



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
REPRODUCCIÓN

PARTICIPACIÓN DE LA KISSPEPTINA EN LA LIBERACIÓN DE LH, FSH Y
SOMATOTROPINA EN BECERRAS PREPÚBERES DEL TRÓPICO DE
DISTINTAS EDADES

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
MÓNICA ALAMILLA RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. ALEJANDRO VILLA GODOY FMVZ-UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR FMVZ-UNAM
DR. HÉCTOR R. VERA ÁVILA CENID FISILOGIA ANIMAL-INIFAP

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres:

Por tener siempre el consejo adecuado en el momento preciso, por las palabras de aliento, por enseñarme, a no claudicar, a ser perseverante, constante, en fin a luchar por lo que quiero. Todos estos valores los aprendí de ustedes, que son sin duda dos grandes seres humanos, pero para mí son y siempre serán los mejores padres del mundo.

A Mauricio:

Hermano adorado...

Por los fines de semana llenos de risa, que son un respiro de frescura, alegría y espontaneidad. Por tu cariño, y por tu confianza y por esa actitud relajada que contagias. Te quiero mucho.

A mis amigos:

Daniela Rodríguez, Marco Galicia, Alejandro Jiménez, Araceli Chávez, Ángeles Jaramillo, Yaneth Pérez y Enrique Olloqui. Por su apoyo incondicional, por todos los consejos y experiencias compartidas durante esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al **Doctor Alejandro Villa Godoy** por haberme dado la oportunidad de trabajar con él, por los consejos y conocimientos proporcionados en este tiempo.

A la **Doctora Karla Rodríguez Hernández** por todas sus enseñanzas y por haberme ayudado a la realización de mi tesis.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por darme las herramientas necesarias para realizar mis estudios.

Al **CONACYT** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al **Macroproyecto 7.3.2 SDEI-UAIFE-UNAM** y al **PAPIIT-UNAM IN205510**, por los fondos otorgados para la realización de esta investigación.

A los Doctores **Jorge Rosete, René Calderón y a Rubén Santos** por todo su apoyo, paciencia y consejos durante la realización de esta investigación.

A los miembros de mi comité tutorial, los **Doctores Héctor R. Vera Ávila y Carlos G. Gutiérrez Aguilar**.

A los miembros del **jurado** por las aportaciones proporcionadas para enriquecer el contenido de mi tesis.

A la **Doctora Clara Murcia** y a la **Doctora Susana Rojas** por haberme ayudado a cuantificar las concentraciones séricas de las hormonas que se midieron en este trabajo mediante del RIA y ELISA.

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado o Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que esta tesis esté disponible para cualquier intercambio bibliotecario.

Mónica Alamilla Rodríguez

| | |
|--|---------------|
| LISTA DE CONTENIDO | |
| RESUMEN..... | IV |
| ABSTRACT..... | V |
| I.INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1-4 |
| II.REVISIÓN DE LITERATURA | |
| Introducción de la Revisión de Literatura..... | 5-9 |
| Regulación central del proceso de pubertad..... | 9-12 |
| Agentes señalizadores de origen ovárico..... | 12-17 |
| Agentes señalizadores de origen somático..... | 17-27 |
| Kisspeptina..... | 27-32 |
| III.REFERENCIAS..... | 33-63 |
| IV.Respuesta de LH, FSH y GH a una aplicación de Kisspeptina en becerras prepúberes de diferentes edades y su asociación con las concentraciones circulantes de Leptina, IGF-I y estradiol. | |
| INTRODUCCIÓN..... | 64-66 |
| HIPÓTESIS..... | 66 |
| OBJETIVOS..... | 66 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | |
| Sitio | 66 |
| Animales y manejo general..... | 67-68 |
| Muestras y mediciones..... | 68-69 |
| Análisis de laboratorio..... | 69-70 |
| Diseño experimental y análisis estadístico..... | 70-72 |
| RESULTADOS..... | 72-79 |
| DISCUSIÓN..... | 79-98 |
| CONCLUSIONES..... | 88-89 |
| REFERENCIAS..... | 90-103 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Respuesta de LH en becerras de 4, 7 y 11 meses de edad, a una aplicación intravenosa de Kiss-10 (5 µg/kg de peso vivo). Las muestras fueron colectadas cada 15 minutos. Distintas literales indican diferencia entre medias (^{a, b} P<0.0001).

Figura 2. Respuesta de FSH en becerras de 4,7 y 11 meses de edad a una aplicación intravenosa de Kiss-10 (5 µg/kg de peso vivo). Las muestras fueron colectadas cada 15 min. No se detectaron diferencias entre medias (P>0.05).

Figura 3 Perfil de GH en becerras representativas de la respuesta a una aplicación intravenosa de Kiss-10. La becerro Toda respondió durante las 4 horas posteriores a la inyección; la becerro Tardía respondió en las últimas dos horas de muestreo; la becerro Sin Respuesta, no respondió; la becerro Temprana respondió en las dos siguientes a Kiss-10.

Figura 4. Concentración de GH (media ± ee) en suero de becerras de distinta edad durante todo el tiempo de muestreo. Distintas literales indican diferencia entre medias (^{a, b} P<0.0001).

Figura 5. Concentraciones de IGF-I en suero (media ± ee) de becerras prepúberes de diferentes edades. Distintas literales (^{a, b}) indican diferencia entre medias (P<0.05).

Figura 6. Concentraciones de E2 en suero (media \pm ee) de becerras prepúberes de diferentes edades. Distintas literales (^a, ^b) indican diferencia entre medias (P<0.05).

Figura 7. Concentraciones de leptina en suero (media \pm ee) de becerras prepúberes de diferentes edades. Distintas literales (^a, ^b) indican diferencia entre medias (P<0.05).

Cuadro 1

Proporción de becerras prepúberes de distinta edad, que respondieron a una inyección de Kiss-10 (5 μ g/kg de peso vivo), así como el valor máximo (VMAX) y la duración (DUR) de la respuesta de LH.

Cuadro 2

Proporción de becerras prepúberes de distinta edad, que respondieron a una inyección de Kiss-10 (5 μ g/kg de peso vivo), así como el valor máximo (VMAX) y la duración (DUR) de la respuesta de FSH.

Cuadro 3

Proporción de becerras prepúberes de distinta edad que respondieron con un incremento de GH durante la mayor parte del período posterior a la aplicación de Kiss-10 (5 μ g/kg de peso vivo; Todo), durante las últimas dos horas de muestreo (Tardía), en las primeras dos horas de muestreo posterior a la aplicación de Kiss-10 (Temprana), o que no respondieron al tratamiento (Sin respuesta).

Cuadro 4

Proporción de becerras prepúberes de distinta edad, que respondieron a una inyección de Kiss-10 (5 μ g/kg de peso vivo), así como el valor máximo (VMAX) y la duración (DUR) de la respuesta de GH.

Respuesta de LH, FSH y GH a una aplicación de Kisspeptina en becerras prepúberes de diferentes edades y su asociación con las concentraciones circulantes de leptina, IGF-I y estradiol

RESUMEN

El objetivo fue evaluar los efectos de edad de becerras prepúberes en la secreción de LH, FSH y GH en respuesta a una aplicación de Kiss-10 y determinar su asociación con las concentraciones circulantes de IGF-I, leptina y estradiol (E2). Becerras (n=21) de 4, 7 y 11 meses (m) de edad recibieron una inyección intravenosa de Kiss-10 (5 µg/kg de peso). Se colectó sangre de la yugular cada 15 min (4 h pre y 4 h pos Kiss-10); se cuantificó la LH, FSH y GH séricas (RIA). En la primera muestra posKiss-10, se midieron IGF-I (ELISA), leptina y E2 (RIA). Todas las becerras respondieron a Kiss-10 incrementando la concentración sérica de LH, pero el valor máximo (VMAX) y duración (DUR) de la respuesta fueron mayores (P<0.01 ó P<0.05) en las becerras de 11 m (VMAX=11.62±1.3ng/ml; DUR=132.86±20.05min) que en las de 4 m (VMAX=6.10±1.3ng/ml; DUR=64.29±20.05min) y 7 m (VMAX=7.23±1.3 ng/ml; DUR=92.14±20.05min). Para FSH, todas las becerras de 7 y 11 m respondieron a KISS-10, pero en las de 4 m solo hubo respuesta en 71.4% (5/7) (P<0.05). Los valores medios de FSH fueron similares entre edades (P>0.05): VMAX=1.56±0.3ng/ml y DUR=118.7±24.7min. En GH una menor proporción (P<0.09) de animales de 4 m (71.4%; 5/7) y 7 m (85.7%; 6/7) respondió a Kiss-10 en comparación con las de 11 m (100%; 7/7) y no hubo efecto de edad (P>0.05) para VMAX (34.0±7.1ng/ml) y DUR (112.0±27min). No se encontró asociación (P>0.05) entre IGF-I, E2 y leptina con FSH y GH, sin embargo las becerras de 11 m tuvieron las mayores concentraciones de LH, IGF-I y E2 junto con las menores concentraciones de leptina (P<0.05). Se concluye que Kiss-10 evoca una respuesta de LH en becerras prepúberes entre 4 a 11 m, sin embargo, la calidad de la respuesta no es similar entre edades posiblemente asociado a señales como IGF-I, leptina y E2 que a su vez varían con la edad. En contraste, la presentación de respuestas de GH y FSH a Kiss-10 parece depender de reguladores que se expresan conforme se aproxima la pubertad y que una vez establecidos mantienen su influencia, permitiendo una respuesta relativamente uniforme a Kiss-10.

Palabras clave:

Kisspeptina, vaquillas prepúberes, LH, FSH, GH.

Response of LH, FSH and GH to an application of Kisspeptin and its association with circulating leptin, IGF-I and estradiol in prepubertal heifers of different ages

ABSTRACT

Our objectives were to evaluate effects of age on LH, FSH and GH response to a single application of Kiss-10 in prepubertal heifers, as well as the association of those effects with variations in serum IGF-I, leptin and estradiol (E2). Heifer calves (n=21) that were 4, 7 and 11 months (m) old, received an intravenous injection of Kiss-10 (5 µg/kg). LH, FSH and GH were quantified in blood serum taken every 15 min (4 h pre and 4 h postKiss-10). In the first postKiss-10 sample, IGF-I, leptin and E2 were measured. All heifers responded to Kiss-10 with an increment in LH but the response differed among groups since maximum value (VMAX) and duration (DUR) were higher ($P<0.01$) in 11 m (VMAX=11.62±1.3ng/ml; DUR=132.86±20.05 min) than in 4 m (VMAX=7.23±1.3ng/ml; DUR=64.29±20.05 min) and 7 m-old calves (VMAX=5.04±1.3ng/ml; DUR=92.14±20.05 min). For FSH, all animals of 7 and 11 m responded to Kiss-10 but only 71.4% of the 4 m-old responded ($P<0.05$). In GH, a lower proportion ($P<0.09$) of 4 m (71.4%) and 7 m animals (85.7%) responded to Kiss-10 than in 11 m heifers (100%). Variables describing FSH and GH did not differ among groups ($P>0.05$). No significant association was found ($P>0.05$) of IGF-I, E2 or leptin with FSH and GH; however the 11 m-old heifers registered the highest LH, IGF-I and E2 levels but the lowest leptin level ($P<0.05$). Our conclusions are: Kiss-10 evokes LH increments in all 4-11 m heifers but the response magnitude may depend on other agents that change with age; some of those agents may be IGF-I, E2 and/or leptin. In contrast, magnitude of response of FSH and GH to Kiss-10 appears to be modulated by one or more biological agents that vary with age but once they are expressed, Kiss-10 elicits FSH and GH increments whose magnitude is relatively uniform in prepubertal heifers.

Key words:

Kisspeptin, prepubertal heifers, LH, FSH, GH.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El inicio precoz de la pubertad es de especial importancia en la hembra bovina, ya que cuando paren en su segundo año de edad (esto es, que conciban entre los 13 y 14 meses de edad), producen más crías en su vida que cuando paren después del tercer año (Wiltbank et al., 1969). Además, la probabilidad de que una vaquilla quede gestante al inicio de su primer empadre, aumenta cuando ésta ha cursado previamente por varios ciclos estrales (Byerly et al., 1987). Para ello, es necesario que las vaquillas inicien la pubertad al menos de 2 a 3 meses antes de ingresar al primer programa reproductivo. En el trópico de México, la mayoría de las vaquillas, tienen su primer parto entre los 3.4 y 4 años de edad, lo que además de reducir la producción total de crías por vaca, repercute en la productividad de la ganadería (Ríos et al., 1996). Se ha documentado que el intervalo del nacimiento al inicio de la pubertad dura entre 17 y 26.4 meses (Villa-Godoy y Arreguín, 1993) y es la principal causa de la presentación tardía del primer parto en vaquillas del trópico húmedo mexicano.

Evans et al. (1992) observaron que en becerras ocurre un incremento transitorio en la actividad pulsátil de la hormona luteinizante (LH), entre los 3 y 4 meses de edad. Sumado a lo anterior, Madgwick et al. (2005) redujeron en seis semanas la edad al inicio de la pubertad (de 62.8 a 56.8 semanas), mediante la aplicación de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) cada 12 horas, de la semana 4 a la 8 de edad, con lo cual se simuló el incremento transitorio de LH en edades más tempranas (Evans et al., 1992). La frecuencia de secreción de la LH y las concentraciones de E2, aumentan en sangre conforme las vaquillas se aproximan al inicio de la pubertad; los cambios son graduales y dependen del desarrollo del sistema neurosecretor de GnRH y del proceso que lo regula, según la aún aceptada “teoría del gonadostato” propuesta en 1931 por Dohrn y Hohlweg (Terasawa y Fernández, 2001). Por lo tanto, es factible que al provocar incrementos de la secreción de LH en etapas tempranas de la vida de una becerrea, se adelante la pubertad. El aumento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG) característico del inicio de la pubertad, muestra una

amplia variabilidad en los bovinos con relación a la edad y es influenciado por la raza, peso, composición corporal, así como el nivel nutricional, los efectos ambientales asociados con las estaciones del año y el ambiente social (Calderón et al, 1996; Ferrel, 1982; Hall et al., 1995; Meirelles et al., 1991; Velázquez et al., 2000a y 2000b).

Se han desarrollado modelos teóricos para explicar la regulación molecular del eje HHG, basados en datos generados en primates (Roa et al., 2008), roedores (Mead et al., 2007; Roa et al., 2008), ovinos (Arreguín-Arévalo et al., 2007; Whitlock et al., 2008), cerdos (Lents et al., 2008) y en bovinos (Yoshioka et al., 2001), los cuales sitúan a la GnRH como el elemento más importante desde el punto de vista jerárquico. Algunos de los citados autores (Roa et al., 2008; Mead et al., 2007; Arreguín-Arévalo et al., 2007; Whitlock et al., 2008 y Lents et al., 2008) coinciden al considerar a la kisspeptina (Kiss) como la unidad molecular que actúa de manera integradora (activador-interruptor o “switch”) y sobre la cual actúa un gran número de sustancias moduladoras. Los agentes moduladores estimulan o inhiben el tono del citado eje y los autores mencionados, no tienen duda en señalar a la Kiss como el elemento que durante décadas se buscó como intermediario entre las neuronas GnRHérgicas y los efectos positivos o negativos que los estrógenos ejercen sobre la frecuencia de pulsos de la GnRH, y consecuentemente de las gonadotropinas hipofisiarias.

La Kiss fue identificada en 1996 en líneas celulares de melanoma con baja capacidad metastásica (Roa et al., 2008); es un péptido de 54 aminoácidos, que actúa a través del receptor GPR54, activando a una proteína G (Muir et al., 2001). La Kiss es producida principalmente en el hipotálamo, pero también el gen que gobierna su síntesis es expresado en placenta e intestino (Smith, 2008). Así mismo, su receptor es expresado en la placenta, páncreas, médula espinal y diferentes áreas del cerebro, incluidos hipotálamo, ganglio basal, amígdala, sustancia negra e hipocampo.

Muir et al. (2001) mencionan que la Kiss, codifica una serie de péptidos relacionados estructuralmente, que se derivan aparentemente de un proceso proteolítico de un precursor común de 145 aminoácidos, que contiene una

secuencia de 19 aminoácidos de señal, dos posibles sitios de corte dibásico (entre los aminoácidos 57 y 67) y un sitio putativo para la ruptura terminal y amidación (aminoácidos 12 a124). Kotani et al. (2001) señalan que la familia de Kiss, incluye también a fragmentos más cortos de la región C-terminal, como Kiss-14, Kiss-13 y Kiss-10, todas ellas, con una actividad biológica similar.

Los mecanismos potencialmente involucrados en la activación de las neuronas GnRHérgicas en el momento que inicia la pubertad son: aumento del tono de Kiss en determinados núcleos del hipotálamo (Arcuato o ARC y anteroventroperiventricular o AVPV), aumento de la expresión de GPR54, aumento de la capacidad de respuesta a los efectos estimulantes de esta proteína, incremento de la eficiencia de acoplamiento de GPR54 con sus sistemas de señalización, aumento del número de proyecciones entre neuronas Kisspeptidérgicas y GnRHérgicas, al igual que un incremento de la frecuencia de pulsos de GnRH.

En ratas, los incrementos en la concentración sérica de estrógenos, son obligatorios para el aumento preovulatorio de LH (retroalimentación positiva), un fenómeno que implica la activación de neuronas Kisspeptidérgicas en el núcleo AVPV; mientras que las neuronas Kiss en el núcleo ARC regulan la retroalimentación negativa de E2 (Smith et al., 2006). Además de la interacción entre agentes señalizadores de origen ovárico y del sistema nervioso central, algunos tejidos no gonadales ni nerviosos contribuyen con sustancias señalizadoras de la madurez somática. Por ejemplo, la Leptina alcanza máximas concentraciones séricas algunas semanas antes o el día de la primera ovulación, dependiendo de la raza de las becerras (García et al., 2003). De la misma manera, existe una relación entre la hormona del crecimiento ó GH (Simpson et al., 1991), el factor del crecimiento parecido a la insulina tipo 1 ó IGF-I (Jones et al., 1991) y el inicio de la pubertad en hembras bovinas.

Lo anterior parece indicar que el patrón secretor de gonadotropinas característico del inicio de la pubertad se puede establecer con GnRH exógena, si ésta se aplica con la frecuencia adecuada, aún en etapas muy tempranas del crecimiento con relación al momento en que se alcanza la madurez del sistema nervioso central y de los tejidos corporales.

Por lo anterior, se puede pensar que los efectos inhibitorios durante la etapa prepuberal, reducen la liberación de Kiss y consecuentemente de la GnRH, ya que ésta última al ser aplicada en forma exógena, desencadena la liberación de LH y la presentación de la pubertad en becerras; una acción similar a ésta fue observada con Kiss exógena en roedores y primates (Roa y Tena-Sempere, 2007). Navarro et al. (2005 a) encontraron que la administración de Kiss aumenta la concentración de LH en ratas; en otros estudios se encontraron similares resultados, en ratonas (Han et al., 2005), primates (Shahab et al., 2005), cerdas (Lents et al., 2008) y ovejas (Smith, 2008).

Ahora bien, en becerras de 7 meses de edad, se sabe que una aplicación intravenosa de Kiss-10, en dosis de 5µg/kg de peso corporal, evoca un pulso de LH y de GH (Kadokawa et al., 2008); en cambio, en becerras de 5 a 6 meses de edad, la administración de Kiss-10 indujo la liberación de un pulso de LH y de FSH, más no de GH (Ezzat et al., 2009). Por lo tanto, se desconoce si la Kiss-10 puede o no estimular la liberación de LH en becerras prepúberes mayores de 7 ó menores de 5 meses de edad; además, se ignora si la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la GH pueden o no ser alteradas por Kiss exógena en diferentes edades de becerras prepúberes.

El tema central del trabajo que aquí se presenta, se refiere a la respuesta de la Kiss-10 aplicada una sola vez, sobre el aumento en las concentraciones séricas de LH, FSH y GH en becerras prepúberes de distintas edades.

REVISIÓN DE LITERATURA

Introducción de la Revisión de Literatura:

En este capítulo se analizan los conocimientos actuales de los mecanismos neuroendocrinos que están involucrados en la pubertad. Se hace énfasis en el papel que desempeña la Kiss en la activación de los ejes gonadotrópico y somatotrópico, cuyas acciones están íntimamente vinculadas con el inicio de la pubertad. Así mismo, se discuten los efectos de los factores de origen gonadal o somático que regulan la actividad de las neuronas productoras de Kiss, tales como los esteroides ováricos, el IGF-I y la leptina. A lo largo de la revisión, se examinarán prioritariamente los datos generados en rumiantes; no obstante, en algunos casos se utilizarán datos provenientes de otras especies, con el fin de aclarar conceptos.

El inicio de la pubertad en las hembras bovinas se caracteriza por la maduración del eje reproductivo (hipotálamo-hipófisis-ovario), que ocurre de manera gradual y se asocia con cambios en la composición corporal, modificaciones endocrinas tanto en el mismo eje reproductivo (Day y Anderson, 1998), como en el eje somatotrópico (Velázquez et al., 2008). Algunos de los factores que influyen en el inicio de la pubertad de las vaquillas son: el entorno en el que se encuentra el animal, el estado nutricional y la época del año (Schillo et al., 1992). Otros aspectos relacionados con la edad en que se inicia la pubertad, son las variables de desempeño productivo, tales como el peso corporal y las reservas del tejido adiposo, variables que además de ser afectadas por el ambiente, son influenciadas por la genética de los animales (Patterson et al., 1992). A fin de entender estos cambios asociados con el crecimiento del animal y su relación con la maduración del eje reproductivo, hemos interpretado la revisión efectuada a finales de los años noventa por Day y Anderson (1998), quienes usaron como base información proveniente de becerras de razas cárnicas. Dichos autores propusieron que el control endocrino de la pubertad se divide en tres períodos (Figura 1), cuyos nombres fueron modificados ligeramente por nosotros, por considerar la nomenclatura original menos adecuada (dentro del paréntesis se

inserta la clasificación original sugerida por Day y Anderson); dichas etapas son: infantil (prepuberal), prepuberal (peripuberal) y puberal (puberal).

El período infantil tiene una duración variable, dependiendo de la genética del animal y de su alimentación; durante el transcurso de este período, se encuentran los niveles circulantes más bajos de E2 del intervalo que inicia en el nacimiento y finaliza con la pubertad. Sin embargo durante la infancia, el hipotálamo se encuentra en la etapa más sensible a los efectos de retroalimentación negativa ejercidos por E2 y una consecuencia de ello es que los pulsos de GnRH y LH son de baja frecuencia (1.2 a 1.7/24h; Gasser et al., 2006a) y elevada amplitud (5.5ng/ml; Melvin et al., 1999); así mismo el diámetro máximo del folículo dominante no sobrepasa 11.5 mm (Gasser et al., 2006b). Según los últimos autores, las concentraciones promedio de E2 circulante en esta etapa son de 1.6 pg/ml. El período prepuberal comprende el intervalo en el que se produce el incremento de la secreción de LH, como resultado de un aumento en la liberación de la GnRH, y abarca un lapso de aproximadamente 50 días antes de la pubertad (Day et al., 1987). Ha sido establecido en las novillas, que el aumento en la secreción de de GnRH, es el resultado de una disminución de la sensibilidad hipotalámica a la retroalimentación negativa ejercida por el E2, lo que resulta en el aumento de la secreción de LH (Kinder et al., 1995 y Foster et al., 2006); lo que, a su vez, ocasiona un mayor crecimiento de los folículos ováricos dominantes (Bergfeld et al., 1994) y como consecuencia, un aumento de las concentraciones de E2 sistémico. El aumento en E2 induce un incremento de LH que antecede a la primera ovulación. Durante la etapa prepuberal, la frecuencia de pulsos de LH es de 3.5 a 6/24h (Gasser et al., 2006a) y su amplitud es de 4.6 ng/ml, valor significativamente inferior al de la etapa infantil. Así mismo, el diámetro folicular máximo en este período es de 10.5 a 12.8 mm (Gasser et al., 2006b); los mismos investigadores señalan una concentración periférica media de E2 de 2.6 pg/ml, valor que excede al observado en la fase infantil. Ahora bien, en becerras Hereford que se encuentran en el período puberal, aumenta inicialmente la frecuencia de pulsos de 0.28/h (semana 20 prepúber) a 0.5/h (semana 4 prepúber) (Evans et al., 1994), pero posteriormente y siendo ya inminente la primera ovulación, la actividad

pulsátil se detiene para dar cabida a la primera oleada preovulatoria de LH (Evans et al., 1994; Melvin et al., 1999). El diámetro máximo de los folículos ovulatorios no es significativamente mayor que el registrado en la etapa prepuberal (Gasser et al., 2006b) ya que se han documentado valores entre 12.5 y 13.5 mm (Gasser et al., 2006b). La modificación en la capacidad del hipotálamo para superar la inhibición por el E2 debe ocurrir para permitir la secuencia de acontecimientos descrita, que resulta en la primera oleada de la LH (Day y Anderson, 1998). Con relación a la FSH, hay informes contradictorios, ya que Nakada et al. (2000) reportan que en becerras Holstein, tanto la concentración media como el número de pulsos, se mantienen constantes durante los primeros 30 días de edad y los 20 días que preceden a la pubertad; por el contrario, en becerras de genotipos cárnicos, Melvin et al., (1999) declaran un aumento en los valores medios y en el número de pulsos durante las oleadas de desarrollo folicular, conforme se aproxima la pubertad.

