



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría en Ciencias (Neurobiología)**

**Instituto de Neurobiología**

**Expresión sexualmente dimórfica de la prolactina y el neuropéptido kisspeptina  
durante la maduración sexual en ratones**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

**BIOL. LUIS ÁNGEL MORALES LAURRABAQUIO**

Directora de Tesis:

**Dra. Rebeca Corona García-Cabral**

**Dra. María Teresa Morales Guzmán**

Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla

Comité Tutor

**Dra. Marie Christine Aline Bedos**

ENES Unidad Juriquilla

**Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez**

Instituto Nacional de Perinatología

Querétaro, Qro., abril 2021



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.

## **Reconocimientos**

El presente trabajo de maestría se realizó en el Laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla, bajo la dirección de la Dra. Rebeca Corona García-Cabral y la Dra. María Teresa Morales Guzmán.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM con los proyectos IA202218, IA200820 e IN204718, así como por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el donativo A1S8948. El autor contó con beca del CONACYT (920791).

Contó con la guía constante del Comité Tutor integrado por:

**Dra. Rebeca Corona García-Cabral**  
**Dra. María Teresa Morales Guzmán**  
**Dra. Marie Christine Aline Bedos**  
**Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez**

Adicionalmente, a los integrantes del Jurado Examen integrado por:

**Dra. Aurea Orozco Rivas**  
**Dra. Rebeca Corona García-Cabral**  
**Dr. José Luis Quintanar Stephano**  
**Dra. Marie Christine Aline Bedos**  
**Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández**

, por las observaciones y comentarios para el mejoramiento de esta Tesis.

Agradecemos el apoyo técnico brindado por el personal del INB:

A la Dra. Preethi Jayakumar, investigadora postdoctoral, por la realización de los experimentos de PCR.

En su momento a la Técnico Académico del laboratorio D-05: Biol. María Eugenia Ramos Aguilar.

En todos trámites administrativos y académicos realizados en la Unidad de Enseñanza: M. en C. Leonor Casanova Rico y a la Dra. Nuri Aranda.

En las videoconferencias y enlaces en exámenes y clases: Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala.

A la Dra. Alejandra Castilla León por las charlas y consejos en el manejo y cuidado de los animales. También agradecemos al M.V.Z. Martín García Servín y a la Dra. María Antonieta Carbajo Mata.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández y a la Dra. Ericka Alejandra De los Ríos Arellano, por el apoyo brindado.

En la unidad de Proteogenómica del instituto a la responsable M. en C. Adriana González Gallardo, por el apoyo y consejos brindados y todo lo relacionado con PCR y técnicas de biología molecular.

Continuando con los agradecimientos y reconocimientos hasta la bella, caótica y única CDMX donde estan ustedes y siempre estan al pendiente de mí. Mis padres, hermanos, familiares y amigos.

Es un gusto reconocer a la *Dra. B. Leyva* compañera, colega y amiga, así mismo, a la *Dra. W. Alvarez* por sus múltiples colaboraciones.

Finalmente, y no menos importante agradezco a mis amigos y compañeros de generación *19-21* por compartir esta etapa de mi formación y de mi vida, y a ustedes por estar ahí y convivir en Priv. de Juriquilla #123, Psiq. Alejandra C., Arq. Anel G., Ing. Mary Jane y M.C. Jorge S.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	8
<b>Antecedentes</b> .....	10
<b>El eje reproductivo y su regulación</b> .....	10
<b>Maduración del eje reproductivo</b> .....	12
<b>El neuropéptido kisspeptina</b> .....	14
<b>Regulación de la participación de las neuronas kisspeptinérgicas en la reproducción</b> .....	17
<b>Neuronas kisspeptinérgicas del núcleo arqueado</b> .....	19
<b>Neuronas kisspeptinérgicas del núcleo anteroventral periventricular</b> .....	22
<b>Neuronas kisspeptinérgicas de la amígdala medial posterodorsal</b> .....	24
<b>Dimorfismo sexual en la expresión del neuropéptido kisspeptina</b> .....	26
<b>La hormona prolactina</b> .....	28
<b>Síntesis y secreción de la prolactina</b> .....	29
<b>Receptor de prolactina</b> .....	31
<b>Acción de la prolactina a través de su receptor</b> .....	34
<b>Prolactina en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas</b> .....	35
<b>Dimorfismo sexual en la expresión de la prolactina</b> .....	38
<b>Interacción entre la prolactina y las neuronas kisspeptinérgicas</b> .....	39
<b>Justificación</b> .....	41
<b>Hipótesis</b> .....	42
<b>Objetivos</b> .....	42
<b>General</b> .....	42
<b>Particulares</b> .....	42
<b>Materiales y método</b> .....	43
<b>Modelo experimental</b> .....	43
<b>Diseño experimental</b> .....	43
<b>Hembras</b> .....	43
<b>Machos</b> .....	45
<b>Cuantificación de la expresión del ARNm por qPCR</b> .....	46
<b>Disección del tejido para el análisis de qPCR</b> .....	46

<b>Extracción, purificación y cuantificación de <i>ARNm</i></b> .....	47
<b>Retrotranscripción</b> .....	48
<b>qPCR en tiempo real</b> .....	49
<b>Análisis estadístico</b> .....	49
<b>Resultados</b> .....	50
<b>Hembras</b> .....	50
<b>Machos</b> .....	55
<b>Dimorfismo sexual</b> .....	60
<b>Discusión</b> .....	68
<b>Conclusiones</b> .....	76
<b>Anexo 1</b> .....	78
<b>Anexo 2</b> .....	79
<b>Referencias</b> .....	80

## Resumen

La pubertad representa el inicio de un periodo de maduración sexual, el cual se acompaña de la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El gen *Kiss1* codifica al neuropéptido kisspeptina, que es un poderoso activador de las neuronas GnRH. Las neuronas kisspeptinérgicas expresan el receptor de prolactina (PRL-R) y es activado en presencia de la prolactina (PRL). Varios estudios han indicado que la PRL puede modular el eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-gónadas actuando sobre poblaciones específicas de neuronas hipotalámicas que expresan el gen *Kiss1*. En el cerebro, el neuropéptido kisspeptina se expresa predominantemente en dos áreas del hipotálamo, el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) y el núcleo arqueado (ARC). Las neuronas kisspeptinérgicas en estas dos regiones hipotalámicas están reguladas diferencialmente por esteroides sexuales, tanto en etapas tempranas del desarrollo como en la edad adulta, y también muestran diferentes patrones de expresión, siendo mayor la expresión de estas neuronas en hembras que en machos. Aunado a esto se sabe que la kisspeptina también se expresa en la amígdala medial posterodorsal (MePD) y en otras pequeñas regiones cerebrales hasta la etapa adulta en roedores, sin embargo, en estas regiones no se ha reportado una expresión sexualmente dimórfica. En este proyecto, el dimorfismo sexual fue la parte medular de investigación, porque nos permitió comparar la expresión del gen *Kiss1* y del gen de la prolactina (*Prl*) en el inicio de la pubertad y durante la maduración sexual en ratones. Para ello en el presente trabajo, se realizó la evaluación de la expresión basal de cuatro genes indispensables para la reproducción en el inicio de la pubertad, durante la madurez sexual y en la etapa adulta, en hembras y en machos: *Prl*, receptor de prolactina (*Prlr*), *Kiss1* y receptor de kisspeptina (*Kiss1r*). De acuerdo con nuestros resultados en las tres etapas de maduración sexual, la expresión de *Kiss1* es mayor en el hipotálamo de hembras, a diferencia de la MePD, en donde la expresión del gen *Kiss1* se mantuvo constante en las diferentes etapas de maduración sexual. Los niveles de expresión relativa de ARNm de *Prl*, *Prlr* y *Kiss1r* en el hipotálamo y en la MePD se mantuvieron constantes en las diferentes etapas de maduración sexual independientemente del sexo.

## Abstract

Puberty represents the beginning of a period of sexual maturation and begins with the hypothalamic secretion of gonadotropin releasing hormone (GnRH) regulated by kisspeptineric neurons encoded by the *Kiss1* gene, which is a powerful activator of GnRH neurons. The kisspeptineric neurons express the prolactin receptor (PRL-R) and are activated by prolactin (PRL). Several studies have indicated that PRL can modulate the reproductive axis (hypothalamic-pituitary-gonads) by acting on specific populations of hypothalamic neurons that express the *Kiss1* gene. In the brain, the neuropeptide kisspeptin is predominantly expressed in two areas of the hypothalamus, the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and the arcuate nucleus (ARC). Kisspeptineric neurons in these two hypothalamic regions are differentially regulated by sexual steroids, both in early stages of development and in adulthood, showing different expression patterns, being the expression of this neurons higher in females than in males. In addition to this, it is known that kisspeptin is also expressed in the posterodorsal medial amygdala (MePD) and in other small brain regions until adulthood in rodents, however, in these regions no dimorphic expression was reported. Sexual dimorphism is the core part of the present research, which is why we were interested in evaluating the participation of the genes *Kiss1* and prolactin (*Prl*) at the beginning of puberty and during sexual maturation of female and male mice. For this, in the present work, an evaluation of the basal expression of four essential genes for reproduction at the beginning of puberty, during sexual maturity and in adulthood, in females and males was carried out: *Prl*, prolactin receptor (*Prlr*), *Kiss1* and kisspeptin receptor (*Kiss1r*). According to our results *Kiss1* expression is higher in the hypothalamus of females in the three stages of sexual maturation. In the MePD, the expression of the *Kiss1* gene remained constant in the different stages of sexual maturation. The relative amount of *Prl*, *Prlr* and *Kiss1r* mRNA in the hypothalamus and in the MePD remain constant at different stages of sexual maturation regardless of sex.



## Introducción

La reproducción es una función indispensable para la perpetuación de la especie y está regulada por el eje reproductivo integrado por el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas (HHG) (Pinilla et al., 2012). La secreción hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se ha establecido sólidamente como la vía clave que inicia y controla la función reproductiva al estimular la liberación de gonadotropinas desde el hipotálamo (Hrabovszky et al., 2010).

El inicio de la pubertad marca una gran diferencia en las funciones y respuestas fisiológicas, que coincide con la activación de los receptores de kisspeptina (KISS1R), localizados en las neuronas GnRHérgicas (Clarkson et al., 2017). El papel estimulante de la kisspeptina en la pubertad revolucionó la comprensión actual de la regulación neuroendocrina de la reproducción (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). La kisspeptina, un neuropéptido hipotalámico codificado por el gen *Kiss1*, es un neuromodulador que actúa estimulando la secreción pulsátil de la GnRH, que a su vez facilita la secreción de gonadotropinas de la hipófisis anterior (Pinilla et al., 2012).

La liberación pulsátil de GnRH mediada por kisspeptina depende de los esteroides sexuales. El estradiol, la progesterona y la testosterona modulan la expresión del ARNm de *Kiss1* y la actividad de la kisspeptina en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV) como en el núcleo arqueado (ARC) del hipotálamo a través de receptores a esteroides sexuales (Smith et al., 2005, 2006). Además, de estas dos poblaciones hipotalámicas de neuronas kisspeptinérgicas, en la amígdala medial posterodorsal (MePD), hay una tercera población de neuronas que expresan *Kiss1*. Sin embargo, esta expresión solo se ha reportado en la etapa adulta (Kim et al., 2011). Estas neuronas kisspeptinérgicas de MePD participan en la regulación de la reproducción al igual que las del hipotálamo (Comninou et al., 2016), y están comprometidas con el comportamiento social y la información de olores sexualmente relevantes para coordinar el eje HHG (Pineda et al., 2017).

Existe un dimorfismo sexual en la expresión de neuronas kisspeptinérgicas en el hipotálamo, siendo mayor su expresión en las hembras que en los machos (Herbison, 2008). Las neuronas kisspeptinérgicas son sensibles a la retroalimentación de los esteroides sexuales y a las

señales metabólicas y se reconoce a la kisspeptina como un factor integrador crucial que regula el inicio de la pubertad, la secreción de gonadotropinas y el control de la reproducción (Pinilla et al., 2012).

La prolactina (PRL) también es una hormona clave en el control de la reproducción (Goffin et al., 2002; Krüger et al., 2005). La PRL puede modular el eje HHG al actuar sobre neuronas kisspeptinérgicas hipotalámicas a través del receptor de PRL (PRL-R) (Kokay et al., 2011; Brown et al., 2014; Araujo-Lopes et al., 2014; Donato y Frazao, 2016). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se demostró como las variaciones de los niveles de PRL durante la etapa juvenil temprana alteran el periodo de pubertad de una manera sexualmente dimórfica, retrasando su inicio en las hembras, pero no en los machos, sugiriendo la relevancia que tiene la PRL en la maduración sexual (Corona et al., 2020).

De acuerdo con la literatura podemos plantear que el inicio de la pubertad en ratones hembra y macho comienza con la secreción hipotalámica de GnRH y esto está regulado por neuronas kisspeptinérgicas que expresan el PRL-R y son activados por PRL. Por esta razón, resulta de interés evaluar si, durante la maduración sexual, junto con el establecimiento sexualmente dimórfico de las neuronas kisspeptinérgicas, se establece también una expresión diferencial de otros actores importantes como el KISS1R, que se expresa en las neuronas de GnRH y que es esencial para el inicio de la pubertad y para el mantenimiento de la etapa reproductiva, así como la expresión del PRL-R en las neuronas kisspeptinérgicas. En el presente trabajo se cuantificó el nivel de expresión de ARNm de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* durante las etapas más representativas de la maduración sexual de ratones hembra y macho.

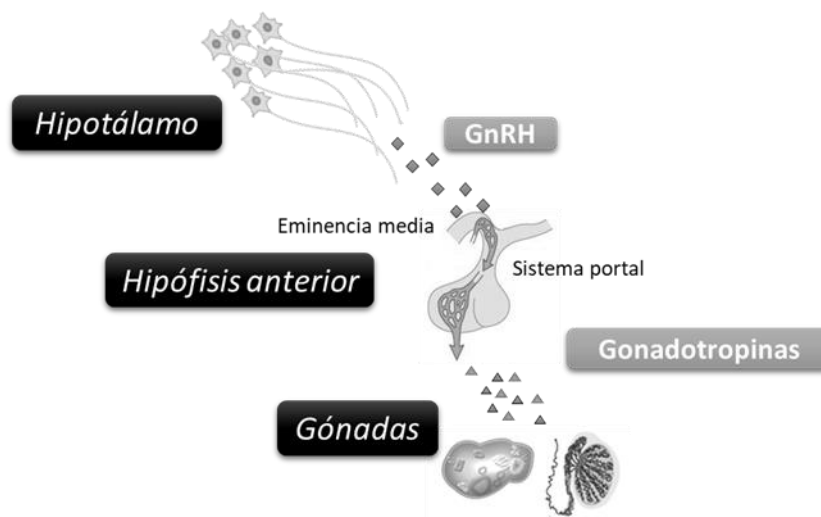
## Antecedentes

### El eje reproductivo y su regulación

La reproducción es una función indispensable para la perpetuación de la especie y está bajo el control del eje reproductivo que está integrado por el eje HHG. Este eje integra diversas señales internas y externas que son procesadas para regular la función reproductiva (**Figura 1**) (Pinilla et al., 2012).

La función del eje HHG en los mamíferos se basa principalmente en la interacción dinámica de señales esenciales que surgen del hipotálamo medio-basal, principalmente en el AVPV, en el ARC y el área preóptica anterior (POA), donde un grupo de neuronas hipotalámicas sintetizan y liberan a la GnRH que es liberada en la eminencia media para estimular la secreción de gonadotropinas de la glándula hipófisis (Wray, 2010; McArdle y Roberson, 2014; Clavijo y Hsiao, 2018). Las células neurosecretoras hipotalámicas GnRHérgicas producen y liberan a GnRH de forma pulsátil en la circulación portal hipotálamo-hipofisaria, llegando posteriormente a la glándula hipófisis anterior, donde estimula la síntesis y liberación de gonadotropinas (Kaprara y Huhtaniemi, 2018).

Los receptores de la GnRH se encuentran en las membranas citoplasmáticas de los gonadotropos ubicados en la hipófisis anterior, la interacción ligando-receptor favorece la regulación de conductas reproductivas y en la promoción de la gametogénesis. Las gonadotropinas: hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH), son liberadas a la circulación sistémica hasta llegar a su órgano blanco las gónadas (ovarios y testículos). La LH promueve la síntesis de hormonas esteroideas en las gónadas [progesterona ( $P_4$ ), testosterona (T) y estradiol ( $E_2$ )] y proteicas (activina e inhibina). La FSH promueve el crecimiento y diferenciación de los óvulos y espermatozoides, En conjunto, LH y FSH promueven la ovulación en hembras y la espermatogénesis en machos (Prieto et al., 2002; Herbison, 2016; McArdle y Roberson, 2014).



**Figura 1. Representación esquemática de los principales componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas que controla la reproducción.** La secreción de GnRH es pulsátil y espontánea en la eminencia media. Actúa sobre una población de células de la hipófisis anterior, los gonadotropos, los cuales sintetizan y liberan a las gonadotropinas LH y FSH, ambas hormonas actúan sobre las gónadas para la maduración de los gametos, síntesis de hormonas sexuales y la regulación del eje HHG. Modificado de Walker y Gore, 2011.

En las gónadas se llevan a cabo dos procesos diferentes que consisten en la producción de gametos (gametogénesis) y la producción de hormonas (esteroidogénesis). Estos dos procesos ocurren tanto en hembras como en machos. El sistema reproductivo de la hembra es más complejo que el del macho, debido a dos distintas funciones reproductivas que tiene que llevar a cabo: 1) la formación de gametos y el control de la fertilidad, y 2) el mantenimiento del desarrollo del ovocito fecundado (óvulo) durante la preñez. Estas dos funciones requieren diferentes ambientes endocrinos que involucran la participación de diversas hormonas, siendo las hormonas determinantes el  $E_2$ , producido por el folículo, y la  $P_4$ , que es sintetizada en el cuerpo lúteo (y posteriormente la placenta) (Goodman, 2015). La LH producida en la hipófisis anterior y transportada por la circulación general participa en la formación y función del cuerpo lúteo, así como en la ovulación en las hembras, y en los machos, promueve la producción de T por las células de Leydig en el testículo. Por otro lado, en machos, la FSH estimula la espermatogénesis que es un proceso en el que las espermatogonias (célula diploide,  $2n$ ) se transforman en espermatozoides (células haploides,  $1n$ ) como resultado de la mitosis, la meiosis y espermiogénesis. En hembras, la FSH estimula

la formación de folículos ováricos, así como la secreción de estrógenos (McArdle y Roberson, 2014; Goodman, 2015).

Durante el desarrollo postnatal, los mecanismos mediados por los esteroides sexuales E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> y T, ejercen una importante regulación a nivel hipotalámico-hipofisario, al establecer diferencias sexuales en los circuitos que controlan, en la edad adulta, la reproducción masculina y femenina. Además de los esteroides sexuales, existen factores específicos del sexo, genéticos y epigenéticos que modulan las diferencias sexuales en el cerebro y otros tejidos durante el desarrollo y pueden afectar los procesos reproductivos y metabólicos en la edad adulta (Arnold et al., 2017; Rulli et al., 2018).

El generador de pulsos de GnRH se activa durante el desarrollo embrionario después de completar la migración de neuronas GnRHérgicas desde la placoda olfatoria embrionaria, donde se originaron, hasta el hipotálamo (Wray, 2010). La secreción hipotalámica de GnRH aumenta en la vida postnatal temprana, lo que también conduce a la activación temporal de la esteroidogénesis gonadal. Durante la infancia, las gónadas pueden responder a la estimulación exógena de gonadotropinas, pero permanecen normalmente inactivas porque la liberación pulsátil de GnRH se mantiene en condiciones basales. Entonces, hasta que se presenta un incremento en la secreción pulsátil de la GnRH comienza el inicio de la pubertad, posteriormente la secreción pulsátil de la GnRH se mantiene durante toda la etapa reproductiva (Plant, 2015; Clavijo y Hsiao, 2018; Kaprara y Huhtaniemi, 2018).

### **Maduración del eje reproductivo**

La pubertad se define como la transición entre inmadurez sexual y la etapa adulta, cuando culmina la producción de gametos maduros e inicia la actividad reproductiva. Este periodo de transición coincide con la reactivación de la secreción pulsátil de GnRH, como se ha descrito en roedores (Prevot, 2015), ovejas (Foster y Hileman, 2015) y primates (Plant et al., 2015).

Los mecanismos precisos que desencadenan el inicio de la pubertad siguen siendo poco comprendidos. Se ha propuesto que el aumento de los activadores de la secreción de GnRH

es influido por varios neurotransmisores entre los que se encuentran la dopamina, noradrenalina y serotonina y junto con la supresión de los inhibidores de su secreción (GABA, Ghrelina o el gen MKRN3), culminan en el inicio de la pubertad (Tena-Sempere 2007; Abreu y Kaiser, 2016). Además de los neurotransmisores antes mencionados, hormonas como la inhibina y la activina, regulan la liberación de LH y FSH (Prieto et al., 2002). Actualmente se propone al neuropéptido kisspeptina como el eslabón fundamental del eje HHG, al estimular la secreción y señalización del decapeptido GnRH en las neuronas de GnRHérgicas, evento que da inicio a la pubertad. Así mismo, el neuropéptido kisspeptina es esencial para la maduración sexual y el funcionamiento normal del eje HHG en la etapa adulta de los mamíferos (Prevot, 2015).

La kisspeptina es un neuropéptido codificado por el gen *Kiss1* y es fundamental para la regulación de la secreción pulsátil de la GnRH. Se ha descrito que la pérdida de función del gen *Kiss1* o la ausencia del receptor KISS1R en humanos y roedores interrumpe el inicio de la pubertad y conduce a hipogonadismo hipogonadotrópico (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003); sin embargo, también se ha comprobado que la administración exógena de kisspeptina en roedores y humanos induce la liberación de GnRH/LH mediante la activación del KISS1R localizado en neuronas GnRHérgicas (Han et al., 2005; Herbison et al., 2010). En este contexto se entiende que la maduración del eje HHG depende de la síntesis de kisspeptina y de la expresión del KISS1R en el hipotálamo (Skorupskaite et al., 2014).

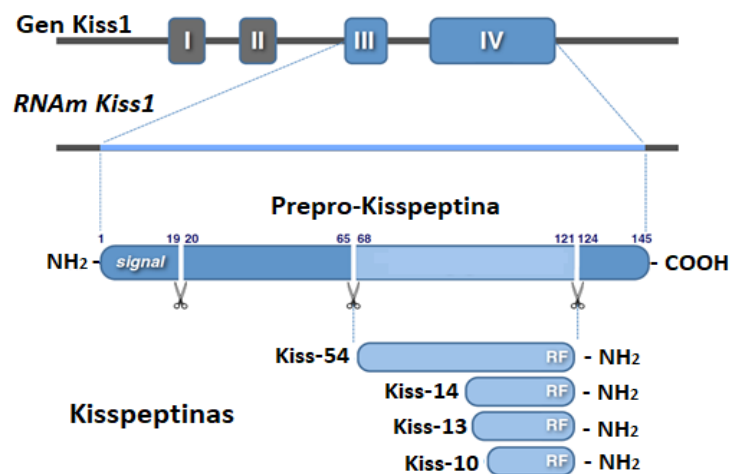
Como se mencionó previamente, la liberación pulsátil de GnRH en mamíferos comienza en el estado embrionario, poco después de que las neuronas de GnRH llegan al hipotálamo e inicia la liberación de gonadotropinas que continúa a lo largo de la infancia. En esta etapa, la secreción de gonadotropinas aún no inicia, por lo que las células somáticas de las gónadas que sustentan la gametogénesis no responden a la estimulación de GnRH (Wray, 2010; Plant, 2015).

En la pubertad, la kisspeptina representa el estímulo más potente para la secreción de GnRH, la cual depende de la concentración de esteroides sexuales circulantes y señales metabólicas desde el desarrollo hasta la etapa adulta. Casi todas las neuronas GnRHérgicas expresan ARNm del receptor de kisspeptina (*Kiss1r*) y son activadas intensamente por este

neuropéptido (Irwig et al., 2005; Han et al., 2005; Pielecka-Fortuna et al., 2008). El KISS1R, al ser activado por la kisspeptina, estimula a las neuronas GnRHérgicas y a su vez, favorece la secreción de gonadotropinas (Gottsch et al., 2004; Terasawa et al., 2013; Javed et al., 2015; Herbison, 2016; Clarkson et al., 2017).

### El neuropéptido kisspeptina

El neuropéptido kisspeptina está codificado por el gen *Kiss1*, y el receptor KISS1R por el gen *GPR54*. El producto del gen *Kiss1* es una proteína precursora de 145 aminoácidos que genera metastina (54 aminoácidos) y otros péptidos de menor tamaño, tales como kiss-14, kiss-13 y kiss-10, que forman la familia de péptidos, kisspeptinas (**Figura 2**). Estos péptidos comparten la región C-terminal con terminación Arg-Phe-NH<sub>2</sub>, característico de la familia de péptidos RF-amida. Se ha establecido que la región de 10 aminoácidos del extremo C-terminal de la kisspeptina (kiss-10) es la región biológicamente activa y responsable de la unión del péptido con su receptor, capaz de producir una máxima activación de las funciones de neurotransmisión y neuromodulación del KISS1R (Kotani et al., 2001; Ohtaki et al., 2001, Muir et al., 2001).



**Figura 2. Principales características estructurales de los péptidos kisspeptina y los productos del gen *Kiss1*.** El gen *Kiss1* está compuesto por cuatro exones (I, II, III y IV), siendo los dos primeros exones no codificantes. El precursor de kisspeptina contiene 145 aminoácidos y un péptido señal (signal) de 19 aminoácidos y una región central de 54 aminoácidos, kisspeptina-54 (Kp-54). En la

parte inferior se muestran los péptidos kisspeptina Kp-14, Kp-13 y Kp-10, generadas por escisión proteolítica y denominadas de acuerdo al número de aminoácidos que las componen. La Kp-10 corresponde a la región terminal común (-COOH) de 10 aminoácidos que contiene el motif RF-amida (-NH<sub>2</sub>) que es suficiente para activar completamente el KISS1R. Estas características estructurales de la kisspeptina están presentes en mamíferos placentarios, modificado de Pinilla et al., 2012.

El papel principal del neuropéptido kisspeptina en el inicio de la pubertad se demostró por primera vez en 2003 cuando de Roux et al., (2003) y Seminara et al., (2003) realizaron estudios en humanos y ratones demostrando la relevancia de la interacción ligando-receptor, kisspeptina/KISS1R, en la función reproductiva a partir de estudios en donde inactivaron esta interacción y en consecuencia los individuos no podían alcanzar la pubertad (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003; Topaloglu et al., 2012). A partir de entonces se ha aceptado que el neuropéptido kisspeptina es un factor integrador principalmente porque las neuronas kisspeptinérgicas son excitadas por la entrada de esteroides sexuales (E<sub>2</sub> y T) (Ojeda y Skinner, 2006; Clarkson et al., 2009). La entrada y disponibilidad de los esteroides sexuales coordinan el funcionamiento del eje HHG a través de neuronas hipotálamicas kisspeptinérgicas que proyectan y activan directamente a las neuronas GnRHérgicas (Kauffman, 2010; Gottsch et al., 2009).

Sin embargo, la actividad prematura del ligando kisspeptina/KISS1R da lugar a una pubertad precoz (Teles et al., 2008; Silveira et al., 2010), y en ratones hembra y macho con mutaciones del gen *Kiss1* hay ausencia del inicio de la pubertad (d'Anglemon de Tassigny et al., 2007). Durante la maduración sexual, el neuropéptido kisspeptina es un factor integral que sigue un patrón complejo de activación, que puede incluir:

- 1) El aumento en la expresión del gen *Kiss1* alrededor de la pubertad (Guerriero et al., 2012) en determinados núcleos del hipotálamo en ratones (Han et al., 2005), ratas (Sun et al., 2007), primates (Keen et al., 2008; Shahab et al., 2005) y borregos (Redmond et al., 2011; Nestor et al., 2012). En los roedores, dicho aumento se presenta en el núcleo AVPV, pero no en el ARC. Durante la pubertad de las monas Rhesus, la secreción pulsátil del neuropéptido kisspeptina aumenta en la eminencia media hasta alcanzar un pulso por hora, misma que está en estrecha asociación positiva (75 %) con la secreción pulsátil de la GnRH (Keen et al., 2008).



