



Participación del hipotálamo en los efectos de ghrelina sobre la actividad funcional espermática, la espermatogénesis, el éxito reproductivo y la conducta sexual en ratones machos

María Belén Poretti.

tesis (Doctorado en Ciencias de la Salud)--Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas, 2020.

Aprobada: 30 de junio de 2020

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Participación del hipotálamo en los efectos de ghrelina sobre la actividad funcional espermática, la espermatogénesis, el éxito reproductivo y la conducta sexual en ratones machos is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional License.



**PARTICIPACIÓN DEL HIPOTÁLAMO EN LOS EFECTOS DE
GHRELINA SOBRE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL
ESPERMÁTICA, LA ESPERMATOGÉNESIS, EL ÉXITO
REPRODUCTIVO Y LA CONDUCTA SEXUAL EN RATONES
MACHOS**

Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud

Bióloga MARÍA BELÉN PORETTI

Bióloga María Belén Poretti

Directora:

Profesora Doctora Valeria Paola CARLINI

Comisión Asesora:

Profesor Doctor Javier Alberto ZAMUDIO

Profesora Doctora Laura María VINCENTI

RHCD 1080/2013

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que de una forma u otra aportaron su granito de arena para la realización de esta Tesis.

A la Dra. Valeria Carlini, quien dirigió mi trabajo una vez más, gracias por brindarme un lugar en tus proyectos y por permitir abrirme mi propio camino en la ciencia. Hoy soy quien soy en mi vida profesional gracias a vos! Gracias por tus conocimientos, aportes, consejos, por tu cariño y especialmente muchísimas gracias por tu paciencia que me permitió pasar más tiempo con mi pequeña Cande.

A los miembros de la Comisión de Seguimiento, Dr. Javier Zamudio y Dra. Laura Vincenti, por sus aportes, ayuda y orientación. Ha sido un placer contar con ustedes para guiar mi trabajo. Son excelentes profesionales y además su calidez como personas me hizo sentir sumamente cómoda en cada reunión.

A los miembros del Tribunal de Tesis, por sus aportes y sugerencias que fueron de gran valor para enriquecer este trabajo.

A todo el equipo de la Cátedra de Fisiología Humana (FCM-UNC), por el agradable clima de trabajo que construimos a diario. Los extraño muchísimo!. En especial a quienes brindaron asesoramiento científico y/o han colaborado en los experimentos de esta Tesis.

A mis colegas y amigos que aportaron sus conocimientos y ayudaron a resolver los obstáculos que se fueron presentando.

Al Dr. Helgi Schiöth, director de la Unidad de Farmacología Funcional del Departamento de Neurociencias de la Universidad de Uppsala (Suecia), quien me permitió una estancia de seis meses en su laboratorio, durante la cual se llevaron a cabo los experimentos de PCR.

Muchísimas gracias a mi familia, quienes me acompañaron todo este tiempo y me dieron fuerzas para seguir adelante con la Tesis. Gracias a mis padres por enseñarme a ser una buena persona, dedicada y perseverante y gracias por enseñarme el valor del estudio! Gracias Luis, por acompañar a la mami y por ser parte también de estas enseñanzas. Muchas gracias Gi por estar siempre, gracias por tu apoyo y tu compañía.

Por último, un agradecimiento especial para mis amores, Ale, Cande y Fran. Gracias Ale por elegirme para transitar el camino de la vida, gracias por darme esta hermosa familia, gracias por tu apoyo, por tus fuerzas y sobre todo, por hacerme feliz. Te amo!

El presente trabajo fue realizado con subsidios otorgados por
SECyT-UNC y CONICET.

Se deja CONSTANCIA que los experimentos cuyos resultados se incluyen en la presente Tesis Doctoral, fueron realizados en su mayor parte en el Laboratorio de Reproducción del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), CONICET-UNC. La evaluación de expresión de genes fue llevada a cabo en el Laboratorio de Farmacología Funcional, Departamento de Neurociencias de la Universidad de Uppsala, Suecia.



Prof. Dra. Valeria P. CARLINI

Directora

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ESTA TESIS”

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
ABREVIATURAS	5
TÉRMINOS INCLUIDOS	6
INTRODUCCIÓN	7
Hipotálamo	8
Control neuroendócrino del metabolismo energético	9
Control neuroendócrino de la reproducción.....	10
Conducta sexual.....	15
Ghrelina	16
Ghrelina: estructura y síntesis	17
Rol fisiológico de la Ghrelina	21
Ghrelina y balance energético.....	22
Ghrelina y su rol en la fisiología reproductiva	23
Ghrelina y kisspeptinas: posible intermediario?	27
OBJETIVOS	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
HIPÓTESIS	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
ANIMALES.....	32
CIRUGÍAS	32
DROGAS.....	33
TRATAMIENTOS	34
DETERMINACIÓN DE INGESTA Y PESO CORPORAL	35
EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA.....	36
<i>Evaluación de la actividad funcional de espermatozoides epididimarios</i>	36
<i>Evaluación de la capacidad fertilizante in vivo</i>	38
<i>Evaluación de la capacidad fertilizante in vitro</i>	39
EVALUACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE HORMONAS	39

<i>Determinación de la concentración de testosterona</i>	40
<i>Determinación de la concentración de gonadotropinas</i>	40
EVALUACIÓN DE LA HISTOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DE TESTÍCULOS	41
EVALUACIÓN DE LA ULTRAESTRUCTURA TESTICULAR.....	41
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES	42
EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL	44
EVALUACIÓN DE LA INMUNOMARCACIÓN	46
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
RESULTADOS.....	49
1. DETERMINACIÓN DE INGESTA Y PESO CORPORAL	49
1.1. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 7 días sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratones	49
1.2. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratones	49
2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA	50
2.1. Evaluación de la actividad funcional de espermatozoides epididimarios	50
2.1a. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 7 días sobre la actividad funcional espermática en ratones	50
2.1b. <i>Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la actividad funcional espermática en ratones</i>	51
2.2. Evaluación de la capacidad fertilizante <i>in vivo</i>	53
2.2a. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la capacidad fertilizante <i>in vivo</i> en ratones	53
2.3. Evaluación de la capacidad fertilizante <i>in vitro</i>	54
2.3a. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la capacidad fertilizante <i>in vitro</i> en ratones	54
3. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE HORMONAS	55
3.1. Efecto del tratamiento con Ghrl sobre los niveles plasmáticos de testosterona en ratones tratados durante 7 o 42 días.....	55
3.2. Efecto del tratamiento con Ghrl sobre los niveles plasmáticos de gonadotropinas en ratones tratados durante 7 o 42 días.....	56
4. EVALUACIÓN DE LA HISTOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA TESTICULAR	57
4.1. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la histología testicular en ratones	57
4.2. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la ultraestructura testicular de ratones	59

5. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES	61
5.1. Expresión relativa de genes en el hipotálamo	61
5.2. Expresión relativa de genes en hipófisis.....	64
5.3. Expresión relativa de genes en testículos.....	64
6. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL.....	66
7. EVALUACIÓN DE α -TUBULINA MEDIANTE INMUNOMARCACIÓN	68
7. 1. <i>Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la distribución de α-tubulina en espermatozoides de ratón</i>	68
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES.....	79
BIBLIOGRAFÍA	81

RESUMEN

La ingesta de alimentos y la fisiología reproductiva se modulan simultáneamente para optimizar el éxito reproductivo en condiciones metabólicas fluctuantes. Ghrelina (Ghrl), un péptido orexigénico identificado como el ligando endógeno del receptor secretagogo de la hormona del crecimiento, está siendo investigado por su papel potencial en la reproducción. Teniendo en cuenta que los datos disponibles hasta el momento aún son limitados y que la caracterización del mecanismo de acción de Ghrl en el sistema reproductivo no se ha dilucidado completamente, estudiamos la participación del hipotálamo en los efectos de Ghrl en la actividad funcional de los espermatozoides, la espermatogénesis, el éxito reproductivo, la conducta sexual, los niveles de hormonas reproductivas y la expresión de genes relacionados a la fisiología reproductiva en ratones machos después de la administración hipotalámica de Ghrl 0,3 o 3,0 nmol/día o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) en diferentes períodos de tratamiento.

Nuestros resultados muestran que la administración de Ghrl 3,0 nmol/día durante 42 días indujo una disminución significativa de la concentración de espermatozoides epididimarios (Ghrl $17,68 \pm 2,98 \times 10^6/\text{ml}$ vs. LCR $26,91 \pm 1,52 \times 10^6/\text{ml}$, $p \leq 0,05$) y de la motilidad (Ghrl $56,25 \pm 1,80 \%$ vs. LCR $77,67 \pm 1,33 \%$, $p \leq 0,05$). Además, los espermatozoides de los animales tratados con Ghrl 3,0 nmol/día presentaron cambios morfológicos a nivel de la cabeza: morfología anormal, acrosoma pequeño, cromatina no condensada, lo que sugiere que Ghrl podría afectar a los microtúbulos del manchete que se encuentran en las proximidades del núcleo y participan en la formación de la cabeza, en la compactación de la cromatina y transporte de las proteínas a la cola en desarrollo, y/o los que conforman el axonema, estructura interna del flagelo espermático. Además, el tratamiento con Ghrl durante 42 días disminuyó la expresión de esperiolina, lo cual podría explicar, al menos en parte, la disminución de la motilidad de espermatozoides epididimarios y los cambios morfológicos observados a nivel de la cabeza y la cola.

Así mismo, Ghrl disminuyó significativamente el porcentaje de espermatogonias y espermatozoides testiculares ($F = 2, 1492$; $df = 12$; $p \leq 0,05$) y estos resultados se asocian con una reducción en la concentración plasmática de hormona luteinizante y testosterona ($p \leq 0,05$).

Al evaluar el impacto de la administración intrahipotalámica de Ghrl sobre el índice de fertilización *in vivo* y el tamaño de la camada, encontramos que el tratamiento con Ghrl 3,0 nmol/día en los machos, incrementa significativamente el porcentaje de pérdida embrionaria (Ghrl

5,92±1,57 % vs. 1,10±0,75 %, $p<0,05$) y el número de fetos atrofiados en las hembras que copularon con estos animales (Ghrl 0,72±0,19 vs. 0,14±0,10, $p<0,05$), sugiriendo que el tratamiento afectó de algún modo la calidad de las gametas masculinas. Al testear la capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos fertilizados con respecto a los controles. Estos resultados sugieren que los efectos deletéreos observados podrían relacionarse a etapas posteriores del desarrollo del embrión y/o a una falla en la implantación.

La testosterona es una hormona clave para el desarrollo sexual masculino y la conducta sexual. En nuestros resultados se observa que los animales tratados con Ghrl exhibieron un comportamiento dual donde algunos de ellos mostraron una notoria disminución de la motivación en comparación a los controles y a la conducta basal del propio animal. Mientras que otros animales, buscaban más rápido a la hembra y disminuyeron significativamente el tiempo de latencia de eyaculación, sin embargo, una vez producida la eyaculación, estos animales no mostraron nuevo interés por las hembras, por lo que no pudieron reiniciar otro ciclo de cópula.

En cuanto a los posibles mediadores implicados en los efectos deletéreos de Ghrl sobre la funcionalidad espermática, los resultados sugieren la participación de kisspeptinas, dado que la administración de Ghrl 3,0 nmol/día indujo una disminución significativa de la expresión relativa del gen responsable de su expresión (Kiss-1) ($F=10,25$; $p\leq 0,05$) y de su receptor GPR54 ($F=11,34$; $p\leq 0,05$).

Como Ghrl es un péptido orexigénico, se midió diariamente el peso corporal y la ingesta de alimentos. Los resultados mostraron que Ghrl aumentó ambos parámetros; sin embargo, el efecto no duró más allá de la primera semana de tratamiento, por lo tanto, los efectos observados no son atribuibles a este factor.

Los resultados presentados en este trabajo confirman que la administración central crónica de Ghrl deteriora la espermatogénesis y sugieren que este efecto está mediado por la inhibición del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal.

Palabras claves: Ghrelina, hipotálamo, reproducción, hormona luteinizante, testosterona, concentración y actividad funcional espermática de gametas masculinas.

SUMMARY

Food intake and reproductive physiology are both simultaneously modulated to optimize reproductive success under fluctuating metabolic conditions. Ghrelin (Ghrl), an orexigenic peptide identified as the endogenous ligand of the growth hormone secretagogue receptor, is being investigated for its potential role on reproduction. Considering that data available so far are still limited and characterization of Ghrl action mechanism on the reproductive system has not been fully elucidated, we studied the participation of hypothalamus in Ghrl effects on sperm functional activity, spermatogenesis, reproductive success, sexual behavior, reproductive hormone levels, and gene expression related to reproductive physiology in male mice after hypothalamic infusion of 0.3 or 3.0 nmol/day Ghrl or artificial cerebrospinal fluid (ACSF) at different treatment periods.

Our results show that Ghrl 3.0 nmol/day administration for 42 days induced a significant decrease of epididymal sperm concentration (Ghrl 17.68 ± 2.98 vs. CSF $26.91 \pm 1.52 \times 10^6$ ml, $p \leq 0.05$) and motility (Ghrl 56.25 ± 1.80 vs. CSF 77.67 ± 1.33 %, $p \leq 0.05$). In addition, sperm of animals treated with Ghrl 3.0 nmol/day presented morphological changes at the head level: abnormal morphology, small acrosome, uncondensed chromatin, suggesting that Ghrl could affect the microtubules of the manchette found in the vicinity of the nucleus, and participate in the formation of the head, compaction of chromatin and deliver proteins to the developing tail, and/or those that make up the axonema, internal structure of the sperm scourge.

Likewise, Ghrl significantly decreased the percentage of spermatogonia and sperm in testis ($F = 2, 1492$; $df = 12$; $p \leq 0.05$) and these results were associated with a significant reduction in luteinizing hormone and testosterone plasma levels ($p \leq 0.05$).

When evaluating the impact of Ghrl intrahypothalamic administration on fertilization rate and litter size in vivo, we found that Ghrl treatment 3.0 nmol /day in males significantly increases the percentage of embryonic loss (Ghrl 5.92 ± 1.57 % vs. 1.10 ± 0.75 %, $p < 0.05$) and the number of atrophied fetuses in females that copulated with these animals (Ghrl 0.72 ± 0.19 vs. 0.14 ± 0.10 , $p < 0.05$). This suggests that treatment somehow affected the quality of the male gametes. When testing the in vitro fertilizing capacity of sperm, no significant differences were observed in the percentage of fertilized oocytes with respect to controls. These results suggest that deleterious

effects observed could be related to later stages of embryo development and/or to a failure in implantation.

Testosterone is a key hormone for male sexual development and sexual behavior. As seen in our results, animals treated with Ghrl exhibited a dual behavior where some of them showed a marked decrease in motivation compared to the controls and the basal behavior of the animal itself. While others looked for the female faster and significantly reduced the ejaculation latency time, however, once the ejaculation occurred, these animals showed no new interest in females, so they could not restart another intercourse cycle.

Regarding the possible mediators involved in the deleterious effects of Ghrl on sperm functionality, results suggest the participation of kisspeptins, since administration of Ghrl 3.0 nmol/day induced a significant decrease in relative expression of the gene responsible for its expression (Kiss-1) ($F = 10.25$; $p \leq 0.05$) and of its GPR54 receptor ($F = 11.34$; $p \leq 0.05$).

As Ghrl is an orexigenic peptide, body weight and food intake were measured daily. Results showed that Ghrl increases both parameters; however, the effect did not last beyond the first week of treatment, therefore the observed effects are not attributable to this factor.

Results presented in this work confirm that chronic central Ghrl administration impairs spermatogenesis and suggest that this effect is mediated by inhibition of hypothalamic–pituitary–gonadal axis.

Keywords: Ghrelin, hypothalamus, reproduction, luteinizing hormone, testosterone, sperm concentration and functional activity of male gametes.

ABREVIATURAS

ACT: β -actina
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AgRP: proteína agutí
AMPc: adenosina monofosfato cíclico
ANOVA: análisis de varianza
AR: receptores de andrógenos
ARC: núcleo arcuato
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
AVPV: núcleo anteroventral periventricular
BHE: barrera hematoencefálica
BSA: albúmina de suero bovino
CSM: conducta sexual masculina
CYCLO: ciclofilina
DHT: dihidrotestosterona
DIO: obesidad inducida por la dieta
E2: estradiol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EE: error estándar
EIA: inmunoensayo enzimático
ELISA: inmunoensayo ligado a enzimas
FSH: hormona folículo estimulante
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GH: hormona del crecimiento
GHRH: hormona liberadora de la hormona de crecimiento
Ghrl: ghrelina
GHRL: gen que codifica para ghrelina
GHRPs: péptidos sintéticos capaces de estimular la liberación de GH
GHSR: receptor secretagogo de la hormona de crecimiento
GHSR-1a: isoforma del receptor GHSR tipo 1a
GHSR-1b: isoforma del receptor GHSR tipo 1b
GnRH: hormona liberadora de gonadotropina
GOAT: ghrelina O-aciltransferasa
GPR54: receptor de kisspeptinas
h: horas
H3b: histona H3
HE: hematoxilina y eosina
HPG: hipotálamo-pituitario-gonadal
Ht: hipotálamo
i.p.: intra peritoneal
KiSS-1: gen que codifica para kisspeptinas
LCR: líquido cefalorraquídeo

LH: hormona luteinizante
LSD: prueba post hoc (Fisher LSD)
MANOVA: ANOVA multivariado
MPN: núcleo preóptico medial
NPV: núcleo paraventricular
NPY: neuropéptido Y
NVM: núcleo ventromedial
PBS: Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
PKA: proteína kinasa A
POMC/CART: proopiomelanocortina/péptido relacionado a la cocaína y la anfetamina
RPL19: proteína ribosomal 19
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
s.c.: subcutáneo
Ser3: residuo de serina ubicado en la posición 3
SNC: sistema nervioso central
T: testosterona

TÉRMINOS INCLUIDOS

Anoexigénico: sustancia supresora o depresora del apetito
Orexigénico: sustancia que estimula o incrementa el apetito

INTRODUCCIÓN

La homeostasis energética es un proceso clave para el funcionamiento celular. Este proceso implica una clara asociación entre el aporte de energía al organismo y el consumo de la misma (Gil-Campos et al., 2006; Schwartz et al., 2000; Silveira et al., 2000). Desde el punto de vista fisiológico, el balance energético se regula por un complejo sistema neuroendocrino redundante, integrado a nivel del hipotálamo (Ht), donde una compleja red de vías neuronales regula el hambre y la saciedad (Farias et al., 2017; Morton et al., 2006; Schwartz et al., 2000). La alternancia de estos ciclos de hambre-saciedad requiere una coordinación precisa entre los sensores de nutrientes periféricos y las redes de regulación central.

El sistema nervioso central (SNC) recibe información del estado energético en que se encuentra el organismo y envía señales hacia los diversos órganos y sistemas periféricos para lograr un balance energético óptimo, a corto y a largo plazo (Cummings, 2006; Havel, 2001; Moehlecke et al., 2016; Munzberg et al., 2015). Las señales periféricas que operan a corto plazo, en su mayoría hormonas del tracto gastrointestinal, censan las reservas de carbohidratos del organismo e impulsan a la búsqueda de calorías cuando las reservas de glucógeno o los niveles de glucosa descienden, regulando de esta manera la cantidad de alimento consumida en cada ingesta (Schwartz et al., 2000). Así, señales como la distensión gástrica, la colecistoquinina y ghrelina (Ghrl) actúan como señal de inicio de ingesta de alimentos y median la saciedad posprandial, comunicando la sensación de plenitud que acompaña a la ingestión de alimentos y ayudando así a limitar la ingesta. Las señales a largo plazo, como leptina e insulina, reflejan el tamaño de los depósitos lipídicos del tejido adiposo de reserva y promueven la ingesta de alimento a mediano y largo plazo, por lo tanto regulan el peso corporal general (Cummings, 2006).

Desde el punto de vista adaptativo, durante períodos de estrés metabólico, los mecanismos fisiológicos encargados de racionar la energía disponible dan prioridad a los procesos que aseguren la supervivencia del individuo, por sobre todos aquellos que no resulten imprescindibles para la misma, tales como el crecimiento y la reproducción. Esto es posible gracias a que cada nivel del eje reproductivo, Ht, pituitaria y gónadas, tiene la capacidad de responder a las señales metabólicas que censan los cambios en el estado calórico (Comninou et al., 2014; Hill et al., 2008; Schneider, 2004). Ha sido demostrado que la reproducción involucra

una serie de actividades (apareamiento, concepción, gestación, lactancia) que constituyen uno de los mayores gastos de energía que los mamíferos deben afrontar. Estos mecanismos reguladores pueden actuar como pasos cruciales para mantener el desarrollo adecuado del embrión o para evitar el exceso de demandas metabólicas impuestas por el embarazo en estados de malnutrición. Se ha observado que algunas especies de mamíferos presentan regresión gonadal e inactividad sexual durante los períodos de escasez de nutrientes (Schneider, 2004; Wade y Jones, 2003). En los seres humanos, la anorexia, la caquexia y el ejercicio excesivo pueden alterar la ciclicidad reproductiva y la secreción de esteroides gonadales (De Souza et al., 2007; Klentrou y Plyley, 2003). En el extremo opuesto, la obesidad y la diabetes también pueden afectar negativamente la fertilidad (Pasquali et al., 2006; Tortoriello et al., 2007).

En resumen, las señales periféricas y los mecanismos fisiológicos que controlan el balance energético están recíprocamente vinculados a aquéllos que regulan la reproducción y juntos optimizan el éxito reproductivo bajo condiciones metabólicas fluctuantes (Hill et al., 2008; Schneider, 2004; Schneider, 2006). Aunque dicho vínculo se conoce hace varios años, solo recientemente se han comenzado a identificar las señales periféricas y las redes neuroendocrinas responsables de tal fenómeno. Un evento clave en este campo fue la clonación de la hormona leptina derivada de los adipocitos, que cumple un rol fundamental como regulador para la integración de la homeostasis energética y la reproducción (Fernandez-Fernandez et al., 2006). Desde entonces numerosas hormonas han sido estudiadas, entre ellas Ghrl, por su papel central en la homeostasis energética. Sin embargo, a pesar del vínculo comprobado entre la homeostasis energética y la fertilidad, el papel potencial de la Ghrl en el control de la función gonadal ha recibido hasta ahora poca atención. Es por eso que estudiamos el rol del hipotálamo en los efectos del péptido sobre la actividad funcional espermática, la espermatogénesis, el éxito reproductivo, la conducta sexual, los niveles de hormonas reproductivas y la expresión de genes relacionados a la fisiología reproductiva en ratones.

Hipotálamo

Durante la última década, las investigaciones han revelado que esta estructura puede albergar cientos o incluso miles de neuronas y circuitos funcionalmente distintos, cada uno conservado durante la evolución, debido a su importancia en el control de una vida básica particular (Saper y Lowell, 2014). Situado en la parte superior de la hipófisis anterior, comprende

más de 40 núcleos y áreas, y cada sub-región controla facetas específicas del balance energético. Los más importantes son el núcleo arcuato (ARC), núcleo paraventricular (NPV), núcleo ventromedial (NVM) y el Ht lateral (Ueno y Nakazato, 2016).

El papel del Ht es esencialmente integrador. Constituye un centro de relevo al que llega una gama de entradas sensoriales necesarias para tomar decisiones sobre las diversas funciones biológicas. El Ht compara esas entradas con los niveles ideales para cada parámetro y activa las respuestas autonómicas, endócrinas y conductuales destinadas a mantener la homeostasis. Además, el Ht puede reevaluar continuamente estos "puntos de ajuste" en respuesta al entorno cambiante del organismo y restaurar la fisiología óptima en consecuencia, en un proceso conocido como alostasis (Saper y Lowell, 2014). En síntesis, actúa como un regulador homeostático maestro para modular las actividades que son cruciales para la vida, que gobiernan tanto la supervivencia individual como la propagación de especies.

Las funciones del Ht incluyen el control de la ingesta de alimentos, el balance de líquidos, la termorregulación, los estados de sueño-vigilia, las respuestas al estrés, el crecimiento y la reproducción (Burbridge et al., 2016). Además, participa en el control de la secreción de numerosas hormonas, representando una interface anátomo-funcional entre el sistema nervioso y el endócrino (Schneider, 2004).

Las interacciones entre el sistema nervioso y el sistema endócrino desempeñan un papel esencial en todas las facetas de la homeostasis y regulan aspectos clave de la fisiología. El control neuroendocrino de la homeostasis metabólica y la reproducción han atraído actualmente mucha atención, ya que existen muchos trastornos, como la diabetes mellitus, la obesidad, las alteraciones de la pubertad y la infertilidad, que tienen una base neuroendócrina sustancial y grandes esfuerzos en este sentido se están realizando para encontrar blancos terapéuticos para atacar estas afecciones de incidencia creciente (Tena-Sempere, 2017).

Control neuroendócrino del metabolismo energético

El Ht es la principal región donde se integran complejas redes de vías neuronales que regulan el hambre y la saciedad. En los años 1940s y 1950s, se centró la atención de los científicos en el papel del Ht sobre la regulación de la homeostasis energética. A partir de estudios realizados en animales, en los cuales se producían lesiones en estructuras hipotalámicas, se demostró

hiperfagia masiva y obesidad después de lesiones grandes centradas en el NVM, e hipofagia e inanición después de lesiones grandes del Ht lateral (Anand y Brobeck, 1951; Brobeck et al., 1943; Hetherington y Ranson, 1940; Hetherington y Ranson, 1942). Estos estudios implicaron por primera vez al Ht como un centro importante que controla la ingesta de alimentos y el peso corporal, y a partir de estos resultados, el NVM fue considerado como “centro de la saciedad”, en tanto que el Ht lateral fue considerado “centro del hambre” (Stellar, 1954). Esta hipótesis de los centros duales predominó por varias décadas, pero a medida que el conocimiento de subpoblaciones neuronales involucradas en la homeostasis energética fue avanzando, la noción de “centros” específicos del cerebro que controlan la ingesta de alimentos y el peso corporal ha sido reemplazada por la de vías neuronales discretas que generan respuestas integradas a la información aferente relacionada con el cambio en las reservas energéticas (Schwartz et al., 2000; Woods et al., 1998). En este sentido, el descubrimiento de la leptina, una hormona anorexigénica producida por el tejido adiposo, fue un gran hito que contribuyó a establecer definitivamente que el apetito y el peso corporal están bajo un control biológico intenso, y que las neuronas del Ht son clave para este control.

Estudios posteriores demostraron que además de leptina, numerosas hormonas participan en la homeostasis energética, tal es el caso de insulina, Ghrl, entre otras.

Control neuroendócrino de la reproducción

El Ht desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la fertilidad en todos los mamíferos. La capacidad reproductiva de un individuo depende de la función coordinada de diferentes elementos endócrinos que componen el eje hipotálamo-pituitario-gonadal (HPG). En este sistema se pueden identificar tres grupos principales de hormonas: la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), además de hormonas peptídicas y esteroides sexuales. La función del eje HPG, y por lo tanto de las gónadas, depende principalmente de la interacción de estos tres grupos principales de señales, a través de bucles reguladores de retroalimentación positiva y negativa (Tena-Sempere y Huhtaniemi, 2003).

En este sentido, la producción de espermatozoides (espermatogénesis) es un proceso extraordinariamente complejo y dinámico que requiere la cooperación entre múltiples tipos de

células testiculares y depende de la estimulación de las gonadotropinas hipofisarias, LH y FSH, que se secretan en respuesta a GnRH. La LH se transporta por el torrente sanguíneo hacia los testículos, donde estimula a las células de Leydig para que produzcan testosterona (T), que es esencial para el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis. Los testículos, a su vez, retroalimentan el Ht y la pituitaria a través de la T y la secreción de inhibina, en un circuito de retroalimentación negativa para limitar la producción de GnRH y gonadotropinas (Fig. 1). La T actúa a través de los receptores de andrógenos (AR) en las células de Sertoli y de Leydig (Johnston et al., 2001). Tanto los andrógenos como la FSH actúan sobre los receptores de las células de Sertoli, para estimular diversas funciones necesarias para la producción óptima de espermatozoides (McLachlan et al., 2002b; O'Donnell et al., 2000).

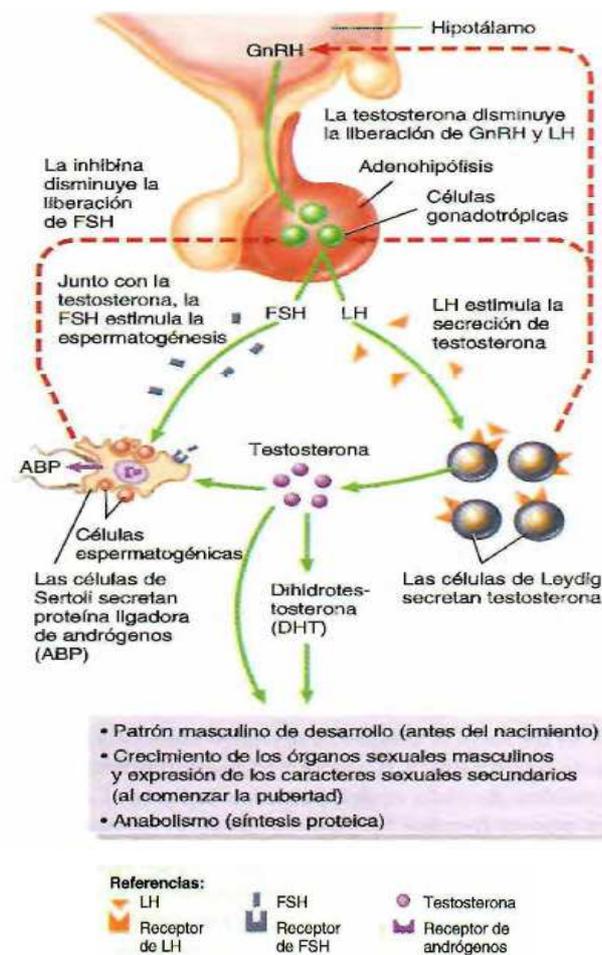


Fig. 1. Control hormonal de la espermatogénesis y acciones de la testosterona y dihidrotestosterona en respuesta a la estimulación por FSH y testosterona. Las líneas rojas indican inhibición por retroalimentación negativa. Fuente: Principios de Anatomía y Fisiología. Tortora & Derrickson. 11° ed.

La espermatogénesis tiene lugar dentro de los túbulos seminíferos del testículo. El epitelio seminífero de los túbulos está formado por las células somáticas de Sertoli y las células germinales masculinas en diversas etapas de desarrollo. El desarrollo de células germinales masculinas depende absolutamente del soporte estructural y nutricional de las células somáticas de Sertoli. Además, como las células germinales carecen de los receptores de andrógenos y FSH, estas hormonas actúan directamente sobre las células de Sertoli para apoyar la espermatogénesis (O'Donnell et al., 2000).

La espermatogénesis es un proceso largo, que tarda hasta 64 días en el ser humano y 35 días en el ratón y su complejidad inherente exige un tiempo preciso y una organización espacial. La espermatogénesis involucra cuatro procesos básicos que ocurren en líneas similares en todos los mamíferos: desarrollo espermatogonial (células madre y divisiones mitóticas de células subsiguientes), meiosis (síntesis de ADN y dos divisiones meióticas para producir espermátides haploides), espermiogénesis (desarrollo de espermátides diferenciadas) y espermiación (el proceso de liberación de esperma maduro en el lumen del túbulo) (Clermont, 1972; Leblond y Clermont, 1952a; McLachlan et al., 2002b; Russell, 1990). En roedores, las células germinales en desarrollo están altamente organizadas en una serie de asociaciones celulares a lo largo del túbulo seminífero, conocidas como etapas, de manera que se puede ver una sola etapa dentro de una sección transversal del túbulo (Russell, 1990).

