-Júnior, V.I. de Almeida, M.L. Pinheiro, y J. Palermo-Neto. 2013. “Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Inhibition Attenuates Acute Lung Injury in Mice.” *PLoS ONE* 8(10):1–15.
- Craft, R.M., J.A. Marusich, y J.L. Wiley. 2013. “Sex Differences in Cannabinoid Pharmacology: A Reflection of Differences in the Endocannabinoid System?” *Life Sci* 92(8–9):476–81.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cristino, L., L. de Petrocellis, G. Pryce, D. Baker, V. Guglielmotti, V. Di Marzo. 2006. "Immunohistochemical Localization of Cannabinoid Type 1 and Vanilloid Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptors in the Mouse Brain." *Neuroscience* 139(4):1405–15.
- D'Mello, C. y M.G. Swain. 2017. "Immune-to-Brain Communication Pathways in Inflammation-Associated Sickness and Depression." *Curr Top Behav Neurosci* 31:73–94.
- Demuth, D.G. y A. Molleman. 2006. "Cannabinoid Signalling." *Life Sciences* 78(6):549–63.
- Desroziers, E., J. Mikkelsen, V. Simonneaux, M. Keller, Y. Tillet, A. Caraty, y I. Franceschini. 2010. "Mapping of Kisspeptin Fibres in the Brain of the pro-Oestrous Rat." *Journal of Neuroendocrinology* 22(10):1101–12.
- Desroziers, E., J.D. Mikkelsen, A. Duittoz, y I. Franceschini. 2012. "Kisspeptin-Immunoreactivity Changes in a Sex- and Hypothalamic-Region-Specific Manner Across Rat Postnatal Development." *Journal of Neuroendocrinology* 24(8):1154–65.
- Devesa, I., R. Planells-Cases, G. Fernández-Ballester, J.M. González-Ros, A. Ferrer-Montiel, y A. Fernández-Carvajal. 2011. "Role of the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Inflammation and Sepsis." *Journal of Inflammation Research* 4(1):67–81.
- Drumond, A., N. Madeira, y R. Fonseca. 2017. "Endocannabinoid Signaling and Memory Dynamics: A Synaptic Perspective." *Neurobiology of Learning and Memory* 138:62–77.
- Ducret, E., G.M. Anderson, y A.E. Herbison. 2009. "RFamide-Related Peptide-3, a Mammalian Gonadotropin-Inhibitory Hormone Ortholog, Regulates Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Firing in the Mouse." *Endocrinology* 150(6):2799–2804.
- Dudás, B. y I. Merchenthaler. 2004. "Close Anatomical Associations between  $\beta$ -Endorphin and Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neuronal Systems in the Human Diencephalon." *Neuroscience* 124(1):221–29.
- Dufau, M.L. y C. Tsai-Morris. 2007. "The Luteinizing Hormone Receptor." Pp. 227–52 en *The Leydig cell in health and disease*, editores: A. Payne y M. Hardy. Totawa, NJ. Springer Inc.
- Dungan, H.M., D.K. Clifton, y R.A. Steiner. 2006. "Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion." *Endocrinology* 147(3):1154–58.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Durrant, A.R. y T.M. Plant. 1999. "A Study of the Gonadotropin Releasing Hormone Neuronal Network in the Median Eminence of the Rhesus Monkey (*Macaca Mulatta*) Using a Post-Embedding Immunolabelling Procedure." *Journal of Neuroendocrinology* 11(10):813–21.
- Ebisui, O., J. Fukata, T. Tominaga, N. Murakami, H. Kobayashi, H. Segawa, S. Muro, Y. Naito, Y. Nakai, Y. Masui, T. Nishida, y H. Imura. 1992. "Roles of Interleukin-1alpha and -1beta in Endotoxin-Induced Suppression of Plasma Gonadotropin Levels in Rats." *Endocrinology* 130(6):3307–13.
- Edwards, J.G. 2014. "TRPV1 in the Central Nervous System: Synaptic Plasticity, Function, and Pharmacological Implications." *Prog Drug Res* 68:77–104.
- Elphick, M.R. 2012. "The Evolution and Comparative Neurobiology of Endocannabinoid Signalling." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1607):3201–15.
- Esposito, G., A.A. Izzo, M. Di Rosa, y T. Iuvone. 2001. "Selective Cannabinoid CB1 Receptor-Mediated Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Protein Expression in C6 Rat Glioma Cells." *Journal of Neurochemistry* 78(4):835–41.
- Faletti, A., S. Perez Martinez, C. Perotti, y M.A. de Gimeno. 1999. "Activity of Ovarian Nitric Oxide Synthase (NOs) during Ovulatory Process in the Rat: Relationship with Prostaglandins (PGs) Production." *Nitric Oxide* 3(4):340–47.
- Fares, F. 2006. "The Role of O-Linked y N-Linked Oligosaccharides on the Structure-Function of Glycoprotein Hormones: Development of Agonists and Antagonists." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1760(4):560–67.
- Farkas, I., I. Kalló, L. Deli, B. Vida, E. Hrabovszky, C. Fekete, S.M. Moenter, M. Watanabe, y Z. Liposits. 2010. "Retrograde Endocannabinoid Signaling Reduces GABAergic Synaptic Transmission to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons." *Endocrinology* 151(12):5818–29.
- Farkas, I., C. Vastagh, E. Farkas, F. Bálint, K. Skrapits, E. Hrabovszky, C. Fekete, y Z. Liposits. 2016. "Glucagon-Like Peptide-1 Excites Firing and Increases GABAergic Miniature Postsynaptic Currents (mPSCs) in Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons of the Male Mice via Activation of Nitric Oxide (NO) and Suppression of Endocannabinoid Signaling Pathways." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10(September):1–20.
- Farkas, I., F. Bálint, E. Farkas, C. Vastagh, C. Fekete, Z. Liposits. 2018. "Estradiol Increases Glutamate and GABA Neurotransmission into GnRH Neurons via

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Retrograde NO-Signaling in Proestrous Mice during the Positive Estradiol Feedback Period.” *eNeuro* 5(4):57–75.
- Farkas, I., C. Vastagh, M. Sárvári, y Z. Liposits. 2013. “Ghrelin Decreases Firing Activity of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons in an Estrous Cycle and Endocannabinoid Signaling Dependent Manner.” *PLoS ONE* 8(10):1–16.
- Fawley, J.A., M.E. Hofmann, y M.C. Andresen. 2014. “Cannabinoid 1 and Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors Discretely Modulate Evoked Glutamate Separately from Spontaneous Glutamate Transmission.” *Journal of Neuroscience* 34(24):8324–32.
- Feetham, C.H., F. O’Brien, y R. Barrett-Jolley. 2018. “Ion Channels in the Paraventricular Hypothalamic Nucleus (PVN); Emerging Diversity and Functional Roles.” *Frontiers in Physiology* 9:1–23.
- Fegley, D., S. Kathuria, R. Mercier, C. Li, A. Goutopoulos, A. Makriyannis, y D. Piomelli. 2004. “Anandamide Transport Is Independent of Fatty-Acid Amide Hydrolase Activity and Is Blocked by the Hydrolysis-Resistant Inhibitor AM1172.” *Proc Nat Acad Sci USA* 101(23):8756–61.
- Felder, C.C., A. Nielsen, E.M. Briley, M. Palkovits, J. Priller, J. Axelrod, D.N. Nguyen, J.M. Richardson, R.M. Riggin, G.A. Koppel, S.M. Paul, y G.W. Becker. 1996. “Isolation and Measurement of the Endogenous Cannabinoid Receptor Agonist, Anandamide, in Brain and Peripheral Tissues of Human and Rat.” *FEBS Letters* 393(2–3):231–35.
- Feleder, C., D. Refojo, H. Jarry, W. Wuttke, y J.A. Moguilevsky. 1996. “Bacterial Endotoxin Inhibits LHRH Secretion Following the Increased Release of Hypothalamic GABA Levels.” *Neuroimmunomodulation* 3:342–51.
- Fernandez-Fernandez, R., A.C. Martini, V.M. Navarro, J.M. Castellano, C. Dieguez, E. Aguilar, L. Pinilla, M. Tena-Sempere. 2006. “Novel Signals for the Integration of Energy Balance and Reproduction.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 254–255:127–32.
- Fernández-Ruiz, J., J. Romero, y J.A. Ramos. 2015. “Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson’s Disease, Huntington’s Chorea, Alzheimer’s Disease, and Others.” *Handb Exp Pharmacol* 231:233–59
- Fernandez-Solari, J., J.P. Prestifilippo, P. Vissio, M. Ehrhart-Bornstein, S.R. Bornstein, V. Rettori, y J.C. Elverdin. 2009. “Anandamide Injected into the Lateral Ventricle of the Brain Inhibits Submandibular Salivary Secretion by Attenuating Parasympathetic

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Neurotransmission.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42(6):537–44.
- Fernández-Solari, J., J.P. Prestifilippo, S.R. Bornstein, S.M. McCann, y V. Rettori. 2006. “Participation of the Endocannabinoid System in the Effect of TNF-Alpha on Hypothalamic Release of Gonadotropin-Releasing Hormone.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1088:238–50.
- Ferré, S., C. Lluís, Z. Justinova, C. Quiroz, M. Orru, G. Navarro, E.I. Canela, R. Franco, y S.R. Goldberg. 2010. “Adenosine-Cannabinoid Receptor Interactions. Implications for Striatal Function.” *British Journal of Pharmacology* 160(3):443–53.
- Fezza, F., M. Bari, R. Florio, E. Talamonti, M. Feole, y M. Maccarrone. 2014. “Endocannabinoids, Related Compounds and Their Metabolic Routes.” *Molecules* 19(11):17078–106.
- Finkelstein, J.S., L.S. O’Dea, R.W. Whitcomb, y W.F. Jr Crowley. 1991. “Sex Steroid Control of Gonadotropin Secretion in the Human Male. II. Effects of Estradiol Administration in Normal and Gonadotropin-Releasing Hormone-Deficient Men.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 73(3):621–628.
- Fioravanti, B., M. De Felice, C.L. Stucky, K.A. Medler, M.C. Luo, L.R. Gardell, M. Ibrahim, T.P. Malan Jr, H.I. Yamamura, M.H. Ossipov, T. King, J. Lai, F. Porreca, y T.W. Vanderah. 2008. “Constitutive Activity at the Cannabinoid CB1 Receptor Is Required for Behavioral Response to Noxious Chemical Stimulation of TRPV1: Antinociceptive Actions of CB1 Inverse Agonists.” *J Neurosci* 28(45):11593–602.
- Fu, J., S. Gaetani, F. Oveisi, J. Lo Verme, A. Serrano, F. Rodríguez De Fonseca, A. Rosengarth, H. Luecke, B. Di Giacomo, G. Tarzia, y D. Piomelli. 2003. “Oleylethanolamide Regulates Feeding and Body Weight through Activation of the Nuclear Receptor PPAR- $\alpha$ .” *Nature* 425(6953):90–93.
- Fujii, M., P. Sherchan, P.R. Krafft, W.B. Rolland, Y. Soejima, y J.H. Zhang. 2014. “Cannabinoid Type 2 Receptor Stimulation Attenuates Brain Edema by Reducing Cerebral Leukocyte Infiltration Following Subarachnoid Hemorrhage in Rats.” *J Neurol Sci.* 342(0):101–6.
- Fundación-canna. 2017. “El Sistema Endocannabinoide.” *Fundación Canna*. (<https://www.fundacion-canna.es/sistema-endocannabinoide>).
- Galiegue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussosoy, D. Carrière, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur, y P. Casellas. 1995. “Expression of Central and Peripheral Cannabinoid Receptors in Human Immune Tissues and Leukocyte