2) Aumento del transcrito del gen *GPR54* y en consecuencia un mayor número de receptores KISS1R o mayor eficiencia en la señalización intracelular en las neuronas GnRH, lo cual posibilita una sensibilidad mayor del sistema GnRH a las acciones estimulantes del neuropéptido kisspeptina. En ratones se ha demostrado que el número de neuronas GnRHérgicas despolarizadas es una respuesta al aumento del neuropéptido kisspeptina que se incrementa conforme progresa el desarrollo puberal (Han et al., 2005). Por otro lado, se demostró que en ratas hembra (Navarro et al., 2004) y monos Rhesus hembra (Shahab et al., 2005), el número de neuronas que expresan el *Kiss1r* en su membrana celular es mayor en adultos que en animales prepúberes.

3) Cambios plásticos que aparentemente favorecen un incremento de los contactos sinápticos entre neuronas kisspeptinérgicas y neuronas GnRHérgicas en el transcurso de la pubertad (Clarkson et al., 2006). La sinapsis entre las neuronas kisspeptinérgicas con las neuronas GnRHérgicas en la eminencia media ha sido demostrado en monos Rhesus (Ramaswamy et al., 2008), ratas (Uenoyama et al., 2011) y borregos adultos (Smith et al., 2011).

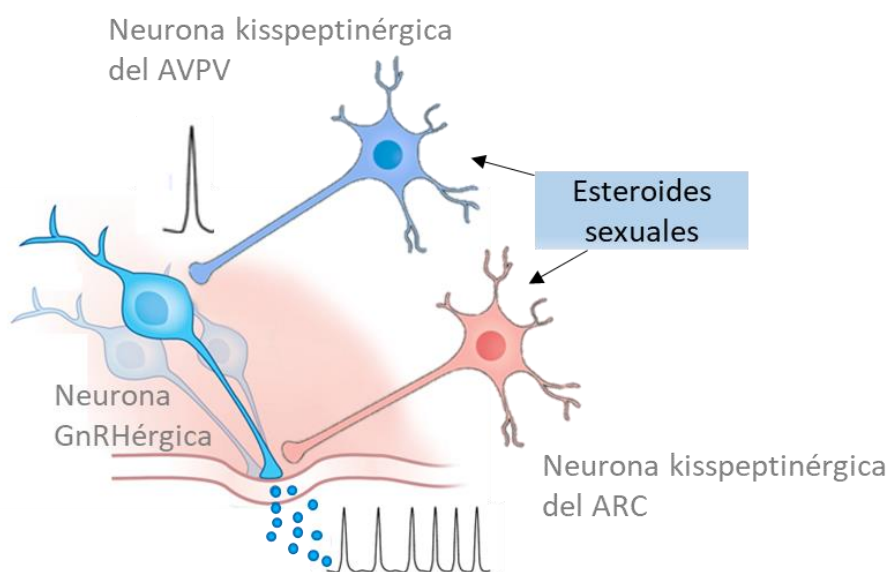
Además, en ratones knock-out, en donde se suprime la expresión del gen *Kiss1* se ha reportado que presentan un fenotipo de infertilidad similar a los ratones knock-out para el gen *Gpr54*, señalando que la kisspeptina a través del GPR54 es esencial para que la maduración sexual inicie en ratones puberales (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007; Lapatto et al., 2007). Aunado a esto la administración exógena de kisspeptina, de manera intracerebroventricular (icv), activa el eje reproductivo en la pubertad, tanto en roedores (Navarro et al., 2004) como en primates (Shahab et al., 2005). La administración crónica de kisspeptina en ratas hembra prepuberales aumentan los niveles de la LH en plasma y adelanta la apertura vaginal, característica del inicio de la pubertad, comparado con ratas hembra tratadas con vehículo icv (Navarro et al., 2004; Clarkson et al., 2010).

En primates macho prepuberales, la administración repetida de kisspeptina aumenta la concentración de GnRH provocando un patrón de secreción similar de GnRH a la de los adultos (Plant et al., 2006).

Por ello, la administración de kisspeptina potencia la actividad de las neuronas GnRH en roedores (Han et al., 2005; Dumalska et al., 2008; Pielecka- Fortuna et al., 2008) e induce la secreción de de GnRH en ovejas (Messenger et al., 2005) y primates (Shahab et al., 2005; Plant et al., 2006). Lo anterior proporciona un panorama convincente de que el neuropéptido kisspeptina tiene un papel importante en la activación de las neuronas GnRHérgicas para el inicio de la pubertad (Smith et al., 2006; Dungan et al., 2006; Clarkson et al., 2010).

### **Regulación de la participación de las neuronas kisspeptinérgicas en la reproducción**

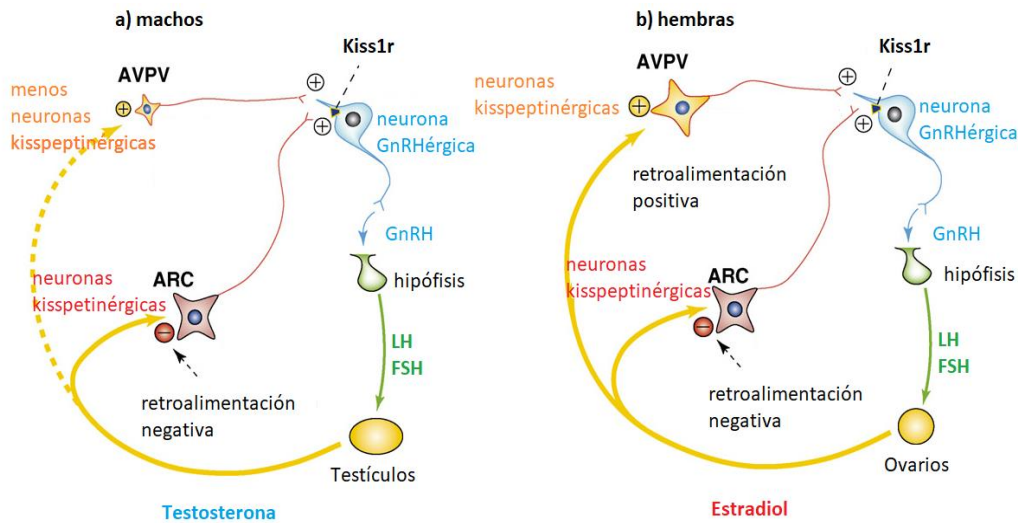
La distribución de neuronas kisspeptinérgicas es muy similar en la gran mayoría de los mamíferos (Uenoyama et al., 2018). Hay expresión de *Kiss1* en el área preóptica del hipotálamo que incluye las regiones del AVPV y del núcleo periventricular (PeN), así como en el ARC (Gottsch et al., 2009). Como se mencionó con anterioridad, estas poblaciones de neuronas kisspeptinérgicas están, en gran medida, reguladas por esteroides sexuales y desempeñan acciones distintas en la función reproductiva (**Figura 3**) (Clarkson y Herbison, 2006; Smith et al., 2006; Smith, 2009).



**Figura 3. Regulación de las neuronas GnRHérgicas por las neuronas kisspeptinérgicas.** Las neuronas kisspeptinérgicas del núcleo anteroventral periventricular (AVPV) envían sus axones hacia el cuerpo celular y a las dendritas proximales de las neuronas GnRHérgicas. Los esteroides sexuales actúan sobre las neuronas kisspeptinérgicas a través de sus receptores, esencial para la regulación del eje HHG, para modular el aumento preovulatorio de la LH. Las neuronas kisspeptinérgicas del núcleo arqueado (ARC) regulan la pulsatilidad de las neuronas GnRHérgicas en la región distal de estas neuronas para generar la secreción pulsátil de LH. Modificado de McCarthy, 2013; Herbison, 2016.

Las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV y del ARC expresan receptores a estrógenos alfa y beta (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), y andrógenos (AR), por lo que pueden ser activadas en presencia de esteroides sexuales (E2 y T) tanto en rata (Kauffman et al., 2007) como en el ratón (Smith et al., 2005). Como se mencionó previamente, la kisspeptina es el principal estimulante de neuronas GnRHérgicas y es un importante regulador del eje reproductivo (Harter et al., 2018). La actividad de las neuronas kisspeptinérgicas es diferente según el núcleo en donde se encuentren, AVPV o ARC, en el desarrollo, en la maduración sexual y en la mediación de la retroalimentación por esteroides sexuales en el eje reproductivo en animales adultos (Figura 4) (Kumar et al., 2015).

La expresión del ER $\alpha$  en neuronas kisspeptinérgicas del ARC de ratas, ratones y ovejas oscila entre el 70 y el 99%, mientras que en la región AVPV se expresa en un 50 y 99% (Franceschini et al., 2006, Smith et al., 2007; Adachi et al., 2007; Clarkson et al., 2008). El porcentaje de expresión del ER $\beta$  en el ARC y AVPV es considerablemente menor, oscilando entre el 11 y el 25% en el ARC y entre el 21 y el 31% en el AVPV de ratas y ratones (Smith et al., 2005, 2006). Otras poblaciones de neuronas kisspeptinérgicas no se han examinado directamente para la colocalización de receptores de esteroides, pero dado que los esteroides sexuales regulan la expresión de *Kiss1* en la amígdala medial en ratas y ratones (Kim et al., 2011), y la presencia de ER y AR en esta área (Simerly et al., 1990), indican con certeza que los esteroides sexuales también ejercen sus efectos de retroalimentación en la amígdala (Comminos et al., 2016).



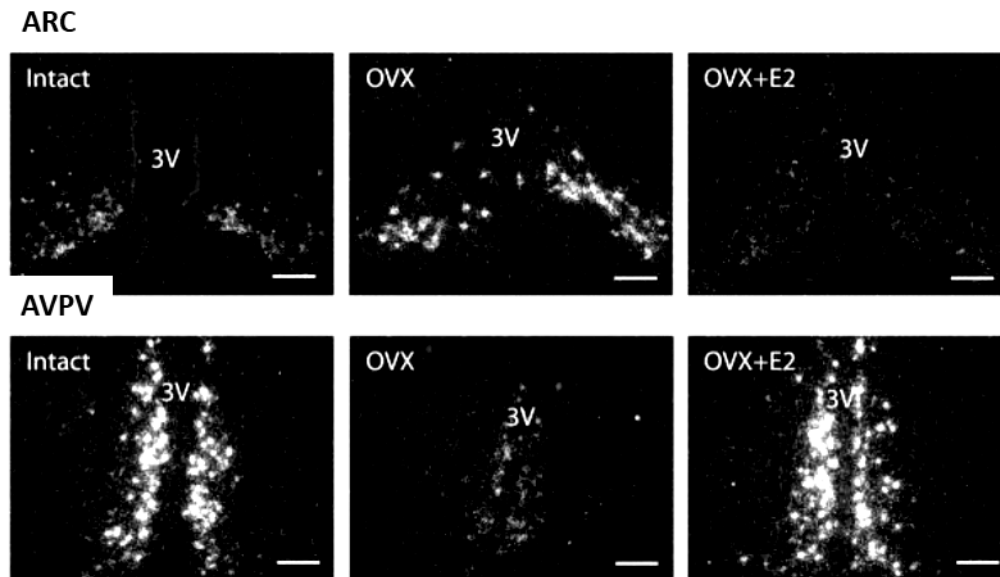
**Figura 4. Modelo de señalización del neuropéptido kisspeptina-Kiss1r en roedores (a) machos y (b) hembras.** Las neuronas kisspeptinérgicas en el núcleo arqueado (ARC) proporcionan una entrada estimulante tónica a las neuronas GnRH y están reguladas negativamente por los esteroides sexuales gonadales. En el núcleo anteroventral periventricular (AVPV), los machos poseen un menor número de neuronas kisspeptinérgicas, en comparación con las hembras en esta región; este dimorfismo sexual de la expresión de neuronas kisspeptinérgicas en el AVPV se diferencia por los esteroides sexuales al inicio de la vida perinatal. En contraste con el ARC, la liberación del neuropéptido kisspeptina en el AVPV es estimulada por la presencia de esteroides sexuales, generando una retroalimentación positiva y el aumento de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) necesario para la ovulación. Modificado de Kauffman et al., 2007.

### Neuronas kisspeptinérgicas del núcleo arqueado

El ARC es una estructura sensible a los esteroides sexuales (Cone et al., 2001). Dentro del ARC se localiza una población importante de neuronas kisspeptinérgicas que se les denominó KNDy debido a que estas neuronas coexpresan kisspeptina, Neuroquinina B (NKB) y Dinorfina A (DYN). (Lehman et al., 2010). El estudio de Goodman et al. (2007), fue el primero en describir esta población de neuronas kisspeptinérgicas en el ARC de ovinos que coexpresan DYN y NKB, y muy probablemente receptores de hormonas esteroides que se expresan en casi todas las neuronas de Dinorfina y NKB en el ARC, proporcionando evidencia directa de que las neuronas contienen neuropéptidos adicionales involucrados en el control reproductivo. También se ha descrito esta población de neuronas KNDy en el ARC de ratas (Burke et al., 2006), ratones (Ruka et al., 2013) y humanos (Rometo et al., 2007).

Estas neuronas KNDy envían proyecciones que terminan en aposición con las neuronas GnRH del hipotálamo (Kinoshita et al., 2005; Mittelman-Smith et al., 2012).

Como se describe y se observa en la **Figura 5**, estas neuronas kisspeptinérgicas del ARC forman parte del mecanismo neuroendocrino que regula la retroalimentación negativa, responsable de suprimir el pico preovulatorio de GnRH/LH durante la mayor parte del ciclo estral en las hembras (Mittelman-Smith et al., 2012).



**Figura 5. Patrón de expresión de las neuronas kisspeptinérgicas en el ARC y el AVPV.** Imágenes de campo oscuro que muestran células que expresan el ARNm de *Kiss1*, evaluados mediante hibridación *in situ*, (presencia de racimos blancos de gránulos de plata) en secciones representativas del núcleo arqueado (ARC) y del núcleo anteroventral periventricular (AVPV) de ratones con ovariectomía (OVX), OVX+ estradiol (E<sub>2</sub>) e intactos en ovario (controles). En el panel superior en el ARC, la OVX incrementa el número de células inmunoreactivas al neuropéptido kisspeptina y la OVX + inyección de E<sub>2</sub> disminuye la expresión del ARNm. En el panel inferior en el AVPV, la OVX disminuye el número de células inmunoreactivas al neuropéptido kisspeptina y la OVX + inyección de E<sub>2</sub> aumenta la expresión del ARNm. 3V: tercer ventrículo. Barras de calibración: 100 micras. Modificado de Smith et al., 2005.

Las neuronas KNDy del ARC están reguladas por E<sub>2</sub> en el ratón (Navarro et al., 2009). DYN es un péptido opioide endógeno (EOP) que parece mediar el control de retroalimentación inhibitoria de la P<sub>4</sub> en la secreción de GnRH (Goodman et al., 2004). Los tres neuropéptidos están relacionados en la regulación de las neuronas GnRHérgicas en el ratón; En esta especie, las neuronas KNDy también expresan los receptores afines para NKB y DYN (es decir, receptor de opiáceos NK3 y el receptor de opiáceos Kappa, respectivamente), lo que sugiere

la existencia de contactos autosinápticos entre neuronas kisspeptinérgicas/ DYN / NKB, que a su vez impulsa la secreción pulsátil de GnRH y LH en el ratón (Navarro et al., 2009). Esta idea es consistente con las observaciones previas hechas en el mono en donde la secreción pulsátil del neuropéptido kisspeptina aumenta la liberación de GnRH en la eminencia media (Keen et al., 2008). Es probable que otros sistemas peptidérgicos y neurotransmisores clásicos, como el glutamato y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico, también desempeñen funciones importantes en la regulación de la actividad de neuronas KNDy en el ARC, sin embargo, no está descrito ampliamente (Oakley et al., 2009).

En mamíferos la expresión de *Kiss1* en el ARC está presente alrededor del día embrionario 18 en ambos sexos (Semaan, 2013; Clarkson et al., 2009). Se ha propuesto que esta población de neuronas kisspeptinérgicas son sexualmente dimórficas durante el período postnatal (PN) temprano, entre PN10 y PN25, ya que las hembras muestran más neuronas kisspeptinérgicas (cuerpos celulares y fibras) que los machos. Este dimorfismo persiste hasta alrededor de PN30, pero en la edad adulta desaparece (Semaan, 2010; Brock y Bakker, 2013).

Los esteroides sexuales proporcionan señales de retroalimentación que se transmiten hasta las neuronas GnRHérgicas para coordinar el ciclo estral en los mamíferos. En roedores, el E<sub>2</sub> tiene un efecto inhibitor, retroalimentando negativamente la secreción de GnRH y gonadotropinas durante todo el ciclo estral, excepto durante las etapas de proestro tardío y estro del ciclo estral. En estas etapas el aumento de E<sub>2</sub> inicia una oleada de liberación de GnRH y gonadotropinas (retroalimentación positiva) que causa la ovulación (Smith et al., 2011). Los efectos de retroalimentación tanto negativos como positivos causados por E<sub>2</sub> son mediados principalmente por el ER $\alpha$  (Wintermantel et al., 2006), que no se expresa en las neuronas GnRHérgicas (Hrabovszky et al., 2000). Se ha postulado que las neuronas kisspeptinérgicas del ARC participan en la retroalimentación negativa en presencia de E<sub>2</sub> (Dungan et al., 2007). Esta hipótesis proviene de evidencias en donde el E<sub>2</sub> inhibe la expresión del gen *Kiss1* en esta región hipotalámica (Roa et al., 2011), un efecto que se ha observado consistentemente en roedores, ovejas, monos, y humanos (Goodman, 2015). El nivel circulante de E<sub>2</sub> en animales con ovariectomía (OVX), que es muy bajo, incrementa la expresión del ARNm de *Kiss1* en el ARC (Smith et al., 2005 a), que es lo que ocurre durante el ciclo estral de las hembras cuando no están ovulando (diestro y metaestro). Por el contrario,

en animales intactos (no OVX), en periodos de ovulación la concentración de E<sub>2</sub> es más elevada e inhibe la expresión de kisspeptina en el ARC. Las neuronas kisspeptinérgicas del ARC responden a bajas concentraciones de E<sub>2</sub> y T modulando la liberación tónica de la GnRH directamente en la eminencia media, a través de la activación de los receptores ER $\alpha$  y AR, respectivamente (Smith et al., 2005 a, b).

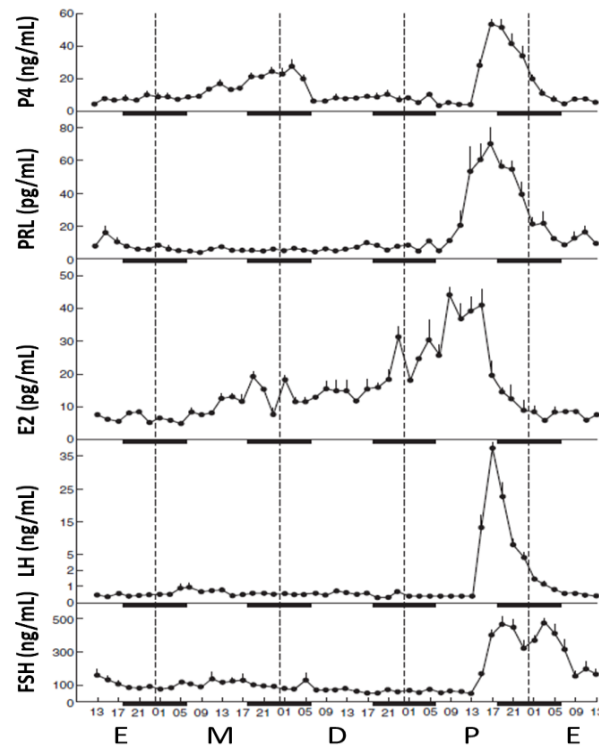
### **Neuronas kisspeptinérgicas del núcleo anteroventral periventricular**

La expresión del neuropéptido kisspeptina en las neuronas del AVPV comienza en la tercera semana PN, entre PN10-PN15, y aumenta exponencialmente hasta el momento de la pubertad, alrededor del PN30 en ratones de la cepa C57BL/6J (Clarkson et al., 2009). La población de neuronas kisspeptinérgicas del AVPV influye en la función reproductiva de las hembras adultas, así como en las diferencias sexuales en el inicio de la pubertad. La expresión de neuronas kisspeptinérgicas en el AVPV es mayor en hembras que en los machos, característica que ha sido reportada en ratones (Smith et al., 2005 a, b; Clarkson y Herbison, 2006; Kauffman et al., 2007) y en diferentes especies, incluidos los humanos en la zona periventricular del tercer ventrículo (RP3V), que es el equivalente del AVPV en roedores (Kauffman, 2010; Hrabovsky et al., 2010).

En hembras, las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV median los efectos de retroalimentación positiva del E<sub>2</sub> sobre la secreción de GnRH, al inervar directamente el soma de las neuronas de GnRH (Wintermantel et al., 2006) lo que desencadena el pico preovulatorio de LH (Smith et al., 2006; Herbison, 2008). Además, la expresión de c-Fos, un marcador de actividad neuronal, aumenta en las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV durante este pico (Smith et al., 2006; Robertson et al., 2009). También se ha demostrado que la administración de un antagonista del KISS1R puede bloquear el pico preovulatorio de LH (Kinoshita et al., 2005; Pineda et al., 2010) y en ratones knock-out, en donde se suprime la expresión del gen *Kiss1*, no responden al tratamiento con E<sub>2</sub> para restablecer la secreción pulsátil de LH (Clarkson et al., 2008).

La secreción preovulatoria de gonadotropinas ocurre cuando hay un aumento de E<sub>2</sub>, que se presenta en el día del Proestro. Esto ocurre durante el ciclo estral en donde se producen una serie de cambios fisiológicos en el ovario, en el útero y en la vagina como consecuencia de

las variaciones de las concentraciones hormonales de la FSH, LH, E<sub>2</sub>, PRL y P<sub>4</sub>, (ver **Figura 6**) (Levine, 2015; Cora et al., 2015). Aunado a esto, se ha observado que los roedores con OVX y con implantes subcutáneos que proveen E<sub>2</sub> de manera continua mantienen la concentración hormonal basal, en donde no hay ovulación. Estos animales, en los que se ha eliminado el efecto inhibitorio del E<sub>2</sub> (retroalimentación negativa), presentan “picos” de LH todos los días a la misma hora. Estos “picos” persisten en condiciones constantes de E<sub>2</sub> y son acompañados por la activación de las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV (Robertson et al., 2009). La OVX incrementa el número de células inmunoreactivas al neuropéptido kisspeptina en el ARC (Smith et al., 2005), y la inyección de E<sub>2</sub> disminuye la concentración del neuropéptido kisspeptina y del ARNm de *Kiss1* en el ARC (Kinoshita et al., 2005; Smith et al., 2005; Adachi et al., 2007).



**Figura 6. Concentraciones de esteroides sexuales, gonadotropinas y prolactina durante el ciclo estral.** Se observa la concentración hormonal en el plasma periférico que se obtuvo en intervalos de 2 horas durante cada día del ciclo estral durante 4 días en ratas. Cada punto representa la concentración hormonal media (error estándar de la media) de cinco a seis animales. Las barras negras representan el intervalo oscuro en la habitación de los animales (06:00-18:00) y los números debajo de ellas representan la hora del día (10:00-2:00) en términos del reloj de 24 horas. P<sub>4</sub>: progesterona, PRL: prolactina, E<sub>2</sub>: estradiol, LH: hormona luteinizante y FSH: hormona estimulante del folículo. Modificado de Levine, 2015 referencia Smith et al., 1975.



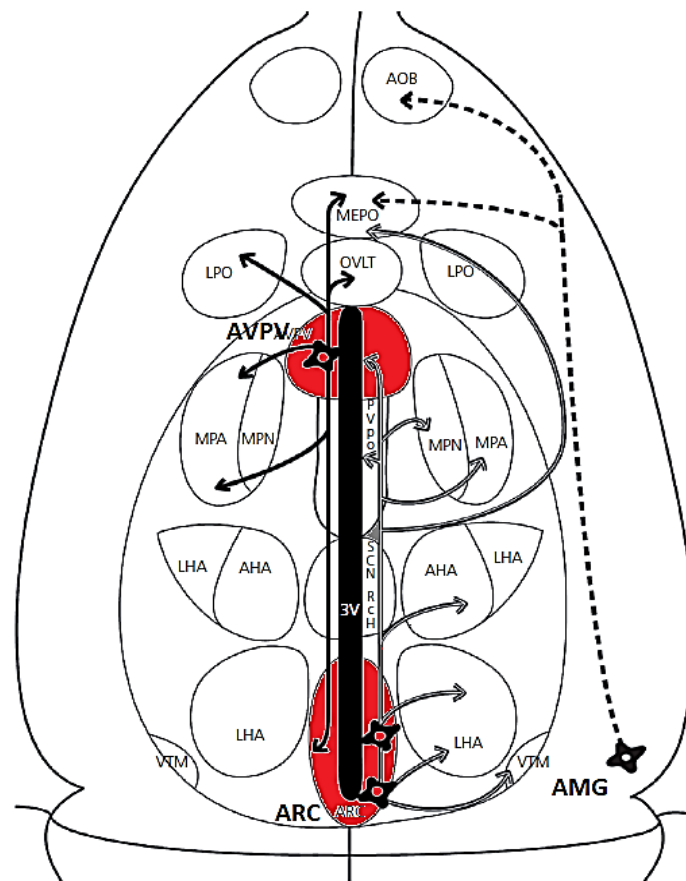
### **Neuronas kisspeptinérgicas de la amígdala medial posterodorsal**

Existe una tercera población de neuronas kisspeptinérgicas extra hipotalámica que están localizadas en la MePD. Estas neuronas comienzan a sintetizar el neuropéptido kisspeptina alrededor del PN35, lo cual coincide con el inicio de la pubertad (Stephens et al., 2016). La MePD forma parte del sistema límbico, y, por ende, las neuronas kisspeptinérgicas que se encuentran ahí podrían estar implicadas en el comportamiento emocional y sexual (Canteras et al., 1995; Comninou et al., 2015). Por otro lado, las señales olfatorias que son percibidas por el órgano vomeronasal (OVN) principalmente, pero también por el epitelio olfatorio principal pueden modificar la liberación de hormonas por parte del hipotálamo y provocar cambios fisiológicos y en la conducta reproductiva. La información recibida a través del bulbo olfatorio (BO) sigue un trayecto neural pasando por diferentes regiones cerebrales hasta llegar a la amígdala en donde hay un relevo de información hacia el hipotálamo directamente (Keller et al., 2006).

El BO es la región principal del cerebro involucrada en el procesamiento y envío de información de olores sexualmente relevantes a las áreas del cerebro involucradas en la regulación de la conducta reproductiva y la memoria, incluida la amígdala (Dulac y Torello, 2003; Gottfried, 2010). Anatómicamente y funcionalmente, el BO se organiza en dos sistemas: el sistema olfatorio principal y el accesorio. El sistema olfatorio principal procesa la información detectada en el epitelio olfatorio principal por neuronas sensoriales. La información olfativa proveniente del bulbo olfatorio principal se une con la información olfativa que proviene del bulbo olfatorio accesorio (BOA) en el hipotálamo, que es el último relevo de información olfativa (Keller et al., 2009; Corona, 2011).

El sistema olfatorio accesorio está formado por el OVN, localizado en la cavidad nasal, y el BOA, ubicado en la zona posterodorsal del BO. El OVN envía información hacia el BOA, donde hacen contacto con las células mitrales. Las células mitrales del BOA proyectan a la amígdala, y las células de la amígdala envían proyecciones de regreso al BOA (Munger et al., 2007; Pardo-Bellver, 2012) lo que sugiere una constante retroalimentación del olfato por parte de la amígdala (Pineda et al., 2017).