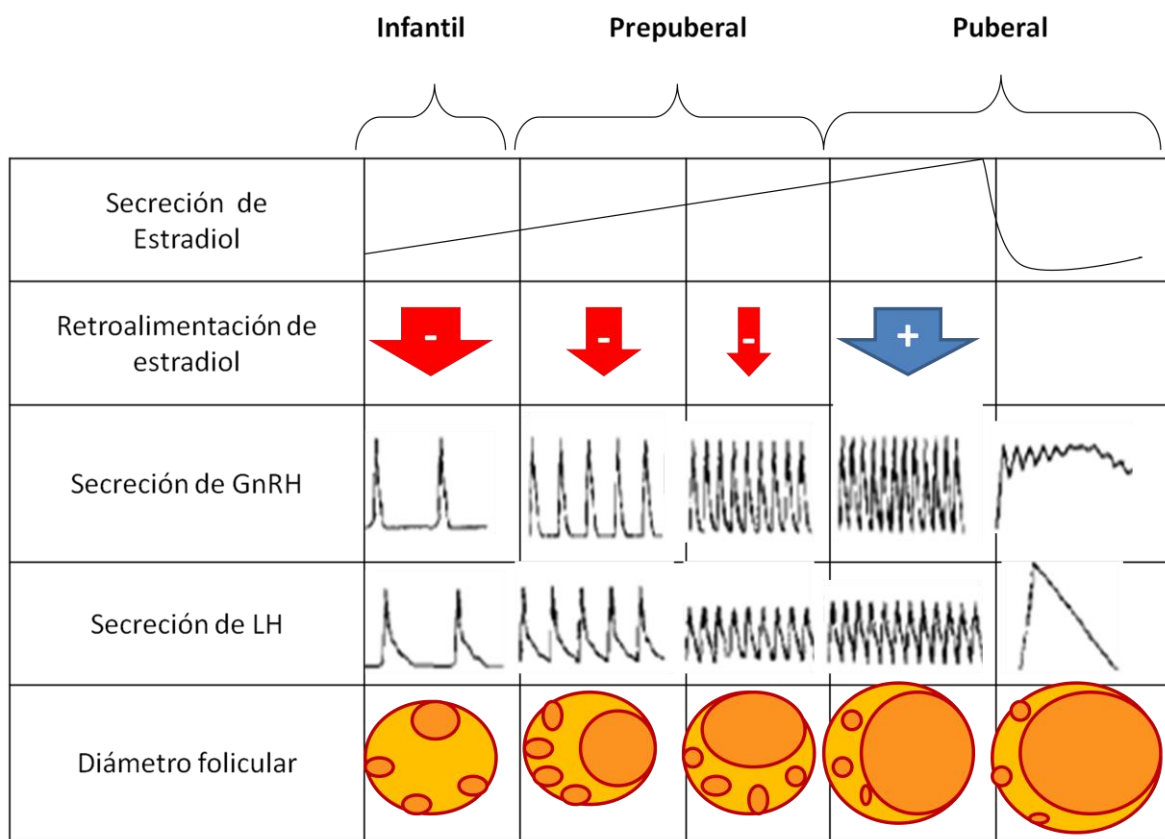


Figura 1. Modelo de cambios fisiológicos responsables del inicio de la pubertad en las becerras. El signo en las flechas indica si la retroalimentación del E2 es negativa (-) o positiva (+) sobre la secreción de LH; la amplitud de las flechas indica el grado relativo de retroalimentación. La secreción de la GnRH es más sensible a la retroalimentación negativa de E2 durante el período infantil que en el prepuberal. Cuando comienza la disminución de la retroalimentación negativa de E2, aumenta la secreción de GnRH y de LH (Esquema tomado de Day y Anderson, 1998)

Desde una perspectiva neurobiológica, el inicio de la pubertad se deriva de la activación concertada entre moduladores de la red neuronal y las células gliales, lo que regula la secreción de GnRH (Roa et al., 2008). Ambos tipos de señalizadores afectan a la red neuronal de GnRH (Ojeda et al., 2008). La estimulación máxima de la GnRH conduce al aumento de la secreción de gonadotropinas hipofisarias (Parent et al., 2003; Ojeda et al., 2010).

En los capítulos siguientes, se discuten en detalle los fenómenos neuroendocrinos que determinan el inicio de la pubertad, con especial énfasis en las señales provenientes de los tejidos gonadales y somáticos que la desencadenan.

Regulación central del proceso de pubertad

Como se mencionó en la introducción de esta sección, en los mamíferos las variaciones en el patrón de liberación de las gonadotropinas hipofisarias son controladas por los cambios en la liberación pulsátil de GnRH. El aumento de la secreción de GnRH en la pubertad, se debe a cambios de acción de los neurotransmisores producidos por diversos grupos neuronales y de varios agentes señalizadores sintetizados en las células gliales que actúan sobre la red de neuronas productoras de GnRH. En una revisión sobre el tema, Terasawa y Fernández (2001) proporcionan evidencias con relación a varios neurotransmisores que modulan, negativa o positivamente, la actividad del eje HHG durante el período prepuberal. Dichos autores proponen que una acción adecuada de ambos grupos de efectores son los que determinan un ambiente neuroendocrino que dirige hacia el inicio de la pubertad. Entre los agentes excitatorios (Ojeda y Terasawa, 2002; Ojeda y Skinner, 2005), se encuentran señalizadores transinápticos como el Glutamato (Glut), la Noradrenalina (NE), la Neurocinina B (NKB) y la Kiss (DeRoux et al., 2003; Seminara et al., 2003). También hay evidencias en apoyo de que la secreción de GnRH no puede ser considerada como un evento impulsado únicamente por las señales transinápticas, sino que también es influenciada positivamente por algunas sustancias liberadas por células gliales, tales como el IGF-I, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante α y β (TGF α y β), y la prostaglandina E2 (PGE2) descritos por Ojeda et al. (2003). En el grupo de agentes señalizadores inhibitorios destacan el ácido gama-amino butírico (GABA), los péptidos opioides o EOP (Terasawa y Fernandez, 2001; Terasawa, 1999) y el péptido relacionado con los RFAmida (RFRP), citado por Ebling y Luckman (2008).

La intervención de múltiples efectores de la actividad GnRHérgica fue reconocida paulatinamente. Al final de los años 90 y principios del presente siglo, se reconoció al Glut como uno de los agentes transinápticos con acción positiva más poderosa, ya que provoca el inicio de la pubertad al aumentar el tono glutamatérgico (Ojeda y Terasawa, 2002). Donoso et al. (1990) y Claypool et al. (2000) establecieron que la activación de las neuronas glutaminérgicas incrementa la secreción de GnRH y acelera la maduración sexual en ratas y monos (Plant et al., 1989; Urbanski y Ojeda, 1990). El Glut actúa tanto de forma directa (Ottem et al., 2002; Gore, 2001) como a través de un subconjunto de reguladores neuronales (Eyigor y Jennes, 2000) para estimular la secreción de GnRH.

La neurotransmisión glutamatérgica es un proceso complejo controlado por un gran número de genes necesarios para la síntesis, transporte, y liberación del mismo aminoácido, así como para la expresión de los receptores que modulan las acciones de Glut. Durante la pubertad ocurren una serie de cambios en la expresión del receptor de Glut y de proteínas vesiculares transportadoras (PVT) del mismo neurotransmisor en determinados subconjuntos celulares del hipotálamo (Brann et al., 1993; Ojeda et al., 2010). Se han generado evidencias indicadoras de que más que los cambios en la síntesis de Glut, las variaciones en la síntesis de los citados receptores y de PVT (tales como Caveolina, Clatrina, Dinamina) son los mecanismos implicados en el inicio de la pubertad, al menos en ratas (Ojeda et al., 2010). Sin embargo existen muchas incógnitas en cuanto a los sistemas que controlan estos genes y por lo mismo, no serán discutidos en este capítulo.

Otro grupo de neuronas, el de las GABAérgicas, proporciona una importante influencia inhibitoria en el control de la secreción de GnRH durante el desarrollo prepuberal (Mitsushima et al., 1994; Parhar et al., 2004). Aunque esta influencia inhibitoria de GABA se ha demostrado de manera inequívoca en primates (Kimura, 1997; Keen et al., 1999), en roedores su papel inhibitorio es menos claro, debido a que se ha informado en ratonas cíclicas tanto efectos inhibidores como estimulantes (Ojeda y Terasawa, 2002); no obstante algunos autores proponen que un desbalance entre el tono glutamatérgico y GABAérgico, puede resultar en

aproximadamente un 20% de las neuronas de GnRH reaccionando a GABA de manera positiva (Moenter y DeFazio, 2005). El GABA regula la secreción de GnRH mediante la unión a receptores localizados tanto en las neuronas de GnRH (DeFazio et al., 2002; Han et al., 2004), como en grupos neuronales que sintetizan neuropéptidos y neurotransmisores diversos (Ojeda y Terasawa, 2002). Como es el caso de Glut, la acción de GABA requiere de la participación de diferentes genes implicados en la síntesis, el metabolismo, el transporte y liberación del GABA; no obstante, de manera similar al Glut, también se ha propuesto que no es un aumento en la expresión del gen regulador de la síntesis de GABA lo que participa en el inicio de la pubertad, sino cambios en la expresión de los genes asociados con un aumento en las neuronas PVT y los receptores del GABA (Ojeda et al., 2010).

Otras neuronas que ejercen un efecto transináptico inhibitorio de la red neuronal de GnRH, es el sistema opiatérgico. Una reducción en la influencia de los péptidos opiáceos endógenos (EOP) sobre la red neuronal de GnRH en el momento de la pubertad, puede no ser tan crítica como la pérdida de control inhibitorio de GABA. Sin embargo, los EOP pueden aportar equilibrio homeostático, en contraposición de los efectos causados por la cascada de eventos que conducen a la estimulación en la producción de GnRH al inicio de la pubertad (Ojeda et al., 2006). En roedores, la liberación de los EOP (Blank, Panerai y Friesen, 1979) disminuye en el momento de la pubertad (Wilkinson y Bhanot, 1982); no obstante los EOP no parecen impedir el inicio de la pubertad (Ojeda y Urbansky, 1994), a pesar de haber sido considerados como uno de los grupos de agentes inhibidores más importantes de los pulsos de GnRH y LH en humanos y primates no humanos adultos (Terasawa y Fernández, 2001).

En aves, se ha documentado de manera convincente, la existencia de la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH; Ebling y Luckman, 2008), cuya función inhibitoria del eje HHG es considerada tan importante como la acción estimuladora de Kiss; sin embargo la GnIH no ha sido identificada en mamíferos. Sin embargo, en éstos, se ha reportado la existencia del péptido relacionado con la familia RFRP (Ebling y Luckman, 2008), que ha sido propuesto como un homólogo de la

GnIH. Otros autores denominan al RFRP como Neuropéptido FF o NPFF (Findeisen et al., 2011). No obstante, no hay evidencias convincentes de sus efectos inhibitorios en mamíferos prepúberes (Ebling, 2005), y su misma identidad es discutida, ya que Ebling y Luckman (2008) consideran al RFRP diferente desde el punto de vista génico al NPFF.

Las células gliales y algunas neuronas de GnRH presentan relación funcional (Silverman et al., 1994). Esta relación depende de los factores de crecimiento que actúan a través de receptores serina-treonina quinasa, como el TGF β 1, y factores de crecimiento que señalizan a través de receptores con actividad de tirosina quinasa, como el IGF-I, el Factor de Crecimiento Básico Fibroblástico (FbGF) y los factores del crecimiento epidérmico (EGF) de la familia del TGF α , y neuroregulinas (NRG_S).

La regulación central del eje HHG depende, como se discutió en los párrafos anteriores, de múltiples señales de origen neuronal y de células gliales cuya integración determina el inicio de la pubertad; sin embargo, para su funcionamiento, requiere también de una pléyade de señales provenientes de los tejidos periféricos. Los principales agentes moduladores de las funciones centrales desencadenantes de la pubertad, provienen de los ovarios: E2 y P4. Sin embargo existen otros señalizadores cuyo origen radica en tejidos no gonadales y que han sido considerados como indicadores de madurez somática; entre ellos destacan el IGF-I y la leptina. En las secciones siguientes, se discute el papel que los agentes de origen gonadal o somático desempeñan en el inicio de la pubertad en las hembras.

Agentes señalizadores de origen ovárico

Estradiol

Ramírez y McCann (1963) identificaron que el inicio de la pubertad está condicionado a la disminución de la retroalimentación negativa del E2, lo cual desencadena los cambios ya señalados en la liberación de GnRH, LH y FSH, así como en el desarrollo folicular, la maduración del folículo dominante, con el correspondiente aumento en la función esteroideogénica y finalmente la ovulación.

Sin embargo, los mecanismos exactos que intervienen en la red neuronal que conducen a la disminución de la retroalimentación negativa del E2 en el hipotálamo, y la desinhibición consecuente de las neuronas de GnRH para iniciar la pubertad, son conocidos de manera fragmentada.

Los receptores de E2 más conocidos son los llamados ER, de los cuales existe abundante información con respecto a sus isoformas ER α y el ER β (Chu et al., 2009), llamados también receptores clásicos (Prossnitz et al., 2008). Éstos fueron identificados en 1973, sobre la base de la actividad de unión específica, en el útero y vagina de la rata (Jensen y DeSombre, 1973). Sin embargo existen otros receptores menos conocidos (receptores no clásicos), como el receptor de membrana asociado a proteína G (GPR30), el receptor putativo de estrógenos asociado a membrana plasmática (ER-X) y el receptor sensible al compuesto difenilacrilamida STX (STX-R; Terasawa y Kenealy, 2012). Los tres citados receptores fueron descubiertos a finales de los años 90 (Prossnitz et al., 2008).

Varios grupos de investigadores (Abraham et al., 2003; Temple et al., 2004; Chu et al., 2009; Cheong et al., 2012; Sun et al., 2010), documentaron que en los mamíferos las neuronas de GnRH no cuentan con ER α y ER β . No obstante, en estudios más recientes efectuados en primates y ratones (Terasawa y Kenealy, 2012), se detectó que en las neuronas de GnRH ocurre un efecto directo de rápida acción excitatoria del E2 el cual ocurre a nivel de sinapsis, a través de sus receptores no clásicos GPR30 (Thomas e

t al., 2010) y STX-R (Qiu et al., 2003). Lo anterior significa que el receptor GPR30 es activado por E2 sintetizado, a través de un proceso de aromatización, en neuronas del hipotálamo y que es liberado a nivel sináptico. En esta vía de transmisión, la neurona postsináptica es la de GnRH. Por su parte los receptores STX-R también han sido identificados en neuronas de GnRH de primates no humanos (Terasawa y Kenealy, 2012) y se asume que son activados por E2 proveniente de las gónadas. Únicamente en primates parece existir este sistema, en el que al menos dos tipos de receptores están implicados en la mediación de la acción rápida del E2 en las neuronas de GnRH (Terasawa y Kenealy, 2012). Mientras que en roedores, únicamente el receptor GPR30 parece ser suficiente

para mediar las acciones rápidas del E2 (Terasawa y Kenealy, 2012). De hecho, aun es controversial su clasificación, ya que algunos autores consideran al GPR30 como un miembro del grupo de receptores ER (Ford et al., 2011), y lo vinculan con el crecimiento longitudinal de los huesos, considerándolo un receptor funcional de estrógenos, cuya deficiencia mantiene el crecimiento longitudinal acelerado por un mayor tiempo en ratones. Otros investigadores vinculan al GPR30 con una serie de funciones en las que puede o no interactuar con los efectos clásicos del E2, ya que se ha observado que aún en células que no expresan ER, se mantiene la acción de E2 mediante la activación de los receptores GPR30 (Prossnitz y Maggiolini, 2009). Cada vez se acumula más información acerca de los receptores que determinan las acciones rápidas del E2; sin embargo hasta el momento no se ha encontrado una función de dichos receptores en el fenómeno la pubertad. No obstante, es factible que células sin expresión de los ER, pudieran ser responsivas al E2 mediante algunos de los receptores de acción rápida antes citados.

En resumen, con respecto al inicio de la pubertad, la mayor parte de la información indica que los efectos clásicos de retroalimentación positiva y negativa de E2 de origen ovárico, son mediados por los ER α , mientras que los ER β intervienen solamente en la retroalimentación positiva de E2 (Antal et al., 2008). No obstante, en la mayoría de hembras mamíferas estudiadas no se ha detectado la expresión de ER α en las neuronas de GnRH. Por el contrario, se han registrado ER α en neuronas que se encuentran en el área AVPV; éstas consisten en una diversidad de linajes neuronales que responden positiva o negativamente a E2 y que sintetizan alguno de los siguientes señalizadores: Glut (Eyigor et al., 2004), GABA (Flügge et al., 1986), NE (Lee et al., 2000), Kiss (Simerly y Swanson, 1987), Dinorfina (Gottsch et al., 2009) y NKB (Goubillon et al., 2000). Los citados agentes actúan directamente, a través de receptores específicos en las neuronas de GnRH (Gu y Simerly, 1997; Simerly, 1998). El AVPV, por lo tanto, desempeña un papel fundamental en la integración y la transmisión de señales hacia las neuronas GnRHérgicas; el AVPV también recibe señales provenientes de neuronas de los núcleos preóptico medial, ARC y posterior de la amígdala. Dichas neuronas expresan receptores de E2 (Simerly, 1998), por tanto el E2 puede actuar

directamente en las neuronas del área AVPV e indirectamente a través de señales transinápticas provenientes de otras neuronas. Ahora bien, existe un consenso entre varios autores en el sentido de que entre los señalizadores mencionados, los principales traductores de las acciones de E2 en el eje hipotálamo-adenohipófisis son GABA (Ottem et al., 2004; DeCavel y Van den Pol, 1990), Glut (Roberts et al., 2006; Christian y Moenter, 2010) y Kiss (Shahab et al., 2005; Irwig et al., 2005).

Se ha registrado en ratas que al momento de la oleada preovulatoria de LH, las vesículas transportadoras de Glut aumentan en el núcleo AVPV, mientras que las vesículas que contienen GABA disminuyen (Ottem et al., 2004). Una vez liberados estos neurotransmisores, llegan a las neuronas de GnRH, donde activan a sus receptores específicos (Ottem et al., 2002). En cuanto a los receptores de Glut, Brann et al. (2008) identificaron dos tipos: el denominado ácido propionico-ionotrópico α -amino-3 hidro-5metil-4isoxazol (AMPA) y el N-metil-D-Aspartato (NMDA).

Los receptores para Glut reciben su nombre, por ser altamente selectivos con relación al secretagogo que los activa, es decir AMPA y NMDA, siendo el primero considerado más importante debido a que la mayoría de las neuronas de GnRH lo expresan, mientras que solo el 20% de ellas expresan NMDA (Spergel et al., 1999).

Con relación a los receptores de GABA en las neuronas de GnRH, se han encontrado dos isoformas: GABA_A y GABA_B. Se sabe con certeza que los receptores GABA_A son activados sinápticamente, mientras que no existen evidencias contundentes con respecto al mecanismo de activación de los receptores GABA_B (Christian y Moenter, 2010); consecuentemente los efectos de E2 en las neuronas de GnRH son atribuibles a la activación del receptor GABA_A. GABA es comúnmente citado como el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (Decavel y Van den Pol, 1990; Liu y Reppert, 2000); sin embargo sus acciones en la red de neuronas de GnRH también pueden ser estimuladoras en hembras prepúberes, aunque este último efecto es controversial (Christian y Moenter, 2010), ya que sus acciones excitatorias en las neuronas

GnRHérgicas solo se presentan en condiciones muy específicas (Roa y Tena-Sempere, 2010).

Aparentemente, y en ausencia de información crítica para entender plenamente las acciones de Glut y GABA, ambos neurotransmisores desempeñan un papel crítico en el inicio de la pubertad, mediando los efectos de retroalimentación positiva y negativa del E2 (Christian y Moenter, 2010), proporcionando un elemento clave en el momento del cambio de sensibilidad del hipotálamo a los efectos de retroalimentación negativa a positiva del E2, particularmente en la emisión de la oleada preovulatoria de GnRH y LH en las hembras que inician la pubertad.

Progesterona (P4)

La P4 es reconocida universalmente como uno de los principales inhibidores de la red neuronal de GnRH (Goodman, 1996), particularmente en modelos de hembras cíclicas. El concepto actual es que la acción de P4 se ejerce indirectamente en las neuronas de GnRH (Popa et al., 2008) y se asume que la acción directa de la P4 en las neuronas de GnRH es poco probable, ya que en la literatura no se ha podido observar la expresión de receptores para P4 en dichas neuronas (Fox et al., 1990; Leranth et al., 1992; Skinner et al., 2001).

Richter et al. (2005) documentaron la existencia de dos receptores de P4 (PR α y PR β) en el cerebro. Más tarde Sleiter et al. (2009) reportaron la presencia de PR α y PR β en el hipotálamo medio basal de cuyos, otros investigadores (Dempsey et al., 1936; Blaustein y Feder, 1980), los describieron específicamente en el núcleo ARC de ratas; mientras que en otros estudios se demostró la expresión de los citados receptores en el POA del núcleo ARC de ovejas (Mani y Oyola, 2012; Dufourny et al., 2005 a, b).

En el núcleo ARC existe una serie de grupos neuronales que responden a P4 y que sintetizan alguno de los siguientes señalizadores: dopamina, Neuropéptido Y (Dufourny et al., 2005a), β -endorfina y dinorfina B (Dufourny et al., 2005b y Lehman et al., 2010). Los citados agentes actúan directamente a través de receptores específicos en las neuronas de GnRH (Roa y Herbison, 2012; Wakabayashi et al., 2012). Por tanto, las evidencias discutidas anteriormente,

indican que las acciones de retroalimentación negativa de la P4 de origen ovárico no se ejercen directamente en las neuronas de GnRH; por el contrario, son mediadas por la activación de los receptores $PR\alpha$ y $PR\beta$ localizados en neuronas del POA, las que a su vez llevan a cabo una acción inhibitoria al promover la liberación de varios neurotransmisores (dopamina, Neuropéptido Y, β -Endorfina y Dinorfina B), que efectúan la inhibición en la liberación de GnRH al actuar directamente en las neuronas que la sintetizan (Skinner et al., 1998). En la literatura científica reciente, existen evidencias sólidas sobre otra vía de acción indirecta que tanto E2 (retroalimentación positiva o negativa; Lehman et al., 2010; Navarro y Tena-Sempere, 2012) como P4 (retroalimentación negativa únicamente; Dufurny et al., 2005 a, b; Lehman et al., 2010) efectúan para inhibir o estimular la liberación de GnRH; dichas acciones, como se discutirá ampliamente en el inciso correspondiente, son ejercidas a través de neuronas que producen Kiss.