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Subpopulations.” *Eur J Biochem* 232(1):54–61.
- Galve-Roperh, I., V. Chiurchiù, J. Díaz-Alonso, M. Bari, M. Guzmán, y M. Maccarrone. 2013. “Cannabinoid Receptor Signaling in Progenitor/stem Cell Proliferation and Differentiation.” *Progress in Lipid Research* 52(4):633–50.
- Gammon, C.M., G.M. Freeman, W. Xie, S.L. Petersen, y W.C. Wetsel. 2005. “Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion by Cannabinoids.” *Endocrinology* 146(10):4491–99.
- Garcia-Segura, L.M., B. Lorenz, y L.L. DonCarlos. 2008. “The Role of Glia in the Hypothalamus: Implications for Gonadal Steroid Feedback and Reproductive Neuroendocrine Output.” *Reproduction* 135(4):419–29.
- Gentile, A., D. Fresegna, A. Musella, H. Sepman, S. Bullitta, F. De Vito, R. Fantozzi, A. Usiello, M. Maccarrone, N.B. Mercuri, B. Lutz, G. Mandolesi, y D. Centonze. 2016. “Interaction between Interleukin-1 $\beta$  and Type-1 Cannabinoid Receptor Is Involved in Anxiety-like Behavior in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.” *Journal of Neuroinflammation* 13(1):1–14.
- Gharib, S.D., M.E. Wierman, M.A. Shupnik, y W.W. Chin. 1990. “Molecular Biology of the Pituitary Gonadotropins.” *Endocrine Reviews* 11(1):177–99.
- Di Giorgio, NP. 2013. “GABA y receptores GABA B en el eje reproductivo: su relación con GnRH y kisspeptinas.” Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Di Giorgio, N.P., S.J. Semaan, J. Kim, P.V. López, B. Bettler, C. Libertun, V.A. Lux-Lantos, A.S. Kauffman. 2014. “Impaired GABAB Receptor Signaling Dramatically up-Regulates Kiss1 Expression Selectively in Nonhypothalamic Brain Regions of Adult but Not Prepubertal Mice.” *Endocrinology* 155(3):1033–44.
- Gong, J.P., E.S. Onaivi, H. Ishiguro, Q.R. Liu, P.A. Tagliaferro, A. Brusco, y G.R. Uhl. 2006. “Cannabinoid CB2 Receptors: Immunohistochemical Localization in Rat Brain.” *Brain Research* 1071(1):10–23.
- Goodman, J. y M.G. Packard. 2015. “The Influence of Cannabinoids on Learning and Memory Processes of the Dorsal Striatum.” *Neurobiology of Learning and Memory* 125(June):1–14.
- Gore, A.C. y J.L. Roberts. 1997. “Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Gene Expression in Vivo and in Vitro.” *Neuroendocrinology* 18(2):209–45.
- Gregory, S.J., C.T. Lacza, A.A. Detz, S. Xu, L.A. Petrillo, y U.B. Kaiser. 2005. “Synergy between Activin A and Gonadotropin-Releasing Hormone in Transcriptional

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Activation of the Rat Follicle-Stimulating Hormone-Beta Gene.” *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19(1):237–54.
- Grossman, A.B., W.G. Rossmanith, E.B. Kabigting, G. Cadd, D. Clifton, y R.A. Steiner. 1994. “The Distribution of Hypothalamic Nitric Oxide Synthase mRNA in Relation to Gonadotrophin-Releasing Hormone Neurons.” *The Journal of Endocrinology* 140(2):R5-8.
- Grumbach, M.M. 2002. “The Neuroendocrinology of Human Puberty Revisited.” *Hormone Research* 57(SUPPL. 2):2–14.
- Gui, H., Y. Sun, Z.M. Luo, D.F. Su, S.M. Dai, X. Liu. 2013. “Cannabinoid Receptor 2 Protects against Acute Experimental Sepsis in Mice.” *Mediators of Inflammation* 2013:741303.
- Guillemin, R. 1978. “Peptides in the Brain. the New Endocrinology of the Neuron.” *Science* 202(4366):390–402.
- Guzman, M. 2005. “Effects on Cell Viability.” *Handb Exp Pharmacol* (168):627–42.
- Guzmán, M., J. Lo Verme, J. Fu, F. Oveisi, C. Blázquez, y D. Piomelli. 2004. “Oleoylethanolamide Stimulates Lipolysis by Activating the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPAR-Alpha).” *Journal of Biological Chemistry* 279(27):27849–54.
- Han, S.K., M.L. Gottsch, K.J. Lee, S.M. Popa, J.T. Smith, S.K. Jakawich, D.K. Clifton, R.A. Steiner, y A.E. Herbison. 2005. “Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty.” *Journal of Neuroscience* 25(49):11349–56.
- Han, S.K., K. Lee, J.P. Bhattarai, y A.E. Herbison. 2010. “Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Exerts Stimulatory Effects on GnRH Neurones in Intact Adult Male and Female Mice.” *Journal of Neuroendocrinology* 22(3):188–95.
- Hanchate, N.K., J. Parkash, N. Bellefontaine, D. Mazur, W.H. Colledge, X. d'Anglemont de Tassigny, y V. Prevot. 2012. “Kisspeptin-GPR54 Signaling in Mouse NO-Synthesizing Neurons Participates in the Hypothalamic Control of Ovulation.” *Journal of Neuroscience* 32(3):932–45.
- Hanus, L., S. Abu-Lafi, E. Frider, A. Breuer, Z. Vogel, D.E. Shalev, I. Kustanovich, y R. Mechoulam. 2001. “2-Arachidonyl Glyceryl Ether, an Endogenous Agonist of the Cannabinoid CB1 Receptor.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(7):3662–65.
- Harms, P.G., S.R. Ojeda, y S.M. McCann. 1976. “Failure to Monoaminergic and

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cholinergic Receptor Blockers to Prevent Prostaglandin E<sub>2</sub>-Induced Luteinizing Hormone Release.” *Endocrinology* 98(2):318–23.
- Hashimotodani, Y., T. Ohno-Shosaku, H. Tsubokawa, H. Ogata, K. Emoto, T. Maejima, K. Araishi, H.S. Shin, y M. Kano. 2005. “Phospholipase C $\beta$  Serves as a Coincidence Detector through Its Ca<sup>2+</sup>-dependency for Triggering Retrograde Endocannabinoid Signal.” *Neuron* 45(2):257–68.
- Herbison, A.E. 2006. “Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network.” Pp. 399–443 en *Physiology of Reproduction*, editores: E. Knobil y J. Neill. Academic Press.
- Herbison, A.E. y S.M. Moenter. 2011. “Depolarising and Hyperpolarising Actions of GABAA Receptor Activation on GnRH Neurons: Towards an Emerging Consensus.” *J Neuroendocrinol* 23(7):557–69.
- Herbison, A.E., S.X. Simonian, P.J. Norris, y P.C. Emson. 1996. “Relationship of Neuronal Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity to GnRH Neurons in the Ovariectomized and Intact Female Rat.” *Journal of Neuroendocrinology* 8(1):73–82.
- Herde, M.K., K.J. Iremonger, S. Constantin, y A.E. Herbison. 2013. “GnRH Neurons Elaborate a Long-Range Projection with Shared Axonal and Dendritic Functions.” *Journal of Neuroscience* 33(31):12689–97.
- Herkenham, M., A.B. Lynn, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. de Costa, y K.C. Rice. 1991. “Characterization and Localization of Cannabinoid Receptors in Rat Brain: A Quantitative in Vitro Autoradiographic Study.” *The Journal of Neuroscience* 11(2):563–83.
- Herman, A.P., A. Krawczyńska, J. Bochenek, E. Dobek, A. Herman, y D. Tomaszewska-Zaremba. 2013. “LPS-Induced Inflammation Potentiates the IL-1  $\beta$  -Mediated Reduction of LH Secretion from the Anterior Pituitary Explants.” *Clinical and Developmental Immunology* 2013.
- Hermann, H., L. De Petrocellis, T. Bisogno, A. Schiano Moriello, B. Lutz, y V. Di Marzo. 2003. “Dual Effect of Cannabinoid CB<sub>1</sub>receptor Stimulation on a Vanilloid VR<sub>1</sub> Receptor-Mediated Response.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 60(3):607–16.
- Hernangómez, M., L. Mestre, F.G. Correa, F. Loría, M. Mecha, P.M. Iñigo, F. Docagne, R.O. Williams, J. Borrell, y C. Guaza. 2012. “CD200-CD200R1 Interaction Contributes to Neuroprotective Effects of Anandamide on Experimentally Induced Inflammation.” *Glia* 60:1437–50.
- Hillard, C.J., M. Beatka, y J. Sarvaideo. 2016. “Endocannabinoid Signaling and the