Aunado a esto se ha demostrado que las neuronas kisspeptinérgicas de la MePD tienen sinapsis con las neuronas hipotalámicas GnRHérgicas en el POA, así como las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV y el ARC (Pineda et al., 2017) (**Figura 7**). Las neuronas kisspeptinérgicas de la MePD también proyectan sus axones a través del núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) integrando circuitos límbicos y olfativos, hasta llegar a las neuronas GnRHérgicas, por lo que se propone que participan en la modulación de la secreción y liberación de gonadotropinas (Yeo y Herbison, 2011; Cominos et al., 2016; Pineda et al., 2017).



**Figura 7. Distribución de fibras en el cerebro de ratón.** Vista horizontal esquemática del hipotálamo ventral que ilustra las proyecciones de fibras de las neuronas kisspeptinérgicas. Núcleo anteroventral periventricular (AVPV), sus proyecciones de las neuronas kisspeptinérgicas se indican mediante flechas negras continuas. Núcleo arqueado (ARC), las proyecciones de esta población de neuronas kisspeptinérgicas se ilustran con flechas blancas. Las proyecciones de neuronas kisspeptinérgicas de la amígdala se indican mediante flechas de puntos. Mostrando esquemáticamente las regiones del cerebro a las cuales están enviando sus terminaciones dendríticas. 3V, tercer ventrículo; AHA, área hipotalámica anterior; AMG, amígdala; AOB, bulbo olfatorio accesorio; LHA,

área hipotalámica lateral; LPO, área preóptica lateral, MEPO, núcleo preóptico mediano; MPA, área preóptica medial; Núcleo preóptico medial MPN; Rch, área retroquiasmática; SCN, área supraquiasmática; OVLT, órgano vascular de la lámina terminal, PVpo, núcleo preóptico periventricular; VTM, núcleo tuberomamilar ventral. Modificado de Yeo et al., 2016.

### **Dimorfismo sexual en la expresión del neuropéptido kisspeptina**

La kisspeptina actúa de forma diferente en cada sexo. En el caso de los humanos, la kisspeptina estimula la liberación de gonadotropinas, pero en las mujeres, el efecto es variable y depende de la fase del ciclo menstrual (Skorupskaite et al., 2014). Como se describió anteriormente, las fluctuaciones de los esteroides sexuales y otros mecanismos, como los cambios en la sensibilidad a la GnRH en la hipófisis o la respuesta de la red de neuronas GnRHérgicas al neuropéptido kisspeptina, regulan la sensibilidad al neuropéptido kisspeptina durante todo el ciclo menstrual en humanos (Pinilla et al., 2012). Esto mismo ocurre en ratones hembra y se ha demostrado claramente que el E<sub>2</sub> es un regulador transcripcional importante del sistema kisspeptinérgico, con capacidad de activar la expresión del gen *Kiss1* en el AVPV durante el período previo a la ovulación (Proestro). Los mecanismos mediante los cuales el E<sub>2</sub> contribuye a la expresión completa del aumento preovulatorio y de las gonadotropinas en ratones son ciertamente complejas y multifacéticas (ciclo estral), y probablemente involucren acciones en diferentes sitios de la red neuroendocrina que conducen a la secreción de LH y FSH (Tena-Sempere et al., 2004; Skorupskaite et al., 2014).

No solo hay dimorfismo sexual en la respuesta de las gonadotropinas al neuropéptido kisspeptina, sino que también hay diferencias anatómicas. Como se mencionó previamente, el AVPV femenino posee una mayor cantidad de fibras y cuerpos celulares en comparación con las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV masculino (Smith et al., 2005 a, b; Clarkson y Herbison, 2006; Kauffman et al., 2007). Estas diferencias sexuales en las neuronas kisspeptinérgicas parecen establecerse durante el desarrollo perinatal temprano a través de la acción de los esteroides sexuales (Kauffman et al., 2010; Pinilla et al., 2012). Estas diferencias funcionales y anatómicas reflejan roles sexualmente dimórficos de la acción del neuropéptido kisspeptina, influyendo en su función reproductiva, la retroalimentación de esteroides sexuales sobre las neuronas GnRH y la secreción de gonadotropinas (Skorupskaite et al., 2014).

Debido a que hay muchas más neuronas kisspeptinérgicas en el AVPV en roedores hembras que machos (Clarkson y Herbison, 2006), y esta área es el sitio donde el E<sub>2</sub> actúa para inducir el pico preovulatorio de GnRH en estas especies (Herbison, 2008), el control hormonal de este dimorfismo sexual se ha centrado en los efectos de la T durante el período perinatal. Los estudios en ratas que utilizan gonadectomía neonatal y/o tratamientos con esteroides (Kauffman et al., 2007; Hrabovszky et al., 2010) apoyan la hipótesis de que la secreción testicular de T durante este período se convierte en E<sub>2</sub>, que luego produce una disminución permanente de las células que expresan el gen *Kiss1* en el AVPV. Esta conclusión también está respaldada por los efectos de las manipulaciones genéticas en ratones que eliminaron la enzima aromatasa (Bakker et al., 2010) o la alfa-fetoproteína (Gonzalez-Martinez et al., 2008). Se ha observado un dimorfismo sexual similar en el número de neuronas kisspeptinérgicas en POA en ovejas (Cheng et al., 2010) y humanos (Hrabovszky et al., 2010), pero los factores responsables siguen siendo desconocidos.

Los efectos del E<sub>2</sub> sobre el número de neuronas kisspeptinérgicas en el AVPV pueden no limitarse al período perinatal, ya que en ratones la OVX en el PN15 el E<sub>2</sub> redujo la expresión del ARNm de *Kiss1* en el AVPV adulto a niveles masculinos (Clarkson et al., 2009). Por otro lado, en ratones hipogonadales (hpg) (Gill et al., 2010), la ausencia de esteroides sexuales no alteró el aumento relacionado con la edad en el número de neuronas del AVPV, pero los ratones machos hpg mostraron un aumento similar en las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV que no fue evidente en sus compañeros de camada silvestres (WT, por sus siglas en inglés). Sin embargo, no hubo diferencias relacionadas con la edad en la expresión de *Kiss1* (qPCR) en ratones hpg hembra o macho (Gill et al., 2010), por lo que parece haber un desajuste entre el ARNm de *Kiss1* y la expresión de proteínas en estos ratones.

En ovejas (Cheng et al., 2010) y humanos (Hrabovszky et al., 2010), también hay significativamente más neuronas kisspeptinérgicas en el ARC de las hembras que en los machos, mientras que, en los roedores, la expresión de neuronas kisspeptinérgicas en el ARC es similar en ambos sexos (Kauffman et al., 2007, 2009; Homma et al., 2009). No hay información sobre los factores responsables de este dimorfismo sexual en los seres humanos, pero en las ovejas, es probable que los efectos de los esteroides sexuales desempeñen un papel clave porque el dimorfismo sexual se observa en animales gonadectomizados (Nestor

et al., 2012). Sin embargo, la masculinización prenatal de las hembras con tratamiento con T durante la gestación no influyó en el número de neuronas kisspeptinérgicas, pero sí disminuyó el número de células NKB y DYN a los niveles observados en los machos (Cheng et al., 2010). Por otro lado, los ratones muestran un dimorfismo sexual en las neuronas kisspeptinérgicas del ARC que se pierde durante el desarrollo. Específicamente, la OVX de las hembras prepúberes da como resultado una duplicación del número de neuronas kisspeptinérgicas, mientras que la castración de los machos antes de la pubertad no tiene ningún efecto, una diferencia de sexo no observada en ratones adultos (Kauffman et al., 2009).

Las neuronas kisspeptinérgicas son notablemente consistentes en todas las especies de mamíferos estudiadas hasta la fecha, al menos en cuanto al control de la secreción de GnRH. Las poblaciones principales de neuronas kisspeptinérgicas se encuentran en dos áreas: un gran número en el ARC y un conjunto más pequeño en el POA, que se concentra en el AVPV de los roedores. Las redes neuroendocrinas que coordinan la reproducción son complejas, integrando una amplia gama de señales internas y externas en los mamíferos. La GnRH es la principal reguladora de la reproducción; sin embargo, las neuronas kisspeptinérgicas son integradoras de señales de esteroides sexuales, del estado nutricional y metabólico, la expresión de péptidos y hormonas, como la PRL para controlar la secreción de gonadotropinas y, posteriormente, el eje reproductivo (Marques et al., 2018).

### **La hormona prolactina**

La PRL es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada por los lactotrofos localizados en la hipófisis anterior, que representan del 20 al 50% de las células de esta glándula. Conforme a la fisiología y bioquímica de esta hormona, se le han atribuido más de 300 funciones biológicas en diferentes tejidos y órganos en vertebrados, por lo que se considera una hormona pleiotrópica (Bole-Feyost et al., 1998; Freeman et al., 2000).

Los genes que codifican a la PRL, la hormona de crecimiento (GH) y la hormona lactógeno placentario provienen de un gen ancestral común. El ARNm de *Prl* da origen a un polipéptido de 227 aminoácidos, después de la eliminación de 28 aminoácidos que corresponden al péptido señal del inicio de la traducción de proteínas, se genera a la proteína madura de 23

kDa (kilodaltones) con un tamaño de 199 aminoácidos. La PRL es una proteína monocatenaria con tres puentes disulfuro formados por seis residuos de cisteína (Bole-Feyost et al., 1998; Freeman et al., 2000).

La PRL madura, que se modifica posterior a la traducción de proteínas, se sintetiza y secreta en la hipófisis anterior y la regulación hipotalámica está mediada por DA; sin embargo, el SNC, el sistema inmunológico, el útero y las glándulas mamarias son capaces de producir PRL. La estimulación del pezón, la luz, el olfato y el estrés pueden contribuir al inicio de la síntesis de PRL en estos tejidos (Bernard et al., 2019). Otros factores que estimulan la producción de PRL incluyen la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), los estrógenos y los antagonistas de la DA (antipsicóticos) (Freeman et al., 2000).

El aumento de la secreción de PRL hipofisaria durante la lactancia provoca la inhibición de la GnRH interrumpiéndose el ciclo reproductivo (ciclo menstrual). Este periodo de infertilidad conduce a la producción de la leche materna por la acción de la PRL en la glándula mamaria. En condiciones patológicas, la secreción láctea, está asociada con procesos de hiperprolactinemia, a consecuencia de abultamientos hipofisarios productores de PRL (hiperprolactinomas). Estas altas tasas de PRL circulante son causantes de la infertilidad tanto en mujeres como en hombres, aunque en los hombres es casi nula la hiperprolactinemia (Freeman et al., 2000). Los machos tienen niveles característicamente bajos de PRL y con un patrón de secreción pulsátil. La elevación anormal en los machos sugiere un posible proceso patológico subyacente, como un adenoma hipofisario o un efecto adverso de la medicación. En general la PRL es menos abundante en machos y en hembras no lactantes y no preñadas (Freeman et al., 2000; Li et al., 2019; Bernard et al., 2019; Vilar et al., 2019).

### **Síntesis y secreción de la prolactina**

Como se mencionó con anterioridad la PRL se sintetiza principalmente en la hipófisis anterior y se libera en respuesta a innumerables factores externos y estados fisiológicos (Freeman et al., 2000). La regulación de la PRL se lleva a cabo por las neuronas dopaminérgicas localizadas en el ARC del hipotálamo, llamadas neuronas tuberoinfundibulares (TIDA) que proyectan hacia la eminencia media, neuronas tubero-hipofisarias (THDA) y neuronas hipofisio-periventriculares (PHDA) que proyectan al lóbulo

posterior y al lóbulo intermedio respectivamente. Las neuronas dopaminérgicas regulan la secreción de PRL, al liberar dopamina que llega a la hipófisis anterior desde las neuronas TIDA por medio de los vasos portales largos, y desde las neuronas THDA y PHDA a través de los vasos portales cortos (Grattan y Tissier, 2015). La PRL estimula directamente estas tres poblaciones de neuronas (TIDA, THDA y PHDA), lo que da como resultado una regulación de retroalimentación negativa de circuito corto de su propia secreción, así como la activación de otras neuronas que responden a la PRL en el cerebro (Demaria et al., 2000; Lyons et al., 2010; Grattan y Tissier, 2015).

La dopamina es el mayor inhibidor de la síntesis y secreción de PRL. La dopamina tras interactuar con los receptores dopaminérgicos tipo 2 (D2) en la membrana de las células lactotropas ejerce su función inhibitoria por acción de proteínas G inhibitorias que se encuentran asociadas al receptor D2. Los estímulos fisiológicos que regulan la secreción de PRL son múltiples: el estrés, el aumento de estrógenos en el ovario y la succión del pezón durante la lactancia es una señal inhibitoria de la secreción pulsátil de GnRH del hipotálamo (Tsukamura y Maeda, 2001). Estos estímulos son detectados por el hipotálamo, que elabora factores liberadores de PRL (PRF) y factores inhibidores de PRL (PIF). En mamíferos, el hipotálamo ejerce un efecto mayoritariamente inhibidor sobre la síntesis y secreción de PRL, que además está influenciada por muchos otros factores liberados por las células lactotropas de la hipófisis anterior (regulación autocrina), así como por otras células de la hipófisis (regulación paracrina) (Bole-Feyost et al., 1998; Freeman et al., 2000; Ben-Jonathan et al., 2008).

Las concentraciones plasmáticas de PRL varían a lo largo del día siendo mayores durante el periodo de sueño que durante el de vigilia, indicando que el ritmo de secreción de PRL en humanos es circadiano. La alta tasa de secreción PRF durante el sueño está asociada a los periodos de movimiento rápido de ojos (sueño REM). De hecho, se ha observado que la actividad dopaminérgica de las neuronas TIDA disminuye con anterioridad a la elevación de los niveles plasmáticos de PRL, mostrando que la liberación de dopamina hipotalámica en el vaso portal que llega a la hipófisis presenta ritmos circadianos asociados a los periodos de disminución de las tasas secretoras de PRL. Múltiples factores como el ciclo circadiano, la actividad sensorial y neuronal, así como otras hormonas como el E<sub>2</sub>, la P<sub>4</sub> y el cortisol regulan

la secreción de PRL indirectamente a través de la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Sellix et al., 2004; Liang et al., 2011; Grattan y Tissier, 2015).

### **Receptor de prolactina**

Las diversas acciones biológicas de PRL están mediadas a través de su receptor. El receptor de PRL transmembranal (PRL-R) es un miembro de la familia de receptores de citocinas de clase I, que inicia las vías de transducción de señales y da como resultado una serie de eventos fisiológicos coordinados en los tejidos endocrinos blanco (Bole-Feyost et al., 1998; Goffin et al., 2002).

Las acciones biológicas de la PRL están mediadas por la interacción con el PRL-R que se expresa en la membrana celular, el cual se encuentra ampliamente distribuido en diferentes regiones del cerebro tales como la corteza cerebral, bulbo olfatorio, hipocampo, amígdala, hipotálamo, hipófisis, entre otras (Cabrera-Reyes et al., 2017). Además del cerebro, el PRL-R tiene una amplia expresión en diferentes órganos, tales como, corazón, pulmón, timo, bazo, hígado, páncreas, riñón, glándula adrenal, útero, músculo esquelético y piel (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000).

Existen diferentes isoformas del PRL-R en las diferentes especies, las cuales son resultado del empalme alternativo y están formadas por un dominio extracelular, uno transmembranal y uno citoplasmático. Aunque las isoformas varían en la longitud y composición de sus dominios citoplasmáticos, sus dominios extracelulares son idénticos (Torner, 2016). En el humano se han reportado tres isoformas del PRL-R, una larga y dos cortas (S1a y S1b); en la rata se han reportado tres isoformas, una larga, una intermedia y una corta, mientras que en el ratón se han reportado 4 isoformas, una larga y tres cortas (S1, S2 y S3), las cuales son iguales en sus dominios extracelular y transmembranal, difiriendo entre si únicamente en la longitud de su dominio intracelular (Bole-Feyost et al., 1998; Freeman et al., 2000; Ben-Jonathan et al., 2008).

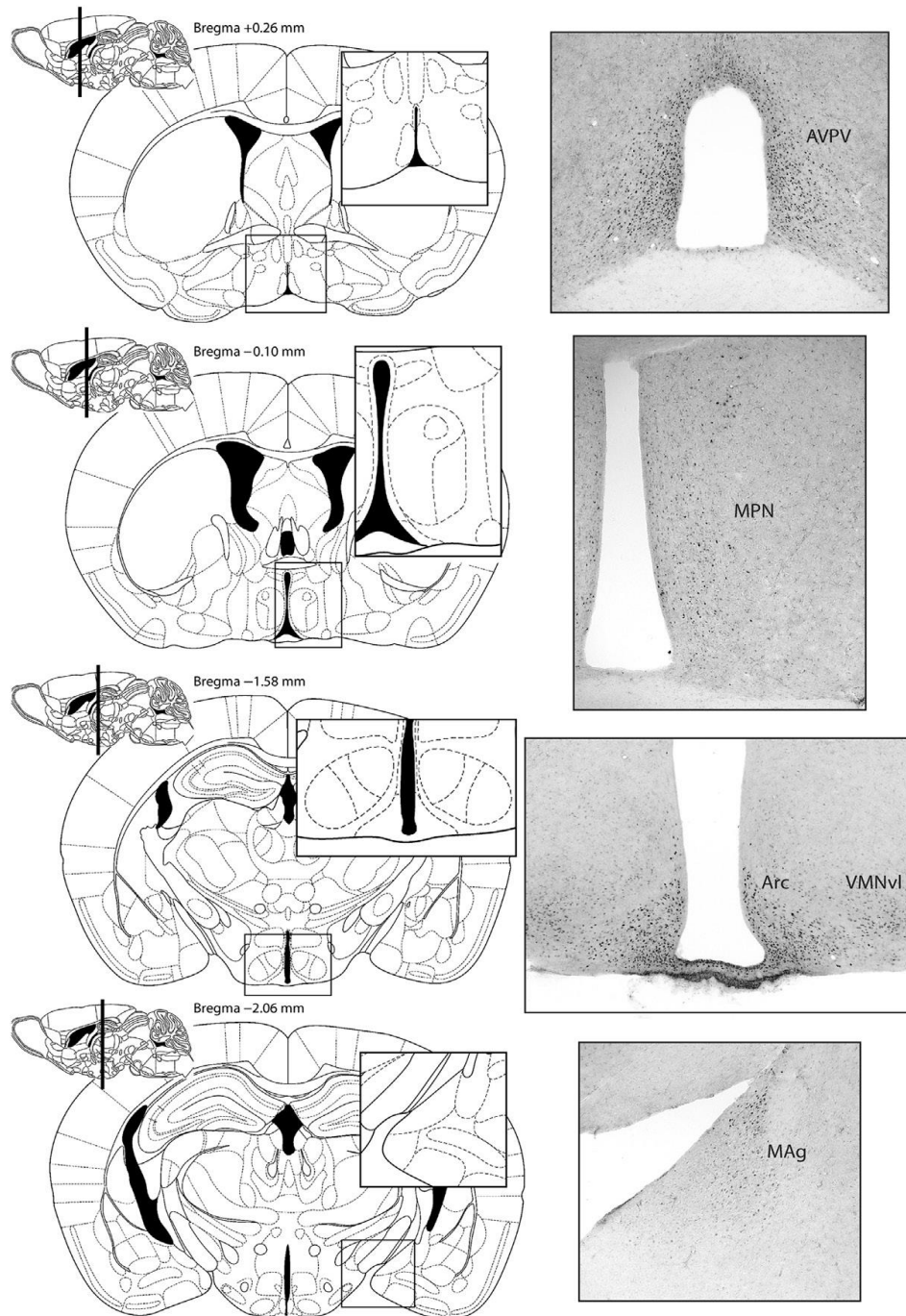
La unión de la PRL al PRL-R conduce a una rápida activación de las vías de transducción de señales asociadas al receptor y que en los diferentes tejidos existen cantidades variables de éstos, ya que, por ejemplo, en tejidos como la glándula mamaria y el ovario la isoforma



predominante es la larga, mientras que, en el hígado, la isoforma corta es la que más se expresa. (Bole-Feyost et al., 1998; Goffin et al., 2002).

Las diferentes isoformas del PRL-R pueden desencadenar diferentes vías de señalización por lo que la respuesta que lleva a cabo cada uno, es única, después de la dimerización del PRL-R para formar homodímeros. Los dímeros de la isoforma larga son capaces de activar vías de señalización de segundos mensajeros, en particular, la cascada de señalización del transductor de señal JAK y el activador de la transcripción (JAK-STAT), mediante la activación de STAT3 y STAT5 fosforilado como se muestra en la **Figura 8**. En cambio, la isoforma corta del PRL-R activa la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Tanto los heterodímeros de la isoforma larga y corta del PRL-R pueden inhibir la señalización de PRL y contribuyen a modular las acciones de PRL (Perrot-Appianat et al., 1997; Devi et al., 2014; Torner, 2016).

Se ha demostrado que la expresión del *Prlr* puede variar dependiendo del estado hormonal del animal (preñez, lactancia o ciclo estral); por ejemplo, en el ratón se ha demostrado que la isoforma larga y la isoforma corta incrementan significativamente a la mitad de la preñez en el ovario. Sin embargo, la forma corta disminuye incrementándose nuevamente hasta el inicio de la lactancia, mientras que la isoforma larga permanece constante hasta el final del embarazo y durante la lactancia (Ben-Jonathan et al., 2008; Shao et al., 2008). Por otro lado, en el cuerpo lúteo ambas isoformas están expresadas durante todo el embarazo y en los folículos su expresión incrementa al final de la preñez y durante la lactancia. Estos datos dan una idea clara de que las variaciones en la expresión de las isoformas del PRL-R se deben a la participación de esta hormona en eventos clave durante cada una de estas etapas y que la regulación de la expresión del *Prlr* depende tanto del tejido como del estado fisiológico y hormonal del sujeto (Gadd y Clevenger, 2006; Pascual-Mathey et al., 2016).

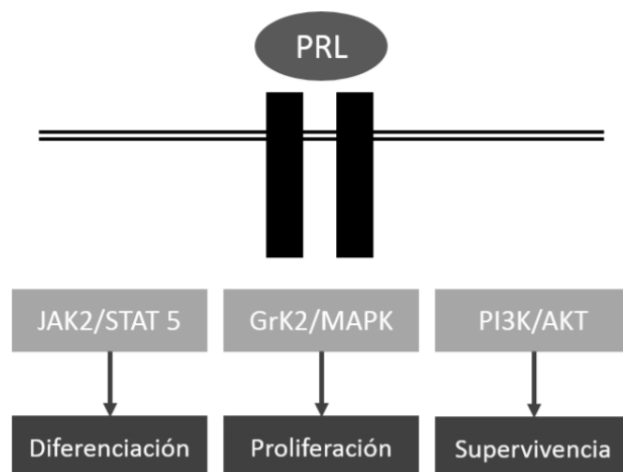


**Figura 8. Representación coronal de las regiones en donde se muestra la expresión de STAT5 fosforilado inducido por prolactina en el cerebro del ratón.** Los diagramas de la izquierda muestran las principales estructuras del cerebro del ratón y su agrandamiento. Las micrografías a la derecha muestran la expresión de STAT5 fosforilado inducido por PRL (los puntos negros representan la tinción nuclear de cada neurona). Las áreas principales que muestran un marcado positivo de las neuronas sensibles a la PRL están marcadas (AVPV, núcleo periventricular anteroventral; MPN, núcleo preóptico medial; ARC, núcleo arqueado; VMNvl, núcleo hipotalámico ventromedial, subdivisión ventrolateral; MAg, amígdala medial. Modificado del atlas del cerebro de Franklin y Paxinos, 2004; Brown et al., 2010.

### **Acción de la prolactina a través de su receptor**

Los efectos producidos por la hormona PRL en la célula se deben a la dimerización y activación de su receptor. Como todos los receptores de la familia de citocinas tipo I, el PRL-R no tiene actividad enzimática, sin embargo, su activación por la PRL provoca un aumento de la fosforilación de proteínas celulares, incluida la del propio receptor en residuos de tirosina. Esto se debe a que el PRL-R une en su región intracelular a dos tipos de proteínas tirosina quinasas, JAK2, miembro de la familia de las Janus quinasas, y las proteínas tirosinas quinasas de la familia de protooncogenes Src (Brooks, 2012).

La activación del receptor ocurre cuando la PRL se une a la región extracelular del PRL-R donde se encuentran dos monómeros induciendo su dimerización y activación. Cada molécula de PRL contiene dos sitios de unión, el primer sitio de unión de la PRL reacciona con una molécula del receptor. La formación de este complejo PRL-PRL-R es esencial para la activación del sitio de unión II en la misma molécula de PRL con la segunda molécula del receptor (Freeman et al., 2000). La unión de PRL con su receptor induce la fosforilación de tirosinas (Tyr) de distintas proteínas intracelulares. La región intracelular próxima a la membrana se encuentra constitutivamente asociada a JAK2 que se fosforila después de la interacción ligando-receptor y activando vías de señalización como JAK2/STAT (transductores y activadores de la señal de transcripción) y/o MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos). La activación de JAK2 es esencial para la señalización de muchas citocinas. Esta vía transmite información que se recibe de señales polipeptídicas extracelulares, a través de receptores transmembranales, directamente a promotores blanco en el núcleo, generando en consecuencia un mecanismo para regular la transcripción sin necesidad de segundos mensajeros. La PRL actúa a través de la isoforma larga, activa distintas cinasas, incluidas JAK2-STAT, Src cinasa, fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K/AKT) y proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (**Figura 9**). La isoforma corta no activa STAT, pero puede activar las vías alternas de MAPK y de PI3K (Binart et al., 2010; Blanco-Favela et al., 2012).



**Figura 9. Vías de señalización de la prolactina a través del PRL-R.** En cuanto a la vía de señalización intracelular desencadenada por el complejo hormona/receptor se incluye a la vía de las JAK2/STAT (Señales transductoras y activadoras de transcripción), la de las MAP cinasas (Proteínas cinasas activadas por mitógeno); y la vía de las AKT (Proteínas serina/treonina cinasas). Modificado de Pfaff, 2002.

### **Prolactina en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas**

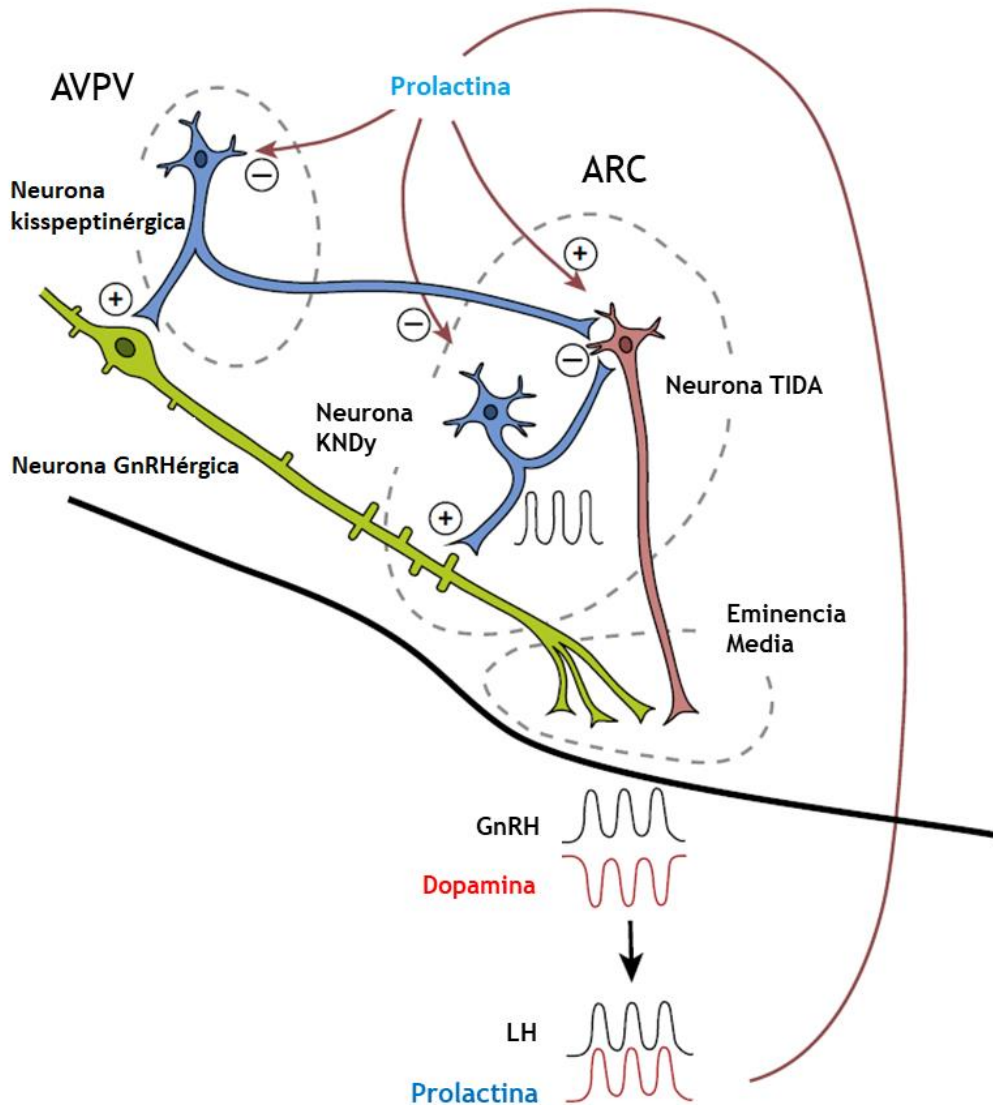
Las acciones biológicas de la PRL, y la distribución de los PRL-R en mamíferos, están relacionadas principalmente con la reproducción (Cabrera-Reyes et al., 2017) y la lactancia (Grattan y Tissier, 2015).