La espermatogonia es el tipo de célula germinal de reserva. Esta población heterogénea incluye células madre espermatogoniales, que se renuevan durante toda la vida para proporcionar un conjunto de células madre disponibles para la espermatogénesis, así como células en proliferación que se diferencian y se comprometen a ingresar en la meiosis (Guan et al., 2006). Se ha informado que la maduración espermatogonial depende en gran medida de la FSH (Haywood et al., 2003; Meachem et al., 2005; Weinbauer et al., 1991). La espermatogonia finalmente se diferencia en espermátocitos que proceden del proceso de meiosis que comienza con la síntesis de ADN y resulta en un gameto tetraploide. Durante la larga profase meiótica, que dura aproximadamente 2 semanas, se producen pares de cromosomas homólogos y recombinación meiótica que permiten el intercambio de información genética entre cromosomas apareados, creando así una diversidad genética entre los gametos. Al final de la profase, las células meióticas pasan a través de dos divisiones reductoras rápidas y sucesivas para producir espermátides haploides. La finalización de la meiosis depende absolutamente de la acción de los andrógenos en

las células de Sertoli; en ausencia de andrógenos, no se producirán espermátides haploides (Haywood et al., 2003; O'Donnell et al., 1996; O'Donnell et al., 1994; Singh et al., 1995). Las espermátides redondas haploides recién formadas se diferencian, sin más división, en espermatozoides altamente especializados durante el proceso de espermiogénesis, etapa final de la espermatogénesis. Esto implica la pérdida del gran citoplasma de la espermátide, revelando los espermatozoides maduros y la separación final de los espermatozoides de las células de Sertoli a la luz del túbulo, antes de su paso al epidídimo (Leblond y Clermont, 1952a; O'Donnell et al., 2000). Como se mencionó previamente, si bien la espermatogénesis es absolutamente dependiente de la secreción de andrógenos por las células de Leydig, ha sido demostrado que puede proceder en ausencia de FSH; sin embargo, los testículos son más pequeños y se reduce la producción de esperma. Esto se debe al papel de la FSH en la proliferación y diferenciación peripuberal de las células de Sertoli y en el mantenimiento de la supervivencia de las células germinales. Si bien la FSH no es esencial para la espermatogénesis, en general se considera que tanto la supervivencia de las espermátides durante la espermiogénesis como su liberación dependen de los niveles óptimos de andrógeno y FSH ya que ambas hormonas tienen efectos independientes, cooperativos y sinérgicos para promover la producción máxima de esperma (Matthiesson et al., 2006; McLachlan et al., 2002a; Saito et al., 2000) (Fig. 2).

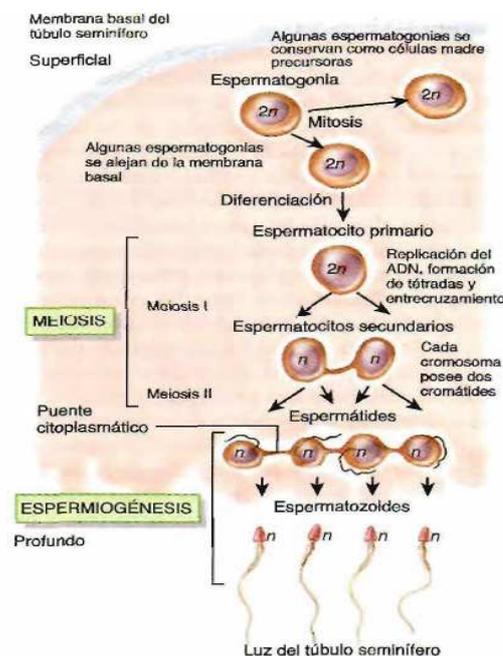


Fig. 2: Etapas de la espermatogénesis. Las células diploides ($2n$) poseen 46 cromosomas y las células haploides (n) poseen 23. Fuente: Principios de Anatomía y Fisiología. Tortora & Derrickson. 11° ed.

La espermiogénesis ocurre durante un período de 2 a 3 semanas en ratones y ratas e implica muchos procesos complejos, incluido el desarrollo del acrosoma (un orgánulo en la superficie de la cabeza del espermatozoide que contiene las enzimas necesarias para penetrar en la zona pelúcida del ovocito y así facilitar la fertilización), el flagelo (la estructura móvil a base de microtúbulos requerida para motilidad de los espermatozoides) y la remodelación del ADN de la espermátida. Así la apariencia morfológica del acrosoma en desarrollo y la forma cambiante del núcleo permiten distinguir las diferentes fases de la espermiogénesis (Leblond y Clermont, 1952b).

Durante la espermiogénesis, el núcleo redondo de la espermátide se polariza en un lado de la célula y, poco después, comienza a cambiar de forma a medida que comienza la condensación nuclear y el modelado de la cabeza del espermatozoide. A medida que el núcleo espermático se compacta, la cromatina nucleosomal se transforma en fibras de cromatina compactadas mediante el reemplazo de histonas con proteínas de transición, que posteriormente se reemplazan por protaminas (Braun, 1998; Hecht, 1998). La morfología nuclear normal de los espermatozoides se basa en la compactación del ADN que determina la forma característica de la cabeza, específica de cada especie. Una de las estructuras principales asociada con la conformación de la cabeza del espermatozoide es el manchette (Kierszenbaum y Tres, 2004; Toshimori y Ito, 2003).

Al finalizar la espermiogénesis se produce la separación de los espermatozoides de las células de Sertoli hacia la luz del túbulo, para hacerse paso al epidídimo. Una vez allí, el gameto masculino sufre modificaciones bioquímicas moduladas por la composición intraluminal del epidídimo, bajo estimulación androgénica (Cuasnicu et al., 1984a; Robaire y Viger, 1995), en particular por las proteínas secretadas por el epitelio epididimal (Cuasnicu et al., 1984b). Estas modificaciones incluyen: un aumento en la carga superficial negativa total; modificaciones a las propiedades de unión a la lectina; cambios en la composición lipídica de la membrana; remodelación de microdominios de membrana (rafts lipídicos) y de otras estructuras de membranas plasmáticas; modificaciones a las glicoproteínas de superficie y la relocalización de antígenos de superficie (Sullivan y Mieusset, 2016). En conjunto, estas modificaciones sufridas por el gameto masculino en tránsito se conocen como maduración epididimaria (Cooper y Yeung, 2006). La maduración epididimaria implica tanto modificaciones del batido flagelar como la adquisición de propiedades necesarias para encontrar eficientemente las vestimentas del ovocito, especialmente la zona pelúcida (una capa de glicoproteína acelular que rodea al ovocito) (Sullivan

y Mieusset, 2016). Si bien en este momento los espermatozoides se encuentran completamente formados, aun falta un evento clave en su fisiología, la adquisición de la capacidad fertilizante y la motilidad hiperactivada, que ocurre en el tracto genital femenino (Pitnick et al., 2019).

Conducta sexual

En roedores, la conducta sexual masculina (CSM) típica, se caracteriza por una serie de patrones conductuales estereotipados que incluyen montas a la hembra, acompañadas de erecciones del pene, movimientos pélvicos e intromisiones en la vagina. Después de varias montas e intromisiones, el macho puede eyacular introduciendo en la hembra un tapón vaginal (Meisel y Sachs, 1994). En la mayoría de las especies estudiadas, la CSM es regulada por hormonas del eje HPG.

La CSM puede dividirse en tres etapas: la precopulatoria, la copulatoria y la postcopulatoria. En la etapa precopulatoria, los machos reciben información de la receptividad de la hembra y se aproximan a ella con el fin de olfatear y explorar su región anogenital (Hull y cols., 2006).

La fase copulatoria se divide en tres etapas: la monta, la intromisión y la eyaculación. En la monta, el macho se acerca a la hembra receptiva, la sujeta de los flancos para subirse en ella e inicia una serie de movimientos pélvicos. Aunque el pene del macho se encuentra parcialmente erecto, durante estos movimientos, no hay penetración del pene en la vagina de la hembra. Por otro lado, la hembra presenta la lordosis, en la cual ella arquea la espalda levantando la cabeza, haciendo a un lado la cola y exponiendo su vagina con el fin de facilitar la cópula (Hull y cols., 2006). En la intromisión, el macho monta a la hembra, realiza movimientos pélvicos e introduce el pene en su vagina, para después desmontarla rápida y bruscamente y lamerse el pene. En la rata, el ratón y otras especies de roedores, el macho intromite a la hembra varias veces antes de eyacular (Hull y cols., 2006). En la etapa de post cópula, el macho presenta un periodo refractario en el que reposa, lleva a cabo el acicalamiento de sus genitales y no muestra interés por la hembra.

La CSM consta de dos componentes, el apetitivo o motivacional y el ejecutorio o consumatorio. Todos los parámetros de la CSM mencionados anteriormente sirven para evaluar cualquiera de estos dos componentes (Meisel y Sachs, 1994).

La búsqueda de las bases neurológicas del comportamiento sexual en estudios de ablación en animales demostró que el núcleo preóptico medial (NPM) desempeña un papel crucial en el control del comportamiento sexual masculino en muchas especies estudiadas (Dominguez y Hull, 2005; Hull y Dominguez, 2015). Las lesiones del NPM interrumpen el comportamiento sexual masculino en ratas y la severidad del deterioro sexual depende del tamaño y la ubicación de la lesión. De acuerdo con la evidencia obtenida hasta el momento, se considera que el NPM es un centro regulador en el macho, que recibe información sensorial, tal como los estímulos olfativos de hembras en estro y estímulos somatosensoriales de genitales y envía proyecciones a estructuras que son críticas para la iniciación del comportamiento sexual y la inducción de la eyaculación (Veening y Coolen, 2014; Yamaguchi et al., 2018).

El control neuroendócrino de la CSM depende tanto de las hormonas hipotalámicas e hipofisarias, como de la T, producida a nivel local dentro del testículo, siendo otra hormona clave para el desarrollo sexual masculino. Ha sido demostrado que en hámsters castrados los implantes postoperatorios de T en el NPM son capaces de restaurar parcialmente el comportamiento sexual masculino que resultó alterado por la castración (Wood, 1998). El rol de este núcleo hipotalámico puede entenderse entonces gracias a que las neuronas que lo componen son sensibles a los esteroides gonadales, codifican estímulos etológicamente relevantes y se asocian a los circuitos de recompensa del cerebro medio para promover un comportamiento prosocial (apareamiento, paternidad, etc.) crítico para la supervivencia de las especies (McHenry et al., 2017).

Ghrelin

Ghrelin, el secretagogo natural para la hormona del crecimiento (GH) fue identificado por Kojima et al. (1999). Su historia comienza a finales de los 70 con una serie de investigaciones que dieron lugar al descubrimiento de péptidos sintéticos capaces de estimular la liberación de GH (GHRPs) *in vitro* (Bowers, 1971; Bowers, 1998; Momany et al., 1981). En un comienzo, se pensó que estos péptidos eran análogos al estimulador fisiológico, la hormona liberadora de GH (GHRH), sin embargo, a partir de la comparación de la actividad de GHRH y GHRPs entre 1982 y 1984, se sugirió la existencia de un nuevo regulador hormonal natural de la secreción de GH que aún no se había aislado e identificado (Bowers, 1998; Bowers, 2012). En 1996, el descubrimiento y clonación del receptor específico para estos péptidos secretagogos de GH (GHSR) en hipófisis anterior e hipotálamo, junto a la evidencia de que la estimulación de este receptor activaba una vía

intracelular diferente a la vía de la proteína quinasa A (PKA)-adenosina monofosfato cíclico (AMPC) inducida por GHRH, respaldó la hipótesis de una nueva hormona hipotalámica, ligando endógeno para este receptor (Howard et al., 1996). Finalmente, en el año 1999, Kojima y colaboradores aislaron un producto natural a partir del estómago de rata e identificaron a la Ghrl como el ligando específico de GHSR capaz de estimular la liberación de GH.

Ghrelina: estructura y síntesis

Es un péptido de 28 aminoácidos que se forma a partir de su precursor, la preproghrelina, el cual experimenta una modificación post-traducciona l en la que el residuo de serina ubicado en la posición 3 (Ser3) se une covalentemente a un ácido graso, el ácido octanoico, a través de un enlace de tipo éster (Fig. 3) (Kojima et al., 1999). Esta es la primera hormona peptídica modificada por un ácido graso que se conoce en el reino animal (Bednarek et al., 2000). La acilación de la Ghrl, por la ghrelina O-aciltransferasa (GOAT) es esencial para la unión al receptor y para las actividades endocrinas de Ghrl, incluida la estimulación de la liberación de GH (Hosoda et al., 2000; Kojima y Kangawa, 2005; Mohan y Unniappan, 2013). Esta modificación produce un incremento en la liposolubilidad (Hosoda et al., 2000) y probablemente sea la razón por la cual el péptido atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) (Banks et al., 2002). Estudios posteriores demostraron que la secuencia completa de Ghrl no es necesaria para su actividad, sino que el segmento Gly-Ser-Ser (n-octanoil) -Phe parece constituir el "núcleo activo" requerido para inducir la movilización de Ca^{+2} necesaria para la activación de su receptor (Bednarek et al., 2000; Matsumoto et al., 2001). El péptido de origen sintético muestra igual respuesta biológica que el péptido natural purificado (St-Pierre et al., 2003).

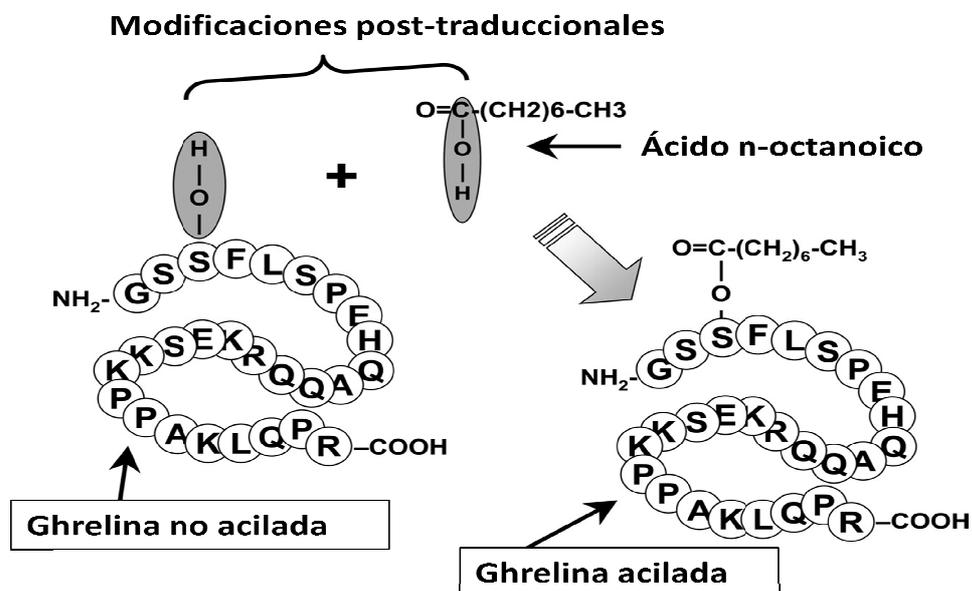


Fig.3. Estructura de Ghrelin acilada y no acilada. Adaptado de Van der Lely (2004b). Derechos reservados por The Endocrine Society, 2004.

En humanos el gen que codifica para Ghrl (GHRL) se localiza en el cromosoma 3p26-25 (Kaiya et al., 2003; Kanamoto et al., 2004). Otros dos productos peptídicos se forman a partir del gen de Ghrl, por medio de un empalme alternativo o de una extensa modificación post-traduccionales del precursor de Ghrl, la preproghrelina; éstos son des-acil Ghrl (des-Ghrl) que no está acilada o que ha perdido su residuo de ácido graso y obestatina. Aunque sus receptores aún no han sido identificados, ya han demostrado ser activos (Granata et al., 2010; Soares y Leite-Moreira, 2008). Muchos estudios han revelado la complejidad del sistema de Ghrl, que incluye efectos fisiológicos diferenciales ejercidos por los distintos productos peptídicos formados a partir del gen de Ghrl. Como se mencionó, la mayoría de las acciones biológicas de la Ghrl, especialmente aquellas que involucran efectos endócrinos y anabólicos, requieren Ghrl acilada (van der Lely et al., 2004a). Si des-Ghrl tiene funciones fisiológicas es una cuestión controvertida. Aunque no puede unirse a su receptor y carece de actividad liberadora de GH (García et al., 2007; Hosoda et al., 2000), muestra muchas funciones periféricas, comportándose tanto como agonista como un antagonista de la Ghrl acilada (Delhanty et al., 2013; Delhanty et al., 2014).

Ghrelin circula en plasma principalmente en forma no acilada (80-90 % aproximadamente), pero también se encuentra alguna proporción de la forma acilada (Hosoda et al., 2000; van der Lely et al., 2004a), unida a proteínas de alta densidad que contienen una enzima

denominada paraoxonasa. Esta es una potente estearasa que parece estar involucrada en la desacilación, hidrolizando el ácido graso unido a Ser3 (Beaumont et al., 2003).

La principal fuente de producción de Ghrl es la mucosa gástrica. Particularmente, las células parietales u oxínticas, secretoras del ácido gástrico de la mucosa del fundus gástrico (Ariyasu et al., 2001; Sakata et al., 2002). Estudios en ratas y en pacientes sometidos a gastrectomía han demostrado que esta fuente representa aproximadamente el 80% de la producción de Ghrl plasmática en ratas (Dornonville de la Cour et al., 2001) y el 65% en humanos (Ariyasu et al., 2001; Cummings et al., 2002). Sin embargo, ha sido reportado que los niveles plasmáticos de Ghrl se incrementan gradualmente con el tiempo después de la gastrectomía, sugiriendo que otros tejidos compensan la baja en la producción de Ghrl (Hosoda et al., 2003). Estos hallazgos están en línea con lo reportado previamente respecto de su producción a lo largo del tubo digestivo (Date et al., 2000; Sakata et al., 2002), en el SNC y en otras estructuras periféricas como testículos (Barreiro et al., 2002; Gaytan et al., 2004; Tanaka et al., 2001), ovarios (Caminos et al., 2003), placenta (Gualillo et al., 2001), riñones (Mori et al., 2000), páncreas (Volante et al., 2002a), pulmones (Volante et al., 2002b), sistema inmune (Dixit et al., 2004; Hattori et al., 2001) y otros tejidos (Caminos et al., 2005). Además de su expresión en tejidos normales, también se ha observado la presencia de Ghrl en tejidos tumorales, como es el caso del adenoma pituitario y tumores neuroendócrinos (Andrusiewicz et al., 2017; Kanamoto et al., 2001; Korbonits et al., 2001a; Korbonits et al., 2001b; Papotti et al., 2001; Yeh et al., 2005).

A nivel del SNC, se ha observado la presencia de Ghrl en diferentes núcleos del Ht (Cowley et al., 2003; Lu et al., 2002) y en la glándula hipófisis (Korbonits et al., 2001a). Algunos trabajos indican que se detecta a nivel central en axones y vesículas sinápticas del Ht, desde donde se proyecta a diferentes estructuras como el hipocampo, la amígdala y el núcleo dorsal del rafe, modulando de manera diferencial la ingesta, memoria y ansiedad (Carlini et al., 2004; Cowley et al., 2003; Nakazato et al., 2001a; Tschöp et al., 2000). En este sentido, ha sido demostrado que actúa sobre el ARC del Ht donde activa neuronas que expresan el NPY y AgRP (Chen et al., 2004; Kamegai et al., 2001; Nakazato et al., 2001b; Wang et al., 2014) indicando que la Ghrl local podría representar un circuito regulatorio en el control de la homeostasis energética (Cowley et al., 2003; Papotti et al., 2000). Sin embargo, ha sido recientemente publicado un trabajo que sostiene que no existe evidencia irrefutable y reproducible que respalde la idea de que Ghrl se sintetice, en niveles fisiológicamente relevantes, en el SNC de los mamíferos (Cabral et al., 2017). En este

sentido, algunos autores sostienen que la Ghrl predominantemente derivada del estómago, es la que actúa en diferentes regiones del SNC para regular la homeostasis energética, y que esto requeriría que el péptido atravesara la BHE. En ratones, Ghrl puede atravesar la BHE desde el cerebro a la sangre pero no en dirección opuesta, desde la sangre al cerebro y por lo tanto, la accesibilidad de la Ghrl periférica al cerebro está restringida a áreas específicas del mismo (Banks et al., 2002; Cabral et al., 2015; Cabral et al., 2014). Los principales blancos de la Ghrl circulante parecen incluir órganos circunventriculares, donde la Ghrl plasmática puede difundirse libremente a través de los capilares fenestrados o sus áreas cerebrales circundantes, como en el caso del ARC (Cabral et al., 2014; Schaeffer et al., 2013).

La función biológica de Ghrl es mediada por su interacción con su receptor GHSR, un receptor acoplado a proteína G y altamente expresado en tejidos neuroendócrinos como el Ht (Zigman et al., 2006). Sin embargo, cada vez se reconoce más que Ghrl también es capaz de unirse a otros receptores aún desconocidos (Camina, 2006). Hay dos isoformas de GHSR, tipo 1a (GHSR-1a) y tipo 1b (GHSR-1b), que se producen como resultado de un empalme alternativo de un único gen localizado en el cromosoma 3q26.2.3 y es altamente conservado a través de las especies (Davenport et al., 2005; Gaytan et al., 2004; Howard et al., 1996; McKee et al., 1997). Ghrelina se une al tipo 1a, mientras que GHSR1b parece ser biológicamente inactivo en sí mismo, sin embargo, podría interactuar con otras proteínas y modular sus funciones (Callaghan y Furness, 2014; Kim et al., 2001). La activación de GHSR1a inducida por Ghrl regula la transcripción de genes y aumenta la actividad eléctrica en las neuronas (Cowley et al., 2003; Diano et al., 2006; Nakazato et al., 2001a; Ribeiro et al., 2014). Además, modula la liberación de neurotransmisores en los terminales presinápticos (Cowley et al., 2003; Lopez Soto et al., 2015).

La presencia de ARNm para GHSR-1a ha sido observada en distintas áreas del SNC como células somatotropas de la hipófisis (Ong et al., 1998), núcleo ARC de Ht (Howard et al., 1996) y en estructuras extra hipotálamicas, fundamentalmente en hipocampo (gyrus dentado y regiones CA₂ y CA₃), sustancia nigra, área tegmental ventral, núcleo dorsal del rafe, etc. (Guan et al., 1997; Horvath et al., 2001; Shuto et al., 2001; Smith et al., 2001; Tannenbaum et al., 1998).

Además, se ha demostrado la presencia del receptor GHSR-1a en diferentes tejidos periféricos como corazón, riñón, pulmón, hígado, testículo, músculo esquelético, corteza adrenal (Andreis et al., 2003; Barreiro et al., 2003; Bodart et al., 1999; Papotti et al., 2000; Tena-Sempere

et al., 2002) y en células tumorales (Andrusiewicz et al., 2017; Cassoni et al., 2004; Gaytan et al., 2004; Yeh et al., 2005).

Una característica interesante de GHSR-1a es su alta actividad constitutiva intrínseca que le permite emitir señales de manera independiente de los niveles de Ghrl circulantes y la función gastrointestinal (Damian et al., 2012; Lopez Soto et al., 2015; Mokrosinski y Holst, 2010; Petersen et al., 2009). Además, GHSR-1a puede heterodimerizarse con otros receptores acoplados a proteína G (Jiang et al., 2006; Park et al., 2012; Schellekens et al., 2013) y es susceptible de sufrir desensibilización y regulación negativa (Camina et al., 2004). Estas características del receptor permiten a algunos autores proponer que la señalización central de GHSR-1a podría regularse independientemente de los niveles de Ghrl en plasma y la función gastrointestinal (Cabral et al., 2017).

Rol fisiológico de la Ghrelina

Inicialmente se describió a la Ghrl como un ligando endógeno del receptor secretagogo de la hormona de crecimiento, siendo capaz de estimular la liberación de GH con un efecto aún más potente que GHRH (Arvat et al., 2000; Takaya et al., 2000), pero estudios posteriores demostraron un poderoso rol sobre la homeostasis energética. Ghrelina se secreta de manera pulsátil y rítmica. Las concentraciones del péptido en plasma muestran un aumento repentino antes de las comidas y disminuyen después, por lo cual se la postula como el disparador de la ingesta (Ariyasu et al., 2001; Cummings et al., 2001; le Roux et al., 2005; Shiiya et al., 2002; Tolle et al., 2002).

Desde su descubrimiento ha atraído la atención de la comunidad científica por su capacidad para estimular la ingesta de alimentos en mamíferos, lo cual lo convierte en un objetivo potencial para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la obesidad, una importante enfermedad de salud pública que afecta cerca de dos billones de personas en el mundo y cuya prevalencia desde 1980 ha aumentado continuamente en la mayoría de los países. El aumento de su prevalencia y comorbilidad asociada hacen que esta enfermedad este superando a las enfermedades infecciosas como la principal causa de muertes en todo el mundo (Afshin et al., 2017; Cummings, 2006; Kopelman, 2000). Los reportes que muestran que Ghrl aumenta poderosamente la ingesta de alimentos y el peso corporal cambiaron gran parte del enfoque de la investigación sobre este nuevo péptido a sus funciones en la homeostasis energética. Sin

embargo, las acciones biológicas de Ghrl son mucho más diversas que las descritas originalmente y es sumamente importante lograr el antagonismo del balance de energía positiva mediado por ésta.

En esta línea, después de casi 20 años de investigación, se ha demostrado que Ghrl está involucrada en numerosas actividades fisiológicas complejas, tanto endocrinas como no endocrinas (Broglio et al., 2003). La presencia de su receptor en SNC y diversos tejidos periféricos permite a la Ghrl ejercer diversas acciones biológicas. Además de la estimulación de secreción de GH y su efecto sobre el control del balance energético, se ha reportado que Ghrl ejerce efectos sobre la secreción de otras hormonas, la homeostasis de la glucosa, la función pancreática, la motilidad gastrointestinal, la función cardiovascular, la función renal, la inmunidad, la inflamación, la proliferación y supervivencia celular, el metabolismo óseo, la reproducción, el estrés, el estado de ánimo y la emoción, la memoria y el sueño (van der Lely et al., 2004a). Dado este amplio espectro de actividades biológicas, es evidente que el descubrimiento de Ghrl abrió nuevas perspectivas dentro de la investigación neuroendocrina, pudiendo algún día, aportar resultados de impacto clínico y potencial terapéutico.

Ghrelin y balance energético

Varias áreas relacionadas del Ht, incluyendo el ARC, el NVM y el núcleo NPV, forman una red neuronal que controla los tres factores que subyacen el metabolismo energético: el apetito y la ingesta de alimentos, el depósito de grasas y el gasto energético (Morton et al., 2006).

El control de la ingesta de alimentos por parte del SNC es un proceso que implica el monitoreo y la integración de señales aferentes del tejido adiposo, el páncreas y el intestino; y señales eferentes que generan respuestas en la ingesta de alimentos a corto y largo plazo (Farias et al., 2017; Moehlecke et al., 2016; Munzberg et al., 2015; Ochner et al., 2011). Estas señales claves no solo incluyen metabolitos circulantes como la glucosa, los ácidos grasos libres y los aminoácidos, sino también hormonas específicamente secretadas, como la leptina, la insulina y la Ghrl.

Como se mencionó anteriormente, a partir del descubrimiento del rol de Ghrl sobre la homeostasis energética, se modificó el enfoque de la investigación sobre esta hormona. A pesar de sus múltiples funciones, el interés actual en Ghrl radica en su potente valor orexigénico. La Ghrl

estimula la ingesta de alimentos a corto plazo con mayor eficacia que cualquier molécula conocida, excepto el NPY, con el que es aproximadamente equipotente (Asakawa et al., 2001; Wren et al., 2001a) y es única en su capacidad para ejercer este efecto ya sea inyectado de manera central o periférica (Cummings, 2006). Las concentraciones de Ghrl en plasma muestran un aumento repentino antes de las comidas, disminuyen después y comienzan a aumentar gradualmente hasta la siguiente comida, lo que sugiere que este péptido contribuye al hambre preprandial y participa en el inicio de las comidas (Cummings, 2006; Date et al., 2000). Además, se secreta ante situaciones de déficit energético, como el ayuno, la hiponutrición, la anorexia nerviosa o la caquexia, entre otros, a fin de estimular la ingesta de alimentos y el almacenamiento de nutrientes (Asakawa et al., 2001; Kojima y Kangawa, 2005; Tschöp et al., 2000; Wren et al., 2000). Más aún, la administración crónica aumenta de forma duradera el peso corporal en muchas especies, incluidos los seres humanos, como resultado de los efectos anabólicos sobre la ingesta de alimentos, el gasto de energía y la utilización de combustible (Asakawa et al., 2001; Nakazato et al., 2001a; Tschöp et al., 2000; Wren et al., 2001a; Wren et al., 2001b).

A pesar de las numerosas investigaciones que involucran a Ghrl en el balance energético, los resultados publicados son aún controvertidos. Estudios realizados en nuestro laboratorio, si bien demostraron que el péptido aumenta la ingesta de alimentos, como lo hicieron otros investigadores (Nakazato et al., 2001a; Tschöp et al., 2000; Wren et al., 2001a), también confirmaron que el efecto no duró más allá del quinto día de tratamiento (Poretti et al., 2018). Estos resultados están en línea con otros autores que han demostrado que la elevación crónica de Ghrl en el Ht produce un aumento en la ingesta de alimentos que conduce a un aumento en el peso corporal, pero este efecto parece ser solo transitorio y se normaliza después de unas semanas (Qi et al., 2015). Además, hay algunos autores que afirman que el Ghrl no es un factor orexigénico crítico, basado en la observación que ratones deficientes en Ghrl o en su receptor exhiben un comportamiento de alimentación normal (Sato et al., 2008; Sun et al., 2003; Wortley et al., 2004).

Ghrelin y su rol en la fisiología reproductiva

El éxito evolutivo de un organismo depende de su capacidad para reproducirse y asegurar la supervivencia de su descendencia. Como se mencionó previamente, la regulación adecuada del balance energético es importante para la fertilidad. Por lo tanto, la capacidad de controlar la

reproducción y el metabolismo garantiza que las crías nazcan en un entorno con suficientes suministros de energía para mantener la supervivencia tanto de la madre como de la descendencia (Evans y Anderson, 2012). Como consecuencia de esta asociación, las perturbaciones en el balance energético con frecuencia resultan en un deterioro de la fertilidad (Pasquali et al., 2007). Numerosos trabajos reportaron una inhibición del eje reproductivo cuando el balance de energía es negativo. Ovejas sometidas a alimentación restringida mostraron una disminución significativa en la concentración de LH, FSH y frecuencia del pulso de LH, en comparación con las ovejas controles alimentadas normalmente (Thomas et al., 1990). En ratas macho, la restricción de alimentos disminuyó los niveles de LH, FSH y T en comparación con los controles alimentados *ad libitum* (Compagnucci et al., 2002). Se han observado resultados similares en ratones, que muestran una fertilidad reducida como consecuencia de la desnutrición (Castellano et al., 2005; Luque et al., 2007). Además hay reportes que indican que algunas especies de mamíferos presentan regresión gonadal e inactividad sexual durante los períodos de escasez de nutrientes (Schneider, 2004; Wade y Jones, 2003). Esto también ha sido reportado en seres humanos, donde la anorexia y la caquexia pueden alterar la ciclicidad reproductiva y la secreción de esteroides gonadales (De Souza et al., 2007; Klentrou y Plyley, 2003).