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hypothalamic-Pituitary- Adrenal Axis.” *Compr Physiol* 7(1):1–15.
- Hillard, C.J. y A. Jarrahan. 2003. “Cellular Accumulation of Anandamide: Consensus and Controversy.” *British Journal of Pharmacology* 140(5):802–8.
- Hinuma, S., Y. Shintani, S. Fukusumi, N. Iijima, Y. Matsumoto, M. Hosoya, R. Fujii, T. Watanabe, K. Kikuchi, Y. Terao, T. Yano, T. Yamamoto, Y. Kawamata, Y. Habata, M. Asada, C. Kitada, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura, M. Tanaka, Y. Ibata, y M. Fujino. 2000. “New Neuropeptides Containing Carboxy-Terminal RFamide and Their Receptor in Mammals.” *Nature Cell Biology* 2(10):703–8.
- Horvath, E. y K. Kovacs. 1988. “Fine Structural Cytology of the Adenohypophysis in Rat and Man.” *Journal of Electron Microscopy Technique* 8(4):401–32.
- Huang, S.M., T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T.J. Petros, J.F. Krey, C.J. Chu, J.D. Miller, S.N. Davies, P. Geppetti, J.M. Walker, y V. Di Marzo. 2002. “An Endogenous Capsaicin-like Substance with High Potency at Recombinant and Native Vanilloid VR1 Receptors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(12):8400–8405.
- Iannotti, F.A., V. Di Marzo, y S. Petrosino. 2016. “Endocannabinoids and Endocannabinoid-Related Mediators: Targets, Metabolism and Role in Neurological Disorders.” *Progress in Lipid Research* 62:107–28.
- Igaz, P., R. Salvi, J.P. Rey, M. Glauser, F.P. Pralong, y R.C. Gaillard. 2006. “Effects of Cytokines on Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Gene Expression in Primary Hypothalamic Neurons and in GnRH Neurons Immortalized Conditionally.” *Endocrinology* 147(2):1037–43.
- Irani, B.G., C. Le Foll, A. Dunn-Meynell, y B.E. Levin. 2008. “Effects of Leptin on Rat Ventromedial Hypothalamic Neurons.” *Endocrinology* 149(10):5146–54.
- Irwig, M.S., G.S. Fraley, J.T. Smith, B.V. Acohido, S.M. Popa, M.J. Cunningham, M.L. Gottsch, D.K. Clifton, y R.A. Steiner. 2004. “Kisspeptin Activation of Gonadotropin Releasing Hormone Neurons and Regulation of KiSS-1 mRNA in the Male Rat.” *Neuroendocrinology* 80(4):264–72.
- Ishac, E.J., L. Jiang, K.D. Lake, K. Varga, M.E. Abood, G. Kunos. 1996. “Inhibition of Exocytotic Noradrenaline Release by Presynaptic Cannabinoid CB1receptors on Peripheral Sympathetic Nerves.” *British Journal of Pharmacology* 118(8):2023–28.
- Iwasa, T., T. Matsuzaki, A. Tungalagsuvd, M. Munkhzaya, T. Kawami, H. Niki, T. Kato, A. Kuwahara, H. Uemura, T. Yasui, y M. Irahara. 2014. “Hypothalamic Kiss1 and RFRP Gene Expressions Are Changed by a High Dose of Lipopolysaccharide in

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Female Rats.” *Hormones and Behavior* 66(2):309–16.
- Jakubowski, M. y J.L. Roberts. 1994. “Processing of Gonadotropin-Releasing Hormone Gene Transcripts in the Rat Brain.” *The Journal of Biological Chemistry* 269(6):4078–83.
- Janovick, J.A. y P.M. Conn. 1996. “Gonadotropin Releasing Hormone Agonist Provokes Homologous Receptor Microaggregation: An Early Event in Seven-Transmembrane Receptor Mediated Signaling.” *Endocrinology* 137(8):3602–5.
- Jansen, H.T., C. Cutter, S. Hardy, M.N. Lehman, y R.L. Goodman. 2003. “Seasonal Plasticity within the Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) System of the Ewe: Changes in Identified GnRH Inputs and Glial Association.” *Endocrinology* 144(8):3663–76.
- Jarow, J.P., W.W. Wright, T.R. Brown, X. Yan, y B.R. Zirkin. 2005. “Bioactivity of Androgens within the Testes and Serum of Normal Men.” *Journal of Andrology* 26(3):343–48.
- Jennes, L., W.E. Stumpf, y M.E. Sheedy. 1985. “Ultrastructural Characterization of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) -Producing Neurons.” *The Journal of Comparative Neurology* 232:534–47.
- Julius, D. 2013. “TRP Channels and Pain.” Pp. 355–84 en *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 29. Editor: Randy Schekman. Elsevier Inc.
- Kaczocha, M., A. Hermann, S.T. Glaser, I.N. Bojesen, y D.G. Deutsch. 2006. “Anandamide Uptake Is Consistent with Rate-Limited Diffusion and Is Regulated by the Degree of Its Hydrolysis by Fatty Acid Amide Hydrolase.” *Journal of Biological Chemistry* 281(14):9066–75.
- Kah, O., C. Lethimonier, G. Somoza, L.G. Guilgur, C. Vaillant, y J.J. Lareyre. 2007. “GnRH and GnRH Receptors in Metazoa: A Historical, Comparative, and Evolutionary Perspective.” *General and Comparative Endocrinology* 153(1–3):346–64.
- Kakizaki, Y., H. Watanobe, A. Kohsaka, y T. Suda. 1999. “Temporal Profiles of Interleukin-1beta, Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor-Alpha in the Plasma and Hypothalamic Paraventricular Nucleus after Intravenous or Intraperitoneal Administration of Lipopolysaccharide in the Rat: Estimation by Push-Pull perfusion.” *Endocrine Journal* 46(4):487–96.
- Kang, S.S., S.R. Kim, S. Leonhardt, H. Jarry, W. Wuttke, y K. Kim. 2000. “Effect of Interleukin-1beta on Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) and GnRH Receptor Gene Expression in Castrated Male Rats.” *Journal of Neuroendocrinology* 12(5):421–



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 29.
- Karamikheirabad, M., G. Behzadi, M. Faghihi, R. Raoofian, S. Ejtemaei Mehr, W.A. Zuure, y H.R. Sadeghipour. 2013. "A Role for Endocannabinoids in Acute Stress-Induced Suppression of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Male Rats." *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 40(4):155–62.
- Katona, I. y T.F. Freund. 2014. "Multiple Functions of Endocannabinoid Signaling in the Brain." *Annual Review of Neuroscience* 35:529–58.
- Kauffman, A.S., M.L. Gottsch, J. Roa, A.C. Byquist, A. Crown, D.K. Clifton, G.E. Hoffman, R.A. Steiner, y M. Tena-Sempere. 2007. "Sexual Differentiation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Rat." *Endocrinology* 148(4):1774–83.
- Kawai, T. y S. Akira. 2006. "TLR Signaling." *Cell Death and Differentiation* 13(5):816–25.
- Kerr, D.M., N.N. Burke, G.K. Ford, T.J. Connor, B. Harhen, L.J. Egan, D.P. Finn, y M. Roche. 2012. "Pharmacological Inhibition of Endocannabinoid Degradation Modulates the Expression of Inflammatory Mediators in the Hypothalamus Following an Immunological Stressor." *Neuroscience* 204:53–63.
- Kerr, D.M., B. Harhen, B.N. Okine, L.J. Egan, D.P. Finn, y M. Roche. 2013. "The Monoacylglycerol Lipase Inhibitor JZL184 Attenuates LPS-Induced Increases in Cytokine Expression in the Rat Frontal Cortex and Plasma: Differential Mechanisms of Action." *British Journal of Pharmacology* 169(4):808–19.
- Kho, D.T., M. Glass, y E.S. Graham. 2017. "Is the Cannabinoid CB2 Receptor a Major Regulator of the Neuroinflammatory Axis of the Neurovascular Unit in Humans?" Pp. 367–96 en *Advances in Pharmacology*, vol. 80. Editores: D. Kendall y A. Stephen. Elsevier Inc.
- Kinsey-Jones, J.S., X.F. Li, A.M. Knox, E.S. Wilkinson, X.L. Zhu, A.A. Chaudhary, S.R. Milligan, S.L. Lightman, y K.T. O'Byrne. 2009. "Down-Regulation of Hypothalamic Kisspeptin and Its Receptor, Kiss1r, mRNA Expression Is Associated with Stress-Induced Suppression of Luteinising Hormone Secretion in the Female Rat." *Journal of Neuroendocrinology* 21(1):20–29.
- Kirby, E.D., A.C. Geraghty, T. Ubuka, G.E. Bentley, y D. Kaufer. 2009. "Stress Increases Putative Gonadotropin Inhibitory Hormone and Decreases Luteinizing Hormone in Male Rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(27):11324–29.
- Kirilly, E., X. Gonda, y G. Bagdy. 2012. "CB1 Receptor Antagonists: New Discoveries Leading to New Perspectives." *Acta Physiologica* 205(1):41–60.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kirkham, T.C., C.M. Williams, F. Fezza, y V. Di Marzo. 2002. "Endocannabinoid Levels in Rat Limbic Forebrain and Hypothalamus in Relation to Fasting, Feeding and Satiation: Stimulation of Eating by 2-Arachidonoyl Glycerol." *British Journal of Pharmacology* 136(4):550–57.
- Klein, T.W. 2005. "Cannabinoid-Based Drugs as Anti-Inflammatory Therapeutics." *Nature Reviews Immunology* 5(5):400–411.
- Klein, T.W., B. Lane, C.A. Newton, y H. Friedman. 2000. "The Cannabinoid System and Cytokine Network." *Proc Soc Exp Biol Med* 255(1):1–8.
- Knigge, K.M. y D.E. Scott. 1970. "Structure and Function of the Median Eminence." *The American Journal of Anatomy* 129(2):223–43.
- Knobil, E. 1990. "The GnRH Pulse Generator." *Am J Obstet Gynecol.* 163(5 Pt2):1721–27.
- Köfalvi, A., M.F. Pereira, N. Rebola, R.J. Rodrigues, C.R. Oliveira, y R.A. Cunha. 2007. "Anandamide and NADA Bi-Directionally Modulate Presynaptic Ca<sup>2+</sup> levels and Transmitter Release in the Hippocampus." *British Journal of Pharmacology* 151(4):551–63.
- Krsmanovic, L.Z., L. Hu, P.K. Leung, H. Feng, y K.J. Catt. 2009. "The Hypothalamic GnRH Pulse Generator: Multiple Regulatory Mechanisms." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20(8):402–8.
- Kuehl-Kovarik, M.C., W.A. Pouliot, G.L. Halterman, R.J. Handa, F.E. Dudek, y K.M. Partin. 2002. "Episodic Bursting Activity and Response to Excitatory Amino Acids in Acutely Dissociated Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons Genetically Targeted with Green Fluorescent Protein." *The Journal of Neuroscience* 22(6):2313–22.
- Kurrasch, D.M., C.C. Cheung, F.Y. Lee, P.V. Tran, K. Hata, H.A. Ingraham. 2007. "The Neonatal Ventromedial Hypothalamus Transcriptome Reveals Novel Markers with Spatially Distinct Patterning." *Journal of Neuroscience* 27(50):13624–34.
- Labar, G. y C. Michaux. 2007. "Fatty Acid Amide Hydrolase: From Characterization to Therapeutics." *Chem Biodivers* 4(8):1882–1902.
- Lasaga, M. y L. Debeljuk. 2011. "Tachykinins and the Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis: An Update." *Peptides* 32(9):1972–78.
- De Laurentiis, A., J. Fernandez-Solari, C. Mohn, B. Burdet, M.A. Zorrilla Zubilete, y V. Rettori. 2010. "The Hypothalamic Endocannabinoid System Participates in the Secretion of Oxytocin and Tumor Necrosis Factor-Alpha Induced by Lipopolysaccharide." *Journal of Neuroimmunology* 221(1–2):32–41.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lee, S.H., M. Ledri, B. Tóth, I. Marchionni, C.M. Henstridge, B. Dudok, K. Kenesei, L. Barna, S.I. Szabó, T. Renkecz, M. Oberoi, M. Watanabe, C.L. Limoli, G. Horvai, I. Soltesz, y I. Katona. 2015. "Multiple Forms of Endocannabinoid and Endovanilloid Signaling Regulate the Tonic Control of GABA Release." *Journal of Neuroscience* 35(27):10039–57.
- Lehman, M.N., L.M. Coolen, y R.L. Goodman. 2010. "Minireview: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) Cells of the Arcuate Nucleus: A Central Node in the Control of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion." *Endocrinology* 151(8):3479–89.
- Lehnardt, S. 2010. "Innate Immunity and Neuroinflammation in the CNS: The Role of Microglia in Toll-like Receptor-Mediated Neuronal Injury." *Glia* 58(3):253–63.
- Li, X.F., J.E. Bowe, J.S. Kinsey-Jones, S.D. Brain, S.L. Lightman, y K.T. O'Byrne. 2006. "Differential Role of Corticotropin-Releasing Factor Receptor Types 1 and 2 in Stress-Induced Suppression of Pulsatile Luteinising Hormone Secretion in the Female Rat." *Journal of Neuroendocrinology* 18(8):602–10.
- Liew, S.H., S.J. Meachem, y M.P. Hedger. 2007. "A Stereological Analysis of the Response of Spermatogenesis to an Acute Inflammatory Episode in Adult Rats." *Journal of Andrology* 28(1):176–85.
- Limebeer, C.L., V.K. Vemuri, H. Bedard, S.T. Lang, K.P. Ossenkopp, A. Makriyannis, y L.A. Parker. 2010. "Inverse Agonism of Cannabinoid CB1 Receptors Potentiates LiCl-Induced Nausea in the Conditioned Gaping Model in Rats." *British Journal of Pharmacology* 161(2):336–49.
- Lin, Y., X. Li, M. Lupi, J.S. Kinsey-Jones, B. Shao, S.L. Lightman, y K.T. O'Byrne. 2011. "The Role of the Medial and Central Amygdala in Stress-Induced Suppression of Pulsatile LH Secretion in Female Rats." *Endocrinology* 152(2):545–55.
- Lin, Y.S., X.F. Li, B. Shao, M.H. Hu, A.L. Goundry, A. Jeyaram, S.L. Lightman, y K.T. O'Byrne. 2012. "The Role of GABAergic Signalling in Stress-Induced Suppression of Gonadotrophin-Releasing Hormone Pulse Generator Frequency in Female Rats." *Journal of Neuroendocrinology* 24(3):477–88.
- Liu, X., R. Porteous, X. d'Anglemon de Tassigny, W.H. Colledge, R. Millar, S.L. Petersen, y A.E. Herbison. 2011. "Frequency-Dependent Recruitment of Fast Amino Acid and Slow Neuropeptide Neurotransmitter Release Controls Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Excitability." *Journal of Neuroscience* 31(7):2421–30.
- Liu, X. y A.E. Herbison. 2011. "Estrous Cycle- and Sex-Dependent Changes in Pre- and