El aumento de la secreción de PRL hipofisaria durante la lactancia provoca la inhibición de la GnRH interrumpiéndose el ciclo reproductivo (ciclo menstrual). La PRL durante la lactancia se une al PRL-R en las neuronas kisspeptinérgicas disminuyendo la expresión del gen *Kiss1* en el hipotálamo medial y por ende la liberación del neuropéptido kisspeptina, esto repercute en la baja frecuencia y amplitud de los pulsos de las GnRH provocando la disminución en la secreción de la LH en ratas (Kokay et al., 2011) y ratones (Yamada et al., 2012). Sin embargo, la vía neuroendocrina por la cual la PRL inhibe la frecuencia del pulso de GnRH aún no se ha dilucidado por completo a diferencia del sistema dopaminérgico el cual controla la secreción de PRL (Grattan y Tissier, 2015). En modelos de roedores, las neuronas kisspeptinérgicas del ARC modulan la liberación de dopamina de las neuronas TIDA, regulando así la liberación de PRL, como se representa en la **Figura 10** (Szawka et al., 2010).

La dopamina liberada en la sangre portal hipofisaria inhibe tónicamente la secreción de PRL de los lactotrofos (Ben-Jonathan et al., 2006) y los estímulos que desencadenan la liberación de PRL, como el E<sub>2</sub>, el apareamiento y la lactancia, por lo general tienen la inhibición de las neuronas TIDA como una vía común (Grattan y Kokay et al., 2008). Existe evidencia de que las dendritas de las neuronas kisspeptinérgicas tienen contacto sináptico y regulan la actividad de las neuronas TIDA (Szawka et al., 2010; Ribiero et al., 2015).

Además de su participación en la lactancia, la PRL modula varios aspectos como el desarrollo, el sistema endocrino y reproductivo, la conducta, cognición y memoria (Cabrera-Reyes et al., 2017), en la neuroprotección en neuronas del hipocampo (Morales, 2011) y la supresión de la respuesta al estrés (Turner et al., 2009), en la estimulación de la mielinización en el sistema nervioso central (SNC) y la neurogénesis en el bulbo olfatorio (Shingo et al., 2003), en el sistema inmunológico e incluso desempeñan un papel en la homeostasis (Grattan y Tissier, 2015).

La PRL es capaz de ejercer múltiples acciones en el organismo; una de las mejor estudiadas es la referente a la reproducción (Grattan y Tissier, 2015; Cabrera-Reyes et al., 2017). Las funciones de la PRL en la reproducción han sido reportadas a partir de estudios en ratones sin expresión del receptor de PRL (knock-out) y deficientes en PRL, que tienen un fenotipo claro de infertilidad (Binart et al., 2010). En diferentes estudios se ha propuesto que la PRL puede modular el eje reproductivo al actuar sobre neuronas kisspeptinérgicas hipotalámicas en hembras (Kokay et al., 2011; Araujo-Lopes et al., 2014) y machos (Brown et al., 2014; Donato y Frazao, 2016). Las neuronas kisspeptinérgicas del hipotálamo expresan el PRL-R, por lo que la interacción de la PRL con sus receptores en las neuronas kisspeptinérgicas participan en la regulación del eje reproductivo (Brown et al., 2010; Kokay et al., 2018).



**Figura 10. Representación esquemática del circuito neuronal que muestra las posibles interacciones en el control de la secreción de prolactina y gonadotropinas.** Las neuronas KNDy del ARC, actúan como un generador pulsátil al estimular la liberación de GnRH y reducir paulatinamente la liberación de dopamina de las neuronas TIDA favoreciendo un el aumento de PRL previo al pico preovulatorio de LH. Se ha demostrado la conectividad anatómica entre las neuronas KNDy y las TIDA, pero el mecanismo de acción sigue siendo poco claro. Las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV que impulsan el aumento preovulatorio de LH. La PRL actúa a través de la retroalimentación negativa, activando las neuronas TIDA liberando dopamina e inhibiendo las neuronas kisspeptinérgicas. La elevación crónica de la PRL, puede conducir a la supresión de la secreción de gonadotropinas. GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; KNDy: neurona kisspeptinérgica, neuroquinina B (NKB) y dinorfina; RP3V, región periventricular rostral del tercer ventrículo; Neurona TIDA, neurona dopaminérgica tuberoinfundibular. Modificado de Grattan, 2018.

## Dimorfismo sexual en la expresión de la prolactina

La PRL es sintetizada y liberada por los lactotrofos de la hipófisis anterior, en las hembras hay una mayor cantidad de lactotrofos que en los machos, un dimorfismo sexual que comienza alrededor de la pubertad y continúa hasta la edad adulta (Grattan y Tissier, 2015).

En las hembras, la PRL es fundamental para favorecer el estado de maternidad, disminuyendo la receptividad femenina, promoviendo la ingesta de alimentos y la conducta materna (Esteves et al., 2019). Varios estudios han reportado que el aumento de PRL está asociado a condiciones fisiológicas como el estrés y la conducta sexual, ambos factores elevan los niveles de PRL en ratones hembra y macho (Kirk et al., 2017). Sin embargo, el papel de la PRL en la fisiología de los machos no se ha detallado ampliamente, aunque se ha propuesto que la liberación de PRL durante la cópula regula la libido en roedores (Exton et al., 2001) y humanos (Krüger et al., 2005).

La hormona PRL a través de las variantes de su receptor PRL-R desempeña funciones importantes en varios tejidos, incluyendo el cerebro. En particular en la hipófisis, la *Prl* y el *Prlr* son más abundantes en ratas hembra y la expresión de ambos genes varía conforme al ciclo estral de la hembra (Cabrera-Reyes et al., 2015). Sin embargo, en ratas macho adulto la expresión de *Prl* es más abundante en el hipotálamo que en las hembras en cualquier etapa del ciclo estral, aun así, la expresión del *Prlr* es más abundante en hembras, lo que sugiere que la hembra tiene mayor disponibilidad del PRL-R para sus funciones (Cabrera Reyes et al., 2015)

Recientemente en el laboratorio se describió que las variaciones en los niveles de PRL provocado por la administración exógena de la hormona retrasa el inicio de la pubertad en ratones juveniles hembra, pero no en machos (Corona et al., 2021). Este cambio en los niveles de PRL aumentan la expresión del *Prlr* en el ARC de ratones hembra y macho, lo que sugiere que la PRL es importante en las primeras etapas de maduración sexual e inicio de la pubertad en ambos sexos (Corona et al., 2021).

La expresión del PRL-R es similar en ratones hembra y macho (Brown et al., 2010), sin embargo, la expresión de *Prlr* se concentra en el hipotálamo rostral y medio, aunque también se ha descrito la expresión del PRL-R en regiones extra-hipotalámicas como la MePD, el

BNST, entre otros (Brown et al., 2010; Patil et al., 2014). Estas regiones extra-hipotalámicas son importantes para la regulación de conductas específicas para cada sexo (Esteves et al., 2019) en el caso de la MePD regula la conducta sexual en machos (Pineda et al., 2017).

### **Interacción entre la prolactina y las neuronas kisspeptinérgicas**

El descubrimiento del neuropéptido kisspeptina ha proporcionado un nuevo panorama en la comprensión del sistema neuroendocrino que controla la reproducción, y el neuropéptido kisspeptina podría estar involucrado en ambas formas de coordinación entre la PRL y la LH (Grattan, 2015).

Se ha observado que un estímulo agudo de PRL induce la activación de los PRL-R en las neuronas kisspeptinérgicas, mediante la presencia de STAT5 fosforilado (Brown et al., 2014; Kokay et al., 2011; Li et al., 2011). La vía de señalización STAT5 es la vía canónica de la PRL utilizada para mediar la mayoría de sus efectos en los diferentes tejidos (Pascual-Mathey et al., 2016).

Se ha comprobado que la administración crónica de PRL ovina reduce la expresión de kisspeptina y GnRH y causa anovulación en ratones hembra (Sonigo et al., 2012). Esto se respalda con estudios en donde describen el papel de la PRL en la regulación de las neuronas kisspeptinérgicas. La inyección (icv) crónica de PRL ovina en ratas lactantes y vírgenes induce la expresión de STAT5 fosforilado en el ARC, esta expresión inhibe la secreción de LH en ratas hembra (Araujo-Lopes et al., 2014), demostrando que las neuronas kisspeptinérgicas responden a la acción directa de PRL en diferentes condiciones fisiológicas. Por lo cual es inequívoco señalar que la lactancia inhibe a la kisspeptina en el ARC y suprime la secreción de LH (Yamada et al., 2007; True et al., 2011).

La expresión de neuronas kisspeptinérgicas del AVPV en ratas hembra es menor (Overgaard et al., 2013) y, probablemente debido a esto, observar el efecto de la PRL o durante la lactancia en las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV en ratas ha sido complicado (Yamada et al., 2007; Smith et al., 2011; Araujo-Lopes et al., 2014). En ratones, la expresión de neuronas kisspeptinérgicas es más evidente (Overgaard et al., 2013) y se ha demostrado que la secreción elevada de PRL durante la lactancia o inducida en el ratón se asocia con la



disminución de la expresión de kisspeptina en el AVPV y en el ARC (Liu et al., 2014; Brown et al., 2014). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo que determina la inhibición inducida por la PRL durante la lactancia en ambas poblaciones, AVPV y ARC, en murinos (Overgaard et al., 2013; Araujo-Lopes et al., 2014).

En un modelo de infertilidad causado por la administración crónica de PRL en ratones hembra, la administración intraperitoneal del péptido kisspeptina-10, favorece la recuperación de la regularidad del ciclo estral y la tasa de ovulación normal, al mantener la secreción de gonadotropinas y la ciclicidad ovárica (Sonigo et al., 2012; Donato y Frazao, 2016). La capacidad de las neuronas kisspeptinérgicas de regular a su vez a la PRL refleja una interacción compleja de las neuronas kisspeptinérgicas KNDy del ARC, así como las del AVPV con las neuronas de dopamina que contribuyen al control de la secreción de la hormona (Aquino et al., 2017; Grattan, 2018). La mayoría de las neuronas kisspeptinérgicas expresan el PRL-R (Bernard et al., 2015), por lo que se ha propuesto que en estados hiperprolactinéemicos la supresión del neuropéptido kisspeptina es causado por la PRL (Grattan, 2015).

## Justificación

Se ha propuesto a la PRL como un modulador del eje HHG durante la etapa adulta, actuando a través de la interacción con su receptor PRL-R que se expresa en las neuronas kisspeptinérgicas. En esta etapa, la presencia de las neuronas kisspeptinérgicas es sexualmente dimórfica, siendo mayor la expresión en las hembras. Este dimorfismo comienza con el proceso de maduración sexual, sin embargo, se desconoce si la expresión de *Kiss1* y *Prl* es también dimórfica. Aunado a esto, la PRL tiene funciones claras en la fisiología y el comportamiento femenino lo que ha apoyado la idea de que la PRL podría tener un papel esencial en las hembras. Por esta razón, resulta de interés evaluar si durante la maduración sexual, junto con el establecimiento dimórfico de las neuronas kisspeptinérgicas se establece también la participación de otros actores importantes como el KISS1R que está presente en las neuronas GnRHérgicas y que es esencial para el inicio de la pubertad y para el mantenimiento de la etapa reproductiva, así como el PRL-R en las neuronas kisspeptinérgicas. En el presente trabajo se evaluó el perfil de la expresión relativa de los genes de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y los *Kiss1r* durante las diferentes etapas que llevan a la maduración sexual de ratones hembra y macho.

Estudios previos muestran que la PRL actúa directamente sobre neuronas kisspeptinérgicas e induce la supresión de la expresión del ARNm de *Kiss1* y la secreción de kisspeptina, lo que conduce a una menor activación de la secreción de gonadotropinas y GnRH (Donato y Frazao, 2016). Dados estos antecedentes respecto a las diferencias entre sexos podemos formular la siguiente hipótesis.

## **Hipótesis**

La expresión de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* en el hipotálamo y en la MePD mostrará un dimorfismo sexual durante las etapas de la maduración sexual que marcan cambios fisiológicos importantes tanto en hembras como en machos: Inicio de la Pubertad, Madurez Sexual y Adulto.

## **Objetivos**

### **General**

Cuantificar la expresión de *Prl*, *Kiss1* y sus receptores *Prlr*, *Kiss1r*, respectivamente, en el hipotálamo y en la MePD durante la maduración sexual de ratones hembra y macho C57BL/6.

### **Particulares**

1. Cuantificar la expresión del ARNm de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r*, mediante qPCR cuantitativa (qPCR), en el hipotálamo y en la MePD de ratones hembra, en diferentes etapas de la maduración sexual: Inicio de la Pubertad, Madurez Sexual y Adulto.
2. Cuantificar la expresión del ARNm de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r*, mediante qPCR, en el hipotálamo y en la MePD de ratones macho, en diferentes etapas de la maduración sexual: Inicio de la Pubertad, Madurez Sexual y Adulto.
3. Determinar si los niveles de expresión de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* tanto en el hipotálamo como en la MePD presentan un patrón de dimorfismo sexual durante la maduración sexual.

## **Materiales y método**

### **Modelo experimental**

Se utilizaron ratones hembra y macho de la cepa C57BL/6 de diferentes edades previo, durante y después de la pubertad que se obtuvieron a partir del PN21. Los ratones fueron proporcionados y criados en el Bioterio General del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los animales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones: ciclo de luz invertido (12 horas luz/12 horas oscuridad) en donde la luz se apaga a las 08:00 am y se enciende a las 20:00 pm, con temperatura controlada 23°C, así como agua y alimentación *ad libitum*. Los animales permanecieron con la madre hasta el PN21, que corresponde al día del destete. A partir del PN 21 se separaron hembras y machos y se les dio un seguimiento individual para los experimentos. Todas las manipulaciones fueron aprobadas por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM Campus Juriquilla con los protocolos 049 y 104.A, siguiendo los Lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999.

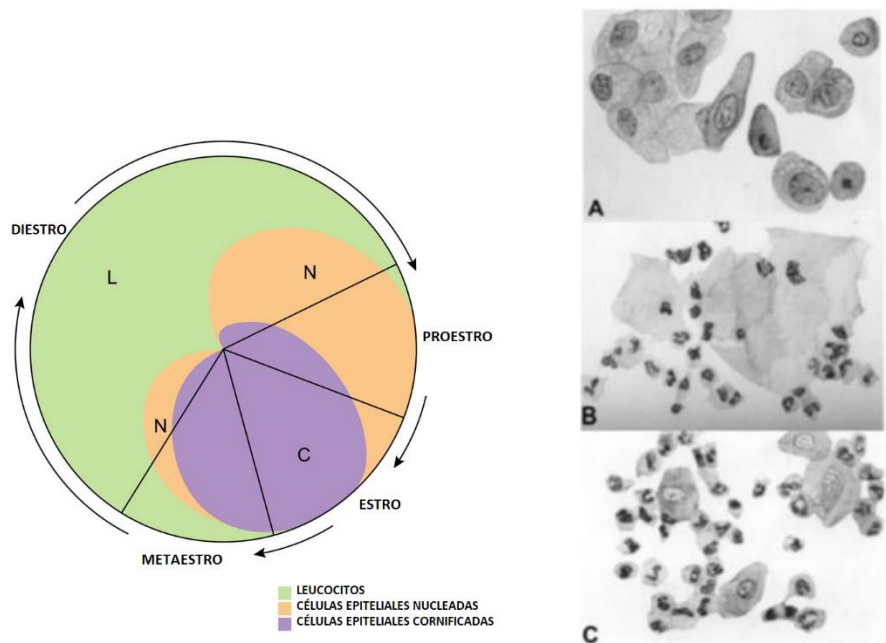
### **Diseño experimental**

Para conformar de manera aleatoria los grupos de interés para nuestros experimentos utilizamos ratones hembra y macho a partir del PN21 y se determinó la edad de nuestros animales mediante características que nos permitieron tener tres grupos que representan el proceso de maduración sexual de los ratones: grupo de Inicio de Pubertad, Madurez Sexual y grupo de Adultos. Para lograr tener los primeros dos grupos, se les dio un seguimiento individual a los ratones hembra y macho a partir del PN21, día del destete de la madre y edad en la cual los animales ya son independientes de los padres.

### **Hembras**

El Inicio de Pubertad, etapa que se determinó con la identificación de la apertura vaginal (AV), PN28-33, coincide con la activación del eje HHG. La apertura vaginal es un evento fisiológico que se puede observar a simple vista y se acompaña con el aumento de E<sub>2</sub> y LH. (Navarro et al., 2004; Clarkson et al., 2010). La etapa de Madurez Sexual, PN37-45, se determinó con el primer estro que fue identificado mediante citología vaginal, esta etapa

marca el inicio de la etapa madura. El ciclo estral se divide en cuatro fases: diestro, proestro, estro y metaestro, (**Figura 11**), los cambios citológicos vaginales determinan las fases del ciclo. Estos se correlacionan con los cambios en la concentración de hormonas circulantes durante cada etapa del ciclo estral (Cora et al., 2015). Durante el diestro hay una mayor cantidad de leucocitos, pocas células epiteliales y muy pocas células nucleadas, en el proestro hay mayor cantidad de células nucleadas y pocos leucocitos, mientras que durante la etapa del estro, hay una mayor cantidad de células epiteliales cornificadas (sin núcleo) o queratinizadas; y finalmente en el metaestro empiezan a aumentar la cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales (Byers et al., 2012). Para la etapa Adulto, se utilizaron hembras vírgenes de PN84, 12 semanas, debido a que a esta edad ya se ha establecido por completo la fisiología reproductiva del animal (Pinilla et al., 2012).



**Figura 11. Representación proporcional de los diferentes tipos de células que se presentan durante el ciclo estral de la hembra.** L: leucocitos (C), N: células epiteliales nucleadas (A), C: células epiteliales cornificadas (B). Las etapas del ciclo estral se identifican con base en la ausencia, presencia, o la proporción de tres tipos de células principalmente en el epitelio vaginal: los leucocitos, las células epiteliales nucleadas y las células epiteliales cornificadas. Modificado de Byers et al., 2012; Cora et al., 2015.

## Machos

El Inicio de Pubertad se determinó cuando se observó el descenso testicular (DT), que ocurre aproximadamente en el PN30-35 que fisiológicamente está acompañado del inicio de la espermatogénesis (Egan et al., 2017). La etapa de Madurez Sexual está determinada por la producción de espermatozoides móviles capaces de fecundar al óvulo y normalmente ocurre entre PN40 y PN55, tanto en ratas como en ratones (Prevot, 2015). Por ello, la edad en la cual se determinó la etapa de madurez sexual fue 15 días después del DT y el agrandamiento testicular. Para el grupo de Adultos, se utilizaron machos de PN84, aproximadamente 12 semanas, debido a que a esa edad el eje HHG ya es completamente funcional y maduro (Navarro et al., 2015).

En la **Tabla 1** se representa la organización de los grupos experimentales.

Grupos	Edad (Media $\pm$ SEM)		
Inicio de Pubertad			
Hembras	n=18	PN (31.44 $\pm$ 1.91) AV	
Machos	n=18	PN (32.16 $\pm$ 0.78) DT	
Madurez Sexual			
Hembras	n=18	PN (32.27 $\pm$ 1.22) AV	PN (41.77 $\pm$ 3.5) MS
Machos	n=18	PN (31.33 $\pm$ 1.08) DT	PN (45.22 $\pm$ 0.8) MS
Adulto			
Hembras	n=18	PN: 84 (12 semanas)	
Machos	n=18	PN: 84 (12 semanas)	

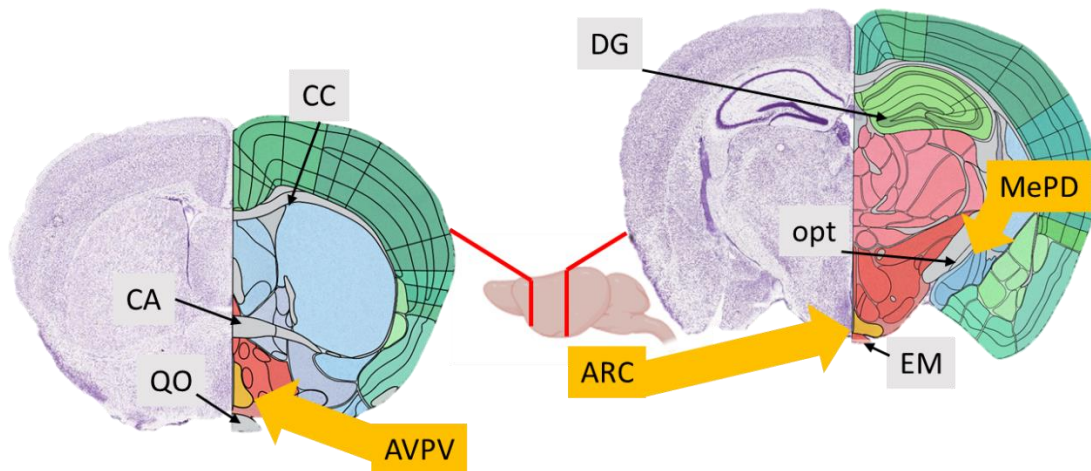
**Tabla 1. Grupos experimentales utilizados.** En la tabla se representan los tres diferentes grupos estudiados que representan el proceso de maduración sexual: Inicio de Pubertad, Madurez Sexual y Adulto en animales hembra y macho. Se observa el número de ratones utilizados para cada grupo y sexo, así como la media de las edades. SEM: error estándar de la media; PN: postnatal; MS: Madurez Sexual; AV: apertura vaginal; DT; descenso testicular; n: número de animales por grupo.

### **Cuantificación de la expresión del ARNm por qPCR**

La expresión de los genes *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* se cuantificó por qPCR en las regiones del hipotálamo y la MePD de hembras y machos en las diferentes etapas de maduración sexual. La agrupación de las diferentes etapas de maduración sexual se representa en la Tabla 1. Se cuantificó la expresión de los genes en el hipotálamo debido a que en esta región se encuentran las neuronas que expresan el *Kiss1* (Smith et al., 2006), así como una densa expresión del *Prlr* (Brown et al., 2010). En la MePD hay también expresión de neuronas kisspeptinérgicas que son relevantes para la regulación del eje reproductivo (Pineda et al., 2017). Así mismo, por medio de la detección de células que expresan STAT5 fosforilado en la región de la MePD, se sugiere que hay presencia del PRL-R en esta región, pero en menor cantidad en comparación con regiones hipotalámicas (Salais-López et al., 2018).

### **Disección del tejido para el análisis de qPCR**

Los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se extrajo el cerebro el cual se mantuvo en frío. Las regiones del hipotálamo y de la MePD se obtuvieron siguiendo referencias anatómicas del Atlas del cerebro de ratón (Franklin y Paxinos, 2004). Las muestras fueron colectadas y se prepararon seis grupos del tejido hipotalámico, conformado por tres animales para cada etapa de maduración sexual de ratones hembra y macho. Para la disección de la MePD se realizaron tres grupos con el tejido de la MePD izquierda y derecha para cada etapa de maduración sexual de cada animal. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento (**Figura 13**).



**Figura 13. Representación anatómica coronal del cerebro de ratón con las regiones de interés AVPV, ARC y MePD.** Para hacer la disección del hipotálamo completo se realizaron dos cortes coronales señalados con líneas rojas, las referencias anatómicas utilizadas fueron sobre la superficie ventral anterior al quiasma óptico (QO) y anterior a la protuberancia. El primer corte coronal es donde se ubica a la comisura anterior (CA), el cuerpo calloso (CC) y es la región en donde inicia el AVPV (amarillo). El segundo corte se realizó anterior a la protuberancia para obtener en la misma rebanada al ARC (amarillo) y en vista coronal se aprecia a la eminencia media EM, el *dentate gyrus* (DG), en este segundo corte y como referencia anatómica adicional se encuentra el tracto óptico (TO) que sirve de referencia para diseccionar a la MePD (como se muestra en la vista coronal del cerebro de ratón). Modificado del atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos, 2004.

### **Extracción, purificación y cuantificación de ARNm**

El ARN total se purificó mediante el método de isotiocianato de guanidina con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) para aislar ARN en un solo paso, siguiendo el instructivo del reactivo. Brevemente: el tejido hipotalámico y de la MePD se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL con 500 microlitros ( $\mu$ l) de TRIzol y se homogenizaron con ayuda de un homogeneizador Sigma Aldrich 2000. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ l de cloroformo a cada uno de los tubos y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos para luego incubarlos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los tubos se centrifugaron para separar la fase acuosa que contiene el ARN, la cual se colocó en un tubo nuevo. Para precipitar el ARN de la solución se adicionaron 0.5 ml de alcohol isopropílico y los tubos se centrifugaron para decantar el sobrenadante. El ARN se resuspendió en agua desionizada libre de RNasas. De esta solución se preparó una dilución 1:100 en agua desionizada libre de RNasa para medir en un espectrofotómetro ND-1000 (Nano-Drop; Thermo Scientific,



Waltham, MA). El ARN total de cada muestra se obtuvo con relación a la absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  y se determinó la pureza y la concentración del ARN obtenido.

Para la detección de los genes blanco se utilizaron los oligonucleótidos tomados de (Moreno-Carranza et al., 2018; Quennell et al., 2011) o fueron diseñados que se muestran a continuación en la **Tabla 2** y se demostró su eficiencia mediante curvas de dilución (*Prl*: 97.7%; *Prlr* (isoforma larga): 99.0%; *KissI*: 120.1% y *KissIr*: 113.6%).

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño	# acceso
<i>Prl</i>	F: 5'- ACCCTGATCCTCAGTTTGTGT - 3' R: 5'- CTCCAATCTCTTTGGCTCTTG - 3'	118 pb	X04418.1
<i>Prlr</i> (isoforma larga)	F: 5'- ACCTGCATCTTTCCACCAGTT - 3' R: 5'- CCAGAGTCACTGTCGGGA - 3'	257 pb	NM_001034111.1
<i>KissI</i>	F: 5'- CCTTCCTCCCAGAATGATCTC - 3' R: 5'- GATCCAGGCTTCACTTTGC - 3'	99 pb	NM_178260.3
<i>KissIr</i>	F: 5'- CTTACCGCACTCCTCTACC - 3' R: 5'- ACACAGTCACATAACCAGCGG - 3'	266 pb	NM_001359010.1
<i>18s</i> Gen constitutivo	F: 5'-CTCTTTCTCGATTCCGTGGGT-3' R: 5'-TTAGCATGCCAGAGTCTCGT-3'	100 pb	M59389

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación del ARNm.** Para la amplificación del cDNA se utilizan oligonucleótidos específicos (F: forward; R: reverse), pares de bases (pb), ambas secuencias actúan como cebadores de la acción de la polimerasa.

