



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GnRH, KISSPEPTINA Y KISS1R EN LA RATA**

***taiep*: UN MODELO ANIMAL DE DESMIELINIZACIÓN DEL SISTEMA**

**NERVIOSO CENTRAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LUZ PATRICIA MUÑOZ DE LA TORRE**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**Dra. Leticia Morales Ledesma**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**Dra. Lucía Alba Martínez Mota**

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑOZ

**Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena**

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑOZ

**MÉXICO, CD. MX.**

**JUNIO, 2023.**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GnRH, KISSPEPTINA Y KISS1R EN LA RATA**

***taiep*: UN MODELO ANIMAL DE DESMIELINIZACIÓN DEL SISTEMA**

**NERVIOSO CENTRAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LUZ PATRICIA MUÑOZ DE LA TORRE**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. LUCÍA ALBA MARTÍNEZ MOTA**

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑOZ

**DRA. ERIKA MONSERRAT ESTRADA CAMARENA**

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑOZ

**MÉXICO, CD. MX.**

**JUNIO, 2023.**

**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**OFICIO CPCB/325/2023**

**ASUNTO: Oficio de Jurado**

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **13 de febrero de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **MUÑOZ DE LA TORRE LUZ PATRICIA** con número de cuenta **519020469** con la tesis titulada **“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GNRH, KISSPEPTINA Y KISS1R EN LA RATA TAIEP: UN MODELO ANIMAL DE DESMIELINIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOS CENTRAL”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR  
Vocal: DRA. ANGÉLICA TRUJILLO HERNÁNDEZ  
Vocal: DR. FRANCISCO CASTELÁN  
Vocal: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO  
Secretario: DRA. ERIKA MONSERRAT ESTRADA CAMARENA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de abril de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por haberme permitido entrar a su programa de estudios en beneficio de mi formación académica y conducirme a terminar mis estudios de doctorado.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado como becario número 736151. La realización de esta tesis contó con el apoyo financiero de UNAM-DGAPA-PAPIIT, clave IN216519 e IN207022.

Agradezco a mi tutor principal y a los miembros del comité tutor:

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena

Dra. Lucía Alba Martínez Mota

Por su gran apoyo académico en la realización de este estudio, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron la escritura de la tesis y por la guía que me brindaron para terminar mis estudios de doctorado.

## Agradecimientos

A los miembros del jurado:

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena

Dra. Angélica Trujillo Hernández

Dr. Benjamín Floran Garduño

Dr. Francisco Castelán

Por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por sus comentarios y sugerencias.

A mi directora de tesis, Dra. Leticia Morales Ledesma por el tiempo invertido en mi formación, por su apoyo e infinita paciencia.

A mi madre por su apoyo y paciencia durante todo este tiempo.

A esa persona importante en mi vida, que siempre estuvo ahí para brindarme toda su ayuda, soportar mis momentos malos y compartir los momentos buenos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio que me han brindado desinteresadamente su valiosa amistad

## Índice

|  |    |
|--|----|
| Resumen.....   | 1  |
| Abstract.....  | 3  |
| Introducción.....  | 5  |
| Antecedentes.....  | 6  |
| El control reproductivo.....   | 6  |
| Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....                           | 7  |
| Kisspeptina.....   | 13 |
| El eje HHG durante el desarrollo de la rata y diferencias entre sexos..... | 16 |
| Alteraciones del eje HHG.....  | 20 |
| Desmielinización y problemas reproductivos.....                            | 22 |
| Análisis de las alteraciones del eje HHG por desmielinización.....         | 26 |
| Rata <i>taiep</i> .....  | 26 |
| Planteamiento del problema.....  | 29 |
| Hipótesis.....   | 30 |
| Objetivo general.....  | 31 |
| Objetivos particulares.....  | 31 |
| Metodología.....   | 32 |
| Sacrificio de los animales.....  | 32 |
| Detección de mielina en cerebro.....                                       | 33 |
| Inmunofluorescencia.....   | 33 |
| Adquisición y análisis de las imágenes de inmunofluorescencia.....         | 34 |
| ELISA.....   | 36 |
| Conteo de ovocitos y porcentaje de animales ovulantes.....                 | 36 |
| Análisis espermático.....  | 37 |
| Morfología de los túbulos seminíferos.....                                 | 38 |
| Análisis estadísticos.....   | 41 |
| Resultados.....  | 42 |
| Mielina presente en el hipotálamo.....                                     | 42 |
| Caracterización de las hembras <i>taiep</i> (90 días).....                 | 44 |
| Caracterización del ciclo estral.....                                      | 44 |
| Peso corporal.....   | 45 |
| Peso de los órganos.....   | 46 |

|  |     |
|--|-----|
| Porcentaje de animales ovulantes y número de ovocitos ovulados .....   | 48  |
| Concentración sérica de LH por etapa del ciclo estral .....  | 48  |
| Análisis de la expresión hipotalámica de kisspeptina, GnRH y el receptor Kiss1R por etapa del ciclo estral. .... | 49  |
| Expresión de kisspeptina en ARC por etapa del ciclo estral .....   | 49  |
| Expresión de kisspeptina en AVPV por etapa del ciclo estral .....  | 52  |
| Diferencia en la población de IRcb entre núcleos .....   | 55  |
| Expresión de GnRH y Kiss1R en ME y AVPV por etapa del ciclo estral .....   | 56  |
| Caracterización de los machos <i>taiep</i> (90 días).....  | 61  |
| Peso corporal y de los órganos .....   | 61  |
| Concentración sérica de LH y testosterona.....   | 62  |
| Análisis de la expresión hipotalámica de kisspeptina, GnRH y el receptor Kiss1R .....                            | 62  |
| Expresión de kisspeptina en ARC .....  | 62  |
| Expresión de kisspeptina en AVPV .....   | 64  |
| Expresión de GnRH y Kiss1R en ME y AVPV .....  | 67  |
| Morfología testicular.....   | 70  |
| Caracterización de los túbulos seminíferos de la categoría 1 .....   | 72  |
| Caracterización de los túbulos seminíferos de la categoría 2 .....   | 73  |
| Caracterización de los túbulos seminíferos de la categoría 3 .....   | 74  |
| Análisis espermático .....   | 76  |
| Número de espermatozoides .....  | 76  |
| Motilidad espermática.....   | 76  |
| Resumen resultados .....   | 78  |
| Discusión.....   | 79  |
| Contraste con otros modelos y el ser humano.....   | 89  |
| Limitaciones y perspectivas.....   | 90  |
| Conclusiones.....  | 93  |
| Referencias .....  | 94  |
| Anexo.....   | 120 |

## Índice de abreviaturas

MS – esclerosis múltiple  
HHG - hipotálamo-hipófisis-gónadas  
GnRH - hormona liberadora de gonadotropinas  
FSH - hormona folículo estimulante  
LH - hormona luteinizante  
ARC - núcleo arcuato  
ME - eminencia media  
Kiss1R - receptor a kisspeptina 1  
AVPV - área anteroventral periventricular  
EAE - encefalomiелitis alérgica experimental  
SD – Sprague-Dawley  
IRcb – cuerpos celulares inmunorreactivos  
E- estro  
D – diestro  
P – proestro temprano  
C – cepa  
S - sexo  
CE – ciclo estral  
L - lado  
HHA - hipotálamo-hipófisis-adrenal  
ROS – especies reactivas de oxígeno  
IGF1- factor de crecimiento similar a la insulina  
SSN - nervio espermático superior  
ISN - nervio espermático inferior

## Resumen

La reproducción es un evento altamente controlado y debido a la complejidad en la regulación de este evento cualquier alteración puede desencadenar problemas reproductivos. Tal es el caso de las enfermedades desmielinizantes donde se han reportado alteraciones reproductivas en pacientes con esclerosis múltiple. Es importante comprender como se ha afectado el control reproductivo ya que proporcionará información útil para el desarrollo de tratamientos de fertilidad que sean más efectivos y no causen efectos secundarios como se ha observado en algunos pacientes. Para esto es importante contar con modelos animales, uno de estos es la rata *taiep*. Este modelo se caracteriza por presentar desmielinización progresiva del sistema nervioso central lo cual provoca que de manera paulatina el animal desarrolle temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis del tren posterior. Dentro de los problemas reproductivos descritos en nuestro modelo tenemos que la hembra presenta cambios en la secreción de hormonas esteroideas, presenta quistes foliculares y alteración en la presencia de catecolaminas ováricas; por otro lado el macho no ha sido estudiado a profundidad, solo se ha descrito que presenta dificultad para llevar a cabo la copula. Debido a estas características usamos a la rata *taiep* para caracterizar las alteraciones del control reproductivo a nivel hipotalámico en ambos sexos; así como el análisis de las alteraciones reproductivas a nivel testicular y espermático en el macho. A nivel hipotalámico observamos dimorfismo sexual en la expresión de kisspeptina, caracterizado por un incremento en los macho *taiep* y disminución en las hembras *taiep* respecto al animal control. En ambos sexos se observa que no hay cambios en la expresión de GnRH pero hay disminución en las concentraciones séricas de LH. En el caso del macho observamos a nivel testicular la alteración del tamaño de los túbulos seminíferos, siendo más grandes que en el animal control, además de que este efecto es más marcado en el testículo izquierdo. No observamos alteración en la muestra seminal total, al analizar las muestras considerando si se obtuvieron del epidídimo izquierdo o derecho se observa la disminución de la movilidad espermática en el epidídimo izquierdo y aumento la movilidad espermática en el epidídimo derecho respecto al

control. Los cambios observados en nuestro modelo animal a nivel hipotalámico son diferentes a los observados en el modelo de encefalomiелitis alérgica experimental, y nos permiten sugerir que las alteraciones a nivel hipotalámico va a depender del tipo de proceso desmielinizante que se esté cursando. En el caso del macho *taiep* parece ser que la desmielinización presente a nivel central junto con las alteraciones en el control hipotalámico no ha causado alteraciones que imposibiliten la reproducción, por lo que es necesario profundizar el estudio analizando la viabilidad de los espermatozoides así como analizar estos aspectos a diferentes edades. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que la rata *taiep* presenta alteración en la expresión de kisspeptina de forma sexo dependiente, acompañado de la disminución de las concentraciones de LH lo cual parece no ser suficiente para causar alteraciones a nivel gonadal que imposibiliten la reproducción. Debido a esto consideramos que es necesario profundizar el análisis para determinar qué factores están manteniendo el funcionamiento gonadal, ya que podrían ser factores que faciliten el establecimiento de terapias reproductivas efectivas en pacientes con enfermedades desmielinizantes.