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Postsynaptic GABA B Control of GnRH Neuron Excitability.” *Endocrinology* 152(12):4856–64.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$  CT Method.” *Methods* 25:402–8.
- López, F.J., A.O. Donoso, y A. Negro-Vilar. 1992. “Endogenous Excitatory Amino Acids and Glutamate Receptor Subtypes Involved in the Control of Hypothalamic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Secretion.” *Endocrinology* 130(1986–1992).
- Louis, G.W., M. Greenwald-Yarnell, R. Phillips, L.M. Coolen, M.N. Lehman, y M.G. Myers Jr. 2011. “Molecular Mapping of the Neural Pathways Linking Leptin to the Neuroendocrine Reproductive Axis.” *Endocrinology* 152(6):2302–10.
- Loveland, K.L., B. Klein, D. Poeschl, S. Indumathy, M. Bergmann, B.E. Loveland, M.P. Hedger, y H.C. Schuppe 2017. “Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and beyond.” *Frontiers in Endocrinology* 8(NOV):1–16.
- LoVerme, J., G. La Rana, R. Russo, A. Calignano, y D. Piomelli. 2005. “The Search for the Palmitoylethanolamide Receptor.” *Life Sciences* 77(14):1685–98.
- De Luis, D.A., O. Izaola, D. Primo, B. De la Fuente, y R. Aller. 2017. “El Polimorfismo rs3123554 En El Gen Receptor Canabinoide Tipo 2 (CNR2) Se Relaciona Con El Peso Corporal Y La Resistencia a La Insulina En Obesos.” *Endocrinología, Diabetes Y Nutrición* 64(8):440–45.
- Ma, L., J. Jia, X. Liu, F. Bai, Q. Wang, y L. Xiong. 2015. “Activation of Murine Microglial N9 Cells Is Attenuated through Cannabinoid Receptor CB2 Signaling.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458(1):92–97.
- Maccarrone, M. 2009. “Endocannabinoids: Friends and Foes of Reproduction.” *Progress in Lipid Research* 48(6):344–54.
- Mackie, K. 2008. “Cannabinoid Receptors: Where They Are and What They Do.” *Journal of Neuroendocrinology* 20(SUPPL. 1):10–14.
- Maejima, T., S. Oka, Y. Hashimoto-dani, T. Ohno-Shosaku, A. Aiba, D. Wu, K. Waku, T. Sugiura, y M. Kano. 2005. “Synaptically Driven Endocannabinoid Release Requires Ca<sup>2+</sup>-Assisted Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1 to Phospholipase C 4 Signaling Cascade in the Cerebellum.” *Journal of Neuroscience* 25(29):6826–35.
- Mailleux, P. y J.J. Vanderhaeghen. 1992. “Distribution of Neuronal Cannabinoid

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Receptor in the Adult Rat Brain: A Comparative Receptor Binding Radioautography and in Situ Hybridization Histochemistry.” *Neuroscience* 48(3):655–68.
- Maione, S., T. Bisogno, V. de Novellis, E. Palazzo, L. Cristino, M. Valenti, S. Petrosino, V. Guglielmotti, F. Rossi, y V. Di Marzo. 2006. “Elevation of Endocannabinoid Levels in the Ventrolateral Periaqueductal Grey through Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase Affects Descending Nociceptive Pathways via Both Cannabinoid Receptor Type 1 and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Receptors.” *Pharmacology* 316(3):969–82.
- Malan, T.P., M.M. Ibrahim, J. Lai, T.W. Vanderah, A. Makriyannis, y F. Porreca. 2003. “CB2 Cannabinoid Receptor Agonists: Pain Relief without Psychoactive Effects?” *Current Opinion in Pharmacology* 3(1):62–67.
- Mandal, T.K. y N.S. Das. 2009. “Effect of  $\delta$ -9-Tetrahydrocannabinol on Altered Antioxidative Enzyme Defense Mechanisms and Lipid Peroxidation in Mice Testes.” *European Journal of Pharmacology* 607(1–3):178–87.
- Mani, S.K., A. Mitchell, y B.W.O. Malley. 2001. “Progesterone Receptor and Dopamine Receptors Are Required in Delta 9 -Tetrahydrocannabinol Modulation of Sexual Receptivity in Female Rats.” *PNAS* 98(3):1249–54.
- Marchalant, Y., S. Rosi, y G.L. Wenk. 2007. “Anti-Inflammatory Property of the Cannabinoid Agonist WIN-55212-2 in a Rodent Model of Chronic Brain Inflammation.” *Neuroscience* 144(4):1516–22.
- Maresz, K., E.J. Carrier, E.D. Ponomarev, C.J. Hillard, y B.N. Dittel. 2005. “Modulation of the Cannabinoid CB2 Receptor in Microglial Cells in Response to Inflammatory Stimuli.” *Journal of Neurochemistry* 95(2):437–45.
- Marks, B.H. 1973. “Delta1 Tetrahydrocannabinol and Luteinizing Hormone Secretion.” *Progress in Brain Research* 39:331–38.
- Martini, A.C., R. Fernández-Fernández, S. Tovar, V.M. Navarro, E. Vigo, M.J. Vazquez, J.S. Davies, N.M. Thompson, E. Aguilar, L. Pinilla, T. Wells, C. Dieguez, y M. Tena-Sempere. 2006. “Comparative Analysis of the Effects of Ghrelin and Unacylated Ghrelin on Luteinizing Hormone Secretion in Male Rats.” *Endocrinology* 147(5):2374–82.
- Di Marzo, V. 2008. “Targeting the Endocannabinoid System: To Enhance or Reduce?” *Nature Reviews. Drug Discovery* 7(may):438–55.
- Di Marzo, V. y L. Cristino. 2008. “Why Endocannabinoids Are Not All Alike.” *Nature Neuroscience* 11(2):124–26.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Di Marzo, V. y I. Matias. 2005. "Endocannabinoid Control of Food Intake and Energy Balance." *Nat Neurosci* 8(5):585–89.
- Di Marzo, V., D. Melck, T. Bisogno, y L. De Petrocellis. 1998. "Endocannabinoids: Endogenous Cannabinoid Receptor Ligands with Neuromodulatory Action." *Trends in Neurosciences* 21(12):521–28.
- Di Marzo, V. y L. De Petrocellis. 2010. "Endocannabinoids as Regulators of Transient Receptor Potential (TRP) Channels: A Further Opportunity to Develop New Endocannabinoid-Based Therapeutic Drugs." *Current Medicinal Chemistry* 17(14):1430–49.
- Di Marzo, V., L. De Petrocellis, y T. Bisogno. 2001. "Endocannabinoids Part I: Molecular Basis of Endocannabinoid Formation, Action and Inactivation and Development of Selective Inhibitors." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 5(2):241–65.
- Di Marzo, V. y S. Petrosino. 2007. "Endocannabinoids and the Regulation of Their Levels in Health and Disease." *Current Opinion in Lipidology* 18(2):129–40.
- Matias, I. y V. Di Marzo. 2007. "Endocannabinoids and the Control of Energy Balance." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18(1):27–37.
- Matsuwaki, T., E. Watanabe, M. Suzuki, K. Yamanouchi, y M. Nishihara. 2003. "Glucocorticoid Maintains Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone under Infectious Stress Condition." *Endocrinology* 144(8):3477–82.
- Matsuyama, S., S. Ohkura, K. Mogi, Y. Wakabayashi, Y. Mori, H. Tsukamura, K. Maeda, M. Ichikawa, y H. Okamura. 2011. "Morphological Evidence for Direct Interaction between Kisspeptin and Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons at the Median Eminence of the Male Goat: An Immunoelectron Microscopic Study." *Neuroendocrinology* 94(4):323–32.
- Maurer, J.A. y S. Wray. 1999. "Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Quantified in Tissues and Slice Explant Cultures of Postnatal Rat Hypothalami." *Endocrinology* 140(2):791–99.
- Mazier, W., N. Saucisse, B. Gatta-Cherifi, y D. Cota. 2015. "The Endocannabinoid System: Pivotal Orchestrator of Obesity and Metabolic Disease." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 26(10):524–37.
- McArdle, C.A. y M.S. Roberson. 2015. "Gonadotropes and Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling." Pp. 335–97 en *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, editores: T. M. Plant y A. J. Zelenik. Elsevier Inc.
- McClellan, K.M., K.L. Parker, y S. Tobet. 2006. "Development of the Ventromedial