### Retrotranscripción

El ARN obtenido se mezcló en un tubo Eppendorf libre de nucleasas con 1  $\mu$ L del cebador, 1  $\mu$ g de RNA total, 1  $\mu$ L del mix de 10mM de dNTPs y se llevó a volumen final de 12  $\mu$ L con agua libre de nucleasas. Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C para romper uniones inespecíficas en el ARN y permitir que se extienda por completo la cadena; de esta manera se pueden unir los oligonucleótidos, descritos en la Tabla 2, de forma correcta a la cola de poli A de los ARNm de interés; posteriormente el tubo donde se llevó a cabo la reacción anterior se colocó en hielo y se le adicionó Buffer 5X, 2  $\mu$ L de ditioneitol (DTT) 0.1 M; esta segunda reacción se incubó 2 minutos a 37°C, para posteriormente añadir 1  $\mu$ L de retrotranscriptasa del virus de leucemia murina moloney M-MLV. Se añadió la retrotranscriptasa y se incubó 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C, luego 70°C durante 15 minutos para detener la reacción. Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -80°C.

## **qPCR en tiempo real**

La PCR cuantitativa se realizó añadiendo el colorante SYBR Green (Thermo Scientific), que emite su máxima fluorescencia cuando se encuentra unido a la doble cadena de ADN, esta fluorescencia fue detectada con el sistema de detección de PCR StepOne®. Las muestras se prepararon por duplicado en un volumen total de 10 µl. Para la amplificación de cada ARN mensajero (*Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r*) de ratón se emplearon los oligonucleótidos presentados en la Tabla 2. Se aplicaron las siguientes condiciones de PCR: 95 °C durante 10 minutos previo a 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos y la extensión a 72 °C durante 30 segundos según las instrucciones del fabricante. Las muestras se compararon mediante el método de Ct relativo (Livak y Schmittgen., 2001). Los resultados de qPCR se representan como la expresión relativa de los genes de interés (veces de inducción), que se calculó utilizando la expresión del ARN ribosomal 18s como control interno (Fleming et al., 2019).

## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó por duplicado en todas las muestras de las diferentes etapas de maduración sexual de ratones hembra y macho a partir del promedio de los valores de Ct (ciclo umbral). Los niveles relativos de expresión (tasa de cambio) de los ARNm evaluados fueron: *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* en diferentes etapas de maduración sexual. Se utilizó al grupo de Inicio de Pubertad como el grupo de referencia (control) tanto en el hipotálamo como en la MePD. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, (K-W), debido a que los datos no presentaron una distribución normal (evaluado por la prueba de Shapiro-Wilks), y, si el resultado de la prueba estadística mostraba diferencias significativas, se realizó la prueba post-hoc de Dunn.

El análisis estadístico de la expresión sexualmente dimórfica de las tres etapas de maduración sexual se evaluaron los siguientes aspectos: interacción entre grupos, la etapa de maduración y sexo. Para evaluar el dimorfismo sexual de los niveles de expresión de los genes de interés se utilizaron los mismos valores de Ct de las diferentes etapas de maduración sexual de ratones hembra y macho, pero la comparación se hizo utilizando como grupo control a los

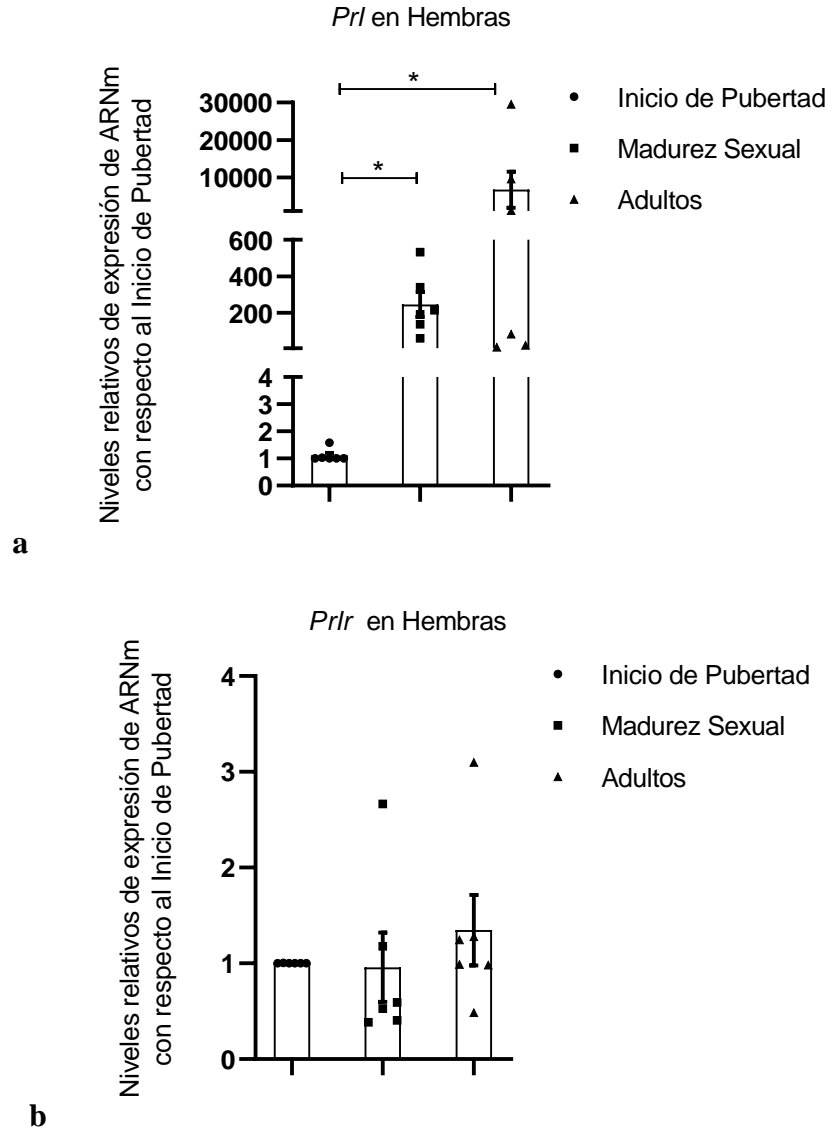
machos en el Inicio de la Pubertad. Al no tener una distribución normal, se optó por ordenar los datos de hembras y machos en las diferentes etapas de maduración sexual, utilizando como grupo control a los machos, con la finalidad de utilizar el análisis de varianza (ANOVA) de datos aleatorios de dos vías, seguidas de una prueba post-hoc de Bonferroni, debido a que no hay una prueba de dos vías para datos no paramétricos. Fueron considerados como diferencias significativas aquellos en los que la probabilidad fue igual o menor que (0.05). El programa estadístico utilizado fue GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, versión 8.

## Resultados

### Hembras

#### ARNm de *Prl* y *Prlr* en hipotálamo

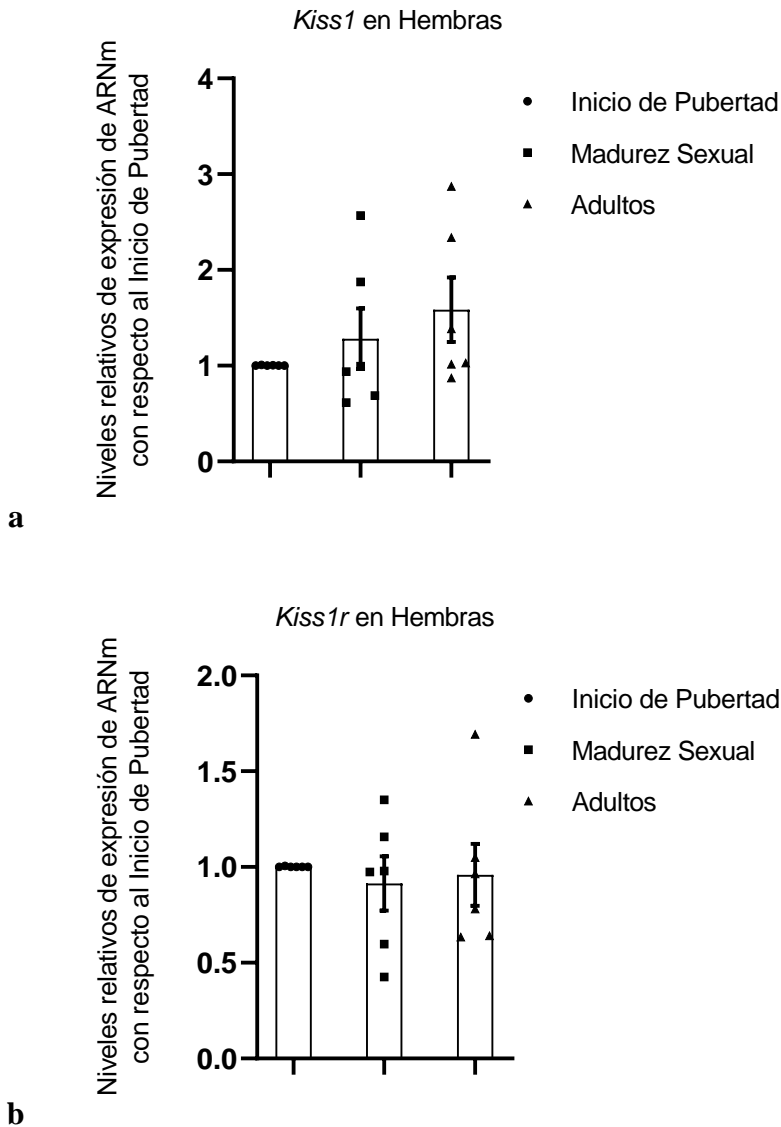
La expresión del ARNm de *Prl* fue significativamente diferente entre las tres etapas de maduración sexual (Inicio de Pubertad, Madurez Sexual y Adulto) (K-W:  $H(2) = 11.38$ ,  $p = 0.0006$ ), en donde la expresión mayor se observó en la etapa de Madurez Sexual y en la etapa de Adultos en comparación con el Inicio de Pubertad ( $p = 0.125$  y  $p = 0.0088$ , respectivamente) (**Figura 14 a**). El perfil de expresión del ARNm de *Prlr* (**Figura 14 b**) fue constante en las tres etapas de maduración sexual en hembras (K-W:  $H(2) = 0.4402$ ,  $p = 1.731$ ). Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 1.



**Figura 14. Expresión del ARNm de *Prl* y *Prlr* en el hipotálamo de ratones hembra C57BL/6 en la maduración sexual.** (a) Perfil de expresión del ARNm de *Prl* y *Prlr* (b) en las tres etapas de maduración sexual. Cada símbolo en las gráficas representa un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones evaluados para cada etapa de maduración sexual. El análisis estadístico para *Prl* y *Prlr* se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis y una prueba post-hoc para *Prl* de comparación múltiple de Dunn,  $*p < 0.05$ . Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* en hipotálamo

El perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* (**Figura 15 a**) fue constante en todos los grupos. La expresión de *Kiss1r* también fue constante (**Figura 15 b**) en las diferentes etapas de maduración sexual. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los genes de acuerdo a la prueba estadística de Kruskal Wallis, ni en *Kiss1* (K-W:  $H(2)=(3.310)$ ,  $p=0.1962$ ), ni en *Kiss1r* (K-W:  $H(2)=(1.263)$ ,  $p=0.5622$ ). Para los valores de media  $\pm$  error estándar (SEM), ver anexo 1.

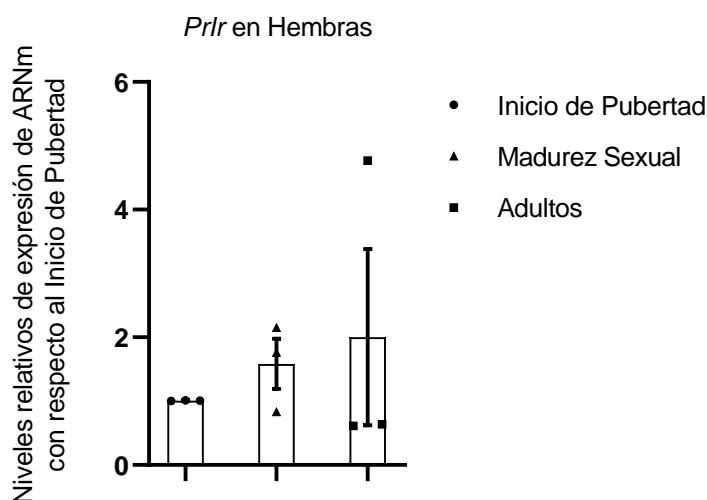


**Figura 15. Expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* en el hipotálamo de ratones hembra C57BL/6 en la maduración sexual.** En las gráficas (a) y (b) se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r*, respectivamente, en las tres diferentes etapas de maduración sexual. Cada símbolo en ambas gráficas representa un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones

evaluados para cada etapa de maduración sexual. El análisis estadístico para *Kiss1* y *Kiss1r* se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

#### ARNm del *Prlr* en la MePD

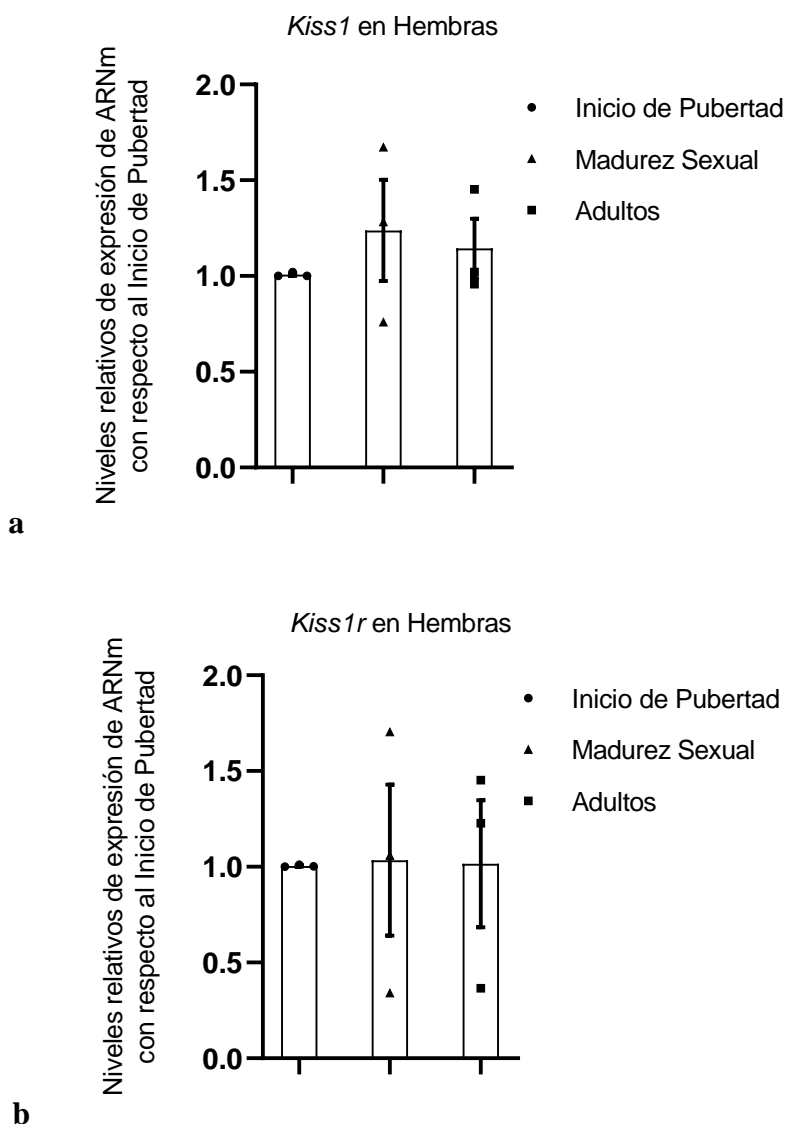
El perfil de expresión del ARNm del *Prlr* (**Figura 16**) fue constante en las tres etapas de maduración sexual en hembras, por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas (K-W:  $H(2)=(8.00)$ ,  $p=0.7214$ ). Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 1.



**Figura 16. Expresión del ARNm del *Prlr* en la MePD de ratones hembra C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica se presenta el perfil de expresión del ARNm del *Prlr*, en las tres diferentes etapas de maduración sexual. Cada símbolo en las gráficas representa un grupo conformado por seis animales, dando una n total de 18 ratones evaluados para cada etapa de maduración sexual. El análisis estadístico para el *Prlr* se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

## ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* en la MePD

El perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* (**Figura 17 a, b**) fue constante en las tres etapas de maduración sexual. El análisis con la prueba Kruskal Wallis no reveló diferencias significativas en la expresión de *Kiss1* (K-W:  $H(2)=(0.3556)$ ,  $p=0.8786$ ), y tampoco en la expresión de *Kiss1r* (K-W:  $H(2)=(0.6222)$ ,  $p=0.8286$ ). Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 1.



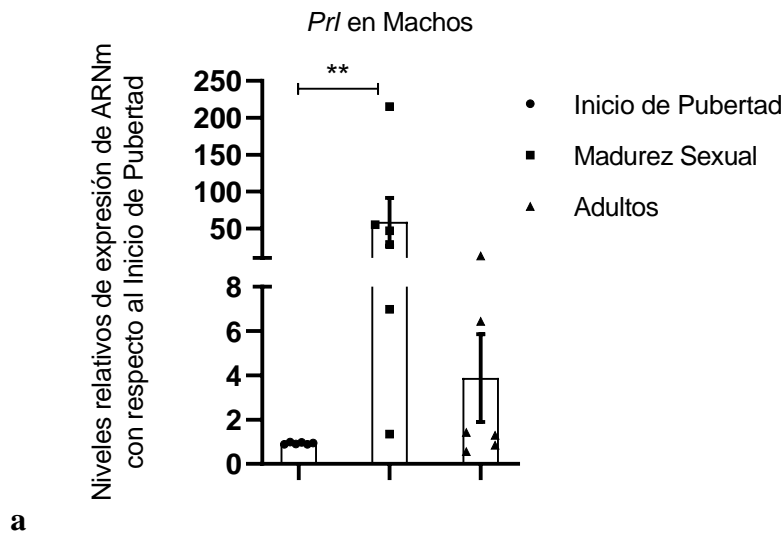
**Figura 17. Expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* en la MePD de ratones hembra C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica (a) y (b) está representado el perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r*, respectivamente, en las tres diferentes etapas de maduración sexual. Cada símbolo en ambas gráficas representa un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones

evaluados para cada etapa de maduración sexual. El análisis estadístico para el *Kiss1* y *Kiss1r* se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

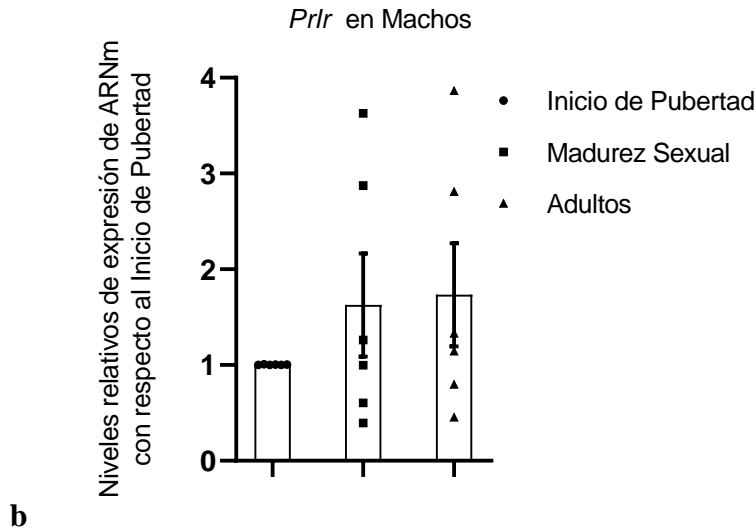
## Machos

### ARNm de *Prl* y *Prlr* en hipotálamo

El perfil de expresión del ARNm de *Prl* y del *Prlr* (**Figura 18 a, b**) tuvo un aumento en la expresión del ARNm de *Prl* en la etapa de Madurez Sexual. La prueba de Kruskal Wallis reveló diferencias estadísticamente significativas para la expresión del ARNm de *Prl* (K-W:  $H(2)=(8.503)$ ,  $p=0.0079$ ). El análisis post-hoc de Dunn reveló un aumento en la expresión de *Prl* en la etapa de Madurez Sexual comparado con el Inicio de Pubertad ( $p=0.0242$ ), esto es un dato interesante que permite suponer que la PRL tiene acciones puntuales durante la Madurez Sexual en machos. Con respecto al análisis de la expresión de *Prlr*, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre las etapas de maduración sexual (K-W:  $H(2)=(0.7552)$ ,  $p=0.6082$ ). Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 1.



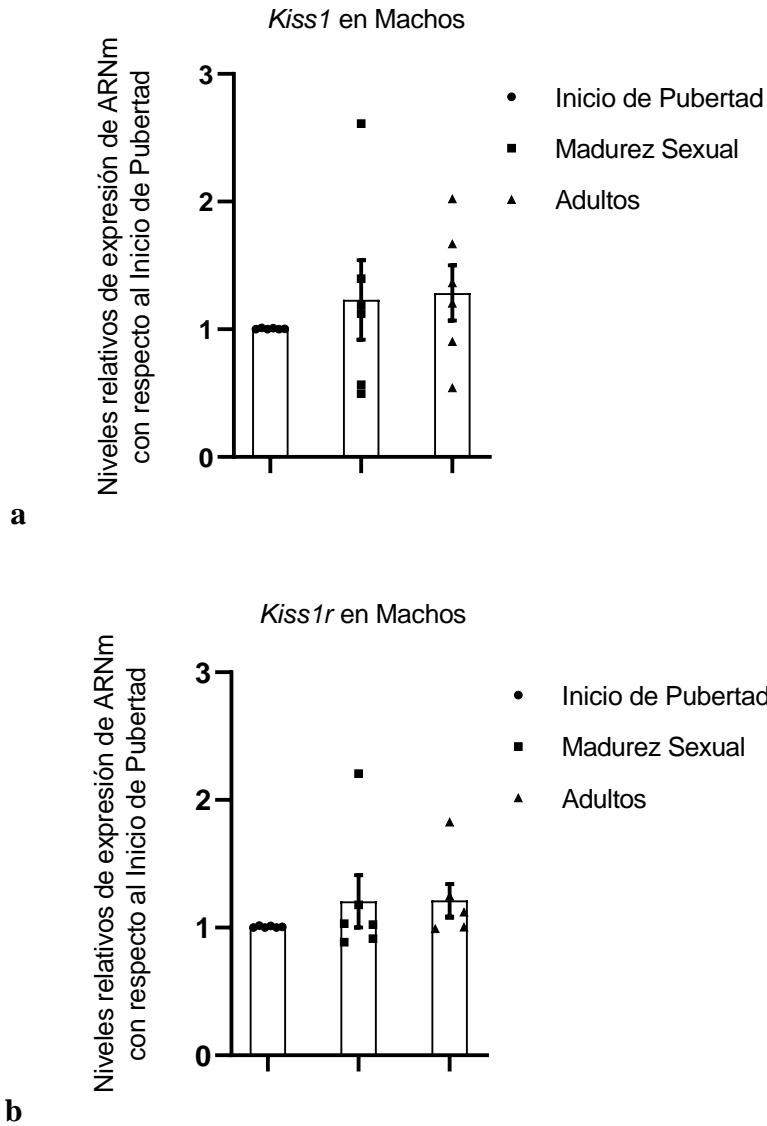




**Figura 18. Expresión del ARNm de *Prl* y *Prlr* en el hipotálamo de ratones macho C57BL/6 en la maduración sexual.** En las gráficas se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Prl* (a) y *Prlr* (b) en las tres etapas de maduración sexual. Los símbolos representan un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba post-hoc de comparación múltiple de Dunn, para el ARNm de *Prl*, \*\*  $p < 0.01$ . Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

#### ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* en hipotálamo

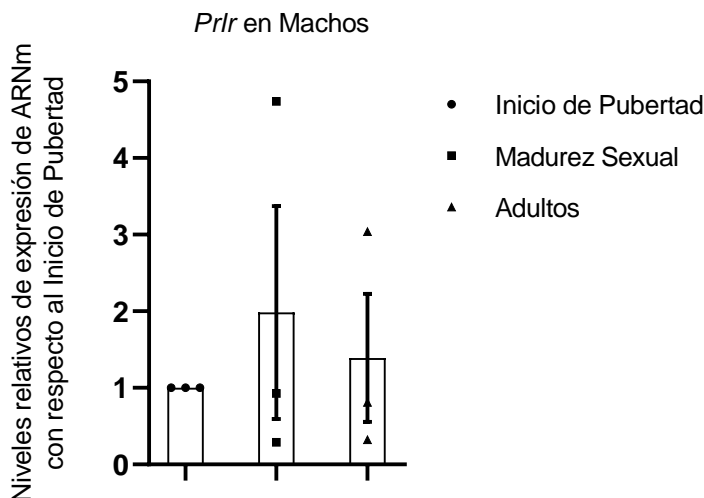
El perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* (**Figura 19 a**) tuvo un patrón de expresión constante en los tres grupos: *Kiss1* (K-W:  $H(2)=(1.368)$ ,  $p=0.5264$ ). La expresión de *Kiss1r*, (**Figura 19 b**), presentó niveles similares en el hipotálamo en las tres etapas de maduración sexual. Los resultados de la prueba estadística para *Kiss1r* no mostraron diferencias significativas (K-W:  $H(2)=(2.327)$ ,  $p=0.3263$ ). Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 1.



**Figura 19. Expresión del ARNm de *Kiss1* y del *Kiss1r* en el hipotálamo de ratones macho C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica (a) se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* y en la gráfica (b) *Kiss1r*. Cada símbolo en las gráficas representa un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual. El análisis estadístico para el *Kiss1* y *Kiss1r* se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

## ARNm del *Prlr* en MePD

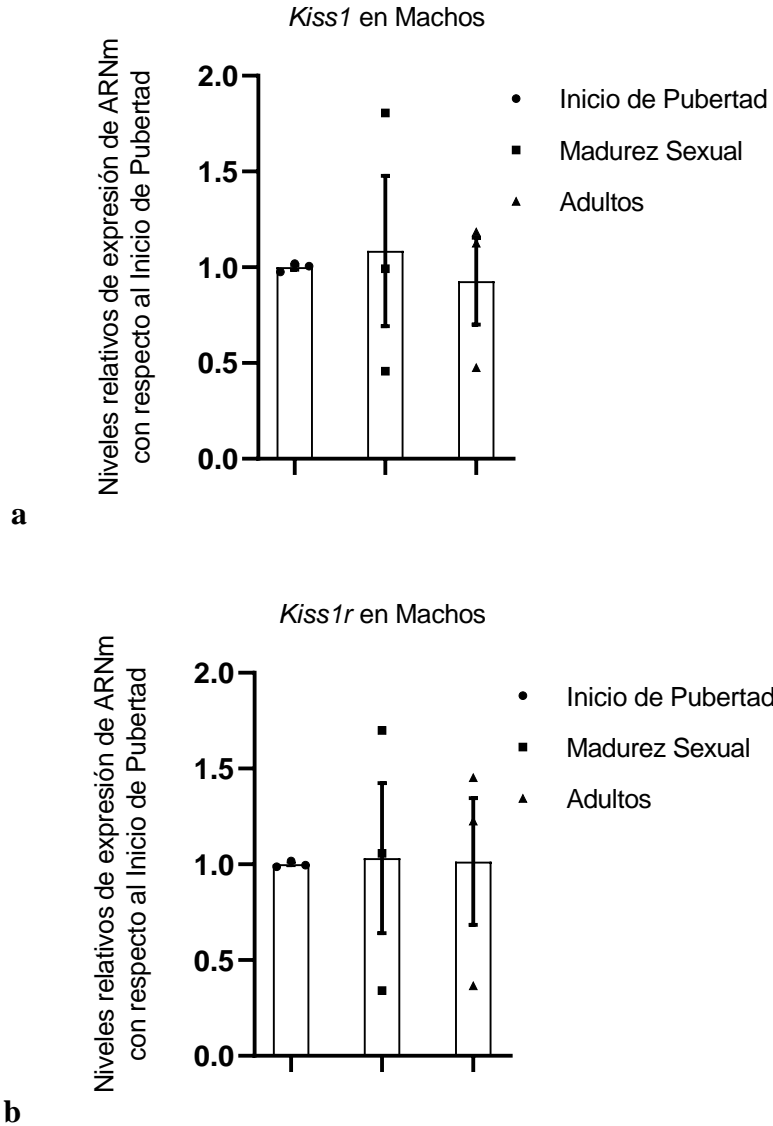
El perfil de expresión del ARNm del *Prlr*, (**Figura 20**), en machos es constante en la Madurez Sexual y en Adultos, por lo cual sugerimos que la expresión del *Prlr* fue similar en las tres etapas de maduración sexual, (K-W:  $H(2)=0.6222$ ,  $p=0.8286$ ). Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 1.