## Abstract

Reproduction is a highly controlled event and because of the complexity of the regulation of this event, any alteration can cause reproductive problems. Such is the case of demyelinating diseases where reproductive alterations have been reported in patients with multiple sclerosis. It is important to understand how reproductive control has been affected because it will provide useful information for the development of fertility treatments that are more effective and do not cause side effects as it has been observed in some patients. In order to achieve this, it is important to have animal models, one being the *taiep* rat. This animal model is characterised by progressive demyelination of the central nervous system, this cause gradual onset of tremor, ataxia, immobility, epilepsy and paralysis of the hind legs. Among the reproductive alterations described in our model we have that the female rat presents changes in the secretion of steroid hormones, follicular cysts and alteration in the presence of ovarian catecholamine; on the other hand, the male rat has not yet been fully studied, but it has been described that it has difficulty to copulate. Because of these characteristics, we use the *taiep* rat to characterise reproductive alterations at hypothalamic level in both sexes; as well as reproductive alterations at testicular and spermatic level in the male rat. At hypothalamic level, we showed sexual dimorphism in kisspeptin expression, characterised by an increase in males and a decrease in females when compared to control animals. Neither sex showed changes in the expression of GnRH but there is a decrease in the concentration of LH in serum. Male rats showed alterations at testicular level, specifically the size of the seminiferous tubules, these were bigger than in the control animal, this effect is greater in the left side testicle. We did not find alteration in the total seminal sample, when samples were analysed considering the side where they were obtained, there is a decrease in spermatic motility in the left side epididymis and an increase in the right side epididymis when compared with the control animal. The observed changes in our animal model at hypothalamic level are different to the ones observed in a model of experimental allergic encephalomyelitis, and suggest that alterations at hypothalamic level are going to be dependent on the kind of

demyelination process. In the case of the male *taiep* rat, demyelination at central level in conjunction with alterations at hypothalamic level have not changed alterations that make reproduction impossible, it is necessary to deepen the study analysing the viability of sperm cells as well as analyse these parameters at different ages. Results obtained in this work suggest that the *taiep* rat presents a sex dependent alteration in kisspeptin expression, in conjunction with a decrease in LH concentration that is not enough to cause alterations at gonadal level that make reproduction impossible. Because of this, we consider that it necessary to deepen the analysis in order to determine which factors are maintaining gonadal function, because those might be the foundation for effective reproductive therapies in patients with demyelinating diseases.

## Introducción

Las enfermedades desmielinizantes se caracterizan por ser de tipo inflamatorio, de origen idiopático y por provocar daño selectivo a la vaina de mielina (Bermejo Velasco *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2015). La enfermedad desmielinizante más común es la esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés), cuya prevalencia es mayor en mujeres y surge entre los 20-40 años (Rowan, 2002; Love, 2006). En los años recientes se ha observado el incremento de la incidencia de MS (Rivera, 2017; Walton *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2023). Aunado a esto, los pacientes de MS han reportado problemas reproductivos, tales como incremento de la concentración de hormonas gonadotrópicas, decremento de las hormonas esteroideas, alteración de la función gonadal llegando incluso a la infertilidad; los cuales varían entre hombres y mujeres (Cavalla *et al.*, 2006; Pakpoor *et al.*, 2014; Sepúlveda *et al.*, 2016; Glazer *et al.*, 2018; D'Amico *et al.*, 2020). Debido a estas alteraciones, las mujeres con MS han optado por realizarse tratamientos de fertilidad, los cuales incrementan la sintomatología de la enfermedad (Correale *et al.*, 2012; Houtchens *et al.*, 2020). Se desconoce el abordaje terapéutico para los problemas de infertilidad de los varones (Massarotti *et al.*, 2021). Resulta interesante que los efectos secundarios de los tratamientos para la fertilidad podrían evitarse estableciendo tratamientos adecuados en los pacientes con MS, pero hasta ahora ha resultado complicado debido al desconocimiento de las alteraciones que causan la desmielinización sobre el control reproductivo.

## Antecedentes

### El control reproductivo

Para identificar las alteraciones causadas por la desmielinización es necesario conocer cómo es el control reproductivo de un organismo sano. La reproducción está regulada por una compleja red entre el sistema nervioso central y las gónadas, que se conoce como el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG) (Kanasaki *et al.*, 2017). A nivel del hipotálamo la kisspeptina estimula la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que a su vez, estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) (Herbison, 2016), las que a nivel gonadal estimulan el crecimiento folicular en la hembra (Butcher *et al.*, 1974; Trewin *et al.*, 1998; Herbison, 2016), la espermatogénesis en el macho (Jean-faucher *et al.*, 1983; Ismael *et al.*, 2017) y la esteroidogénesis en ambos (Plant & Zeleznik, 2015). Las hormonas esteroides derivadas de la estimulación gonadal tienen un papel crítico en la retroalimentación del circuito del eje HHG (Herbison, 2016). Por lo que este eje se encarga de modular la liberación de hormonas que estimulan el desarrollo de los gametos y la secreción de hormonas esteroideas en ambos sexos (Ilustración 1) (Oyola & Handa, 2017; Kaprara & Huhtaniemi, 2018).

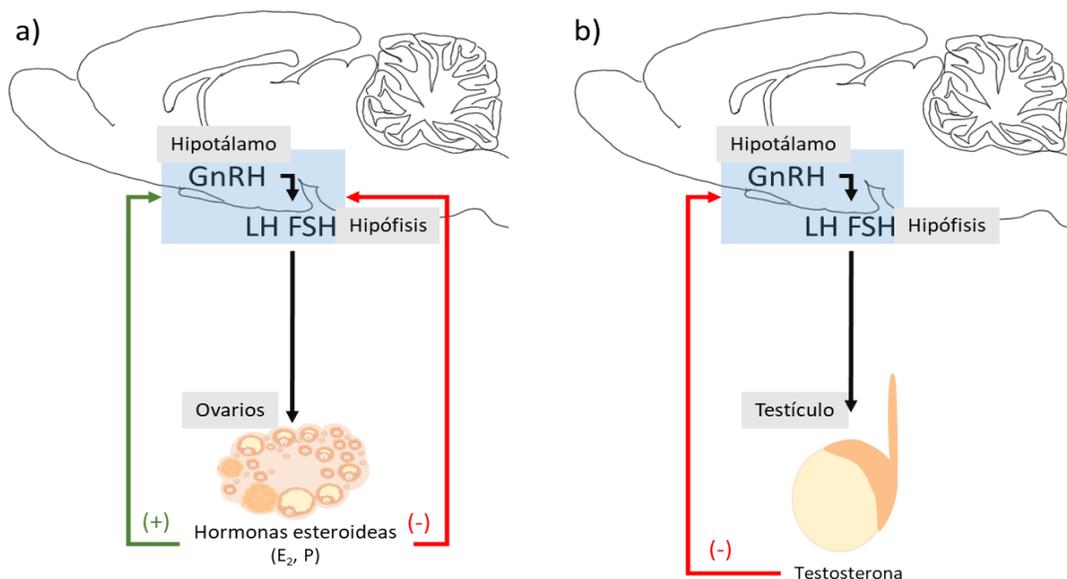


Ilustración 1. Representación esquemática del eje HHG. En (a) se observa el eje HHG de la hembra y en (b) el eje HHG del macho. La flecha verde indica la regulación positiva hacia el hipotálamo y la hipófisis; la flecha roja es la regulación negativa hacia el hipotálamo y la hipófisis. Abreviaturas: HHG: hipotálamo-hipófisis-gónada, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona folículo estimulante, E2: estradiol, P: progesterona. (Elaborado por Muñoz de la Torre).

## Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

La principal hormona que participa en el control del eje HHG es la GnRH (Herbison, 2016). Su descubrimiento surgió de la idea de que podría existir una sustancia capaz de regular la función reproductiva a nivel hipotalámico (Harris, 1948; Plant, 2015). Esta idea fue confirmada por los grupos de Schally y Guillemin, los cuales aislaron un neuropéptido de 10 aminoácidos en el hipotálamo de cerdo y de la oveja (Schneider *et al.*, 2006; Plant, 2015), que fue llamado hormona liberadora de la LH; por su relación con la liberación de este péptido (Amoss *et al.*, 1971; Schally *et al.*, 1971). Posteriormente se percataron de que este neuropéptido es capaz de regular la liberación de la LH y de la FSH en diferentes mamíferos, por lo que fue renombrada como hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH (Schally *et al.*, 1971; Parhar, 2002; Plant, 2015). La GnRH es producida y liberada en el hipotálamo por un tipo neuronal particular que se conoce como neuronas GnRH.

Las neuronas GnRH migran en etapas tempranas del desarrollo embrionario de la placoda olfatoria hacia el hipotálamo (Ilustración 2) (Tobet & Schwarting, 2006; Schwarting *et al.*, 2007; Wierman *et al.*, 2011). Al término de la migración se observa que las neuronas GnRH se distribuyen en forma de red continua a lo largo de la banda diagonal de Broca, áreas septales, estría *terminalis*, área preóptica ventral, lateral y medial, hipotálamo anterior, núcleo arcuato (ARC), núcleo infundibular, eminencia media (ME) y el órgano vasculoso de la lámina terminal (Merchenthaler *et al.*, 1984; Herbison, 2016; Barabás *et al.*, 2020). La neurona GnRH posee una estructura bipolar, el soma mide 10-20  $\mu\text{m}$  y sus axones son llamados dendrones, estos se concentran en la ME y el órgano vasculoso de la lámina terminal que son los sitios de secreción de GnRH hacia el sistema portal hipofisiario terminal (Merchenthaler *et al.*, 1984; Herbison, 2016; Barabás *et al.*, 2020). La actividad de las neuronas GnRH está sincronizada para producir pulsos generando que la

secreción de GnRH sea pulsátil, pero el mecanismo solo se conoce parcialmente (Plant & Zeleznik, 2015).

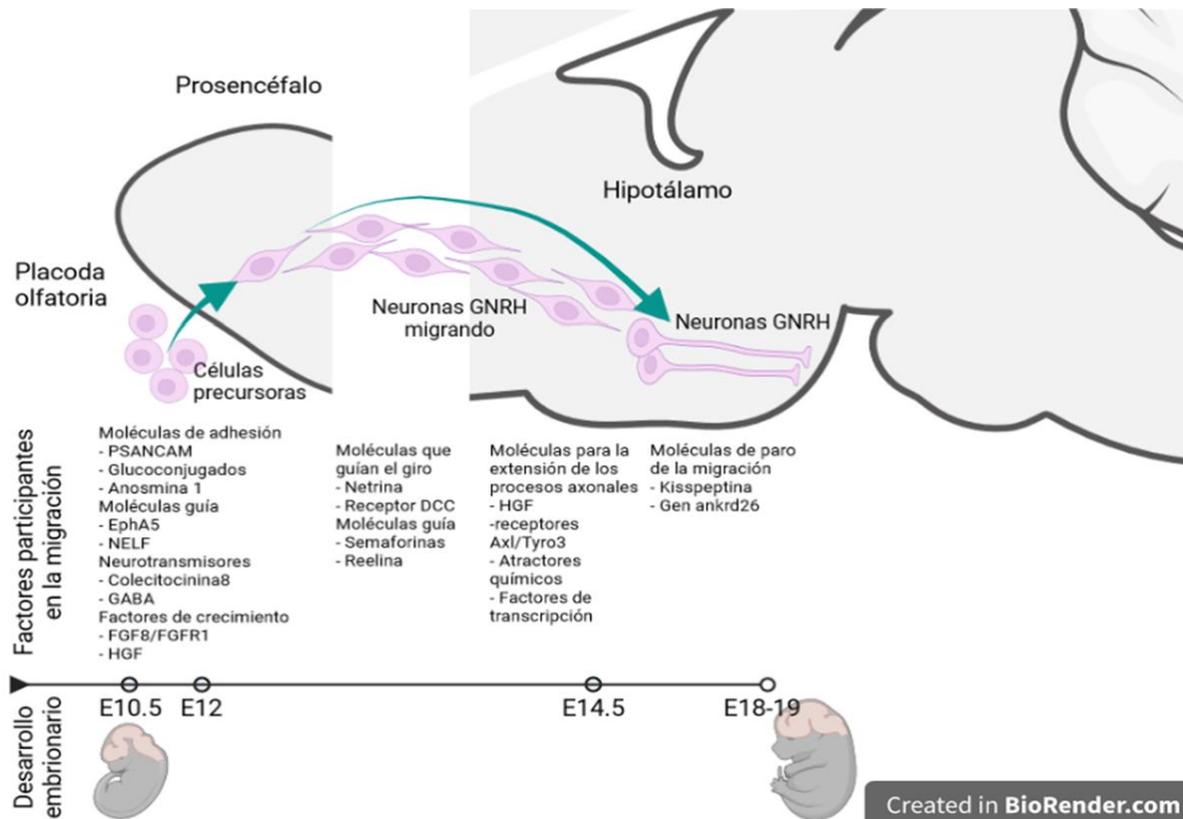


Ilustración 2. Proceso migratorio de las neuronas GNRH. Se muestra la etapa de desarrollo embrionario cuando inicia y termina la migración y los factores que intervienen en los diferentes pasos críticos de la migración (Tarozzo et al., 1995; NIELSENPREISS et al., 2004; Tsai et al., 2005; Schwarting et al., 2007; Wierman et al., 2011; Cariboni et al., 2012; Huilgol & Tole, 2016; Soga et al., 2016) Abreviaturas: GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas. (Elaborado por Muñoz de la Torre en Biorender.com).