Agentes señalizadores de origen somático

Factor de crecimiento parecido a la insulina –I

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) constituyen un sistema complejo de hormonas peptídicas del tipo 1 y 2 (IGF-I e IGF-II, respectivamente), receptores de superficie (receptor de insulina o IR, así como los receptores IGF-RI e IGF-RII) y 6 tipos de proteínas de unión de los IGF (IGF-BP del 1 al 6), las cuales se encuentran circulando en la sangre y en algunos tejidos (Pavelic et al., 2007). A pesar de que las IGF-BP han sido señaladas como elementos importantes en las acciones de los IGF en varios niveles, debido a que se encuentran fuera del alcance del presente trabajo, solo se discutirá su intervención cuando sea indispensable para entender los efectos de los IGF. Ambos IGF son moléculas altamente homólogas, formadas por una sola cadena polipeptídica (70 y 67 residuos de aminoácidos respectivamente para el IGF-I y el IGF-II). Cada IGF proviene de una distinta prepro-hormona, la prepro-IGF-I (130 aminoácidos) y la prepro-IGF-II (180 aminoácidos).

El IGF-I es considerado como una hormona trófica que se encuentra circulando en la sangre en relativamente elevadas concentraciones; la mayor parte del IGF-I circulante proviene del hígado, no obstante la mayoría de los tejidos son capaces de sintetizar el IGF-I y son sensibles a él; particularmente durante las etapas posnatales de crecimiento (Pavelic et al., 2007). La regulación de la síntesis del IGF-I hepático depende principalmente de la acción de la GH y la insulina (Butler y Le Roith, 2001; Le Roith et al., 2001a; Le Roith et al., 2001b). No obstante, existen múltiples factores asociados con la nutrición y las distintas etapas de desarrollo del individuo, que modifican la síntesis de dicha hormona, tanto en hígado como en otros tejidos (Spicer y Echterkamp 1995; Watson et al., 1999; Daftary y Gore, 2005). En contraste, la síntesis del IGF-II es en gran medida independiente de la GH (Spicer et al., 2004) y su expresión es mucho mayor durante la etapa fetal en comparación con la vida posnatal (Constância et al., 2002). Desde el punto de vista funcional, el IGF-II es considerado como un factor regulador de la mitosis en un gran número de tejidos (Spicer et al., 2007); por el contrario, el IGF-I es considerado como uno de los elementos de mayor importancia en el crecimiento somático, la tasa de crecimiento y del tamaño corporal maduro (Roberts et al., 1990). Adicionalmente, varios investigadores han generado evidencias en el sentido de que el IGF-I, ya sea en la fracción sintetizada en tejidos específicos o la que se encuentra circulando en la sangre, desempeña un importante papel en el proceso del crecimiento corporal de los mamíferos (Pagan et al., 2003) y aparentemente en el inicio de la pubertad (Velazquez et al., 2008). Consecuentemente, en lo que resta del presente inciso y de la tesis en general, se discutirá exclusivamente el papel del IGF-I asociado con los fenómenos del crecimiento y la pubertad.

Los efectos biológicos de los IGF en las células blanco, son mediados por los receptores de superficie antes citados, sin embargo mientras el IGF-I se une con alta afinidad al IGF-RI y con un menor grado de afinidad al IR, el IGF-II se une con alta afinidad al IGF-RI y con baja afinidad al IGF-RII, pero posee prácticamente una nula afinidad al IR; por tanto, la mayor parte de las acciones de ambos IGF se ejercen a través del IGF-RI (Pavelic et al., 2007).

En una revisión reciente (Velásquez et al., 2008), los autores abordaron el tema en debate de la relativa importancia de los efectos endocrinos y los para-autocrinos del IGF-I en la reproducción. De acuerdo a las evidencias que dichos investigadores discuten, parece quedar claro que en los roedores es más importante el papel local del IGF-I, a nivel de órganos reproductivos, mientras que en rumiantes es la acción endocrina del IGF-I la que determina en mayor grado los efectos positivos de dicha hormona en la reproducción.

Con relación a la pubertad, se ha generado información que apoya el concepto de que los cambios hormonales determinantes del inicio de la pubertad en rumiantes, discutidos en secciones previas, no ocurren sino hasta que la hembra posee un tamaño corporal adecuado o un estado metabólico que le permita reproducirse exitosamente (Rawlings et al., 2003; Abeygunawardena y Dematawewa, 2004).

La concentración sanguínea del IGF-1 es regulada por múltiples factores, destacando algunos de origen genético como la raza (Roberts, et al., 1990; Jones et al., 1991), el sexo del individuo (Lund-Larsen et al., 1975; Luna et al., 1983) y la condición de haber nacido como cría única, como producto de un parto gemelar o de nacencia múltiple (Holland et al., 1988.); así como un conjunto de factores ambientales, tales como la dieta (Breier, et al., 1986; Breier et al., 1988), la edad al destete (Breier et al., 1988), la tasa de crecimiento (Mandel, et al. 1995), la condición o composición corporal (León et al., 2004) y la época del año en que nace el animal y cursa por los períodos críticos del crecimiento (Schillo et al., 1992).

En el hipotálamo de roedores, de humanos (Carro y Torres-Aleman, 2006) y de bovinos se expresa el receptor IGF-IR (Li et al., 2007). Se ha identificado la presencia y expresión de dichos receptores en la adenohipófisis, el plexo coroideo, el bulbo olfatorio, el núcleo supraquiasmático, la eminencia media y núcleo paraventricular (Lesniak et al., 1988; Bondy et al., 1992; DeKeyser et al., 1994; Navarro y Tena-Sempere, 2012). En dichos núcleos el IGF-IR se localiza en neuronas que sintetizan GABA (Sanchez-Alvarez et al., 2011) y Glut (Zheng y Quirion, 2009). Después de una extensa búsqueda en la literatura científica, no hay información disponible sobre la identificación de receptores para IGF-I en las

neuronas Kiss-1 y KNDy (Kisspeptina/Neurocinina B/dinorfina). Por otro lado, se ha probado de manera satisfactoria la existencia de mecanismos que permiten la translocación del IGF-I de la corriente sanguínea al ambiente intercelular que rodea a las neuronas y células gliales de roedores (Rotwein 1988; Ojeda et al., 2010). Este conjunto de evidencias, le dan credibilidad al concepto de un papel fisiológico del IGF-I sanguíneo en la regulación del eje HHG.

Los niveles de IGF-I en sangre, son determinados por múltiples factores, por ejemplo: se ha informado que la concentración sérica de IGF-I está estrechamente asociada de manera positiva con el peso corporal (Jones et al., 1991; Yelich et al., 1996; Luna-Pinto y Cronje, 2000; García et al., 2002); es decir, de acuerdo con estos investigadores, a mayor tasa de crecimiento y peso, mayor será la concentración sérica del IGF-I. En contraste, García et al. (2003) encontraron que los niveles de IGF-I en vaquillas de carne, disminuyeron durante las 10 semanas que precedieron al inicio de la pubertad. Las discrepancias señaladas podrían deberse a diferencias en el estado metabólico del animal al momento de la toma de muestras, al intervalo y duración del tiempo de muestreo con respecto al inicio de la pubertad, a la raza de los animales bajo estudio, o por diversos aspectos asociados con la alimentación. Se ha determinado que en becerras de razas cárnicas, los niveles sanguíneos de IGF-I son muy variables entre animales, dependiendo de la interacción entre la edad en que se toman las muestras y la raza, ya que los animales de razas precoces para iniciar la pubertad (Angus, Charolais), presentan los valores séricos máximos de IGF-I, aproximadamente dos semanas antes de la primera ovulación; por el contrario las becerras menos precoces (Simmental, Bradford) presentan el pico de IGF-I al momento de la primera ovulación (Jones et al., 1991). Las novillas prepúberes a las que se les restringe el alimento y se les alimenta posteriormente de manera normal, tienen un ritmo de crecimiento superior al de becerras sometidas a una dieta convencional de manera regular, lo que se asocia con un rápido aumento en los niveles de IGF-I durante la fase de crecimiento compensatorio (Granger et al., 1989).

Las vaquillas prepúberes adecuadamente alimentadas, alcanzan la pubertad a una edad más temprana en comparación con los animales de la misma raza

sometidos a una restricción alimenticia (Schillo et al., 1992, Macdonald et al., 2005), fenómeno que se asocia con menores niveles de IGF-I en sangre inducidos por la restricción en la dieta (Yelich et al, 1996, Luna-Pinto y Cronje, 2000). Por otro lado, en novillas sometidas a un ayuno de corto plazo, se redujo la frecuencia de los pulsos de LH y simultáneamente disminuyó la concentración periférica de IGF-I (Yelich et al., 1996, Luna-Pinto y Cronje., 2000). Si bien todas las evidencias señaladas son correlativas y no de relaciones causa-efecto, indican que el IGF-I circulante es un mediador metabólico que participa en el inicio de la pubertad en novillas. Sin embargo evidencias de otra naturaleza refuerzan lo sugerido por los estudios mencionados anteriormente; por ejemplo, la inmunización contra la Hormona Liberadora de la Hormona del Crecimiento (HGRH) antes de la pubertad en vaquillas de carne, provocó una reducción de IGF-I en suero y el retraso de la pubertad, mismo que estuvo vinculado con una reducción en el crecimiento folicular (Simpson et al., 1991). Esto permite sugerir que la disminución de las concentraciones de IGF-I en sangre, podría afectar negativamente la capacidad del ovario para sintetizar E2 y retrasar, o impedir el incremento preovulatorio de dicha hormona, postergando la oleada preovulatoria de LH (Simpson et al., 1991, Schoppee et al., 1996).

En general, esta información proporciona evidencia de un papel del IGF-I circulante como señal de control, la que permite que la pubertad ocurra cuando el crecimiento somático adecuado se ha logrado. De la misma manera, indica que el IGF-I sanguíneo podría participar en el inicio de la pubertad, actuando en diferentes niveles: hipotálamo, adenohipósis y ovario. En el inciso de Kisspeptina se discutirá con más detalle la interacción del IGF-I con las neuronas involucradas en la pubertad citadas con anterioridad.

Leptina

La leptina es una hormona proteica, descrita por primera vez por Zhang et al. (1994) y es sintetizada y secretada principalmente por los adipocitos. La leptina participa en la regulación de la homeostasis y es uno de los más importantes agentes de señalización que indica a los centros neuroendocrinos, el nivel de

crecimiento, la cantidad y el estado funcional del tejido adiposo (Houseknecht et al., 1998; Barb et al., 2002). Spicer et al. (2001) señalan que la leptina capturó la atención de numerosos científicos cuando se descubrieron sus propiedades reguladoras sobre las funciones neuroendocrinas. Posteriormente, Hausman et al. (2012) documentaron que debido a la gran cantidad de péptidos producidos por el tejido adiposo, se propuso el concepto de neuroadipología y se establecieron los vínculos de ésta rama de la ciencia con las funciones de los sistemas neuroendocrino y neuroinmunológico. Específicamente, la leptina desempeña acciones reguladoras en el control del consumo voluntario de alimento (Ingvarsen y Boisclair, 2001), en la hematopoyesis (Houseknecht et al., 1998), en la angiogénesis (Margetic et al., 2002) y en la respuesta inmune (Ingvarsen y Boisclair, 2001). Uno de los papeles más importante que desempeña la leptina, es su intervención en varios niveles del funcionamiento del eje reproductivo en mamíferos (Clarke y Henry, 1999; Spicer et al., 2001; Margetic et al., 2002; Hausman et al., 2012). Además del tejido adiposo, se ha encontrado la expresión de mRNA de leptina en otros tejidos, hallazgos compendiados por Spicer et al. (2001): útero y placenta del humano, en el hipotálamo de rata y en adenohipófisis de rata y ratona. Sin embargo la significancia fisiológica de la leptina sintetizada en dicho tejidos se encuentra lejos de ser entendida. Por el contrario, existe un cúmulo de evidencias en favor de la intervención de la leptina circulante, de origen adiposo, en la reproducción de humanos, cerdos, ovinos, bovinos, rata y ratón (Spicer et al., 2001). Una de esas evidencias es la expresión del receptor para leptina y/o de su mRNA en el hipotálamo (Zieba et al., 2008) y la hipófisis anterior de la cerda (Lin et al., 2001), oveja (Dyer et al., 1997), rata (Zamorano et al., 1997) y ratona (Tartaglia et al., 1995). Por lo tanto, se ha propuesto que la leptina podría actuar en el cerebro y / o hipófisis para participar en la regulación de la secreción de gonadotropinas hipofisarias. Varios autores reconocen la importancia de la leptina en la reproducción de las hembras mamíferas maduras (Clarke y Henry, 1999; Spicer et al., 2001; Margetic et al., 2002; Hausman et al., 2012), pero todos ellos destacan particularmente la intervención de dicha hormona en el inicio de la pubertad. Debido a lo anterior, en los siguientes párrafos, se integra la información

más relevante relacionada con los efectos de la leptina en el inicio de la pubertad, con especial énfasis en las hembras rumiantes.

La síntesis de leptina en el tejido adiposo blanco y su secreción es multirregulada. Entre los factores que determinan los niveles circulantes sistémicos de leptina se encuentran: el género del individuo, la composición corporal, la edad, la especie, la raza y la dieta. Con relación al género, en humanos se ha comprobado que los niños tienen menores concentraciones de leptina que las niñas desde los 5 hasta los 13 años de edad (Spicer et al., 2001); además, mientras en los niños se observan los valores pico de leptina a los 9 años y posteriormente declinan a niveles similares a los registrados cuando tenían 5 años, en las niñas se observa un aumento lineal con los valores más bajos a los 5 años y los más altos a los 13 años de edad. En ambos géneros, la leptina es afectada positivamente por la masa corporal (Spicer et al., 2001). De manera similar, en bovinos adultos se han generado evidencias que indican una mayor concentración de leptina en sangre de hembras que en machos (Hausman et al., 2012). Así mismo, en becerras prepúberes de la raza Japanese Black se encuentran mayores concentraciones de leptina, en comparación con las de los novillos de la misma raza (Tokuda e Yano, 2001).

Se han registrado diferencias en la expresión del receptor de leptina en tejido adiposo dorsal y en el endometrio, atribuibles a la raza de las cerdas tanto maduras (Guay et al., 2001) como prepúberes (González-Añover et al., 2012). En otros estudios se detectaron diferencias atribuibles a la raza tanto de novillos (Nkrumah et al., 2007) como de toros en crecimiento (Thomas y Burguera 2002). Sin embargo en hembras bovinas maduras no se han encontrado diferencias en los niveles circulantes de leptina entre razas cárnicas y lecheras (Delavaud et al., 2002). En lo que se refiere a vaquillas prepúberes, no encontramos estudios disponibles en la literatura relacionados con los efectos de raza en los niveles circulantes de dicha hormona. Por otro lado, se han registrado diferencias entre especies estrechamente emparentadas, mantenidas bajo condiciones similares; por ejemplo, los burros presentan concentraciones séricas mucho más elevadas de leptina que los caballos (Díez et al., 2012). En oposición a la ausencia aparente

del efecto de raza en hembras bovinas, existen múltiples evidencias de que el estado nutricional, indicado por la composición corporal, afecta las concentraciones sanguíneas de leptina. Por ejemplo, en becerras prepúberes se ha informado que las concentraciones circulantes de leptina se correlacionan positivamente con la cantidad de tejido adiposo del animal (Houseknecht et al., 1998). Así mismo, se han generado evidencias (Gillis et al., 2004) que prueban la influencia de la dieta a corto y largo plazos en las concentraciones de leptina circulante. Con relación a esto, Chillard et al. (2005) propusieron a la leptina como un vínculo entre la historia nutricional y la regulación fisiológica del animal, que integra las necesidades del animal tales como las que se presentan durante el ciclo de gestación-lactancia, la disponibilidad predecible de alimentos debido a variaciones estacionales o el potencial de supervivencia ante climas extremos y que depende en parte del nivel de grasa corporal. Lo anterior indica que se necesitan alcanzar concentraciones adecuadas de leptina para que se inicie la pubertad o la actividad reproductiva posparto.

La leptina es considerada como un modulador del inicio de la pubertad, debido a la relación entre ésta y la cantidad de tejido adiposo, condición o composición corporal. En estudios efectuados en ratonas, la administración exógena de leptina acelera la edad en que inician la pubertad (Ahima et al., 1997). También en ratonas, la mutación del gen de leptina (*ob/ob*) o del gen del receptor de leptina (LEPR), generó disfunciones metabólicas como la hiperfagia, obesidad y diabetes, así como desórdenes reproductivos, tales como las concentraciones bajas de LH, desarrollo incompleto de los órganos reproductivos y el fracaso en alcanzar la madurez sexual (Ahima et al., 1997). Por añadidura, el tratamiento con leptina en ratonas *ob/ob* estimuló el desarrollo gonadal, la secreción de gonadotropinas hipofisarias e indujo la pubertad (Chehab et al., 1996).

Williams et al. (2002) efectuaron una extensa revisión en la que discuten información generada en vaquillas peripúberes, en la que se sustenta que la ingestión de energía, la tasa de crecimiento, y la adiposidad están vinculadas con el inicio de la pubertad en dichos animales. En la citada revisión se documenta prolijamente que la restricción moderada de energía de la dieta ocasiona un

retraso en el inicio de la pubertad, debido principalmente al crecimiento retardado que a su vez provoca un retraso en el aumento de la frecuencia de pulsos de LH. El fenómeno descrito, aparentemente es debido a que se prolonga la condición de sensibilidad del hipotálamo a la retroalimentación negativa de estradiol. Además la ingesta de energía alimentaria y el metabolismo ejercen efectos profundos sobre el sistema de comunicación neurohumoral E2-GnRH-LH, tanto antes como después de la maduración sexual. Williams et al. (2002) describen que en antes de la primera ovulación de las vaquillas, el patrón de síntesis y secreción de leptina están relacionados positivamente con el peso corporal y con las concentraciones séricas de IGF-I. En la revisión citada, y en otro trabajo (García et al., 2003), se establece la existencia de dicha relación, ya que se encontró que el peso corporal explica la mayor cantidad de la variación asociada con el tiempo de inicio de la pubertad y, que a su vez se correlaciona fuertemente con la leptina circulante ($r=0.85$). A pesar de la información discutida arriba, se ha demostrado que la leptina exógena no es capaz de promover un aumento en la frecuencia de pulsos de LH en novillas prepúberes alimentadas normalmente, o con una dieta restringida en energía (Zieba et al., 2004), fenómeno que difiere de lo reportado en vacas, las cuales después de un período de ayuno de corta duración, respondieron a la leptina exógena con un incremento de la pulsatilidad de LH (Williams et al., 2002). Por lo tanto existe algún otro agente señalizador requerido para que la leptina ejerza una acción positiva en el eje gonadal, mismo que aparentemente está presente en hembras bovinas maduras y no en las prepúberes. Tanto Zieba et al. (2004) como Williams et al. (2002) proponen que la leptina es una hormona permisiva del inicio de la pubertad.

No se ha observado una relación directa entre las neuronas de GnRH y la leptina (Donato et al., 2011), y la literatura no permite establecer la existencia de un vínculo directo entre ambos efectores. Por ejemplo, las neuronas de GnRH no expresan LEPR. Ahora bien, en una revisión realizada por Smith et al. (2002), se indica que el receptor de leptina es un miembro de la familia de receptores de citoquinas de clase I. Existen en al menos seis isoformas que surgen de las variantes del empalme de ARNm, entre las que incluye una forma larga (Ob-Rb)

de 303 aminoácidos y varias formas cortas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y OB-Rf) con longitudes variables del dominio citoplásmico, que van de 31 a 42 aminoácidos (Bjørnbæk et al., 1997); otra isoforma es la OB-Re, la cual carece tanto del dominio transmembranal como citoplásmico, es soluble y sirve como una proteína de unión a la leptina circulante (Lahlou et al., 2000). El Ob-Rb es el receptor predominante expresado en el cerebro, particularmente en el hipotálamo de rata y ratona (Elmqvist et al., 1998; Mercer et al., 1996), y el Ob-Ra se encuentra principalmente en los tejidos periféricos tales como el hígado, páncreas, gónadas y músculo esquelético (Smith et al., 2002). Sin embargo, el receptor Ob-Ra está presente en el plexo coroideo (Lynn et al., 1996) y los capilares neurales (Golden et al., 1997), participando en el transporte de leptina en la sangre y el líquido cefalorraquídeo, y a través de la barrera hematoencefálica.

Las múltiples formas de receptor de la leptina y su distribución fuera del sistema nervioso central, permiten sugerir que el papel de la leptina se extiende más allá de su función como factor de saciedad. Además de regular el apetito y la ingesta de energía, la leptina afecta a varios mecanismos metabólicos y neuroendocrinos relacionados con la partición del gasto energético (Smith et al., 2002). La distribución de la isoforma OB-Rb en los núcleos del hipotálamo varía entre especies: en ovejas se ha encontrado abundantemente en los núcleos ventromedial y ARC (Zieba et al., 2008); en ratonas en los núcleos ventromedial, periventricular, ventral premamilar y ARC. En cerdas se encuentra en el área preóptica (POA) y en los núcleos ARC, supraóptico y paraventricular (Czaja et al., 2002). Además, dicha isoforma del receptor de leptina, se expresa en la hipófisis anterior de cerdas (Lin et al., 2001), de ovejas (Dyer et al., 1997), de ratas (Zamorano et al., 1997) y de ratonas (Tartaglia et al., 1995). Por lo tanto, la leptina podría actuar en el hipotálamo y / o la hipófisis anterior para regular la secreción de gonadotropinas.

Ebling (2005) discute evidencias sobre neurotransmisores, tales como el neuropeptido Y (NPY), la proopiomelanocortina (POMC) y el GABA quienes actúan como mediadores de la acción de la leptina en la liberación de GnRH. Dichas observaciones han sido verificadas por otros autores (Cunningham et al.,

1999; Iqbal et al., 2001; Williams et al., 2002; Sullivan y Meonter, 2004). Recientemente, Roa y Tena-Sempere (2010) y Lehman et al. (2010), generaron y discutieron evidencias producidas a través de varios estudios con relación al papel de la leptina en la liberación de LH, FSH y GH en animales prepúberes; dichos investigadores proponen que los efectos de la leptina en los ejes gonadotrópico y somatotrópico son ejercidos de manera indirecta a través de la Kiss.

LaPaglia et al. (1998) han proporcionado evidencia en ratas, de que la leptina actúa como un neuromodulador en la liberación de la GH, mediante la relación de este sistema hormonal con el estado nutricional del animal. A su vez, Houseknecht et al. (2000) indicaron que en vacas, la GH puede regular la expresión de gen de la leptina en el tejido adiposo tanto *in vivo* como *in vitro*, y que los mecanismos parecen ser independientes de la masa de tejido adiposo.

En resumen, se han generado evidencias del papel de la leptina en la liberación de LH, FSH y GH en animales prepúberes; sin embargo esos efectos parecen ser efectuados de manera indirecta a través de la Kiss, aspecto que será discutido con más detalle en el siguiente capítulo.

Kisspeptina

La Kiss fue identificada en 1996 en líneas celulares de melanoma con baja capacidad metastásica (Roa et al., 2008). La Kiss se describió como un péptido de 54 aminoácidos, que actúa a través del receptor GPR54, activando a una proteína G (Muir et al., 2001). Se encontró que la Kiss es producida en el hipotálamo, placenta e intestino y su receptor es expresado en la placenta, páncreas, médula espinal y diferentes áreas del cerebro, incluidos hipotálamo, ganglio basal, amígdala, sustancia negra e hipocampo (Smith, 2008). La Kiss también es llamada por algunos autores metastina por su capacidad para inhibir la metástasis de células de melanoma *in vivo* (Ohtaki et al. 2001). Muir et al. (2001) afirman que la Kiss es una familia que comprende una serie de péptidos relacionados estructuralmente, que se derivan aparentemente de un proceso proteolítico, a partir de un precursor común de 145 aminoácidos, que contiene una secuencia de 19 aminoácidos de señal, dos posibles sitios de corte dibásico (entre los

aminoácidos 57 y 67) y un sitio putativo para la ruptura terminal y amidación (aminoácidos 12 a124). Kotani et al. (2001) señalan que la familia de Kiss, incluye también a fragmentos más cortos de la región C-terminal de la molécula de metastina, como kisspeptina-14, kisspeptina-13 y kisspeptina-10, todas ellas, con una actividad biológica similar.