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nucleus of the Hypothalamus.” *Frontiers in Neuroendocrinology* 27(2):193–209.
- McLaughlin, P.J., K. Winston, L. Swezey, A. Wisniecki, J. Aberman, D.J. Tardif, A.J. Betz, K. Ishiwari, A. Makriyannis, y J.D. Salamone. 2003. “The Cannabinoid CB1 Antagonists SR 141716A and AM 251 Suppress Food Intake and Food-Reinforced Behavior in a Variety of Tasks in Rats.” *Behavioural Pharmacology* 14(8):583–88.
- Melmed S. 2010. *The Pituitary: Third Edition*. Elsevier Inc.
- Mestre, L., F. Correa, A. Arévalo-Martín, E. Molina-Holgado, M. Valenti, G. Ortar, V. Di Marzo, y C. Guaza. 2005. “Pharmacological Modulation of the Endocannabinoid System in a Viral Model of Multiple Sclerosis.” *Journal of Neurochemistry* 92(6):1327–39.
- Miliar, R.P., P.J. Wormald, y R.C. Milton. 1986. “Stimulation of Gonadotropin Release by a Non- GnRH Peptide Sequence of the GnRH Precursor.” *Science* 232(4746):68–70.
- Millar, R.P., Z.L. Lu, A.J. Pawson, C.A. Flanagan, K. Morgan, y S.R. Maudsley. 2004. “Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors.” *Endocrine Reviews* 25(2):235–75.
- Miller, A.M. y N. Stella. 2008. “CB2 Receptor-Mediated Migration of Immune Cells: It Can Go Either Way.” *British Journal of Pharmacology* 153(2):299–308.
- Mittelman-Smith, M.A., H. Williams, S.J. Krajewski-Hall, J. Lai, P. Ciofi, N.T. McMullen, y N.E. Rance. 2012. “Arcuate Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) Neurons Mediate the Estrogen Suppression of Gonadotropin Secretion and Body Weight.” *Endocrinology* 153(6):2800–2812.
- Moenter, S.M., A.R. DeFazio, G.I.R. Pitts, y C.S. Nunemaker. 2003. “Mechanisms Underlying Episodic Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion.” *Frontiers in Neuroendocrinology* 24(2):79–93.
- Moldrich, G. y T. Wenger. 2000. “Localization of the CB1 Cannabinoid Receptor in the Rat Brain. An Immunohistochemical Study.” *Peptides* 21(11):1735–42.
- Molina-Holgado, F.R., E. Pinteaux, J.D. Moore, E. Molina-Holgado, C. Guaza, R.M. Gibson, y N.J. Rothwell. 2003. “Endogenous Interleukin-1 Receptor Antagonist Mediates Anti-Inflammatory and Neuroprotective Actions of Cannabinoids in Neurons and Glia.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23(16):6470–74.
- Molinas, A.J., L.D. Desmoulins, B.V. Hamling, S.M. Butcher, I.J. Anwar, K. Miyata, C.L. Enix, C.M. Dugas, R. Satou, A.V. Derbenev, y A. Zsombok, 2018. “Interaction between TRPV1-expressing neurons in the hypothalamus.” *Journal of*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Neurophysiology* 121(1):140-151.
- More, S.V., J.Y. Park, B.W. Kim, H. Kumar, H.W. Lim, S.M. Kang, S. Koppula, S.H. Yoon, y D.K. Choi. 2013. "Anti-Neuroinflammatory Activity of a Novel Cannabinoid Derivative by Inhibiting the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-Induced BV-2 Microglial Cells." *Journal of Pharmacological Sciences* 121(2):119–30.
- Moschos, S., J.L. Chan, y C.S. Mantzoros. 2002. "Leptin and Reproduction: A Review." *Fertility and Sterility* 77(3):433–44.
- Moynagh, P.N. 2005. "TLR Signalling and Activation of IRFs: Revisiting Old Friends from the NF- $\kappa$ B Pathway." *Trends in Immunology* 26(9):469–76.
- Munkhzaya, M., T. Matsuzaki, T. Iwasa, A. Tungalagsuvd, T. Kawami, T. Kato, A. Kuwahara, M. Irahara. 2015. "The Suppressive Effect of Immune Stress on LH Secretion Is Absent in the Early Neonatal Period in Rats." *International Journal of Developmental Neuroscience* 46:38–43.
- Murakami, M., T. Matsuzaki, T. Iwasa, T. Yasui, M. Irahara, T. Osugi, y K. Tsutsui. 2008. "Hypophysiotropic Role of RFamide-Related Peptide-3 in the Inhibition of LH Secretion in Female Rats." *Journal of Endocrinology* 199(1):105–12.
- Murphy, L.L., R.W. Sieger, M.S. Smith, y A. Barlke. 1990. "Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol, Cannabinol and Cannabidiol, Alone and in Combinations, on Luteinizing Hormone and Prolactin Release and on Hypothalamic Neurotransmitters in the Male Rat." *Neuroendocrinology* 52(4):316–21.
- Musumeci, G., G. Grasselli, S. Rossi, V. De Chiara, A. Musella, C. Motta, V. Studer, G. Bernardi, N. Haji, H. Sepman, D. Fresegna, M. Maccarrone, G. Mandolesi, y D. Centonze. 2011. "Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Channels Modulate the Synaptic Effects of TNF- $\alpha$  and of IL-1 $\beta$  in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Neurobiology of Disease* 43(3):669–77.
- Nagy, I., D. Friston, J. Sousa Valente, J.V. Torres Perez, y A.P. Andreou. 2014. "Pharmacology of the Capsaicin Receptor, Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Ion Channel." Pp. 39–76 en *Capsaicin as a Therapeutic Molecule*. Editor: O.M.E. Abdel-Salam. Springer Inc.
- Napimoga, M.H., B.B. Benatti, F.O. Lima, P.M. Alves, A.C. Campos, D.R. Pena-Dos-Santos, F.P. Severino, F.Q. Cunha, y F.S. Guimarães. 2009. "Cannabidiol Decreases Bone Resorption by Inhibiting RANK/RANKL Expression and pro-Inflammatory Cytokines during Experimental Periodontitis in Rats." *International Immunopharmacology* 9(2):216–22.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nikolics, K., A.J. Mason, E. Szönyi, J. Ramachandran, y P.H. Seeburg. 1985. "A Prolactin-Inhibiting Factor within the Precursor for Human Gonadotropin-Releasing Hormone." *Nature* 316(6028):511–17.
- Nishimura, M. y S. Naito. 2005. "Tissue-Specific mRNA Expression Profiles of Human Toll-like Receptors and Related Genes." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28(5):886–92.
- Nomura, D.K., B.E. Morrison, J.L. Blankman, J.Z. Long, S.G. Kinsey, M.C. Marcondes, A.M. Ward, Y.K. Hahn, A.H. Lichtman, B. Conti, y B.F. Cravatt. 2011. "Endocannabinoid Hydrolysis Generates Brain Prostaglandins That Promote Neuroinflammation." *Science* 334(6057):809–13.
- O'Bryan, MK, S. Schlatt, DJ Phillips, D. De Kretser, y MP Hedger. 2000. "Bacterial Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Compromises Testicular Function at Multiple Levels in Vivo." *Endocrinology* 141(1):238–46.
- Oláh, M., H. Mилоh, y T. Wenger. 2008. "The Role of Endocannabinoids in the Regulation of Luteinizing Hormone and Prolactin Release. Differences between the Effects of AEA and 2AG." *Molecular and Cellular Endocrinology* 286(1–2 SUPPL. 1):36–40.
- Oliveira da Cruz, J.F., L.M. Robin, F. Drago, G. Marsicano, y M. Metna-Laurent. 2016. "Astroglial Type-1 Cannabinoid Receptor (CB1): A New Player in the Tripartite Synapse." *Neuroscience* 323(May):35–42.
- Ong, W.Y. y K. Mackie. 1999. "A Light and Electron Microscopic Study of the CB1 Cannabinoid Receptor in Primate Brain." *Neuroscience* 92(4):1177–91.
- Ortega-Gutiérrez, S., E. Molina-Holgado, y C. Guaza. 2005. "Effect of Anandamide Uptake Inhibition in the Production of Nitric Oxide and in the Release of Cytokines in Astrocyte Cultures." *Glia* 52(2):163–68.
- Pacher, P. y G. Kunos. 2013. "Modulating the Endocannabinoid System in Human Health and Disease: Successes and Failures." *FEBS J* 280(9):1918–43.
- Pagotto, P., G. Marsicano, F. Fezza, M. Theodoropoulou, Y. Grübler, J. Stalla, T. Arzberger, A. Milone, M. Losa, V. Di Marzo, B. Lutz, G.K. Stalla. 2001. "Normal Human Pituitary Gland and Pituitary Adenomas Express Cannabinoid Receptor Type 1 and Synthesize Endogenous Cannabinoids: First Evidence for a Direct Role of Cannabinoids on Hormone Modulation at the Human Pituitary Level." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(6):2687–96.
- Pagotto, U., G. Marsicano, D. Cota, B. Lutz, y R. Pasquali. 2006. "The Emerging Role of