**Figura 20. Expresión del ARNm del *Prlr* en la MePD de ratones macho C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica se presenta el perfil de expresión del ARNm del *Prlr*, en las tres diferentes etapas de maduración sexual. Cada símbolo en la gráfica representa un grupo conformado por seis animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual. El análisis estadístico para el *Prlr* se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

## ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* en la MePD

El perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r*, (**Figura 21 a, b**), se mantuvo constante en las tres etapas de maduración sexual. La prueba de Kruskal Wallis no mostró diferencias significativas ni en *Kiss1* (K-W:  $H(2)=(0.3556)$ ,  $p=0.8786$ ), ni en *Kiss1r* (K-W:  $H(2)=(0.6222)$ ,  $p=0.8286$ ). Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 1.



**Figura 21. Expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* en la MePD de ratones macho C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica (a) y (b) se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r*, respectivamente, en las tres diferentes etapas de maduración sexual. Cada símbolo en ambas gráficas representa un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual. El análisis estadístico para el *Kiss1* y *Kiss1r* se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

## Dimorfismo sexual

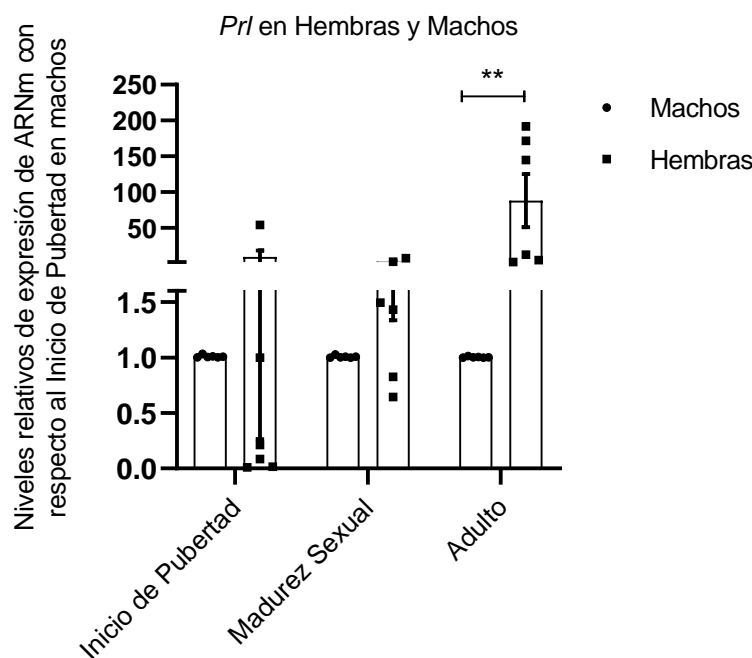
Uno de los principales objetivos de este trabajo fue comparar el patrón de expresión de los genes de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* durante la maduración sexual entre ratones hembra y macho. De acuerdo con la participación de PRL en la fisiología y el comportamiento reproductivo en mamíferos, los esteroides sexuales son reguladores importantes de la expresión de *Prl*, así como del *Prlr* en diferentes tejidos como el ovario, útero e hipotálamo (Freeman et al., 2000; Furigo et al., 2014). Se ha reportado que la expresión de *Prl* en el hipotálamo de ratas macho adulto es mayor que en la hembra en cualquier etapa del ciclo estral, y que la expresión de *Prlr* se expresa en ambos sexos sin diferencia alguna (Cabrera-Reyes et al., 2015).

Existe evidencia de que previo al inicio de la pubertad y hasta en la etapa adulta la expresión de *Kiss1* es regulada por E<sub>2</sub> y T (Smith, 2013) al igual que *Kiss1r* (Semaan et al., 2013). Por otro lado, la expresión del gen *Kiss1* en el AVPV del hipotálamo de roedores se diferencia sexualmente porque las hembras expresan más neuronas kisspeptinérgicas que los machos (Oakley et al., 2009). Este dimorfismo sexual en la distribución anatómica de la kisspeptina es particular para la generación del pico preovulatorio de LH, que es exclusivo de la hembra (Smith et al., 2005). Sin embargo, en el ARC y MePD no se ha reportado que exista dimorfismo sexual en la expresión de *Kiss1*. Además, la expresión de KISS1R en neuronas GnRHérgicas va en aumento desde etapas tempranas del desarrollo hasta el inicio de la pubertad y posteriormente se mantiene la presencia de KISS1R para el mantenimiento de la etapa reproductiva (Herbison et al., 2010), también se ha reportado la expresión en de KISS1R fuera del hipotálamo como en la MePD, BNST, entre otras (Pineda et al., 2017), sin embargo, el perfil de expresión de *Kiss1r* mediante qPCR durante la maduración sexual en ratones hembra y macho no ha sido descrito.

En el presente trabajo se evaluó la expresión de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r*, con el fin de determinar el perfil de expresión de cada uno de ellos durante la maduración sexual de ratones hembra y macho, en particular nos enfocamos en determinar si existe un dimorfismo sexual en las etapas previas a la edad adulta, que es en donde ya se ha identificado un claro dimorfismo sexual de PRL (Cabrera-Reyes et al., 2015) y kisspeptina (Clarkson y Herbison, 2006).

### Expresión del ARNm de *Prl* en el hipotálamo

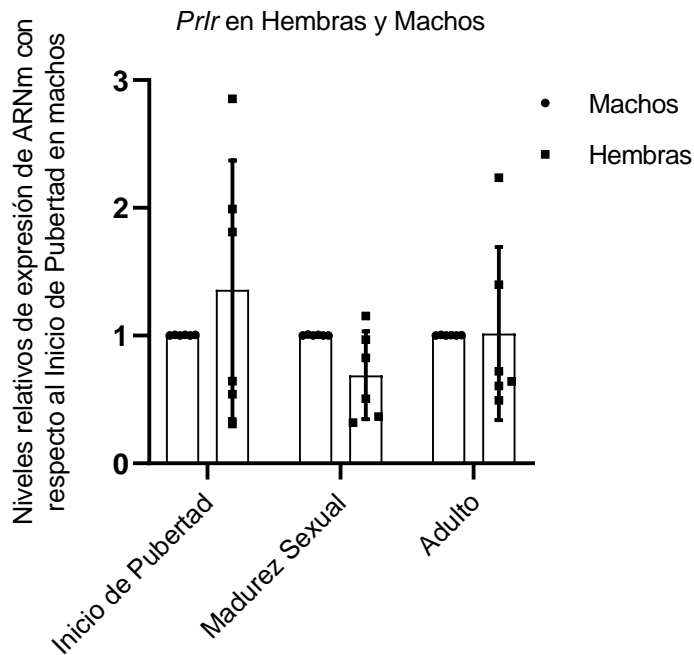
El perfil de expresión del ARNm de *Prl* es similar en hembras y machos, (**Figura 22**), [F (2, 20) = 4.252 p=0.0289, F (1.055, 10.55) = 4.250 p=0.0633, F (1, 10) = 8.008 p=0.0179]. Sin embargo, observamos un aumento característico en hembras en la etapa adulta, lo cual hace referencia al dimorfismo sexual previamente descrito. Para los valores de media  $\pm$  error estándar (SEM), ver anexo 2.



**Figura 22. Expresión sexualmente dimórfica del ARNm de *Prl* en el hipotálamo de ratones C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Prl*, en las tres etapas de maduración sexual. Cada símbolo en la gráfica representa un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual y sexo. El análisis estadístico para el ARNm de *Prl* se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de datos aleatorios de dos vías, seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni, en los ratones de la etapa adulta, \*\*p<0.01. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

### Expresión del ARNm de *Prlr* en el hipotálamo

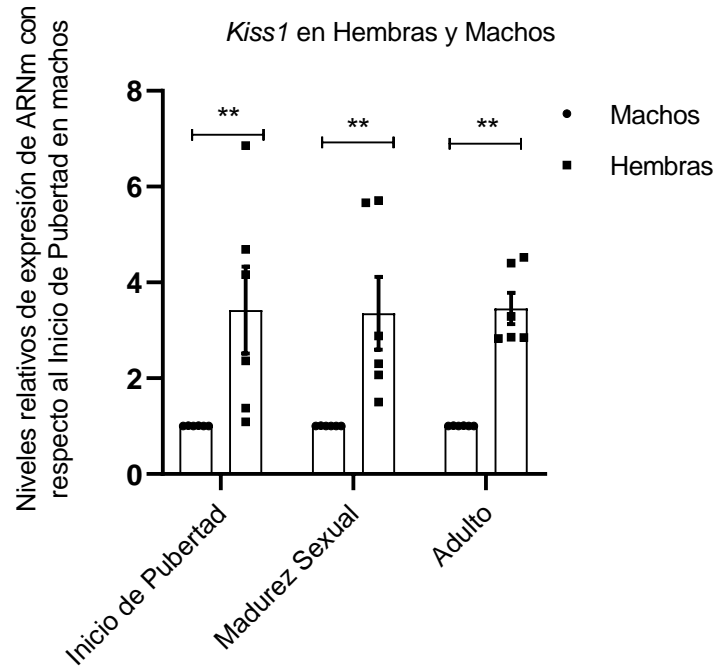
El perfil de expresión del ARNm del *Prlr*, (**Figura 23**), [F (2, 20) = 1.283 p=0.2990, F (2, 20) = 1.29 p=0.2971, F (1, 10) = 0.01117 p=0.9179] se mantiene constante en las tres etapas de maduración sexual en ambos sexos. Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 2.



**Figura 23. Expresión sexualmente dimórfica del ARNm del *Prlr* en el hipotálamo de ratones C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Prlr*, en las tres etapas de maduración sexual. Cada símbolo en la gráfica representa un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual y sexo. El análisis estadístico para el ARNm del *Prlr* se realizó mediante un ANOVA de datos aleatorios de dos vías. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

#### Expresión del ARNm de *Kiss1* en el hipotálamo

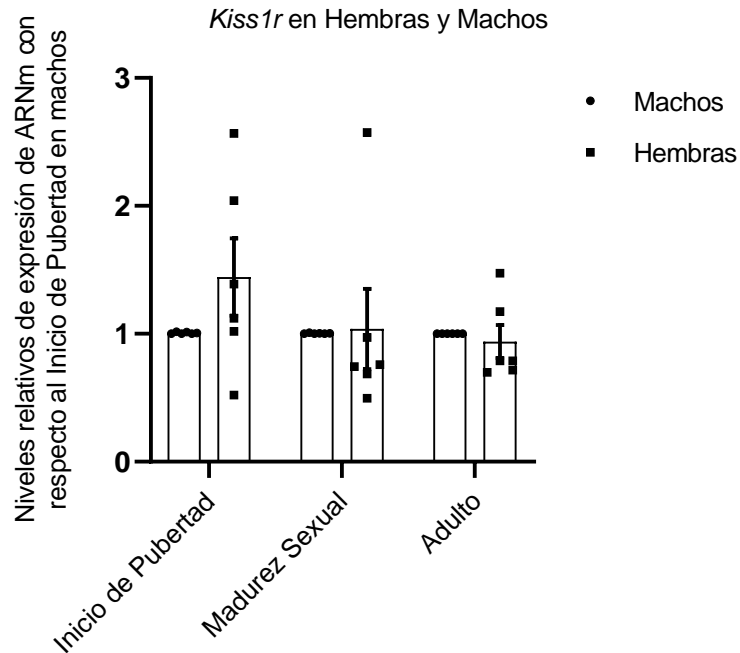
La expresión del gen *Kiss1*, (**Figura 24**), en las tres etapas de maduración sexual es sexualmente dimórfica [ $F(2, 20) = 0.006077$   $p=0.9939$ ,  $F(2, 20) = 0.006579$   $p=0.9934$ ,  $F(1, 10) = 26.08$   $p=0.0005$ ]. El perfil de expresión de *Kiss1* en el hipotálamo de hembras se mantuvo constante en las tres etapas de maduración sexual. Este perfil de expresión de *Kiss1* indica que el dimorfismo sexual está presente desde el inicio de la pubertad y se va consolidado durante las diferentes etapas de la maduración sexual. Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 2.



**Figura 24. Expresión dimórfica del ARNm de *Kiss1* en el hipotálamo de ratones C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* en las tres etapas de maduración sexual. Cada símbolo en la gráfica representa un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual y sexo. El análisis estadístico para el ARNm de *Kiss1* se realizó mediante un ANOVA de datos aleatorios de dos vías, seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni, en las tres etapas, \*\*p<0.01. Los datos se expresan como media ± error estándar (SEM).

En la siguiente grafica podemos observar el perfil de expresión constante del *Kiss1r*, (**Figura 25**), en las tres etapas de maduración sexual [F (2, 20) = 1.523 p=0.2423, F (2, 20) = 1.586 p=0.2295, F (1, 10) = 0.4928 p=0.4987]. Para los valores de la media ± SEM ver anexo 2.

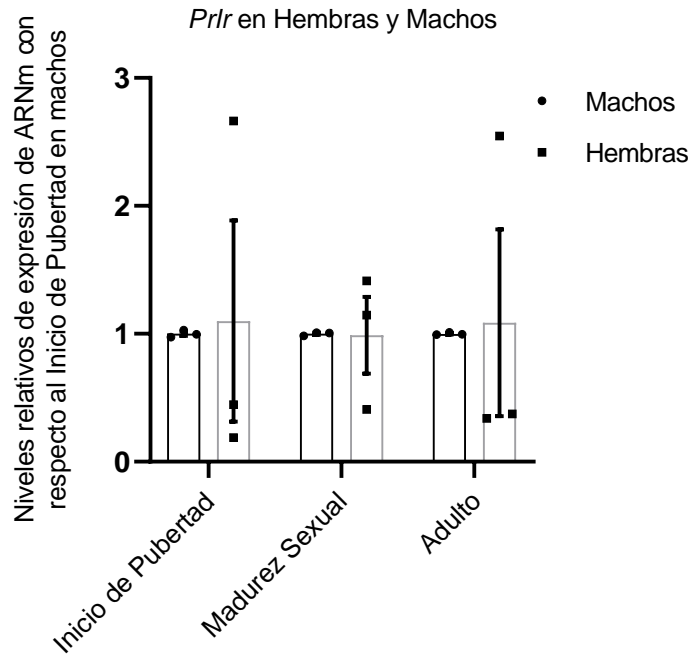




**Figura 25. Expresión dimórfica del ARNm de *Kiss1r* en el hipotálamo de ratones C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica se muestra la expresión del *Kiss1r* en las tres etapas de maduración sexual. Cada símbolo en la gráfica representa un grupo conformado por tres animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual y sexo. El análisis estadístico del ARNm del *Kiss1r* se realizó mediante un ANOVA de datos aleatorios de dos vías. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

#### Expresión del ARNm de *Prlr* en la MePD

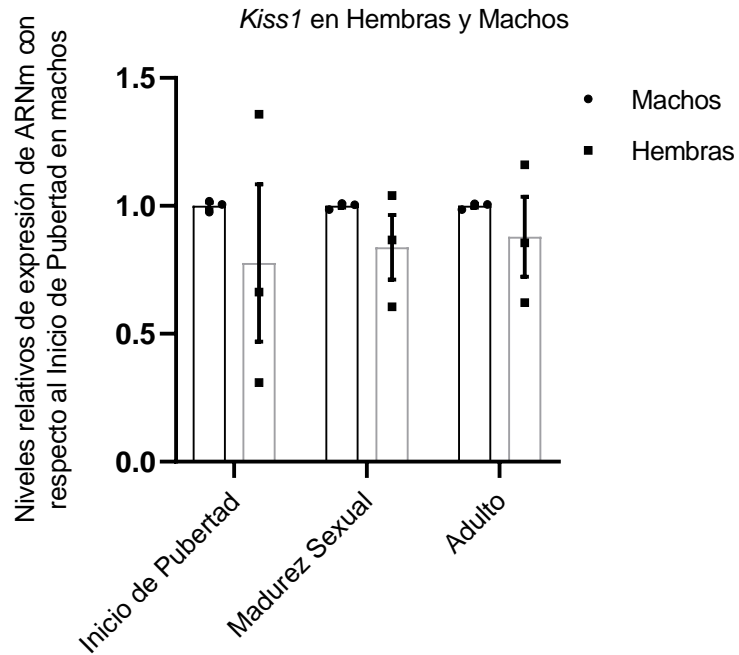
La expresión del ARNm del *Prlr* es constante en las tres etapas de maduración sexual de ratones hembra y macho [F (2, 8) = 0.1174 p=0.8907, F (2, 8) = 0.1282 p=0.8814, F (1, 4) = 0.001681 p=0.9693], (**Figura 26**). Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 2.



**Figura 26. Expresión sexualmente dimórfica del ARNm del *Prlr* en la MePD de ratones C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Prlr* en las tres etapas de maduración sexual. Cada símbolo en la gráfica representa un grupo conformado por seis animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual y sexo. El análisis estadístico para el ARNm del *Prlr* se realizó mediante un ANOVA de datos aleatorios de dos vías. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

#### Expresión del ARNm de *Kiss1* en la MePD

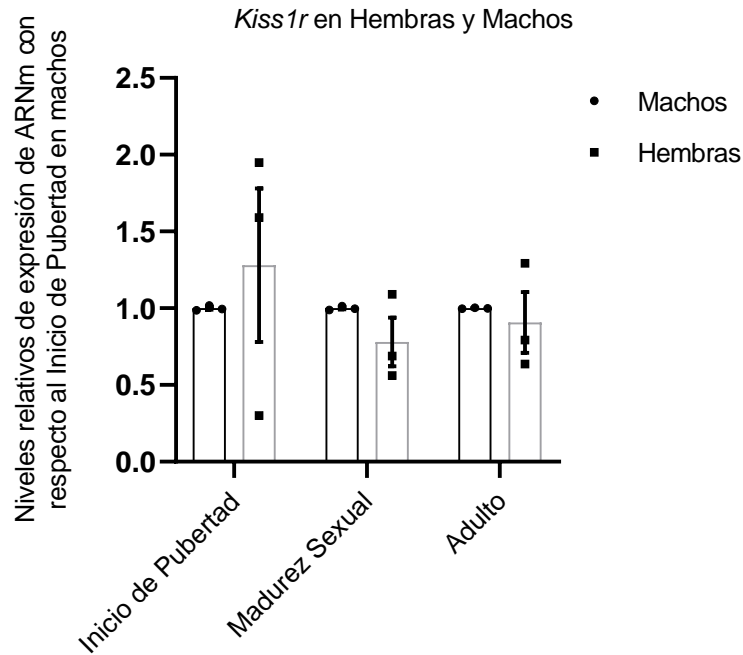
La expresión del ARNm de *Kiss1* [ $F(2, 8) = 0.1472$   $p=0.8654$ ,  $F(2, 8) = 0.1423$   $p=0.8695$ ,  $F(1, 4) = 0.8327$   $p=0.4131$ ] (**Figura 27**), se mantuvo constante en las diferentes etapas de maduración sexual. Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 2.



**Figura 27. Expresión sexualmente dimórfica del ARNm de *Kiss1* en la MePD de ratones C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Kiss1* en las diferentes etapas de maduración sexual. Cada símbolo en la gráfica representa un grupo conformado por seis animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual y sexo. El análisis estadístico para el ARNm de *Kiss1* se realizó mediante un ANOVA de datos aleatorios de dos vías. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

#### Expresión del ARNm de *Kiss1r* en la MePD

El perfil de expresión del ARNm de *Kiss1r* [ $F(2, 8) = 0.6968$   $p=0.5260$ ,  $F(2, 8) = 0.7130$   $p=0.5189$ ,  $F(1, 4) = 1.102$   $p=0.3531$ ], (**Figura 28**), es constante en las tres etapas de maduración sexual. Para los valores de la media  $\pm$  SEM ver anexo 2.



**Figura 28. Expresión sexualmente dimórfica del ARNm de *Kiss1r* en la MePD de ratones C57BL/6 en la maduración sexual.** En la gráfica se presenta el perfil de expresión del ARNm de *Kiss1r* en las diferentes etapas de maduración sexual. Cada símbolo en la gráfica representa un grupo conformado por seis animales, dando una n total de 18 ratones para cada etapa de maduración sexual y sexo. El análisis estadístico para el ARNm de *Kiss1r* se realizó mediante un ANOVA de datos aleatorios de dos vías. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

## Discusión

En este trabajo de tesis se determinó la expresión del ARNm de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* durante la maduración sexual en ratones hembra y macho. Estos genes son de gran importancia para el inicio de la pubertad y el mantenimiento de la reproducción en la etapa adulta en ambos sexos. La evaluación del dimorfismo sexual fue medular en este proyecto pues se ha descrito en la literatura que la expresión de *Kiss1* es mayor en hembras que en machos (Clarkson y Herbison, 2006). Por otro lado, se conocen ampliamente las funciones de la PRL en la lactancia, la gestación y en la función reproductiva, sin embargo, no se ha explorado el curso temporal de expresión de *Prl* durante la maduración sexual en ratones. Por ende, se evaluó la expresión del ARNm en etapas clave para la reproducción, el inicio de la pubertad y la maduración sexual, con la premisa de que la expresión de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* presenta dimorfismo sexual durante este periodo crítico para el establecimiento de la etapa reproductiva.

La PRL es una hormona pleiotrópica que participa en varias funciones fisiológicas incluida la reproducción. En hembras, la PRL favorece el desarrollo de la glándula mamaria y la lactogénesis (Donato y Frazao, 2016). Se ha reportado que la expresión del ARNm de *Prl* en el hipotálamo de ratas hembra varía en las diferentes etapas del ciclo estral, siendo mayor la expresión previo al pico preovulatorio, (proestro tardío y estro) (Cabrera-Reyes et al., 2015). Esta condición es interesante y coincide con lo descrito por Aquino et al., (2017), en donde demostraron que la administración de kisspeptina puede estimular de forma aguda la liberación de PRL, siendo esta respuesta sensible a los esteroides sexuales.

Los resultados de este estudio mostraron que, la expresión del ARNm de *Prlr* se mantuvo constante en hembras y machos durante toda la maduración sexual y que la expresión del ARNm de *Prl* en el hipotálamo es sexualmente dimórfica, siendo mayor en las hembras durante la etapa adulta. El incremento en la expresión del *Prl* podría deberse a que, durante esta etapa, las hembras presentan un ciclo estral, en el cual se llevan a cabo una serie de cambios fisiológicos como consecuencia de las variaciones en las concentraciones hormonales de gonadotropinas, esteroides sexuales y de PRL (Levine, 2015). Además, en las hembras en etapa adulta se observó una expresión sexualmente dimórfica. Esto pudiera ser el resultado del pico preovulatorio que requiere del estímulo de la kisspeptina para la síntesis

y liberación de LH y PRL (Grattan, 2018), lo que podría reflejar que, en la etapa adulta, las hembras requieren de este aumento de *Prl* por las diferentes etapas del ciclo estral y por ello se observa un patrón de expresión mayor que en los machos en la misma etapa. En conjunto, podemos sugerir que la mayor expresión de ARNm de *Prl* en el hipotálamo de hembras es en la etapa adulta, probablemente por el papel tan relevante que tiene la PRL en la fisiología femenina.

El papel de la PRL se ha centrado en la fisiología de las hembras porque las funciones de la hormona favorecen el estado de maternidad, por ello, los estudios neuroendocrinológicos hacen referencia a la lactancia y la conducta materna, mientras que en los machos las funciones de la PRL no se han detallado ampliamente, sin embargo, se ha sugerido que la PRL tiene funciones diferentes en hembras y machos (Brown et al., 2010; Cabrera-Reyes et al., 2015). Por ejemplo, la distribución del PRL-R se ha descrito en la hembra (Bakowska 1997; 2003) y se ha estudiado recientemente en el cerebro de roedores machos (Kokay et al., 2018). Utilizando un modelo animal modificado genéticamente en el que se expresa un gen reportero ( $\tau$ GFP) bajo el control del promotor de PRL-R, se ha demostrado que la expresión de PRL-R es similar en machos y hembras con diferencias cuantitativas en solo dos núcleos, en el AVPV y núcleo preóptico medio. Esto sugiere que la PRL puede tener muchas funciones que son equivalentes en ambos sexos (Salais-Lopes et al., 2018).

Una de las posibles razones de la falta de más estudios neuroendocrinos de la función de PRL en machos se relaciona con el hecho de que los niveles de PRL circulante son relativamente bajos en condiciones estándar (Guillou et al., 2015), lo que la hace poco accesible y limita su estudio. Aun así, varios estudios han descrito incrementos agudos en la secreción sistémica de PRL en machos asociados a ciertas condiciones fisiológicas, como la respuesta al estrés (Kirk et al., 2017) o el comportamiento sexual (Hernandez et al., 2006). Nuestros resultados mostraron un incremento en la expresión de *Prl* en los machos durante la madurez sexual. Esto podría explicarse como una adaptación en la que, en el transcurso de la maduración sexual el incremento de PRL sea necesario para permitir que la conducta sexual se establezca completamente y así iniciar la etapa reproductiva. Este dato es interesante ya que es la primera vez que se reporta en ratones macho un aumento en la expresión de *Prl* en la maduración sexual. Este resultado podría deberse a que la PRL se requiere para la

maduración sexual del macho, y nos permite suponer que, dependiendo de la edad del animal y del sexo, la expresión de *Prl* puede aumentar o disminuir en ratones macho. El papel sexualmente dimórfico de la PRL en la maduración sexual ha sido recientemente descrito en nuestro laboratorio (Corona et al., 2021). Se encontró que la alteración del nivel fisiológico de PRL en etapas tempranas (juveniles) mediante la administración exógena de PRL para aumentarlo o, mediante el uso de un agonista dopaminérgico (cabergolina) para disminuirlo, retrasa el inicio de la pubertad en hembras, pero no en machos (Corona et al., 2021). Dado que en la presente tesis se observó que la expresión del ARNm de *Prl* es 200 veces mayor en hembras adultas en comparación con los machos, se puede proponer que el dimorfismo sexual del ARNm de *Prl* tiende a ser más evidente conforme los animales maduran sexualmente.

Nuestros resultados muestran así mismo que, durante la etapa de madurez sexual, la expresión de *Prl* aumentó significativamente en el macho. Este hecho no se había descrito previamente en ratones, y permite sugerir que la PRL actúa en etapas precisas durante la maduración sexual de machos. De manera interesante, existe evidencia de que la PRL se libera de forma aguda con la eyaculación (Hernandez et al., 2006) y se ha propuesto que puede intervenir en la saciedad después de la cópula, que conduce al período refractario (Krüger et al., 2002). De hecho, niveles altos de PRL por un periodo crónico pueden suprimir la conducta copulatoria en ratas y producir disfunción sexual y otros efectos secundarios en los machos (Rehman et al., 2000). Con base en lo anterior se ha propuesto que la función inhibitoria de la PRL sobre la función sexual tiene un componente central importante (Salais-López et al., 2018); sin embargo, falta mucho por estudiar con respecto a la fisiología de la PRL y a los mecanismos exactos a través de los cuales opera la PRL en el cerebro masculino.