Las neuronas de Kiss se encuentran en discretos subgrupos neuronales de la POA (Gottsch et al. 2004) y el ARC (Shahab et al. 2005, Gottsch et al. 2004). Los receptores de Kiss se expresan en las neuronas de GnRH (Parhar, et al., 2004) y en la adenohipófisis (Muir et al. 2001, Kotani et al. 2001). Esta distribución sugiere que las neuronas de Kiss no sólo inducen la secreción de GnRH actuando en las neuronas GnRHérgicas, sino que también tienen la capacidad de estimular directamente la secreción de gonadotropinas (Navarro et al. 2005a), mediante la liberación de Kiss en el sistema portal hipotálamo-hipófisis. Tanto las neuronas que expresan Kiss, como su receptor aumentan en el hipotálamo de primates no humanos en el momento de la pubertad, lo que permitió generar el concepto de que la Kiss contribuye a la activación de la secreción de GnRH en dicha condición fisiológica (Shahab et al., 2005).

Los mecanismos potencialmente involucrados en la activación de las neuronas GnRHérgicas en el momento que inicia la pubertad son: aumento del tono de las neuronas Kiss en determinados núcleos del hipotálamo (ARC y AVPV), aumento de la expresión de GPR54, aumento de la capacidad de respuesta a los efectos estimulantes de esta proteína, incremento de la eficiencia de acoplamiento de GPR54 con sus sistemas de señalización, aumento del número de proyecciones entre neuronas Kisspeptidérgicas y GnRHérgicas, aumento de las frecuencias de pulsos de GnRH y con ello, la secreción pulsátil de LH y FSH, así como de la función gonadal (Castellano,et al., 2006).

Existen pruebas convincentes obtenidas en ratas (Navarro et al., 2005b), ratonas (Tena-Sempere, 2007), primates no humanos (Roa y Tena-Sempere 2007), cerdas (Lents et al., 2008) y ovejas (Smith 2008), que han demostrado un papel estimulante de la Kiss en el control neuroendocrino de la pubertad y las funciones reproductivas en general (Roa et al., 2008; Oakley et al., 2009; Lehman et al.,

2010). Los resultados de la administración intracerebro-ventricular de Kiss para adelantar la pubertad en ratas (Navarro et al., 2004, 2005b) apoya este concepto. Roa y Tena-Sempere. (2007), Arreguín-Arévalo et al. (2007) y Lents et al. (2008) en roedores, ovinos y cerdos respectivamente, coinciden al considerar a la Kiss como la unidad molecular que actúa de manera integradora (activador-interruptor o “switch”), y sobre cuyas neuronas actúa un gran número de sustancias moduladoras que estimulan o inhiben el tono del eje HHG. Los autores mencionados, no tienen duda en señalar a la Kiss como el elemento que durante décadas se buscó como intermediario entre las neuronas GnRHérgicas y los efectos positivos o negativos que los estrógenos ejercen sobre la frecuencia de pulsos de la GnRH y de las gonadotropinas hipofisarias.

Aparentemente, la acción estimulante principal de la Kiss se lleva a cabo mediante la activación de las neuronas de GnRH, a través de contactos sinápticos directos entre neuronas productoras de Kiss y de GnRH (Figura 2). Además existen evidencias de la participación de señales directas recibidas por las neuronas productoras de GnRH, que son emitidas por otras neuronas (GABA, EOP, GnIH NPY, β -Endor, Glut, NKDy, KISS1) o células gliales (IGF-I, FGF, TGF α , β y PGE $_2$), que pueden actuar como agentes reguladores (activadores o inhibidores) en la secreción de GnRH (Figura 2). Además existen mensajeros indirectos (E2, P4 y Leptina) que son recibidos por las neuronas KISS1 y KNDy, para que se lleve a cabo la producción de Kiss (Figuras 2).

Las neuronas productoras de Kiss son amplificadores estrógeno-dependientes de la neurosecreción de GnRH en el momento de la pubertad, en lugar de disparadores primarios.

Se ha observado que existen dos tipos de neuronas productoras de Kisspeptina (Navarro y Tena-Sempere., 2012): las neuronas NKDy que se encuentran en el ARC de ratas (Burke et al., 2006), ratonas (Navarro et al., 2009), ovejas (Goodman et al., 2007) y cabras (Wakabayashi et al., 2010); mientras que otro grupo de neuronas denominadas KISS1, están en el núcleo AVPV de roedores (Clarkson et al., 2009) y humanos (Lehman et al., 2010). Las primeras son responsables de la liberación pulsátil de LH y las segundas determinan la

liberación de LH en forma de oleada, además de participar en su liberación pulsátil (Figura 3). Mientras las neuronas Kiss-1 secretan únicamente Kiss, las neuronas NKDy secretan Kiss, Neurocinina B y Dinorfina A (Navarro y Tena-Sempere 2012). Las neuronas KNDy tienen altas cantidades de receptores de esteroides gonadales, especialmente E2 y P4 (Lehman, 2010). Los incrementos en la concentración sérica de estrógenos, son obligatorios para el aumento preovulatorio de LH (retroalimentación positiva), un fenómeno que implica la activación de neuronas Kisspeptidérgicas en el núcleo AVPV, mientras que el núcleo ARC regula la retroalimentación negativa de E2, inhibiendo la liberación tónica de LH (Smith et al., 2006). Por el contrario, la P4 no tiene efecto sobre las neuronas Kiss1 de ovejas, ratas y ratones (Lehman et al., 2010). Es decir, mientras que las neuronas KNDy poseen receptores para E2 y P4, las Kiss-1 solo expresan receptores para E2.

Una vez que el E2 se une a sus receptores en las neuronas KNDy, evoca la liberación de los péptidos NKB y Dinorfina A, los cuales actúan en las neuronas que lo secretan y en neuronas cercanas de la misma estirpe (acciones auto y para-crina); el primero estimulando y el segundo inhibiendo la liberación de Kiss. Por tanto las neuronas NKDy representan un sistema autocontenido en el que la NKB y la Dinorfina A afinan la liberación de Kiss en forma de pulsátil. Por otro lado, se han reportado terminaciones nerviosas que contienen NKB circundando las neuronas Kiss-1, por lo que NKB parece participar como estimulante de las neuronas Kiss1. Posteriormente se inicia el proceso de secreción de Kiss y de la regulación de sus patrones de liberación en forma de pulsos. Al mismo tiempo, la NKB induce la liberación de Dinorfina, cuya acción es la de inhibir la liberación de NKB y de Kiss. Una vez que se termina la secreción de NKB se detiene también la liberación de Dinorfina y por lo tanto su acción inhibitoria (Navarro, 2012).

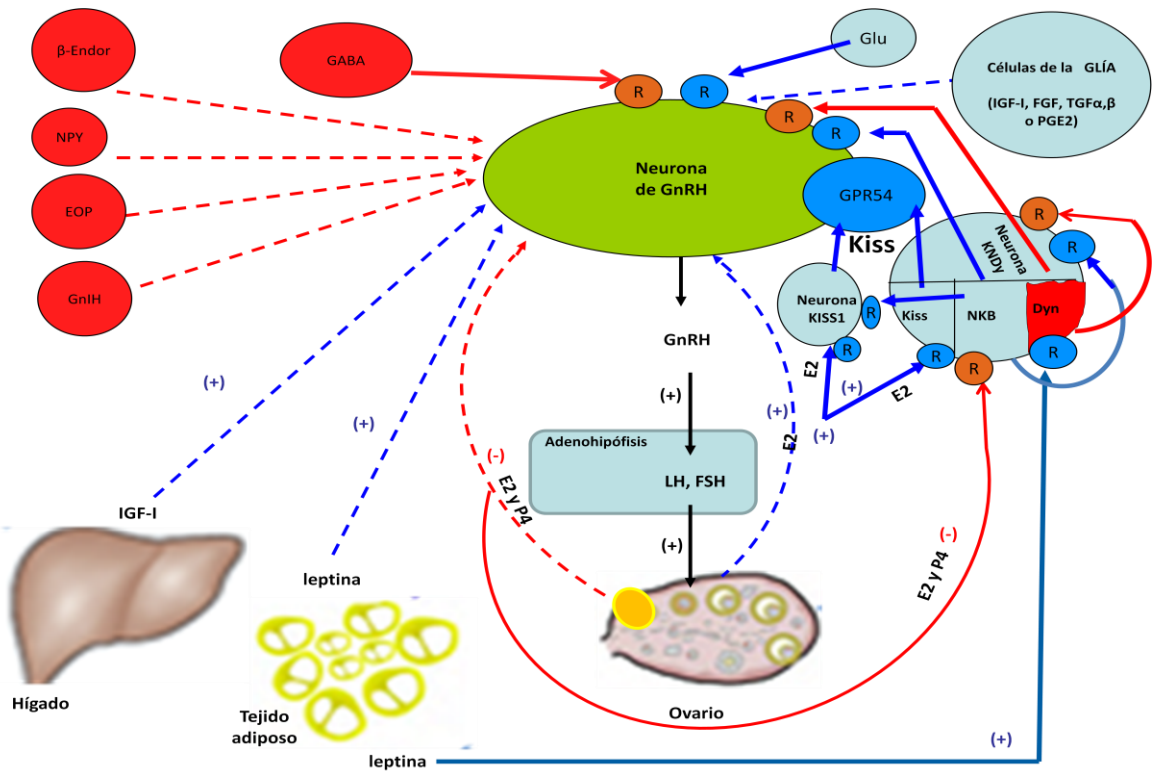


Figura 3. Mecanismos básicos neuroendocrinos implicados en el inicio de la pubertad. Las neuronas GnRH reciben señales de otras neuronas, tanto inhibitorias (círculo rojo) como excitatorias (círculo azul). Estas secretan agentes que estimulan o inhiben la secreción GnRH, algunos de estos agentes cuentan con receptores en las Neuronas de GnRH, lo cual no denota necesariamente co-expresión de dichas moléculas en un mismo cuerpo celular. Varias de estas señales actúan en forma directa (línea continua), mientras que otras actúan en forma indirecta (línea punteada). Estos circuitos centrales son modulados por señales periféricas, tales como los esteroides gonadales (E2 y P4) y las señales metabólicas (leptina e IGF-I), de manera positiva (+) o negativa (-). Algunas señales inhibitorias son el ácido gama aminobutírico (GABA), los péptidos opiáceos endógenos (EOP), la hormona inhibitoria de gonadotropinas (GnIH) el neuropéptido Y (NPY) y la β -Endorfina (β -Endor). Algunas de las señales excitatorias son la kisspeptina, proveniente de las neuronas KISS1, señales provenientes de las células de la Glia (IGF-I, FGF, TGF α , β y PGE $_2$) y el glutamato (Glu). Otras neuronas tienen ambas funciones como las NK1 que secretan moduladores que actúan de forma positiva (Neuroquinina y Kisspeptina), pero coexpresan un regulador negativo (Dinorfina). Esquema elaborado con base en: Roa y Tena-Sempere, 2010 y Lehman et al., 2010.

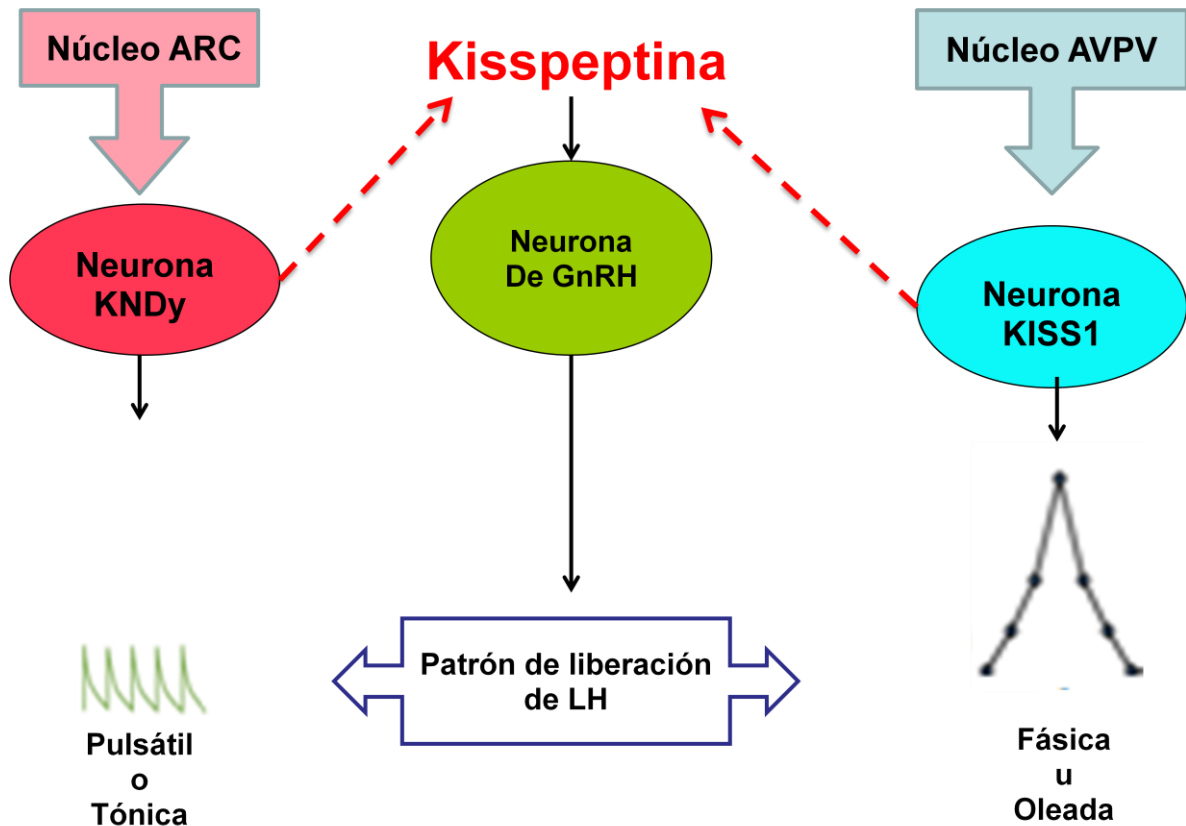


Figura 3. Existen dos tipos de neuronas productoras de Kisspeptina: Las neuronas NKDY que se encuentran en el núcleo Arcuato (ARC) y las neuronas KISS1 en el núcleo anteroventralperipentricular (AVPV). Las NKDY son responsables de la liberación pulsátil de LH y las KISS1 de la liberación en forma de oleada de LH, pero también contribuyen con su liberación pulsátil (Esquema elaborado a partir de: Roa y Tena-Sempere, 2010 y Navarro y Tena-Sempere 2012).

Ahora bien, en beceras de 7 meses de edad, se sabe que una aplicación intravenosa de Kiss-10 en dosis de $5\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal evoca un pulso de LH y de GH (Kadokawa et al., 2008); en cambio, en beceras de 5 meses de edad, la administración de Kiss-10 indujo la liberación de un pulso de LH y de FSH, más no de GH (Ezzat et al., 2009). Por lo tanto, se desconoce si la Kiss-10 puede o no estimular la liberación de LH en beceras prepúberes mayores de 7 ó menores de 5 meses de edad. Además, se ignora si la liberación de FSH y GH pueden o no ser alteradas por Kiss exógena en diferentes edades de beceras prepúberes.

REFERENCIAS DE LA REVISIÓN DE LITERATURA:

1. Abeygunawardena, H., Dematawewa, C. M. B. 2004. Pre-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. *Anim Reprod Sci* 82, 373-387.
2. Ábrahám, I.M., Han, S.K., Todman, M.G., Korach, K.S., Herbison, A.E. 2003. Estrogen receptor β mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J. Neurosci.* 23, 5771-5777.
3. Ahima, R.S., Dushay, J., Flier, S.N., Prabakaran, D., Flier, J.S. 1997. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *The Journal of Clinical Investigation.* 99, 391–395.
4. Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., Mark, M. 2008. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ER β -null mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 2433–2438.
5. Arreguin-Arevalo, J.A., Lents, C.A., Farmerie, T.A., Nett, T.M., Clay, C.M., 2007. Kiss-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci.* 101, 265–275.
6. Barb, C. R., G. J. Hausman, and K. L. Houseknecht. 2002. Biology of leptin in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 21, 297–317.
7. Bergfeld, E.G.M., Kojima F.N., Cupp, A.S., Wehrman, M.E., Peters, K.E., Garcia-Winder, M., Kinder, J.E. 1994. Ovarian follicular development in

- prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. *Biol. Reprod.* 51,1051–1057.
8. Bjørbæk, C., Uotani, S., Da Silva B., a. Flier J.S. 1997. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 32686–32695.
 9. Blank, M.S., Panerai, A.E., Friesen, H.G. 1979. Opioid peptides modulate LH secretion during sexual maturation. *Science* 203,1129-1131.
 10. Blaustein, J.D., Feder, H.H. 1980. Nuclear progesterin receptors in guinea pig brain measured by an in vitro exchange assay after hormonal treatments that affect lordosis. *Endocrinology.* 106, 1061-1069.
 11. Bondy, C.A., Werner, H., Roberts, C.T., Jr, LeRoith, D.1992. The cellular pattern of type-I IGF receptor gene expression during the maturation of the rat brain: comparison with IGF-I and IGF-II. *Neuroscience.* 46, 909-923.
 12. Brann, D.W., Zamorano, P.L., Ping, L., Mahesh, V.B., 1993. Role of excitatory amino acid neurotransmission during puberty in the female rat. *Mol Cell Neurosci* 4,107–112.
 13. Brann, D. W., Zamorano, P. L., Chorich, L. P., Mahesh, V. B. 2008. Steroid hormone effects on NMDA receptor binding and NMDA receptor mRNA levels in the hypothalamus and cerebral cortex of the adult rat. *Neuroendocrinology*, 58, 666-672.
 14. Breier, G., Bucan, M., Francke, U., Colberg-Poley, A. M., Gruss, P. 1986. *EMBO J.*, 5, 2209-2215.

15. Breier, B.H., Gluckman, P.D., Bass, J.J. 1988. Plasma concentrations of insulin-like growth factor-1 and insulin in the infant calf: ontogeny and influence of altered nutrition. *J Endocrinol.* 119, 43-50,
16. Butler, A.A., Le Roith, D. 2001. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol.* 63, 141–64.
17. Burke, M.C., Letts, P.A., Krajewski, S.J., Rance, N.E. 2006. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol.* 498, 712–726.
18. Carro, E., Torres-Aleman, I. 2006. Serum insulin-like growth factor in brain function. *Keio J Med.* 55, 59–63.
19. Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Roa, J., Vig, E., Pineda, R., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2006. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes.* 55, 2602-2610.
20. Chehab, F.F., Lim, M.E., Lu, R. 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics.* 12,318-320.
21. Cheong, R. Y. 2012. Effects of estradiol on gonadotropin-releasing hormone neurons (Doctoral dissertation, University of Otago).

22. Chilliard, Y., Delavaud, C., Bonnet, M. 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol.* 29,3-22.
23. Christian, C.A., Moenter, S.M. 2010. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev.* 31, 544-77.
24. Chu, Z., Andrade, J., Shupnik, M.A., Moenter, S.M. 2009. Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied E2: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *J Neurosci.* 29, 5616-27.
25. Clarke, I.J., Henry, B.A. 1999. Leptin and reproduction. *Rev Reprod.* 4,48-55.
26. Clarkson, J., Boon, W.C., Simpson, R.E., Herbison, E.A., 2009. Postnatal Development of an Estradiol-Kisspeptin Positive Feedback Mechanism Implicated in Puberty Onset. *Endocrinol.* 150, 3214–3220
27. Claypool, L.E., Kasuya, E., Saitoh, Y., Marzban, F., Terasawa, E. 2000. N-methyl d,l-aspartate induces the release of luteinizing hormone-releasing hormone in the prepubertal and pubertal female rhesus monkey as measured by in vivo push-pull perfusion in the stalk-median eminence. *Endocrinology.* 141, 219–228.
28. Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W. 2002:

Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 417, 945-948.

29. Cunningham, M.J., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biology of Reproduction*. 60, 216-222.
30. Czaja, K., Lakomy, M., Sienkiewicz, W., Kaleczyc, J., Pidsudko, Z., Barb, C.R. 2002. Distribution of neurons containing leptin receptors in the hypothalamus of the pig. *Biochem Biophys Res Commun*. 298, 333–7.
31. Daftary, S.S., Gore, A.C. 2005. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med*. 230, 292–306.
32. Day, M.L., Anderson, L.H. 1998. Current concepts on the control of puberty in cattle. *Journal of Animal Science*. 76, 1-15.
33. Day, M.L., Imakawa, K., Wolfe, P.L., Kittok, R.J., Kinder, J.E. 1987. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary E2 receptors in the negative feedback of E2 on luteinizing hormone secretion. *Biology of Reproduction*. 37, 1054-1065.
34. DeCavel, C., Van den Pol, A.N. 1990. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 302, 1019–1037.
35. DeFazio, R.A., Heger, S., Ojeda, S.R., Moenter, S.M. 2002. Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*. 16, 2872-2891.

36. DeKeyser, J., Wilczak, N., De Backer, J. P., Herroelen, L., Vauquelin, G. 1994. Insulin-like growth factor-I receptors in human brain and pituitary gland: An autoradiographic study. *Synapse*, 17, 196-202.
37. Delavaud, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bocquier, F., Kann, G., Chilliard, Y. 2002. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J Anim Sci.* 80, 1317-28.
38. Dempsey, E.W., Hertz, R., Young, W.C. 1936. The experimental induction of oestrus (sexual receptivity) in the normal and ovariectomized guinea pig. *Am.J.Physiol.* 116, 201-209.
39. DeRoux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci.* 100, 10972–10976.
40. Díez, E., López, I., Pérez, C., Pineda, C., Aguilera-Tejero, E. 2012. Plasma leptin concentration in donkeys. *Vet Q.* 32, 13-6.
41. Donato, J.Jr., Cravo, R.M., Frazao, R., Elias, C.F. 2011. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology.* 93,9-18.
42. Donoso, A.O., López, F.J., Negro-Vilar, A. 1990. Glutamate receptors of the non- N-methyl-d-aspartic acid type mediate the increase in luteinizing hormone releasing hormone release by excitatory amino acid in vitro. *Endocrinology* 126,414-420.

43. Dufourny L, Caraty A, Clarke IJ, Robinson JE, Skinner DC. 2005a. Progesterone-receptive dopaminergic and neuropeptide Y neurons project from the arcuate nucleus to gonadotropin-releasing hormone-rich regions of the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology*. 82, 21-31
44. Dufourny, L., Caraty, A., Clarke, I.J., Robinson, J.E., Skinner, D.C. 2005b. Progesterone-receptive beta-endorphin and dynorphin B neurons in the arcuate nucleus project to regions of high gonadotropin-releasing hormone neuron density in the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology*. 81,139-49.
45. Dyer, C.J., Simmons, J.M., Matteri, R.L., Keisler, D.H. 1997. Effects of an intravenous injection of NPY on leptin and NPY-Y1 receptor mRNA expression in ovine adipose tissue. *Endocrinol*. 14, 325-33.
46. Ebling, F.J. 2005. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction*. 129, 675-683.
47. Ebling, F.J., Luckman, S.M. 2008. RFamide-related peptide: another sexy peptide? *Endocrinology*. 149, 899-901.
48. Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., Saper, C.B. 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*. 395, 535-547.
49. Eyigor, O., Jennes, L. 2000. Kainate receptor subunit-positive gonadotropin-releasing hormone neurons express c-Fos during the steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology* 141, 779-786.