En el otro extremo del espectro metabólico, la obesidad inducida por la dieta (DIO) también tiene un efecto sobre el estado reproductivo. En ratones machos con DIO, la movilidad del espermatozoides y la fertilidad se ven comprometidas en comparación con los controles de peso normal (Ghanayem et al., 2010). En ciertas cepas de ratones, que son susceptibles a DIO, las hembras adultas, presentaron una disminución en las tasas de embarazo y la expresión de GnRH en comparación con los controles (Tortoriello et al., 2004). Resultados similares fueron observados en humanos donde la obesidad y la diabetes también pueden afectar negativamente la fertilidad (Pasquali et al., 2006; Tortoriello et al., 2007).

Este vínculo entre la nutrición y la reproducción se explica porque estas funciones están bajo el control preciso de diferentes redes reguladoras, que se superponen parcialmente. Muchos de los estímulos metabólicos, mediadores hormonales y/o neuropéptidos que controlan el balance energético intervienen también en la reproducción, no sólo en los aspectos fisiológicos sino también en los conductuales. En este sentido, el Ht participa en el control de la secreción de numerosas hormonas, representando una interface anátomo-funcional entre el sistema nervioso y

el endócrino. En él se encuentra la mayor concentración de receptores para hormonas sexuales del SNC (Schneider, 2004).

Además del control hormonal, una gran cantidad de señales centrales y periféricas, de naturaleza estimulante e inhibitoria, están involucradas en la modulación de la función del eje gonadotrópico por cambios en las condiciones internas y señales externas (Tena-Sempere, 2008). Teniendo en cuenta la posición central de la GnRH en el control jerárquico del eje HPG, se sabe que muchos de estos reguladores apuntan a las neuronas hipotalámicas de la GnRH para regular la fertilidad. La evidencia sugiere que las neuronas involucradas en la regulación del metabolismo energético pueden comunicarse con el eje HPG a través de las interacciones con las neuronas gonadotróficas. Las neuronas GnRH dentro del NPM del Ht controlan la secreción de LH hipofisaria a través de la liberación pulsátil de la GnRH desde sus terminales en la eminencia media hacia los vasos sanguíneos portales hipofisarios. Ha sido demostrado que los pulsos de GnRH se suprimen fácilmente mediante la restricción de alimentos, mientras que la pulsatilidad se restaura rápidamente cuando se alivia el desafío energético (Hill et al., 2008). Tanto los machos como las hembras de un gran número de especies exhiben esta supresión a pesar del hecho de que una interrupción temporal de la espermatogénesis es poco probable que tenga consecuencias reproductivas a largo plazo en el macho (Bronson y Heideman, 1990; Parfitt et al., 1991).

El papel integrador de Ghrl en la regulación homeostática es evidente por su función en la regulación de la reproducción frente al balance energético. Este péptido es capaz de inhibir la actividad del eje HPG para inhibir la función reproductiva en condiciones de déficit de energía, actuando tanto a nivel central como periférico (Fetissov et al., 2010). Es conocido que la hiperghrelinemia característica de las situaciones de ayuno o hiponutrición, ejerce efectos inhibitorios sobre la fisiología reproductiva y la conducta sexual de todas las especies de mamíferos en las que se ha estudiado (Bertoldi et al., 2011; Schneider, 2004; Wade et al., 1996). Estas observaciones llevaron a la propuesta de que la Ghrl funciona como señal periférica para la insuficiencia energética, cuyos niveles aumentan en condiciones de balance energético negativo para activar las respuestas homeostáticas en términos de mayor ingesta de alimentos y disminución de la actividad locomotora espontánea (Tang-Christensen et al., 2004; Zigman y Elmquist, 2003).

En la última década, se realizaron numerosos esfuerzos para dilucidar cuál es el rol que Ghrl ejerce sobre el eje HPG. Aún así, sus efectos sobre la liberación de las gonadotropinas siguen siendo controvertidos: la primera publicación informó que Ghrl *in vitro* no modifica la secreción de LH y FSH en las células de la hipófisis (Kojima et al., 1999). Sin embargo, hay evidencias de que el péptido ejercería acciones tanto inhibitoras como estimuladoras sobre la secreción de estas hormonas. En general, los estudios realizados *in vivo* hasta ahora en distintas especies han demostrado que la administración central de Ghrl es capaz de suprimir diferentes aspectos de la secreción pulsátil de LH (Fernandez-Fernandez et al., 2004; Fernandez-Fernandez et al., 2005b; Kluge et al., 2007; Lanfranco et al., 2008; Martini et al., 2006; Vulliemoz et al., 2004). Sin embargo, en estudios *in vitro*, Ghrl estimuló, en forma dosis-dependiente, la secreción basal de gonadotropinas desde el tejido hipofisario (Fernandez-Fernandez et al., 2005b).

Además, Ghrl es capaz de disminuir la secreción de GnRH o reducir la frecuencia de sus picos *ex vivo* por los explantes hipotalámicos de ratas hembras ovariectomizadas (Fernandez-Fernandez et al., 2005b; Lebrethon et al., 2007).

En cuanto a las acciones de Ghrl sobre la secreción de FSH, estudios realizados en ratas reportan que la administración central del péptido a hembras provocó respuestas inhibitorias solo en el estro, mientras que en los machos adultos se detectó una inhibición significativa de los niveles de FSH después de la infusión de dosis altas de Ghrl (Martini et al., 2006). Estudios realizados en humanos también reportan un efecto inhibitorio sobre FSH (Kluge et al., 2012).

En conjunto, estas observaciones confirman un importante papel inhibitorio de Ghrl en el control de la secreción de gonadotropinas, que es probable que se manifieste en condiciones de hiperghrelinemia, como las de déficit de energía (Fernandez-Fernandez et al., 2006). Esta observación, junto con sus efectos informados sobre la pulsatilidad de la LH, sugiere fuertemente un importante sitio central de acción para los efectos inhibidores del péptido en el eje gonadotrópico (Tena-Sempere, 2008).

Además de las acciones centrales sobre el eje reproductivo, varias líneas de evidencia indican que Ghrl también se expresa y realiza efectos biológicos específicos directamente a nivel gonadal (Barreiro et al., 2004; Tena-Sempere, 2005). Como se mencionó anteriormente, se ha descrito la presencia tanto de Ghrl como de su receptor GHSR1a en testículo (Barreiro et al., 2002; Gaytan et al., 2004; Gnanapavan et al., 2002; Tanaka et al., 2001; Tena-Sempere et al., 2002) y en ovario de varias especies, incluyendo el humano (Caminos et al., 2003; Gaytan et al., 2003). La

síntesis del péptido a nivel gonadal es parcialmente regulada por la secreción de LH, lo cual sugiere que Ghrl opera como un regulador local de las acciones esteroideogénicas de esta gonadotropina (Tena-Sempere, 2005).

Análisis de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ* han revelado la presencia del GHSR1a en células somáticas de Sertoli y de Leydig, así como en células germinales en rata y en el humano (Barreiro y Tena-Sempere, 2004). Se ha hipotetizado por lo tanto, que Ghrl podría funcionar como modulador local o parácrino de las funciones esenciales de este tipo de célula, como esteroideogénesis y proliferación (Barreiro et al., 2002; Tena-Sempere et al., 2002). De hecho, Tena-Sempere et al. (2002) demostraron *ex vivo* la capacidad de Ghrl para inhibir, de manera dosis-dependiente, la secreción de T estimulada por las células de Leydig, así como disminuir los niveles de expresión de varios factores clave de la ruta esteroideogénica. Además se ha comprobado en ratas, que Ghrl es capaz de inhibir la expresión del factor de células madre en las células de Sertoli, que es el principal estimulador paracrino del desarrollo de las células germinales, actuando como un factor de supervivencia para espermatogonias, espermatocitos y espermátides (Yan et al., 2000). Por último, la inyección intratesticular de Ghrl *in vivo* indujo una disminución significativa en la actividad proliferativa de células de Leydig inmaduras (Barreiro et al., 2004). Por todo ello se ha sugerido que niveles elevados de Ghrl podrían contribuir a la supresión del eje reproductivo masculino en situaciones de balance energético negativo (Barreiro y Tena-Sempere, 2004; Tena-Sempere, 2007a).

Con respecto a la capacidad de Ghrl para modular la activación del eje HPG en la pubertad, la administración repetida de Ghrl, redujo significativamente los niveles séricos de LH y T, y retrasó parcialmente la separación balanoprepucial (como índice externo de inicio de la pubertad) en ratas macho (Fernandez-Fernandez et al., 2005a; Martini et al., 2006). La pubertad es una etapa sumamente sensible al estado de las reservas de energía y las situaciones de insuficiencia energética están asociadas a la demora o ausencia de la pubertad; entonces, es posible que este péptido funcione como señal inhibitoria de la reproducción (Fernandez-Fernandez et al., 2006).

Ghrelina y kisspeptinas: posible intermediario?

El inicio de la pubertad es gatillado por la activación de neuronas cerebrales que producen GnRH e inducen la liberación hipofisaria de LH y FSH para el despertar gonadal.

Durante muchos años, grandes esfuerzos se han realizado para intentar hallar el verdadero gatillo del eje gonadal. En el año 2003, Seminara et al. demostraron que la señalización a través del receptor GPR54, expresado por las neuronas GnRH, es esencial para la maduración del sistema reproductivo, al inhibir el inicio de la pubertad en roedores que tenían una delección en el gen. El mismo año, otros autores publicaron resultados similares en ratones y humanos, abriendo nuevas perspectivas en el campo reproductivo (de Roux et al., 2003; Funes et al., 2003). GPR54 media las acciones de una familia única de ligandos conocidos como kisspeptinas, que se derivan del gen KiSS-1 (Kotani et al., 2001). Así, las kisspeptinas aparecen como un eslabón fundamental del eje HPG al activar la secreción de GnRH para iniciar la pubertad y mantener la función reproductiva del adulto (Gottsch et al., 2004; Han et al., 2005; Smith et al., 2005).

Múltiples estudios han implicado la señalización de las kisspeptinas como el vínculo entre el estado energético y la fertilidad. KiSS-1 se expresa en neuronas ubicadas en varios núcleos hipotalámicos, sitios clave para la regulación de la secreción de gonadotropinas (Gottsch et al., 2004). En ratones en estados de desnutrición, el ayuno condujo a una reducción significativa en la cantidad de ARNm de KiSS-1, que precede a la disminución de GnRH (Castellano et al., 2005; Castellano et al., 2006).

Si bien la ruta metabólica precisa aún no se ha entendido completamente, es probable que las señales periféricas como leptina, insulina y Ghrl desempeñen un papel importante en la regulación de kisspeptinas en el metabolismo energético y la reproducción (Hill et al., 2008). Los mecanismos a través de los cuales la Ghrl central inhibe el sistema reproductivo aún no han sido completamente dilucidados. En este sentido, las neuronas Kiss-1 en el Ht podrían ser un objetivo primario. En estudios anteriores se observó que Ghrl redujo significativamente la duración de la respuesta secretora de LH a kisspeptina-10 (Martini et al., 2006). Además, otros estudios han reportado que durante el ayuno, el tratamiento con Ghrl exógena o la combinación de ambos, se reduce significativamente la expresión del mRNA de Kiss1 en ciertos núcleos hipotalámicos (Forbes et al., 2009). Ambos resultados apoyan la idea que Ghrl podría inhibir la secreción de LH al suprimir directamente los efectos de la kisspeptina en el eje reproductivo. Sin embargo, un estudio de coexpresión directa de las neuronas GHSR y GNRH o kisspeptina utilizando GHSR-eGFP, reportó que ni las neuronas GNRH ni las kisspeptinas en el AVPV expresan GHSR-eGFP, por lo que cualquier efecto de Ghrl en estas neuronas kisspeptinas debe ser indirecto (Smith et al., 2013). A pesar de esto, la validez del modelo GHSR-eGFP es cuestionada y sigue siendo probable que las neuronas kisspeptina en el ARC puedan coexpresar GHSR y recibir entrada directa de Ghrl porque

la expresión de mRNA para ambos genes es prominente en esta área (Gottsch et al., 2004; Zigman et al., 2006).

El papel potencial de leptina y Ghrl en la regulación de las neuronas Kiss-1 es discutido por De Bond y Smith (2014) (Fig. 4). Estas hormonas podrían ejercer una acción indirecta sobre los sistemas neuronales dentro del ARC, responsables de integrar estas señales metabólicas periféricas y transmitir la información de la ingesta de alimentos y el gasto energético a centros cerebrales superiores (De Bond y Smith, 2014). Si bien aún no se ha demostrado si están involucradas activamente en el control metabólico de las neuronas kisspeptinas, apoyaría esta hipótesis el hecho de que la mayoría de las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART en el ARC contienen LepRb, receptor de insulina y GHSR, receptor de Ghrl (Barsh y Schwartz, 2002; Perello et al., 2012; Willeesen et al., 1999). Futuros estudios son necesarios para confirmar esta posibilidad y determinar su relevancia fisiológica.

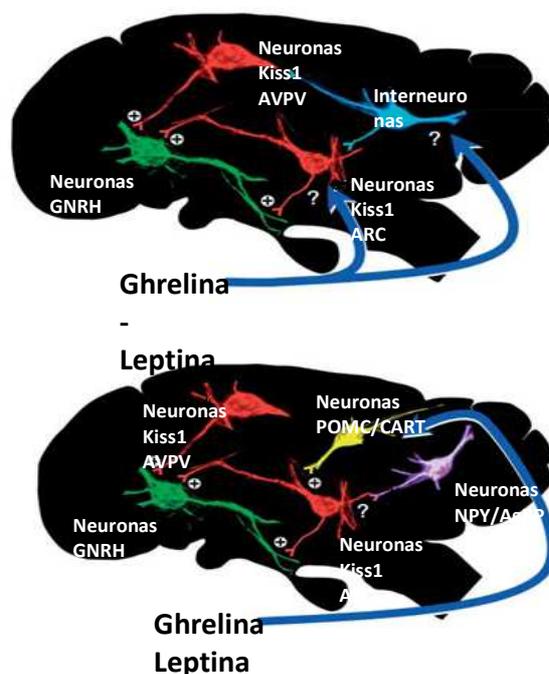


Fig. 4. Papel potencial de leptina y Ghrl en la regulación de las neuronas Kiss1. La leptina estimula (+) la expresión de Kiss1 en AVPV y ARC. Ghrl inhibe (-) las neuronas Kiss1 y lo hace en el AVPV a través de un mecanismo indirecto aún por determinar. Abajo: la posible implicación de las neuronas NPY / AgRP y POMC / CART en la regulación de las neuronas Kiss1. Los reguladores de la función metabólica (leptina y Ghrl) regulan las neuronas NPY / AgRP y POMC / CART, que están conectadas funcionalmente a las neuronas Kiss1. En esta etapa, la regulación NPY / AgRP de las neuronas Kiss1 no está clara. Por otro lado, los productos de las neuronas POMC / CART parecen estimular (+) las neuronas Kiss1. Fuente: Kisspeptin and Energy Balance in Reproduction (De Bond y Smith, 2014).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo es aportar conocimientos que contribuyan a esclarecer la participación del hipotálamo en los efectos de Ghrl sobre la función reproductora en ratones machos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Determinar la participación del hipotálamo en los efectos de Ghrl durante la maduración epididimaria, a través de la evaluación de:

1a- La concentración y actividad funcional de espermatozoides epididimarios (motilidad, vitalidad, madurez de membrana, prueba de resistencia osmótica y reacción acrosomal espontánea)

1b- Los niveles plasmáticos de las hormonas folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y testosterona (T).

1c- La expresión relativa de genes que codifican para: GnRH, FSH, LH, Kiss-1, sus receptores (GnRHr, FSHr, LHR, GPR54), receptores de Ghrl y receptores de testosterona (AR) en hipotálamo, pituitaria y/o testículo por PCR de tiempo real.

2- Determinar la participación del hipotálamo en los efectos de Ghrl durante la espermatogénesis, a través de la evaluación de:

2a- La concentración y actividad funcional de espermatozoides epididimarios (motilidad, vitalidad, madurez de membrana, prueba de resistencia osmótica y reacción acrosomal espontánea).

2b- Los niveles plasmáticos de las hormonas folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y testosterona (T).

2c- La expresión relativa de genes que codifican para: GnRH, FSH, LH, Kiss-1, sus receptores (GnRHr, FSHr, LHR, GPR54), receptores de Ghrl y receptores de testosterona (AR) en hipotálamo, pituitaria y/o testículo por PCR de tiempo real.

2d- La histología, morfometría y ultraestructura testicular mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

3- Evaluar la participación del hipotálamo en los efectos de la administración de Ghrl sobre el índice de fertilización *in vivo* y el tamaño de la camada.

4- Evaluar la participación del hipotálamo en los efectos de la administración de Ghrl sobre la fertilización *in vitro*.

5-Explorar la participación del hipotálamo en los efectos de una única administración de Ghrl sobre la conducta sexual, mediante la evaluación de: frecuencia de montas, intromisiones y eyaculaciones en ratones machos.

6- Determinar la expresión de los genes que codifican para α -tubulina y esperiolina (proteína asociada al centriolo en la espermatogénesis) en testículo luego de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días.

7- Determinar la presencia de α -tubulina, α -tubulina acetilada y acrosina en espermatozoides epididimarios mediante inmunomarcación luego de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días.

HIPÓTESIS

La hipótesis central de este proyecto plantea que ***la inyección intra-hipotalámica de Ghrl modifica la actividad del eje hipotálamo-pituitario-gonadal modulando la esteroidogénesis gonadal, la gametogénesis, la maduración y la actividad funcional de las gametas, la capacidad fertilizante de las mismas y la conducta sexual.***

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se emplearon ratones machos albinos Swiss N/NIH sexualmente maduros (60 días) de 30 - 35 g de peso corporal. Los animales fueron colocados individualmente en cajas y mantenidos bajo un ciclo luz/oscuridad de 14:10 horas (h) con condiciones controladas de temperatura (24 ± 2 °C), agua y comida (Gepasa Feeds, Pilar, Argentina) *ad libitum*.

Los procedimientos fueron realizados conforme a lo establecido en el Reglamento del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de las Facultades de Ciencias Médicas y de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba (Aprobado por CICUAL el 07/07/15).

CIRUGÍAS

Después de un período de adaptación al operador, se llevó a cabo la cirugía intra hipotalámica para colocar las bombas osmóticas (Alzet, Durect™), de acuerdo con los métodos descritos por Franklin y Paxinos (2001). Los animales fueron anestesiados con una combinación de 55 mg/kg de ketamina HCl (Vetanarcol König: Laboratories König S.A, Argentina) y 11 mg/kg de xilazina (Kensol König: Laboratories König S.A, Argentina), y colocados en un aparato estereotáxico. Las coordenadas relativas a bregma fueron: anterior -1,46 mm, lateral 0,5 mm y vertical 5,5 mm. La cánula se fijó a la superficie del cráneo con cemento acrílico dental. Los animales fueron implantados con una bomba de perfusión osmótica (osmotic pumps) modelo 1007D o modelo 2006, de acuerdo al tratamiento al que fueron asignados. Diferentes animales fueron infundidos diariamente con líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) o Ghrl 0,3 o 3,0 nmol/día. Después de la cirugía, los animales fueron alojados en jaulas individuales. El último día de tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación.

Para explorar el papel del Ht en los efectos de una sola administración de Ghrl en el comportamiento sexual, los animales fueron canulados como se explica a continuación. Después de la anestesia (con el mismo procedimiento indicado para la cirugía de bomba osmótica), los ratones se colocaron en un aparato estereotáxico y se sometieron a cirugía hipotalámica utilizando una cánula de guía de acero, de acuerdo con los métodos descritos por Franklin y Paxinos (2001). Las coordenadas relativas a bregma fueron: anterior -1,46 mm, lateral 0,5 mm y vertical 5,5 mm. Las cánulas se fijaron a la superficie del cráneo con cemento acrílico dental. Siete

días después de la cirugía, se infundió a los animales Ghrl o LCR usando una jeringa Hamilton de 10 μl conectada por un tubo de polietileno Pe-10 a una aguja de calibre 30 que se extendía 0,75 mm más allá de la cánula guía. Se administró una infusión de 0,5 μl durante un período de 1 min.

La posición de la cánula fue determinada histológicamente para confirmar el sitio de infusión (Fig. 5). Para obtener los cortes de los cerebros, se empleó en un crióstato (Leica). Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y observados en un microscopio confocal espectral (Olympus, FV1200). Solo fueron incluidos para el análisis estadístico aquellos animales que fueron correctamente administrados en el NVM del hipotálamo.

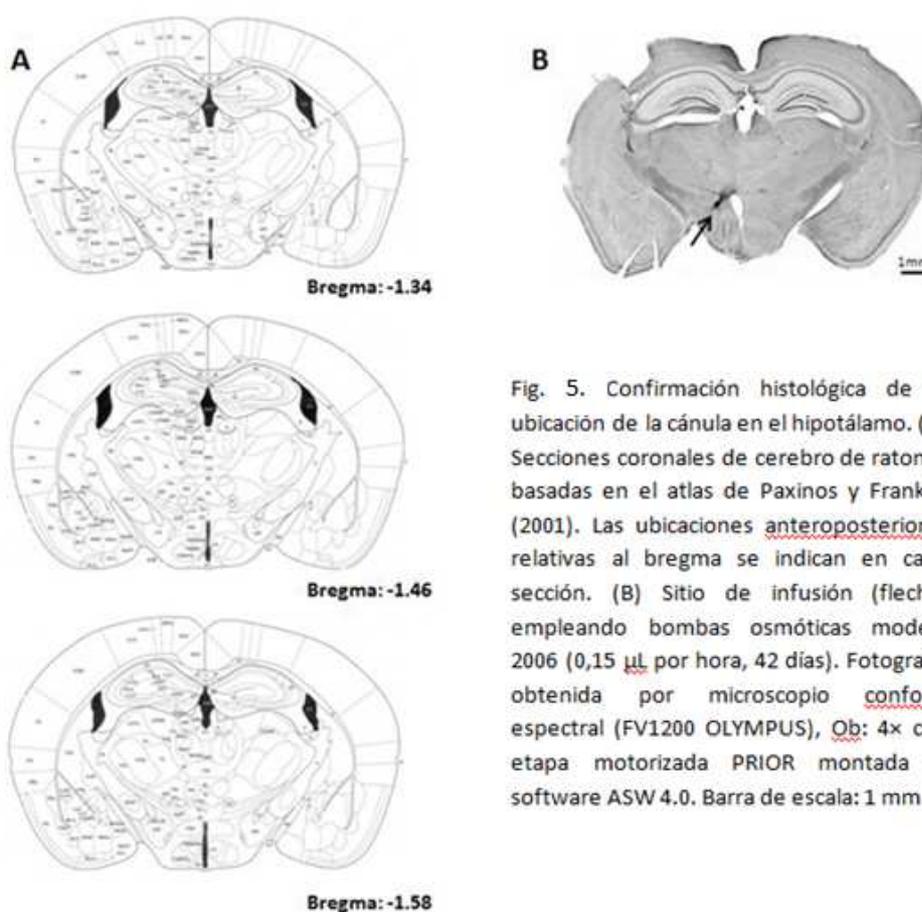


Fig. 5. Confirmación histológica de la ubicación de la cánula en el hipotálamo. (A) Secciones coronales de cerebro de ratones basadas en el atlas de Paxinos y Franklin (2001). Las ubicaciones anteroposteriores relativas al bregma se indican en cada sección. (B) Sitio de infusión (flecha) empleando bombas osmóticas modelo 2006 (0,15 μl por hora, 42 días). Fotografía obtenida por microscopio confocal espectral (FV1200 OLYMPUS), Ob: 4 \times con etapa motorizada PRIOR montada al software ASW 4.0. Barra de escala: 1 mm.

DROGAS

La Ghrl (acil-Ghrl) (Innovagen, Suecia) se disolvió en LCR, se dividió en alícuotas y se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La misma se infundió crónicamente en el hipotálamo

empleando bombas osmóticas modelo 1007D (0,5 µl por hora, 7 días) o modelo 2006 (0,15 µl por hora, 42 días). Las dosis que se ensayaron (0,3 o 3,0 nmol/día) fueron aquellas que modifican la ingesta y/o los niveles plasmáticos de hormona de crecimiento en estudios previos (Carlini et al., 2002; Wren et al., 2000). Distintos animales fueron utilizados para cada dosis del péptido.

En el caso la determinación de la conducta sexual, los animales fueron infundidos con una única dosis de Ghrl 3,0 nmol/día.

LCR: fue preparado con la siguiente composición (Nm), NaCl 128, KCl 3.0, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 1.0, Na₂HPO₄ 21.0, NaH₂PO₄ 1.3; pH 7.4 y luego esterilizado utilizando un filtro MILIPORE de 0,22 mm de poro por 47 mm de diámetro (McNay y Sherwin, 2004).

TRATAMIENTOS

En el ratón, la espermatogénesis consta de un período de desarrollo de 35 días que parte de las células iniciales, las espermatogonias de tipo A1 diferenciadas, y culmina en la formación de los espermatozoides (Franca et al., 1998). En este proceso, la duración de cada estadio celular es de 8,6 días, y son necesarios cuatro ciclos consecutivos para culminar con la espermatogénesis (Clermont y Trott, 1969). Teniendo esto en cuenta, la evaluación de los efectos de Ghrl sobre la actividad funcional de los espermatozoides en ratones se realizó en diferentes grupos experimentales (cada uno de ellos con determinadas condiciones):

Primer grupo experimental: con el objeto de estudiar la participación del Ht en los efectos de Ghrl sobre la maduración epididimaria, se cuantificó la actividad funcional de los espermatozoides epididimarios (concentración, motilidad, vitalidad, madurez de membrana, prueba de resistencia osmótica y reacción acrosomal espontánea) luego de la administración hipotalámica de Ghrl durante 7 días (período que cubre la liberación de espermatozoides maduros en la luz del túbulo seminífero y una serie de modificaciones celulares que ocurren durante el tránsito a lo largo del epidídimo). Además se cuantificó la concentración plasmática de FSH, LH y T y se determinó por PCR de tiempo real la expresión relativa de genes que codifican para: GnRH, FSH, LH, Kiss-1, sus receptores (GnRHr, FSHr, LHR, GPR54), receptores de Ghrl y receptores de testosterona (AR) en hipotálamo, pituitaria y/o testículo.

Segundo grupo experimental: para estudiar la participación del Ht en los efectos de Ghrl sobre la espermatogénesis, se cuantificó la actividad funcional de espermatozoides epididimarios mediante la valoración de los parámetros mencionados en el párrafo anterior luego de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días (período que cubre al menos un ciclo

espermatogénico completo y migración de espermatozoides epididimarios). Además se cuantificó la concentración plasmática de FSH, LH y T y se determinó por PCR de tiempo real la expresión relativa de genes que codifican para: GnRH, FSH, LH, Kiss-1, sus receptores (GnRHr, FSHr, LHR, GPR54), receptores de Ghrl y receptores de testosterona (AR) en hipotálamo, pituitaria y/o testículo. Estos animales fueron testeados también para estudios histológicos de morfología y ultraestructura testicular.

Ha sido demostrado que Ghrl induce adipogénesis (Davies et al., 2009; Thompson et al., 2004) y que la fertilidad masculina y la libido se encuentran disminuidas en situaciones de obesidad (ganancia de peso corporal) (Du Plessis et al., 2010; Palmer et al., 2012; Shukla et al., 2014). Por lo tanto, con el fin de minimizar el sesgo potencial de las principales diferencias en el peso corporal, se midieron diariamente la ingesta de alimentos y el peso corporal.

Tercer grupo experimental: en base a los resultados observados en los primeros grupos experimentales, se planteó como nuevo interrogante cuantificar la capacidad fertilizante tanto *in vivo* como *in vitro* de los animales luego de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días. Además, parte de los espermatozoides obtenidos de estos animales fueron utilizados para inmunomarcación de α -tubulina, α -tubulina acetilada y acrosina.

En los tres grupos experimentales, los animales fueron divididos en:

- Controles: infundidos con LCR.
- Tratados: diferentes animales fueron tratados con Ghrl 0,3 nmol/día o 3,0 nmol/día.

Cuarto grupo experimental: los animales fueron tratados para explorar la participación del Ht en los efectos de una única administración de Ghrl sobre la conducta sexual. En base a resultados obtenidos durante el desarrollo de la Tesis se determinó emplear para este N experimento la dosis más alta de Ghrl (3,0 nmol/día).

DETERMINACIÓN DE INGESTA Y PESO CORPORAL

Durante el tratamiento se registró diariamente la cantidad de alimento ingerido (diferencia entre la comida suministrada y la comida remanente). El registro se realizó entre las 11 y 12 h para prevenir variaciones determinadas por ritmos circadianos, durante los 7 o 42 días de tratamiento según el caso. Los resultados se expresan como la media \pm error estándar (EE) en gramos. El n muestral por grupo fue de 9-12 animales

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA

Evaluación de la actividad funcional de espermatozoides epididimarios

Para la obtención de los espermatozoides epididimarios, luego del sacrificio de los animales por decapitación, se realizó una laparotomía amplia extrayéndose los testículos y epidídimos. Los testículos completamente aislados de la grasa circundante, fueron pesados en balanza de precisión (Scientech Inc., Colorado, EE.UU.), expresándose como peso relativo (peso testicular/peso del animal). Posteriormente, para la realización de estudios histológicos y ultraestructurales en los animales tratados durante 42 días, los testículos se fijaron en la solución fijadora correspondiente.

Bajo lupa estereoscópica (Olympus, Tokio, Japón), se separaron las porciones caudales de ambos epidídimos que fueron colocadas más tarde en una cápsula con 2 mL de medio de Tyrode modificado con albúmina. El medio de incubación Tyrode posee la siguiente composición (mM): CaCl_2 1,8; MgCl_2 0,929; KCl 2,68; NaCO_3H 11,903; NaCl 136,86; NaPO_4H_2 0,287; glucosa 5,56; suplementado con 4 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma Chem. Co., Argentina), pH: 7,3 - 7,5 y osmolaridad 270-290 mOsm/l. Fue además esterilizado por ultrafiltración (filtros con poros de 0,2 μm) (Fraser, 1993). A continuación, se realizaron varios cortes con tijera de microdissección y la cápsula fue colocada en estufa a 37°C durante 10 min, con 95% aire: 5% CO_2 y humedad a saturación, para provocar la extrusión de los espermatozoides. Una vez transcurrido este período se evaluó la actividad funcional espermática, valorando los siguientes parámetros:

- *Concentración y motilidad:* se cuantificaron simultáneamente, utilizando cámara de Makler (Makler, 1980) bajo microscopio invertido (Olympus, Tokio, Japón) a 200x, con un volumen de muestra de 25 μL . La concentración se expresa como la media \pm EE en 1×10^6 células por ml de suspensión de espermatozoides y la motilidad se informa como porcentaje de espermatozoides móviles (sumatoria de progresivos y no progresivos) e inmóviles \pm EE (Baiardi et al., 1997). N=9-10 animales/grupo.

- *Formas inmaduras:* se cuantificaron los porcentajes de células acodadas ("*bending*"; angulación de 90° y 180° del flagelo espermático a nivel del cuello o pieza intermedia) y/o con gota citoplasmática (remanente de citoplasma de células germinales en la cola de espermatozoide). La ausencia de estas características se asocia con procesos de maduración y de adquisición de motilidad y de capacidad fertilizante (Cornwall et al., 1988). Los resultados se expresan como la media \pm EE del porcentaje de gametos acodados, con gota citoplasmática e

inmaduros totales (espermatozoides acodados + espermatozoides con gota citoplasmática - espermatozoides con ambas alteraciones). N=9-10 animales/grupo.