Se tienen dos hipótesis sobre la regulación de la pulsatilidad de la secreción de GnRH. La primera plantea que deben existir suficientes interconexiones entre las neuronas GnRH para que se estimulen entre ellas reclutando a más neuronas GnRH y cuya sincronización estaría dada por la presencia de entradas glutamatérgicas (Choe et al., 2013; Plant & Zeleznik, 2015). La segunda, y más aceptada, es la existencia de un “generador del pulso” que es conformado por neuronas localizadas en el hipotálamo medio basal que son críticas para la generación del pulso estimulando la síntesis y liberación de GnRH (Plant & Zeleznik, 2015). Esta pulsatilidad se ha caracterizado en individuos de ambos sexos: en el

caso de los machos la GnRH se secreta en pulsos con una frecuencia constante y en las hembras la frecuencia de los pulsos varía durante el ciclo menstrual o estral, mostrando un gran aumento en la secreción de GnRH antes de la ovulación (Marty *et al.*, 2003; Plant & Zeleznik, 2015). Para que se pueda secretar la GnRH es necesario que se estimule la transcripción del gen que la produce.

El gen que codifica la GnRH es el GnRH1 compuesto de 4 exones cortos y 3 intrones largos; en el humano está presente en el cromosoma 8 y en el ratón en el 14 (Plant & Zeleznik, 2015). El transcrito primario es de 4200pb, tras pasar por el proceso de empalme (*splicing*) se reduce a 560pb, que corresponde al transcrito maduro (Plant & Zeleznik, 2015). Este se exporta y traduce a una pre-hormona de 92aa que consta de: la secuencia señal, la hormona GnRH, el sitio de corte y el péptido asociado a GnRH o GAP; después de varios procesos enzimáticos se obtiene GnRH (Plant & Zeleznik, 2015). La transcripción está regulada por  $Ca^{++}$  y se ha reportado que los estrógenos incrementan la transcripción aproximadamente un 40% (Plant & Zeleznik, 2015; Kaprara & Huhtaniemi, 2018). Tanto la síntesis de la GnRH como su liberación requerirán de la estimulación de diversos factores (Ilustración 3 y Tabla 1) (Witkin *et al.*, 1991; Herbison *et al.*, 1996; Funabashi *et al.*, 2001; Pimpinelli *et al.*, 2006; Turi *et al.*, 2008; Prevot *et al.*, 2010; Kenealy *et al.*, 2011; Roa, 2013; Christian, 2017; Kanasaki *et al.*, 2017; Phumsatitpong & Moenter, 2018; Terasawa, 2018), apoyando la hipótesis del generador del pulso, donde se ha mostrado que el factor más importante es la kisspeptina (Clarkson & Herbison, 2006; Choe *et al.*, 2013; Plant, 2015).

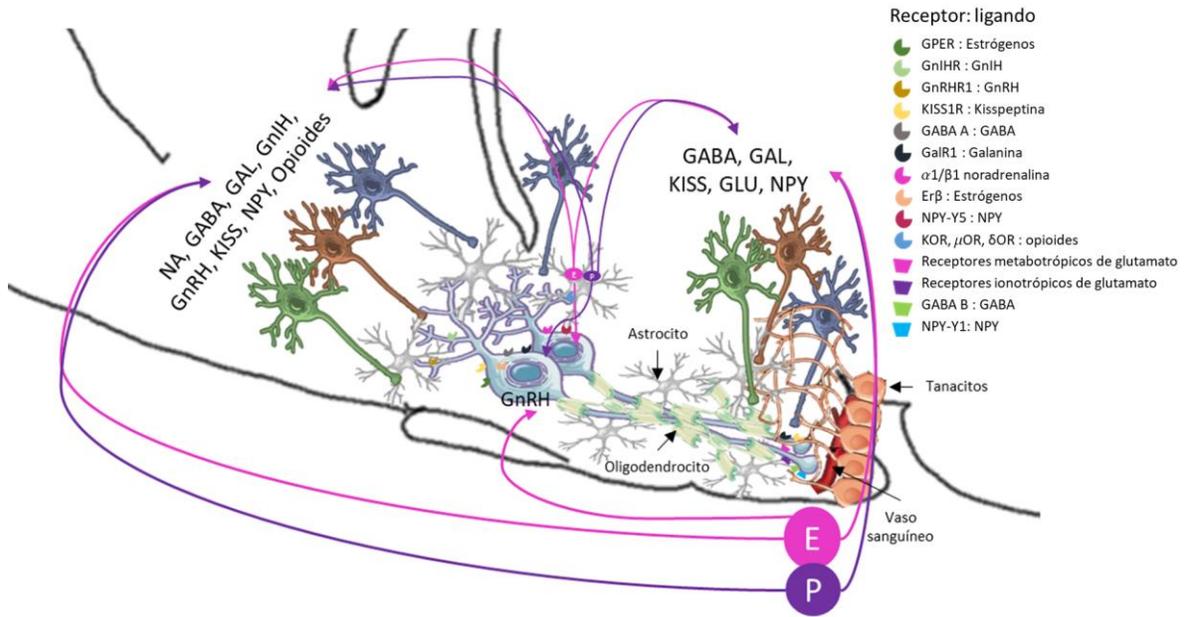


Ilustración 3. Representación esquemática de las interacciones de las neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo. Se señalan las entradas neuronales y hormonales. También se esquematizan los receptores a las diferentes señales y su localización en el cuerpo de la neurona GnRHérgicas. Abreviaturas: GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, E: estradiol, P: progesterona, NA: noradrenalina, GABA: ácido  $\gamma$  aminobutírico, GAL: galanina, GnIH: hormona inhibidora de las gonadotropinas, KISS: kisspeptina, NPY: neuropéptido Y, GLU: glutamato (Elaborado por Muñoz de la Torre).

Tabla 1. Entradas hormonales, neurales y gliales que reciben las neuronas GNRH para el control de su funcionamiento

| Entradas hormonales, gliales y neurales de la neurona GNRH      | Acción sobre la neurona GnRH   |
|---|--|
| Glutamato, ácido gamma aminobutírico (GABA), $\beta$ -endorfina | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Organiza y mantiene la pulsatilidad (Roa, 2013; Kanasaki <i>et al.</i>, 2017).</li> <li>• A través del receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub> se estimula la secreción de GnRH (Christian, 2017).</li> <li>• Actividad inhibitoria en las neuronas GnRH que presentan el receptor metabotrópico GABA<sub>B</sub> (Christian, 2017).</li> </ul> |
| Neuronas GnRH   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilitan el proceso de sincronización, coordinan el pulso GnRH y participan en el retrocontrol de su actividad (Witkin <i>et al.</i>, 1995).</li> </ul>  |
| Noradrenalina   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulador positivo que facilita, pero no determina la liberación de GnRH (Herbison <i>et al.</i>, 1996).</li> </ul>   |
| Neuropéptido Y  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulador positivo a nivel del nervio terminal para la liberación de GnRH (Roa, 2013).</li> </ul>   |
| Vasopresina   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta la liberación de GnRH (Funabashi <i>et al.</i>, 2001; Plant &amp; Zeleznik, 2015).</li> </ul>   |
| Acetilcolina  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Efecto dual (Turi <i>et al.</i>, 2008).                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• A través de los receptores muscarínicos tipo 2 (M2) reduce la secreción de GnRH.</li> <li>• A través de los tipo1 (M1) causa un incremento rápido y transitorio de GnRH.</li> </ul> </li> </ul>                                  |
| Opioides  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhiben la liberación de GnRH (Pimpinelli <i>et al.</i>, 2006).</li> </ul>  |

Continúa en la siguiente página .....

| Entradas hormonales, gliales y neurales de la neurona GNRH | Acción sobre la neurona GnRH  |
|--|---|
| Factor liberador de corticotropina                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Altera la frecuencia de disparo de las neuronas GnRHérgicas (Phumsatitpong &amp; Moenter, 2018):                             <ul style="list-style-type: none"> <li>● Estimulando el receptor tipo 1 (CRFR1) incrementa la frecuencia.</li> <li>● Estimulando el receptor tipo 2 (CRFR2) disminuye la frecuencia.</li> </ul> </li> </ul>   |
| Kisspeptina  | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Es el activador más potente de la excitabilidad de la neurona GnRH (Clarkson &amp; Herbison, 2006; Choe <i>et al.</i>, 2013).</li> <li>● Causa la liberación GnRH (Clarkson &amp; Herbison, 2006; Choe <i>et al.</i>, 2013).</li> </ul>  |
| Glía   | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Barrera física entre neurona GnRH con los tanacitos (Prevot <i>et al.</i>, 2010).                             <ul style="list-style-type: none"> <li>● Impide el contacto de la terminal del dendrón con la pared endodimial del tercer ventrículo.</li> </ul> </li> </ul>   |
| Hormonas esteroideas                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Estradiol (Witkin <i>et al.</i>, 1991; Prevot <i>et al.</i>, 2010).                             <ul style="list-style-type: none"> <li>● Causa la liberación de óxido nítrico que retrae el tanacito.</li> <li>● Incrementa la producción de la prostaglandina E2 (PGE2) facilitando la liberación de GnRH.</li> </ul> </li> <li>● Participan en la regulación de la intensidad del disparo, modifican la liberación de GnRH y la oscilación de Ca<sup>++</sup> (Kenealy <i>et al.</i>, 2011; Terasawa &amp; Kenealy, 2012; Phumsatitpong &amp; Moenter, 2018).</li> <li>● Progesterona (Plant &amp; Zeleznik, 2015).                             <ul style="list-style-type: none"> <li>● Modifica las corrientes de Ca<sup>++</sup> en la neurona GnRH.</li> </ul> </li> </ul> |

## Kisspeptina

La kisspeptina fue catalogada inicialmente como supresor de la metástasis tumoral, pero en 2003 se planteó la idea de que también participa en la reproducción, ya que la mutación del gen para el receptor a kisspeptina 1 (Kiss1R) induce hipogonadismo hipogonadotrópico en humanos y ratones (Steiner, 2013). En 2008 se propuso como un regulador del control reproductivo en el *First World Conference of Kisspeptin Signalling in the Brain* llevado a cabo en Córdoba, España (Uenoyama, Pheng, *et al.*, 2016). Posterior a esto, se ha mostrado que la ausencia del Kiss1R causa el retraso de la pubertad, que la kisspeptina participa en la secreción y el establecimiento del patrón cíclico de la liberación de GnRH, lo que es crucial para el inicio de la pubertad y el correcto funcionamiento del eje HHG en la etapa adulta (Kauff & Smith, 2013; Clarke *et al.*, 2015; Uenoyama, Pheng, *et al.*, 2016). También está relacionada con la desfeminización del cerebro de los machos durante la etapa embrionaria, ya que en ausencia de Kiss1R los machos presentan una pérdida de la conducta reproductiva masculina y, por el contrario, muestran conductas típicamente femeninas como la lordosis (Clarkson *et al.*, 2014). La kisspeptina es liberada por las neuronas kisspeptidérgicas que se han identificado en el cerebro de diferentes mamíferos, entre ellos la rata (Hassaneen *et al.*, 2016; Uenoyama, Pheng, *et al.*, 2016).