50. Eyigor, O., Lin, W., Jennes, L. 2004. Identification of Neurones in the Female Rat Hypothalamus That Express Oestrogen Receptor-Alpha and Vesicular Glutamate Transporter-2. *J Neuroendocrinol.*, 16, 26-31.
51. Evans, A.C., Adams, G.P., Rawlings, N.C. 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Fertil.* 102, 463-70.
52. Ezzat, A.A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Yamashita, T., Hirata, T.I., Sawai, K., Hashizume, T. 2009. Characteristics of the stimulatory effect of Kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *Reprod. Dev.* 55, 650–654.
53. Flügge, G., Wuttke, W., Fuchs, E. 1986. Postnatal development of transmitter systems: sexual differentiation of the GABAergic system and effects of muscimol. *Int J Dev Neurosci*, 4, 319-326.
54. Findeisen, M., Rathmann, D., Beck-Sickinger, A.G. 2011. RFamide peptides: structure, function, mechanisms and pharmaceutical potential. *Pharmaceuticals*. 4, 1248-1280.
55. Ford, J.J., Hajibeigi, A., Oz, O.K. 2011. Emerging Role of GPR30/GPER1 in Skeletal Metabolism. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem.* 11, 275-281.
56. Foster D.L., Jackson L.M., Padmanabhan V. (2006) Programming of GnRH feedback controls timing puberty and adult activity. *Molecular and Cell Endocrinology.* 254-255: 109 – 119.

57. Fox, S.R., Harlan, R.E., Shivers, B.D., Pfaff, D.W. 1990. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology*. 51, 276–83
58. García, M.R., Amstalden, M., Williams, S.W., Stanko, R.L., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Nizielski, S.E., Williams, G.L., 2002. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J Anim Sci*. 80, 2158-67.
59. Garcia, M.R., Amstalden, M., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Williams, G.L., 2003. Age at puberty, total fat and conjugated linoleic acid content of carcass, and at four circulating metabolic hormones in beef heifers fed a diet high in linoleic acid beginning months of age. *J Anim Sci*. 81, 261-268.
60. Gasser, C.L., Grum, D.E., Mussard, M.L., Fluharty, F.L., Kinder, J.E., Day, M.L. 2006a. Induction of precocious puberty in heifers I: enhanced secretion of Luteinizing Hormone. *J Anim Sci*. 84, 2035-2041.
61. Gasser, C.L., Burke, C.R., Mussard, M.L., Behlke, E.J., Grum, D.E., Kinder, J.E., Day, M.L. 2006b. Induction of precocious puberty in heifers II: Advanced ovarian follicular development. *J Anim Sci*. 84, 2042 – 2049.
62. Gillis, M. H., Duckett, S. K., Sackmann, J. R., Realini, C. E., Keisler, D.H., Pringle, T.D. 2004. Effects of supplemental rumen-protected conjugated linoleic acid or linoleic acid on feedlot performance, carcass quality, and leptin concentrations in beef cattle. 82:851-859. *J Anim Sci*. 82, 851-859.

63. Goodman, R.L. 1996. Neural systems mediating the negative feedback actions of estradiol and progesterone in the ewe. *Acta Neurobiol. Exp.* 56, 727–41.
64. Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., De Oliveira, C.V., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology.* 148, 5752–5760.
65. Golden, P.L., Maccagnan, T.J., Pardridge, W.M. 1997. Human blood-brain barrier leptin receptor. *J Clin Invest.* 99, 14-18.
66. Gonzalez-Añoover P, Vigo E, Encinas T, Torres-Rovira L, Pallares P, Gomez-Izquierdo E, Sanchez-Sanchez R, Mallo F, Gonzalez-Bulnes A. 2012. Prepuberal evolution of plasma leptin levels in gilts of thrifty genotype (Iberian pig) and lean commercial crosses (Large White × Landrace). *Res Vet Sci.* 93, 100-2.
67. Gore, A.C., 2001. Gonadotropin-releasing hormone neurons. NMDA receptors, and their regulation by steroid hormones across the reproductive life cycle. *Brain Res Rev* 37,235–248. Gore AC 2001 Gonadotropin-releasing hormone neurons. NMDA receptors, and their regulation by steroid hormones across the reproductive life cycle. *Brain Res Rev* 37, 235–248.
68. Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 2004. A role for

- kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 145, 4073– 4077.
69. Gottsch, M.L., Navarro, V.M., Zhao, Z., Glidewell-Kenney, C., Weiss, J., Jameson, J.L., Clifton, D.K., Levine, J.E., Steiner, R.A. 2009. Regulation of Kiss1 and Dynorphin gene expression in the brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J Neurosci*. 29, 9390-9395.
70. Gore, A.C. 2001. Gonadotropin-releasing hormone neurons. NMDA receptors, and their regulation by steroid hormones across the reproductive life cycle. *Brain Res Rev*. 37,235–248.
71. Goubillon, M.L., Forsdike, R.A., Robinson, J.E., Ciofi, P., Caraty, A., Herbison, A.E. 2000. Identification of neurokinin B-expressing neurons as a highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology* 141, 4218–4225.
72. Granger, A.L., Wyatt, W.E., Craig, W.M., Thompson, D.L. Jr., Hembry, F.G. 1989. Effects of breed and wintering diet on growth, puberty and plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in heifers. *Domest Anim Endocrinol*. 6, 253–262.
73. Gu, G.B., Simerly, R.B. 1997. Projections of the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus in the female rat. *J Comp Neurol* 384,142–164.
74. Guay, F., Palin, M.F., Matte, J.J., Laforest, J.P. 2001 Effects of breed, parity, and folic acid supplement on the expression of leptin and its receptors' genes in embryonic and endometrial tissues from pigs at day 25 of gestation. *Biol Reprod*. 65, 921-7.

75. Hall, J.B., Staigmiller, R.B., Bellows, R.A., Short, R.E., Moseley, W.M., Bellows, S.E., 1995. Body composition and metabolic profiles associated with puberty in beef heifers. *J Anim Sci.* 73, 3409-3420.
76. Han, S.K., Todman, M.G., Herbison, A.E. 2004. Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 145, 495-499.
77. Hausman, G.J., Barb, C.R., Lents, C.A. 2012. Leptin and reproductive function. *Biochimie.* 94, 2075-81.
78. Holland, M.D., K. L. Hossner, G.D. Niswender, T.H. Elsasser, K.G. Odde. 1988. Validation of a heterologous radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I in bovine serum. *J. Endocrinol.* 119:281.
79. Houseknecht, K. L., C. A. Baile, R. L. Matteri, M. E. Spurlock. 1998. The biology of leptin: A review. *J. Anim. Sci.* 76, 1405–1420.
80. Houseknecht KL, Portocarrero CP, Ji S, Lemenager R, Spurlock ME. 2000. Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. *J Endocrinol.* 164, 51-7.
81. Hwa, V., Oh, Y., Rosenfeld, R.G. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrinol.* 20, 761–87.
82. Ingvarsen, K.L., Boisclair, Y.R. 2001. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domest Anim Endocrinol.* 21, 215–250.

83. Iqbal, J., Pompolo, S., Murakami, T., Grouzmann, E., Sakurai, T., Meister, B., Clarke, I.J., 2001. Immunohistochemical characterization of localization of long form leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells in the ovine hypothalamus. *Brain Res.* 920, 55–64.
84. Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Steiner, R.A. 2005. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80, 264-272.
85. Jensen, E.V., DeSombre, E.R. 1973. Estrogen-receptor interaction. *Science* 182, 126–34.
86. Jones, E.J., Armstrong, J D., Harvey R.W., 1991. Changes in metabolites, metabolic hormones, and luteinizing hormone before puberty in Angus, Braford, Charolais, and Simmental heifers. *J Anim Sci.* 69, 1607-1615.
87. Kadokawa, H., Matsui, M., Hayashi, K., Matsunaga, N., Kawashima, C., Shimizu, T., Kida, K., Miyamoto, A., 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *J. Endocrinol.* 196, 331–334.
88. Keen, K.L., Burich, A.J., Mitsushima, D., Kasuya, E., Terasawa, E. 1999. Effects of pulsatile infusion of the GABA_A receptor blocker bicuculline on the onset of puberty in female rhesus monkeys. *Endocrinology.* 140, 5257–5266.

89. Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., Ruvkun, G. 1997. Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 277, 942-6.
90. Kinder, J.E., Bergfeld E.G.M., Wehrman, M.E., Peters, K.E., Kojima, F.N. 1995. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*49, 393–407.
91. Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N, Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* 276, 34631–34636.
92. Lahlou M, Clement K, Care1 JC, Vaisse C, Lotton C, LeBihan Y, Basdevant A, Lebouc Y, Froguel P, Roger M, Guy-Grand B. 2000. Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: Relation to fat mass. *Diabetes*. 49,1347-1352.
93. Lamond, D.R. 1970. The influence of undernutrition on reproduction in the cow. *Animal Breeding Abstracts* 38, 359-372.
94. LaPaglia N, Steiner J, Kirsteins L. 1998. Leptin alters the response of the growth hormone releasing factor–growth hormone–insulin-like growth factor-1 axis to fasting. *J Endocrinol.* 159, 79.
95. Lee, D.K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A.P., Liu, Y., Osmond, D.H., George, S.R., O’Dowd, B.F., 2000. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J. Neurochem.* 74, 34–41.

96. Lehman, M.N., Coolen, L.M., Goodman, R.L. 2010. Minireview. Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 151, 3479–3489.
97. Lents, C.A., Heidorn, N.L., Barb, C.R., Ford, J.J., 2008. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction* 135, 879–887.
98. Leranth C, MacLusky NJ, Brown TJ, Chen EC, Redmond DEJ, Naftolin F. 1992. Transmitter content and afferent connections of estrogen-sensitive progesterin receptor-containing neurons in the primate hypothalamus. *Neuroendocrinology* 55, 667–82.
99. Lesniak, M. A., Hill, J. M., Kiess, W., Rojeski, M., Pert, C. B., Roth, J. 1988. Receptors for insulin-like growth factors I and II: autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin. *Endocrinology*, 123, 2089-2099.
100. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu J-L, Butler A. 2001. The somatomedin hypothesis. *Endocrinol Rev.* 22, 53–74.
101. Le Roith D, Scavo L, Butler A. 2001. What is the role of circulating IGF-1? *Trends Endocrinol Metab.* 12, 48–52.
102. León, H.V., Hernández-Cerón, J., Keislert, D.H., Gutierrez, C.G. 2004. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J Anim Sci.* 82, 445-51.

103. Li, S., Li, Y., Yu, S., Du, W., Zhang, L., Dai, Y., Liu, Y., Li, N. 2007. Expression of insulin-like growth factors systems in cloned cattle dead within hours after birth. *Mol Reprod Dev.*74, 397–402.
104. Lin J, Richard Barb C, Kraeling RR, Rampacek GB. 2001. Developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. *Biol Reprod.* 64, 1614-8.
105. Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., Efstratiadis, A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulinlike growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (IgfR). *Cell.* 75, 59–72.
106. Liu, C., Reppert, S.M. 2000. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron.* 25, 123-128.
107. Luna, A.M., Wilson, D.M., Wibbelsman, C.J., Brown, R.C., Nagashima, R.J., Hintz, R.L., Rosenfeld, R.G. Somatomedins in adolescence: a cross-sectional study of the effect of puberty on plasma insulin-like growth factor I and II levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 57, 268-271, 1983.
108. Luna-Pinto, G, Cronje, P.B. 2000. The roles of the insulin-like growth factor system and leptin as possible mediators of the effects of nutritional restriction on age at puberty and compensatory growth in dairy heifers. *S Afr J Anim Sci.* 30, 155-163.
109. Lund-Larsen, TR., BaiZe, H. 1975. Growth hormone and somatomedin activities in lines of pigs selected for rate of gain and thickness of backfat. *Acta Agriculturae Scandinavia* 25, 231-234.

110. Lynn RB, Cao G-Y, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. 1996. Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 219:884-889.
111. Mani, S.K., Oyola, M.G. 2012. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front Endocrinol.* 3, 7.
112. Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G., Hill, R.A. 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26, 1407-33.
113. Melvin, E.J., Lindsey, B.R., Quintal-Franco, J., Zanella, E., Fike, K.E., Van Tassell, C.P. Kinder, J.E. 1999. Circulating concentrations of E2, luteinizing hormone, and follicle stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. *Biol Reprod.* 60, 405-412.
114. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence DB, Hannah LT, Morgan PJ, Trayhum P. 1996. Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 8, 733-735.
115. Mandel S, Moreland E, Nichols V, Hanna C, Lafranchi S. 1995. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-binding protein-3, growth hormone (GH)-binding protein, erythrocyte IGF-I receptors, and growth rate during GH treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 80, 190-4.
116. Mitsushima, D., Hei, D.L., Terasawa, E. 1994. γ amino butyric acid is an inhibitory neurotransmitter restricting the release of luteinizing

- hormone-releasing hormone before the onset of puberty. *Proc Natl Acad Sci.* 91, 395–399.
117. Moenter, S.M., DeFazio, R.A. 2005. Endogenous gamma-aminobutyric acid can excite gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 146, 5374-5379.
118. Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L., Harrison, D.C. 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 276, 28969–28975.
119. Nakada, K., Moriyoshi, M., Nakao, T. Watanabe, G. Taya, K. 2000. Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, E2-17 β , testosterone, progesterone and inhibin in heifers from birth to puberty. *Domestic Animal Endocrinology.* 18, 57-69.
120. Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, J.M., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M. 2004. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol.* 561, 379–386.
121. Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar. E.,

- Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2005a. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 146, 1689-97.
122. Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Nogueiras, R., Vazquez, M.J., Barreiro, M.L., Magni, P., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2005b Characterization of the potent LH releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146, 156-163.
123. Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 2009. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci*. 29, 11859-66.
124. Navarro, V.M., Tena-Sempere, M., 2012. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol*. 8,40-53.
125. Nkrumah, J.D., Keisler, D.H., Crews, D.H.Jr., Basarab, J.A., Wang, Z., Li, C., Price, M.A., Okine, E.K., Moore, S.S. 2007. Genetic and phenotypic relationships of serum leptin concentration with performance, efficiency of gain, and carcass merit of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 85, 2147–2155.
126. Oakley, A.E., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*. 30, 713-43.
127. Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y.,

- Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M. 2001, Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411, 613–617.
128. Ojeda, S.R., Urbanski, H.F. 1994. Puberty in the rat, en: Knobil, E., Neill, J.D., (Eds.), *The physiology of reproduction*, Academic Press/Elsevier. New York: pp 363–409.
129. Ojeda, S.R., Terasawa, E. 2002. Neuroendocrine regulation of puberty. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S, Moss R, Rubin R, eds. *Hormones, brain and behavior*. New York: Elsevier; 4, 589–659.
130. Ojeda, S.R., Prevot, V., Heger, S., Lomniczi, A., Dziedzic, B., Mungenast, A. 2003. Glia-to neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann Med* 35, 244–255.
131. Ojeda, S.R., Skinner, M.K. 2005. Puberty in the rat. In: Neill JD, *The physiology of reproduction*. 3er ed. San Diego: Academic Press/Elsevier; 2061–2126.
132. Ojeda, S.R., Lomniczi, A., Mastronardi, C., Heger, S., Roth, C., Parent, A.S., Matagne, V., Mungenast, A.E., 2006. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 147, 1166-1174.
133. Ojeda S.R., Lomniczi, A., Sandau, U.S. 2008. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol.* 20, 732-42.

134. Ojeda, S.R., Lomniczi, A., Sandau, U., Matagne, V. 2010. New concepts on the control of the onset of puberty. *Endocr Dev.* 17, 44-51.
135. Ottem, E.N., Godwin, J.G., Petersen, S.L. 2002. Glutamatergic signaling through the N-methyl-D-aspartate receptor directly activates medial subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons, but does not appear to mediate the effects of estradiol on LHRH gene expression. *Endocrinology* 143, 4837–4845.
136. Ottem, E.N., Godwin, J.G., Krishnan, S., Petersen, S.L. 2004. Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. *J Neurosci* 24, 8097–8105.
137. Ottem, E.N., Godwin, J.G., Petersen, S.L. 2002. Glutamatergic signaling through the N-methyl-d-aspartate receptor directly activates medial subpopulations of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons, but does not appear to mediate the effects of E2 on LHRH gene expression. *Endocrinology.* 143, 4837–4845.
138. Pagan, M., Davis, M.E., Stick, D.A., Simmen, R. C.M., Raney, N.E., Tempelman, R.J., Ernst, C.W. 2003. Evaluation of serum insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) in Angus cattle divergently selected for serum IGF-I concentration. *Domest Anim Endocrinol.*, 25, 345-358.
139. Parhar, I.S., Ogawa, S., Sakuma, Y. 2004 Laser captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G proteincoupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology.* 145:3613–3618.

140. Patterson, D.J., Perry, R.C., Kiracofe, G.H., Bellows, R.B., Staigmiller, R.B., Corah, L.R. 1992. Management considerations in heifer development and puberty. *Journal of Animal Science*. 70: 4018 – 4035. 69.
141. Pavelic, J., Matijevic, T., Knezevic, J. 2007. Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian Indian J Med Res*. 125, 511.
142. Plant, T.M., Gay, V.L., Marshall, G.R., Arslan, M. 1989. Puberty in monkeys is triggered by chemical stimulation of the hypothalamus. *PNAS*, 86, 2506-2510.
143. Popa, M.S., Clifton, K.D., Steiner, R.A. 2008. The Role of Kisspeptins and GPR54 in the Neuroendocrine Regulation of Reproduction. *Annu. Rev. Physiol*. 70:213–38.
144. Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Smith, H. O., Oprea, T. I., Sklar, L. A., Hathaway, H. J. 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol.*, 70, 165-190.
145. Prossnitz, E.R., Maggiolini, M. 2009. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 308. 32–38.
146. Qiu, J., Bosch, M.A., Tobias, S.C., Grandy, D.K., Scanlan, T.S., Rønnekleiv, O.K., Kelly, M.J., 2003. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J. Neurosci*. 23, 9529–9540.

147. Ramirez, V.D., McCann, S.M. 1963. Comparison of the Regulation of Luteinizing Hormone (LH) Secretion in Immature and Adult Rats. *Endocrinol.* 72, 452–455.
148. Rawlings, N.C., Evans, A.C.O., Honaramooz, A., Bartlewski, P. M., 2003. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 259–270.
149. Richter, T.A., Robinson, J.E., Lozano, J.M., Evans, N.P. 2005. Progesterone can block the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe by a direct inhibitory action on oE2-responsive cells within the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology.* 17: 161 - 169.
150. Rispoli, L.A., Nett, T.M. 2005. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: Structure, distribution and regulation of expression. *Animal Reproduction Science.* 88, 57 – 74.
151. Roa, J., Tena-Sempere, M. 2007. Kiss-1 system and reproduction: Comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *General and comparative. Endocrinology.* 153, 132 – 140.
152. Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2008. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol.* 29, 48-69.
153. Roa, J., Tena-Sempere, M. 2010. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTO signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 519–528.

154. Roa, J., Herbison, A.E. 2012. Direct Regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology*. 153, 5587-99.
155. Roberts, C.A., McCutcheon, S.N., Blair, H.T., Gluckman, P.D., Breier, B.H. 1990. Developmental patterns of plasma insulin-like growth factor-1 concentrations in sheep. *Domest Anim Endocrinol*. 7. 457-63.
156. Roberts, C.B., Best, J.A., Suter, K.J. 2006. Dendritic processing of excitatory synaptic input in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 147, 1545–1555.
157. Roth, C.L., McCormack, A.L., Lomniczi, A., Mungenast, A.E., Ojeda, S.R. 2006. Quantitative proteomics identifies a major change in glial glutamate metabolism at the time of female puberty. *Mol Cell Endocrinol*, 254, 51-59.
158. Rotwein, P., Burgess, S.K., Milbrandt, J.D., Krause, J.E. 1988. Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci*. 85, 265-269.
159. Sanchez-Alavez M, Osborn O, Tabarean IV, Holmberg KH, Eberwine J, Kahn CR, Bartfai T. 2011 Insulin-like growth factor 1-mediated hyperthermia involves anterior hypothalamic insulin receptors. *J Biol Chem*. 286,14983-14990.
160. Schillo, K.K., Hall, J.B., Hileman, S.M. 1992. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J Anim Sci*. 70, 3994-4005.

161. Schoppee, P.D., Armstrong, J.D., Harvey, M.D., Whitacre, M.D., Felix, A., Campbell, R.M. 1996. Immunization against growth hormone releasing factor or chronic feed restriction initiated at 3.5 months of age reduces ovarian response to pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone at 6 months of age and delays onset of puberty in heifers. *Biol Reprod.* 55, 87-98.
162. Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, Jr. J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, Jr. W.F., Aparicio, S.A., Colledge, W.H. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 349, 1614–1627.
163. Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., Plant, T.M. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci.* 102, 2129-34.
164. Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.I., Pfaff, D.W., 1983. Absence of α E2 concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 304, 345–347.
165. Simerly, R.B., Swanson, L.W. 1987. Castration reversibly alters levels of cholecystinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei in the rat. *PNAS.* 84, 2087-2091.
166. Simerly, R.B. 1998. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav Brain Res* 92,195–203.

167. Silverman, A.J., Millar, R.P., King, J.A., Zhuang, X. Silver, R. 1994. Mast cells with gonadotropin releasing hormone-like immunoreactivity in the brain of doves. *Proc. Natl Acad. Sci.* 91, 3695–3699.
168. Simpson, R.B., Armstrong, J.D., Harvey, R.W., Miller, D.C., Heimer, E.P. Campbell, R.M., 1991. Effect of active immunization against growth hormone-releasing factor on growth and onset of puberty in beef heifers. *J Anim Sci.* 69, 4914-4924.
169. Skinner, D.C., Evans, N.P., Delaleu, B., Goodman, R.L., Bouchard, P., Caraty, A. 1998. The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 95, 10978-10983.
170. Skinner, D.C., Caraty, A., Allingham, R. 2001. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology*, 142, 573–579.
171. Sleiter, N., Pang, Y., Park, C., Horton, T.H., Dong, J., Thomas, P., Levine, JE. 2009. Progesterone receptor A (PRA) and PRB-independent effects of progesterone on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology.* 150, 3833-44.
172. Smith, G.D., Jackson, L.M., Foster, D.L. 2002. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology.* 57, 73-86.
173. Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinol.* 146, 3686-92

174. Smith, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., 2006. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci.* 26, 6687-94.
175. Smith, J.T. 2008. Kisspeptin signaling in the brain: Steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Research Reviews* 57: 288 – 298.
176. Spergel, D.J., Krüth, U., Hanley, D.F., Sprengel, R., Seeburg, P.H. 1999 GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 19:2037–2050.
177. Spicer, L.J., Echterkamp, S.E. 1995. The ovarian insulin and insulinlike growth factor system with emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 12:223–45.
178. Spicer, L.J. 2001. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol.* 21,251-70.
179. Spicer, L.J., Voge, J.L., Allen DT. 2004. Insulin-like growth factor-II stimulates steroidogenesis in cultured bovine thecal cells. *Mol Cell Endocrinol* 227, 1–7.
180. Spicer, L.J., Aad, P.Z. 2007. Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF-1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biol Reprod.* 77, 18–27.
181. Sullivan, S.D., Meonter, S.M., 2004. γ Aminobutyric acid neurons integrate and rapidly transmit permissive and inhibitory metabolic cues to

- gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 145, 1194–1202.
182. Sun, J., Chu, Z., Moenter, S. M. 2010. Diurnal in vivo and rapid in vitro effects of estradiol on voltage-gated calcium channels in gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci*. 30, 3912-3923.
183. Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 83, 1263–1271.
184. Taylor St. C. S., Fitzhugh H. A. Jr. 1971. Genetic relationships between mature weight and time taken to mature within a breed. *J Anim Sci*. 33, 726 – 731.
185. Temple, J.L., Laing, E., Sunder, A., Wray, S. 2004. Direct action of estradiol on gonadotropin-releasing hormone-1 neuronal activity via a transcription-dependent mechanism. *J Neurosci*. 24, 6326-6333.
186. Tena-Sempere, M. *Neuroendocrinology*. 2007. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. 86, 229-41.
187. Terasawa, E. 1999. Hypothalamic control of the onset of puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 6, 44–49
188. Terasawa, E., Fernandez, D.L. 2001. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev*. 22, 111–151
189. Terasawa, E., Kenealy, B.P. 2012 .Neuroestrogen, rapid action of E2, and GnRH neurons. *Front Neuroendocrinol*. 33, 364–375.