- *Vitalidad*: se determinó mediante el empleo de la coloración supravital con Hoechst 33258 (H258) (3 mg/ml en solución isotónica) (Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU.) (Yelian y Dukelow, 1992). Este colorante fluorescente se fija al ADN de las células muertas. Las lecturas se realizaron en microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axiolab, Alemania) con aumento de 400x. Se contabilizaron no menos de 100 espermatozoides entre teñidos (muertos) y no teñidos (viables) (Fiol de Cuneo et al., 1994) y se informan como la media \pm EE del porcentaje de células viables. N=9-10 animales/grupo.

- *Reacción acrosomal*: con el fin de permitir la lectura simultánea de vitalidad y estadio acrosomal, se empleó la técnica de doble tinción con H258 y lectina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) (Sigma Chem.Co., Argentina). Esta última, tiene afinidad por las glicoproteínas que llevan los grupos sacáridos, α -D-glucosa y α -D-manosa, presentes en la cara interna de la membrana acrosomal externa. Las muestras fueron tratadas como se describe en Puechagut et al. (2012). El estado acrosomal fue calificado como: acrosoma intacto (los que presentan fluorescencia compacta en la cabeza) y acrosoma reaccionado (los que mostraron ausencia de fluorescencia en la región cefálica). Las lecturas se realizaron en microscopio de epifluorescencia con un aumento de 1000x. Para obtener los porcentajes de reacción acrosomal verdadera y descartar la ocurrida por muerte celular, sólo se tuvieron en cuenta las formas vivas. Se consideraron no menos de 100 espermatozoides (Fiol de Cuneo et al., 1994). Los resultados se expresan como la media \pm EE en porcentaje de la integridad acrosomal. N=9-10 animales/grupo.

- *Prueba de resistencia osmótica*: para detectar la integridad funcional de la membrana espermática, los espermatozoides fueron incubados durante 45 min a 37°C en una solución hipoosmótica de citrato de Na⁺ y fructosa (100 mOsmol/l) (Ruiz et al., 1996). Al cabo de este período, empleando microscopio de contraste de fases con aumento de 400x y contando no menos de 100 gametas, se determinó el porcentaje de espermatozoides que exhibieron una deformación por hiperhidratación de la pieza intermedia y/o cola. Los resultados se expresan como la media \pm EE en porcentaje de espermatozoides reactivos e íntegros. N=9-10 animales/grupo.

Evaluación de la capacidad fertilizante in vivo

Tres días antes de que finalice el tratamiento del grupo experimental tratado por 42 días (día 39 de tratamiento), cada macho fue alojado con dos hembras no tratadas la tarde del proestro de éstas. Al día 42, los machos fueron separados de las hembras y sacrificados en cámara de dióxido de carbono (70%). Cada hembra fue examinada diariamente a fin de detectar signos de cópula (tapón mucoso o espermatozoides en el extendido vaginal), considerando este como el día gestacional 1. Al día gestacional 18, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical y se cuantificaron los parámetros que se detallan a continuación. El n muestral por grupo fue de 9-10 animales.

- *Tasa de fertilización in vivo:* el porcentaje de efectividad se evaluó como un parámetro de la capacidad de los machos para fecundar a las hembras (Puechagut et al., 2012). Se determinó mediante la evaluación del porcentaje de hembras preñadas por cada macho, en relación con el número total de hembras con apareamiento positivo alojadas con cada macho (el apareamiento fue verificado por la presencia de tapón mucoso o espermatozoides en el extendido vaginal). Los resultados son expresados como la media \pm EE.
- *Número de fetos o tamaño de la camada:* se evaluó el número de fetos presentes en los cuernos uterinos (Puechagut et al., 2012). Los resultados son expresados como la media \pm EE.
- *Peso de la camada:* se registró el peso de la camada completa utilizando balanza de precisión (Scientech Inc., Colorado, EE.UU.). Los resultados son expresados en gramos como la media \pm EE.
- *Peso promedio de las crías:* luego del registro del peso de la camada completa, se calculó el cociente entre este valor y el número de fetos de la camada completa, para estimar el peso individual. Los resultados son expresados en gramos como la media \pm EE.
- *Número de cuerpos lúteos:* se obtuvieron los ovarios de las hembras sacrificadas en el día 18 de preñez y bajo lupa estereoscópica (Olympus, Tokio, Japón) se contabilizó el número de cuerpos lúteos presentes en ambos ovarios (indicador de la tasa de ovulación) (Luque et al., 2014).
- *Porcentaje de pérdida embrionaria:* se calculó relacionando la tasa de ovulación con el tamaño de la camada según la siguiente fórmula: $100 - [(tamaño\ de\ la\ camada \times 100) / tasa\ de\ ovulación]$ (Luque et al., 2014).

- *Atrofia fetal:* se cuantificó, en caso de que existieran, el número de fetos atrofiados, es decir, aquellos que mostraban un tamaño marcadamente inferior que lo estimado para su edad gestacional (Luque et al., 2014).

Evaluación de la capacidad fertilizante in vitro

Para la obtención de ovocitos se utilizaron hembras estimuladas farmacológicamente a superovular según lo establecido por Martini et al. (2000), mediante la administración de 5 UI de PMS (Sigma Chemical Co., Argentina) y 48 h después de 10 UI de gonadotropina coriónica humana (Sigma Chemical Co., Argentina). Los animales fueron sacrificados 13-14 h después de la última inyección empleando la cámara de dióxido de carbono (70%). Mediante laparotomía amplia se procedió a la extracción de los oviductos, que fueron colocados en una cápsula con medio de Tyrode. Bajo lupa estereoscópica (Olympus, Tokio, Japón) se visualizó la ampolla oviductal y mediante punción de la misma se procedió a la obtención de los complejos cúmulus-ovocito. Los mismos fueron suspendidos en otra cápsula con medio de Tyrode para conformar un pool de ovocitos y llevados a incubadora termostata a 37°C hasta el momento de su utilización.

- *Porcentaje de fertilización in vitro:* esta técnica se realizó de acuerdo a Yelian y Dukelow (1992). Los ovocitos obtenidos a partir de la ampolla oviductal luego de la inducción a superovulación, fueron colocados en medio de Tyrode suplementado con albúmina (~20/cápsula) e inseminados con 5×10^5 espermatozoides/ml provenientes de cada macho tratado por 42 días, obtenidos al momento de su sacrificio. El porcentaje de fertilización *in vitro* y el clivaje embrionario se determinó 24 h después de la inseminación, por visualización directa en microscopio de luz invertida y los resultados se expresan como porcentaje de ovocitos fertilizados (presencia de pronúcleos o embriones de 2 o más células). Para la determinación de este parámetro se utilizó un n muestral de 6-8 animales por grupo.

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE HORMONAS

El último día de tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación. La sangre se recolectó por punción de la aorta abdominal en tubos con EDTA e inmediatamente se centrifugó (3000 rpm, 10 min, 4°C). Las muestras individuales de plasma se congelaron y almacenaron (a -20°C) para la posterior determinación hormonal.

Determinación de la concentración de testosterona

Las concentraciones de testosterona (T) presentes en las muestras de plasma obtenidas fueron determinadas utilizando la técnica de inmunoensayo enzimático (EIA). Se utilizó un anticuerpo policlonal para la detección de T y sus correspondientes conjugados de peroxidasa (anti-testosterona R156/7, Department of Population Health and Reproduction, C. Munro, UC Davis, CA, EE.UU.). El anticuerpo presenta las siguientes reacciones cruzadas: 5- α -dihydrotestosterona (57,4%), androstenediona (0,27%), androsterona (0,04 %), colesterol (0,03%) y < 0,02 % con todos los otros esteroides testeados.

Los inmunoensayos fueron realizados de acuerdo a la técnica descrita por Munro y Lasley (1988). Para ello se utilizaron microplacas de fondo plano (Nunc Maxisorp, VWR, Mississauga, ON, Canadá) recubiertas con 50 μ l de anticuerpo diluido en solución buffer de recubrimiento (50 mM de buffer bicarbonato, pH 9,6); las placas fueron luego cubiertas con selladores de acetato para evitar la evaporación, y se incubaron a 4°C. Luego de 16-24 h, las placas fueron lavadas con una solución de Tween 20 al 0,02% utilizando un lavador de microplacas (Bio-Tek Elx 50 v, Bio-Tek Instruments). Inmediatamente después, 50 μ l de las muestras de plasma, de los testigos de concentración conocida y de los controles fueron añadidos por duplicado a la microplaca, seguido por la adición de 50 μ l del conjugado de peroxidasa correspondiente a la hormona de interés. A continuación, las placas se cubrieron e incubaron a temperatura ambiente (21°C) durante 2 h. Posteriormente, las placas se lavaron y secaron con papel secante, agregando inmediatamente 100 μ l de solución sustrato (50 mM de citrato, 1,6 mM de peróxido de hidrógeno, 0,4 mM de 2,20-azino-di-(3-etilbenzotiazolin sulfónico) sal de diamonio, pH 4). Finalmente, se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de microplacas (Thermo Electron Corporation, EE.UU.). La sensibilidad del ensayo fue de 2,44 pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron de <10 y <15%, respectivamente. Los resultados se expresaron como Log₁₀ de la concentración de testosterona en plasma en ng/ml. El n muestral por grupo fue de 9-12 animales.

Determinación de la concentración de gonadotropinas

La concentración de LH y FSH en las muestras de plasmas obtenidas se determinó mediante el empleo de kits ELISA comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (MyBioSource, EE. UU.). El rango de detección para el kit de LH fue 0.78 mUI/ml - 50 mUI/ml y para el kit de FSH 3.12 mUI/ml - 100 mUI/ml. La sensibilidad del ensayo de LH fue hasta 0,08 mUI/ml y para FSH fue de 1,0 mUI/ml. Los coeficientes de variación intra e interensayo para LH fueron \leq 8% y

≤12%, respectivamente. Los coeficientes de variación intra e interensayo para FSH fueron <15%. Los resultados se expresan en mUI/ml. El n muestral por grupo fue de 5-7 animales.

EVALUACIÓN DE LA HISTOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DE TESTÍCULOS

A fin de estudiar la participación del Ht en los efectos de la administración de Ghrl sobre la morfometría testicular en ratones, se analizaron los testículos de los animales tratados con Ghrl durante 42 días. Después del sacrificio de los animales, un testículo de cada animal fue fijado en solución de Bouin durante 48 h, se deshidrató en una serie de alcoholes de concentración ascendente (70%, 80%, 96%, 96%, 96% por 1 h cada uno, luego se pasó a alcohol 100% durante 12 h, a continuación 2 lavados en alcohol 100% de 1 h cada uno y por último 3 lavados en xilol de 1 h cada uno) y se incluyó en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos a intervalos regulares. Las secciones histológicas (5 mm) se tiñeron con hematoxilina y eosina (H/E). Todas las secciones se observaron con un microscopio trinocular óptico Zeiss Primo Star (Gotinga, Alemania) conectado a la cámara digital Zeiss Axio Cam ERc 5s. Las secciones teñidas con H/E se usaron para identificar diferentes etapas del ciclo celular del epitelio seminífero (espermatogonias, espermátidos, espermátides y espermatozoides), células de Leydig y Sertoli en un área preestablecida de 5x5 cm. Se obtuvieron recuentos de células diferenciadas de cada 20ª sección para proporcionar una selección de muestra del 5% por testículo. La histología se realizó mediante el recuento de 20 túbulos seminíferos en cada portaobjetos (Kheradmand et al., 2009). Para evitar el sesgo, el experimento lo realizaron dos observadores, a doble siego. Los resultados se expresan como media ± EE del porcentaje de cada tipo de célula germinal por animal y las células de Leydig y Sertoli como media ± EE del número de células por animal. Los análisis de morfometría testicular se realizaron teniendo en cuenta 50 túbulos seminíferos por animal (Duan et al., 2014). El diámetro del túbulo seminífero y la altura del epitelio seminífero se midieron con el sistema de análisis de imagen AxioVision 4.0 V 4.8.2.0. Los resultados se expresan como la media ± EE en micrómetros. El n muestral por grupo fue de 5 animales.

EVALUACIÓN DE LA ULTRAESTRUCTURA TESTICULAR

A fin de evaluar la ultraestructura testicular de los animales tratados con Ghrl durante 42 días, se procedió según lo establecido por Díaz de Barboza (2014). Los testículos (uno por animal) se fijaron por inmersión en una mezcla de glutaraldehído al 2% (v/v) y formaldehído al 4% (v/v) en buffer cacodilato 0,1M durante 24 h. Las muestras se trozaron en bastones de 1x3 mm y luego se

realizó una postfijación con tetróxido de osmio al 1% (p/v) en buffer cacodilato por 2 h. Posteriormente los trozos fueron deshidratados e incluidos en Araldita a 60°C durante 48 h. Se obtuvieron secciones de 0,5 micras cortadas con cuchilla de diamante en un ultramicrotomo JEOL JUM-7 que fueron teñidas con azul de toluidina para seleccionar la zona de corte. De dicha zona posteriormente se obtuvieron secciones finas (80 nm) que fueron montadas en grillas de níquel y contrastadas con uranilo alcohólico y citrato de plomo. Las secciones fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión LEO 906 (Oberkochen, Alemania). El n muestral por grupo fue de 3-5 animales.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se disecaron el hipotálamo, la hipófisis total, y los testículos de algunos animales. Luego, las estructuras se colocaron en solución de RNAlater (Ambion, Austin, TX, EE.UU.) para su preservación. El n muestral por grupo fue de 5-6 animales.

Aislamiento del ARN y síntesis del ADN complementario (ADN_c): las muestras de tejido fueron homogeneizadas por sonicación en Trizol (Invitrogen, Suecia). Luego se agregó cloroformo al homogenato y se centrifugó (12.000 g, 4°C, 15 min). El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se precipitó el ARN con isopropanol, incubando toda la noche a -20°C. Los *pellets* fueron lavados con etanol 75%, secados a temperatura ambiente y luego, resuspendidos en agua libre de ARNasa. La contaminación con ADN fue removida por tratamiento con ADNasa I (Roche Diagnostics) (37°C, 4 h) y la enzima fue luego inactivada por calentamiento (75°C, 15 min). La ausencia de ADN genómico se confirmó por PCR empleando *primers* para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de ratón (GAPDH). La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría (ND-1000 NanoDrop, Thermo Scientific, EE.UU.). El ADN_c fue sintetizado con transcriptasa inversa MMLV.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR): se procedió como se describe en Carlini et al. (2012). El ADN de cada tejido fue analizado cuantitativamente por PCR en tiempo real utilizando un termociclador MyiQ (BIO-Rad Laboratories, Suecia). Cada reacción de RT-PCR fue realizada con un volumen total de 20 µL conteniendo ADN_c sintetizados a partir de 25 ng de ARN, 0,25 M de cada *primer*, 20 mM TRIS/HCl (pH 8,4), 50 nM KCl, 4 mM Cl₂Mg, 0,2 mM dNTP, SYBR Green (1:50000) y con 0,02 U/l Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Suecia). La

amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial por 4 min a 95°C, seguido por 50 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 52–62°C (temperatura óptima de anillamiento para cada primer) y 30 s a 72°C. Este paso fue seguido por 1 min a 55-62°C (temperatura óptima de anillamiento) y una curva de fusión con 84 ciclos de 10 s a 55°C, aumentado en 0,5°C por ciclo. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado. Se incluyeron un control negativo para cada par de *primers* y un control positivo con 25 ng de ADN genómico en cada plato. Los *primers* fueron diseñados empleando el programa *Beacon Primer Design 4.0* (Premier Biosoft, EE. UU.) (Tabla 1). Los factores de normalización se calcularon usando el método GeNorm descrito por Vandesompele et al. (2002). Los siguientes genes fueron utilizados como factores de normalización de la expresión: GAPDH, proteína ribosomal 19 (RPL19), ciclofilina (CYCLO), histona H3 (H3b), y β -actina (ACT). Los genes de interés fueron: GnRH, FSHb, LHb, kisspeptina (KiSS-1), sus receptores (GnRHr, FSHr, LHr, GPR54), receptores de Ghrl (GHRs), esperiolina (Spatc1) y receptores de testosterona (AR) (Tabla 1). Las curvas de fusión se analizaron manualmente para cada muestra individual a fin de confirmar que sólo un producto sea amplificado y que sea significativamente diferente en comparación con la curva de fusión para el control negativo. Los resultados son expresados como la media de la expresión relativa del gen \pm EE.

Tabla 1Secuencias de los *primers* empleados para RT-PCR

Gen	Sentido (5' → 3')	Antisentido (5' → 3')	Temperatura de Anillamiento
ACT	CCTTCTGGGTATGGAATCCTGTG	CAGCACTGTGTTGGCATAGAGG	55°
AR	CTCTCTGTCTGTATAAATC	GGAAAGTTGTAGTAGTCG	55,8°
CYCLO	TTTGGGAAGGTGAAAGAAGG	ACAGAAGGAATGGTTTGATGG	55°
FSHb	TAAGCATCAATACCACTT	TTGAAGGTACATACTTTCT	55°
FSHr	ATGATGTCTTGGAGGTAAT	GTACAGCAGATTGTTAGC	55°
GAPDH	TCCCTCAAGATTGTCAGCAA	CACCACCTTCTTGATGTCATC	56°
GHRS	ACTACAAACCCGACTTCTA	CCACATCTGCTTCATCAATA	57,5°
GnRH	TGGATCAAATGGCAGAAC	CTTCCTCTCAATCAGACT	57,5°
GnRHr	AAATCATCTTTGCTCTCA	GGATATTATTCTGGACTGA	55°
GPR54	GGAAACTCATTGGTCATC	GTTAGCGATGTAGAAGTT	57,8°
H3b	CCTTGTTGGTCTGTTTGA	CAGTTGGATGTCCTTGGG	55°
Kiss-1	AAAAGTGAAGCCTGGATC	CTTGCTCTCTGCATACCG	56°
LH	ACTGTCCTAGCATGGTTC	ACAGGAAAGGAGACTATGG	55°
LHr	GACTTAATGAGGTCGTAA	TTCAATGTATAGCAGGTT	56°
Spatc1	TTGCCAATCTTGCCATGC	GTCCAGTAGAGGGCAAACCC	55°
Tub	AGTGCTCCTCTTCTACAG	TATCTCCGTGGTAAGTGC	55°
RPL19	AATCGCCAATGCCAACTC	GGAATGGACAGTCACAGG	55°

Abreviaturas: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína ribosomal 19 (RPL19), ciclofilina (CYCLO), histona H3 (H3b), β -actina (ACT), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona folículo estimulante (FSHb), hormona luteinizante (LHb), kisspeptina (KISS-1), receptor de la hormona de crecimiento (GnRHr), receptor de FSH (FSHr), receptor de LH (LHr), receptor de kisspeptina (GPR54), receptor de Ghrl (GHRS), receptor de testosterona (AR), α -tubulina (Tub) y esperiolina (Spatc1).

EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL

En base a los resultados obtenidos en los grupos experimentales 1 y 2, tratados previamente en el laboratorio, se determinó emplear para este experimento solo la dosis más alta de Ghrl (3,0 nmol/día). Los machos fueron administrados con una única dosis de LCR o Ghrl 3,0 nmol/día media hora antes de la realización del test conductual. Las hembras empleadas para los experimentos fueron castradas previamente y suplementadas con esteroides de acuerdo a Bertoldi et al. (2011) para inducir receptividad.

Ovariectomía: para este procedimiento quirúrgico, las hembras fueron anestesiadas con 55 mg/kg de clorhidrato de ketamina HCl (Vetanarcol König: Laboratories König S.A, Argentina) y 11 mg/kg de xilazina (Kensol König: Laboratories König S.A, Argentina). Mediante una incisión en uno de los flancos del animal, se realizó la ligadura de los oviductos y la posterior extracción de ambos ovarios. Tres semanas después de la ovariectomía, las hembras se entrenaron para la prueba de conducta sexual, empleando un grupo de machos experimentados con el fin de corroborar la receptividad. Para lograr la receptividad, las hembras fueron inyectadas con benzoato de estradiol s.c. (10 µg/animal/día en 0,1 ml de aceite de sésamo, 52 y 28 h antes del inicio de la prueba conductual) y progesterona (500 µg/animal/día s.c. en 0,1 ml de aceite de sésamo, 4 h antes de la prueba de comportamiento) (Bertoldi et al., 2011). A la tercera semana de entrenamiento, se seleccionaron para los experimentos las hembras que exhibieron un promedio de receptividad del 50 - 75%.

La prueba de conducta sexual se realizó entre las 2-3 PM en fase de oscuridad, con una lámpara de luz roja (25 Watt) dispuesta encima del dispositivo donde se estudió la conducta. El mismo consiste en una caja de vidrio transparente, de 17 cm de ancho x 30 cm de largo x 20 cm de altura, la cual está montada en soportes que la elevan de la mesada y sobre un espejo, para facilitar de esta manera la observación de las intromisiones (Bertoldi et al., 2011) (Fig. 6). Después de 5 min de adaptación del macho a la caja, se introdujo una hembra receptiva y se midió la conducta copulatoria mediante el registro de los siguientes parámetros: número de montas, número de intromisiones y latencia de eyaculación (Ferraz et al., 2001).

Se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico del número de montas y de intromisiones los animales que no eyacularon durante el período de tiempo considerado (30 min) para evitar un sesgo en dichos parámetros debido simplemente a que al eyacular normalmente dejan de montar (después de una eyaculación, los machos necesitan un descanso durante aproximadamente 5 min, antes de preceder con el siguiente ciclo de eyaculación). Mientras que para estudiar la latencia de eyaculación, en el análisis estadístico se tuvieron en cuenta los animales que tuvieron una eyaculación dentro de los 30 min analizados.



Fig. 6. Evaluación de la conducta sexual en ratón. En el primer panel se observa el dispositivo donde se estudió la conducta. En el medio, se observa una montura con la hembra receptiva (lordosis). En el último panel se describen los parámetros que se evaluaron en el test de conducta sexual (Guevara *et al.* 2012).

Se diseñó un protocolo que consistió en dos fases, una de entrenamiento y una de prueba, con 7 días de diferencia entre una y otra (para evitar efectos de la memoria a largo plazo). En base a los cambios observados en los parámetros testeados durante la fase de prueba, se decidió realizar una tercera fase donde se evaluó nuevamente la conducta sexual administrando a los animales sólo con LCR, de la misma manera que durante la fase de entrenamiento, para corroborar si los cambios se debían al tratamiento o a otros factores como el aprendizaje o acostumbamiento (Fig. 7).

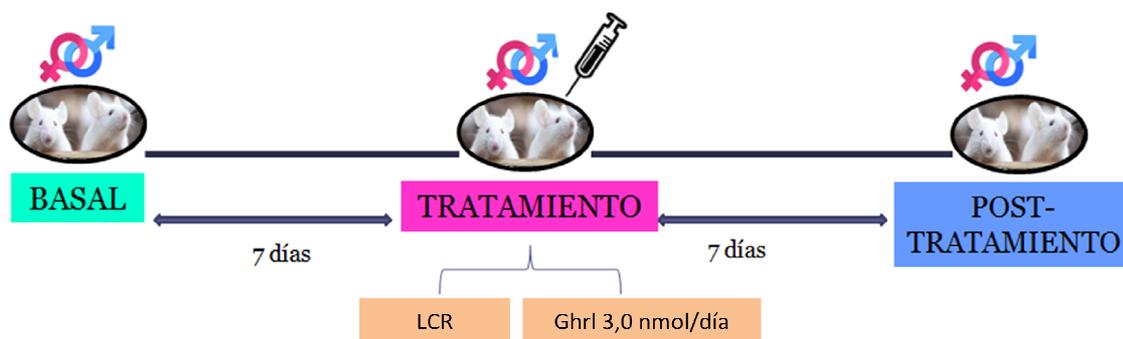


Fig. 7. Protocolo de administración para evaluar la conducta sexual en ratones machos. Los animales fueron administrados en la fase de entrenamiento (conducta basal) con una única dosis de LCR. A los 7 días, los animales fueron administrados con LCR o Ghrl 3,0 nmol/día según correspondiera. A los 7 días de la fase de prueba, los animales se trataron nuevamente con una única dosis de LCR.

EVALUACIÓN DE LA INMUNOMARCACIÓN

A fin de estudiar la participación del Ht en los efectos de la administración de Ghrl sobre la presencia de proteínas de interés (α -tubulina, α -tubulina acetilada y acrosina), se analizaron los espermatozoides de los animales tratados con Ghrl durante 42 días. Luego del sacrificio, se obtuvieron los espermatozoides epididimarios. Para ello, se realizó una laparotomía amplia, extrayéndose los testículos y epidídimos. Se separó la porción caudal de los epidídimos bajo lupa estereoscópica (Olympus, Tokio, Japón), y uno de ellos fue colocado en 1 ml de PBS. A

continuación, se realizaron varios cortes con tijera de microdissección y se lo dejó reposar durante 10 min para permitir la extrusión de los espermatozoides. Luego la solución de espermatozoides se centrifugó a 300-400 rpm durante 10 min y a continuación, se lavó para remover el plasma seminal. Para ello, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en 1 ml de PBS, se homogeneizó y se centrifugó nuevamente. El lavado se repitió dos veces. Luego se colocaron 20 μ l de la suspensión de espermatozoides sobre un portaobjetos de vidrio de carga positiva o con poly-L-lisina, se realizó un extendido que se dejó secar al aire y posteriormente se fijó. La fijación de la muestra se realizó con paraformaldehído al 4% en PBS por 15 min.

Inmunocitoquímica: Se realizó una modificación de Dvorakova et al. (2005). Los portaobjetos con los espermatozoides fijados se lavaron 2 veces con PBS frío y posteriormente se incubaron en PBS con Tritón X-100 al 0,25% por 10-20 min. A continuación se lavaron los vidrios en PBS 3 veces por 5 min. Al finalizar los lavados, se colocaron en solución de bloqueo (albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS) durante 1 h. Luego se incubaron con los anticuerpos primarios contra α -tubulina (Life Technologies, A11126), α -tubulina acetilada (Thermo Fisher Scientific, 6-11B-1) o acrosina (Thermo Fisher Scientific, MA1-19180) en cámara húmeda toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en BSA al 1%. Luego de la incubación, se lavó con PBS 3 veces, cada lavado con una duración de 5 min, y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (Thermo Fisher Scientific, AlexaFluor 488; diluido en BSA al 1%) y con Phalloidina-Rodamina (Molecular Probes Invitrogen, dilución 1: 500) durante por 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Para la visualización del ADN se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó el preparado durante 1 min con Hoechst 33258 a 37 °C. Luego de 3 lavados con PBS, los portaobjetos con las muestras fueron montados en medio de montaje Fluorsave (protector de la fluorescencia) y observados al microscopio de epifluorescencia. Como controles, se realizaron preincubaciones de los anticuerpos primarios por 1 h con sus correspondientes antígenos, o de los anticuerpos secundarios en ausencia de los primarios. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con Adobe Photoshop 7.0.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron usando el software estadístico STATISTICA - Stat Soft (Versión 10). Se corroboraron los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas; cuando los supuestos estadísticos no se cumplieron, los datos se transformaron en Log10. Los datos se

expresan como media \pm EE. El valor de alfa considerado fue del 5%; por lo tanto, para todas las variables estudiadas, se consideró una diferencia significativa entre los grupos cuando $p < 0,05$.

Los parámetros reproductivos, los datos de las pruebas hormonales y los datos de la conducta sexual se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de una prueba post hoc (Fisher LSD) cuando fue apropiado. En el caso de los datos obtenidos para los genes, la prueba post hoc utilizada fue Bonferroni. Cuando los datos se expresaron como porcentajes, se analizaron usando la prueba de Chi-cuadrado.

Los datos de ingesta de alimentos y peso corporal se analizaron utilizando un ANOVA de medidas repetidas y LSD post hoc cuando fue apropiado.

Los recuentos diferenciales de células de los datos histológicos se analizaron mediante ANOVA multivariado (MANOVA) y se realizó una prueba post hoc de LSD cuando fue apropiado.

RESULTADOS

1. DETERMINACIÓN DE INGESTA Y PESO CORPORAL

1.1. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 7 días sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratones

En la Fig. 8A se muestra la cuantificación de la ingesta de alimentos llevada a cabo durante el período experimental. El tratamiento con Ghrl 3,0 nmol/día indujo diferencias significativas en la cantidad de alimento diario consumido entre el segundo y el quinto día de tratamiento ($p < 0,05$). El ANOVA de medidas repetidas también reveló una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo ($F = 2,60$; $df = 12$; $p < 0,05$), efectos significativos del tratamiento ($F = 6,73$; $df = 2$; $p < 0,05$) y efectos significativos del tiempo ($F = 51,70$; $df = 6$; $p < 0,05$).

En relación con el peso corporal (Fig. 8B), los animales tratados con la dosis más alta de Ghrl durante 7 días mostraron mayor peso en general, pero esta diferencia solo alcanzó significancia estadística en el día 6 ($F = 7,89$; $df = 2$; $p < 0,05$).

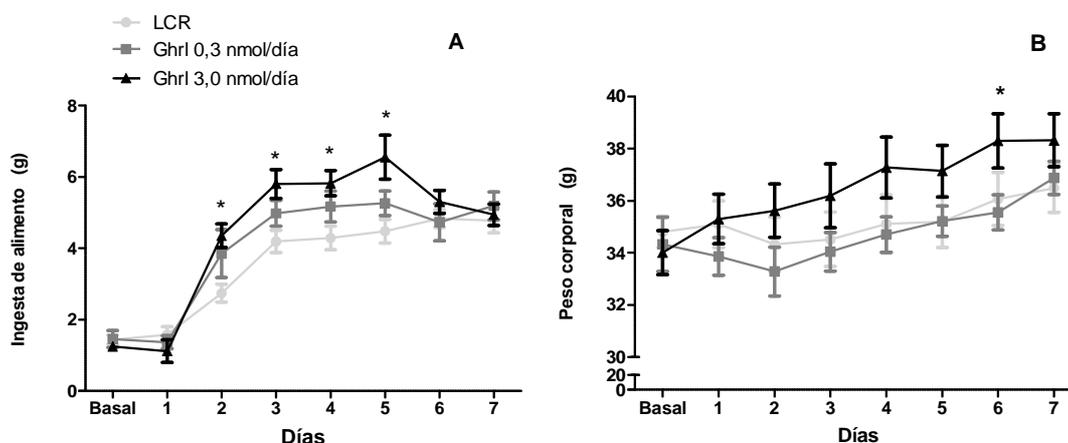


Fig. 8. Efecto de ghrelina sobre la ingesta diaria de alimento (A) y el peso corporal (B) en ratones tratados durante 7 días (media (g) \pm EE). Los animales fueron infundidos en el hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) mediante bombas osmóticas modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días). $n = 9-12$ animales/grupo.* Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

1.2. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratones

La cuantificación de la ingesta de alimentos realizada diariamente durante el período experimental se muestra como la ingesta semanal de alimentos en la Fig. 9A. La prueba de ANOVA de medidas repetidas reveló una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo ($F =$

3,72; $df = 10$; $p < 0,05$), efectos significativos del tiempo ($F = 10,65$; $df = 5$; $p < 0,05$) y efectos no significativos del tratamiento ($p > 0,05$). El tratamiento con Ghrl 3,0 nmol/día indujo un aumento significativo en la cantidad de alimento consumido pero solo durante la primera semana de tratamiento ($p < 0,05$).

En concordancia con el aumento en la ingesta de alimentos, se detectó un aumento significativo en el peso corporal en los animales tratados con Ghrl 3,0 nmol/día con respecto al grupo tratados con LCR solo en la primera semana de tratamiento (Fig. 9B) ($F = 2,98$; $df = 2$; $p < 0,05$). Sin embargo, no se encontraron variaciones significativas entre el peso final y el peso inicial para cada animal ($p > 0,05$).