Las neuronas kisspeptidérgicas se encuentran en el hipotálamo dorsomedial, el ventromedial, el ARC, el núcleo del tracto solitario, la médula caudal ventrolateral y el área anteroventral periventricular (AVPV) (Brailoiu *et al.*, 2005; Pinilla *et al.*, 2012; Kinsey-Jones *et al.*, 2014). Las regiones que participan en el control reproductivo son el ARC y el AVPV (Ilustración 4) (Kauff & Editors, 2013; Hassaneen *et al.*, 2016; Uenoyama, Pheng, *et al.*, 2016). Se sabe que la región del área AVPV presenta dimorfismo sexual, ya que los machos tienen un menor número de neuronas kisspeptidérgicas que las hembras en diestro (Kauff & Editors, 2013; Marraudino *et al.*, 2017). En el caso de las ratas macho, se ha mostrado que el dimorfismo sexual se establece durante los primeros días de vida en respuesta al incremento de los andrógenos durante la etapa neonatal. Esta aseveración se fundamenta en que al

retirar los testículos el día del nacimiento se observa la feminización de la población de neuronas kisspeptidérgicas en AVPV (Homma *et al.*, 2009; Clarkson & Herbison, 2016). En las hembras se ha mostrado que son los estrógenos los que mantienen la población de neuronas kisspeptidérgicas ya que al administrar estradiol a hembras ovariectomizadas en etapa neonatal se produce el incremento en la población de neuronas kisspeptidérgicas del AVPV; sin embargo, la administración neonatal de andrógenos la disminuye (Kauffman *et al.*, 2007; Homma *et al.*, 2009).

En el macho adulto se ha mostrado que los andrógenos estimulan la actividad de las neuronas kisspeptidérgicas del área AVPV y suprimen la actividad de las neuronas del ARC, ambos efectos son mediados a través de los receptores a estrógenos y andrógenos (Smith *et al.*, 2005). Se sabe que la actividad de las neuronas kisspeptidérgicas del ARC en el macho es similar a la de las hembras ya que regula la liberación pulsátil de GnRH, pero la función de las neuronas kisspeptidérgicas del AVPV es menos clara (Smith *et al.*, 2005). Se sugiere que participan en el establecimiento del comportamiento reproductivo masculino causando un incremento en testosterona ante la presencia de hembras en estro (Watanabe *et al.*, 2020). En el caso de las hembras las neuronas kisspeptidérgicas presentes en AVPV son reguladas de forma positiva por los estrógenos provocando la liberación de la GnRH e induciendo la secreción del pico de LH (Smith *et al.*, 2006). Por otro lado, las neuronas kisspeptidérgicas presentes en el ARC son capaces de secretar dos péptidos, la neurokinina B y dinorfina, por lo que reciben el nombre de neuronas KNDy (Pinilla *et al.*, 2012). La secreción de kisspeptina de las neuronas KNDy es regulada de manera negativa por los estrógenos e influye en la pulsatilidad de GnRH (Li *et al.*, 2009; Kauff & Editors, 2013; Terasawa *et al.*, 2013); aunado a esto, la neurokinina B participa en la estimulación de GnRH (Wakabayashi *et al.*, 2010) y la dinorfina actúa como inhibidor de las neuronas kisspeptidérgicas del AVPV regulando la amplitud del pico de LH (Helena *et al.*, 2015). La activación de las neuronas kisspeptidérgicas del ARC no solo depende de estradiol también requiere la participación de progesterona, en especial la neuroprogesterona producida por los astrocitos es crucial para su activación (Micevych & Sinchak,

2008b; Herbison, 2020). Para que se pueda secretar la kisspeptina es necesario que se estimule la transcripción del gen que la produce.

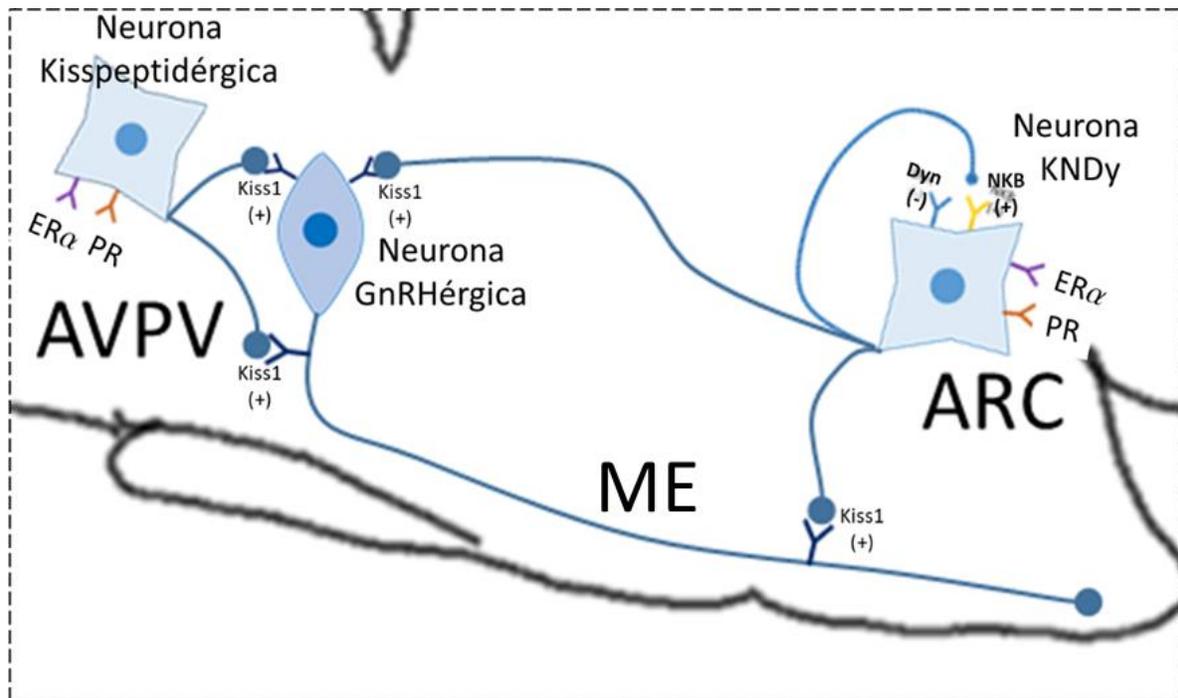


Ilustración 4. Distribución de las neuronas GnRHérgicas, kisspeptidérgicas y de tipo KNDy en el hipotálamo de la rata. También se muestran los receptores que posee cada tipo neuronal. Abreviaturas: AVPV: área anteroventral periventricular, ME: eminencia media, ARC: núcleo arcuato, ERα: receptor alfa de estrógenos, PR: receptor a progesterona, Kiss1: receptor a kisspeptina, Dyn: dinorfina, NKB: neurokinina B, KNDy: neuronas capaces de secretar kisspeptina, neurokinina B y dinorfina (Elaborado por Muñoz de la Torre).

El gen que transcribe la kisspeptina es el KISS1/kiss1 (Clarke *et al.*, 2015); en el humano el gen cuenta con 4 exones de los cuales los primeros dos son no codificantes y los últimos dos generan un péptido de 145aa (Clarke *et al.*, 2015). La maduración de este péptido dará lugar a la kisspeptina (de 54aa en humano y 52aa en el ratón) (Pinilla *et al.*, 2012); la cual puede ser reducida a péptidos de 14, 13 y 10 aminoácidos (Clarke *et al.*, 2015). La transcripción de kisspeptina aumenta ante la presencia de estradiol (Clarkson, 2013) y leptina (Castellano *et al.*, 2011; Clarke *et al.*, 2015) y es inhibida por la grelina (Forbes *et al.*, 2009). El receptor para la kisspeptina es el GPR54, actualmente catalogado como Kiss1R. Se trata de un receptor acoplado a una proteína de tipo Gq (Kauff & Editors, 2013; Clarke *et al.*, 2015), presente en diversas regiones como el páncreas, el tejido adiposo y diversas

áreas del sistema nervioso como las neuronas GnRH (Uenoyama *et al.*, 2011; Pinilla *et al.*, 2012; De Bond & Smith, 2014). La interacción entre las neuronas kisspeptidérgicas y GnRH varía de acuerdo con el sexo y la etapa de desarrollo del animal (Ferrini *et al.*, 2001; Steiner, 2013; Clarkson *et al.*, 2014), lo cual se refleja en los cambios observados en el eje HHG.

### **El eje HHG durante el desarrollo de la rata y diferencias entre sexos**

El eje HHG es el orquestador de los cambios en la dinámica reproductiva a través de las diferentes etapas de desarrollo de los mamíferos (Uenoyama *et al.*, 2015). El desarrollo de los animales, en específico de las ratas, está dividido en las siguientes etapas: neonatal, infantil, juvenil, puberal y adulto (McCutcheon & Marinelli, 2009). Cada etapa está caracterizada por diferentes eventos a nivel reproductivo (Tabla 2) y aunado a esto se ha descrito la presencia de dimorfismo sexual en el funcionamiento del eje HHG (Gottsch *et al.*, 2004; Clarkson & Herbison, 2006; Uenoyama, Pheng, *et al.*, 2016; Kaprara & Huhtaniemi, 2018). Las hembras tienen un mayor número de neuronas kisspeptidérgicas en el AVPV (Gottsch *et al.*, 2004; Clarkson & Herbison, 2006; Uenoyama, Pheng, *et al.*, 2016; Kaprara & Huhtaniemi, 2018) y durante la pubertad presentan un incremento mayor de kisspeptina y Kiss1R que el macho (Takumi *et al.*, 2011). Como se puede observar en la Tabla 2, en las primeras etapas de vida del animal se establece el dimorfismo sexual que permitirá la correcta activación del eje HHG al llegar a la pubertad, permitiendo que el animal pueda reproducirse en la vida adulta; pero cuando alguna de las partes del eje presenta alteraciones se desarrollan diferentes tipos de enfermedades que dificultan o impiden la reproducción (Plant & Zeleznik, 2015).