190. Thomas, T., Burguera, B. 2002. Is leptin the link between fat and bone mass? *J Bone Miner Res.*17, 1563-9.
191. Thomas, P., Alyea, R., Pang, Y., Peyton, C., Dong, J., Berg, A.H., 2010. Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish. *Steroids* 75, 595–602.
192. Tokuda, T., Yano, H. 2001. Blood leptin concentrations in Japanese Black cattle. *Animal Science.* 72, 309-313.
193. Urbanski, H.F., Ojeda, S.R. 1990. A role for N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors in the control of LH secretion and initiation of female puberty. *Endocrinology* 126, 1774–1776
194. Velazquez M.A., Spicer L.J., Wathes D.C. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal Endocrinology.* 35: 325 – 342.
195. Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K., Steiner, R.A., Okamura, H. 2010. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin- releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci.*30, 3124–3132.
196. Wakabayashi, Y., Yamamura, T., Sakamoto, K., Mori, Y., Okamura, H. 2013. Electrophysiological and Morphological Evidence for Synchronized GnRH Pulse Generator Activity Among Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin A (KNDy) Neurons in Goats. *J Reprod Dev.* 59, 40-48.

197. Watson, A.J., Westhusin, M.E., Winger, Q.A. 1999. IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *J Reprod Fertil.* 54, 303–15.
198. Wilkinson, M., Bhanot, R. 1982. A puberty-related attenuation of opiate peptide-induced inhibition of LH secretion. *Endocrinology*, 11, 1046-1048.
199. Williams, G.L., Amstalden, M., Garcia, M.R., Stanko, R.L., Nizielski, S.E., Morrison, C.D., Keisler, D.H. 2002. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animal Endocrinology.* 23,339 – 349.
200. Yakar, S., Liu, J.L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Saur. B. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA*;96:7324–9.
201. Yelich, J. V., R. P. Wettemann, H. G. Dolezal, K. S. Lusby, D. K. Bishop, and L. J. Spicer. 1995. Effects of growth rate on carcass composition and lipid partitioning at puberty and growth hormone, insulin-like growth factor I, insulin, and metabolites before puberty in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 73:2390–2405
202. Yelich, J.V., Wettemann, R.P., Marston, T.T., Spicer, L.J., 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domest Anim Endocrinol.* 13, 325-38.

203. Zamorano, P.L., Mahesh, V.B., De Sevilla, L.M., Chorich, L.P., Bhat, G.K., Brann, D.W. 1997. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology*. 65,223-8.
204. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
205. Zheng, W.H., Quirion, R., 2009. Glutamate acting on N-methyl-D-aspartate receptors attenuates insulin-like growth factor-1 receptor tyrosine phosphorylation and its survival signaling properties in rat hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 284, 855-61.
206. Zieba, D.A. Amstalden, M., Morton, S., Maciel, M.N, Keisler, D.H., Williams, G.L. 2004 .Regulatory Roles of Leptin at the Hypothalamic-Hypophyseal Axis before and after Sexual Maturation in Cattle¹ Animal Reproduction Laboratory, *Biol Reprod*. 71, 804–812
207. Zieba, D.A., Amstalden, M., Williams, G.L. 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domest Anim Endocrin*. 29, 166-185.
208. Zieba, D.A., Szczesna, M., Klocek-Gorka, B, Williams, G.L. 2008. Leptin as nutritional signal regulating appetite and reproductive processes in seasonally-breeding ruminants. *J. Physiol. Pharmacol.* 59, 7-18.

Respuesta de LH, FSH y GH a una aplicación de Kisspeptina en becerras prepúberes de diferentes edades y su asociación con las concentraciones circulantes de leptina, IGF-I y estradiol.

Introducción

Existen evidencias que indican un papel preponderante de la Kisspeptina (Kiss) en la regulación del inicio de la pubertad en hembras de especies, tales como ratas (Navarro et al., 2005), cerdas (Lents et al., 2008), humanos (DeRoux et al., 2003) y bovinos (Kadokawa et al., 2008; Ezzat et al., 2009).

Algunos autores (Roa et al., 2008; Mead et al., 2007; Arreguín-Arévalo et al., 2007; Lents et al., 2008) consideran a las neuronas productoras de Kiss como integradoras de varias señales que actúan modulando el tono de operación del eje hipotálamo-adenohipófisis-gónadas. Dichos investigadores señalan a la Kiss como el elemento intermediario entre los efectos de retroalimentación de los estrógenos y otras sustancias sobre la secreción pulsátil de GnRH y como consecuencia en la secreción de las gonadotropinas hipofisarias.

La Kiss es expresada principalmente a nivel del hipotálamo (Smith et al., 2005) y está constituida por una familia de péptidos que incluye isoformas con cadenas que varían en el número de residuos de aminoácidos, pero que comparten la región C-terminal (Kiss-54, Kiss-14, Kiss-13 y Kiss-10), misma que les confiere una actividad biológica similar (Kotani et al., 2001). Su receptor GPR54, se encuentra en las neuronas GnRHérgicas y es de la familia de receptores acoplados a proteínas G de membrana (Muir et al., 2001).

Las neuronas kisspeptidérgicas cuentan con receptores para estradiol (E2) progesterona (P4) y leptina (Smith et al., 2005; Roseweir y Millar, 2009; Luque et al., 2007), así como para el ácido γ -amino butírico (GABA), glutamato y péptidos opioides (Ojeda et al., 2006). A partir de estos receptores, las neuronas kisspeptidérgicas tienen la capacidad de integrar señales de origen ovárico y del sistema nervioso central, así como señales periféricas asociadas con la madurez somática, para de esa manera participar en la regulación del proceso de pubertad. Algunos trabajos realizados en ratas (Navarro et. al., 2005) y cerdas prepúberes (Lents et al., 2008), mostraron que la concentración sérica de LH aumenta en respuesta a una aplicación de Kiss-10. Por su parte, Castellano et al. (2006) observaron en ratas prepúberes, que una inyección intracerebroventricular de Kiss-10 provoca un aumento en las concentraciones séricas de LH, la cual fue mayor en animales de 15 días de edad con relación a los de 5 y 25 días ($P < 0.01$). Ahora bien, en becerras de 7 meses de edad, se determinó que una aplicación intravenosa de Kiss-10, en dosis de 5 μ g/kg de peso corporal, evoca un aumento en las concentraciones séricas de LH y de GH (Kadokawa et al., 2008). En contraste, en becerras de 5 meses de edad la administración de Kiss-10 por la misma vía y en la misma dosis, indujo la liberación de LH y de FSH más no de GH (Ezzat et al., 2009). Con relación a ésto, se desconoce si la Kiss-10 puede o no estimular la liberación de LH en becerras prepúberes mayores de 7 ó menores de 5 meses de edad. Asimismo, se ignora si la liberación de FSH y GH posterior a la administración de Kiss puede ser diferente en becerras prepúberes dentro de este rango de edades.

Por lo anterior, el tema central del trabajo que aquí se presenta, se enfoca en evaluar el efecto de la edad en becerras prepúberes sobre el patrón de liberación de LH, FSH y GH en respuesta a la Kiss-10 exógena.

Hipótesis:

La administración de una inyección de Kiss-10 induce un pulso de LH, FSH y GH de características similares en becerras prepúberes, independientemente de su edad y sus concentraciones circulantes de E2, IGF-I y leptina.

Objetivos:

Evaluar el efecto de una aplicación de Kiss-10 en el patrón de liberación de LH, FSH y GH en becerras prepúberes de 4, 7 y 11 meses de edad.

Determinar la asociación de las concentraciones séricas de E2, IGF-I y leptina en la respuesta de LH, FSH y GH a una aplicación de Kiss-10 en becerras prepúberes de 4, 7 y 11 meses de edad.

MATERIALES Y METODOS

Sitio

El trabajo se efectuó en el Campo Experimental Las Margaritas (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), ubicado en Hueytamalco, Puebla, México. El sitio se encuentra a una altura de 400 m sobre el nivel del mar, en un clima subtropical húmedo (Afc) de acuerdo con la clasificación de García (1981) y tiene una temperatura promedio anual de 21°C y una precipitación pluvial de 3000 mm/año.

Animales y manejo general

Los procedimientos aplicados en el presente trabajo fueron aprobados por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (Programa de Posgrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM).

Se utilizaron 21 becerras de raza Holstein y Suizo Pardo. Dos semanas previas al inicio del experimento los animales fueron alojados en corrales individuales cuyas dimensiones son de 12 m de largo y 6 m de ancho con piso de cemento; cada corral cuenta con un área de sombra de 8 m de largo y 6 m de ancho. Los corrales están equipados con un comedero de 5 m de largo por 0.50 m de ancho y 0.65 m de alto y un bebedero de 1 m de largo por 0.50 m de ancho y 0.65 m de alto. Después del período experimental, las becerras permanecieron en los corrales durante dos días adicionales, con el fin de revisar su estado de salud. Durante su confinamiento, los animales recibieron agua, mezcla de minerales y forraje picado (caña japonesa: *Saccharum sinense*) *ad libitum*. Adicionalmente, a cada animal se le ofreció un concentrado comercial (2kg/día; 18% de proteína cruda, 70% de TND, NU3-Lechero, La Piedad Michoacán, México), para promover una ganancia de peso de ≥ 0.5 kg/día.

Los animales fueron asignados a tres grupos homogéneos desde el punto de vista genético (n=7): 4 meses (media \pm ee) (4.8 ± 0.15); 7 meses (7.5 ± 0.15) y 11 meses (11.4 ± 0.15) de edad. Al inicio del trabajo, el peso promedio de los animales del grupo de 4, 7 y 11 meses de edad fue de 106.3 ± 6.7 , 114.3 ± 6.7 y 139.4 ± 6.7 kg, respectivamente. La condición corporal inicial (media \pm ee) de los grupos de 4, 7 y 11 meses fue respectivamente de 2.14 ± 0.2 , 2.3 ± 0.20 y 2.3 ± 0.20 , en escala del 1 al 5 (Edmonson et al., 1989). Un día previo a la aplicación de Kiss-10, a cada

becerra se le insertó una cánula de polietileno (0.57 mm de diámetro interno, 2.08 mm de diámetro externo y 90 cm de largo, Intramedic, Clay Adams, NJ, EUA) en una de las venas yugulares; la cánula se insertó a través de un trocar (calibre 12, E-Store, Hong Kong, China), previa anestesia local, por vía subcutánea (100 mg de Pisicaina, PiSA®, DF, México). En seguida se extrajo el trocar y se fijó la cánula al cuello mediante dos puntos de sutura (Nylon del número 1/0, Dermalon Uss-Dg, Norwalk, CT, EUA).

Muestras y mediciones

Durante la semana previa a la aplicación de Kiss-10, se tomaron cuatro muestras de sangre cada tercer día por punción de la vena coccígea, para comprobar la condición anovulatoria de las becerras (concentraciones de progesterona en suero <1 ng/ml). A través de la cánula se tomaron muestras de sangre cada 15 minutos durante ocho horas, cuatro previas y cuatro posteriores a la aplicación de Kiss-10 (5 µg/kg de peso corporal; Proimmune, Oxford, MA, EUA). Para evitar la formación de coágulos entre muestras, a las cánulas se les infiltró un anticoagulante (5ml de una solución de heparina con 250 UI/ml, diluidos en 1.0 litro de solución de cloruro de sodio, Inhepar, PiSA®, DF, México).

La sangre (33 muestras en cada animal) fue centrifugada a 1,500 rpm durante 10 minutos con el fin de obtener el suero, el cual se almacenó a -18°C hasta su posterior análisis. En las muestras obtenidas cada 15 minutos se determinaron las concentraciones de LH, FSH y GH. Adicionalmente, en algunas muestras previas (1, 2 y 3) y posteriores a la aplicación de Kiss-10 (18, 19, 20, 26, 27 y 28), se

cuantificaron las concentraciones séricas de E2, leptina y del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I).

Análisis de laboratorio

Las concentraciones séricas de progesterona fueron determinadas en un solo ensayo mediante estuches de radioinmunoanálisis (RIA; Coat a Count, Diagnostic Product Corporation, DPC, Los Ángeles, CA, EUA). La sensibilidad de dicho ensayo fue de 0.02 ng/ml, con un coeficiente de variación intraensayo de 6.15%. La leptina fue cuantificada por medio de estuches multiespecies de RIA (Linco Research Inc. Sigma, St. Louis, MO, EUA); en dos ensayos, la sensibilidad fue de 1.0 ng/ml y el coeficiente de variación (CV) interensayo e intraensayo fue de 12.93% y 2.63% respectivamente. Las concentraciones de IGF-I fueron determinadas mediante estuches comerciales; en dos ensayos (ELISA, Alpcó Immunoassays, Salem, NH, EUA), la sensibilidad fue de 0.9 ng/ml y el CV intraensayo fue de 3.66% e interensayo de 3.79%. Las concentraciones séricas de E2 se determinaron mediante un RIA con un atisuerdo altamente específico para E2-17 β , marcado con ¹²⁵I y descrito por England et al. (1974) y validado por Nett et al. (1975), con una sensibilidad de 0.21 pg/ml y un CV intraensayo de 9.18%. LH, FSH y GH fueron cuantificadas por RIA; los procedimientos fueron validados y descritos por Nett et al. (1975), Hermite et al. (1972) y Verduzco (2004), respectivamente. En tres ensayos de LH, el límite mínimo y máximo fue de 0.27 ng/ml y 57.91 ng/ml; los valores medios de los controles bajo, medio y alto fueron respectivamente de 2.3 ng/ml, 14.55 ng/ml y 33.88 ng/ml; mientras que los correspondientes CV fueron: intraensayo de 5.31%, 1.07% y 8.10%, e interensayo

de 9.64%, 6.56% y 8.70%. En el caso de FSH la sensibilidad fue de 0.0479 ng/ml, el CV intraensayo fue de 6.34% y el CV interensayo de 13.12%. En dos ensayos de GH el límite mínimo y máximo fue de 1.6 ng/ml y 87.42 ng/ml respectivamente, mientras que los valores medios de los controles bajo y alto fueron respectivamente de 2.22 ng/ml y 4.63 ng/ml; por su parte, los CV intraensayo fueron en el primer ensayo de 26.56% y 0.24 % y en el segundo ensayo de 3.57% y 4.58% mientras que interensayo fueron de 21.32 y 11.43% respectivamente.

Los ensayos de IGF-I P4 y leptina se efectuaron en el departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, mientras que los ensayos de GH y LH en el en el Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Finalmente FSH y E2 fueron cuantificadas en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Estado de Colorado.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño base fue de parcelas divididas con mediciones repetidas en el tiempo, para modelos de efectos fijos, el cual se adaptó de acuerdo a las variables de respuesta como a continuación se describe. Para los datos relacionados con la concentración media de LH, FSH y GH se analizó el efecto de edad (4, 7 y 11 meses de edad), muestra y su interacción. La respuesta a Kiss-10 fue definida como el período comprendido entre la primera muestra que excedió por dos desviaciones estándar a la concentración basal grupal del período previo a Kiss-10 y la primera muestra cuya concentración regresó al nivel basal. Se generaron dos variables dependientes relacionadas con LH, FSH y GH, las cuales fueron:

duración de la respuesta (DUR) y valor máximo (VMAX); VMAX fue la concentración máxima de cada hormona durante el período posterior a la aplicación de Kiss-10, dentro del segmento considerado como respuesta. En el caso de VMAX y DUR para cada una de las hormonas citadas, así como los datos de las concentraciones medias de E2, IGF-I y leptina se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía para modelos de efectos fijos en el cual se incluyó únicamente el efecto de edad de las becerras. Adicionalmente, con el fin de establecer la actividad pulsátil de los animales antes de la aplicación de Kiss-10, en las muestras de suero 1 a 16 se analizó la frecuencia y amplitud de pulsos de LH, FSH y GH; para ello, se definió como pulso al incremento sostenido de los niveles hormonales por arriba de la concentración basal más 2 DE (basal: media de las tres concentraciones más bajas registradas en cada becerro durante el período previo a la aplicación de Kiss-10), durante al menos dos muestras consecutivas, con al menos una descendente y con retorno a concentraciones similares a la basal. La amplitud y frecuencia de pulsos fueron analizadas mediante un análisis de varianza de una vía para modelos de efectos fijos. Los análisis estadísticos antes indicados se efectuaron aplicando los procedimientos ANOVA o GLM (SAS, 2002). Además se examinó la correlación entre las variaciones en las concentraciones séricas de LH, FSH y GH y las de E2, IGF-I o leptina mediante el procedimiento CORR (SAS, 2002). La proporción de animales que mostró respuesta de LH, FSH y GH a Kiss-10, fueron analizados mediante pruebas de tablas de contingencias (χ^2). Los datos referentes a las concentraciones séricas de progesterona no fueron analizados estadísticamente, debido a que en todas las muestras colectadas los niveles fueron < 1 ng/ml,

indicando la condición prepúber de todas las becerras involucradas en el experimento.

RESULTADOS

Durante el período de muestreo previo al tratamiento de Kiss-10, ninguna de las hormonas estudiadas fue diferente entre las becerras de 4, 7 y 11 meses de edad ($P>0.05$). Todas las becerras respondieron a Kiss-10 con un incremento de LH. Las concentraciones séricas promedio de LH (Figura 1), aumentaron ($P<0.0001$) por efecto del tratamiento, independientemente de la edad. Sin embargo, VMAX de LH fue mayor ($P<0.05$) en las becerras de 11 que en las de 4 y 7 meses de edad (Figura 1, Cuadro 1); en contraste la DUR de LH solo fue mayor en los animales de 11 meses con respecto a los de 4 meses.

En contraste con lo observado en LH, no hubieron diferencias ($P>0.05$) adjudicables a la edad de los animales en ninguna de las características de la respuesta de FSH a Kiss-10 (Figura 2; Cuadro 2). El 100% de las becerras de 7 y 11 meses respondieron a Kiss-10, mientras que solo el 71.4% de las de 4 meses mostraron una respuesta (Cuadro 2).

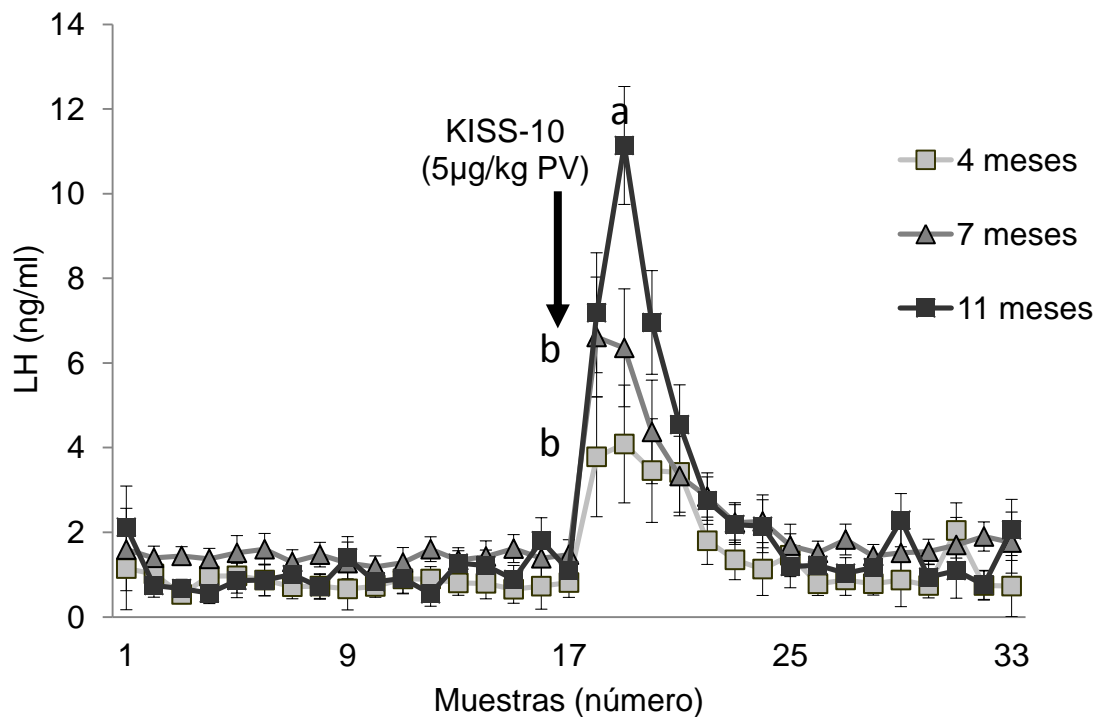


Figura 1. Respuesta de LH en becerras de 4, 7 y 11 meses de edad, a una aplicación intravenosa de Kiss-10 (5 µg/kg de peso vivo). Las muestras fueron colectadas cada 15 minutos. Distintas literales indican diferencia entre medias (^{a, b} P<0.0001).

Cuadro 1

Proporción de becerras prepúberes de distinta edad, que respondieron a una inyección de Kiss-10 (5 µg/kg de peso vivo), así como el valor máximo (VMAX) y la duración (DUR) de la respuesta de LH.

| Edad (meses) | Animales que respondieron (%) | LH | |
|--------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | | VMAX (ng/ml) | DUR (min) |
| 4 | 100 (7/7)* | 6.10±1.3 ^a | 64.29±20.05 ^a |
| 7 | 100 (7/7) | 7.23±1.3 ^a | 92.14±20.05 ^{a, b} |
| 11 | 100 (7/7) | 11.62±1.3 ^c | 132.86±20.05 ^b |

Distintas literales indican diferencias entre grupos (a,c P<0.01, a, b P<0.05).

*En paréntesis animales que respondieron/animales por grupo.

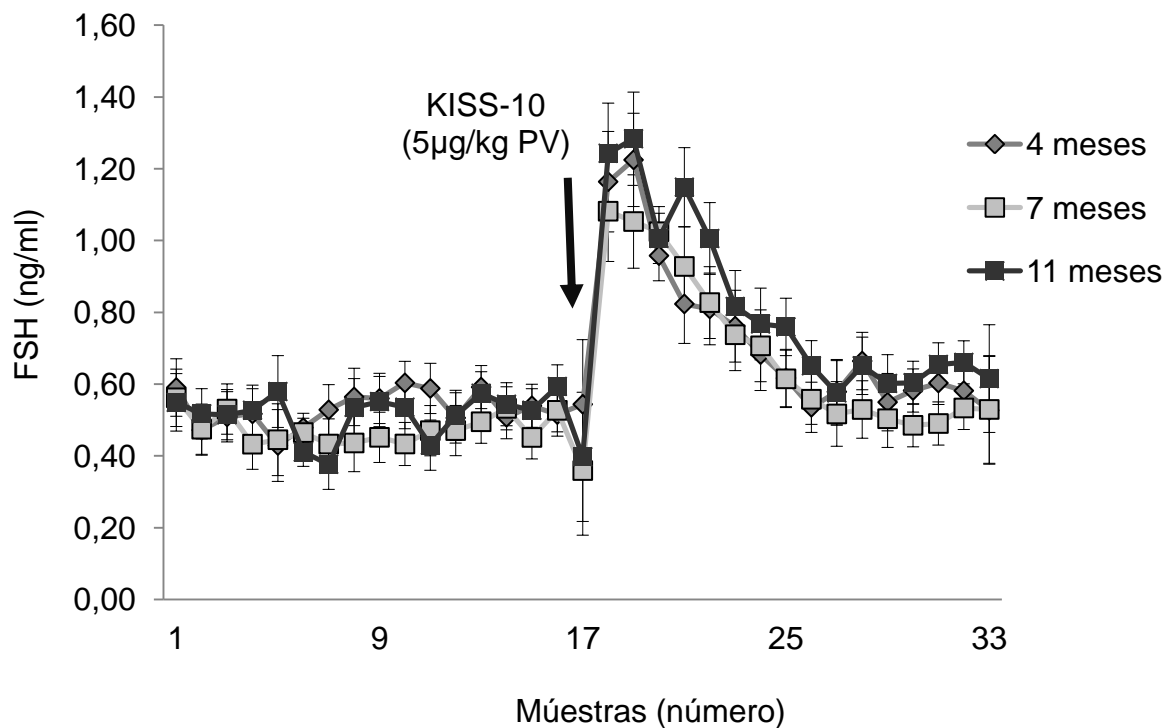


Figura 2. Respuesta de FSH en becerras de 4,7 y 11 meses de edad a una inyección intravenosa de Kiss-10 (5 µg/kg de peso vivo). Las muestras fueron colectadas cada 15 min. No se detectaron diferencias entre medias ($P>0.05$).