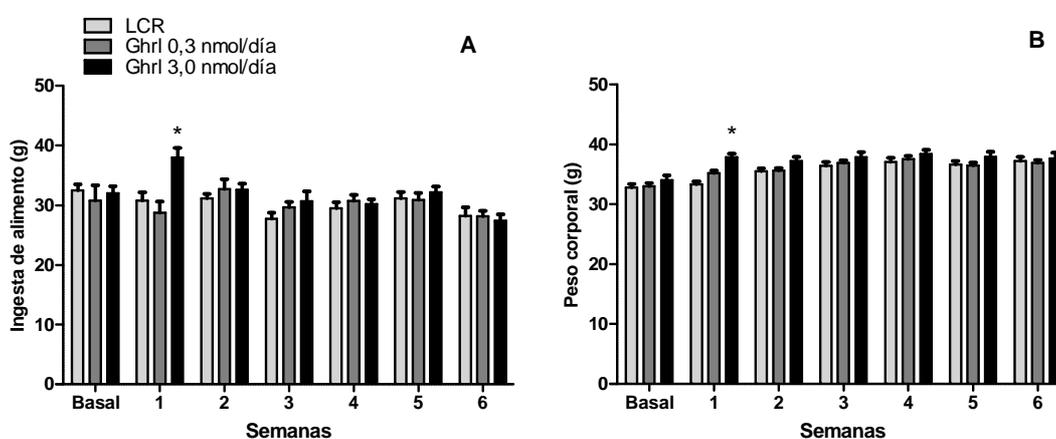


Fig. 9. Efecto de ghrelina sobre la ingesta semanal acumulada de alimento (A) y el peso corporal (B) en ratones tratados durante 42 días (media (g) \pm EE). Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas osmóticas modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). $n = 9-12$ animales/grupo. * Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA

2.1. Evaluación de la actividad funcional de espermatozoides epididimarios

2.1a. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 7 días sobre la actividad funcional espermática en ratones

La evaluación de las características seminales no mostró una modificación significativa en los parámetros evaluados entre los grupos (concentración de espermatozoides, motilidad, vitalidad, integridad acrosomal y prueba de resistencia osmótica, $p > 0,05$). Además, no hubo diferencias significativas en los parámetros de madurez de los espermatozoides, como porcentajes de espermatozoides acodados, espermatozoides con gota citoplasmática o aquellos con ambas

características (Tabla 2). Los pesos testiculares relativos fueron similares en los tres grupos ($4,97 \pm 0,20$ mg, $5,79 \pm 0,12$ mg, $5,54 \pm 0,16$ mg en LCR, Ghrl 0,3 y Ghrl 3,0 nmol/día, respectivamente).

Tabla 2

Actividad funcional espermática de espermatozoides del epidídimo caudal de ratones tratados por 7 días con Ghrl o LCR.

	LCR	Ghrl (0,3 nmol/día)	Ghrl (3,0 nmol/día)
Concentración de espermatozoides (1×10^6 /ml)	$23,59 \pm 1,90$	$18,53 \pm 2,06$	$25,11 \pm 6,11$
Motilidad (%)	$75,00 \pm 5,25$	$81,80 \pm 2,24$	$76,94 \pm 2,45$
Vitalidad (%)	$75,89 \pm 5,78$	$77,50 \pm 5,09$	$87,89 \pm 1,84$
Prueba de resistencia osmótica (%)	$74,72 \pm 3,62$	$80,82 \pm 1,60$	$79,56 \pm 1,94$
Integridad acrosomal (%)	$67,89 \pm 6,77$	$67,40 \pm 6,70$	$78,67 \pm 6,28$
Espermatozoides acodados (%)	$2,67 \pm 0,85$	$4,40 \pm 1,63$	$3,28 \pm 0,68$
Espermatozoides con gota citoplasmática (%)	$11,17 \pm 2,50$	$13,10 \pm 3,52$	$15,00 \pm 5,96$

Los animales fueron infundidos con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) en el hipotálamo mediante bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE. n=9-10 animales/grupo.

2.1b. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la actividad funcional espermática en ratones

La Figura 10 muestra los efectos del tratamiento hipotalámico de Ghrl luego de 42 días sobre la concentración de espermatozoides (A) y el porcentaje de motilidad espermática (B), respectivamente. Como puede verse, el tratamiento con Ghrl 3,0 nmol/día reduce significativamente la concentración espermática ($F = 3,93$; $df = 2$; $p < 0,05$) y la motilidad de los espermatozoides ($F = 12,82$; $df = 2$; $p < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre los grupos en los otros parámetros evaluados (vitalidad, integridad acrosomal, respuesta al shock hipoosmótico, presencia de formas inmaduras) (Tabla 3). No se encontraron diferencias significativas en el peso relativo de los testículos ($4,97 \pm 0,18$ mg, $5,15 \pm 0,13$ mg, $4,99 \pm 0,17$ mg en LCR, Ghrl 0.3 y Ghrl 3.0 nmol / día, respectivamente).

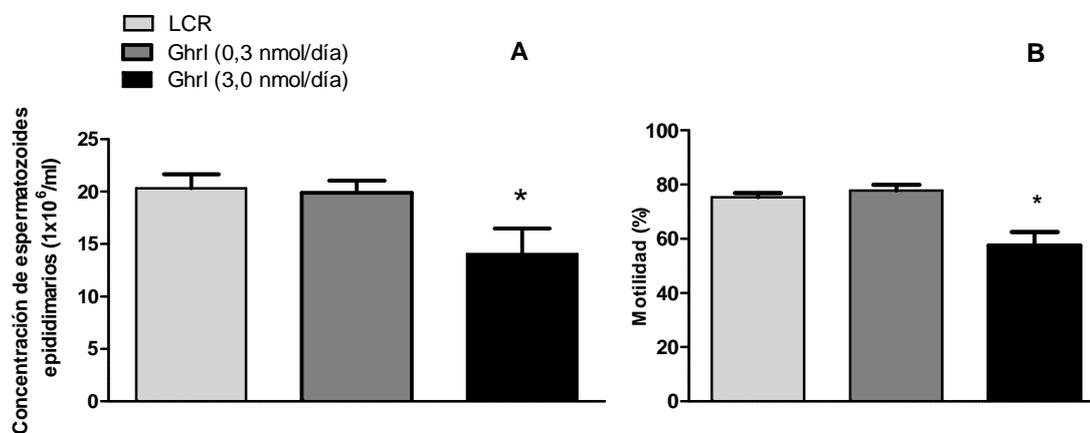


Fig 10. Efecto de ghrelina sobre la concentración de espermatozoides (1×10^6 / ml) (A) y el porcentaje de motilidad espermática (B) en ratones crónicamente tratados durante 42 días. Los animales fueron infundidos en el hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas osmóticas modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 9-10 animales/grupo. * Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

Tabla 3

Actividad funcional espermática de espermatozoides del epidídimo caudal de ratones tratados por 42 días con Ghrl o LCR.

	LCR	Ghrl (0,3 nmol/día)	Ghrl (3,0 nmol/día)
Vitalidad (%)	83,40 \pm 2,09	79,55 \pm 2,33	78,30 \pm 2,00
Prueba de resistencia osmótica (%)	71,91 \pm 2,42	72,91 \pm 2,81	69,05 \pm 3,98
Integridad acrosomal (%)	71,00 \pm 6,23	71,78 \pm 4,36	68,40 \pm 7,37
Espermatozoides acodados (%)	8,50 \pm 1,44	8,78 \pm 2,40	12,70 \pm 2,81
Espermatozoides con gota citoplasmática (%)	31,40 \pm 3,17	28,89 \pm 5,03	25,70 \pm 3,89

Los animales fueron infundidos con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) en el hipotálamo mediante bombas de perfusión osmótica modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE. n=9-10 animales/grupo.

2.2. Evaluación de la capacidad fertilizante *in vivo*

2.2a. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la capacidad fertilizante *in vivo* en ratones

La evaluación de la capacidad fertilizante *in vivo* de animales tratados durante 42 días se muestra en la Fig.11. El tratamiento con Ghrl 3,0 nmol/día en los machos, incrementa significativamente el porcentaje de pérdida embrionaria (Fig. 11A) ($F = 2,58$; $df = 2$; $p < 0,05$) y el número de fetos atrofiados en las hembras puestas a copular con estos animales (Fig. 11B) ($F = 2,24$; $df = 2$; $p < 0,05$).

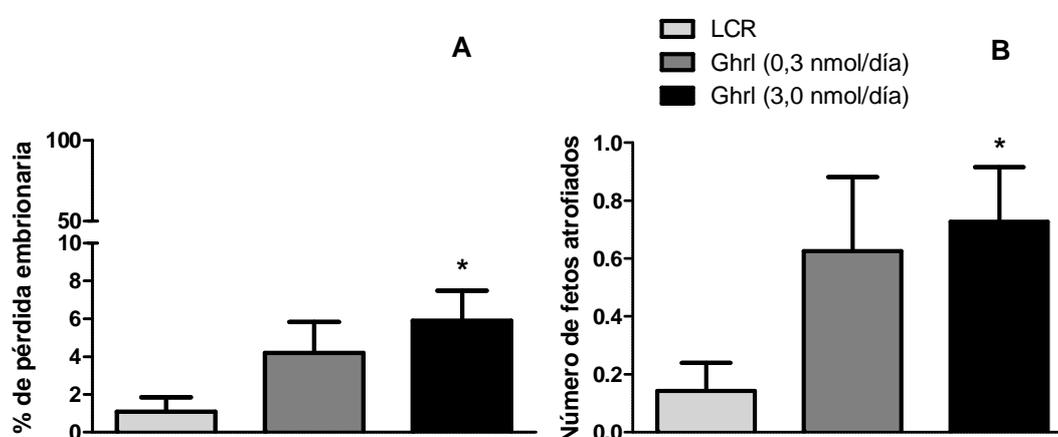


Fig 11. Efecto de ghrelina sobre el porcentaje de pérdida embrionaria (A) y la atrofia fetal (B) en hembras que copularon con machos crónicamente tratados durante 42 días. Los animales fueron infundidos en el hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas osmóticas modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. $n = 9-10$ animales/grupo. * Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

No hubo diferencias significativas entre los grupos en los otros parámetros evaluados (tasa de fertilización *in vivo*, número de fetos, peso de la camada, peso promedio de las crías, número de cuerpos lúteos) (Tabla 4).

Tabla 4

Capacidad fertilizante *in vivo* de los ratones tratados por 42 días con Ghrl o LCR.

	LCR	Ghrl (0,3 nmol/día)	Ghrl (3,0 nmol/día)
Tasa de fertilización <i>in vivo</i> (%)	81,25 ± 9,15	80,00 ± 12,24	78,57 ± 10,10
Nº de fetos	12,43 ± 0,47	12,50 ± 0,29	12,18 ± 0,42
Peso de la camada (g)	13,27 ± 0,37	14,32 ± 0,58	13,16 ± 0,58
Peso promedio por cría (g)	1,08 ± 0,04	1,14 ± 0,03	1,08 ± 0,03
Nº de cuerpos lúteos	12,57 ± 0,47	13,13 ± 0,42	12,91 ± 0,33

Los animales fueron infundidos con Ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo (LCR) en el hipotálamo mediante el empleo de bombas osmóticas modelo 2006 (0.15 µl por hora, 42 días). Los resultados se expresan como la media ± EE. n=9-10 animales/grupo.

2.3. Evaluación de la capacidad fertilizante *in vitro*

2.3a. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la capacidad fertilizante *in vitro* en ratones

No se observan diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos fertilizados *in vitro* en los animales tratados con ninguna de las dosis de Ghrl con respecto a los animales control ($p > 0,05$) (Fig. 12).

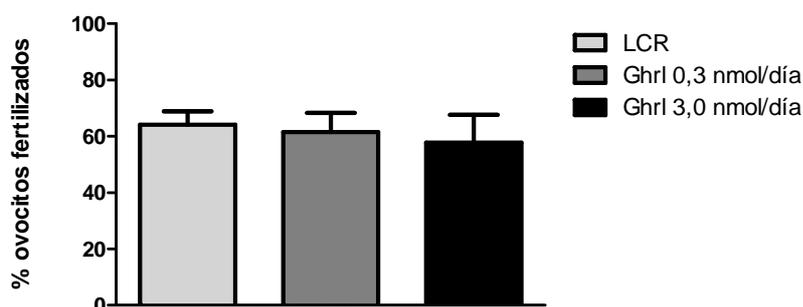


Fig 12. Efecto de ghrelina sobre el porcentaje de ovocitos fertilizados *in vitro* con espermatozoides de ratones machos crónicamente tratados durante 42 días. Los animales fueron infundidos en el hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas osmóticas modelo 2006 (0,15 µl por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media ± EE. n = 6-8 animales/grupo. * Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

3. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE HORMONAS

3.1. Efecto del tratamiento con Ghrl sobre los niveles plasmáticos de testosterona en ratones tratados durante 7 o 42 días

La Fig. 13 muestra el efecto Ghrl sobre los niveles de testosterona en plasma de animales tratados durante 7 (Fig. 13A) o 42 (Fig. 13B) días. Como puede verse, el tratamiento de 7 días no produjo cambios significativos en los niveles plasmáticos de testosterona ($p > 0,05$) mientras que el tratamiento con Ghrl 3,0 nmol/día durante 42 días redujo significativamente esta variable ($F = 4,98$; $df = 2$; $p < 0,05$).

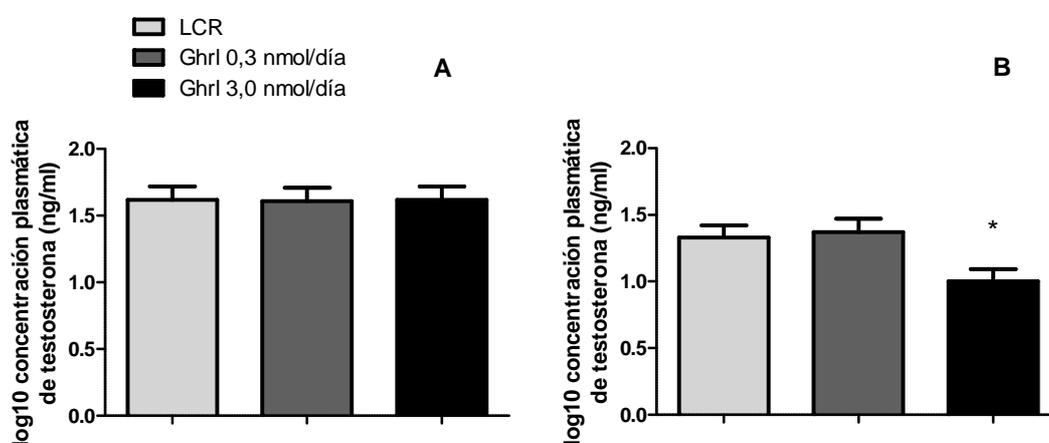


Fig 13. Efecto de ghrelina sobre la concentración plasmática de testosterona en ratones tratados durante 7 (A) o 42 (B) días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días) o 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como log10 de la concentración plasmática de testosterona en ng/ml. $n = 9-10$ animales/grupo. * Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

En línea con los resultados presentados anteriormente, se demostró correlación significativa entre la concentración de espermatozoides epididimarios (10^6 células/ml) y el log10 de la concentración plasmática de testosterona (ng/ml) ($r = 0,8386$) y entre la motilidad espermática (%) y log10 de la concentración plasmática de testosterona (ng/ml) ($r = 0,8031$) (Fig. 14).

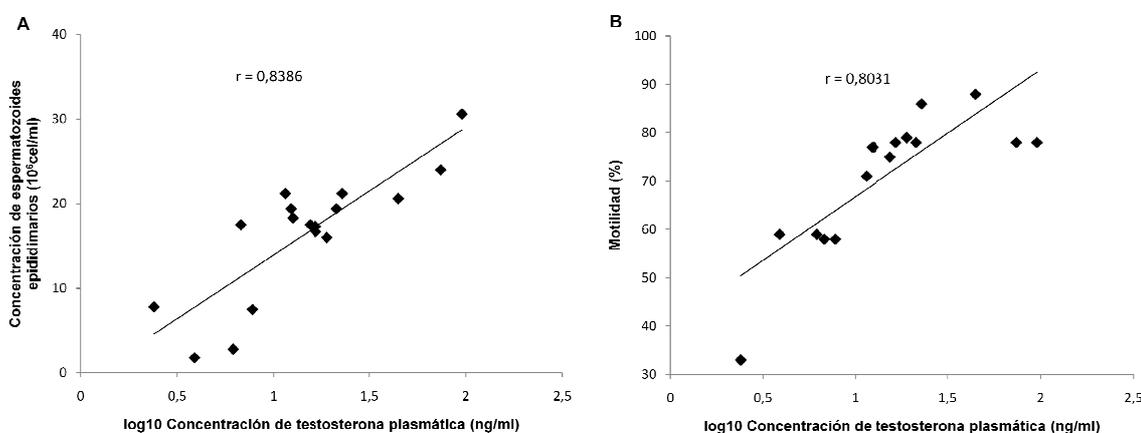


Fig. 14. Correlación entre el log10 de la concentración de testosterona plasmática (ng/ml) y la concentración de espermatozoides epididimarios (A, coeficiente de correlación del rango spearman $r = 0,8386$; $p < 0,05$) o la motilidad espermática (B, $r = 0,8031$; $p < 0,05$). Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido ceforraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días).

3.2. Efecto del tratamiento con Ghrl sobre los niveles plasmáticos de gonadotropinas en ratones tratados durante 7 o 42 días

La Fig. 15 muestra el efecto Ghrl sobre los niveles plasmáticos de FSH en animales tratados durante 7 (Fig. 15A) o 42 (Fig. 15B) días. En el plasma de los animales tratados con Ghrl se observaron niveles similares de esta hormona en relación con ratones administrados con LCR ($p > 0,05$).

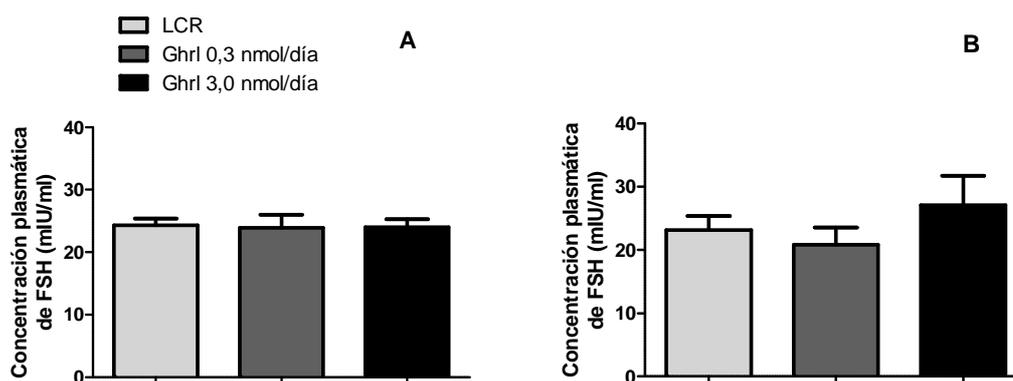


Fig. 15. Efecto de ghrelina sobre la concentración de FSH en plasma (mIU/ml) en ratones tratados durante 7 (A) o 42 (B) días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido ceforraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días) o 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. $n = 5-7$ animales/grupo. * Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

La Fig. 16 muestra el efecto de Ghrl sobre los niveles de LH en plasma de animales tratados durante 7 días (Fig. 16A) o 42 (Fig. 16B). Como puede verse, el tratamiento por 7 días no produjo cambios significativos en los niveles plasmáticos de LH ($p > 0.05$), mientras que el tratamiento Ghrl 3,0 nmol/día durante 42 días redujo significativamente esta variable ($F = 4,21$; $df = 2$; $p < 0,05$).

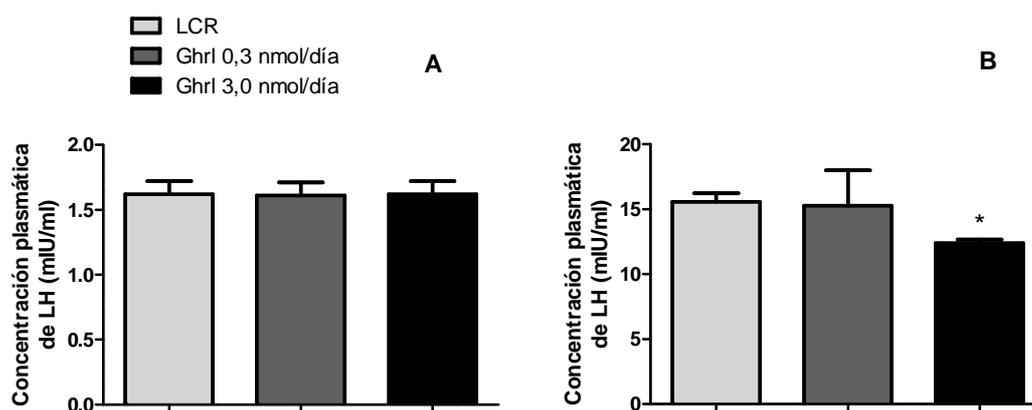


Fig. 16. Efecto de ghrelina sobre la concentración de LH en plasma (mIU/ml) en ratones tratados durante 7 (A) o 42 (B) días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días) o 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. $n = 5-7$ animales/grupo. * Diferencias significativas vs. LCR, $p < 0,05$.

4. EVALUACIÓN DE LA HISTOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA TESTICULAR

4.1. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la histología testicular en ratones

La Fig. 17 muestra el efecto de Ghrl sobre el ciclo celular espermático. Solo el tratamiento con Ghrl 3,0 nmol/día indujo una disminución significativa en el porcentaje de espermatogonias y espermatozoides ($F = 3841,96$; $df = 4$; $p < 0,05$) y un aumento en los estadios intermedios, espermatoцитos y espermátides ($p < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre las dosis de Ghrl ($p > 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en el número de células de Sertoli y células de Leydig ($p > 0,05$) (Tabla 5).

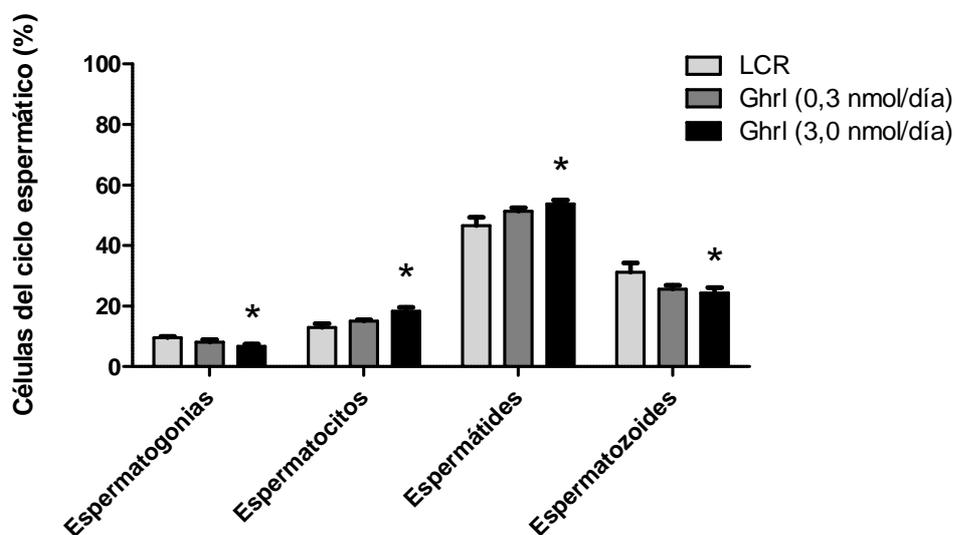


Fig. 17. Efecto de la grelina sobre el porcentaje de tipos de células germinales presentes en el epitelio seminífero en ratones crónicamente tratados durante 42 días. Los animales fueron infundidos con ghrelina (Ghr) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). El recuento diferencial de células se llevó a cabo contando al menos 20 túbulos seminíferos en cada portaobjetos. Los resultados se expresan en porcentaje de cada tipo de celda como media \pm EE. n = 5 animales/grupo. * Diferencias significativas p < 0,05 vs LCR.

Tabla 5

Efecto de ghrelina sobre el número de células de Leydig y Sertoli en ratones crónicamente tratados durante 42 días.

	LCR	Ghrl (0,3 nmol/día)	Ghrl (3,0 nmol/día)
Células de Leydig	65,60 \pm 7,15	78,40 \pm 6,33	70,20 \pm 7,77
Células de Sertoli	11,80 \pm 1,20	11,20 \pm 2,96	12,60 \pm 1,83

Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) mediante bombas de perfusión osmótica modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). El recuento diferencial de células se llevó a cabo contando al menos 20 túbulos seminíferos en cada portaobjetos. Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 5 animales / grupo.

El análisis de ANOVA no reveló diferencias significativas en los parámetros morfométricos de testículos de ratones tratados con Ghrl en comparación con animales control (p > 0,05) (Tabla 6).

Tabla 6

Efecto de ghrelina en la morfometría de los testículos de ratones tratados crónicamente durante 42 días.

	LCR	Ghrl (0,3 nmol/día)	Ghrl (3,0 nmol/día)
Diámetro del túbulo seminífero (μm)	216,23 \pm 7,76	206,23 \pm 4,60	208,02 \pm 12,28
Altura del epitelio seminífero (μm)	66,83 \pm 1,47	62,76 \pm 3,39	63,68 \pm 1,86

Los animales fueron infundidos con ghrelina (Ghrl) o liquid cefalorraquídeo artificial (LCR) mediante bombas de perfusión osmótica modelo 2006 (0,15 μl por hora, 42 días). Los análisis de morfometría testicular se evaluaron como diámetro del túbulo (μm) y altura del epitelio (μm) teniendo en cuenta 50 túbulos seminíferos por animal. Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 5 animales/grupo.

4.2. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la ultraestructura testicular de ratones

Las Fig. 18 y 19 corresponden a microfotografías electrónicas de túbulos seminíferos de ratones tratados durante 42 días con Ghrl 3,0 nmol/día. En la Fig. 18 se observa que los animales tratados con Ghrl 3,0 nmol/día mostraron cambios en el núcleo de los espermatozoides, donde la cromatina presentaba un patrón de condensación más laxo, que se evidencia por una coloración más clara. Además, en estos animales pudo observarse que la morfología del acrosoma se encontraba alterada (Fig. 19 C y D). El análisis del total de las microfotografías reveló una gran cantidad de espermátides alargadas, lo que normalmente se evidencia por la presencia de una estructura transitoria llamada manchette (conjunto de microtúbulos que se extienden paralelos al eje mayor de la célula, alrededor de la parte posterior del núcleo y la parte superior del flagelo) (Datos no mostrados).

Por otra parte, no se observaron diferencias morfológicas en las células de Leydig en los grupos tratados (Fig. 18 A y C).

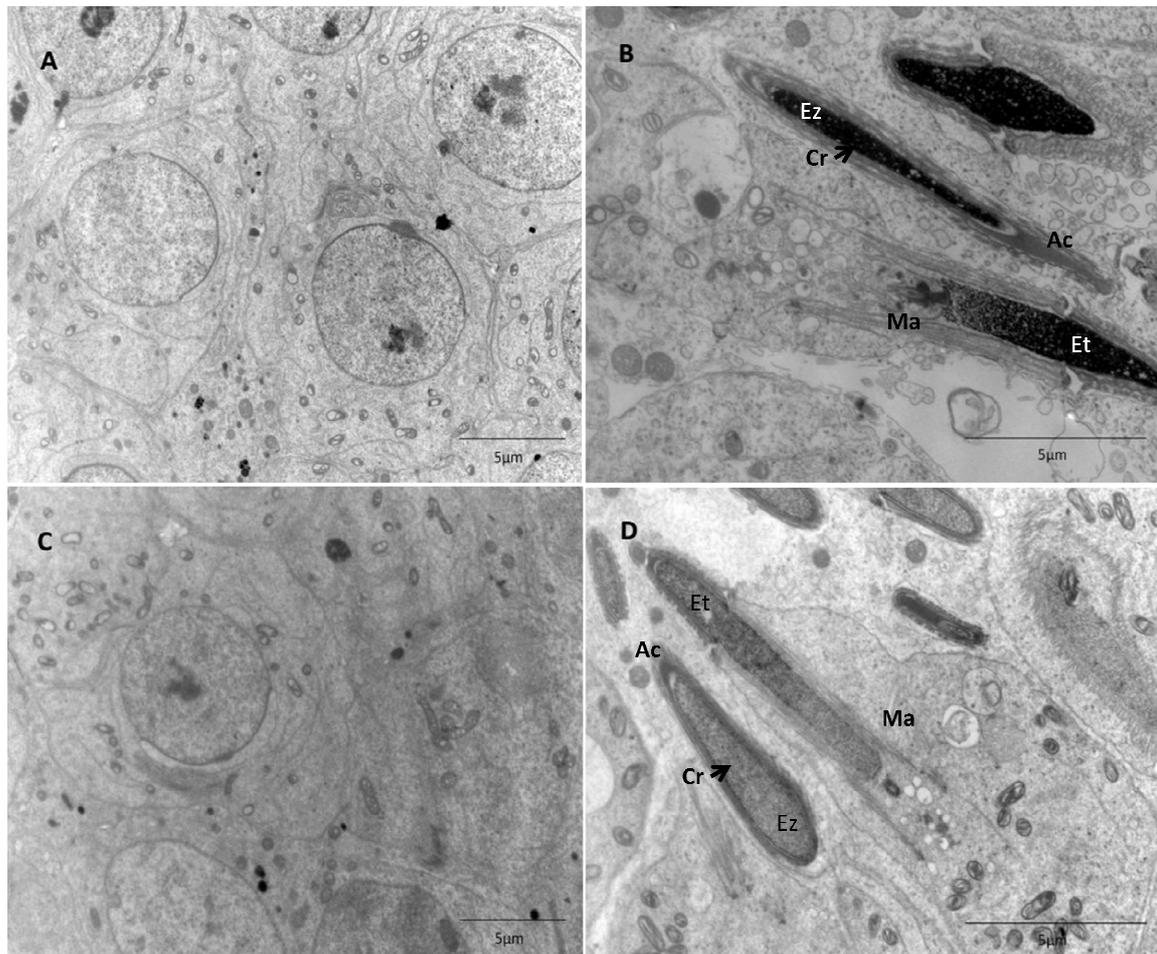


Fig. 18. Micrografías electrónicas de túbulos seminíferos de ratones tratados durante 42 días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl 3,0 nmol/día - C y D) o líquido ceforraquídeo artificial (LCR - A y B) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). A y C: células de Sertoli (escala: 5 μ m). B y D: espermátides y espermatozoides (escala: 5 μ m). (D) compactación anormal de la cromatina (Cr) en el núcleo. Ez: espermatozoide. Et: espermátide. Ac: acrosoma. Ma: manchette. n: 3-5 animales/grupo.