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- the Endocannabinoid System in Endocrine Regulation and Energy Balance.” *Endocrine Reviews* 27(1):73–100.
- Palomba, L., C. Silvestri, R. Imperatore, G. Morello, F. Piscitelli, A. Martella, L. Cristino, y V. Di Marzo. 2015. “Negative Regulation of Leptin-Induced Reactive Oxygen Species (ROS) Formation by Cannabinoid CB1 Receptor Activation in Hypothalamic Neurons.” *Journal of Biological Chemistry* 290(22):13669–77.
- Patil, M., A. Patwardhan, M.M. Salas, K.M. Hargreaves, y A.N. Akopian. 2011. “Cannabinoid Receptor Antagonists AM251 and AM630 Activate TRPA1 in Sensory Neurons.” *Neuropharmacology* 61(4):778–88.
- Patterson, C.M., R.L. Leshan, J.C. Jones, y M.G. Myers. 2011. “Molecular Mapping of Mouse Brain Regions Innervated by Leptin Receptor-Expressing Cells.” *Brain Research* 1378:18–28.
- Paxinos, G. y C. Watson. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic P. Elsevier.
- Pedersen, S.F., G. Owsianik, y B. Nilius. 2005. “TRP Channels: An Overview.” *Cell Calcium* 38:233–52.
- Penatti, C.A.A., M.C. Davis, D.M. Porter, y L.P. Henderson. 2010. “Altered GABAA Receptor-Mediated Synaptic Transmission Disrupts the Firing of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in Male Mice under Conditions That Mimic Steroid Abuse.” *Journal of Neuroscience* 30(19):6497–6506.
- Pertwee, R.G. 2007. “GPR55: A New Member of the Cannabinoid Receptor Clan?” *British Journal of Pharmacology* 152(7):984–86.
- Pertwee, R.G., A.C. Howlett, M.E. Abood, S.P. Alexander, V. Di Marzo, M.R. Elphick, P.J. Greasley, H.S. Hansen, G. Kunos, K. Mackie, R. Mechoulam, y R.A. Ross. 2010. “International Union of Basic and Clinical Pharmacology, LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB 1 and CB 2.” *Pharmacological Reviews* 62(4):588–631.
- Pestonjamasp, V.K. y S.H. Burstein. 1998. “Anandamide Synthesis Is Induced by Arachidonate Mobilizing Agonists in Cells of the Immune System.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1394(2–3):249–60.
- De Petrocellis, L., C.J. Chu, A.S. Moriello, J.C. Kellner, J.M. Walker, y V. Di Marzo. 2004. “Actions of Two Naturally Occurring Saturated N-Acyldopamines on Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Channels.” *British Journal of Pharmacology* 143(2):251–56.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Petrocellis, L. y V. Di Marzo. 2009. "Role of Endocannabinoids and Endovanilloids in Ca<sup>2+</sup>signalling." *Cell Calcium* 45(6):611–24.
- Pielecka-Fortuna, J., Z. Chu, y S.M. Moenter. 2008. "Kisspeptin Acts Directly and Indirectly to Increase Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Its Effects Are Modulated by Estradiol." *Endocrinology* 149(4):1979–86.
- Pinilla, L., E. Aguilar, C. Dieguez, R.P. Millar, y M. Tena-Sempere. 2012. "Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms." *Physiological Reviews* 92(3):1235–1316.
- Du Plessis, S.S., A. Agarwal, y A. Syriac. 2015. "Marijuana, Phytocannabinoids, the Endocannabinoid System, and Male Fertility." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32(11):1575–88.
- Poling, M.C., J. Kim, S. Dhamija, y A.S. Kauffman. 2012. "Development, Sex Steroid Regulation, and Phenotypic Characterization of RFamide-Related Peptide (Rfrp) Gene Expression and RFamide Receptors in the Mouse Hypothalamus." *Endocrinology* 153(4):1827–40.
- Poling, M.C., M.P. Shieh, N. Munaganuru, E. Luo, y A.S. Kauffman. 2014. "Examination of the Influence of Leptin and Acute Metabolic Challenge on RFRP-3 Neurons of Mice in Development and Adulthood." *Neuroendocrinology* 100(4):317–33.
- Porter, A.C., J.M. Sauer, M.D. Knierman, G.W. Becker, M.J. Berna, J. Bao, G.G. Nomikos, P. Carter, F.P. Bymaster, A.B. Leese, y C.C. Felder. 2002. "Characterization of a Novel Endocannabinoid, Virodhamine, with Antagonist Activity at the CB1 Receptor." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301(3):1020–24.
- Przybyła, J.A. y V.J. Watts. 2010. "Ligand-Induced Regulation and Localization of Cannabinoid CB1 and Dopamine D2L Receptor Heterodimers." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 332(3):710–19.
- Puffenbarger, R.A., A.C. Boothe, y G.A. Cabral. 2000. "Cannabinoids Inhibit LPS-Inducible Cytokine mRNA Expression in Rat Microglial Cells." *Glia* 29(1):58–69.
- Quennell, J.H., A.C. Mulligan, A. Tups, X. Liu, S.J. Phipps, C.J. Kemp, A.E. Herbison, D.R. Grattan, y G.M. Anderson. 2009. "Leptin Indirectly Regulates Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Function." *Endocrinology* 150(6):2805–12.
- Raborn, E.S. y G.A. Cabral. 2010. "Cannabinoid Inhibition of Macrophage Migration to the Trans-Activating (Tat) Protein of HIV-1 Is Linked to the CB 2 Cannabinoid Receptor." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 333(1):319–27.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Reguero, L., N. Puente, I. Elezgarai, J. Mendizabal-Zubiaga, M.J. Canduela, I. Buceta, A. Ramos, J. Suárez, F. Rodríguez de Fonseca, G. Marsicano, y P. Grandes. 2011. "GABAergic and Cortical and Subcortical Glutamatergic Axon Terminals Contain CB1cannabinoid Receptors in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus." *PLoS ONE* 6(10).
- Rettori, V., M.C. Aguila, M.F. Gimeno, A.M. Franchi, y S.M. McCann. 1990. "In Vitro Effect of Delta 9-Tetrahydrocannabinol to Stimulate Somatostatin Release and Block that of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone by Suppression of the Release of Prostaglandin E2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(24):10063–66.
- Rezende, R.M., P. Paiva-Lima, W.G. Dos Reis, V.M. Camêlo, A. Faraco, Y.S. Bakhle, y J.N. Francischi. 2012. "Endogenous Opioid and Cannabinoid Mechanisms Are Involved in the Analgesic Effects of Celecoxib in the Central Nervous System." *Pharmacology* 89(3–4):127–36.
- Rieder, S.A., A. Chauhan, U. Singh, M. Nagarkatti, y P. Nagarkatti. 2010. "Cannabinoid-Induced Apoptosis in Immune Cells as a Pathway to Immunosuppression." *Immunobiology* 215(8):598–605.
- Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, y C.T. Wittwer. 1997. "Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction." *Analytical Biochemistry* 245(2):154–60.
- Rivas, P.M.S., F.M.V. Vechiato, B.C. Borges, R. Rorato, J. Antunes-Rodrigues, y L.L.K. Elias 2017. "Increase in Hypothalamic AMPK Phosphorylation Induced by Prolonged Exposure to LPS Involves Ghrelin and CB1R Signaling." *Hormones and Behavior* 93:166–74.
- Roa, J. y A.E. Herbison. 2012. "Direct Regulation of GnRH Neuron Excitability by Arcuate Nucleus POMC and NPY Neuron Neuropeptides in Female Mice." *Endocrinology* 153(11):5587–99.
- Roche, M., M. Diamond, J.P. Kelly, y D.P. Finn. 2006. "In Vivo Modulation of LPS-Induced Alterations in Brain and Peripheral Cytokines and HPA Axis Activity by Cannabinoids." *Journal of Neuroimmunology* 181(1–2):57–67.
- Roche, M., J.P. Kelly, M. O'Driscoll, y D.P. Finn. 2008. "Augmentation of Endogenous Cannabinoid Tone Modulates Lipopolysaccharide- Induced Alterations in Circulating Cytokine Levels in Rats." *Immunology* 125(2):263–71.
- Rodríguez de Fonseca, F., M. Cebeira, J.A. Ramos, M. Martín, y J.J. Fernández-Ruiz.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1994. "Cannabinoid Receptors in Rat Brain Areas: Sexual Differences, Fluctuations during Estrous Cycle and Changes after Gonadectomy and Sex Steroid Replacement." *Life Sciences* 54(3):159–70.
- Romero-Zerbo, S.Y., M.S. Garcia-Gutierrez, J. Suárez, P. Rivera, I. Ruz-Maldonado, M. Vida, F. Rodriguez de Fonseca, J. Manzanares, y F.J. Bermúdez-Silva. 2012. "Overexpression of Cannabinoid CB2 Receptor in the Brain Induces Hyperglycaemia and a Lean Phenotype in Adult Mice." *Journal of Neuroendocrinology* 24(8):1106–19.
- Ross, R.A., H.C. Brockie, L.A. Stevenson, V.L. Murphy, F. Templeton, A. Makriyannis, y R.G. Pertwee. 1999. "Agonist-Inverse Agonist Characterization at CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors of L759633, L759656, and AM630." *Br J Pharmacol.* 126(3):665–72.
- Van Rossum, D. y U.K. Hanisch. 2004. "Microglia." *Metab Brain Dis* 19(3–4):393–411.
- Roth, M.D., J.T. Castaneda, y S.M. Kiertscher. 2015. "Exposure to  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol Impairs the Differentiation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and Their Capacity for T Cell Activation." *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 10(2):229–62.
- Ruiz-Pino, F., V.M. Navarro, A.H. Bentsen, D. Garcia-Galiano, M.A. Sanchez-Garrido, P. Ciofi, R.A. Steiner, J.D. Mikkelsen, L. Pinilla, y M. Tena-Sempere. 2012. "Neurokinin B and the Control of the Gonadotropic Axis in the Rat: Developmental Changes, Sexual Dimorphism, and Regulation by Gonadal Steroids." *Endocrinology* 153(10):4818–29.
- Ryberg, E., N. Larsson, S. Sjögren, S. Hjorth, N.O. Hermansson, J. Leonova, T. Elebring, K. Nilsson, T. Drmota, P.J. Greasley. 2007. "The Orphan Receptor GPR55 Is a Novel Cannabinoid Receptor." *British Journal of Pharmacology* 152:1092–1101.
- Sachot, C., S. Poole, G.N. Luheshi. 2004. "Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats" *J Physiol* 561:263-272.
- Saghatelian, A., S.A. Trauger, E.J. Want, E.G. Hawkins, G. Siuzdak, y B.F. Cravatt. 2004. "Assignment of Endogenous Substrates to Enzymes by Global Metabolite Profiling." *Biochemistry* 43(45):14332–39.
- Sagrillo, C.A., D.R. Grattan, M.M. McCarthy, y M. Selmánoff. 1996. "Hormonal and Neurotransmitter Regulation of GnRH Gene Expression and Related Reproductive Behaviors." *Behavior Genetics* 26(3):241–77.
- Sakar, D.K. y N. Mitsugi. 1990. "Correlative Changes of the Gonadotropin-Releasing