Cuadro 2

Proporción de becerras prepúberes de distinta edad, que respondieron a una inyección de Kiss-10 (5 µg/kg de peso vivo), así como el valor máximo (VMAX) y la duración (DUR) de la respuesta de FSH.

| Edad (meses) | Animales que respondieron (%) | FSH | |
|--------------|-------------------------------|--------------|------------|
| | | VMAX (ng/ml) | DUR (min) |
| 4 | 71.4 (5/7)* | 1.5±0.3 | 81.0±23.4 |
| 7 | 100 (7/7) | 1.2±0.3 | 85.7±19.8 |
| 11 | 100 (7/7) | 2.0±0.3 | 147.9±19.8 |

No se detectaron diferencias atribuibles a edad ($P>0.05$).

*En paréntesis animales que respondieron/animales por grupo.

En cuanto a la respuesta de GH a la aplicación de Kiss-10, no se encontró un patrón definido como en el caso de las gonadotropinas, en las que la respuesta ocurrió inmediatamente después de la Kiss-10, finalizando aproximadamente entre una y dos horas después del primer incremento; por el contrario se observó que algunas becerras no respondieron (Figura 3), otras mostraron respuesta durante todo el período de muestreo posterior a Kiss-10, unas más respondieron durante las primeras dos horas, mientras que otras becerras mostraron la respuesta durante las últimas dos horas de muestreo (Cuadro 3). Así mismo fue evidente que antes de la inyección de Kiss-10 había marcada actividad pulsátil de GH en la mayoría de los animales (80.95%; 1.19 pulsos; VMAX de 29.03 ± 4.18 ng/ml; DUR de 44.61 ± 13.41 min). No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) atribuibles a la edad en ninguna de las variables relacionadas con la respuesta de GH a Kiss-10 (Cuadro 4), habiéndose registrado una media para todos los animales de $VMAX = 34.0 \pm 7.1$ ng/ml y de $DUR = 112.0 \pm 27$ min. El 100% de las becerras de 11 meses de edad respondieron a Kiss-10, sin embargo una menor proporción de animales de 4 y 7 meses no respondió al tratamiento (Cuadro 4), aunque no se detectó diferencia significativa entre grupos ($P > 0.50$).

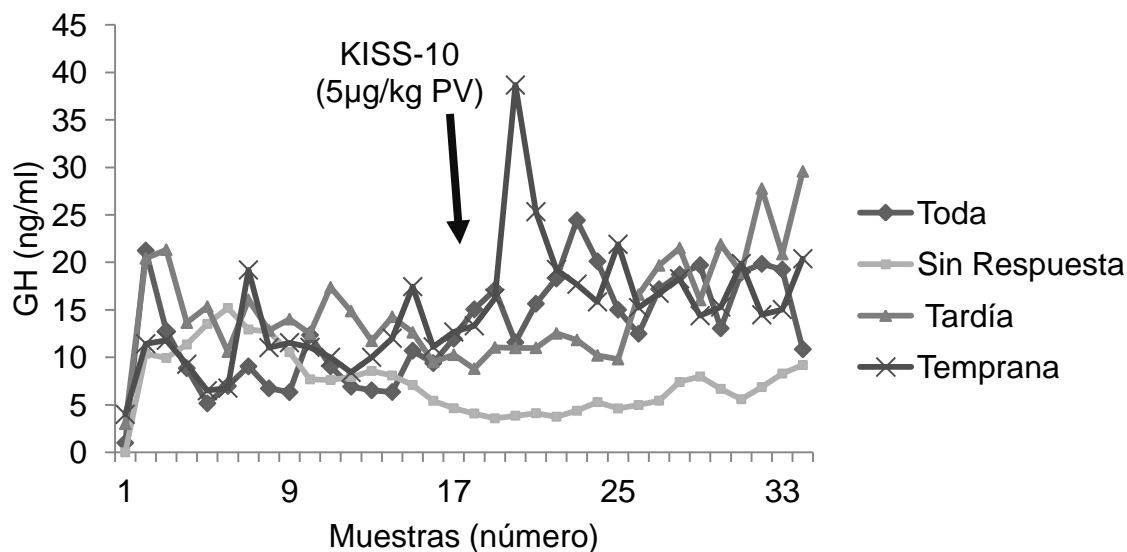


Figura 3. Perfil de GH en becerras representativas de la respuesta a una aplicación intravenosa de Kiss-10. La becerro Toda respondió durante las 4 horas posteriores a la inyección; la becerro Tardía respondió en las últimas dos horas de muestreo; la becerro Sin Respuesta, no respondió; la becerro Temprana respondió en las dos siguientes a Kiss-10.

Cuadro 3

Proporción de becerras prepúberes de distinta edad que respondieron con un incremento de GH durante la mayor parte del período posterior a la aplicación de Kiss-10 (5 µg/kg de peso vivo; Todo), durante las últimas dos horas de muestreo (Tardía), en las primeras dos horas de muestreo posterior a la aplicación de Kiss-10 (Temprana), o que no respondieron al tratamiento (Sin respuesta).

| Edad (meses) | Todo | Sin respuesta | Tardía | Temprana |
|--------------|-------------|---------------|------------|------------|
| 4 | 14.2 (1/7)* | 28.6 (2/7) | 28.6(2/7) | 28.6 (2/7) |
| 7 | 0 (0/7) | 14.2 (1/7) | 71.4 (5/7) | 14.2 (1/7) |
| 11 | 14.2 (1/7) | 0 (0/7) | 57.1(4/7) | 28.6(2/7) |

*En paréntesis animales que respondieron/animales por grupo.

Cuadro 4

Proporción de becerras prepúberes de distinta edad, que respondieron a una inyección de Kiss-10 (5 µg/kg de peso vivo), así como el valor máximo (VMAX) y la duración (DUR) de la respuesta de GH.

| Edad (meses) | Animales que respondieron (%) | GH | |
|-----------------|----------------------------------|-----------------|--------------|
| | | VMAX (ng/ml) | DUR (min) |
| 4 | 71.4 (5/7)* | 28.6±7.7 | 105.0±29.7 |
| 7 | 85.7 (6/7) | 36.7±7.0 | 87.5±27.1 |
| 11 | 100.0 (7/7) | 36.83±6.5 | 143.6±25.1 |

No se detectaron diferencias atribuibles a la edad ($P>0.50$).

*En paréntesis animales que respondieron/animales por grupo.

Las concentraciones séricas de IGF-I (Figura 4) fueron mayores ($P<0.05$) en las becerras de 11 meses que en las de 4 y 7 meses de edad; en cambio, los niveles sanguíneos de E2 (Figura 5) fueron mayores ($P<0.05$) únicamente en las becerras de 11 con respecto a las de 4 pero no a las de 7 meses ($P>0.05$). En oposición a las dos hormonas previamente descritas, los niveles séricos de leptina fueron menores en las becerras de 11 meses con relación a los registrados en los animales de 4 y 7 meses de edad (Figura 6). Las muestras de suero previas a Kiss-10 no difirieron ($P>0.05$) de las dos últimas muestras colectadas con respecto a las concentraciones de IGF-I, leptina y E2, en becerras de 4, 7 y 11 meses de edad.

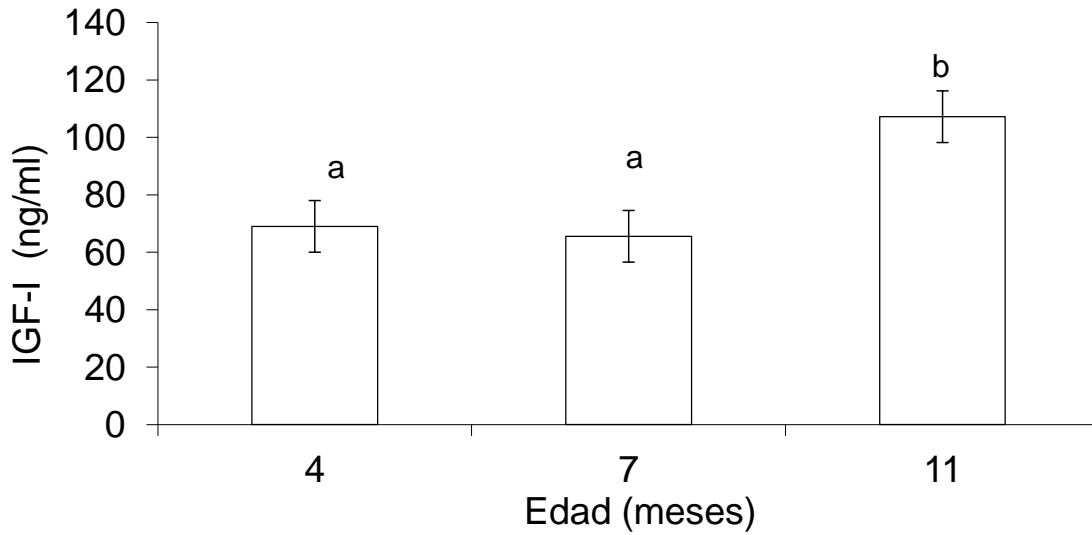


Figura 4. Concentraciones de IGF-I en suero (media \pm ee) de becerras prepúberes de diferentes edades. Distintas literales (^a, ^b) indican diferencia entre medias ($P < 0.05$).

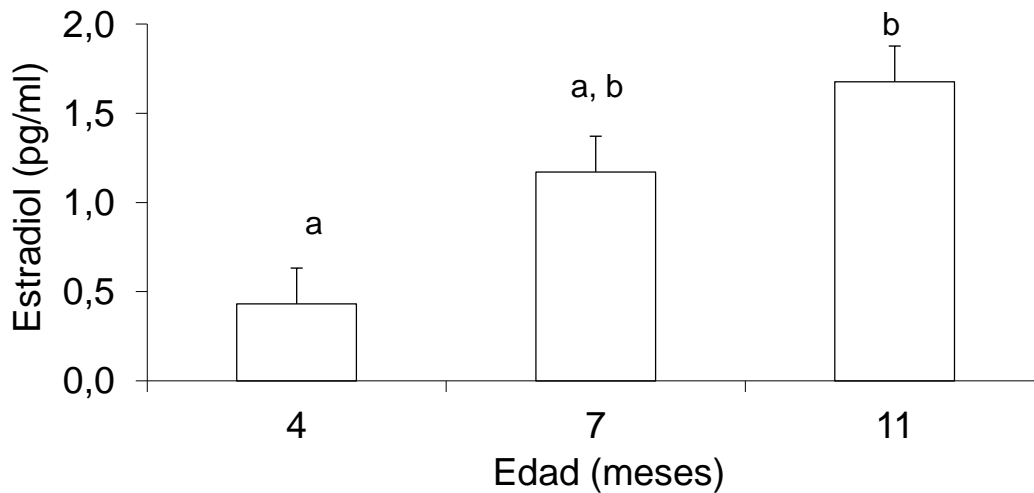


Figura 5. Concentraciones de E2 en suero (media \pm ee) de becerras prepúberes de diferentes edades. Distintas literales (^a, ^b) indican diferencia entre medias ($P < 0.05$).

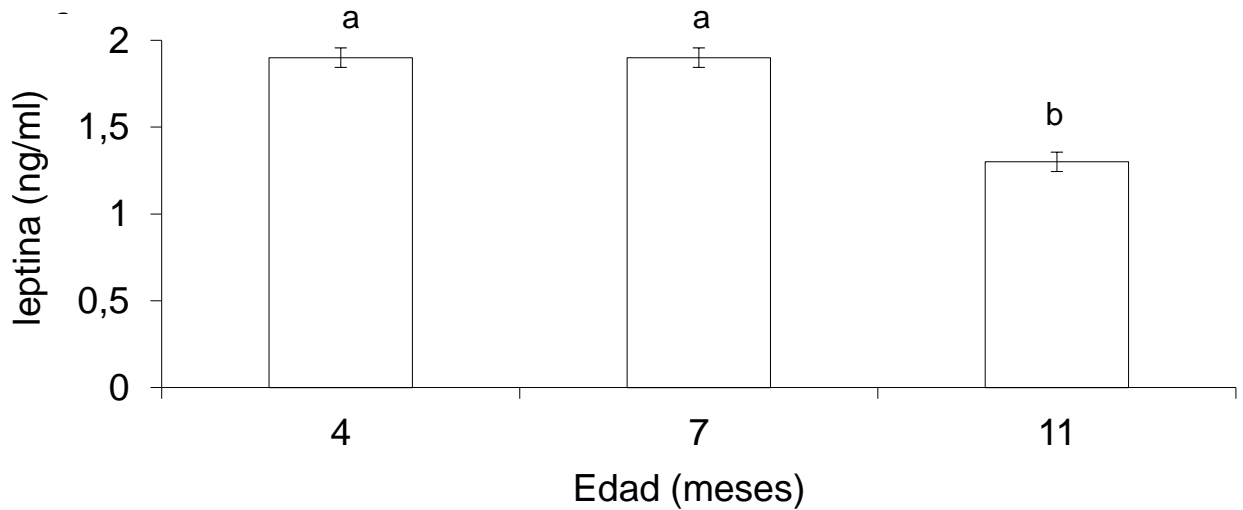


Figura 6. Concentraciones de leptina en suero (media \pm ee) de becerras prepúberes de diferentes edades. Distintas literales (^a, ^b) indican diferencia entre medias ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

Una revisión de la literatura disponible, nos permite afirmar que éste es el primer trabajo donde se examina el efecto de la edad de hembras bovinas prepúberes en las variaciones de la concentración sérica de LH, FSH y GH como respuesta a una aplicación de Kiss-10. El 100% de las becerras respondieron a la administración de Kiss-10 con un incremento de LH. No es posible comparar los presentes resultados con los derivados de investigaciones previas, ya que si bien existen varios estudios efectuados en hembras prepúberes tales como ratas (Navarro et al., 2005), cerdas (Lents et al., 2008) y becerras (Kadokawa et al., 2008; Ezzat et al., 2009), en ninguno de ellos se indica la proporción de animales que respondieron a Kiss-10, independientemente de la especie.

Si bien todas las becerras respondieron a Kiss-10, la calidad de la respuesta de LH difirió con relación a la edad, ya que en los animales de 11 meses la secreción de LH fue superior en cuanto a VMAX y DUR a la de los animales de 7 y 4 meses. En contraste, solo la DUR de LH fue mayor en las becerras de 11 con respecto a las de 4 meses. En trabajos previos efectuados en hembras de mono Rhesus, Shahab et al. (2005), encontraron que la expresión de Kiss y de su receptor GPR54 aumenta al inicio de la pubertad, con respecto a una edad temprana o tardía prepuberal; por su parte Navarro et al. (2004) determinaron en ratas, que al inicio de la pubertad aumenta la expresión tanto de Kiss como de su receptor, en comparación con los valores observados a los cinco días de edad; no obstante, dichos investigadores detectaron que Kiss y su receptor se expresaron en menor grado cuando los animales se aproximaron a la pubertad que cuando eran recién nacidos o púberes. Por lo tanto, con base en información derivada de hembras primates y ratas, es poco probable que la variación en la respuesta de LH a Kiss-10 correspondiente a la edad de las becerras en nuestro estudio, se deba a cambios en la expresión de Kiss o de su receptor. Un posible mecanismo que explicaría la mayor respuesta de LH a Kiss-10 en becerras de 11 meses en comparación con las de 4 y 7 meses de edad, es sugerido por los datos generados por Castellano et al. (2006), quienes observaron que la liberación de LH es mayor en respuesta a Kiss-10 cuando las ratas tienen 15 días, que las de 5 ó 25 días de edad (lejanas y cercanas a la pubertad, respectivamente); a pesar de lo anterior, el aumento de GnRH inducido por la Kiss-10 no difirió en las tres etapas prepuberales mencionadas, lo que permite proponer que conforme se aproxima la edad al inicio de la pubertad aumenta la expresión de los receptores

de GnRH en los gonadotropos. Independientemente del mecanismo central que determine el nivel de respuesta de LH a la Kiss-10, nuestra información indica que aparentemente existen agentes señalizadores que cambian con la edad, modificando la respuesta a Kiss-10.

Una explicación posible al mayor aumento de LH resultante de la aplicación de Kiss-10 en becerras de 11 meses, se refiere a la posible influencia de la mayor concentración sérica de E2 observada en dichas becerras en comparación con las de 4 meses de edad. Entre las evidencias que soportan lo anterior se puede mencionar un trabajo (Whitlock et al., 2008) en el que vacas ovariectomizadas, inyectadas con Kiss-10 y E2, aumentaron las concentraciones plasmáticas de LH, en comparación con vacas en similar condición ovárica e inyectadas únicamente con Kiss-10. Así mismo, Sébert et al. (2010) observaron que la concentración plasmática de E2 fue mayor en ovejas que respondieron con una oleada de LH después de la aplicación de Kiss-10, en comparación con aquellas que no la mostraron. Varias evidencias generadas en roedores, primates y ovejas son discutidas por Clarkson et al. (2009), quienes a partir de ellas proponen que la expresión de Kiss es condicionada por la acción del E2, esteroide que actúa a través de sus receptores ER α presentes en las neuronas Kisspeptidérgicas encargadas de regular la liberación fásica de GnRH y consecuentemente de LH. Un mecanismo adicional del E2 podría efectuarse a nivel de los gonadotropos, células capaces de responder a una acción directa de la Kiss. Entre los datos producidos en favor de dichas acciones de Kiss y de E2 se mencionan los siguientes: se ha demostrado la expresión del receptor GPR54 en gonadotropos de cultivos primarios de células adenohipofisiarias provenientes de borregos

adultas (Smith, 2008); de manera similar, la expresión de receptores ER α y ER β ha sido demostrada en gonadotropos de rata (Childs y Unabia, 2001). Otro hallazgo efectuado en cultivos primarios de células de la adenohipófisis provenientes de papiones hembra, se refiere al aumento de la liberación de LH en respuesta a Kiss-10, al adicionar E2 al medio de cultivo (Córdoba-Chacón et al., 2010). Por su parte Ezzat et al. (2010) en un estudio *in vitro* encontraron que el E2 incrementa la sensibilidad de los gonadotropos a Kiss-10, estimulando la liberación de LH en células de la pituitaria de becerros de 7 semanas de edad. Lo discutido en el párrafo anterior y en las líneas previas, permite sugerir la existencia de un mecanismo de interacción positiva entre E2 y Kiss a dos niveles: de neuronas GnRHérgicas y de gonadotropos, además de los efectos que el E2 ejerce sobre las neuronas productoras de Kiss.

En el presente trabajo, encontramos una mayor concentración de IGF-I en el suero de las de las becerras de 11 meses al compararse con las de menor edad. Por tanto, IGF-I puede ser propuesto como un indicador de un ambiente metabólico favorable para el inicio de la pubertad en becerras. Lo anterior es factible, ya que en becerras de razas cárnicas se ha documentado que aumenta el IGF-I circulante unos días antes o al momento de la primera ovulación (Jones et al., 1991; Yelich et al., 1996). Así mismo, en ratonas prepúberes la administración de IGF-I adelantó la pubertad; en el mismo sentido, en ratonas transgénicas con mutaciones en el receptor para IGF-I de las neuronas GnRHérgicas, se retrasó la pubertad aún con la aplicación de IGF-I (Divall et al., 2010). Es probable que uno de los mecanismos del IGF-I para inducir la pubertad, sea potenciar el efecto de Kiss-10 en la secreción de LH, ya que en monos prepúberes (Hiney et al., 2010)

se observó que la administración de IGF-I indujo la expresión del gen Kiss-1 en el núcleo AVPV-del hipotálamo, pero no en las neuronas del ARC, lo que sugiere que IGF-I podría ejercer un efecto positivo, directo o indirecto, en las neuronas Kisspeptidérgicas encargadas de regular la secreción fásica de GnRH y por lo tanto de LH, mas no en las neuronas del ARC, mismas que han sido propuestas como moduladoras de la secreción tónica de las gonadotropinas hipofisarias (Navarro y Tena-Sempere, 2012).

Por lo anterior, es explicable que no se hayan detectado cambios en el patrón pulsátil de LH adjudicables a la Kiss-10. Alternativamente, las concentraciones séricas relativamente elevadas de IGF-I en las becerras de 11 meses, pudieron haber contribuido con un incremento más marcado de LH en respuesta a Kiss-10, en comparación con el observado en animales de 4 y 7 meses de edad. El IGF-I pudo haber actuado directamente en las neuronas productoras de GnRH, ya que existen evidencias de la expresión de receptores para IGF-I en dichas neuronas (DiVall et al., 2010). En un nivel descendente, es factible que incrementos en el IGF-I circulante estimulen a los gonadotropos para que liberen LH, ya que Adam et al. (2000) encontraron que la aplicación de IGF-I incrementó los niveles circulantes de LH en borregas; así mismo, dichos autores identificaron receptores para IGF-I en las porciones distal y tuberal de la adenohipófisis de dicha especie. Así mismo, en trabajos efectuados *in vitro* con células provenientes de la adenohipófisis de borregas (Adam et al., 2000) y de ratas (Kanematsu et al., 1991; Soldani et al., 1994), se registró un incremento en la liberación de LH al adicionar IGF-I al cultivo. Por su parte, los hallazgos referentes a la posibilidad de que el IGF-I circulante atraviese la barrera hematoencefálica en ratas (Bohannon 1988), y que al ingresar

al cerebro se acumule en el núcleo AVPV y la eminencia media (Reinhardt, Bondy 1994 y Hiney et al., 1996), le da significancia fisiológica a la acción potencial del IGF-I en hipotálamo y adenohipófisis. En conjunto, estos estudios dan pauta para sugerir que el IGF-I circulante puede actuar tanto en el hipotálamo como en la hipófisis, para modular la secreción de LH inducida por Kiss-10.

Finalmente la mayor respuesta de LH a Kiss-10 en becerras de 11 meses, pudo ser el resultado de una acción conjunta de IGF-I y E2, ya que Hiney et al., (2004) encontraron que en ratas prepúberes el IGF-I exógeno evocó un incremento en la LH sérica únicamente cuando las concentraciones séricas endógenas de E2 fueron superiores a 20pg/ml; los mismos investigadores disminuyeron significativamente la edad de las ratas a la pubertad cuando aplicaron conjuntamente IGF-I y E2, más no cuando administraron dichas hormonas por separado. Así mismo, dos grupos de investigadores (Xia et al., 2001; Hashizume et al., 2002) encontraron que la LH aumenta en sistemas de cultivo de células adenohipofisiarias bovinas y de ratas respectivamente, al agregar IGF-I o E2 al medio; no obstante al adicionar ambas hormonas se induce una mayor liberación de LH.