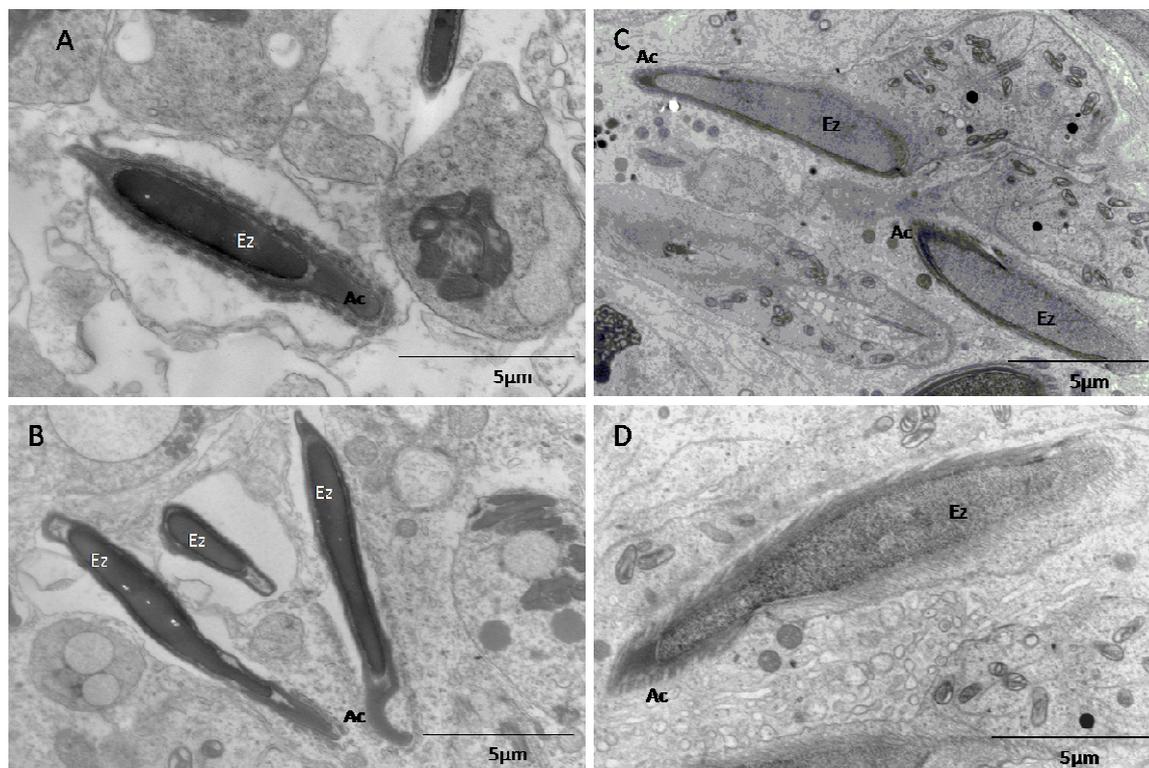


Fig. 19. Micrografías electrónicas de túbulos seminíferos de ratones tratados durante 42 días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl 3,0 nmol/día – C y D) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR - A y B) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 2006 (0,15 µl por hora, 42 días). Escala: 5 µm. Ez: espermatozoides. Et: espermátides. Ac: acrosoma. n: 3-5 animales/grupo.

5. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES

5.1. Expresión relativa de genes en el hipotálamo

5.1a. Efectos de la administración de Ghrl durante 7 y 42 días sobre la expresión del receptor de Ghr (GHSR)

Las Fig. 20 A y B muestran el efecto del tratamiento durante 7 y 42 días con Ghrl (0,3 nmol/día o 3,0 nmol/día) sobre la expresión de GHSR, respectivamente. El ANOVA de una vía indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{7 \text{ días}} = 1,716$; $df = 2$; $p > 0,05$; $F_{42 \text{ días}} = 1,069$; $df = 2$; $p > 0,05$).

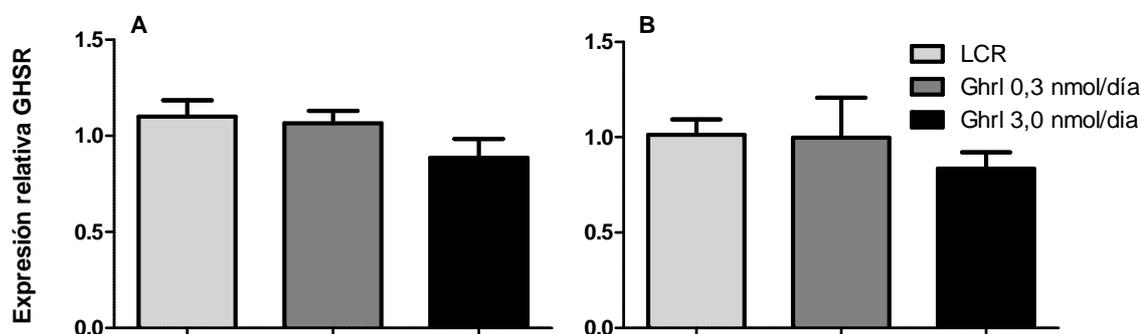


Fig. 20. Efecto de ghrelina sobre la expresión relativa de GHSR en ratones tratados durante 7 (A) o 42 (B) días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días) o 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 5-6 animales/grupo.

5.1b. Efectos de la administración de Ghrl durante 7 y 42 días sobre la expresión de Kisspeptinas (Kiss 1)

Las Fig. 21 A y B muestran el efecto del tratamiento durante 7 y 42 días con Ghrl (0,3 nmol/día o 3,0 nmol/día) sobre la expresión de Kiss 1, respectivamente. En ella se destaca que solo la dosis de Ghrl 3,0 nmol/día produjo una disminución significativa en la expresión relativa del gen ($F_{7 \text{ días}} = 10,25$; $df = 2$; $p \leq 0,05$; $F_{42 \text{ días}} = 9,401$; $df = 2$; $p \leq 0,05$).

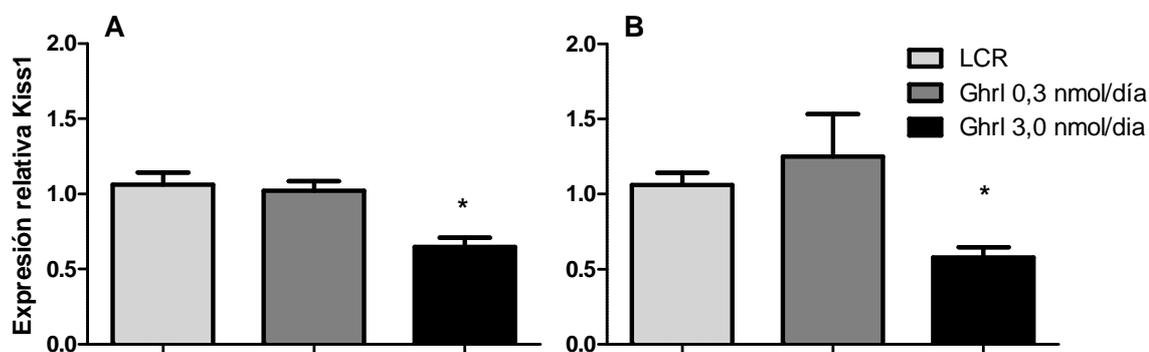


Fig. 21. Efecto de ghrelina sobre la expresión relativa de Kiss1 en ratones tratados durante 7 (A) o 42 (B) días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días) o 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 5-6 animales/grupo. * Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

5.1c. Efectos de la administración de Ghrl durante 7 y 42 días sobre la expresión del receptor de Kiss 1 (GPR54)

Las Figuras 22 A y B muestran el efecto del tratamiento durante 7 y 42 días con Ghrl (0,3 nmol/día o 3,0 nmol/día) sobre la expresión de GPR54, respectivamente. El ANOVA de una vía indica que Ghrl 3,0 nmol/día disminuye significativamente la expresión del gen respecto al control ($F_{7 \text{ días}} = 20,57$; $df = 2$; $p \leq 0,05$; $F_{42 \text{ días}} = 12,43$; $df = 2$; $p \leq 0,05$).

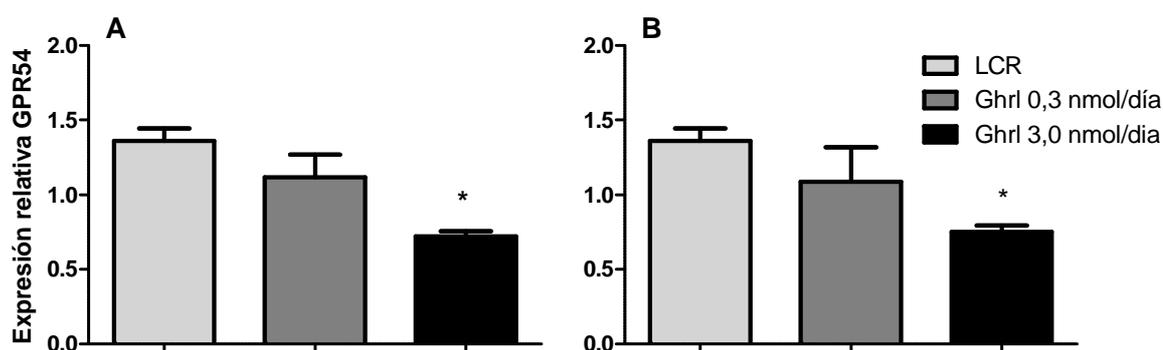


Fig. 22. Efecto de ghrelina sobre la expresión relativa de GPR54 en ratones tratados durante 7 (A) o 42 (B) días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días) o 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. $n = 5-6$ animales/grupo. * Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

5.1d. Efectos de la administración de Ghrl durante 7 y 42 días sobre la expresión de GnRH

Las Figuras 23 A y B muestran el efecto del tratamiento durante 7 y 42 días respectivamente con Ghrl 0,3 nmol/día o 3,0 nmol/día sobre la expresión de GnRH. El ANOVA de una vía indica diferencias significativas en los animales tratados con Ghrl 3 nmol/día con respecto al control en ambos periodos de tratamiento (7 y 42 días) ($F_{7 \text{ días}} = 10,19$; $df = 2$; $p \leq 0,05$; $F_{42 \text{ días}} = 3,519$; $df = 2$; $p \leq 0,05$).

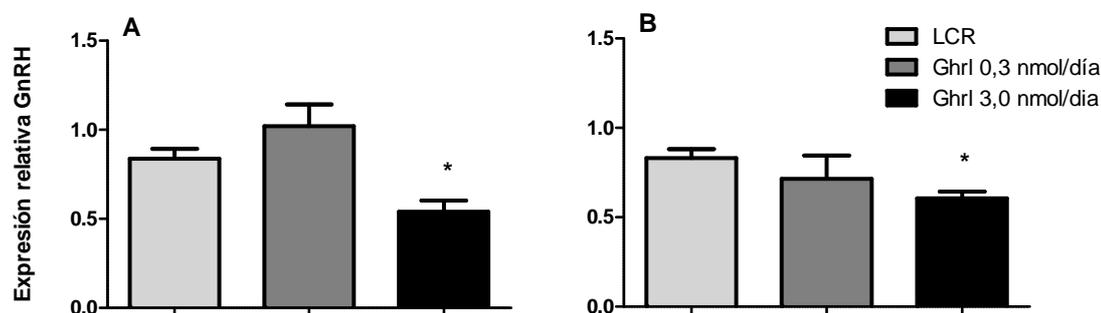


Fig. 23. Efecto de ghrelina sobre la expresión relativa de GnRH en ratones tratados durante 7 (A) o 42 (B) días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días) o 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 5-6 animales/grupo.* Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

5.2. Expresión relativa de genes en hipófisis

La evaluación de la expresión relativa de los genes medidos en hipófisis (GnRHr, FSHb) no mostró una modificación significativa entre los grupos en ninguno de los periodos de tiempo de tratamiento ($p > 0,05$) (Datos no mostrados).

No se pudo evaluar la expresión relativa del gen que codifica para LH debido a una falla en el diseño de los primers que no permitió ampliar la secuencia de interés para su cuantificación.

5.3. Expresión relativa de genes en testículos

No se pudo evaluar la expresión relativa del gen que codifica para LHr debido a una falla en el diseño de los primers que no permitió ampliar la secuencia de interés para su cuantificación.

5.3a. Efectos de la administración de Ghrl durante 7 y 42 días sobre la expresión del receptor de testosterona (AR)

La Figura 24 A muestra el efecto del tratamiento durante 7 días con Ghrl (0,3 nmol/día o 3,0 nmol/día) sobre la expresión de AR. El ANOVA de una vía indica que el tratamiento con Ghrl incrementa significativamente la expresión del receptor de testosterona respecto del control, en ambas dosis probadas ($F=7,48$; $df=2$; $p < 0,05$). No se observaron diferencias en la expresión del gen analizado en los animales tratados por 42 días ($p > 0,05$).

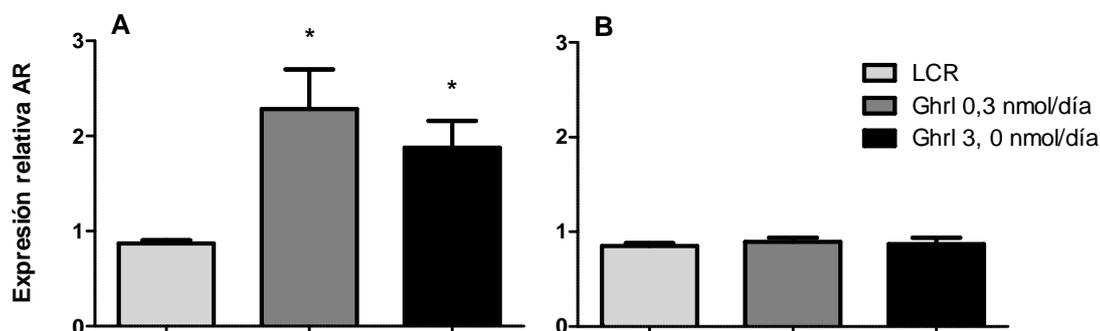


Fig. 24. Efecto de ghrelina sobre la expresión relativa del receptor de testosterona (AR) en ratones tratados durante 7 (A) o 42 (B) días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días) o 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 5-6 animales / grupo.* Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

5.3b. Efectos de la administración de Ghrl durante 7 y 42 días sobre la expresión del receptor de FSH (FSHr)

Las Figuras 25 A y B muestran el efecto del tratamiento con Ghrl (0,3 nmol/día o 3,0 nmol/día) durante 7 y 42 días respectivamente sobre la expresión de FSH. El ANOVA de una vía indica que no existen diferencias significativas entre los animales tratados con Ghrl 3,0 nmol/día con respecto a los controles ($F_{7\text{días}} = 0,4702$; $df = 2$; $p > 0,05$; $F_{42\text{días}} = 0,1827$; $df = 2$; $p > 0,05$).

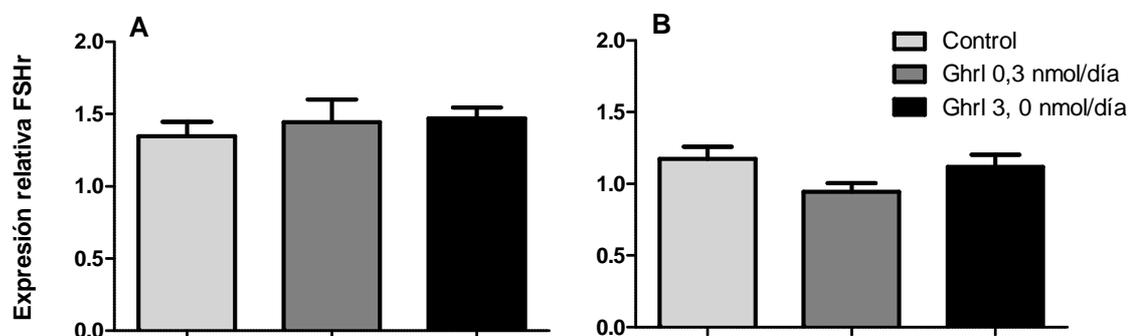


Fig. 25. Efecto de ghrelina sobre la expresión relativa de FSHr en ratones tratados durante 7 (A) o 42 (B) días. Los animales fueron infundidos en hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas de perfusión osmótica modelo 1007D (0,5 μ l por hora, 7 días) o 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 5-6 animales / grupo.

5.3c. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la expresión de los genes que codifican para α -tubulina y esperiolina en ratones

La evaluación de la la expresión de los genes que codifican para α -tubulina y esperiolina de animales tratados durante 42 días se muestra en la Fig. 26. El tratamiento con Ghrl 3,0 nmol/día, disminuye significativamente la expresión del gen que codifica para esperiolina (Fig. 26B) ($F=14,90$; $df=2$; $p < 0,05$). No se observan diferencias significativas en la expresión del gen que codifica para α -tubulina (Fig. 26A).

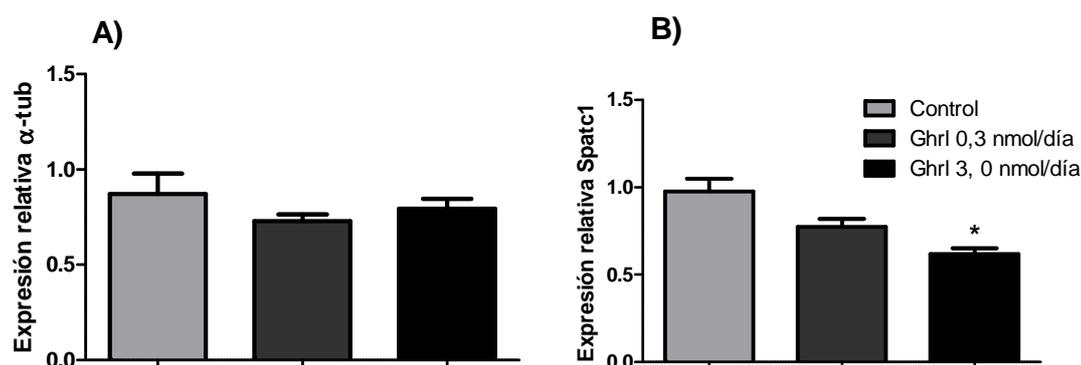


Fig 26. Efecto de ghrelina sobre expresión del gen que codifica para α -tubulina (A) y esperiolina (B) en testículo luego de la administración hipotalámica de Ghr durante 42 días. Los animales fueron infundidos en el hipotálamo con ghrelina (Ghrl) o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas osmóticas modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). Los resultados se expresan como media \pm EE. $n = 6-8$ animales/grupo. * Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

6. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL

La CSM de los animales tratados con una única dosis de Ghrl se muestra en las Fig. 27, 28 y 29. El tratamiento con Ghrl (3,0 nmol/día) indujo un efecto dual, disminuyendo significativamente el componente motivacional de la CSM en el 40% de los animales tratados en relación al control. Estos animales mostraron una reducción significativa del número de montas y de intromisiones en comparación a la conducta basal de cada animal, alcanzando nuevamente los valores basales luego de 1 semana sin tratamiento ($p < 0,05$) (Fig. 27 y 28).

El ANOVA del numero de montas reveló efectos significativos del tratamiento ($F = 9,54$; $df = 1$; $p < 0,05$). Por su parte, el análisis estadístico del numero de intromisiones reveló efectos significativos del tratamiento ($F = 3,35$; $df = 1$; $p < 0,05$).

Por otra parte, aquellos animales que no vieron afectado el componente motivacional de la CSM mostraron un aumento significativo en el componente ejecutivo, exhibiendo una disminución en el tiempo de latencia de eyacuación en relación al control, parámetro que retornó a los valores basales luego de una semana ($p < 0,05$) (Fig. 29).

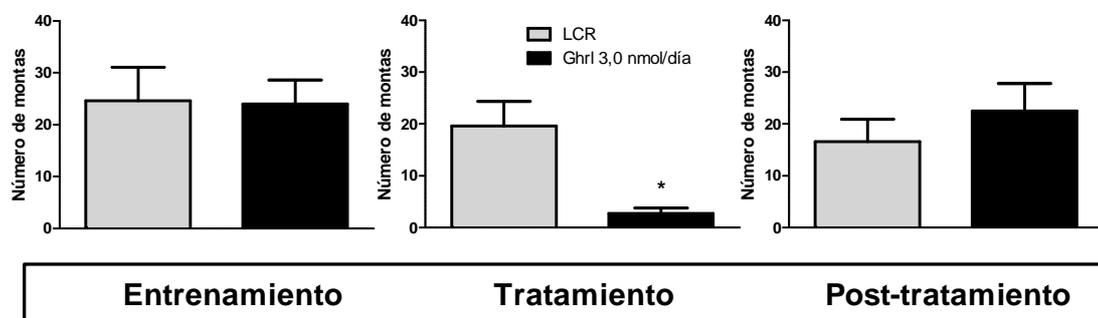


Fig. 27. Efecto de ghrelina sobre el número de montas en la prueba de conducta sexual de ratones tratados con una única dosis de Ghrl (3,0 nmol/día) o LCR. Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 9-10 animales/grupo.

* Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

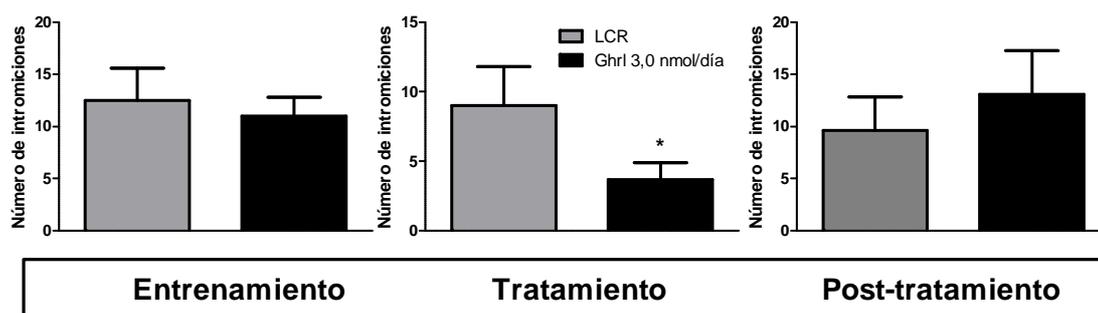


Fig. 28. Efecto de ghrelina sobre el número de intrusiones en la prueba de conducta sexual de ratones tratados con una única dosis de Ghrl (3,0 nmol/día) o LCR. Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 9-10 animales/grupo.

* Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

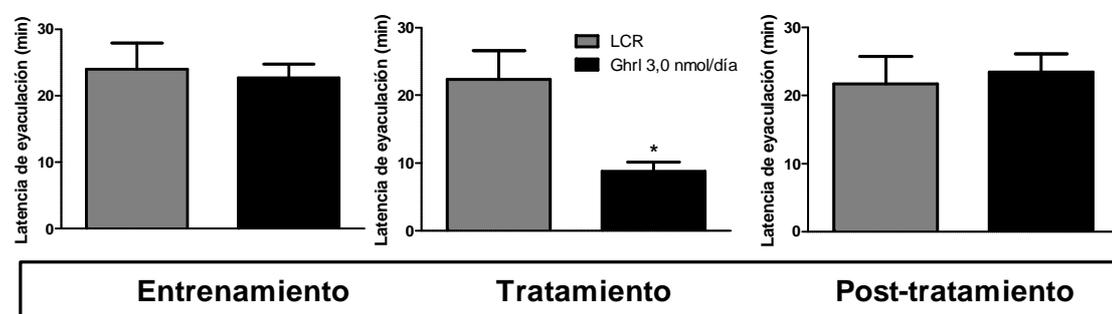


Fig. 29. Efecto de ghrelina sobre la latencia de eyaculación en la prueba de conducta sexual de ratones tratados con una única dosis de Ghrl (3,0 nmol/día) o LCR. Los resultados se expresan como media \pm EE. n = 9-10 animales/grupo.

* Diferencias significativas $p < 0,05$ vs LCR.

7. EVALUACIÓN DE α -TUBULINA MEDIANTE INMUNOMARCACIÓN

7. 1. Efectos de la administración hipotalámica de Ghrl durante 42 días sobre la distribución de α -tubulina en espermatozoides de ratón

Con relación a la inmunomarcación de α -tubulina, solo se observaron cambios cualitativos en los espermatozoides, como puede verse en la Fig. 30 B, los espermatozoides de animales tratados con Ghrl muestran un patrón α -tubulina entrecortado desde la pieza principal a la pieza terminal, donde la parte media del flagelo es más fluorescente que la pieza principal y la fluorescencia también es predominante pieza terminal, predominado en la punta del flagelo (panel d, e y f). En comparación, en los animales controles todo el flagelo exhibe una tinción continua, con una tinción predominante de la pieza media (panel a, b y c).

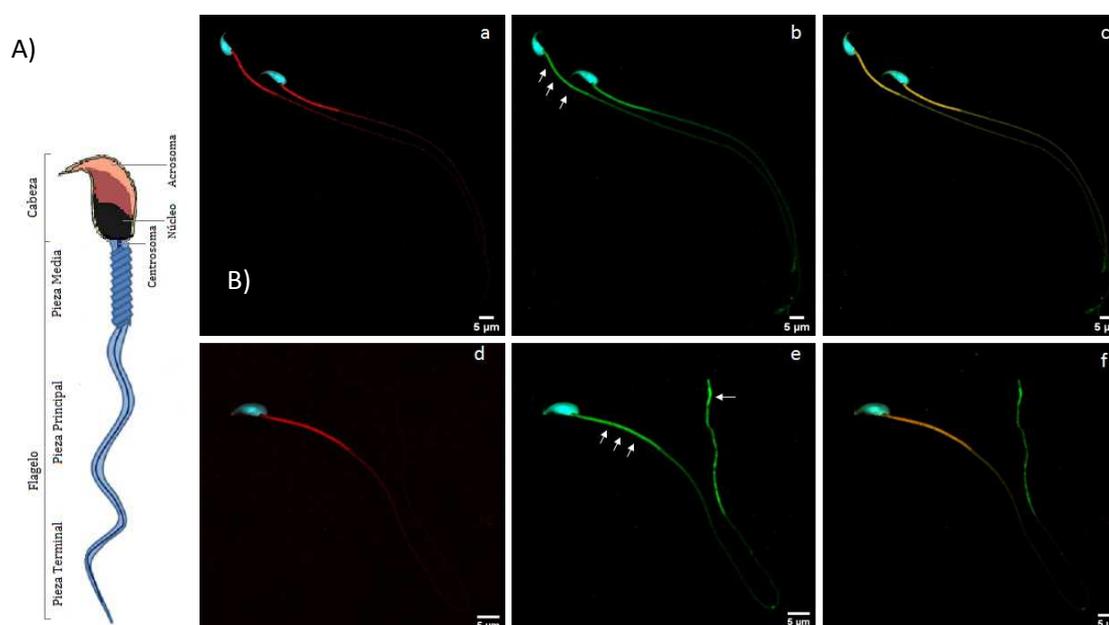


Fig 30. A) Estructura del espermatozoide de ratón. Cabeza en forma de gancho, cuyo mayor volumen está ocupado por el núcleo. El flagelo presenta tres regiones: pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. B) Efecto de ghrelina sobre α -tubulina en espermatozoides de animales tratados intrahipotalámicamente durante 42 días. Panel a - c animales controles; panel d - f animales tratados con ghrelina (Ghrl). Los animales fueron infundidos en el hipotálamo con Ghrl o líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) empleando bombas osmóticas modelo 2006 (0,15 μ l por hora, 42 días). n = 4-5 animales/grupo. La primera columna exhibe la tinción de los núcleos con Hoesch (azul), la segunda la inmunomarcación de actina con Faloidina Rodamina (rojo), la tercera la inmunomarcación de α -tubulina con Alexa Fluor 488 (verde) y la cuarta la colocalización de los anteriores. La flecha marca las diferencias observadas en la pieza terminal.

DISCUSIÓN

A pesar del vínculo comprobado entre la homeostasis energética y la fertilidad, los estudios realizados con respecto al papel potencial de Ghrl en la fisiología reproductiva hasta el momento se han restringido principalmente a las acciones gonadales directas del péptido producido localmente o bien, a sus efectos sobre las hormonas reproductivas, mientras que los efectos centrales sobre la actividad funcional espermática no han sido elucidados por completo. Es por eso que estudiamos el rol del Ht en los efectos del péptido sobre la conducta sexual, espermatogénesis, cantidad y calidad de los espermatozoides, éxito reproductivo, niveles plasmáticos de hormonas reproductivas y expresión de genes relacionados a la fisiología reproductiva en ratones.

Los resultados correspondientes a la evaluación de la actividad funcional espermática a los 42 días muestran que la dosis de 3,0 nmol/día redujo la concentración y la motilidad de los espermatozoides del epidídimo caudal, acompañado por la caída de T, sin afectar su viabilidad y los parámetros relacionados con la funcionalidad de la membrana del espermatozoide, tales como la respuesta a la prueba de hinchazón hipoosmótica y la integridad acrosomal.

Dado que Ghrl es un péptido orexigénico que induce adipogénesis (Tschöp et al., 2000), y que ha sido comprobado que la fertilidad masculina y la libido se encuentran disminuidas en situaciones de obesidad (Esfahani y Pal, 2018; Jia et al., 2018; Katib, 2015; Larsen et al., 2007; Mihalca y Fica, 2014), se midió diariamente el peso corporal de los animales y la ingesta de alimentos para minimizar el sesgo potencial de posibles diferencias en el peso corporal que pudieran afectar los parámetros reproductivos en análisis. Los resultados presentados aquí confirman que Ghrl aumenta la ingesta de alimentos, lo que se demostró previamente en algunos informes (Nakazato et al., 2001a; Tschöp et al., 2000; Wren et al., 2001a); sin embargo, el efecto no duró más allá del quinto día de tratamiento (Poretti et al., 2018). Estos resultados están en línea con otros autores que han demostrado que la elevación crónica de Ghrl en el Ht produce un aumento en la ingesta de alimentos que conduce a un aumento en el peso corporal, pero este efecto parece ser solo transitorio y se normaliza después de unas semanas (Qi et al., 2015). Además, algunos autores afirman que Ghrl no es un factor orexigénico crítico, basado en la observación de que ratones deficientes de Ghrl o su receptor exhiben un comportamiento de alimentación normal (Sato et al., 2008; Sun et al., 2003; Wortley et al., 2004). De acuerdo con

estos resultados, los efectos crónicos observados en los parámetros reproductivos no serían atribuibles a esta variable.

La producción de espermatozoides fértiles es el resultado de numerosas etapas de diferenciación celular que requieren la cooperación entre múltiples tipos de células testiculares y depende de la estimulación de las gonadotropinas hipofisarias, LH y FSH, que se secretan en respuesta a GnRH (Johnston et al., 2001). Una vez finalizada la espermatogénesis, es necesario el paso de los espermatozoides por el epidídimo para madurar y adquirir motilidad (Cooper y Yeung, 2006; Moore y Akhondi, 1996; Sullivan y Belleannée, 2017; Turner, 1995). Este proceso de maduración espermática se produce bajo estimulación androgénica (Cuasnicu et al., 1984a; Robaire y Viger, 1995). Evidencias crecientes sugieren que Ghrl puede participar en dicha red regulatoria modulando la actividad del eje HPG (Tena-Sempere, 2007b; Tena-Sempere, 2008; Tena-Sempere et al., 2007). En este sentido, ha sido demostrado que este péptido es capaz de inhibir la actividad del eje HPG para inhibir la función reproductiva en condiciones de déficit de energía (Fetissov et al., 2010). Para ayudar a esclarecer cuál es el rol que cumple Ghrl, entre los objetivos del presente trabajo se procuró determinar la participación del Ht en los efectos del péptido en tratamientos crónicos cortos (7 días, que cubre la maduración epididimaria) y largos (42 días, que cubra el ciclo espermatogénico). Se observó que la administración de la mayor dosis de Ghrl (3,0 nmol/día) en el Ht durante 42 días redujo significativamente los niveles plasmáticos de LH y T. Estos resultados son concordantes con estudios que han demostrado que la administración central de Ghrl es capaz de suprimir diferentes aspectos de la secreción pulsátil de LH tanto en modelos animales (Fernandez-Fernandez et al., 2004; Furuta et al., 2001; Iqbal et al., 2006; Martini et al., 2006; Vulliemoz et al., 2004; Wang et al., 2011) como en humanos (Kluge et al., 2007; Lanfranco et al., 2008). Más aún, se ha demostrado que el péptido disminuye la liberación de GnRH de explantes hipotalámicos *ex vivo* (Fernandez-Fernandez et al., 2005b). En concordancia con esto, nuestros resultados muestran una disminución en la expresión relativa del gen que codifica para GnRH tanto a los 7 como a los 42 días de tratamiento. En cuanto a los efectos observados del péptido sobre la T, podría suponerse que Ghrl inhibe la secreción de T al disminuir la liberación de LH. En relación a esto, ha sido reportado que Ghrl inhibe, de manera dosis-dependiente, la liberación de T estimulada por hCG y cAMP en estudios *in vitro* (Tena-Sempere et al., 2002). Otros autores reportan que la administración de Ghrl i.c.v. en ratas afecta los niveles séricos de T a dosis de 0,3 nmol mientras que la dosis de 3 nmol pareciera no ejercer

ningún efecto (Wang et al., 2011). Estos resultados contrastan con lo obtenido en nuestro trabajo en que la dosis más alta de Ghrl (3,0 nmol/día) disminuyó la secreción de T. Las diferencias en los modelos experimentales, los protocolos de administración (i.c.v. o intrahipotalámico) o el tiempo de administración podrían ser responsables de algunas inconsistencias en los informes. Estos hallazgos sugieren un sitio de acción central para los efectos inhibidores de Ghrl sobre el eje gonadotrópico, siendo el hipotálamo el principal candidato, en concordancia con lo propuesto por Tena-Sempere (2007a). Por lo tanto, es concebible que los niveles elevados de Ghrl, como los observados en la escasez de nutrientes, puedan contribuir a la supresión del eje reproductor masculino en situaciones de balance energético negativo, reforzando así el papel del péptido como un nexo entre el balance energético y la reproducción (Fernandez-Fernandez et al., 2006).