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hormone and Gonadotropin-Releasing-Hormone-Associated Peptide Immunoreactivities in the Pituitary Portal Plasma in Female Rats.” *Neuroendocrinology* 52:15–21.
- Sarchielli, E., P. Comeglio, R. Squecco, L. Ballerini, T. Mello, G. Guarnieri, E. Idrizaj, B. Mazzanti, L. Vignozzi, P. Gallina, M. Maggi, G.B. Vannelli, y A. Morelli. 2017. “Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Impairs Kisspeptin Signaling in Human Gonadotropin-Releasing Hormone Primary Neurons.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 102(1):46–56.
- Sartim, A.G., B.M. Brito, P.H. Gobira, y S.R.L. Joca. 2019. “Attenuation of Glutamatergic and Nitrergic System Contributes to the Antidepressant-like Effect Induced by Capsazepine in the Forced Swimming Test.” *Behav Pharmacol* 30(1):59–66.
- Schlicker, E. y M. Kathmann. 2001. “Modulation of Transmitter Release via Presynaptic Cannabinoid Receptors.” *Trends in Pharmacological Sciences* 22(11):565–72.
- Schwartz, G.A., D. Raitcheva, E.P. Bless, S.L. Ackerman, y S. Tobet. 2004. “Netrin 1-Mediated Chemoattraction Regulates the Migratory Pathway of LHRH Neurons.” *European Journal of Neuroscience* 19(1):11–20.
- Scorticati, C., J. Fernández-Solari, A. De Laurentiis, C. Mohn, J.P. Prestifilippo, M. Lasaga, A. Seilicovich, S. Billi, A. Franchi, S.M. McCann, y V. Rettori. 2004. “The Inhibitory Effect of Anandamide on Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Secretion Is Reversed by Estrogen.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(32):11891–96.
- Sharpe, R.M. 1994. “Regulation of Spermatogenesis.” Pp. 1363–1434 en *The physiology of reproduction*, editores: E. Knobil y J. Neill. Raven Press.
- Shaughnessy, P.O. 2015. “Testicular Development.” Pp. 567–94 en *Knobil y Neill’s Physiology of Reproduction*, editores: T. Plant y A. Zelenik. Elsevier Inc.
- Shire, D., B. Calandra, M. Delpech, X. Dumont, M. Kaghad, G. Le Fur, D. Caput, y P. Ferrara. 1996. “Structural Features of the Central Cannabinoid CB1 Receptor Involved in the Binding of the Specific CB1 Antagonist SR 141716A.” *Journal of Biological Chemistry* 271(12):6941–46.
- Shughrue, P.J., M.V. Lane, y I. Merchenthaler. 1996. “In Situ Hybridization Analysis of the Distribution of Neurokinin-3 mRNA in the Rat Central Nervous System.” *The Journal of Comparative Neurology* 372:395–414.
- Van Sickle, M.D., M. Duncan, P.J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J.S. Davison, L.J. Marnett, V. Di Marzo, Q.J. Pittman, K.D. Patel, y K.A. Sharkey. 2005. "Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB2 Receptors." *Science* 310(5746):329–32.
- Silverman, A.J., J.L. Roberts, K.W. Dong, G.M. Miller, y M.J. Gibson. 1992. "Intrahypothalamic Injection of a Cell Line Secreting Gonadotropin-Releasing Hormone Results in Cellular Differentiation and Reversal of Hypogonadism in Mutant Mice." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(22):10668–72.
- Simoni, M., F. Fanelli, L. Roli, y U. Pagotto. 2012. "Methodology for measuring testosterone, dihydrotestosterone and sex hormone-binding globulin in a clinical setting" Pp. 60–82 en *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution*, editores: E. Nieschlag, H.M. Behre, S. Nieschlag. Cambridge Press.
- Sirotkin, A.V., M. Chrenková, S. Nitrayová, P. Patras, K. Darlak, F. Valenzuela, L. Pinilla, y M. Tena-Sempere. 2008. "Effects of Chronic Food Restriction and Treatments with Leptin or Ghrelin on Different Reproductive Parameters of Male Rats." *Peptides* 29(8):1362–68.
- Sisk, C.L. y D.L. Foster. 2004. "The Neural Basis of Puberty and Adolescence." *Nature Neuroscience* 7(10):1040–47.
- Spaliviero, J.A., M. Jimenez, C.M. Allan, y D.J. Handelsman. 2004. "Luteinizing Hormone Receptor-Mediated Effects on Initiation of Spermatogenesis in Gonadotropin-Deficient (Hpg) Mice Are Replicated by Testosterone." *Biology of Reproduction* 70(1):32–38.
- Stahel, P.F., W.R. Smith, J. Bruchis, y C.H. Rabb. 2008. "Peroxisome Proliferator-Activated receptors: 'Key' regulators of Neuroinflammation after Traumatic Brain Injury." *PPAR Research* 2008.
- Staiano, R.I., S. Loffredo, F. Borriello, F.A. Iannotti, F. Piscitelli, P. Orlando, A. Secondo, F. Granata, M.T. Lepore, A. Fiorelli, G. Varricchi, M. Santini, M. Triggiani, V. Di Marzo, y G. Marone. 2016. "Human Lung-Resident Macrophages Express CB1 and CB2 Receptors Whose Activation Inhibits the Release of Angiogenic and Lymphangiogenic Factors." *Journal of Leukocyte Biology* 99(4):531–40.
- Ständer, S., M. Schmelz, D. Metze, T. Luger, y R. Rukwied. 2005. "Distribution of Cannabinoid Receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on Sensory Nerve Fibers and Adnexal Structures in Human Skin." *Journal of Dermatological Science* 38(3):177–88.
- Starowicz, K., L. Cristino, y V. Di Marzo. 2008. "TRPV1 Receptors in the Central

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nervous System: Potential for Previously Unforeseen Therapeutic Applications.” *Current Pharmaceutical Design* 14(1):42–54.
- Starowicz, K., S. Nigam, y V. Di Marzo. 2007. “Biochemistry and Pharmacology of Endovanilloids.” *Pharmacology and Therapeutics* 114(1):13–33.
- Steiner, A.A., M.D. Dogan, A.I. Ivanov, S. Patel, A.Y. Rudaya, D.H. Jennings, M. Orchinik, T.W. Pace, K.A. O'connor, L.R. Watkins, A.A. Romanovsky. 2004. “A New Function of the Leptin Receptor: Mediation of the Recovery from Lipopolysaccharide-Induced Hypothermia.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18(15):1949–51.
- Steiner, A.A., A.Y. Molchanova, M.D. Dogan, S. Patel, E. Pétervári, M. Balaskó, S.P. Wanner, J. Eales, D.L. Oliveira, N.R. Gavva, M.C. Almeida, M. Székely, y A.A. Romanovsky. 2011. “The Hypothermic Response to Bacterial Lipopolysaccharide Critically Depends on Brain CB1, but Not CB2 or TRPV1, Receptors.” *Journal of Physiology* 589(9):2415–31.
- Stella, N. 2009. “Endocannabinoid Signaling in Microglial Cells.” *Neuropharmacology* 56(Suppl 1):244–53.
- Stella, N. 2010. “Cannabinoid and Cannabinoid-like Receptors in Microglia, Astrocytes and Astrocytomas.” *Glia* 58(9):1017–30.
- Van Der Stelt, M., M. Trevisani, V. Vellani, L. De Petrocellis, A. Schiano Moriello, B. Campi, P. McNaughton, P. Geppetti, y V. Di Marzo. 2005. “Anandamide Acts as an Intracellular Messenger Amplifying Ca<sup>2+</sup> Influx via TRPV1 Channels.” *EMBO Journal* 24(17):3026–37.
- Stephens, S.B.Z., K.P. Tolson, M.L. Rouse Jr, M.C. Poling, M.K. Hashimoto-Partyka, P.L. Mellon, y A.S. Kauffman. 2015. “Absent Progesterone Signaling in Kisspeptin Neurons Disrupts the LH Surge and Impairs Fertility in Female Mice.” *Endocrinology* 156(9):3091–97.
- Sugiura, T., Y. Kobayashi, S. Oka, y K. Waku. 2002. “Biosynthesis and Degradation of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol and Their Possible Physiological Significance.” *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 66(2–3):173–92.
- Sun, Y., S.P.H. Alexander, D.A. Kendall, y A.J. Bennett. 2006. “Cannabinoids and PPARalpha Signalling.” *Biochemical Society Transactions* 34(Pt 6):1095–97.
- Szafran, B., A. Borazjani, J.H. Lee, M.K. Ross, y B.L.F. Kaplan. 2015. “Lipopolysaccharide Suppresses Carboxylesterase 2g Activity and 2-