En vista de los reportes previos relacionados con los incrementos en los niveles sanguíneos de leptina observados al aproximarse la pubertad, tanto en ratas (Li et al., 1998) como en niñas (Martos-Moreno et al., 2006) y becerras (García et al., 2003); para nosotros fue sorprendente observar que las becerras de 11 meses de edad, quienes tuvieron una mayor respuesta de LH a Kiss-10, presentaran las concentraciones más bajas de leptina en suero. Concordando con nuestra observación, Maciel et al. (2004) determinaron que la leptina exógena no acelera

la pubertad en becerras ni incrementa la secreción de LH espontánea o estimulada por GnRH exógena. Los mismos autores y Hausman et al. (2012) después de analizar la literatura relacionada con leptina y pubertad en becerras, propusieron que la respuesta del eje gonadotrópico a leptina, depende del estado metabólico de los animales, ya que las hembras que han experimentado un período de balance negativo de energía o un período prolongado de alimentación deficiente, son más sensibles a los incrementos de leptina que individuos que han permanecido con dieta adecuada o con períodos deficitarios de energía menos prolongados (Zieba et al., 2003a y 2003b). Aparentemente dicho aumento de sensibilidad se debe a una mayor expresión de receptores para leptina en la adenohipófisis (Iqbal et al., 2000) e hipotálamo de borregas (Dyer et al., 1997) y tanto en hipotálamo como adenohipófisis de ratas (Zamorano et al., 1997). Con relación a esto, durante varios meses previos al inicio de nuestro estudio, se presentó insuficiencia de forrajes en los potreros donde pastorearon las becerras antes de ingresar a nuestro estudio. Consecuentemente, las becerras de mayor edad permanecieron por un período más largo (destete a inicio del trabajo) de restricción alimenticia, perdiendo peso y condición corporal durante un intervalo mayor en comparación con las más jóvenes. A partir de su entrada a los corrales (dos semanas previas a la aplicación de Kiss-10) donde se efectuó el estudio, todas las becerras recibieron una alimentación adecuada, por lo tanto asumimos que los animales de 11 meses tuvieron menos tiempo que las becerras de 7 y 4 meses de edad para recuperar el tejido adiposo perdido. Lo anterior pudiera ser la causa de una menor concentración sérica de leptina en las becerras de mayor edad. Si la leptina intervino en la respuesta de LH a Kiss-10, quizá su efecto se

debió a la diferencia de receptores para esa hormona a nivel central, tal como lo observaron en borregas Dyer et al. (1997).

No se registraron efectos de edad en la respuesta de FSH a Kiss-10 en este trabajo, fenómeno que puede estar asociado al control que ejercen varios efectores además de GnRH sobre su patrón de liberación (Phillips., 2005), a diferencia de LH, con respecto a la cual se ha documentado una mayor dependencia de GnRH que la FSH (Thackray et al., 2010). En la regulación de la liberación de FSH y de la capacidad de expresión de genes de FSH β , participa la activina a un nivel tan importante como la GnRH. Específicamente, la activina induce la transcripción de FSH β y como consecuencia aumenta la producción de FSH (Coss et al., 2010). Otros elementos que participan en la regulación de la liberación de FSH pero que no intervienen en la de LH, son proteínas antagonistas de la activina, tales como la inhibina y la folistatina (Phillips, 2005). Nuestros datos indican la posibilidad de que los mecanismos reguladores de FSH no cambien durante diferentes edades prepuberales y consecuentemente, el efecto de Kiss-10 es similar en becerras prepúberes entre 4 y 11 meses de edad. Lo anterior es apoyado por trabajos de análisis longitudinal efectuados en niñas, en los que se determinó la ausencia de variaciones significativas en concentraciones séricas de activina (Luisi et al., 2001) y folistatina (Chada et al., 2003).

Con respecto a los datos de GH, si se consideran las becerras que respondieron a Kiss-10, no se detectaron diferencias atribuibles a la edad en la magnitud de ninguna de las variables que describieron la respuesta de dicha hormona. No obstante, numéricamente, una menor proporción de becerras de 4 meses que respondieron a Kiss-10 con un incremento de GH y FSH, en comparación con las

de mayor edad. Si bien no encontramos una correlación significativa entre las variaciones de leptina, IGF-I o E2 con la respuesta de las citadas hormonas hipofisarias, pudiera ser factible la existencia de una interacción entre los niveles de IGF-I y E2 que fueron inferiores en las becerras de 4 meses con respecto a las de 11 meses de edad. De hecho, se ha documentado en niñas que las variaciones en cuanto a la tasa de crecimiento e inicio de la pubertad, se deben en parte a los efectos individuales de los estrógenos, la GH, el IGF-I y otros efectores no evaluados en el presente estudio, tales como el cortisol y las hormonas tiroideas (Rogol et al., 2002); así mismo, en vaquillas (Zieba et al., 2005), ratas y ratonas (Cheung et al., 2001) se ha propuesto que además de las interacciones de IGF-I y E2, existe una acción permisiva de la leptina para que la influencia de las demás hormonas involucradas en el inicio de la pubertad, ejerzan sus acciones tanto independientes como conjuntas. También se ha observado que los niveles séricos de GH, IGF-I e insulina varían entre individuos prepúberes, por influencia de su genética, de la dieta que reciben y su estado nutricional (Rogol et al., 2002; Zieba et al., 2005). Con relación a la respuesta de GH a Kiss-10, en la literatura referente a la pubertad, únicamente hemos encontrado tres trabajos, dos en becerras y uno en cerdas; en estas últimas, la Kiss-10 no indujo un aumento de las concentraciones séricas de GH, y aunque los autores no lo declaran, aparentemente ninguna cerda respondió a la Kiss (Lents et al., 2008); en cuanto a las becerras, los resultados son contrastantes, ya que mientras Kadokawa et al. (2008) demostraron una marcada respuesta de GH a las Kiss-10, Ezzat et al. (2009) no detectaron una respuesta significativa de dicha hormona a la Kiss exógena. Como fue el caso de LH y FSH, aparentemente somos los primeros en

registrar la proporción de hembras prepúberes que responden a Kiss-10 con una respuesta de GH. Debido a la escasez de información sobre los efectos de Kiss en las hormonas involucradas en el inicio de la pubertad, sus interacciones y múltiples factores ambientales y genéticos que los modulan tan solo en los bovinos, es claro que varios de los fenómenos discutidos previamente distan mucho de haber sido aclarados.

CONCLUSIONES:

En resumen, todas las becerras respondieron a Kiss-10 con un incremento de LH sérica, sin embargo la magnitud de la respuesta fue mayor en las becerras de 11 meses que en las de 4 y 7 meses de edad; consecuentemente nuestra primera conclusión es que para evocar un aumento significativo de LH la Kisspeptina es suficiente; sin embargo, la calidad de la respuesta de LH depende de otros agentes señalizadores que varían con la edad de las hembras bovinas prepúberes. Así mismo y debido a que se registró una mayor concentración sérica de IGF-I y E2, coincidiendo con un menor nivel sérico de leptina en las becerras de 11 meses, con respecto a las de 4 y 7 meses de edad, concluimos que dichos elementos pueden ser algunos de los efectores implicados en la magnitud de respuesta de LH a Kiss-10.

El porcentaje de becerras con un incremento de GH y FSH en respuesta a Kiss-10, fue menor en las de 4 y 7 meses de edad respectivamente, con respecto a las de 11 meses; aunque estas diferencias no fueron significativas, nos permiten emitir otra conclusión: aparentemente se requiere la acción de otros agentes moduladores que varían con la edad para que ocurra la respuesta de GH y FSH a

Kiss-10; pero una vez que los animales son capaces de responder, las características de liberación de las citadas hormonas no son afectadas por esos moduladores fisiológicos.

REFERENCIAS:

1. Adam, C.L., Gadd, T.S., Findlay, P.A., Wathes, D.C. 2000. IGF-I stimulation of luteinizing hormone secretion, IGF-binding proteins (IGFBPs) and expression of mRNAs for IGFs, IGF receptors and IGFBPs in the ovine pituitary gland. *J Endocrinol.* 166, 247–254.
2. Arreguin-Arevalo, J.A., Lents, C.A., Farmerie, T.A., Nett, T.M., Clay, C.M. 2007. Kiss-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci.* 101, 265–275.
3. Bohannon, N.J., Corp, E.S., Wilcox, B.J., Figlewicz, D.P., Dorsa, D.M., Baskin, D.G. 1988. Characterization of insulin-like growth factor I receptors in the median eminence of the brain and their modulation by food restriction. *Endocrinology.* 122,1940-1947.
4. Byerly, D. J., R. B. Staigmiller, J. G. Berardinelli, Short. R. E. 1987. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *J. Anim. Sci.* 65, 645–650.
5. Calderón, R.R.C., Villa-Godoy, A., Lagunes, L.J. 1996. Determinación ultrasonográfica de la primera ovulación: Asociación con la presentación de ciclos estrales regulares en vaquillas Cebú y Suizo Pardo mantenidas en el trópico. *Tec Pecu Mex* 34:79-88.
6. Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Castano, J.P., Malagon, M.M., Aguilar, E., Dieguez, C., Magni, P., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2006. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of

- kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat, *Mol Cell Endocrinol.* 75, 257–258.
7. Chada, M., Průša. R., Bronský, J., Pechová, M., Kotaška K., Lisá, L. 2003. Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and estradiol and their relationship to the regulation of follicle development in girls during childhood and puberty. *Physiol. Res.* 52: 341-346.
 8. Cheung, C.C., Thornton, J.E, Nurani, S.D., Clifton, D.K., Steiner R.A. 2001, A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinology.*74,12-21.
 9. Childs, G.V., Unabia, G. 2001. Epidermal growth factor and gonadotropin-releasing hormone stimulate proliferation of enriched population of gonadotropes. *Endocrinol.* 142, 847–853.
 10. Clarkson, J., Boon, W.C., Simpson, R.E., Herbison, E.A. 2009. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinol.* 150, 3214–3220
 11. Córdoba-Chacon, J., Luque, M.R., Gahete, D.M., Kineman, D.R., Tena-Sempere, M., Castaño, P.J. 2010. Kisspeptin selectively increases LH and GH, but not FSH, ACTH, PRL or TSH, release in primary pituitary cell cultures from a non-human primate (*Papio anubis*) via distinct signaling pathways and under influence of sex steroids. *Endocrine Abstracts.* 22, 655.

12. Coss, D., Mellon, P.L., Thackray, V.G. 2010. A FoxL in the Smad house activin regulation of FSH. *Trends Endocrinol Metab.* 21, 562-568.
13. DeRoux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to a loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci.* 100, 10972–10976.
14. DiVall, S.A., Williams, T.R., Carver, S.E., Koch, L., Brüning, J.C., Kahn, C.R., Wondisford, F., Radovick, S., Wolfe, A. 2010. Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. *J Clin Invest.* 120, 2900-2909.
15. Dyer, C.J., Simmons, J.M., Matteri, R.L., Keisler, D.H. 1997. Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domest Anim Endocrinol.* 14, 119-28.
16. Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G.A. 1989. Body condition scoring chart for holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 72, 68-78.
17. Evans ACO, Currie WD, Rawlings NC. 1992. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil* 96:847–855.
18. Ezzat, A.A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Yamashita, T., Hirata, T.I., Sawai, K., Hashizume T. 2009. Characteristics of the stimulatory effect of

- Kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *Reprod. Dev.* 55, 650–654
19. Ezzat, A.A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Goto, Y., Nakajima Y., Jin J., Yamashita, T., Sawai, K., Hashizume, T. 2010. The role of sexual steroid hormones in the direct stimulation by Kisspeptin-10 of the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin from bovine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci.* 121, 267–272.
20. Ferrell CL. 1982. Effects postweaning rate of gain on onset of puberty and productive performance of heifers of different breeds. *J Anim Sci* 55:1272-1283.
21. Findeisen, M., Rathmann, D., Beck-Sickinger, A. G. 2011. RFamide peptides: structure, function, mechanisms and pharmaceutical potential. *Pharmaceuticals.* 4, 1248-1280.
22. García de M.E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köeppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de geografía, UNAM, Larios, México, D.F.
23. García, M.R., Amstalden, M., Williams, S.W., Stanko, R.L., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Nizielski, S.E., Williams, G.L. 2002. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J Anim Sci.* 80, 2158-67.

24. Garcia, M.R., Amstalden, M., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Williams, G.L. 2003. Age at puberty, total fat and conjugated linoleic acid content of carcass, and at four circulating metabolic hormones in beef heifers fed a diet high in linoleic acid beginning months of age. *J Anim Sci.* 81, 261-268.
25. Hall, J.B., Staigmiller, R.B., Bellows, R.A., Short, R.E., Moseley, W.M., Bellows, S.E. 1995. Body composition and metabolic profiles associated with puberty in beef heifers. *J Anim Sci.* 73, 3409-3420.
26. Hashizume, T., Kumahara, A., Fujino, M., Okada, K. 2002. Insulin-like growth factor I enhances gonadotropin releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from bovine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci.* 70, 13–21.
27. Hausman, G.J., Barb, C.R., Fairchild, B.D., Gamble, J., Lee-Rutherford L. 2012. Expression of genes for interleukins, neuropeptides, growth hormone receptor, and leptin receptor in adipose tissue from growing broiler chickens. *Domest Anim Endocrinol.* 43, 260–263.
28. Hermite, M.L., Niswender, G.D., Reichert, L.E. Jr., Midgley, A.R. Jr. 1972. Serum follicle-stimulating hormone in sheep as measured by radioimmunoassay. *Biol Reprod.* 6, 325-33.
29. Hiney, J.K., Srivastava, V., Nyberg, C.L., Ojeda, S.R., Dees, W.L. 1996. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinol.* 137, 3717-3727.

30. Hiney, J.K., Srivastava, V.K., Dees Les W, 2010. Insulin-like growth factor-1 stimulation of hypothalamic *KiSS-1* gene expression is mediated by Akt: effect of alcohol. *Neuroscience*. 166, 625–632.
31. Hiney, J.K., Srivastava, V., Dearth, R.K., Dees, W.L., 2004, Influence of estradiol on insulin-like growth factor-1-induced luteinizing hormone secretion. *Brain Res*. 1013, 91–97.
32. Iqbal, J., Pompolo, S., Considine, R. V., Clarke, I. J. 2000. Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine pituitary gland. *Endocrinol*. 141, 1515–1520.
33. Jones, E.J., Armstrong, J D., Harvey R.W. 1991. Changes in metabolites, metabolic hormones, and luteinizing hormone before puberty in Angus, Braford, Charolais, and Simmental heifers. *J Anim Sci*. 69, 1607-1615.
34. Kadokawa, H., Matsui, M., Hayashi, K., Matsunaga, N., Kawashima, C., Shimizu, T., Kida, K., Miyamoto, A. 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *J. Endocrinol*. 196, 331–334.
35. Kanematsu, T., Irahara, M., Miyake, T., Shitsukawa, K., Aono, T. 1991. Effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-pituitary axis in vitro. *Acta Endocrinol*. 125, 227-233.
36. Kotani, M., Detheux, M., Vandenberghe, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez- Huerta, N., Vandepu,

- F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N, Vassart, G., Parmentier, M. 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* 276, 34631–34636.
37. Lents, C.A., Heidorn, N.L., Barb, C.R., Ford, J.J. 2008. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction* 135, 879–887.
38. Li, H., Matheny, M., Tu, N.M., Scarpace, P.J. 1998. Aging and fasting regulation of leptin and hypothalamic neuropeptide Y gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275, 405-411.
39. Luisi, S., Lombardi, I., Florio, P., Cobellis, L., Iughetti, L., Bernasconi, S., Genazzani, A. R., Petraglia F. 2001. Serum activin A levels in males and females during pubertal development. *Gynecol Endocrinol.* 15, 1-4.
40. Luque, R.M., Kineman, R.D., Tena-Sempere, M. 2007. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinol.* 148, 4601-4611.
41. Maciel, M. N., Zieba, D. A., Amstalden, M., Keisler, D. H., Neves J. P., Williams, G. L. 2004. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: Effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. *J Anim Sci.* 82, 2930-2936.

42. Madgwick, S., Evans, A.C., Beard, A.P. 2005. Treating heifers with GnRH from 4 to 8 weeks of age advanced growth and the age at puberty. *Theriogenol.* 63, 2323-33.
43. Martos-Moreno, G.A., Barrios, V., Soriano-Guillén, L., Argente, J. 2006. Relationship between adiponectin levels, acylated ghrelin levels, and short-term body mass index changes in children with diabetes mellitus type 1 at diagnosis and after insulin therapy. *Eur J Endocrinol.* 155,757-61.
44. Mead, E., Maguire, J.J., Kuc, R.E., Davenport, A.P., 2007. Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. *British J Pharmacol.* 151,1143-1153.
45. Meirelles CF, King GJ, Barnabe RC, Abdalla AL, Vitti DMSS. 1991. Reproductive performance of three brazilian beef breeds. *LRRD.*
46. Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A, Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L., Harrison, D.C., 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 276, 28969–28975.
47. Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, J.M., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M. 2004. Advanced vaginal opening and precocious activation of

- the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 561, 379–386.
48. Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar. E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2005a. Effects of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54, on Follicle-Stimulating Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinol.* 146, 1689-97.
49. Navarro V.M., Tena-Sempere M., 2012. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol.* 8,40-53.
50. Nett, T.M, Akbar, A.M., Phemister, R.D., Holst, P.A., Reichert, L.E., Niswender, Jr., G.D., 1975. Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the beagle bitch. *Proc Soc Exp Biol Med.* 252, 134-139.
51. Ojeda, S.R., Urbanski, H.F., Costa, M.E., Hill, D.F., Moholt-Siebert, M. 1990. Involvement of transforming growth factor in the release of luteinizing hormone-releasing hormone from the developing female hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci.* 87, 9698–9702.
- 52., S.R., Urbanski, H.F. 1994. Puberty in the rat, en: Knobil E., Neill J.D. (Eds.). *The physiology of reproduction*, AP. New York, pp 363–409.
53. Ojeda, S.R., Lomniczi, A., Mastronardi, C., Heger, S., Roth, C., Parent, A.S., Matagne, V., Mungenast, A.E. 2006. Minireview: the neuroendocrine

- regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach?
Endocrinol. 147, 1166-1174.
54. Phillips, J.D. 2005. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domest Anim Endocrinol.* 28, 1–16
55. Reinhardt, R.R., Bondy, C.A. 1994. Insulin-like growth factors cross the blood brain barrier. *Endocrinol.* 135, 1753-1761.
56. Ríos, U.A., Vega, M.V.E., Montaña, B.M., Lagunes, L.J., Rosete, F.J.V. 1996. Comportamiento reproductivo de vacas Brahman, Indobrasil y cruza F1 Angus, Charolais, Hereford y Suizo Pardo x Cebú y peso al destete de las crías. *Téc. Pec. Méx.* 34: 20-28.
57. Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2008. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol.* 29, 48-69.
58. Roa J., Tena-Sampere M. 2007. Kiss-1 system and reproduction: Comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *General and comparative Endocrinology.* 153, 132 – 140.
59. Rogol, A. D., Roemmich, J. N., Clark, P. A. 2002. Growth at Puberty. *J Adolesc Health.* 31, 192–200.
60. Roseweir, A.K., Millar, R.P. 2009. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum. Reprod. Update.* 15, 203–212.
61. SAS, 2004. User's Guide Statistics (Release 9.1). SAS Institute, Cary, NC, USA

62. Sébert, M.E., Lomet, D., Saïd, S.B., Monget, P., Briant, C., Scaramuzzi, R.J., Caraty, A. 2010. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory; LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol. *Domest Anim Endocrinol.* 38, 289-298.
63. Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda SR, Plant, T.M. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci.* 102, 2129–2134.
64. Simpson, R.B., Armstrong, J.D., Harvey, R.W., Miller, D.C., Heimer, E.P. Campbell, R.M. 1991. Effect of active immunization against growth hormone-releasing factor on growth and onset of puberty in beef heifers. *J Anim Sci.* 69, 4914-4924.
65. Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinol.* 146, 3686-92.
66. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. 2006. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci.* 26, 6687-94.
67. Smith, J.T., Coolen, L.M., Kriegsfeld, L.J., Sari, I.P., Jaafarzadehshirazi, M.R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R.L., Tilbrook. A.J., Ubuka, T., Bentley, G.E., Clarke, I.J., Lehman, M.N. 2008. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-

- releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*. 149, 5770-82.
68. Soldani, R., Cagnacci, A., Yen, S.S.C. 1994. Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II enhance basal and gonadotropin releasing hormone stimulated luteinizing hormone release from rat anterior pituitary cells *in vitro*. *Eur J Endocrinol*. 131, 641–645.
69. Terasawa, E., Fernandez, D.L. 2001 Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 22:111–151
70. Thackray, V.G., Mellon, P.L., Coss, D. 2010. Hormones in synergy: regulation of the pituitary gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol*. 314, 92-203.
71. Velázquez, S.F., Garcés, Y.P., González, P.E. 2000a. Efecto de grasa dorsal, condición y composición corporal sobre edad y peso al establecimiento de la pubertad en vaquillas en el trópico. XXXVI RNIP. Sonora. p.16.
72. Velázquez SF, Garcés Y.P, González PE. 2000b. Efecto de la suplementación en pastoreo y grupo genético sobre el establecimiento de la pubertad de vaquillas en el trópico. XXXVI RNIP. Sonora. p.15.
73. Verduzco, A., 2004. Efecto de la dieta y el amamantamiento sobre las concentraciones séricas de leptina y hormona del crecimiento en vacas de doble propósito, y su relación con el consumo voluntario, la producción y el anestro posparto (Tesis de Maestría). México (D.F). UNAM,

74. Villa-Godoy A, Arreguín AJA. 1993. Tecnología disponible para optimizar el desempeño reproductivo en hembras bovinas del trópico. Memorias del XVI Simposium de Ganadería Tropical Veracruz, Ver. 55-84.
75. Wildman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E., Boman, R.L., 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J Dairy Sci.* 65, 495-501.
76. Wiltbank, J. N., C. W. Kasson and J. E. Ingalls. 1969. Puberty in crossbred and straightbred beef heifers. *J. Anim. Sci.* 29, 602.
77. Whitlock, B.K., Daniel, J.A., Wilborn, R.R., Rodning, S.P., Maxwell, H.S., Steele, B.P., Sartin, J.L., 2008. Interaction of estrogen and progesterone on kisspeptin-10-stimulated luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Neuroendocrinology.* 88, 212-215.
78. Xia, Y.X., Weiss, J.M., Polack, S., Diedrich, K., Ortmann, O., 2001. Interactions of insulin-like growth factor-I, insulin and estradiol with GnRH-stimulated luteinizing hormone release from female rat gonadotrophs. *Eur J Endocrinol.* 144, 73-9.
79. Yelich, J.V., Wettemann, R.P., Marston, T.T., Spicer, L.J., 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domest Anim Endocrinol.* 13, 325-38.

80. Yoshioka, K., C. Suzuki, S. Arai, S. Iwamura, and H. Hirose. 2001. Gonadotropin-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of the heifer during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 64, 563–570.
81. Zamorano, P.L., Mahesh, V.B., De Sevilla, L.M., Chorich, L.P., Bhat, G.K., Brann, D.W., 1997. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology.* 65, 223-228.
82. Zieba, D.A., Amstalden, M., Maciel, M.N., Keisler, D.H., Raver, N., Gertler, A., Williams, G.L. 2003a. Divergent effects of leptin on luteinizing hormone and insulin secretion are dose dependent. *Experimental Biology and Medicine.* 228, 325–33.
83. Zieba, D.A., Amstalden, M., Morton, S., Gallino, J.L., Edwards, J.F., Harms, P.G., Williams, G.L. 2003b. Effects of leptin on basal and GHRH-stimulated GH secretion from the bovine adenohypophysis are dependent upon nutritional status. *Journal of Endocrinology.* 178, 83–89.
84. Zieba, D.A., Amstalden, M., Williams, G.L., 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. *Domest Anim Endocrinol.* 29, 166-85.

| | |
|----|-----|
| 4 | 1,9 |
| 7 | 1,9 |
| 11 | 1,3 |