Tabla 2. Cambios observados en el eje HHG en las diferentes etapas de desarrollo de los animales.

| Etapas de desarrollo | Edad (días de nacido) | Características del eje HHG   |   |
|----------------------|-----------------------|---|---|
| Neonatal             | 0-7                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Disminución en la concentración de las hormonas esteroideas (Mayer <i>et al.</i>, 2010; Terasawa <i>et al.</i>, 2013).</li> <li>La secreción de GnRH se mantiene de forma basal dejando así al sistema reproductor en pausa (Terasawa <i>et al.</i>, 2013; Plant &amp; Zeleznik, 2015).</li> </ul> <p>♂ <b>primeros días de nacido</b><br/>Las neuronas GnRH aumentan la testosterona activando las neuronas kisspeptidérgicas en AVPV para iniciar la diferenciación sexual del cerebro (Clarkson <i>et al.</i>, 2014).</p> | <p>♀ <b>primeros días de nacido</b><br/>Inicia el proceso de ensamblaje folicular; formando la reserva folicular del ovario (McGee &amp; Hsueh, 2000; Pepling, 2012; Smith <i>et al.</i>, 2014).</p>                                  |
| Infantil             | 7-21                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>El eje HHG sigue en pausa.</li> </ul>  | <p>♀<br/>En el ovario inicia el proceso de reclutamiento inicial de los folículos los cuales no se ovulan y sufren de atresia (el proceso por el cual se degeneran), disminuyendo la reserva folicular (McGee &amp; Hsueh, 2000).</p> |
| Juvenil              | 21-púber              | <ul style="list-style-type: none"> <li>El eje HHG sigue en pausa</li> </ul>   | <p>♀<br/>En el ovario se mantiene el proceso de reclutamiento inicial (McGee &amp; Hsueh, 2000).</p>  |

Continua en la siguiente página .....

| Etapa de desarrollo | Edad (días de nacido)                                   | Características del eje HHG  |   |
|---------------------|---|--|---|
| Púber               | ♀<br>32-34  | <p>♂</p> <p>Incremento en las concentraciones de testosterona.</p> <p>Inicio del ciclo de producción espermática (Lewis <i>et al.</i>, 2002).</p>  | <p>♀</p> <p>Incremento en las concentraciones del estradiol.</p> <p>Incremento en la liberación de LH y de la GnRH (Mayer <i>et al.</i>, 2010; Terasawa <i>et al.</i>, 2013).</p>   |
|                     | ♂<br>45-48  | <p>En el día 30 podemos observar que los testículos completaron es descenso al escroto (Pham <i>et al.</i>, 2005).</p> <p>La separación prepucial ocurre aproximadamente al día 39, indicando la presencia de espermatozoides motiles y el incremento de andrógenos circulantes (Korenbrot <i>et al.</i>, 1977).</p> | <p>Presencia de apertura vaginal, signo físico que indica la activación del eje HHG</p> <p>Establecimiento del ciclo estral (Westwood, 2008; Paccola <i>et al.</i>, 2013):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Duración de 4-5 días: estro, diestro 1, diestro 2 y proestro;</li> <li>algunas veces hay duplicación de una fase.</li> <li>-Depende de las fluctuaciones hormonales cíclicas causadas por el ciclo ovárico.</li> </ul> |
| Adulto              | <p>♀<br/>63 en adelante</p> <p>♂<br/>70 en adelante</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en el número de espinas dendríticas de las neuronas GnRH (Li <i>et al.</i>, 2009).</li> </ul>  |   |

Continua en la siguiente página .....

| Etapa de desarrollo | Edad (días de nacido)       | Características del eje HHG   |  |
|---------------------|-----------------------------|---|--|
| Adulto              | <p>♀<br/>63 en adelante</p> |   | <p>♀</p> <p>Presentan ciclos estrales regulares (McCutcheon &amp; Marinelli, 2009).<br/>Liberación de GnRH en forma pulsátil equivalente a la liberación pulsátil de la LH (Plant, 2015; Uenoyama, Pheng, <i>et al.</i>, 2016).</p>  |
|                     | <p>♂<br/>70 en adelante</p> | <p>♂</p> <p>Presenta conducta sexual Los espermatozoides ya presentan motilidad (McCutcheon &amp; Marinelli, 2009).</p> | <p>Durante el proestro:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Aumento de la sensibilidad del gonadotropo.</li> <li>-Liberación masiva de LH</li> <li>-Incremento en la expresión de los receptores a GnRH (Herbison, 2016).</li> <li>-Los folículos preovulatorios incrementan la síntesis y secreción de estradiol</li> <li>-Incremento de la transcripción de la subunidad β de la LH (Herbison &amp; Pape, 2001).</li> <li>-Incremento de la transcripción de la subunidad β de la FSH que persiste durante la mañana del estro (Thompson &amp; Kaiser, 2014; Stamatiades &amp; Kaiser, 2018).</li> </ul> |

Continúa en la siguiente página .....

| Etapa de desarrollo | Edad                      | Características del eje HHG  |   |
|---------------------|---------------------------|--|---|
| Adulto              | ♂                         | ♂  | ♀   |
|                     | ♀<br>6 meses en adelante  | <p>Adulto mayor:</p> <p>Aumento en la actividad en la sintetasa del óxido nítrico en el hipotálamo que aumenta el óxido nítrico lo que provoca la muerte de las neuronas GnRH y de oxitocina alterando así la función reproductiva, lo que a su vez causa una disminución en la testosterona sérica, hipoespermatogénesis y una disminución en la función copulatoria (Ferrini <i>et al.</i>, 2001).</p> | <p>Adulto mayor:</p> <p>Pérdida del ciclo estral a los 12-18 meses</p> <p>-Varía según la cepa Sprague-Dawley 6-12 meses (D'Albora <i>et al.</i>, 2000).</p> <p>Pérdida de la reserva folicular y disminución en la producción de hormonas esteroideas (McGee &amp; Hsueh, 2000).</p> |
|                     | ♂<br>24 meses en adelante |  |   |

### Alteraciones del eje HHG

Los problemas reproductivos surgen a raíz de alguna alteración en el eje HHG que surge en cualquier etapa del desarrollo, ejemplo de esto una migración incompleta de las neuronas GnRH y la alteración en la secreción de hormonas por parte del eje HHG. Se ha reportado que durante el desarrollo embrionario de ovejas, el incremento de testosterona causa hipertrofia de las neuronas KNDy reduciendo las salidas neuronales al área preóptica y el hipotálamo medio basal, alterando la secreción de GnRH y con ello disminuyendo la fertilidad (Cernea *et al.*, 2015). En el caso de las ratas hembra neonatas, la administración de estrógenos causa disminución en el número de neuronas kisspeptidérgicas en AVPV y disminuye la liberación de LH en la etapa adulta (Usuda *et al.*, 2014). Por otro lado, en ratas neonatales la orquidectomía resulta en la feminización de la expresión del gen KISS1/kiss1 en AVPV, mientras que en hembras la castración neonatal resulta en la masculinización en la expresión de neuronas kisspeptidérgicas en AVPV

(Uenoyama, Tomikawa, *et al.*, 2016). La presencia de hormonas sexuales esteroideas circulantes durante estadios embrionarios o postnatales es importante para la diferenciación sexual y el correcto establecimiento del eje HHG, siendo así la primera ventana donde se establece el funcionamiento del eje HHG.

La segunda ventana es en la etapa púber ya que los cambios hormonales modifican el funcionamiento del eje HHG. En las hembras púberes expuestas a altas concentraciones de andrógenos disminuye la expresión del ARNm de kisspeptina en AVPV en la etapa adulta en comparación con las ratas sin exposición a andrógenos, siendo similar a lo secretado por los machos (Gottsch *et al.*, 2004; Clarkson & Herbison, 2006; Kaprara & Huhtaniemi, 2018). Por otro lado, en hembras de 26 días la administración intracerebroventricular diaria de kisspeptina por 6 días causó que la apertura vaginal ocurriera 3-5 días antes que los animales control (Navarro *et al.*, 2004), y al administrar el antagonista 234 a kisspeptina provocó el retraso en la edad de apertura vaginal (Millar *et al.*, 2010). Lo anterior apoya la idea de que la kisspeptina juega un rol importante en el establecimiento de la pubertad. Pero no solo los cambios hormonales pueden desencadenar alteraciones del eje HHG, también algunas enfermedades afectan el eje HHG.

En el caso de ratones con hipogonadismo hipogonadotrópico se ha mostrado la disminución en la secreción de GnRH, de esteroides y del número de neuronas kisspeptidérgicas en AVPV respecto al control (Clarke *et al.*, 2015). En el caso de los humanos enfermedades, como el síndrome de CHARGE, cuyo nombre es el acrónimo de los signos coloboma ocular, cardiopatía, atresia de las coanas, retraso de crecimiento y/o desarrollo, hipoplasia genital, anomalías del pabellón auricular y/o sordera (Layman *et al.*, 2011) y el síndrome de Kallman (Hardelin, 2001), se caracterizan por la alteración en el proceso de migración y la secreción de las neuronas GnRHérgicas que lleva a problemas en la secreción de GnRH y el retraso del establecimiento de la pubertad (Hardelin, 2001; Layman *et al.*, 2011). Además, se ha reportado en pacientes con enfermedades desmielinizantes como la MS, la presencia de problemas reproductivos e incluso infertilidad (Merghati-Khoei *et al.*, 2013). Debido a que la MS puede surgir a cualquier edad se han realizado

revisiones de reportes de casos los cuales reportan que la menarca aparece de forma normal en mujeres que se diagnosticaron con MS antes de los 18 años (Merghati-Khoei *et al.*, 2013; Waubant, 2018). Por otro lado, se ha reportado que en el caso del surgimiento de la MS en etapa adulta, las mujeres con menarca temprana y antecedentes familiares con MS son más susceptibles a desarrollarla (Waubant, 2018). Hasta ahora, no se han encontrado diferencias en el establecimiento de la pubertad de los hombres con MS respecto a los sanos (Waubant, 2018); tampoco se han identificado las alteraciones del eje HHG a nivel central en estos pacientes.

### Desmielinización y problemas reproductivos

La desmielinización es la pérdida parcial o total de la mielina del sistema nervioso central o periférico; este proceso se produce de manera normal durante el establecimiento de rutas de comunicación del sistema nervioso, pero también puede surgir como un proceso derivado de alguna enfermedad o lesión (Brinkmeyer-Langford *et al.*, 2018; Dennis & Valentine, 2018). La desmielinización es afectada por la presencia de las hormonas esteroideas. Ejemplo de esto es que ante las altas concentraciones de cortisol durante el desarrollo fetal y postnatal se reduce la mielinización (Bohn & Friedrich, 1982; Hirst *et al.*, 2016). Por otro lado, en ratas adultas, los glucocorticoides disminuyen el avance del proceso desmielinizante causado por la inflamación (Sugimura *et al.*, 2005).

En el caso de los esteroides sexuales se ha mostrado que son factores que estimulan la formación de la mielina y evitan su daño ya que disminuyen la actividad inflamatoria y actúan como neuroprotectores (Miller, 2002; Ghoumari *et al.*, 2003; Marin-Husstege *et al.*, 2004; Spence *et al.*, 2011; Spence & Voskuhl, 2012; Roved *et al.*, 2017; Avila *et al.*, 2018). La progesterona, la testosterona y el estradiol, controlan el avance de la desmielinización patológica y se han usado como tratamiento para diversas enfermedades desmielinizantes (Goodin, 2014; Voskuhl *et al.*, 2016; Ghoumari *et al.*, 2020).

El origen de las enfermedades desmielinizantes es idiopático ya que puede ser derivado de una infección viral, de trastornos metabólicos adquiridos, de procesos de isquemia-hipoxia, de presión focal y por procesos inflamatorios (Love, 2006). Una de las enfermedades desmielinizantes más comunes es la MS. Esta enfermedad se presenta en el 70% de los casos entre los 20 y 40 años, con una prevalencia del 75% en las mujeres y 25% en los hombres (Sanders *et al.*, 2000; Toro, 2000; Rowan, 2002). Se han reportado 2.3 millones de enfermos con MS en el mundo y existen unos 20 mil casos en México (Salud, 2016). Cada paciente tiene un curso diferente y por sus características se puede clasificar en: recaída-remisión, primaria-progresiva, secundaria-progresiva y progresiva-recaída (Rowan, 2002); debido a los diferentes cursos que puede tomar la enfermedad se presentan una gran variedad de síntomas.

De forma general los síntomas de la MS son visión borrosa o doble, distorsión en la percepción del color rojo-verde o incluso ceguera de un ojo, neuritis óptica, debilidad muscular en las extremidades, dificultad al coordinar la marcha, pérdida del equilibrio, espasticidad (aumento involuntario del tono muscular que lleva a la rigidez y espasmos), fatiga y parestesia (tener sensaciones sensoriales anormales y transitorias) (Rowan, 2002). Conforme la enfermedad avanza se pueden presentar temblores, ataxia y un incremento en las anormalidades cognitivas (Toro, 2000; Rowan, 2002).