Desde su descubrimiento, el sistema KiSS-1/GPR54 ha recibido gran atención por su posible papel en regulación neuroendocrina de la reproducción. Muchos estudios lo han implicado como posible mecanismo responsable del control fisiológico del eje reproductivo y sus alteraciones fisiopatológicas (Tena-Sempere, 2006). En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo para la expresión relativa de los genes que codifican para kisspeptinas y su receptor proveen evidencia de su rol regulador del eje HPG. Nuestros resultados muestran una disminución en la expresión relativa del KiSS-1 y GPR54 tanto a los 7 como a los 42 días de tratamiento que se relacionan con la disminución observada en la expresión relativa de GnRH en ambos períodos de tratamiento, soportando su papel como “guardián de la GnRH” propuesto por Tena-Sempere (2006).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la concentración de hormonas sexuales ni en ninguno de los parámetros evaluados de la actividad funcional espermática en los animales tratados por 7 días. Sin embargo, este tratamiento sí indujo un aumento en la expresión relativa del gen que codifica para el receptor de andrógenos (AR). Este cambio no se observó en los animales tratados por 42 días, por lo que estudios adicionales que incluyan la evaluación de la expresión proteica del AR son necesarios para ahondar en este aspecto. Los resultados obtenidos sugieren que Ghrl, administrada en el hipotálamo durante todo un ciclo espermatogénico, disminuye la calidad de las gametas y que este efecto podría deberse a una acción inhibitoria sobre el HPG, con la consecuente disminución en la concentración de T plasmática. Estos resultados están respaldados por una alta correlación entre la concentración de los espermatozoides y los niveles de T plasmática, y entre la motilidad espermática y la

concentración de T en plasma. Es posible que el tratamiento durante 7 días no haya sido suficiente para producir cambios significativos en los niveles de T, y en consecuencia, la calidad de las gametas no se haya visto afectada. Como se indicó anteriormente, tanto la espermatogénesis como la maduración epididimaria, son procesos dependientes de andrógenos (Fernandez et al., 2008) y por lo tanto la disminución observada de la calidad de las gametas podría deberse a cambios estructurales del espermatozoide producidos por Ghrl durante la espermatogénesis, o bien a un efecto sobre la remodelación celular que ocurre cuando los espermatozoides migran a través del epidídimo. Para tratar de dilucidar este aspecto, se realizaron valoraciones histológicas y de ultraestructura testicular para evaluar las células espermatogénicas y también estudios inmunológicos sobre los espermatozoides maduros.

En el testículo, las células de Leydig son las principales células intersticiales y sintetizan T para la espermatogénesis (Ozawa et al., 2002). Se ha demostrado que la inyección intratesticular de Ghrl *in vivo* es capaz de inhibir la tasa de proliferación de células de Leydig inmaduras (Barreiro et al., 2004). En esta línea, la inyección subcutánea de Ghrl (1 nmol/día durante 10 días) en ratas adultas mostró un número reducido de células espermáticas diferentes así como de células de Sertoli o Leydig y numerosos cambios intracelulares que confirman la supresión de la capacidad funcional de estas células (Kheradmand et al., 2009). En contraste con esto, nuestros resultados no mostraron cambios en el número de células de Sertoli ni en las de Leydig, lo que respalda la hipótesis de que los cambios observados en nuestro modelo experimental podrían ser consecuencia de una regulación de las hormonas reproductivas mediada por Ghrl. Las diferencias en los protocolos de administración (agudo, subcrónico o crónico) y/o la vía de administración podrían ser responsables de las diferencias entre los resultados observados.

En cuanto a la evaluación del ciclo espermatogénico, los resultados muestran que el tratamiento por 42 días con Ghrl 3,0 nmol/día disminuyó el porcentaje de espermatogonias y espermatozoides, pero aumentó las formas intermedias, espermaticitos y espermátides. Es bien sabido que tanto la FSH como la LH son necesarias para el inicio de la espermatogénesis y el establecimiento de la fertilidad (Matthiesson et al., 2006). Ha sido reportado que la maduración de las espermatogonias depende en gran medida de la FSH (Haywood et al., 2003; Meachem et al., 2005; Weinbauer et al., 1991); la espermiogénesis parece depender de la LH/T intratesticular (O'Donnell et al., 1996; O'Donnell et al., 1994), mientras que la espermiación, el proceso por el cual los espermatozoides se liberan de la célula de Sertoli al lumen del túbulo seminífero,

requieren ambas hormonas (Saito et al., 2000). Con respecto a esto, la pérdida tanto de la acción de la FSH como de la LH en el ratón deficiente en GnRH (Singh et al., 1995) o la acción de la LH sola (Lei et al., 2001; Ma et al., 2004; Zhang et al., 2001) da como resultado el arresto de células germinales en estadio de espermatocitos o espermátides. Por lo tanto, el desarrollo de células germinales en el ratón se puede completar en ausencia de FSH pero no de acción androgénica (Matthiesson et al., 2006). Tales datos respaldan los resultados observados en nuestros experimentos sobre la detención del desarrollo en el estadio de espermátides en detrimento de la producción de espermatozoides, causada por la baja concentración de T plasmática dependiente de la estimulación de LH. Por lo tanto, los efectos de Ghrl sobre el eje reproductivo parecen estar más relacionados con la reducción de los niveles circulantes de LH que con los niveles de FSH. Además, el hecho de que no se hayan observado cambios en la expresión relativa del gen que codifica para FSH en nuestros experimentos podría respaldar esta hipótesis.

Como se mencionó anteriormente, la espermatogénesis es un proceso complejo que requiere la correcta sincronización de las modificaciones celulares para producir espermatozoides funcionales y móviles. La transformación gradual de espermátides en espermatozoides, implica cambios en la arquitectura nuclear, la condensación de la cromatina y la formación del acrosoma y la cola. En este sentido, el transporte de proteínas durante la elongación de la espermátide es fundamental para permitir estos cambios estructurales. Existen dos plataformas microtubulares responsables del transporte de proteínas a la cabeza y la cola en desarrollo: el manchette y el axonema de la cola del espermatozoide (Kierszenbaum y Tres, 2004; Lehti y Sironen, 2017; Toshimori y Ito, 2003).

El manchette es una plataforma microtubular transitoria que rodea la parte distal de la cabeza de la espermátide y que sólo está presente durante el proceso de la elongación. Si bien el mecanismo responsable de este proceso de elongación no está del todo claro, existen evidencias que indican que el manchete tiene un papel clave (Meistrich, 1993). Durante la condensación de cromatina, hay una reducción progresiva en el volumen nuclear y cambios en la forma del núcleo que dan como resultado cabezas de espermatozoides con formas características de cada especie. Estudios recientes indican que existe un vínculo estructural entre el manchette y la envoltura nuclear, que permite a las fuerzas de la superficie celular influir en la morfología nuclear (Iyer et al., 2012; Li et al., 2014; Maniotis et al., 1997; Oko, 1998). Además, ha sido sugerido que el manchette participa en el transporte de las proteínas necesarias para la hipercompactación del

ADN en la cabeza del espermatozoide que se produce por reemplazo de las histonas por una proteína de unión al ADN especializada, denominada protamina (Kanippayoor et al., 2013). Las observaciones ultraestructurales de los animales tratados en nuestros experimentos mostraron un patrón anormal de condensación de la cromatina y una morfología del acrosoma alterada. Además se observó gran cantidad de espermátides alargadas, lo que podría ser consecuencia en una alteración de las proteínas que conforman el manchette.

En relación al axonema, este es otra estructura del citoesqueleto que se forma en la espermátida redonda cuando uno de los centriolos comienza a elongarse frente a la luz del túbulo seminífero para formar el flagelo, estructura fundamental para la movilidad de los espermatozoides de los mamíferos (Goto et al., 2010). El axonema está compuesto por un arreglo de 9+2 microtúbulos que se extienden a lo largo del flagelo. Los microtúbulos flagelares en asociación con otras proteínas hacen que el movimiento de los espermatozoides sea un evento altamente estable y organizado (Clermont et al., 1990). La tubulina, el componente principal de los microtúbulos, es un heterodímero de α -y β -tubulinas que se someten a varias modificaciones postraduccionales: poliglutamilación, poliglicilación, tirosilación/destirosilación y acetilación/desacetilación (Verhey y Gaertig, 2007). La acetilación reversible de α -tubulina se ha implicado en la regulación de la estabilidad y la función de los microtúbulos (Hubbert et al., 2002; Parab et al., 2015; Piperno et al., 1987) y es específica de los microtúbulos flagelares (Hecht et al., 1988). Mutaciones en los genes implicados en la formación de la cola del espermatozoide causan defectos en la motilidad y, por lo tanto, infertilidad masculina (Eddy, 1998; Kim et al., 2018). Nuestros resultados muestran que, si bien no hay cambios a nivel de la expresión génica de α -tubulina, sí se observan cambios a nivel de la proteína, posiblemente atribuidos a alteraciones en la polimerización-despolimerización de esta proteína dinámica, lo cual afecta la formación de la cola, y en consecuencia, a la motilidad de los espermatozoides de los animales tratados con Ghrl.

De esta manera, las alteraciones halladas a nivel del axonema, podrían ser otra explicación posible de los cambios observados en la motilidad espermática. En línea con esto, ha sido demostrado que la integridad del centrosoma espermático se considera de importancia crítica para la fertilización exitosa y el desarrollo embrionario en humanos (Schatten y Sun, 2009). La esperiolina es una proteína centrosomal codificada por el gen *Spatc1* específica de células espermáticas, que está presente en las células espermáticas y los espermatozoides de ratón y humanos (Goto et al., 2010; Jodar et al., 2016). Ha sido demostrado que su expresión está

regulada por el sistema T/AR (Zhang et al., 2012). En los espermatozoides de ratón se encuentra en la pieza de conexión entre la cabeza y la cola y cumple un rol clave para el mantenimiento de dicha integridad (Goto y Eddy, 2004; Goto et al., 2010). Más aún, una proteína relacionada, Spatc1l, que guarda gran homología con la esperiolina, cumple un rol fundamental para la integridad de la unión entre la cabeza y la cola del espermatozoide. Alteraciones en Spatc1l en ratones conduce a la formación de espermatozoides acéfalos y por tanto, a la esterilidad masculina (Kim et al., 2018). Los resultados obtenidos en la expresión de esperiolina podrían explicar al menos en parte la disminución de la motilidad de espermatozoides epididimarios y los cambios morfológicos observados a nivel de la cabeza y la cola en los animales tratados con Ghrl durante 42 días.

Con el fin de evaluar si las alteraciones estructurales y funcionales observadas en los espermatozoides afectaban la capacidad fertilizante de las gametas, se realizaron ensayos *in vivo* e *in vitro*, evaluando además la conducta sexual de los machos para ver si existían efectos del péptido sobre la libido. Uno de los principales hallazgos de nuestro estudio después de aparear los machos tratados con Ghrl durante 42 días con hembras no tratadas, fue que si bien no hubo un cambio significativo en la tasa de fertilización ni en el tamaño de la camada, la dosis más alta de Ghrl produjo un aumento significativo en el porcentaje de pérdida embrionaria y un incremento en el número de fetos atrofiados en las hembras puestas en apareo con estos animales. Actualmente, existen pocas publicaciones acerca de los posibles efectos de Ghrl sobre el éxito reproductivo *in vivo* en ratones machos. Un estudio realizado en ratones tratados con hexarelina, un análogo sintético de Ghrl, no reporta diferencias en la concentración espermática ni en los demás parámetros de calidad evaluados. En consecuencia, estos autores no observaron diferencias significativas en el índice de preñez ni en el tamaño de la camada, sin embargo, sugieren una tendencia a la baja en ambos parámetros y, por esta razón, no descartan un efecto perjudicial sobre el comportamiento reproductivo (Puechagut et al., 2012). Se requieren mayores estudios para dilucidar si estos espermatozoides producen algún tipo de defecto en la fertilización, el desarrollo embrionario temprano y/o la implantación, que altere su desarrollo y aumente el número de atrofias y pérdidas fetales e impide una preñez exitosa. Al testear la capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides de ratones tratados con Ghrl durante 42 días no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos fertilizados con respecto a los controles. Estos resultados apoyan lo observado en los experimentos *in vivo*. Es

decir, que a pesar de que observamos una menor concentración de espermatozoides y que además, los espermatozoides mostraron menor movilidad y alteraciones estructurales, la capacidad fertilizante de los mismos no se vio comprometida en los machos tratados con Ghrl. Por lo tanto sugieren que los efectos deletéreos observados se relacionan a etapas posteriores del desarrollo del embrión y/o a una falla en la implantación. En este sentido, ha sido demostrado que la esperiolina se transmite al cigoto después de la fertilización en ratones y se mantiene durante la primera división meiótica y en algunos embriones de 2 células (Goto et al., 2010). Si bien no se conoce si lo mismo ocurre en humanos, se sabe que la integridad del centríolo espermático está asociado con una inyección intracitoplasmática (ICSI) exitosa en una fertilización *in vitro* (Schatten y Sun, 2009). Más aún, anormalidades en la región centriolar del espermatozoide en humanos están asociadas con casos de infertilidad (Kamal et al., 1999; Rawe et al., 2002), fallas en la división celular después de la ICSI (Chemes, 2000; Nagy, 2000; Rawe et al., 2002) y fallas de fertilización y escisión embrionaria temprana anormal (Nagy, 2000).

El comportamiento sexual masculino comprende un patrón complejo de respuestas genitales y somatomotoras, que incluyen tanto la cópula como los comportamientos precopulatorios que permiten al macho detectar una posible pareja, evaluar su potencial de apareamiento y estimular una respuesta receptiva (Hull y Rodríguez-Manzo, 2017). En roedores, la interacción entre machos y hembras comienza con comportamientos como acercarse y olfatear las regiones anogenitales de cada uno para obtener señales feromonales de preparación sexual para aparearse (Snoeren, 2018); también emiten vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz que algunos autores han considerado mutuamente excitantes (Geyer y Barfield, 1978; Nyby, 1983; Nyby et al., 1977a; Nyby et al., 1977b). Los roedores machos exhiben un patrón copulatorio altamente estereotipado, conformado por tres patrones motores conductuales distintos: monta, intromisión y eyaculación (Hull y Rodríguez-Manzo, 2017). Después de una serie de montas e intromisiones, generalmente de 10 a 20 intromisiones en un período de 2 a 10 min aproximadamente, se alcanza la eyaculación (Snoeren, 2018). En ratas y ratones, la eyaculación no es el final del encuentro sexual, lo que hace que la mayoría de estos animales muestren eyaculaciones múltiples en sucesión antes de dejar de copular (Agmo, 1997).

En prácticamente todas las especies de vertebrados, el comportamiento sexual masculino depende en gran medida de la T y sus metabolitos estradiol (E2) y dihidrotestosterona (DHT). En roedores, ha sido demostrada la importancia de los esteroides testiculares ya que la castración

elimina el apareamiento (Hull y Dominguez, 2015). En este sentido, T ha mostrado ser más efectiva que DHT o E2 para restaurar los comportamientos precopulatorios y copulatorios en ratones castrados, con una sensibilidad a DHT y E2 que varía ampliamente entre las cepas (Burns-Cusato et al., 2004). Sin embargo, ha sido informado que después de la castración y posterior reemplazo de T, los comportamientos regulados por dicha hormona generalmente se pierden y se restauran gradualmente durante un período de días a semanas (Baum et al., 1986; Nyby et al., 1977a; Putnam et al., 2001). En base a los datos obtenidos por nuestro grupo respecto de la supresión del eje HPG, se podría suponer que la administración crónica de Ghrl inhibiría la expresión de comportamientos dependientes de andrógenos típicos del macho. Nuestros resultados muestran que los animales exhibieron un comportamiento dual, donde algunos mostraron un aumento de la motivación, mientras que en otros se observó una notoria disminución de este comportamiento. Esto se manifestó como una falta de acercamiento hacia la hembra y una reducción significativa del número de montas y de intromisiones en comparación a los controles y a la conducta basal del propio animal. Más aún, los mismos animales fueron testeados nuevamente una semana después pero esta vez solo se les administró vehículo para corroborar si los cambios se debían al tratamiento o a otros factores como el aprendizaje o acostumbamiento y se observó que los animales fueron capaces de alcanzar nuevamente los valores basales de montas e intromisiones. En la actualidad, existen pocos estudios que exploran el papel de Ghrl sobre el comportamiento sexual. Los efectos inhibitorios de Ghrl detectados en nuestro trabajo son similares a los informados previamente para ratones hembra, donde la administración s.c. aguda de Ghrl (30 minutos antes de la prueba de comportamiento sexual) disminuyó significativamente la receptividad sexual femenina (Bertoldi et al., 2011). Además se encuentran en línea con otro estudio que reportó un aumento dependiente de la dosis de Ghrl de las latencias de monta e intromisión; sin embargo estos autores observan también un incremento en la latencia de eyaculación (Babaei-Balderlou y Khazali, 2016b). Estas latencias se usan comúnmente para evaluar la motivación sexual del macho (Agmo, 1999) caracterizada por una sincronización del deseo sexual que surge en el cerebro y su transmisión a la periferia, lo que resulta en la erección del pene. En ausencia de testosterona, el deseo sexual que surge se retrasa y no se coordina con la erección del pene (Davidson, 1966; Garelick y Swann, 2014). Shah y Nyby (2010) reportaron que la inyección aguda de Ghrl (en dosis similares a las utilizadas en nuestro estudio) en los ratones machos suprimió el comportamiento de cortejo y el comportamiento

agresivo entre machos 20 min después de su administración i.p.. Estos autores postulan la hipótesis de que la administración aguda de Ghrl inhibe los comportamientos dependientes de andrógenos en ratones machos más rápido de lo que podría predecirse mediante la supresión del eje HPG, por lo tanto Ghrl tendría la capacidad de alterar rápidamente la actividad neurológica en las áreas integrales del cerebro que controlan estos comportamientos dependientes de andrógenos. Esta acción directa de Ghrl en el cerebro podría ser una explicación alternativa para la rápida inhibición observada en nuestros animales.

En el otro extremo, otro grupo de animales, buscaron más rápido a la hembra y disminuyeron significativamente el tiempo de latencia de eyaculación, parámetro que retornó a los valores basales luego de una semana sin tratamiento. Una vez producida la eyaculación, estos animales no mostraron nuevo interés por las hembras, por lo que no pudieron reiniciar otro ciclo de cópula. Estos resultados contrastan con lo observado por Babaei-Balderlou et al. (2016a) ya que ellos observan un aumento en la latencia de eyaculación; sin embargo también reportaron que Ghrl aumentó el intervalo entre los ciclos copulatorios, atribuyendo al péptido un efecto inhibitorio sobre el comportamiento sexual.

Varios autores han propuesto que las diferentes fases del ciclo sexual están reguladas a través de diversos mecanismos, y por esta razón la motivación sexual y el comportamiento copulatorio pueden variar independientemente bajo una variedad de tratamientos (Agmo, 2002; Kondo y Sachs, 2002). Más aún, ha sido propuesto que los altos niveles crónicos de Ghrl pueden, además de inhibir aspectos de la fisiología periférica que hace posible la reproducción, inhibir aún más rápidamente los sustratos motivacionales que subyacen a algunos comportamientos relacionados con la reproducción (Shah y Nyby, 2010). Una vez más, el efecto inhibitorio de Ghrl sobre el comportamiento sexual posiciona al péptido como un regulador clave del metabolismo, evitando la pérdida de energía por vías reproductivas en situaciones de balance energético negativo.

En resumen, Ghrl administrada centralmente es capaz de alterar la actividad funcional de los espermatozoides, la producción de esteroides sexuales y la conducta sexual, efecto que es mediado al menos en parte a través de la inhibición del eje HPG. Nuestros hallazgos apoyan el papel clave de Ghrl como señal interna que desempeña un rol importante en la inhibición

adaptativa de la reproducción en condiciones de insuficiencia energética, trayendo aparejado consecuencias sobre la fertilidad del individuo.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados discutidos anteriormente, es posible inferir que la administración hipotalámica de **Ghrl 3,0 nmol/día durante 42 días o una única dosis en el caso de la conducta sexual:**

- Reduce la concentración y la motilidad de los espermatozoides epididimarios sin afectar su viabilidad y los parámetros relacionados con la funcionalidad de la membrana del espermatozoide, tales como la respuesta a la prueba de hinchazón hipoosmótica y la integridad acrosomal.
- Produce una disminución de la concentración plasmática de la hormona LH y consecuentemente de T, exhibiéndose una alta correlación entre la concentración y la motilidad de espermatozoides epididimarios, con la concentración de T en plasma. Esto sugiere un sitio de acción central para los efectos inhibidores de Ghrl sobre el eje gonadotrópico, siendo el Ht el principal candidato.
- Provoca un arresto de las formas intermedias (espermátocitos y espermátides) en las células del ciclo espermatogénico, en detrimento de los espermatozoides.
- Disminuye la expresión relativa de GnRH en Ht y del gen que codifica para Kiss1 y su receptor GPR54, soportando su papel como “guardián de la GnRH”.
- Induce cambios en el núcleo de los espermatozoides, presentando la cromatina un patrón de condensación más laxo y además, la morfología del acrosoma se encuentra alterada.
- Genera un patrón α -tubulina entrecortado desde la pieza principal a la pieza terminal en los espermatozoides de los animales tratados respecto a los animales controles. Los cambios observados ocurren a nivel de la proteína, sin afectar la expresión génica de α -tubulina.
- Produce también una disminución en la expresión de esperiolina, cuya expresión es regulada por el sistema T/AR, lo que podría explicar al menos en parte la disminución de la motilidad de espermatozoides epididimarios.

- Aumenta significativamente el porcentaje de pérdida embrionaria y el número de fetos atrofiados en hembras no tratadas puestas en apareo con los machos tratados.
- Induce un comportamiento sexual dual, donde algunos machos mostraron un aumento de la motivación, disminuyendo notoriamente la latencia de eyaculación, mientras que en otros se observó una notoria disminución de este comportamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *The New England journal of medicine*. 2017; 377(1):13-27.
- Agmo A. Male rat sexual behavior. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1997; 1(2):203-209.
- Agmo A. Sexual motivation--an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav Brain Res*. 1999; 105(1):129-150.
- Agmo A. Copulation-contingent aversive conditioning and sexual incentive motivation in male rats: evidence for a two-stage process of sexual behavior. *Physiol Behav*. 2002; 77(2-3):425-435.
- Anand BK, Brobeck JR. Localization of a "Feeding Center" in the Hypothalamus of the Rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1951; 77(2):323-325.
- Andreis PG, Malendowicz LK, Trejter M, Neri G, Spinazzi R, Rossi GP, et al. Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: Evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. *FEBS letters*. 2003; 536(1-3):173-179.
- Andrusiewicz M, Komarowska H, Skibinska I, Chmielewska M, Jaskula-Switek M, Liebert W, et al. Expression of ghrelin and ghrelin functional receptor GHSR1a in human pituitary adenomas. *Pol Arch Intern Med*. 2017; 127(3):163-169.
- Arendash GW, Gorski RA. Effects of discrete lesions of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area or other medial preoptic regions on the sexual behavior of male rats. *Brain research bulletin*. 1983; 10(1):147-154.
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001; 86(10):4753-4758.
- Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, et al. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Journal of endocrinological investigation*. 2000; 23(8):493-495.

- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 2001; 120(2):337-345.
- Babaei-Balderlou F, Khazali H. Effects of Ghrelin on Sexual Behavior and Luteinizing Hormone Beta-subunit Gene Expression in Male Rats. *J Reprod Infertil*. 2016a; 17(2):88-96.
- Babaei-Balderlou F, Khazali H. Effects of Ghrelin on Sexual Behavior and Luteinizing Hormone Beta-subunit Gene Expression in Male Rats. *Journal of reproduction & infertility*. 2016b; 17(2):88-96.
- Baiardi G, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M, Ponce AA, Lacuara JL, Vincenti L. Differential effects of pharmacologically generated reactive oxygen species upon functional activity of epididymal mouse spermatozoa. *Can J Physiol Pharmacol*. 1997; 75(3):173-178.
- Banks WA, Tschop M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002; 302(2):822-827.
- Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, et al. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod*. 2002; 67(6):1768-1776.
- Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa J, Gaytan M, et al. Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology*. 2004; 145(11):4825-4834.
- Barreiro ML, Suominen JS, Gaytan F, Pinilla L, Chopin LK, Casanueva FF, et al. Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biol Reprod*. 2003; 68(5):1631-1640.
- Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Molecular and cellular endocrinology*. 2004; 226(1-2):1-9.
- Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(8):589-600.
- Baum MJ, Melamed E, Globus M. Dissociation of the effects of castration and testosterone replacement on sexual behavior and neural metabolism of dopamine in the male rat. *Brain Res Bull*. 1986; 16(2):145-148.

- Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS, et al. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(11):8877-8880.
- Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, et al. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *Journal of medicinal chemistry*. 2000; 43(23):4370-4376.
- Bertoldi ML, Luque EM, Carlini VP, Vincenti LM, Stutz G, Santillan ME, et al. Inhibitory effects of ghrelin on sexual behavior: role of the peptide in the receptivity reduction induced by food restriction in mice. *Horm Metab Res*. 2011; 43(7):494-499.
- Bodart V, Bouchard JF, McNicoll N, Escher E, Carriere P, Ghigo E, et al. Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circulation research*. 1999; 85(9):796-802.
- Bowers CY. The role of cyclic AMP in the release of anterior pituitary hormones. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1971; 185:263-290.
- Bowers CY. Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 1998; 54(12):1316-1329.
- Bowers CY. History to the discovery of ghrelin. *Methods Enzymol*. 2012; 51:43-32.
- Braun RE. Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 1998; 9(4):483-489.
- Brobeck JR, Tepperman J, Long CN. Experimental Hypothalamic Hyperphagia in the Albino Rat. *The Yale journal of biology and medicine*. 1943; 15(6):831-853.
- Broglio F, Gottero C, Arvat E, Ghigo E. Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Horm Res*. 2003; 59(3):109-117.
- Bronson FH, Heideman PD. Short-term hormonal responses to food intake in peripubertal female rats. *Am J Physiol*. 1990; 259(1 Pt 2):R25-31.
- Burbridge S, Stewart I, Placzek M. Development of the Neuroendocrine Hypothalamus. *Compr Physiol*. 2016; 6(2):623-643.
- Burns-Cusato M, Scordalakes EM, Rissman EF. Of mice and missing data: what we know (and need to learn) about male sexual behavior. *Physiol Behav*. 2004; 83(2):217-232.

- Cabral A, De Francesco PN, Perello M. Brain circuits mediating the orexigenic action of peripheral ghrelin: narrow gates for a vast kingdom. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015; 6: 44.
- Cabral A, Lopez Soto EJ, Epelbaum J, Perello M. Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? *Int J Mol Sci*. 2017; 18(3): 638.
- Cabral A, Valdivia S, Fernandez G, Reynaldo M, Perello M. Divergent neuronal circuitries underlying acute orexigenic effects of peripheral or central ghrelin: critical role of brain accessibility. *J Neuroendocrinol*. 2014; 26(8):542-554.
- Callaghan B, Furness JB. Novel and conventional receptors for ghrelin, desacyl-ghrelin, and pharmacologically related compounds. *Pharmacological reviews*. 2014; 66(4):984-1001.
- Camina JP. Cell biology of the ghrelin receptor. *J Neuroendocrinol*. 2006; 18(1):65-76.
- Camina JP, Carreira MC, El Messari S, Llorens-Cortes C, Smith RG, Casanueva FF. Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology*. 2004; 145(2):930-940.
- Caminos JE, Gualillo O, Lago F, Otero M, Blanco M, Gallego R, et al. The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology*. 2005; 146(3):1285-1292.
- Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*. 2003; 144(4):1594-1602.
- Carlini VP, Monzon ME, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 299(5):739-743.
- Carlini VP, Poretti MB, Rask-Andersen M, Chavan RA, Ponzio MF, Sawant RS, et al. Differential effects of fluoxetine and venlafaxine on memory recognition: possible mechanisms of action. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2012; 38(2):159-167.
- Carlini VP, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 313(3):635-641.

- Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, et al. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2004; 150(2):173-184.
- Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, et al. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*. 2005; 146(9):3917-3925.
- Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Roa J, Vigo E, Pineda R, et al. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes*. 2006; 55(9):2602-2610.
- Chemes HE. Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men. *J Androl*. 2000; 21(6):799-808.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews*. 1972; 52(1):198-236.
- Clermont Y, Trott M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertil Steril*. 1969; 20(5):805-817.
- Clermont Y, Oko R, Hermo L. Immunocytochemical localization of proteins utilized in the formation of outer dense fibers and fibrous sheath in rat spermatids: an electron microscope study. *Anat Rec*. 1990; 227(4):447-457.
- Comninos AN, Jayasena CN, Dhillon WS. The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction. *Hum Reprod Update*. 2014; 20(2):153-174.
- Compagnucci C, Compagnucci GE, Lomniczi A, Mohn C, Vacas I, Cebal E, et al. Effect of nutritional stress on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the growing male rat. *Neuroimmunomodulation*. 2002; 10(3):153-162.
- Cooper TG, Yeung C-H. Sperm maturation in the human epididymis. In: De Jonge C, Barratt C (Eds). *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 1st edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2006; 72-107.
- Cornwall GA, Vindivich D, Tillman S, Chang TS. The effect of sulfhydryl oxidation on the morphology of immature hamster epididymal spermatozoa induced to acquire motility in vitro. *Biol Reprod*. 1988; 39(1):141-155.

- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003; 37(4):649-661.
- Cuasnicu PS, Gonzalez Echeverria F, Piazza A, Blaquier JA. Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1984a; 70(2):541-547.
- Cuasnicu PS, Gonzalez Echeverria F, Piazza A, Pineiro L, Blaquier JA. Epididymal proteins mimic the androgenic effect on zona pellucida recognition by immature hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1984b; 71(2):427-431.
- Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & behavior*. 2006; 89(1):71-84.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001; 50(8):1714-1719.
- Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *The New England journal of medicine*. 2002; 346(21):1623-1630.
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Frazier EG, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*. 2004; 145(6):2607-2612.
- Damian M, Marie J, Leyris JP, Fehrentz JA, Verdier P, Martinez J, et al. High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *J Biol Chem*. 2012; 287(6):3630-3641.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000; 141(11):4255-4261.
- Davenport AP, Bonner TI, Ford SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, et al. International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacological reviews*. 2005; 57(4):541-546.
- Davidson JM. Activation of the male rat's sexual behavior by intracerebral implantation of androgen. *Endocrinology*. 1966; 79(4):783-794.

- Davies JS, Kotokorpi P, Eccles SR, Barnes SK, Tokarczuk PF, Allen SK, et al. Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Mol Endocrinol*. 2009; 23(6):914-924.
- De Ambrogi M, Volpe S, Tamanini C. Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptidil hormone. *Med Sci Monit*. 2003; 9(9):RA217-224.
- De Bond JA, Smith JT. Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reproduction*. 2014; 147(3):R53-63.
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100(19):10972-10976.
- De Souza MJ, Lee DK, VanHeest JL, Scheid JL, West SL, Williams NI. Severity of energy-related menstrual disturbances increases in proportion to indices of energy conservation in exercising women. *Fertil Steril*. 2007; 88(4):971-975.
- Delhanty PJ, Negggers SJ, van der Lely AJ. Des-acyl ghrelin: a metabolically active peptide. *Endocr dev*. 2013; 25: 112-121.
- Delhanty PJ, Negggers SJ, van der Lely AJ. Should we consider des-acyl ghrelin as a separate hormone and if so, what does it do? *Front Horm Res*. 2014; 42: 163-174.
- Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, et al. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature neuroscience*. 2006; 9(3):381-388.
- Diaz de Barboza G, Rodriguez V, Ponce R, Theiler G, Maldonado C, Tolosa de Talamoni N. Association of cellular and molecular alterations in Leydig cells with apoptotic changes in germ cells from testes of *Graomys griseoflavus* x *Graomys centralis* male hybrids. *Acta Histochem*. 2014; 116(6):1037-1045.
- Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004; 114(1):57-66.
- Dominguez JM, Hull EM. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiology & behavior*. 2005; 86(3):356-368.

- Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2010; 7(3):153-161.
- Duan W, Liu C, Wu H, Chen C, Zhang T, Gao P, et al. Effects of exposure to extremely low frequency magnetic fields on spermatogenesis in adult rats. *Bioelectromagnetics*. 2014; 35(1):58-69.
- Dvorakova K, Moore HD, Sebkova N, Palecek J. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction*. 2005; 130(1):61-69.
- Eddy EM. Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 1998; 9(4):451-457.
- Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, et al. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regulatory peptides*. 2001; 99(2-3):141-150.
- Esfahani SB, Pal S. Obesity, mental health, and sexual dysfunction: A critical review. *Health Psychol Open*. 2018; 5(2):2055102918786867-2055102918786867.
- Evans JJ, Anderson GM. Balancing ovulation and anovulation: integration of the reproductive and energy balance axes by neuropeptides. *Hum Reprod Update*. 2012; 18(3):313-332.
- Farias G, Netto BDM, Bettini SC, Damaso AR, de Freitas ACT. Neuroendocrine regulation of energy balance: Implications on the development and surgical treatment of obesity. *Nutr Health*. 2017; 23(3):131-146.
- Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, et al. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol*. 2006; 25(254-255): 127-132.
- Fernandez-Fernandez R, Navarro VM, Barreiro ML, Vigo EM, Tovar S, Sirotkin AV, et al. Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology*. 2005a; 146(7):3018-3025.
- Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Lett*. 2004; 362(2):103-107.
- Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, et al. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology*. 2005b; 82(5-6):245-255.
- Fernandez CD, Porto EM, Arena AC, Kempinas Wde G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. *Int J Androl*. 2008; 31(4):427-437.

- Ferraz MR, Ferraz MM, Santos R. How REM sleep deprivation and amantadine affects male rat sexual behavior. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2001; 69(3-4):325-332.
- Fetissov SO, Laviano A, Kalra S, Inui A. Update on ghrelin. *Int J Pept*. 2010; 2010.
- Fiol de Cuneo M, Ruiz RD, Ponce A, Maldonado X, Lacuara JL. Time-related changes in functional activity of mouse spermatozoa during in vitro or in vivo incubation. *J Exp Anim Sci*. 1994; 36(6):189-200.
- Forbes S, Li XF, Kinsey-Jones J, O'Byrne K. Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neurosci Lett*. 2009; 460(2):143-147.
- Franca LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod*. 1998; 59(6):1371-1377.
- Fraser LR. In vitro capacitation and fertilization. *Methods Enzymol*. 1993; 225:239-253.
- Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 312(4):1357-1363.
- Furuta M, Funabashi T, Kimura F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 288(4):780-785.
- Garcia MC, Lopez M, Alvarez CV, Casanueva F, Tena-Sempere M, Dieguez C. Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction*. 2007; 133(3):531-540.
- Garelick T, Swann J. Testosterone regulates the density of dendritic spines in the male preoptic area. *Hormones and behavior*. 2014; 65(3):249-253.
- Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, et al. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004; 89(1):400-409.
- Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, et al. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003; 88(2):879-887.

- Geyer LA, Barfield RJ. Influence of gonadal hormones and sexual behavior on ultrasonic vocalization in rats: I. Treatment of females. *J Comp Physiol Psychol.* 1978; 92(3):438-446.
- Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biol Reprod.* 2010; 82(1):96-104.
- Gil-Campos M, Aguilera CM, Canete R, Gil A. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br J Nutr.* 2006; 96(2):201-226.
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2002; 87(6):2988.
- Goto M, Eddy EM. Speriolin is a novel spermatogenic cell-specific centrosomal protein associated with the seventh WD motif of Cdc20. *J Biol Chem.* 2004; 279(40):42128-42138.
- Goto M, O'Brien DA, Eddy EM. Speriolin is a novel human and mouse sperm centrosome protein. *Hum Reprod.* 2010; 25(8):1884-1894.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology.* 2004; 145(9):4073-4077.
- Goto M, O'Brien DA, Eddy EM. Speriolin is a novel human and mouse sperm centrosome protein. *Hum Reprod.* 2010; 25(8):1884-1894.
- Granata R, Baragli A, Settanni F, Scarlatti F, Ghigo E. Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *J Mol Endocrinol.* 2010; 45(3):107-118.
- Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology.* 2001; 142(2):788-794.
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature.* 2006; 440(7088):1199-1203.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997; 48(1):23-29.
- Guevara M, Amezcua, Hernandez Gonzalez M & Sanz-Martin. A SexyMater: computer program for recording and analysis of maternal and sexual behaviors in rodents. *Neurobiology.* 2012; 3: 1-13.

- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005; 25(49):11349-11356.
- Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001; 86(9):4284-4291.
- Havel PJ. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental biology and medicine*. 2001; 226(11):963-977.
- Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King NJ, Handelsman DJ, Allan CM. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology*. 2003; 144(2):509-517.
- Hecht NB, Distel RJ, Yelick PC, Tanhauser SM, Driscoll CE, Goldberg E, et al. Localization of a highly divergent mammalian testicular alpha tubulin that is not detectable in brain. *Mol Cell Biol*. 1988; 8(2):996-1000.
- Hecht NB. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays*. 1998; 20(7):555-561.
- Hetherington AW, Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record*. 1940; 78(2):149-172.
- Hetherington AW, Ranson SW. The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1942; 76(3):475-499.
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 294(5):E827-832.
- Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschop M. Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective. *Endocrinology*. 2001; 142(10):4163-4169.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000; 279(3):909-913.

- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(1):64-70.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996; 273(5277):974-977.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002; 417(6887):455-458.
- Hull E, Dominguez J. *Male Sexual Behavior*. 2015. 2211-2285
- Hull E, I. Wood R, E. McKenna K. *Neurobiology of Male Sexual Behavior*. 2006. 1729-1824
- Hull EM, Rodríguez-Manzo G. 1.01 - *Male Sexual Behavior*. In: *Hormones, Brain and Behavior* (Third Edition). Oxford:Academic Press; 2017. 1-57
- Iqbal J, Kurose Y, Canny B, Clarke IJ. Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. *Endocrinology*. 2006; 147(1):510-519.
- Iyer KV, Pulford S, Mogilner A, Shivashankar GV. Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport. *Biophys J*. 2012; 103(7):1416-1428.
- Jia Y-F, Feng Q, Ge Z-Y, Guo Y, Zhou F, Zhang K-S, et al. Obesity impairs male fertility through long-term effects on spermatogenesis. *BMC Urology*. 2018; 18(1):42.
- Jiang H, Betancourt L, Smith RG. Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Molecular endocrinology*. 2006; 20(8):1772-1785.
- Jodar M, Sendler E, Krawetz SA. The protein and transcript profiles of human semen. *Cell Tissue Res*. 2016; 363(1):85-96.
- Johnston DS, Russell LD, Friel PJ, Griswold MD. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology*. 2001; 142(6):2405-2408.
- Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Moriyama S, Takahashi A, Kawauchi H, et al. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*. 2003; 144(12):5215-5226.

- Kamal A, Mansour R, Fahmy I, Serour G, Rhodes C, Aboulghar M. Easily decapitated spermatozoa defect: a possible cause of unexplained infertility. *Hum Reprod.* 1999; 14(11):2791-2795.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes.* 2001; 50(11):2438-2443.
- Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, Takaya K, et al. Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2001; 86(10):4984-4990.
- Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, et al. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology.* 2004; 145(9):4144-4153.
- Kanippayoor RL, Alpern JH, Moehring AJ. Protamines and spermatogenesis in *Drosophila* and *Homo sapiens* : A comparative analysis. *Spermatogenesis.* 2013; 3(2):e24376.
- Katib A. Mechanisms linking obesity to male infertility. *Cent European J Urol.* 2015; 68(1):79-85.
- Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, et al. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology.* 2003; 144(6):2623-2633.
- Kheradmand A, Roshangar L, Taati M. The role of ghrelin on the morphometry and intracellular changes in the rat testis. *Tissue Cell.* 2009; 41(2):105-111.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.* 2004; 67(4):271-284.
- Kim K, Arai K, Sanno N, Osamura RY, Teramoto A, Shibasaki T. Ghrelin and growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHSR) mRNA expression in human pituitary adenomas. *Clinical endocrinology.* 2001; 54(6):759-768.
- Kim J, Kwon JT, Jeong J, Hong SH, Park ZY, Chung KH, et al. SPATC1L maintains the integrity of the sperm head-tail junction. *EMBO Rep.* 2018; 19(9).
- Klentrou P, Pyley M. Onset of puberty, menstrual frequency, and body fat in elite rhythmic gymnasts compared with normal controls. *Br J Sports Med.* 2003; 37(6):490-494.
- Kluge M, Schussler P, Schmidt D, Uhr M, Steiger A. Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012; 97(3):E448-451.

- Kluge M, Schussler P, Uhr M, Yassouridis A, Steiger A. Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007; 92(8):3202-3205.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; 402(6762):656-660.
- Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiological reviews*. 2005; 85(2):495-522.
- Kondo Y, Sachs BD. Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiol Behav*. 2002; 76(4-5):443-447.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000; 404(6778):635-643.
- Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001a; 86(2):881-887.
- Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine*. 2001b; 14(1):101-104.
- Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *The Journal of biological chemistry*. 2001; 276(37):34631-34636.
- Lanfranco F, Bonelli L, Baldi M, Me E, Broglio F, Ghigo E. Acylated ghrelin inhibits spontaneous luteinizing hormone pulsatility and responsiveness to naloxone but not that to gonadotropin-releasing hormone in young men: evidence for a central inhibitory action of ghrelin on the gonadal axis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008; 93(9):3633-3639.
- Larsen SH, Wagner G, Heitmann BL. Sexual function and obesity. *International Journal of Obesity*. 2007; 31(8):1189-1198.
- le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatei MA, Bloom SR. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005; 90(2):1068-1071.
- Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1952a; 55(4):548-573.

- Leblond CP, Clermont Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am J Anat.* 1952b; 90(2):167-215.
- Lebrethon MC, Aganina A, Fournier M, Gerard A, Parent AS, Bourguignon JP. Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *J Neuroendocrinol.* 2007; 19(3):181-188.
- Lehti MS, Sironen A. Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis. *Reproduction.* 2016; 151(4):R43-54.
- Lehti MS, Sironen A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biol Reprod.* 2017; 97(4):522-536.
- Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, et al. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Molecular endocrinology.* 2001; 15(1):184-200.
- Li Q, Kumar A, Makhija E, Shivashankar GV. The regulation of dynamic mechanical coupling between actin cytoskeleton and nucleus by matrix geometry. *Biomaterials.* 2014; 35(3):961-969.
- Lopez Soto EJ, Agosti F, Cabral A, Mustafa ER, Damonte VM, Gandini MA, et al. Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. *J Gen Physiol.* 2015; 146(3):205-219.
- Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, et al. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett.* 2002; 321(3):157-160.
- Luque EM, Torres PJ, de Loredó N, Vincenti LM, Stutz G, Santillan ME, et al. Role of ghrelin in fertilization, early embryo development, and implantation periods. *Reproduction.* 2014; 148(2):159-167.
- Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology.* 2007; 148(10):4601-4611.
- Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR. Targeted disruption of luteinizing hormone beta-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004; 101(49):17294-17299.
- Makler A. The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril*. 1980; 33(3):337-338.
- Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94(3):849-854.
- Martini AC, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Navarro VM, Vigo E, Vazquez MJ, et al. Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology*. 2006; 147(5):2374-2382.
- Martini AC, Fiol de Cuneo M, Ruiz RD, Ponce AA, Lacuara JL. In vitro parthenogenesis of mouse oocytes under several experimental conditions. *Zygote*. 2000; 8(1):45-49.
- Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, Tanaka S, et al. Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001; 287(1):142-146.
- Matthiesson KL, McLachlan RI, O'Donnell L, Frydenberg M, Robertson DM, Stanton PG, et al. The relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006; 91(10):3962-3969.
- McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, et al. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Molecular endocrinology*. 1997; 11(4):415-423.
- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de K, Pratis K, et al. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *J Androl*. 2002a; 23(2):149-162.
- McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res*. 2002b; 57:149-179.
- McHenry JA, Otis JM, Rossi MA, Robinson JE, Kosyk O, Miller NW, et al. Hormonal gain control of a medial preoptic area social reward circuit. *Nature neuroscience*. 2017; 20(3):449-458.

- McNay EC, Sherwin RS. From artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) to artificial extracellular fluid (aECF): microdialysis perfusate composition effects on in vivo brain ECF glucose measurements. *J Neurosci Methods*. 2004; 132(1):35-43.
- Meachem SJ, Stanton PG, Schlatt S. Follicle-stimulating hormone regulates both Sertoli cell and spermatogonial populations in the adult photoinhibited Djungarian hamster testis. *Biol Reprod*. 2005; 72(5):1187-1193.
- Meisel RI, Sachs BD. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E and Neill JD (Eds.). *The physiology of Reproduction*, 2nd edition. New York: Raven Press, pp. 3-105.
- Meistrich ML. Nuclear morphogenesis during spermiogenesis. *Molecular Biology of the male reproductive system*. 1993:67-97.
- Mihalca R, Fica S. The impact of obesity on the male reproductive axis. *J Med Life*. 2014; 7(2):296-300.
- Moehlecke M, Canani LH, Silva LO, Trindade MR, Friedman R, Leitao CB. Determinants of body weight regulation in humans. *Arch Endocrinol Metab*. 2016; 60(2):152-162.
- Mohan H, Unniappan S. Discovery of ghrelin o-acyltransferase. *Endocrine development*. 2013; 25:16-24.
- Mokrosinski J, Holst B. Modulation of the constitutive activity of the ghrelin receptor by use of pharmacological tools and mutagenesis. *Methods Enzymol*. 2010; 484:53-73.
- Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Newlander K. Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro. *Endocrinology*. 1981; 108(1):31-39.
- Moore HD, Akhondi MA. In vitro maturation of mammalian spermatozoa. *Rev Reprod*. 1996; 1(1):54-60.
- Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, et al. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS letters*. 2000; 486(3):213-216.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006; 443(7109):289-295.
- Munro CJ, Lasley BL. Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. *Prog Clin Biol Res*. 1988; 285:289-329.
- Munzberg H, Laque A, Yu S, Rezai-Zadeh K, Berthoud HR. Appetite and body weight regulation after bariatric surgery. *Obes Rev*. 2015; 16 Suppl 177-90.

- Munzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism*. 2015; 64(1):13-23.
- Nagy ZP. Sperm centriole dysfunction and sperm immotility. *Mol Cell Endocrinol*. 2000; 166(1):59-62.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001b; 409(6817):194-198.
- Nyby J. Ultrasonic vocalizations during sex behavior of male house mice (*Mus musculus*): a description. *Behav Neural Biol*. 1983; 39(1):128-134.
- Nyby J, Dizinno G, Whitney G. Sexual dimorphism in ultrasonic vocalizations of mice (*Mus musculus*): gonadal hormone regulation. *J Comp Physiol Psychol*. 1977a; 91(6):1424-1431.
- Nyby J, Wysocki CJ, Whitney G, Dizinno G. Pheromonal regulation of male mouse ultrasonic courtship (*Mus musculus*). *Anim Behav*. 1977b; 25(2):333-341.
- O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM, Robertson DM. Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod*. 1996; 55(4):895-901.
- O'Donnell L, McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology*. 1994; 135(6):2608-2614.
- O'Donnell L, Stanton P, de Kretser DM. *Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis*. 2000.
- Ochner CN, Gibson C, Shanik M, Goel V, Geliebter A. Changes in neurohormonal gut peptides following bariatric surgery. *Int J Obes (Lond)*. 2011; 35(2):153-166.
- Oko R. Occurrence and formation of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa. *Andrologia*. 1998; 30(4-5):193-206.
- Ong H, McNicoll N, Escher E, Collu R, Deghenghi R, Locatelli V, et al. Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling. *Endocrinology*. 1998; 139(1):432-435.
- Ozawa N, Goda N, Makino N, Yamaguchi T, Yoshimura Y, Suematsu M. Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *The Journal of clinical investigation*. 2002; 109(4):457-467.

- Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012; 2(4):253-263.
- Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, et al. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000; 85(10):3803-3807.
- Papotti M, Kumar U, Volante M, Pecchioni C, Patel YC. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor types 1-5 in medullary carcinoma of the thyroid. *Clinical endocrinology*. 2001; 54(5):641-649.
- Parab S, Shetty O, Gaonkar R, Balasinor N, Khole V, Parte P. HDAC6 deacetylates alpha tubulin in sperm and modulates sperm motility in Holtzman rat. *Cell Tissue Res*. 2015; 359(2):665-678.
- Parfitt DB, Church KR, Cameron JL. Restoration of pulsatile luteinizing hormone secretion after fasting in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): dependence on size of the refeed meal. *Endocrinology*. 1991; 129(2):749-756.
- Park S, Jiang H, Zhang H, Smith RG. Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109(46):19003-19008.
- Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG*. 2006; 113(10):1148-1159.
- Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007; 14(6):482-487.
- Paxinos G, Franklin K. *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (Academic, San Diego). CA, USA. 2001.
- Perello M, Scott MM, Sakata I, Lee CE, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, et al. Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain. *J Comp Neurol*. 2012; 520(2):281-294.
- Petersen PS, Woldbye DP, Madsen AN, Egerod KL, Jin C, Lang M, et al. In vivo characterization of high Basal signaling from the ghrelin receptor. *Endocrinology*. 2009; 150(11):4920-4930.
- Piperno G, LeDizet M, Chang XJ. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol*. 1987; 104(2):289-302. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima

- M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001a; 409(6817):194-198.
- Pitnick S, Wolfner MF, Dorus S. Post-ejaculatory modifications to sperm (PEMS). *Biological Reviews*. 2019.
- Poretti MB, Frautschi C, Luque E, Bianconi S, Martini AC, Stutz G, et al. Reproductive performance of male mice after hypothalamic ghrelin administration. *Reproduction*. 2018; 156(2):121-132.
- Posovszky C, Wabitsch M. Regulation of appetite, satiation, and body weight by enteroendocrine cells. Part 2: therapeutic potential of enteroendocrine cells in the treatment of obesity. *Horm Res Paediatr*. 2015; 83(1):11-18.
- Puechagut P, Martini A, Stutz G, Santillán M, Luque E, de Cuneo MF, et al. Reproductive performance and fertility in male and female adult mice chronically treated with hexarelin. *Reproduction, Fertility and Development*. 2012; 24(3):451-460.
- Putnam SK, Du J, Sato S, Hull EM. Testosterone restoration of copulatory behavior correlates with medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Hormones and behavior*. 2001; 39(3):216-224.
- Qi Y, Inoue K, Fu M, Inui A, Herzog H. Chronic overproduction of ghrelin in the hypothalamus leads to temporal increase in food intake and body weight. *Neuropeptides*. 2015; 5023-28.
- Quennell JH, Howell CS, Roa J, Augustine RA, Grattan DR, Anderson GM. Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. *Endocrinology*. 2011; 152(4):1541-1550.
- Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, et al. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology*. 2009; 150(6):2805-2812.
- Rawe VY, Terada Y, Nakamura S, Chillik CF, Olmedo SB, Chemes HE. A pathology of the sperm centriole responsible for defective sperm aster formation, syngamy and cleavage. *Hum Reprod*. 2002; 17(9):2344-2349.
- Repaci A, Gambineri A, Pagotto U, Pasquali R. Ghrelin and reproductive disorders. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 340(1):70-79.

- Ribeiro LF, Catarino T, Santos SD, Benoist M, van Leeuwen JF, Esteban JA, et al. Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111(1):E149-158.
- Robaire B, Viger RS. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod*. 1995; 52(2):226-236.
- Ruiz R, Fiol de Cuneo M, Santillán M, Ponce A, Vincenti L, Lacuara J, et al. Hypoosmotic swelling test (HOST) for assessing the integrity of the mouse sperm membrane and its relationship with other functional parameters. Effects of 2-deoxyadenosine. *Journal of Experimental Animal Science (Germany)*. 1996.
- Russell LB. Patterns of mutational sensitivity to chemicals in poststem-cell stages of mouse spermatogenesis. *Prog Clin Biol Res*. 1990; 340C:101-113.
- Saito K, O'Donnell L, McLachlan RI, Robertson DM. Spermiation failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats. *Endocrinology*. 2000; 141(8):2779-2785.
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, et al. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*. 2002; 23(3):531-536.
- Saper CB, Lowell BB. The hypothalamus. *Curr Biol*. 2014; 24(23):R1111-1116.
- Sato T, Kurokawa M, Nakashima Y, Ida T, Takahashi T, Fukue Y, et al. Ghrelin deficiency does not influence feeding performance. *Regulatory peptides*. 2008; 145(1-3):7-11.
- Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, et al. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110(4):1512-1517.
- Schatten H, Sun QY. The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15(9):531-538.
- Schellekens H, van Oeffelen WE, Dinan TG, Cryan JF. Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288(1):181-191.
- Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiology & behavior*. 2004; 81(2):289-317.
- Schneider JE. Metabolic and hormonal control of the desire for food and sex: implications for obesity and eating disorders. *Horm Behav*. 2006; 50(4):562-571.

- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000; 404(6778):661-671.
- Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine*. 2003; 349(17):1614-1627.
- Shah SN, Nyby JG. Ghrelin's quick inhibition of androgen-dependent behaviors of male house mice (*Mus musculus*). *Horm Behav*. 2010; 57(3):291-296.
- Shiiba T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002; 87(1):240-244.
- Shukla KK, Chambial S, Dwivedi S, Misra S, Sharma P. Recent scenario of obesity and male fertility. *Andrology*. 2014; 2(6):809-818.
- Shuto Y, Shibasaki T, Wada K, Parhar I, Kamegai J, Sugihara H, et al. Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R): evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats. *Life sciences*. 2001; 68(9):991-996.
- Silveira PP, Xavier MH, Souza FH, Manoli LP, Rosat RM, Ferreira MB, et al. Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33(11):1343-1350.
- Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology*. 1995; 136(12):5311-5321.
- Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*. 2006; 18(4):298-303.
- Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 2005; 146(7):2976-2984.
- Smith JT, Reichenbach A, Lemus M, Mani BK, Zigman JM, Andrews ZB. An eGFP-expressing subpopulation of growth hormone secretagogue receptor cells are distinct from kisspeptin, tyrosine hydroxylase, and RFamide-related peptide neurons in mice. *Peptides*. 2013; (47):45-53.

- Smith RG, Leonard R, Bailey AR, Palyha O, Feighner S, Tan C, et al. Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine*. 2001; 14(1):9-14.
- Snoeren E. *Female Reproductive Behavior*. 2018.
- Snoeren EM, Agmo A. The incentive value of males' 50-kHz ultrasonic vocalizations for female rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol*. 2014; 128(1):40-55.
- Soares JB, Leite-Moreira AF. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides*. 2008; 29(7):1255-1270.
- St-Pierre DH, Wang L, Tache Y. Ghrelin: a novel player in the gut-brain regulation of growth hormone and energy balance. *News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 2003; 18242-246.
- Stellar E. The physiology of motivation. *Psychol Rev*. 1954; 61(1):5-22.
- Sullivan R, Belleannée C. Role of the Epididymis in Sperm Maturation. In: De Jorge C, Barrat C (Eds). *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. 2nd edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2017; 73-87.
- Sullivan R, Mieusset R. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update*. 2016; 22(5):574-587.
- Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(22):7973-7981.
- Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, et al. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000; 85(12):4908-4911.
- Tanaka M, Hayashida Y, Nakao N, Nakai N, Nakashima K. Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1522(1):62-65.
- Tang-Christensen M, Vrang N, Ortmann S, Bidlingmaier M, Horvath TL, Tschop M. Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats. *Endocrinology*. 2004; 145(10):4645-4652.

- Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD. Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*. 1998; 139(10):4420-4423.
- Tena-Sempere M. Exploring the role of ghrelin as novel regulator of gonadal function. *Growth Horm IGF Res*. 2005; 15(2):83-88.
- Tena-Sempere M. GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Hum Reprod Update*. 2006; 12(5):631-639.
- Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitamins & Hormones*. 2007a; 77:285-300.
- Tena-Sempere M. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology*. 2007b; 86(3):229-241.
- Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitam Horm*. 2008; 77:285-300.
- Tena-Sempere M. Neuroendocrinology in 2016: Neuroendocrine control of metabolism and reproduction. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13(2):67-68.
- Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*. 2002; 143(2):717-725.
- Tena-Sempere M, Barreiro ML, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Role of leptin and ghrelin in the regulation of gonadal function. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2007; 2(2):239-249.
- Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. *Gonadotropins and gonadotropin receptors, Reproductive Medicine, Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals* (2003): New York, NY: Parthenon Publishing.
- Thomas GB, Mercer JE, Karalis T, Rao A, Cummins JT, Clarke IJ. Effect of restricted feeding on the concentrations of growth hormone (GH), gonadotropins, and prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomized ewes. *Endocrinology*. 1990; 126(3):1361-1367.
- Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, et al. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*. 2004; 145(1):234-242.

- Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology*. 2002; 143(4):1353-1361.
- Tortora G, Derrickson B. *Principios de anatomía y fisiología*. 11a edición. Ed. Panamericana.
- Tortoriello DV, McMinn J, Chua SC. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology*. 2004; 145(3):1238-1247.
- Tortoriello DV, McMinn JE, Chua SC. Increased expression of hypothalamic leptin receptor and adiponectin accompany resistance to dietary-induced obesity and infertility in female C57BL/6J mice. *Int J Obes (Lond)*. 2007; 31(3):395-402.
- Toshimori K, Ito C. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol*. 2003; 66(5):383-396.
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000; 407(6806):908-913.
- Turner TT. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J Androl*. 1995; 16(4):292-298.
- Ueno H, Nakazato M. Mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation. *J Diabetes Investig*. 2016; 7(6):812-818.
- van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine reviews*. 2004a; 25(3):426-457.
- van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *Endocrine reviews*. 2004b; 25(3):426-457.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002; 3(7):RESEARCH0034.
- Veening JG, Coolen LM. Neural mechanisms of sexual behavior in the male rat: emphasis on ejaculation-related circuits. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014; 121:170-183.
- Verhey KJ, Gaertig J. The tubulin code. *Cell Cycle*. 2007; 6(17):2152-2160.
- Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, et al. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002a; 87(3):1300-1308.

- Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem.* 2002b; 50(8):1013-1021.
- Vulliamoz NR, Xiao E, Xia-Zhang L, Germond M, Rivier J, Ferin M. Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2004; 89(11):5718-5723.
- Wade GN, Jones JE. Lessons from experimental disruption of estrous cycles and behaviors. *Med Sci Sports Exerc.* 2003; 35(9):1573-1580.
- Wade GN, Schneider JE, Li HY. Control of fertility by metabolic cues. *Am J Physiol.* 1996; 270(1 Pt 1):E1-19.
- Wang L, Fang F, Li Y, Zhang Y, Pu Y, Zhang X. Role of ghrelin on testosterone secretion and the mRNA expression of androgen receptors in adult rat testis. *Systems Biology in Reproductive Medicine.* 2011; 57(3):119-123.
- Wang Q, Liu C, Uchida A, Chuang JC, Walker A, Liu T, et al. Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Mol Metab.* 2014; 3(1):64-72.
- Weinbauer GF, Behre HM, Fingscheidt U, Nieschlag E. Human follicle-stimulating hormone exerts a stimulatory effect on spermatogenesis, testicular size, and serum inhibin levels in the gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated nonhuman primate (*Macaca fascicularis*). *Endocrinology.* 1991; 129(4):1831-1839.
- Willesen MG, Kristensen P, Romer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* 1999; 70(5):306-316.
- Wood RI. Integration of chemosensory and hormonal input in the male Syrian hamster brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 30(855):362-372.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr., Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science.* 1998; 280(5368):1378-1383.
- Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, et al. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004; 101(21):8227-8232.

- Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001a; 86(12):5992.
- Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, et al. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes.* 2001b; 50(11):2540-2547.
- Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology.* 2000; 141(11):4325-4328.
- Yamaguchi S, Abe Y, Maejima S, Tsukahara S. Sexual experience reduces neuronal activity in the central part of the medial preoptic nucleus in male rats during sexual behavior. *Neurosci Lett.* 2018; 685:155-159.
- Yan W, Kero J, Huhtaniemi I, Toppari J. Stem cell factor functions as a survival factor for mature Leydig cells and a growth factor for precursor Leydig cells after ethylene dimethane sulfonate treatment: implication of a role of the stem cell factor/c-Kit system in Leydig cell development. *Dev Biol.* 2000; 227(1):169-182.
- Yeh AH, Jeffery PL, Duncan RP, Herington AC, Chopin LK. Ghrelin and a novel preproghrelin isoform are highly expressed in prostate cancer and ghrelin activates mitogen-activated protein kinase in prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005; 11(23):8295-8303.
- Yelian FD, Dukelow WR. Effects of a DNA-specific fluorochrome, Hoechst 33258, on mouse sperm motility and fertilizing capacity. *Andrologia.* 1992; 24(3):167-170.
- Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol endocrinol.* 2001; 15(1):172-183.
- Zhang QX, Zhang XY, Zhang ZM, Lu W, Liu L, Li G, et al. Identification of testosterone-/androgen receptor-regulated genes in mouse Sertoli cells. *Asian J Androl.* 2012; 14(2):294-300.
- Zigman JM, Elmquist JK. Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. *Endocrinology.* 2003; 144(9):3749-3756.
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2006; 494(3):528-548.