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arachidonylglycerol Hydrolysis: A Possible Mechanism to Regulate Inflammation.” *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 121(Pt B):199–206.
- Tavares, E. y F.J. Miñano. 2010. “Immunoneutralization of the Aminoprocaltitonin Peptide of Procalcitonin Protects Rats from Lethal Endotoxaemia: Neuroendocrine and Systemic Studies.” *Clinical Science (London, England : 1979)* 119(12):519–34.
- Tena-Sempere, M. 2007. “Roles of Ghrelin and Leptin in the Control of Reproductive Function.” *Neuroendocrinology* 86(3):229–41.
- Thanos, P.K., R.C. Ramalhetete, M. Michaelides, Y.K. Piyis, G.J. Wang, y N.D. Volkow. 2008. “Leptin Receptor Deficiency Is Associated With Upregulation of Cannabinoid 1 Receptors in Limbic Brain Regions.” *Synapse* 62(9):637–42.
- Themmen, A.P.N. y I.T. Huhtaniemi. 2000. “Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function.” *Endocrine Reviews* 21(5):551–83.
- Todman, M.G., S.K. Han, y A.E. Herbison. 2005. “Profiling Neurotransmitter Receptor Expression in Mouse Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons Using Green Fluorescent Protein-Promoter Transgenics and Microarrays.” *Neuroscience* 132(3):703–12.
- Tsatsakis, A.M., M. Tutudaki, I. Stiakakis, M. Dimopoulou, M. Tzatzarakis, y M. Michalodimitrakis. 2000. “Characterisation of Cannabis Plants Phenotypes from Illegal Cultivations in Crete.” *Boll Chim Farm* 139(3):140–45.
- Tsou, K., S. Brown, M.C. Sañudo-Peña, K. Mackie, y J.M. Walker. 1998. “Immunohistochemical Distribution of Cannabinoid CB1 Receptors in the Rat Central Nervous System.” *Neuroscience* 83(2):393–411.
- Tsutsui, K., E. Saigoh, K. Ukena, H. Teranishi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, S. Ishii, y P.J. Sharp. 2000. “A Novel Avian Hypothalamic Peptide Inhibiting Gonadotropin Release.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275(2):661–67.
- Turcotte, C., F. Chouinard, J.S. Lefebvre, y N. Flamand. 2015. “Regulation of Inflammation by Cannabinoids, the Endocannabinoids 2-Arachidonoyl-Glycerol and Arachidonoyl-Ethanolamide, and Their Metabolites.” *Journal of Leukocyte Biology* 97(6):1049–70.
- Ueno, N., N. Ling, S.Y. Ying, F. Esch, S. Shimasaki, y R. Guillemin. 1987. “Isolation and Partial Characterization of Follistatin: A Single-Chain Mr 35,000 Monomeric Protein That Inhibits the Release of Follicle-Stimulating Hormone.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(23):8282–86.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ukena, K., E. Iwakoshi, H. Minakata, y K. Tsutsui. 2002. "A Novel Rat Hypothalamic RFamide-Related Peptide Identified by Immunoaffinity Chromatography and Mass Spectrometry." *FEBS Letters* 512(1–3):255–58.
- Urbanski, H.F. 2012. "Differential Roles of GnRH-I and GnRH-II Neurons in the Control of the Primate Reproductive Axis." *Frontiers in Endocrinology* 3(FEB):1–7.
- Varga, R., J.A. Wagner, D.T. Bridgen, y G. Kunos. 1998. "Platelet- and Macrophage-Derived Endogenous Cannabinoids Are Involved in Endotoxin-Induced Hypotension." *FASEB J* 12(11):1035–44.
- Vaughan, C.W. y M.J. Christie. 2005. "Retrograde Signalling by Endocannabinoids." *Handb Exp Pharmacol* (168):367–83.
- Villanueva, A., S.M. Yilmaz, W.R. Millington, R.A. Cutrera, D.G. Stouffer, L.H. Parsons, J.F. Cheer, y C. Feleder. 2009. "Central Cannabinoid 1 Receptor Antagonist Administration Prevents Endotoxic Hypotension Affecting Norepinephrine Release in the Preoptic Anterior Hypothalamic Area." *Shock* 32(6):614–20.
- Wang, R.S., S. Yeh, C.R. Tzeng, y C. Chang. 2009. "Androgen Receptor Roles in Spermatogenesis and Fertility: Lessons from Testicular Cell-Specific Androgen Receptor Knockout Mice." *Endocrine Reviews* 30(2):119–32.
- Watanobe, H. y S. Habu. 2003. "Adrenal Glucocorticoids Do Not Mediate Impaired Reproductive Function Induced by Lipopolysaccharide in Rats." *Neuroendocrinology* 78(1):23–28.
- Watanobe, H. y Y. Hayakawa. 2003. "Hypothalamic Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha, but Not Interleukin-6, Mediate the Endotoxin-Induced Suppression of the Reproductive Axis in Rats." *Endocrinology* 144(11):4868–75.
- Welt, C., Y. Sidis, H. Keutmann, y A. Schneyer. 2002. "Activins, Inhibins, and Follistatins: From Endocrinology to Signaling. A Paradigm for the New Millennium." *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.) 227(9):724–52.
- Wenger, T., V. Rettori, G.D. Snyder, S. Dalterio, y S.M. McCann. 1987. "Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol on the Hypothalamic-Pituitary Control of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Secretion in Adult Male Rats." *Neuroendocrinology* 46(6):488–93.
- Wenger, T, C. Ledent, V. Csernus, e I. Gerendai. 2001. "The Central Cannabinoid Receptor Inactivation Suppresses Endocrine Reproductive Functions." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284(2):363–68.
- Werner, N.A. y J.E. Koch. 2003. "Effects of the Cannabinoid Antagonists AM281 and

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AM630 on Deprivation-Induced Intake in Lewis Rats.” *Brain Research* 967(1–2):290–92.
- Wetsel, W.C. y S. Srinivasan. 2002. “Pro-GnRH Processing.” *Progress in Brain Research* 141:221–41.
- Whiteside, G.T., G.P. Lee, y K.J. Valenzano. 2007. “The Role of the Cannabinoid CB2 Receptor in Pain Transmission and Therapeutic Potential of Small Molecule CB2 Receptor Agonists.” *Curr Med Chem* 14(8):917–36.
- Wildt, L., A. Häusler, G. Marshall, J.S. Hutchison, T.M. Plant, P.E. Belchetz, y E. Knobil. 1981. “Frequency and Amplitude of Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation and Gonadotropin Secretion in the Rhesus Monkey.” *Endocrinology* 109(2):376–85.
- Williams, W.P., S.G. Jarjirian, J.D. Mikkelsen, y L.J. Kriegsfeld. 2011. “Circadian Control of Kisspeptin and a Gated GNRH Response Mediate the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge.” *Endocrinology* 152(2):595–606.
- Wolfson, M.L., J. Aisemberg, A.I. Salazar, A.P. Domínguez Rubio, C.A. Vercelli, y A.M. Franchi. 2013. “Progesterone Reverts LPS-Reduced FAAH Activity in Murine Peripheral Blood Mononuclear Cells by a Receptor-Mediated Fashion.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 381(1–2):97–105.
- Wray, S. 2001. “Development of Luteinizing Hormone Releasing Hormone Neurones.” *Journal of Neuroendocrinology* 13(1):3–11.
- Wu, S. y A. Wolfe. 2012. “Signaling of Cytokines Is Important in Regulation of GnRH Neurons.” *Mol Neurobiol* 45(1):119–25.
- Wu, X., S. Wan, y M.M. Lee. 2007. “Key Factors in the Regulation of Fetal and Postnatal Leydig Cell Development.” *Journal of Cellular Physiology* 213:429–33.
- www.humanbrainfacts.org. 2019. “What Is Hypothalamus, Parts of Hypothalamus with Pictures.” (<https://www.humanbrainfacts.org/hypothalamus.php>).
- Xia, L., C. Matera, M. Ferin, y S.L. Wardlaw. 1996. “Interleukin-1 Stimulates the Central Release of Corticotropin-Releasing Hormone in the Primate.” *Neuroendocrinology* 63:79–84.
- Xia, Y. y A.L. Schneyer. 2009. “The Biology of Activin: Recent Advances in Structure, Regulation and Function.” *Journal of Endocrinology* 202(1):1–12.
- Xiao, E., L. Xia-Zhang, y M. Ferin. 2000. “Inhibitory Effects of Endotoxin on LH Secretion in the Ovariectomized Monkey Are Prevented by Naloxone but Not by an Interleukin-1 Receptor Antagonist.” *NeuroImmunoModulation* 7(1):6–15.
- Xu, C., T.A. Roepke, C. Zhang, O.K. Rønnekleiv, y M.J. Kelly. 2008. “Gonadotropin-

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Releasing Hormone (GnRH) Activates the M-Current in GnRH Neurons: An Autoregulatory Negative Feedback Mechanism?" *Endocrinology* 149(5):2459–66.
- Xu, H., C.L. Cheng, M. Chen, A. Manivannan, L. Cabay, R.G. Pertwee, A. Coutts, y J.V. Forrester. 2007. "Anti-Inflammatory Property of the Cannabinoid Receptor-2-Selective Agonist JWH-133 in a Rodent Model of Autoimmune Uveoretinitis." *Journal of Leukocyte Biology* 82(3):532–41.
- Yano, T., N. Iijima, K. Kakihara, S. Hinuma, M. Tanaka, y Y. Ibata. 2003. "Localization and Neuronal Response of RFamide Related Peptides in the Rat Central Nervous System." *Brain Research* 982(2):156–67.
- Yates, M.L. y E.L. Barker. 2009. "Organized Trafficking of Anandamide and Related Lipids". *Vitam Horm* 81:25-53.
- Yeo, S.H. y W.H. Colledge. 2018. "The Role of Kiss1 Neurons as Integrators of Endocrine, Metabolic, and Environmental Factors in the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis." *Frontiers in Endocrinology* 9:188.
- Yoo, M.J., M. Nishihara, y M. Takahashi. 1997. "Tumor Necrosis Factor-Alpha Mediates Endotoxin Induced Suppression of Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator Activity in the Rat." *Endocrine Journal* 44(1):141–48.
- Yoshida, A., E. Furube, T. Mannari, Y. Takayama, H. Kittaka, M. Tominaga, y S. Miyata. 2016. "TRPV1 Is Crucial for Proinflammatory STAT3 Signaling and Thermoregulation-Associated Pathways in the Brain during Inflammation." *Sci Rep* 18(6):26088.
- Zhang, C., M.A. Bosch, O.K. Rønnekleiv, y M.J. Kelly. 2009. "γ-Aminobutyric Acid B Receptor Mediated Inhibition of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons Is Suppressed by Kisspeptin-G Protein-Coupled Receptor 54 Signaling." *Endocrinology* 150(5):2388–94.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, y J.M. Friedman. 1994. "Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue." *Nature* 372(6505):425–32.
- Zoerner, A.A., F.M. Gutzki, S. Batkai, M. May, C. Rakers, S. Engeli, J. Jordan, y D. Tsikas. 2011. "Quantification of Endocannabinoids in Biological Systems by Chromatography and Mass Spectrometry: A Comprehensive Review from an Analytical and Biological Perspective." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811(11):706–23.