La PRL ejerce varias funciones biológicas a través la unión con el PRL-R, los cuales se encuentran distribuidos en varios tejidos, incluidas varias regiones del cerebro y órganos del tracto reproductivo (Cabrera-Reyes et al., 2017). Con base en lo anterior, la presencia del PRL-R se expresa en el hipotálamo y entre sexos posiblemente de manera diferencial, pero los resultados aquí mostrados nos indican que la expresión del *Prlr* se mantiene constante en hembras y machos independientemente de la etapa de maduración sexual y del sexo de los animales. No obstante, la expresión del ARNm de *Prlr* en el hipotálamo parece ser sensible

a los niveles circulantes de PRL, al menos en la etapa juvenil temprana, ya que recientemente se demostró como la administración exógena y crónica de PRL en esta etapa, tanto en hembras como en machos, aumenta la expresión del *Prlr* específicamente en el ARC (Corona et al., 2021). Sin embargo, el hecho de ver un incremento en la expresión del ARNm de *Prlr*, no garantiza un mayor número de PRL-R. Esto habla de que hay una transcripción genética de ARNm de *Prlr*, pero no sabemos si hay traducción de proteínas al final, esto aplica para los cuatro genes que se evaluaron en este proyecto.

La PRL a través de cambios en la fosforilación de proteínas actúa como un regulador transcripcional y el marcador más fiable de que la PRL se une al PRL-R es la proteína fosforilada STAT5. En ratones hembra y macho se han observado diferencias en la expresión de STAT5 entre sexos (Kokay et al., 2018; Salais-López et al., 2018). Se ha demostrado que ambas poblaciones de neuronas kisspeptinérgicas del hipotálamo (AVPV y ARC) expresan el *Prlr* y responden a la acción de la PRL con un aumento en la expresión de STAT5 fosforilado (Kokay et al., 2011, Brown et al., 2014). La expresión de kisspeptina en ambas poblaciones en el ratón se reduce cuando los niveles de PRL son altos (Brown et al., 2019). También se ha evaluado la expresión, mediante inmunohistoquímica de doble marcaje, de STAT5 fosforilado en neuronas kisspeptinérgicas del ARC en ratas vírgenes y lactantes tras la administración exógena (icv) de PRL (Araujo-Lopes et al., 2014). Sin embargo, una descripción detallada en el cerebro del PRL-R no se ha completado, debido a complicaciones técnicas para marcar a este receptor (Kokay et al., 2018).

El papel de la PRL en la fisiología se ha centrado principalmente en estudios neuroendocrinos que hacen referencia a funciones parentales (Freeman et al., 2000) y la distribución del PRL-R en hembras (Bakowska et al., 1997; Bakowska et al., 2003). Debido a esto, la información que se aporta en este trabajo es relevante, al mostrar los niveles de expresión del *Prlr* en machos y en hembras, en las diferentes etapas de maduración sexual, demostrando así que el perfil de expresión del *Prlr* se mantiene estable desde el inicio de la pubertad hasta la etapa adulta en ambos sexos. Lo cual coincide con la descripción de Brown et al., (2010), en donde menciona que el PRL-R tiene una expresión similar en el cerebro de ratones hembra y macho. Aunado a esto, en el estudio de Kokay et al., (2018), en donde utilizaron un ratón transgénico en el que se expresa un gen reportero ( $\tau$ GFP) bajo el control del promotor del PRL-R,



demonstraron que la expresión de PRL-R es similar en machos y hembras con diferencias cuantitativas en solo dos núcleos, en el AVPV y en el núcleo preóptico medio, siendo ambas regiones hipotalámicas donde se expresan también el ARNm de *Kiss1*. Con base en lo anterior se sugiere que la PRL puede tener diversas funciones equivalentes en ambos sexos.

La presencia de STAT5 fosforilado indica, indirectamente, que la expresión del PRL-R en machos y hembras es similar en el ARC, MePD y BNST, entre otras regiones (Kokay et al., 2018); sin embargo, en el AVPV, la presencia de STAT5 fosforilado es sexualmente dimórfica, siendo mayor en las hembras (Kokay et al., 2018). En conjunto, estos resultados sirven para contrastar nuestros resultados, en los cuales se observó que la expresión del ARNm del *Prlr* es igual en ambos sexos. Es posible que el receptor de PRL sea necesario en diferentes partes del cerebro y la PRL desencadena vías de señalización independiente del sexo. Alternativamente, machos y hembras pueden mostrar una expresión y activación diferencial de elementos reguladores del PRL-R (por ejemplo, Jak, STAT5, SOCS, CIS, etc.) (Pezet et al., 1999; Yasukawa et al., 1999; Freeman et al., 2000). De cualquier forma, se han encontrado diferencias en la regulación funcional de las acciones centrales de PRL en machos y hembras (Kokay et al., 2018 y Salais-López et al., 2018). Además, los datos aquí reportados enfatizan la importancia de analizar también la concentración de proteínas traducidas y hormonas para complementar el análisis de la expresión del *Prlr* en algunas regiones cerebrales para poder comprender el papel de la PRL en la fisiología y el comportamiento de la reproducción.

La señalización kisspeptina-KISS1R es indispensable para el inicio de la pubertad y el establecimiento de la etapa reproductiva en ratones y humanos (Pinilla et al., 2012). Por ello, la expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* son fundamentales en este trabajo. La expresión del gen *Kiss1* en la etapa adulta es sexualmente dimórfica y es mayor en hembras que en machos (Clarkson y Herbison, 2006; Kauffman et al., 2007; Hrabovszky et al., 2010). Los resultados que se obtuvieron en el presente estudio confirman que la expresión del ARNm de *Kiss1* en las hembras es mayor que en los machos, así mismo la expresión de *Kiss1* en hembras se mantuvo constante durante todo el proceso de maduración sexual. Este dimorfismo sexual en la expresión de *Kiss1* se observa en las tres etapas de maduración sexual. En cambio, la expresión del ARNm de *Kiss1r* mantuvo una expresión constante

durante las etapas de maduración sexual en ambos sexos, sugiriendo que el perfil de expresión de *Kiss1* y *Kiss1r*, es independiente uno del otro.

Una característica particular de las neuronas kisspeptinérgicas es su distribución en dos núcleos hipotalámicos. En roedores, estas neuronas se encuentran principalmente en el AVPV y el ARC del hipotálamo (Clarkson et al., 2010). Estas dos poblaciones tienen un papel diferencial y determinante en la regulación de la secreción de GnRH y el eje reproductivo. Este papel está definido por la acción de los esteroides sexuales (Kauffman et al., 2007), debido a que estas neuronas kisspeptinérgicas son blancos directos del E<sub>2</sub> y la T, y expresan altos niveles de los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  y AR.

Existen dos tipos de retroalimentación mediada por esteroides sexuales, las neuronas kisspeptinérgicas del ARC proporciona una estimulación pulsátil a las neuronas GnRH en ambos sexos desde etapas embrionarias (Desroziere et al., 2012). Por el contrario, en las neuronas kisspeptinérgicas dentro de la región AVPV los esteroides sexuales desempeñan un papel en el aumento transitorio de los niveles de expresión *Kiss1* en el AVPV en la edad adulta (Smith et al., 2005) que promueve el aumento preovulatorio de GnRH, necesario para la ovulación en hembras (Harter et al., 2018). En el AVPV, los machos poseen un menor número de neuronas kisspeptinérgicas, en comparación con las hembras; de hecho, este dimorfismo sexual de *Kiss1* en el AVPV está organizado permanentemente por la señalización de esteroides sexuales en las primeras etapas del desarrollo postnatal (Kauffman et al., 2007). Durante un período crítico postnatal, que suele ser la primera semana de vida en roedores, los machos secretan altos niveles de T, mientras que las hembras secretan pocos esteroides sexuales (Semaan et al., 2013).

Ambos eventos de retroalimentación tienen lugar en el hipotálamo, AVPV y ARC, y en este trabajo se evaluó la expresión del ARNm de *Kiss1* en el hipotálamo completo, lo cual puede explicar la dispersión de los datos que se observa en el gen de *Kiss1* durante la maduración sexual en hembras y machos, ya que la concentración de *Kiss1* varía según la concentración de esteroides sexuales en ratones adulto (Kumar et al., 2015). Esta dispersión que se observó en los datos posiblemente se correlaciona con la retroalimentación positiva y negativa que lleva a cabo el AVPV y ARC, respectivamente, al expresar de manera diferencial el gen *Kiss1* dependiendo de la entrada de esteroides sexuales.

La PRL también puede modificar la expresión de *Kiss1*, y es que cuando se administra de manera exógena a ratones hembra y macho durante la etapa juvenil temprana, la expresión del ARNm de *Kiss1* se mantiene constante en el ARC, pero disminuye en el AVPV (Corona et al., 2021), lo que refleja que el AVPV es un núcleo más sensible a la PRL. En el presente trabajo se evaluó la expresión del ARNm de *Kiss1* en el hipotálamo completo de ambos sexos, sin embargo, dadas las diferencias observadas por Corona et al., (2021), para realizar una evaluación más precisa de la expresión de *Kiss1* es necesario evaluar por separado estas regiones hipotalámicas que expresan el *Kiss1* de manera diferencial dependiendo de la concentración de PRL. Es probable entonces, que, dado que en este trabajo no se consideraron por separado el AVPV y ARC para la cuantificación de la expresión de *Kiss1* en el hipotálamo, se puede inferir que la distribución heterogénea que se observa en nuestros resultados puede deberse a este factor.

Se ha descrito la expresión del ARNm de *Kiss1* en cada región hipotalámica (AVPV y ARC) de ratones macho adultos intactos, castrados y castrados tratados con T (Smith et al., 2005). En este trabajo encontraron que, en el ARC de machos castrados, el ARNm de *Kiss1* aumenta significativamente, efecto completamente opuesto a lo observado en machos castrados tratados con T. En el AVPV, el ARNm de *Kiss1* disminuye en los machos castrados y el tratamiento con T aumenta su expresión (Smith et al., 2005). En hembras se demostró como el E<sub>2</sub> regula la expresión del ARNm de *Kiss1* entre grupos de hembras en Diestro, OVX y OVX más E<sub>2</sub> (Smith et al., 2005), demostrando que la expresión de ARNm de *Kiss1* depende de la concentración de E<sub>2</sub>, aumenta en presencia de E<sub>2</sub> y en concentraciones basales de E<sub>2</sub> la expresión del ARNm de *Kiss1* disminuye drásticamente. Estudios en ratones knock-out para ER $\alpha$ , se inhibe el fenómeno de la retroalimentación positiva y negativa a esteroides sexuales en roedores (Couse et al., 2003, Wintermantel et al., 2006), por lo cual se ha descrito que los niveles basales de E<sub>2</sub> inducen un aumento en la expresión de *Kiss1* en el ARC y una disminución en la expresión de *Kiss1* en el AVPV de la hembra (Smith et al., 2005 a; Adachi et al., 2007).

El gen *GPR54* que codifica al receptor del neuropéptido kisspeptina, KISS1R, es esencial en el proceso de maduración sexual. Estudios en donde se suprime la expresión del gen *Kiss1r*, afecta la maduración sexual, provocando retrasos en el desarrollo puberal, niveles bajos de

esteroides sexuales, gametogénesis deteriorada, y pérdida o ausencia de ciclos menstruales o estrales en humanos y ratones, respectivamente (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). En este trabajo, la expresión del ARNm de *Kiss1r* se mantuvo constante en ambos sexos, sin observarse diferencias significativas en ninguna etapa en la maduración sexual, lo cual puede indicar que la expresión de *Kiss1r* es esencial para el inicio de la pubertad y durante toda la maduración sexual tanto en hembras como en machos. Se ha reportado que la administración exógena de kisspeptina en etapas prepúberes acelera la maduración sexual promoviendo una pubertad precoz en ratas y monos (Navarro et al., 2004; Shahab et al., 2005). Por el contrario, la supresión del gen *Kiss1r* retrasa el inicio de la pubertad en ratones hembra y macho (Funes et al., 2003). Con base en lo anterior, la expresión de *Kiss1r* y su ligando pueden afectar el desarrollo previo, durante y después de la pubertad (Han et al., 2005); sin embargo, las poblaciones de neuronas kisspeptinérgicas del ARC y AVPV van madurando desde etapas postnatales y durante la maduración sexual en donde tienen mecanismos específicos en diferentes especies (Ojeda y Skinner, 2006; Plant et al., 2015), pero aparentemente el *Kiss1r* no tiende a cambiar su expresión en el hipotálamo en el transcurso de la maduración sexual. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir que la expresión del ARNm de *Kiss1r* es constante para ambos sexos y en cada etapa de maduración sexual.

La distribución, regulación e importancia funcional de la kisspeptina fuera del hipotálamo no se ha estudiado ampliamente (Kim et al., 2011). En el presente trabajo, se evaluó la expresión de *Kiss1* en la MePD en diferentes etapas de maduración sexual, la MePD está implicada en comportamientos sociales y emocionales, así como en varios aspectos de la reproducción (Pineda et al., 2017). Se ha descrito la expresión de *Kiss1* en la amígdala media (MeA) es mayor en machos adulto que en hembras en diestro (Kim et al., 2011). En cambio, el perfil de expresión de *Kiss1* en el MeA disminuye en ratas y ratones hembra y macho gonadectomizados, pero la administración exógena de esteroides sexuales reestablece el perfil de expresión de *Kiss1* en la MeA (Kim et al., 2011). Por tanto, en los roedores, *Kiss1* se expresa y regula mediante esteroides sexuales en la MeA de ambos sexos y puede desempeñar un papel en la modulación de la reproducción o de las funciones cerebrales que se extienden más allá de la reproducción. Sin embargo, en nuestros resultados el nivel de expresión del gen *Kiss1* o *Kiss1r* en la MePD se mantuvieron constantes en todas las etapas de maduración sexual.

Previamente, en roedores y humanos, ya se había descrito que los genes *Kiss1* y *Kiss1r* se expresan en la MeA (Lee et al., 1999; Muir et al., 2001; Clarkson et al., 2009; Kim et al., 2011), sin embargo, ya se han descrito algunas funciones de las neuronas kisspeptinérgicas en esta región. Por ejemplo, se ha propuesto que la MeA está involucrada en la regulación de procesos fisiológicos y conductuales, incluidos los relacionados con la recompensa, comportamientos sociales (Meyer-Lindenberg et al., 2011) y la reproducción (Pineda et al., 2017).

La MePD, al igual que el hipotálamo, expresa receptores de andrógenos y estrógenos (Cooke et al., 2006) y está conectada con áreas del cerebro implicadas en los comportamientos reproductivos a través del BNST, y en conjunto con las poblaciones de neuronas kisspeptinérgicas del hipotálamo, mantienen una estrecha comunicación con POA formando una red compleja para la regulación de las neuronas GnRHérgicas (Yeo y Herbison, 2011).

La expresión del gen *Kiss1* no es exclusivo del AVPV, ARC y la MePD, regiones como el BNST y el septum lateral lo expresan también, expresan el gen *Kiss1*; sin embargo, aun cuando se desconoce su función en estas últimas regiones, se ha descrito que estas poblaciones de neuronas kisspeptinérgicas están reguladas también por esteroides sexuales (Stephens et al., 2016). Estos resultados muestran que el perfil de expresión de *Kiss1* en la maduración sexual de ambos sexos y en ambas estructuras (hipotálamo y MePD) se mantienen constantes. Sin embargo, la expresión sexualmente dimórfica de *Kiss1* en el hipotálamo fue consistente con lo reportado en literatura, siendo mayor la expresión en hembras (Smith et al., 2005; Clarkson y Herbison, 2006; Clarkson et al., 2010). En cualquier caso, los niveles de expresión del ARNm de *Kiss1* y *Kiss1r* en la MePD son independientes de la expresión de estos mismos mensajeros en el hipotálamo, pero están regulados de manera similar por esteroides sexuales al estar involucrados en el mantenimiento y la función del eje reproductivo de hembras y machos.

## Conclusiones

En el presente trabajo, se realizó una evaluación de la expresión basal de cuatro genes indispensables para la reproducción en hembras y en machos. Los patrones de expresión de

los diferentes genes analizados en este trabajo durante la maduración sexual permiten inferir las etapas en las que la PRL, y su posible interacción con kisspeptina, pudiera ser importante.

Los niveles de expresión de *Prl* en el hipotálamo aumentaron significativamente en las hembras conforme maduran sexualmente. En los machos, de manera interesante y sorpresiva, se observó un incremento durante la etapa de madurez sexual, disminuyendo posteriormente. Estos niveles pueden sugerir la importancia que tiene esta hormona durante etapas precisas de la maduración sexual.

Las diferencias reportadas en la literatura con respecto al dimorfismo sexual del gen *KissI* en el adulto coincide con los datos obtenidos en este trabajo y se suman otras dos etapas inicio de la pubertad y madurez sexual al dimorfismo sexual.

De acuerdo con estos resultados, durante la maduración sexual la expresión de *KissI* mostro un claro dimorfismo sexual, siendo mayor en hembras. La cantidad relativa de ARNm de *Prlr* y *KissIr* en el hipotálamo se mantuvieron constantes en las diferentes etapas de maduración sexual independientemente del sexo.

Evaluaciones adicionales son necesarias para determinar si los niveles de proteína total sintetizada coinciden con los patrones de expresión del ARNm para cada uno de estos genes y etapas de maduración sexual.

Anexo 1

Tabla 3. Valor relativo de la expresión del ARNm de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* en el hipotálamo y en la MePD de ratones hembra y macho, representado como media  $\pm$  error estándar (SEM)

Regiones	Inicio de Pubertad	Madurez Sexual	Adulto
<b>Hipotálamo</b>			
	<i>Prl</i>		
<b>Hembras</b>	1.10 $\pm$ 0.23	246.28 $\pm$ 168.04	6724.14 $\pm$ 11779.56
<b>Machos</b>	1.00 $\pm$ 0.01	51.41 $\pm$ 82.85	2.90 $\pm$ 4.83
	<i>Prlr</i>		
<b>Hembras</b>	1.00 $\pm$ 0.001	0.95 $\pm$ 0.88	1.34 $\pm$ 0.90
<b>Machos</b>	1.00 $\pm$ 0.002	1.62 $\pm$ 1.31	1.73 $\pm$ 1.32
	<i>Kiss1</i>		
<b>Hembras</b>	1.00 $\pm$ 0.003	1.28 $\pm$ 0.77	1.58 $\pm$ 0.82
<b>Machos</b>	1.00 $\pm$ 0.003	1.23 $\pm$ 0.76	1.28 $\pm$ 0.52
	<i>Kiss1r</i>		
<b>Hembras</b>	1.00 $\pm$ 0.00	0.91 $\pm$ 0.34	0.95 $\pm$ 0.39
<b>Machos</b>	1.00 $\pm$ 0.007	1.20 $\pm$ 0.50	1.21 $\pm$ 0.31
<b>MePD</b>			
	<i>Prlr</i>		
<b>Hembras</b>	1.00 $\pm$ 0.005	1.58 $\pm$ 0.67	2.00 $\pm$ 2.39
<b>Machos</b>	1.00 $\pm$ 0.001	1.98 $\pm$ 2.40	1.39 $\pm$ 1.44
	<i>Kiss1</i>		
<b>Hembras</b>	1.007 $\pm$ 0.01	1.23 $\pm$ 0.45	1.14 $\pm$ 0.26
<b>Machos</b>	1.002 $\pm$ 0.002	1.09 $\pm$ 0.67	0.94 $\pm$ 0.40
	<i>Kiss1r</i>		
<b>Hembras</b>	1.00 $\pm$ 0.00	0.65 $\pm$ 0.06	0.78 $\pm$ 0.20
<b>Machos</b>	1.00 $\pm$ 0.005	1.03 $\pm$ 0.68	1.01 $\pm$ 0.57

## Anexo 2

**Tabla 4. Valor relativo de la expresión del ARNm de *Prl*, *Prlr*, *Kiss1* y *Kiss1r* en el hipotálamo y en la MePD en el dimorfismo sexual, representado como media  $\pm$  error estándar (SEM)**

<b>Hipotálamo</b>	<b>Media <math>\pm</math> error estándar (SEM)</b>	
	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
<i>Prl</i>	1.007 $\pm$ 33.16	0.001913 $\pm$ 27.44
<i>Prlr</i>	1.003 $\pm$ 0.00	1.022 $\pm$ 0.193
<i>Kiss1</i>	1.004 $\pm$ 0.00	3.412 $\pm$ 0.02
<i>Kiss1r</i>	1.003 $\pm$ 0.00	1.140 $\pm$ 0.154
<b>MePD</b>	<b>Media <math>\pm</math> error estándar (SEM)</b>	
	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
<i>Prlr</i>	1.005 $\pm$ 0.001	0.98 $\pm$ 0.06
<i>Kiss1</i>	1.002 $\pm$ 0.00	0.83 $\pm$ 0.02
<i>Kiss1r</i>	1.002 $\pm$ 0.001	0.80 $\pm$ 0.13



## Referencias

- Abreu, A. P., y Kaiser, U. B.** (2016). Pubertal development and regulation. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 4(3), 254–264.
- Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K.** (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *Journal Reproduction Dev.* 53(2):367–378
- Anderson, GM., Kieser, DC., Steyn, FJ., Grattan, DR.** (2008). Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. *Endocrinology.* 149:1562–1570.
- Aquino, N. S. S., Araujo-Lopes, R., Henriques, P. C., Lopes, F. E. F., Gusmao, D. O., Coimbra, C. C., Szawka, R. E.** (2017).  $\alpha$ -Estrogen and Progesterone Receptors Modulate Kisspeptin Effects on Prolactin: Role in Estradiol-Induced Prolactin Surge in Female Rats. *Endocrinology*, 158(6), 1812–1826.
- Araujo-Lopes, R., Crampton, J.R., Aquino, N.S., Miranda, R.M., Kokay, I.C., Reis, A.M., Franci, C.R., Grattan DR, Szawka RE.,** (2014). Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. *Endocrinology*; 155: 1010–1020.
- Arnold, A.P.** (2017). A general theory of sexual differentiation. *Journal of Neuroscience Research.* 95 291–300.
- Bakker, J., Pierman, S., and GonzálezMartínez, D.** (2010). Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Horm. Behav.* 57, 390–395.
- Bakowska JC, Morrell JI.** (1997). Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *J Comp Neurol.*; 386:161-177.
- Bakowska JC., Joan I. Morrell** (2003). The distribution of mRNA for the short form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. , 116(1-2), 0–58.
- Ben-Jonathan, N., Hugo, E. R., Brandebourg, T. D. & LaPensee, C. R.** (2006). Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 110–116.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R. & LaPensee, E. W.** (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrinology. Rev.* 29, 1–41.
- Bernard, V., Young, J., Binart, N.** (2019). Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(6):356-365.
- Bernard, V., Young, J., Chanson, P. & Binart, N.** (2015). New insights in prolactin: pathological implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 265–275.
- Binart, N., Bachelot, A., Bouilly, J.** (2010). Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinology Metabolism*; 21:362–368.
- Blanco-Favela, F., Legorreta-Haquet, Ma.V., Huerta-Villalobos, Y.R., Chávez-Rueda, Karina, Montoya-Díaz, Eduardo, Chávez-Sánchez, Luis, & Zenteno-Galindo, Edgar.** (2012). Participación de la prolactina en la respuesta inmune. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 69(5), 329-336.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly PA.** (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. 19(3):225-268.
- Brock, O., & Bakker, J.** (2013). The Two Kisspeptin Neuronal Populations Are Differentially Organized and Activated by Estradiol in Mice. *Endocrinology*, 154(8), 2739–2749.
- Brooks, C. L.** (2012). Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *Endocrine Reviews*, 33(4), 504–525.

**Brown, R.S., Herbison, A.E., Grattan, D.R. (2014).** Prolactin regulation of kisspeptin neurones in the mouse brain and its role in the lactation-induced suppression of kisspeptin expression. *Journal of Neuroendocrinology*; 26 898–908.

**Brown, R.S., Kokay, I.C., Herbison, A.E., Grattan, D.R. (2010).** Distribution of Prolactin-Responsive Neurons in the Mouse Forebrain. *The Journal of Comparative Neurology. Research in Systems Neuroscience*.

**Brown, Rosemary SE., Khant AZ., Phillipps HR., Barad Z., Lein Hsin-Jui., Boehm U., Szawka RE., Grattan DR. (2019).** Acute Suppression of LH Secretion by Prolactin in Female Mice Is Mediated by Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus. *Endocrinology*, 160(5), 1323–1332.

**Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE. (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.

**Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012).** Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE*, 7(4), e35538.

**Cabrera-Reyes, E.A., Morales, O.L., Rivero-Segura, N.A., Arroyo, I.C., Cerbón, M. (2017).** Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine* 57 (2):199–213.

**Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L.W. (1995).** Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *Journal Comp Neurology*; 360:213–245.

**Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN. (2010).** The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology*;151(1): 301–311.

**Clarkson, J. y Herbison, A.E. (2006).** Postnatal Development of Kisspeptin Neurons in Mouse Hypothalamus; Sexual Dimorphism and Projections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology*, 147(12):5817–5825.

**Clarkson, J., Boon, W. C., Simpson, E. R., & Herbison, A. E. (2009).** Postnatal Development of an Estradiol-Kisspeptin Positive Feedback Mechanism Implicated in Puberty Onset. *Endocrinology*, 150(7), 3214–3220.

**Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Moreno, A.S., Colledge, W.H., Herbison, A.E. (2008).** Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *Journal Neuroscience*; 28: 8691–8697.

**Clarkson, J., Han, S. Y., Piet, R., McLennan, T., Kane, G. M., Ng, J., Herbison, A. E. (2017).** Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(47), E10216–E10223.

**Clarkson, J., Han, S.-K., Liu, X., Lee, K., & Herbison, A. E. (2010).** Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324(1-2), 45–50.

**Clavijo, R.I., Hsiao, W. (2018).** Update on male reproductive endocrinology. *Translational Andrology and Urology*;7(3): S367-S372.

**Comminos, A. N., Anastasovska, J., Sahuri-Arisoylu, M., Li, X., Li, S., Hu, M., Dhillon, W. S. (2015).** Kisspeptin signaling in the amygdala modulates reproductive hormone secretion. *Brain Structure and Function*, 221(4), 2035–2047.

**Cone, R., Cowley, M., Butler, A., Fan, W., Marks, D., & Low, M. (2001).** The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, 25(S5), S63–S67.

**Cora, M.C., Kooistra, L., Travlos, G. (2015).** Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol.* 43(6):776-793.

**Corona, R. (2011).** Nuevas neuronas para el olfato y la reproducción. *Revista Digital Universitaria. UNAM.* 12(3):1-10.

**Corona, R., Jayakumar P., Carbajo Mata M.A., Del Valle-Díaz M.F., Luna-García L.A., Morales T. (2021).** Sexually dimorphic effects of prolactin treatment on the onset of puberty and olfactory function in mice. *General and Comparative Endocrinology*, 301, 113652.

**D' Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L. A., Dixon, J. P. C., Day, K., Leitch, H. G., Hendrick, A. G., Colledge, W. H. (2007).** Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (25), 10714–10719.

**de Roux 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.

**Demaria, JE, Nagy GM, Lerant AA, Fekete MIE, Levenson CW, Freeman ME. (2000).** Dopamine transporters participate in the physiological regulation of prolactin. *Endocrinology*; 141:366–74.

**Desroziers, E., Droguerre, M., Bentsen, A.H., Robert, V., Mikkelsen, J.D., Caraty, A., Tillet, Y., Duittoz, A., Franceschini, I., (2012).** Embryonic development of kisspeptin neurones in rat. *J. Neuroendocrinol.* 24, 1284–1295.

**Desroziers; J E., Mikkelsen., V. Simonneaux, M., Keller, Y. Tillet, A., Caraty, I., Franceschini (2010).** Mapping of Kisspeptin Fibres in the Brain of the Pro-Oestrous Rat. , 22(10), 1101–1112.

**Devi, S.Y. y Halperin, J. (2014).** Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 400–410.

**Donato, Jr.J. y Frazão, R. (2016).** Interactions between prolactin and kisspeptin to control reproduction. *Arch Endocrinol Metab.:* 60(6):587-595.

**Dulac, Catherine & Torello, A. Thomas (2003).** Sensory systems: Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. 4(7), 551–562.