Los pacientes con MS progresiva tienen hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Wei & Lightman, 1997), mayores concentraciones de cortisol (Bergh *et al.*, 1999) e incremento en el tamaño de las adrenales (Reder *et al.*, 1994). En el caso de los pacientes con MS de tipo recaída-remisión Heidbrink y colaboradores mostró que tienen concentraciones de cortisol bajas en comparación de pacientes que presentan enfermedades neurológicas no inflamatorias y con respecto a personas sanas. Además, reporta que durante la etapa de remisión la concentración de cortisol es más alta en el líquido cefalorraquídeo que en aquellos pacientes que cursan la fase aguda o una recaída de la MS (Heidbrink *et al.*, 2010). La concentración baja de cortisol presentes en los pacientes con MS llevarían a que la

actividad neuroprotectora y antiinflamatoria sea menor, además de que facilitan la aparición del evento agudo o recaída de la MS. Para mediar estos efectos se ha planteado el uso de glucocorticoides sintéticos como la metilprednisolona en dosis altas (500-2000 mg), ya que dosis menores son ineficientes posiblemente a la inactivación de la enzima 11BHS12, previniendo la aparición de insultos inflamatorios (Heidbrink *et al.*, 2010). También, se ha reportado un incremento en la expresión de genes involucrados en la remielinización y en el efecto protector contra el estrés oxidativo en el cerebro de cadáveres de pacientes femeninos de MS con altos niveles de cortisol y sin daño en la materia blanca (Melief *et al.*, 2019). En pacientes con MS que fueron tratados durante 5 años con metilprednisolona intravenosa (dosis 1000mg/día, 5 días cada 4-6 meses) se observó la reducción del volumen de los espacios negros o daño observado en las imágenes de resonancia magnética en T1 así como la disminución de la atrofia cerebral (Goodin, 2014). Ante dichas evidencias es posible inferir que la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) está asociada con cambios en las vías moleculares que afectan el desarrollo de la MS y que una terapia con glucocorticoides bien controlada ayudaría a reducir los daños causados por la desmielinización.

Aunado a lo anterior, se ha reportado la presencia de problemas reproductivos y alteración en el funcionamiento del eje HHG. En el caso de los hombres que padecen MS, se reporta un decremento de la concentración de testosterona así como hipogonadismo (Pakpoor *et al.*, 2014; Glazer *et al.*, 2018); entre un 50-90% de los pacientes con MS presenta disfunción sexual (Sanders *et al.*, 2000; Foley & Beier, 2006), aunado a esto se ha reportado que la sintomatología de la MS es más grave en hombres en comparación con la observada en las mujeres (Tomassini, 2005). Sin embargo, la tasa de estos signos no se ha podido establecer ya que hay diferencia en la prevalencia en los diferentes estudios (Bove *et al.*, 2014; Diaconu *et al.*, 2022). A nivel reproductivo se ha mostrado que no hay alteración del volumen seminal, del conteo espermático total, ni de la movilidad espermática en pacientes con MS de tipo recaída-remisión comparado con hombres sanos, y tampoco observan cambios a lo largo de 12 meses (D'Amico *et al.*, 2020). No obstante, los resultados de este estudio podrían no ser concluyentes, de hecho los autores

(D'Amico *et al.*, 2020) sugieren incrementar la muestra ya que contaron con una población de 38 pacientes.

Entre el 40-85% de las mujeres que padecen MS presentan disfunciones sexuales (Sanders *et al.*, 2000; Foley & Beier, 2006) como ausencia de orgasmos (Çelik *et al.*, 2013; Merghati-Khoei *et al.*, 2013), por lo que hay insatisfacción sexual causada por problemas físicos como la insensibilidad y el agotamiento físico. Además, presentan irregularidad menstrual, infertilidad, baja concentración de la hormona anti-Mülleriana y de estrógenos, alta concentración de LH y FSH, baja población de folículos antrales y poca reserva folicular, con una calidad deficiente de los ovocitos, que conduce a menor volumen ovárico (Cavalla *et al.*, 2006; Sepúlveda *et al.*, 2016). En otros casos la alta actividad de la hormona corticotropa se ha asociado con la presencia del síndrome de ovario poliquístico en mujeres con MS (Cavalla *et al.*, 2006). Aproximadamente el 20% de las mujeres con MS presentan oligo-amenorrea y signos clínicos de hiperandrogenismo, como la piel grasa, el hirsutismo y el acné (Falaschi *et al.*, 2001). En mujeres postmenopáusicas con MS se ha reportado exacerbación de los síntomas de la enfermedad, lo cual se ha relacionado con la disminución en las concentraciones de estrógenos que caracteriza a esta etapa de la vida (Bove *et al.*, 2015).

Los reportes de problemas reproductivos son mucho mayores en mujeres que hombres, posiblemente debido a que la prevalencia es mayor en la mujer (Toro, 2000; Rowan, 2002), por lo que son ellas las que han optado por someterse a tratamientos hormonales de fertilidad, que constan en la administración de agonistas de GnRH, FSH recombinante y progesterona, los cuales han resultado en el incremento de la sintomatología relacionada con el control motor (Correale *et al.*, 2012; Bove *et al.*, 2020). Por ello es necesario determinar tratamientos de fertilidad específicos para este tipo de pacientes y así reducir ese tipo de efectos secundarios, pero esto resulta complicado ya que hay muy poca información sobre las alteraciones causadas por la desmielinización en el eje HHG.

## Análisis de las alteraciones del eje HHG por desmielinización

Para poder comprender las alteraciones del eje reproductivo derivadas de la desmielinización es importante contar con modelos animales que presenten desmielinización; uno de éstos es el modelo de encefalomiелitis alérgica experimental o EAE (Constantinescu *et al.*, 2011). En este modelo la desmielinización es causada por una reacción inmune ante la administración de péptidos que dependiendo del área tratada desencadena un cuadro agudo, crónico o progresivo de la enfermedad (Link & Xiao, 2001). Se ha reportado que el retiro abrupto de la dexametasona agrava los signos clínicos, pero al realizar un retiro paulatino de los glucocorticoides, se previenen las recaídas (Sugimura *et al.*, 2005). En este modelo animal se ha identificado que los machos tienen la regulación a la baja de los niveles de ARNm de GnRH e incremento en la síntesis de progesterona; en tanto que en la hembra existe una regulación a la baja de los niveles de ARNm de kisspeptina e incremento en la síntesis de progesterona (Milosevic *et al.*, 2020). Considerando que las enfermedades desmielinizantes son idiopáticas, es necesario determinar si las alteraciones se presentan de la misma forma en otro tipo de modelos de desmielinización como la rata *taiep*.

## Rata *taiep*

Esta rata es una mutación espontánea que surgió en la generación F5 durante la obtención de una rata con una alta frecuencia de bostezo espontáneo denominada HY (del inglés *High-Yawning*) a partir de la cepa Sprague-Dawley (SD). La rata *taiep* fue desarrollada en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en 1989 (Holmgren *et al.*, 1989). El nombre *taiep* es el acrónimo de los diversos síntomas motores que presenta, temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis de las extremidades posteriores (Holmgren *et al.*, 1989; Eguibar & Cortes, 2010). Los individuos presentan hipomielinización inicial seguida de una desmielinización progresiva del sistema nervioso central, reportándose, a los 12 meses la pérdida de mielina en regiones rostrales del sistema nervioso central y en la médula espinal (Duncan *et al.*, 1992; Couve *et al.*, 1997). A nivel de los oligodendrocitos se observa

la acumulación de los microtúbulos lo cual causa problemas en el transporte de proteínas formadoras de la mielina, desde el retículo endoplásmico hacia la porción Cis del aparato de Golgi (Couve *et al.*, 1997; O'Connor *et al.*, 2000). Se conoce que esta rata tiene una mutación en el cromosoma 9 (Li *et al.*, 2003), específicamente en el gen *Tubb4a* en la Ala302Thr, la cual se encarga de codificar la  $\beta$ -tubulina y que al ser modificada causa alteraciones en el proceso de la mielinización (Duncan *et al.*, 2017). Resulta interesante que aún con las alteraciones en la mielinización la rata *taiep* llega a tener una supervivencia de más de 2 años, bajo los cuidados adecuados (Duncan *et al.*, 2017).

Las alteraciones en la formación de la mielina en la rata *taiep* generan un cambio en las propiedades eléctricas de las neuronas y de la transmisión sináptica en la médula espinal en el período postnatal durante los primeros 10 días (Fuenzalida *et al.*, 2004). También se ha visto que presentan una respuesta inmadura de reflejo monosináptico en la segunda semana postnatal, que puede deberse a una disrupción en la interacción entre la glía y las neuronas que es necesaria para mantener una correcta función sináptica (Bonansco *et al.*, 2004; Fuenzalida *et al.*, 2004). En el hipocampo, se ha visto la existencia de una transmisión asincrónica por una disfunción en los mecanismos de liberación de glutamato, que lleva a una disfunción no inmune de los oligodendrocitos y pérdida de la mielina; estas características se incrementan con la edad (Fuenzalida *et al.*, 2009; Wilkins *et al.*, 2010). Se ha reportado un aumento en el precursor de proteína amiloide en la sustancia blanca, lo que provoca anomalías del transporte axonal y una pérdida de la mielina en el nervio óptico, alterando así la morfología del potencial de acción compuesto y disminuyendo la velocidad de conducción en condiciones *in vitro* (Roncagliolo *et al.*, 2006; Wilkins *et al.*, 2010).

Además de los cambios estructurales que modifican la expresión de la mielina, existe una disminución de receptores metabotrópicos a glutamato tipo 2 y 3 en el hipocampo (Eguibar *et al.*, 2014) y un aumento a citocinas en diferentes estructuras del sistema nervioso central como el tronco encefálico, el cerebelo y la corteza cerebral (Soto-Rodriguez *et al.*, 2015). Acompañado de una menor expresión de las

citocinas CXCL1 y CCL2 durante el proceso de desmielinización, contribuyendo así a la disminución de la mielinización por parte de las células precursoras de oligodendrocitos, de manera similar a lo observado en pacientes con MS (Eguibar *et al.*, 2014). También tienen menor expresión de CCL5, que contribuye a la disminución en la comunicación entre el axón y la glía, esto es posiblemente responsable de la desmielinización de ciertas áreas del sistema nervioso central de la rata *taiep* (Eguibar *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015). Por su sintomatología y características, la rata *taiep* representa un importante modelo experimental. En el año 2005, Foot y Blakemore la propusieron como un modelo animal de enfermedades desmielinizantes (Foote & Blakemore, 2005b, 2005a; Eguibar & Cortes, 2010).

A nivel reproductivo se sabe que ambos sexos son fértiles, pero poseen una tasa de reproducción baja y una alta mortalidad postnatal (Holmgren *et al.*, 1989). La hembra *taiep* presenta una disminución en la población folicular a los 30 días de edad, quistes foliculares a los 90 días, alteración de la secreción de hormonas esteroideas y disminución en la presencia de fibras noradrenérgicas ováricas a los 30 y 90 días de edad (Muñoz-de-la-Torre *et al.*, 2018). En los machos se ha observado que a partir de los 6 meses tienen dificultad para llevar a cabo la cópula (Holmgren *et al.*, 1989) pero no se ha profundizado en el análisis de las alteraciones reproductivas. Las alteraciones observadas en machos y hembras sugieren que las estructuras que regulan la correcta función del eje HHG están alteradas por el proceso de desmielinización.

## Planteamiento del problema

Debido a las alteraciones reproductivas reportadas en pacientes de ambos sexos con enfermedades desmielinizantes y al desconocimiento de las alteraciones en el eje HHG en diferentes modelos de desmielinización, en el presente estudio utilizamos a la rata *taiep* para caracterizar las alteraciones del eje HHG derivadas de la desmielinización, en individuos de uno y otro sexo. Esta aproximación nos permitirá entender cómo las enfermedades desmielinizantes merman la función reproductiva y aportará información a tomar en cuenta en la implementación de terapias que mejoren la calidad de vida de los pacientes con enfermedades desmielinizantes.

Por lo anterior, se caracterizó en ambos sexos las concentraciones séricas de LH, la expresión de GnRH, kisspeptina y del receptor Kiss1R en el hipotálamo. De igual forma, se midió la concentración sérica de testosterona, se realizó el análisis espermático y el análisis de la morfología de los túbulos seminíferos para profundizar más en las alteraciones reproductivas de los machos *taiep*.

## Hipótesis

- La rata *taiep* presenta desmielinización progresiva del sistema nervioso central por lo que posiblemente encontraremos desmielinización en las regiones del AVPV, ARC y ME.
- Debido a los signos derivados de la desmielinización en la rata *taiep* es posible que se dé un incremento del estrés del animal el cual causará el aumento en el tamaño de las adrenales llevando a la disminución del peso del animal.
- Las alteraciones reproductivas en la rata *taiep* podrían derivarse de cambios en el eje HHG como la disminución en la expresión de kisspeptina, GnRH y del receptor Kiss1R; así como la disminución de las concentraciones séricas de LH; que podrían asociarse a el proceso desmielinizante.
- El macho *taiep* presenta niveles bajos de testosterona sérica, alteraciones a nivel testicular y espermático lo cual podría influir en la capacidad reproductiva.

## Objetivo general

Para profundizar el conocimiento de las alteraciones en el eje HHG causadas por las enfermedades desmielinizantes se caracterizó en las ratas *taiep* de ambos sexos, las alteraciones en el peso corporal, el peso de los órganos reproductivos, cerebro y adrenales, además la expresión hipotalámica de GnRH, kisspeptina y de Kiss1R, así como la secreción de LH. Aunado a esto en las ratas *taiep* hembras se caracterizó la respuesta ovulatoria y en los machos se caracterizó la secreción de testosterona a nivel sérico, la histología testicular y los parámetros espermáticos.

## Objetivos particulares

1. Analizar la presencia de mielina en el cerebro de las ratas *taiep*.
2. Analizar el peso corporal, el peso del cerebro, hipófisis, adrenales y órganos reproductivos.
3. Analizar en las hembras a lo largo del ciclo estral:
  - a. La expresión de kisspeptina en ARC y AVPV.
  - b. La expresión de GnRH en la ME y AVPV.
  - c. La expresión del receptor Kiss1R en la ME y AVPV.
  - d. Las concentraciones séricas de LH.
  - e. Analizar la cantidad de ovocitos ovulados y el porcentaje de animales ovulantes.
4. Analizar en machos:
  - a. La expresión de kisspeptina en ARC y AVPV.
  - b. La expresión de GnRH en la ME y AVPV.
  - c. La expresión del receptor Kiss1R en la ME y AVPV.
  - d. Los cambios en las concentraciones séricas de LH y testosterona.
  - e. Los cambios en la morfología de los túbulos seminíferos.
  - f. Las alteraciones en los parámetros espermáticos en la etapa adulta de los animales.

## Metodología

Se usaron 30 ratas *taiep* y como control se usaron 30 ratas SD; los machos se recibieron de 90 días y las hembras de 75 días. Para determinar la expresión de kisspeptina, GnRH y Kiss1R, se usaron de cada cepa 6 machos y 18 hembras; de las cuales se usaron 6 animales en cada etapa del ciclo estral: estro, diestro, proestro temprano (E, D, P respectivamente). Aunado a esto se usaron 3 animales hembra y 3 machos de 90 días de cada cepa para determinar la expresión de mielina.

## Sacrificio de los animales

El grupo de machos fue sacrificado en el día 90 de edad. En el caso de las hembras las ratas se sacrificaron a los  $90 \pm 3$  días de edad, en alguna de las etapas del ciclo estral (E, D, P). Cada fase fue identificada usando una muestra del epitelio vaginal tomada entre las 9-10 am (Marcondes *et al.*, 2002; Paccola *et al.*, 2013), tomando muestras por al menos 12 días para determinar la ciclicidad del animal antes del sacrificio. En el presente estudio, solamente se utilizaron hembras en proestro temprano debido a que la obtención de animales se complicó como consecuencia de la crisis de salud por COVID-19 surgida en los años recientes.

Los animales se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico (63 mg/mL; dosis normal 20 U.I./100 g peso corporal). Se colectó la sangre por punción cardíaca, dejándola coagular durante 30 minutos, posteriormente se retiró el coágulo y lo restante se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos (centrífuga VELAB, VE-4000). Se separó el suero en alícuotas de 200  $\mu$ L y se almacenó a -20°C hasta el momento de la cuantificación de hormonas.

Se disectaron el cerebro, los ovarios, el útero, los testículos, vesículas seminales, el epidídimo y las adrenales, los cuales se pesaron en fresco (sin grasa visceral) en una balanza analítica (OHAUS, AS120); cada órgano fue pesado una sola vez. El cerebro, los ovarios y los testículos se fijaron usando Buffer Neutral de Formaldehído (BNF) al 10% (BNF10%) para posteriormente ser incluidos en parafina.

## DetECCIÓN DE MIELINA EN CEREBRO

Los cerebros fueron fijados por inmersión en BNF10% por 18-24 h, e incluidos en parafina; fueron cortados en un microtomo a un grosor de 10  $\mu\text{m}$  y colocados en láminas gelatinizadas. Se eliminó la parafina de los cortes usando 2 baños de xilol, alcohol 100%, 96%, 80%, 50% y agua. Posteriormente se siguieron los pasos descritos en la técnica de Woelcke (Carpentier *et al.*, 2012), que consiste en colocar los tejidos desparafinados en una solución de sulfato férrico amónico al 2.5% durante 16-18 h. Después se colocaron en hematoxilina por 1.5-2 h. Para realizar el aclarado de los cortes se colocaron en alcohol 80% hasta que se perdiera el exceso de tinción; una vez aclarados se procedió a realizar la deshidratación mediante 2 baños de alcohol 96%, 100% y xilol para finalmente colocar el medio de montaje y el cubreobjetos. Para evitar la diferencia en color entre los tejidos de las ratas *taiep* y SD las muestras de ambas cepas se tiñeron a la par. Posteriormente se tomaron fotos de los cortes usando un microscopio Zeiss Primo Star Pack 1 con una cámara Moticam 3.0MP, todas las imágenes se guardaron en formato TIFF.

## INMUNOFLUORESCENCIA

La obtención del tejido se hizo siguiendo la metodología de acuerdo con Salehi, 2013; los tejidos fueron fijados por inmersión en BNF 10% de 18-24 hrs., e incluidos en parafina. Empleando un microtomo se realizaron 16 cortes coronales de 10  $\mu\text{m}$  por animal, 8 del AVPV y 8 del ARC-ME; la identificación de las estructuras se realizó de acuerdo con el atlas de Paxinos & Watson (Paxinos & Watson, 1998). Los cortes seleccionados para AVPV se localizan entre las regiones bregma -0.26 a -0.40 y para ARC-ME se localizan entre bregma -2.12 a -3.30 mm. Todos los cortes fueron colocados en láminas gelatinizadas y permanecieron toda la noche en el horno de secado a 37°C, a la mañana siguiente fueron desparafinados.

La recuperación antigénica se realizó usando buffer de citrato (10mM ácido cítrico, 0.05% Tween 20, pH 6; 92°C) por 30 minutos. Después se procedió a realizar el bloqueo colocando los cortes en una solución de caseína 0.25% durante 2 horas. Se incubó durante 24 hrs con los anticuerpos diluidos en buffer salino de fosfatos

(PBS, Tabla 3) a 4°C en una cámara húmeda en la oscuridad, posteriormente fueron montados con medio de montaje (Micromount Leica Biosystem).

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia.

| Anticuerpo   | Dilución | #Catalogo/Marca                        |
|--|----------|--|
| KISS1 receptor Polyclonal Antibody, Cy3 Conjugated               | 1:150    | bs-2501R-Cy3 / Bioss Antibodies Inc.   |
| Kisspeptin Polyclonal Antibody, Cy5 Conjugated                   | 1:150    | bs-0749R-Cy5 / Bioss Antibodies Inc.   |
| Gonadoliberin 1 Polyclonal Antibody, ALEXA FLUOR® 488 Conjugated | 1:150    | bs-10369R-A488 / Bioss Antibodies Inc. |

### Adquisición y análisis de las imágenes de inmunofluorescencia

Para la adquisición de las imágenes se realizó microscopia de fluorescencia confocal utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM5 PASCAL, usando el objetivo plan-neofluar 40x/1.3 oil. La configuración de las líneas láser y los filtros de emisión se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4. Configuración de líneas láser y filtros de emisión.

| Fluorocromo     | Línea láser | Filtro de emisión |
|-----------------|-------------|-------------------|
| Alexa fluor 488 | 488 nm      | 530 nm            |
| Cy3             | 514 nm      | 560 nm            |
| Cy5             | 633 nm      | 650 nm            |

Las imágenes fueron capturadas usando el Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510: el color rojo se usó para kisspeptina, el verde para GnRH y el amarillo para Kiss1R. Todas las imágenes se guardaron en formato TIFF y se exportaron con el programa LSM Image Browser versión 3.4.0.359. En total se evaluaron 768 cortes coronales (384 cortes por área, 96 cortes por cepa, 48 cortes por grupo),

obteniendo un total de 3040 imágenes (1520 cortes por área, 380 cortes por cepa, 190 cortes por grupo).

Se determinó la intensidad de fluorescencia, la cual en este trabajo es considerada como una aproximación de la cantidad de péptido (kisspeptina, GnRH o Kiss1R) disponible en los cuerpos celulares o fibras de la muestra, esto debido a que los anticuerpos están diseñados para unirse a una señal específica. Se usó la herramienta histograma de color del software ImageJ 1.50i (NIH, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) para obtener el valor medio de color el cual representa la intensidad de fluorescencia. Se determinó la presencia de color o fluorescencia en las imágenes control negativo para que fuera el valor de línea de base o ausencia de fluorescencia. Los cuerpos celulares inmunorreactivos (IRcb) y las fibras que se consideraron presentaban una marca positiva del anticuerpo son aquellas que presentaban una media de color mayor a la línea base. Para el caso de la intensidad de fluorescencia de IRcb a kisspeptina se evaluaron en total 720 IRcb, 480 en ARC y 240 en AVPV de 48 rebanadas por grupo analizado. Para el caso de la intensidad de fluorescencia de las fibras GnRH en la EM se realizó la selección de un área de 1000px siguiendo la periferia de la estructura fluorescente, se analizaron un total de 240 áreas tomadas al azar en 48 rebanadas por grupo analizado.

Solo para el caso del kisspeptina, se realizó el conteo de IRcb en las imágenes obtenidas del AVPV y ARC. El conteo se realizó de forma manual, solo se contaron los IRcb que poseían una forma definida ovalada cuya intensidad de fluorescencia fuera mayor a la determinada por el control negativo y que se encontraran dentro del área de 50000  $\mu\text{m}^2$  establecida dentro de los límites de la región analizada de acuerdo con el atlas de Paxinos & Watson (1998). Se realizó el análisis del dimorfismo sexual del número de IRcb a kisspeptina, para lo que se compararon los machos con las hembras en diestro, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Clarkson & Herbison, 2006; Takumi *et al.*, 2011; Overgaard *et al.*, 2013; Marraudino *et al.*, 2017).