**Dumalska, I., Wu, M., Morozova, E., Liu, R., van den Pol, A., & Alreja, M. (2008).** Excitatory Effects of the Puberty-Initiating Peptide Kisspeptin and Group I Metabotropic Glutamate Receptor Agonists Differentiate Two Distinct Subpopulations of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(32), 8003–8013.

**Dungan, H. M., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2006).** Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *Endocrinology*, 147(3), 1154–1158.

**Dungan, H.M., Gottsch ML, Zeng H, Gragerov A, Bergmann JE, Vassilatis DK, Clifton DK, Steiner RA., (2007).** The role of kisspeptinGPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *J Neurosci* 27: 12088 –12095.

**Egan, O.K., Inglis, M.A., Anderson, G.M. (2017).** Leptin Signaling in AgRP Neurons Modulates Puberty Onset and Adult Fertility in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 37(14), 3875–3886.

**Esteves FF, Matias D, Mendes AR, Lacoste B, Lima SQ. (2019).** Sexually dimorphic neuronal inputs to the neuroendocrine dopaminergic system governing prolactin release. *Journal Neuroendocrinology*.31: e12781.

**Exton MS, Krüger TH, Koch M, et al. (2001).** Coitus-induced orgasm stimulates prolactin secretion in healthy subjects. *Psychoneuroendocrinology.* 26:287-294.

**Fleming, T., Balderas-Marquez, J.E., Epardo, D., Avila-Mendoza, J., Carranza, M., Luna, M., Harvey, S., Aramburo, C., Martinez-Moreno, C.G., (2019).** Growth hormone neuroprotection against kainate excitotoxicity in the retina is mediated by Notch/ PTEN/Akt signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60, 4532–4547.

**Foster, D., y Hileman, S.M. (2015).** Chapter 31: Puberty in the Sheep. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. San Diego, CA: Academic Press; (4):2127–2176.

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

**Franklin, K.B. y Paxinos, G. (2008).** The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3rd edition. Elsevier Academic Press, NY. USA.

**Freeman, M.E., Kanyicska, B.L., Lerant, A. (2000).** Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*. Vol. 80, No. 4.

**Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, Yang S, Monsma FJ, Gustafson EL. (2003).** The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1357–1363.

**Furigo, I.C., Kim, K.W., Nagaishi, V.S., Ramos-Lobo, A.M., de Alencar, A., Pedroso, J.A., Metzger, M., Donato Jr., J., (2014).** Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor-alpha and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. *Brain Res*. 1566, 47–59.

**Gadd SL, Clevenger CV. (2006).** Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. *Molecular Endocrinology*, 20:2734–46.

**George, J.T., Veldhuis, J.D., Tena-Sempere, M., Millar, R.P., Anderson, R.A. (2013).** Exploring the pathophysiology of hypogonadism in men with type 2 diabetes: kisspeptin-10 stimulates serum testosterone and LH secretion in men with type 2 diabetes and mild biochemical hypogonadism. *Clinical Endocrinology (Oxf)*; 1:100–104.

**Gill JC, Wang OL, Kakar S, Martinelli E, Carroll RS, Kaiser UB. (2010).** Reproductive Hormone-Dependent and -Independent Contributions to Developmental Changes in Kisspeptin in GnRH-Deficient Hypogonadal Mice. *Plos One* ;5(7).

**Goffin V, Binart N, Touraine P & Kelly PA (2002).** Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annual Review of Physiology*. 64 47–67.

**González-Martínez, D., De Mees, C., Douhard, Q., Szpirer, C., and Bakker, J. (2008).** Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 149, 2333–2340.

**Goodman RL, Coolen LM, Anderson GM, Hardy SL, Valent M, Connors JM, Fitzgerald ME, Lehman MN. (2004).** Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology*;145(6):2959–2967.

**Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ (2007).** Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148:5752–5760.

**Goodman RL. (2015).** Chapter 33: Neuroendocrine Control of Gonadotropin Secretion: Comparative Aspects. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. (4):1537–1574.

**Gorvin, C. M. (2015).** The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 2(3), 85–91.

**Gottfried, Jay A. (2010).** Central mechanisms of odour object perception. *Nat Rev Neurosci*, 11(9), 628–641.

**Gottsche ML, Navarro VM, Zhao Z, Glidewell-Kenney C, Weiss J. (2009).** Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J Neuroscience*, 29(29):9390–9395.

**Grattan RD. (2018).** Coordination or Coincidence? The Relationship between Prolactin and Gonadotropin Secretion. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, Vol. 29, No. 1.

**Grattan, D. R., & Kokay, I. C. (2008).** Prolactin: A Pleiotropic Neuroendocrine Hormone. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 752–763.

**Grattan, D.R. (2015).** The hypothalamo-prolactin axis. *Journal Endocrinology*; 226(2): T101-T122.

**Grattan**, D.R. y **Tissier L.P.** (2015). Chapter12: Hypothalamic Control of Prolactin Secretion, and the Multiple Reproductive Functions of Prolactin. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Fourth Edition* Department of Physiology and Pharmacology. Eds TM Plant y AJ Zeleznik. San Diego CA USA: Elsevier Inc.

**Guerrero**, K. A., **Keen**, K. L., y **Terasawa**, E. (2012b). Developmental increase in kisspeptin-54 release in vivo is independent of the pubertal increase in oestradiol in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 153, 1887–1897.

**Guillou** A, **Romanò** N, **Steyn** F, **Abitbol** K, **Le Tissier** P, **Bonnefont** X. (2015). Assessment of lactotroph axis functionality in mice: longitudinal monitoring of PRL secretion by ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology*. 2014-1571.

**Han**, S.K., **Gottsch**, M.L., **Lee** KJ., (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.*;25:11349–11356.

**Harter**, C. J. L., **Kavanagh**, G. S., & **Smith**, J. T. (2018). The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *Journal of Endocrinology*, 238(3), R173–R183.

**Herbison**, A. E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(8), 452–466.

**Herbison**, A.E. (2015). *Physiology of the Adult Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network*. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4th Edition. Academic. Press.

**Herbison**, A.E., **De Tassigny** XDA, **Doran** J, **Colledge** WH., (2010). Distribution and postnatal development of *Gpr54* gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 151(1):312-321.

**Herbison**, A.E., **Porteous**, R., **Pape**, J.R., **Mora**, J.M., **Hurst** PR., (2008). Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility. *Endocrinology* 149:597–604 25.

**Hernandez**, ME, **Soto-Cid** A, **Rojas** F, **Pascual** LI, **Aranda-Abreu** GE, **Toledo** R. (2006) Prostate response to prolactin in sexually active male rats. *Reprod Biol Endocrinology*.1477-7827-4-28.

**Homma**, T., **Sakakibara**, M., **Yamada**, S., **Kinoshita**, M., **Iwata**, K., **Tomikawa**, J., et al. (2009). Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biol. Reprod*. 81, 1216–1225.

**Hrabovszky**, E., **Ciofi**, P., **Vida**, B. (2010). The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *31:1984-1998*.

**Hu**, Z.Z., **Meng**, J., **Dufau**, M.L. (2001). Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *Journal Biol. Chem*. 276:41086 – 41094

**Irwig** MS, **Fraley** GS, **Smith** JT, **Acohido** BV, **Popa** SM, **Cunningham** MJ, **Gottsch** ML, **Clifton** DK, **Steiner** RA., (2005). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of *KiSS-1* mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80:264–272.

**Javed**, Z., **Qamar**, U., **Sathyapalan**, T. (2015). The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis. *Endokrynologia Polska*. Vol. 66; 6.

**Kaprara**, A., **Huhtaniemi**, I.T. (2017). The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Reproductive Physiology*. 86: 3-17.

**Kauffman** S.A. (2009). Sexual differentiation and the *Kiss1* system: Hormonal and developmental considerations. *30(1)*, 0–93.

**Kauffman**, A. S. (2010). Coming of age in the Kisspeptin Era: Sex differences, development, and puberty. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324(1-2), 51–63.

**Kauffman**, A.S., **Gottsch**, M.L., **Roa**, J., **Byquist**, A.C., **Crown** A, **Clifton** DK, **Hoffman** GE, **Steiner** RA, **Tena-Sempere** M., (2007). Sexual differentiation of *Kiss1* gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*. 148(4):1774–1783.

**Keen, K. L., Wegner, F. H., Bloom, S. R., Ghatei, M. A., and Terasawa, E. (2008).** An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology* 149, 4151–4157.

**Keller, M., Baum, M.J., Brock, O., Brennan, P.A., Bakker J. (2009).** Both main and accessory olfactory systems contribute to mate recognition and sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, 200, 268-276.

**Keller, M., Douhard, Q., Baum, M. J., & Bakker, J. (2006).** Destruction of the Main Olfactory Epithelium Reduces Female Sexual Behavior and Olfactory Investigation in Female Mice. *Chemical Senses*, 31(4), 315–323.

**Kim, J., Semaan, S., Donald, K., Clifton, R.A., Steiner, Sangeeta Dhamija, y Alexander S. Kauffman. (2011).** Regulation of Kiss1 Expression by Sex Steroids in the Amygdala of the Rat and Mouse. *Endocrinology*; 152(5): 2020–2030.

**Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Maeda, K.-I. (2005).** Involvement of Central Metastin in the Regulation of Preovulatory Luteinizing Hormone Surge and Estrous Cyclicity in Female Rats. *Endocrinology*, 146(10), 4431–4436.

**Kirk, SE, Xie TY, Steyn FJ, Grattan DR, Bunn SJ. (2017).** Restraint stress increases prolactin-mediated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 in the hypothalamus and adrenal cortex in the male mouse. *J Neuroendocrinol.* 29:e12477

**Kokay, I.C., Petersen, S.L., Grattan, D.R. (2011).** Identification of Prolactin-Sensitive GABA and Kisspeptin Neurons in Regions of the Rat Hypothalamus Involved in the Control of Fertility. 152: 526-535.

**Kokay, I.C., Wyatt, A., Phillipps, H.R. (2018).** Analysis of prolactin receptor expression in the murine brain using a novel prolactin receptor reporter mouse. *Journal of Neuroendocrinology*; 30: e12634.

**Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. (2001).** The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry* 276 34631–34636.

**Krüger THC, Haake P, Hartmann U, Schedlowski M, Exton MS (2002).** Prolactin release following orgasm: ¿a feedback control of sexual arousal? *Neurosci Biobehav Rev* 26:31–44.

**Krüger, THC., Uwe Hartmann; Manfred Schedlowski (2005).** Prolactinergic and dopaminergic mechanisms underlying sexual arousal and orgasm in humans. , 23(2), 130–138.

**Kumar, D., Periasamy, V., Freese, M., Voigt, A., & Boehm, U. (2015).** In Utero Development of Kisspeptin/GnRH Neural Circuitry in Male Mice. *Endocrinology*, 156(9), 3084–3090.

**Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, Le WW, Hoffman GE, Seminara SB. (2007).** Kiss1-/- mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54 -/- mice. *Endocrinology*; 148: 4927–4936.

**Lee DK, Nguyen T, O’Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O’Dowd BF. (1999).** Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*; 446:

**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.

**Levine, J.E. (2015).** Chapter 26: Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. Vol 2 In Knobil and Neill’s *Physiology of Reproduction* 4th edn pp 335–397. Eds TM Plant y AJ Zeleznik. San Diego CA USA: Elsevier Inc.

**Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I.J., Smith, J.T.** (2011). Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *Journal Neuroendocrinology*; 23(10): 871-82.

**Liang SL, Pan JT.** (2011). The spontaneous firing rates of dopamine-inhibited dorsomedial arcuate neurons exhibit a diurnal rhythm in brain slices obtained from ovariectomized plus estrogen-treated rats. *Brain Res Bull*, 85:189–93.

**Livak, K.J. & Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

**Lyons, DJ, Horjales-Araujo E, Broberger C.** (2010). Synchronized network oscillations in rat tuberoinfundibular dopamine neurons: switch to tonic discharge by thyrotropin-releasing hormone. *Neuron*; 65:217–29.

**Marques, P., Skorupskaite, K., George, J.T.** (2018). Physiology of GnRH and Gonadotropin Secretion. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279070/>

**McArdle, C.A. y Roberson, M.S.** (2015). Chapter 10: Gonadotropes and gonadotropin-releasing hormone signaling. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction 4th edn* pp 335–397. Eds TM Plant y AJ Zeleznik. San Diego CA USA: Elsevier Inc.

**McCarthy, M. M.** (2013). A piece in the puzzle of puberty. *Nature Neuroscience*, 16(3), 251–253.e

**Mendoza-Romo, M.Á. y García-Peña, E.** (2010). Papel de la prolactina en el cáncer de próstata. *Revista Mexicana de Urología*;70(01):55-60.

**Message S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinger I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA.** (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 1761–1766.

**Meyer-Lindenberg, A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M.** (2011). Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat Rev Neuroscience*; 12: 524–538.

**Mittelman-Smith, M. A., Williams, H., Krajewski-Hall, S. J., Lai, J., Ciofi, P., McMullen, N. T., & Rance, N. E.** (2012). Arcuate Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) Neurons Mediate the Estrogen Suppression of Gonadotropin Secretion and Body Weight. *Endocrinology*, 153(6), 2800–2812.

**Morales, T.** (2011). Recent Findings on Neuroprotection Against Excitotoxicity in the Hippocampus of Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(11), 994–1001.

**Moreno-Carranza, B., Bravo-Manriquez, M., Baez, A., Ledesma-Colunga, M.G., Ruiz-Herrera, X., Reyes-Ortega, P., de Los Rios, E.A., Macotela, Y., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C.,** (2018). Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice. *Am. J. Physiol. Regul., Integr. Comp. Physiol.* 314, R902–R908.

**Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Stepkowski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R.** (2001). AXOR12, a Novel Human G Protein-coupled Receptor, Activated by the Peptide KiSS-1. *J Biol Chem*; 276:28969–28975.

**Munger SD, Leinders-Zufall T, Zufall F.** (2009). Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. *Annu Rev Physiol.* 71:115–140.

**Navarro VM, Castellano JM, García-Galiano D, Tena-Sempere M.,** (2007). Neuroendocrine factors in the initiation of puberty: The emergent role of kisspeptin. *Rev Endocr Metab Disord.* 8(1):11-20.

**Navarro VM**, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Tena-Sempere, M., (2004). Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *The Journal of Physiology*, 561(2), 379–386.

**Navarro VM**, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK and Robert A. Steiner. (2009). Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion by Kisspeptin/Dynorphin/Neurokinin B Neurons in the Arcuate Nucleus of the Mouse. *The Journal of Neuroscience*, 29(38):11859–11866.

**Navarro, V. M.**, Bosch, M. A., León, S., Simavli, S., True, C., Pinilla, L., Kaiser, U. B. (2015). The Integrated Hypothalamic Tachykinin-Kisspeptin System as a Central Coordinator for Reproduction. *Endocrinology*, 156(2), 627–637.

**Nestor, C. C.**, Briscoe, A. M., Davis, S. M., Valent, M., Goodman, R. L., and Hileman, S. M. (2012). Evidence of a role for kisspeptin and neurokinin B in puberty of female sheep. *Endocrinology* 153, 2756–2765.

**O'Hara, L.**, Curley, M., Tedim Ferreira, M., Cruickshanks, L., Milne, L., y Smith, L. B. (2015). Pituitary Androgen Receptor Signalling Regulates Prolactin but Not Gonadotrophins in the Male Mouse. *PLOS ONE*, 10(3), e0121657.

**Oakley, Amy E.**, Clifton, Donald K., Steiner, Robert A. (2009). Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews*, 30(6), 713–743.

**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.

**Ojeda, S.R.**, Skinner, M.K. (2006). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y JD Neill (Eds). 3ra Ed. Raven Press, New York. Pp 2061-2126

**Overgaard A**, Tena-Sempere M, Franceschini I, Desroziers E, Simonneaux V, Mikkelsen JD. (2013). Comparative analysis of kisspeptin-immunoreactivity reveals genuine differences in the hypothalamic Kiss1 systems between rats and mice. *Peptides*; 45:85–90.

**Pardo-Bellver, Cecilia**; Cádiz-Moretti, Bernardita; Novejarque, Amparo; Martínez-García, Fernando; Lanuza, Enrique (2012). Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6(10), 3389.

**Pascual-Mathey, L. I.**, Rojas-Duran, F., Aranda-Abreu, G. E., Manzo, J., Herrera-Covarrubias, D., Muñoz-Zavaleta, D. A., Hernandez, M. E. (2016). Effect of hyperprolactinemia on PRL-receptor expression and activation of Stat and Mapk cell signaling in the prostate of long-term sexually-active rats. *Physiology & Behavior*, 157, 170–177.

**Patel SS**, Bamigboye V. (2007). Hyperprolactinaemia. *Journal Obstetric Gynaecology*; 27:455–459.

**Patil MJ**, Henry MA, Akopian AN. (2014). Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels (Austin)*. 8:193-202.

**Perrot-Appianat M**, Gualillo O, Pezet A, Vincent V, Edery M, Kelly PA. (1997). Dominant negative and cooperative effects of mutant forms of prolactin receptor, *Molecular Endocrinology*;11:1020–32.

**Pezet A**, Favre H, Kelly Pa, & Edery M. (1999). Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem* 274: 24497–24502.

**Pielecka-Fortuna, J.**, Chu, Z., & Moenter, S. M. (2008). Kisspeptin Acts Directly and Indirectly to Increase Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Its Effects Are Modulated by Estradiol. *Endocrinology*, 149(4), 1979–1986.

**Pineda, R.**, Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. (2010). Physiological roles of the kisspeptin/ GPR54 system in the neuroendocrine control of reproduction. *Prog. Brain Research*; 181: 55– 77.



**Pineda, R., Plaisier, F., Millar, R.P., Ludwig, M. (2017).** Amygdala Kisspeptin Neurons: Putative Mediators of Olfactory Control of the Gonadotropic Axis. *Neuroendocrinology*;104(3):223-238.

**Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P., & Tena-Sempere, M. (2012).** Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. *Physiological Reviews*, 92(3), 1235–1316.

**Plant TM, Ramaswamy S, Dipietro MJ (2006).** Repetitive activation of hypothalamicGprotein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 147:1007–1013.

**Plant, T. M., Terasawa, E., y Witchel, S. F. (2015).** Chapter 32: Puberty in Non-human Primates and Man. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 1487–1536.

**Plant, T.M. (2015).** Neuroendocrine control of the onset of puberty. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 38: 73-88.

**Prevot, V. (2015).** Chapter 30: Puberty in Mice and Rats. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. San Diego, CA: Academic Press; (4):1395–1439.

**Prieto, G.B., Velazquez, P.M. (2002).** Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Revista Facultad Medicina, UNAM*. Vol.45 No.6.

**Quennell, J.H., Howell, C.S., Roa, J., Augustine, R.A., Grattan, D.R., Anderson, G.M., (2011).** Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. *Endocrinology* 152, 1541–1550.

**Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM. (2008).** Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology*. 9:4387–4395.

**Redmond, J. S., Macedo, G. G., Velez, I. C., Caraty, A., Williams, G. L., and Amstalden, M. (2011a).** Kisspeptin activates the hypothalamicadenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction* 141, 541–548.

**Rehman J, Christ G, Alyskewycz M, Kerr E, Melman A. (2000).** Experimental hyperprolactinemia in a rat model: alteration in centrally mediated neuroerectile mechanisms. *Int J Impot Res*; 12(1):23–32.

**Ribeiro, A.B., Leite, C.M., Kalil, B., Franci, C.R., Anselmo-Franci JA, Szawka RE., (2015).** Kisspeptin Regulates Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurons and Prolactin Secretion in an Oestradiol-Dependent Manner in Male and Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 27(2), 88–99.

**Roa, J., Navarro, T.M., Tena-Sempere, M. (2011).** Kisspeptins in reproductive biology: Consensus knowledge and recent developments. *Biology Reproduction*; 85:650-660.

**Robertson, J. L., Clifton, D. K., de la Iglesia, H. O., Steiner, R. A., & Kauffman, A. S. (2009).** Circadian Regulation of Kiss1 Neurons: Implications for Timing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone/Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology*, 150(8), 3664–3671.

**Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. (2007).** Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 2744–2750.

**Ruka KA, Burger LL, Moenter SM. (2013).** Regulation of arcuate neurons coexpressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin by modulators of neurokinin 3 and k-opioid receptors in adult male mice. *Endocrinology*;154(8):2761–2771.

**Rulli, S. B., Cambiasso, M. J., & Ratner, L. D. (2018).** Programming of the reproductive axis by hormonal and genetic manipulation in mice. *Reproduction*, REP–18–0054.

**Ságodi L. Sóllyom E. Kiss-Tóth E., (2018).** Neuroendocrine mechanisms controlling the development in puberty. [A literature overview]. *Orv Hetil*.159(29):1175-1182.

- Sellix** MT, Egli M, Henderson RP, Freeman ME. (2004). Ovarian steroid hormones modulate circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity. *Brain Research*, 1005:164–81.
- Semaan**, S. J., Tolson, K. P., & Kauffman, A. S. (2013). The Development of Kisspeptin Circuits in the Mammalian Brain. *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology*, 221–252.
- Semaan**, S.J. y Kauffman, A.S. (2010). Sexual differentiation and development of forebrain reproductive circuits. *Current Opinion in Neurology*. 20:424–431
- Seminara**, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK., (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New Engl J Med* 349, 1614–1627.
- Shahab**, M., Mastronardi, C., Seminara, S. B., Crowley, W. F., Ojeda, S. R., and Plant, T. M. (2005). Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2129–2134.
- Shao** R, Nutu M, Weijdegard B. (2008). Differences in prolactin receptor (PRLR) in mouse and human fallopian tubes: evidence for multiple regulatory mechanisms controlling PRLR isoform expression in mice. *Biology Reproduction*, 79:748–57.
- Shingo**, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross JC, Weiss S., (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299 117–120.
- Silveira**, L. G., Noel, S. D., Silveira-Neto, A. P., Abreu, A. P., Brito, V. N., Santos, M. G., Latronico, A. C. (2010). Mutations of the KISS1 Gene in Disorders of Puberty. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(5), 2276–2280.
- Simerly** RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *J Comp Neurol* 294:76–95
- Simerly** RB. (2002). Wired for reproduction: organization and Development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annual Review Neuroscience*; 25:507-536.
- Skorupskaite**, K., George, J.T., y Anderson, R.A. (2014). The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human Reproduction Update*, 20(4), 485–500.
- Smith** Jeremy T. (2009). Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: Comparative aspects. *Peptides*, 30(1), 0–102.
- Smith** JT, Clay CM, Caraty A, Clarke IJ. (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*; 148: 1150–1157.
- Smith** JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA., (a) (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146 3686–3692.
- Smith** JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA., (b) (2005). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146 2976–2984.
- Smith**, J. T., Li, Q., Yap, K. S., Shahab, M., Roseweir, A. K., Millar, R. P., & Clarke, I. J. (2011). Kisspeptin Is Essential for the Full Preovulatory LH Surge and Stimulates GnRH Release from the Isolated Ovine Median Eminence. *Endocrinology*, 152(3), 1001–1012.
- Smith**, J.T. (2009). Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: Comparative aspects. *Peptides*.;30:94-102.
- Smith**, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner RA. (2006). Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *Journal Neuroscience*.;26: 6687–6694.
- Sonigo**, C., Bouilly, J., Carre, N., Tolle, V., Caraty, A., Tello J. (2012) Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration. *J Clin Invest*.;122(10):3791-5.
- Stephens**, S.B., Chahal, N., Munaganuru, N., Parra, R.A., Kauffman, A. (2016). Estrogen stimulation of Kiss1 expression in the medial amygdala involves estrogen receptor-a but not estrogen receptor-b. *Endocrinology*. 157(10):4021–4031.

- Sun Y.**, Tian Z., Zhao H., Stephen TC., Chen B. (2007). Characteristic of hypothalamic kisspeptin expression in the pubertal development of precocious female rats. *420*(1), 0–17.
- Szawka**, R.E., Ribeiro, A.B., Leite, C.M. (2010). Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. *Endocrinology*; 151:3247–3257.
- Teles**, M. G., Bianco, S. D. C., Brito, V. N., Trarbach, E. B., Kuohung, W., Xu, S., ... Latronico, A. C. (2008). AGPR54-Activating Mutation in a Patient with Central Precocious Puberty. *New England Journal of Medicine*, 358(7), 709–715.
- Tena-Sempere** M. (2007). Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology.*; 86:229–41.
- Tena-Sempere**, M., Aguilar, E., Fernandez-Fernandez, R., Pinilla, L. (2004). Ghrelin inhibits prolactin secretion in prepubertal rats. *Neuroendocrinology* 79, 133–141.
- Terasawa**, E., Guerriero, K. A., & Plant, T. M. (2013). Kisspeptin and Puberty in Mammals. *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology*, 253–273.
- Topaloglu**, A. K., Tello, J. A., Kotan, L. D., Ozbek, M. N., Yilmaz, M. B., Erdogan, S., Yuksel, B. (2012). Inactivating KISS1 Mutation and Hypogonadotropic Hypogonadism. *New England Journal of Medicine*, 366(7), 629–635.
- Torner**, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, H.-G., Winkler, J., Neumann, I. D. (2009). Prolactin Prevents Chronic Stress-Induced Decrease of Adult Hippocampal Neurogenesis and Promotes Neuronal Fate. *Journal of Neuroscience*, 29(6), 1826–1833.
- True** C, Kirigiti M, Ciofi P, Grove KL, Smith MS. (2011). Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol*; 23(1):52–64.
- Tsukamura H**, Maeda K. (2001). Non-metabolic and metabolic factors causing lactational anestrus: rat models uncovering the neuroendocrine mechanism underlying the suckling-induced changes in the mother. *Prog Brain Res*; 133:187–205.
- Uenoyama**, Y., Inoue, N., Maeda, K., & Tsukamura, H. (2018). The roles of kisspeptin in the mechanism underlying reproductive functions in mammals. *Journal of Reproduction and Development*.
- Uenoyama**, Y., Inoue, N., Pheng, V., Homma, T., Takase, K., Yamada, S., Ajiki, K., Ichikawa, M., Okamura H, Maeda KI. (2011). Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of axonal regulation of GnRH release. *Journal Neuroendocrinology*. 10:863–870.
- Vilar**, L., Vilar, C., Lyra, R., Freitas, MC. (2019). Pitfalls in the Diagnostic Evaluation of Hyperprolactinemia. *Neuroendocrinology*, 109(1):7-19.
- Walker**, D. M., & Gore, A. C. (2011). Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(4), 197–207.
- Wintermantel**, T.M., Campbell, R.E., Porteous R, Bock D, Gröne HJ, Todman, M.G., Korach K.S., Greiner E, Pérez, C.A., Schütz G, Herbison, A.E. (2006). Definition of Estrogen Receptor Pathway Critical for Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and Fertility. *Neuron*: 52:271–280.
- Wray**, S. (2010). From Nose to Brain: Development of Gonadotrophin-Releasing Hormone -1 Neurons. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(7), 743–753.
- Yamada S**, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, Adachi S, Inoue K, Maeda KI, Tsukamura H. (2007). Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology* 148:2226–2232.
- Yamada**, S., Uenoyama, Y., Deura, C., Minabe, S., Naniwa, Y., Iwata, K., Tsukamura, H. (2012). Oestrogen-Dependent Suppression of Pulsatile Luteinising Hormone Secretion and Kiss1 mRNA Expression in the Arcuate Nucleus During Late Lactation in Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(9), 1234–1242.

**Yasukawa, H., H. Misawa, H. Sakamoto, M. Masuhara, A. Sasaki, T. Wakioka, S. Ohtsuka, T. Imaizumi, T. Matsuda, J. N. Ihle, and A. Yoshimura. (1999).** The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.* 18:1309–1320.

**Yeo, SH. y Herbison, AE. (2011).** Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology.* 152(6):2387-2399.

**Yeo, SH., Kyle, V., Morris, PG., Jackman, S., Sinnott-Smith, L., Schacker, M., Chen, CC., William H. (2016).** Visualization of Kiss1 neuron distribution using a Kiss1-CRE transgenic mouse. *Journal of Neuroendocrinology,* (10), 11, 435.