## ELISA

Las concentraciones séricas de LH (ng/mL) y testosterona (ng/mL) fueron cuantificadas mediante la técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA; Tabla 5).

La cantidad de suero utilizado fue de acuerdo con las indicaciones del fabricante (100 $\mu$ L por muestra). Se colocaron los estándares, el control y las muestras en la microplaca, posteriormente de acuerdo a las indicaciones del fabricante se colocaron el conjugado enzimático, la solución substrato y la solución de paro. Se procedió a leer la placa en el lector de microplacas para absorbancia (Biotek, ELx800) usando el programa KCjunior, con una longitud de 450nm y diferencial de 630nm.

Tabla 5. Características de los kits de ELISA.

| Kit usado  | Coeficientes  |
|--|---|
| - LH ELISA kit Enzo (ENZ-KIT107)                   | 5.3% Coeficiente de variación intraensayo.<br>15.5% Coeficiente interensayo.<br>Sensibilidad de 0.612ng/mL. |
| - Testosterona libre (DRG International Inc., USA) | 4% Coeficiente de variación intraensayo.<br>9% Coeficiente interensayo.<br>Sensibilidad de 16ng/mL.         |

## Conteo de ovocitos y porcentaje de animales ovulantes

Se obtuvieron los oviductos de las ratas sacrificadas en estro. Se colocó cada oviducto en un portaobjetos y usando un microscopio estereoscópico Leica EZ4 se localizó el ámpula, posteriormente con una aguja se reventó el ámpula para permitir la salida de los ovocitos. Se identificaron y contaron todos los ovocitos que salieron del ámpula.

Debido a que hubo animales que no ovularon se incrementó la n en ambos grupos igualándolos para obtener 6 animales en estro y que ovularon de cada cepa para realizar los análisis establecidos. Esto nos permitió calcular el porcentaje de animales ovulantes, usando la siguiente formula:

$$\% \text{ animales ovulantes} = \frac{\text{numero de animales que ovularon}}{\text{numero total de animales}} \times 100$$

### Análisis espermático

Se obtuvieron los epidídimos de los machos de 90 días. Se realizó un corte en la cola de cada epidídimo, cada epidídimo se colocó en un vaso de precipitados y posteriormente se administraron 10 mL de PBS a 37°C; se dejó reposar durante un minuto para que los espermatozoides difundieran al medio (Seed *et al.*, 1996). Posteriormente se colocaron 100 µL de la muestra en un portaobjetos al cual se le colocó un cubreobjetos. Se usó un microscopio Zeiss (Alemania) con una magnificación de 40x para evaluar 5 campos de la muestra, solo se contaron y clasificaron (Tabla 6) los espermatozoides íntegros y cuya cabeza estuviera dentro del campo visual.

Tabla 6. Clasificación de los espermatozoides de acuerdo con su movilidad.

| Tipo de movilidad   | Características   |
|---------------------|---|
| Móvil progresivo    | Espermatozoides que presentan movimiento el cual le permite avanzar en una dirección. |
| Móvil no progresivo | Espermatozoides que presentan movimiento pero no avanzan.                             |
| No móvil            | Espermatozoides que no se mueven.   |

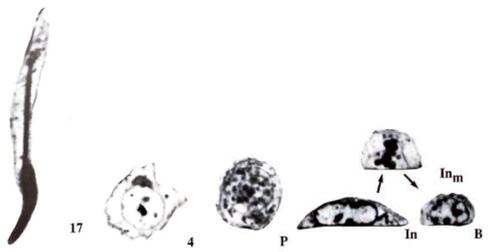
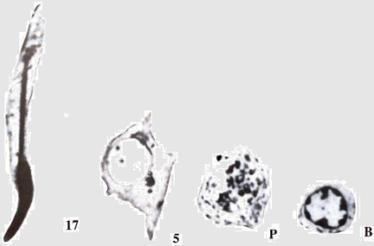
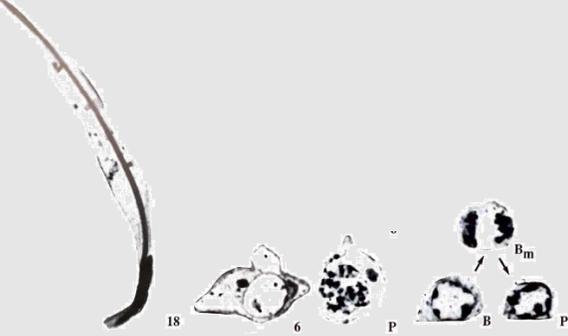
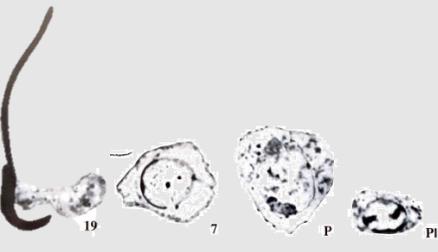
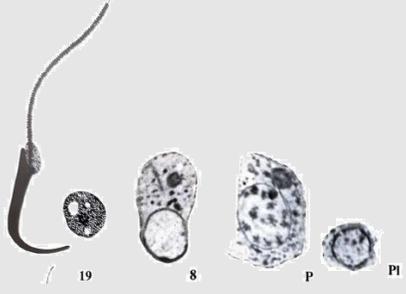
Información tomada de (Seed *et al.*, 1996; Ismael *et al.*, 2017)

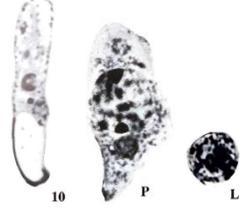
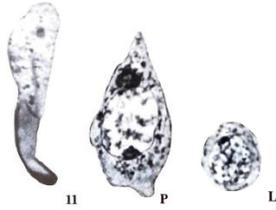
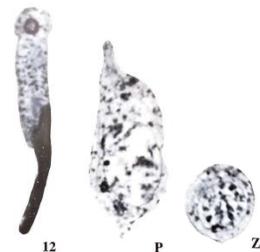
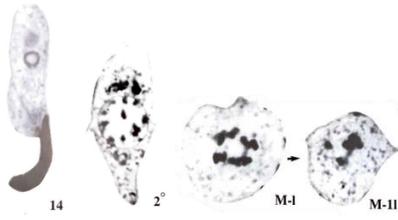
## Morfología de los túbulos seminíferos

Los testículos fueron fijados en NBF10%, posteriormente fueron deshidratados e incluidos en parafina. Ulterior a esto se procedió a cortar en un microtomo a 10  $\mu$ m de grosor obteniendo 16 cortes no seriados por testículo. Los cortes fueron colocados en portaobjetos gelatinizados y teñidos con hematoxilina-eosina. Para realizar el análisis morfológico se tomaron 720 imágenes a 10X (360 imágenes por cepa, 60 imágenes por rata, 30 imágenes por cada testículo) usando la cámara Moticam (Motic®) y un microscopio óptico Zeiss (Germany). Se procedió a clasificar y contar los túbulos seminíferos presentes en las imágenes de cada testículo y por grupo de acuerdo con la Tabla 7. De las imágenes obtenidas se seleccionaron al azar 960 túbulos seminíferos (480 por categoría de clasificación, 240 por cepa, 40 por rata, 20 por testículo izquierdo y 20 por testículo derecho) y se usó el software ImageJ 1.50i (NiH, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) para determinar el área, diámetro y perímetro de los túbulos seminíferos.

Tabla 7. Clasificación de los túbulos seminíferos.

| Grupo | Estadio de desarrollo | Criterio   | Ejemplo ilustrado del tipo celular |
|-------|-----------------------|--|------------------------------------|
| 1     | I                     | No se observa sistema acrosomal en las espermátides con microscopía de campo claro; las espermátides del número 1 son más pequeñas que las del 2   |                                    |
|       | II-III                | El estadio comienza cuando se observan los primeros gránulos proacrosomales o acrosomales. La vesícula acrosomal no se ha aplanado lo suficiente para formar un hemisferio en la superficie nuclear. |                                    |

|   |      |  |  |
|---|------|--|--|
|   | IV   | <p>Este estadio comienza cuando las vesículas acrosomales forman un hemisferio en la superficie nuclear y termina antes de que el ángulo subtendido por el acrosoma que se extiende en la superficie nuclear es de 40</p>                          |    |
|   | V    | <p>El ángulo subtendido por el acrosoma se extiende desde 40° hasta un máximo de 95°</p>   |    |
| 2 | VI   | <p>El ángulo subtendido por el acrosoma se extiende desde 95° hasta un máximo de 120°; las espermatídes alargadas continúan dentro de criptas profundas en las células de Sertoli</p>  |   |
|   | VII  | <p>Las espermatídes alargadas se mueven de la porción luminal del epitelio seminífero y se alinean en el lumen. El ángulo del acrosoma es mayor a 120°. El núcleo de las espermatídes redondas no ha hecho contacto con la superficie celular.</p> |  |
|   | VIII | <p>El núcleo hace contacto con la membrana plasmática, pero su forma aun no se distorsionada de redonda o levemente ovalada.</p>   |  |

|   |      |  |  |
|---|------|--|--|
| 3 | IX   | El núcleo de la espermatíde se deforma de su forma redonda u ovoide, pero no se forma un ángulo ventral.   |    |
|   | X    | La espermatíde forma un ángulo ventral pero no se observa ángulo dorsal.   |    |
|   | XI   | La espermatíde se alarga y muestra un ángulo dorsal; la cabeza muestra una superficie dorsal ligeramente curva y aún no toma una apariencia de “varilla doblada”.  |    |
|   | XII  | La superficie dorsal de la cabeza de la espermatíde tiene apariencia de varilla doblada; la tinción densa de cromatina aún no está completa, indicando que la condensación aún no alcanza el extremo caudal                      |   |
|   | XIII | Una tinción densa se extiende por el núcleo de la espermatíde, indicando que cromatina densa se puede ver por toda la cabeza; el estadio termina antes de que comience la metafase meiótica del diploteno de los espermatocitos. |  |
|   | XIV  | La presencia de la anafase meiótica o telofase de meiosis I, espermatocitos secundarios o cualquier fase de meiosis II definen este estadio.   |  |

Las imágenes y criterios fueron tomados de (Russell *et al.*, 1993). Abreviaturas: 1-19: espermatides, P: espermatocitos en paquiteno, In: espermatogonias intermedias, Inm: espermatogonias intermedias en mitosis, B: espermatogonias B,

Bm: espermatogonias B en mitosis, Pl: espermatocito en preleptoteno, L: espermatocito en leptoteno, D: espermatocito en diploteno, Z: espermatocito en zigoteno, M-I espermatocito en meiosis I, M-II: espermatocito en meiosis II.

### Análisis estadísticos

El peso de los órganos fue normalizado con respecto al peso corporal (PC), usando la siguiente fórmula:

$$\left( \frac{\text{peso del órgano (g)} * 100}{\text{peso corporal (g)}} \right) * 1000 = \text{peso relativo en } \frac{\text{mg}}{100\text{g de PC}}$$

La fluorescencia fue normalizada de 0 a 1, usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{valor a normalizar} * 1}{\text{valor más grande de fluorescencia}} = \text{valor normalizado 0 a 1}$$

*Valor mas grande de fluorescencia: esta el valor más grande mostrado en el histograma de color del programa ImageJ 1.50i*

A todos los datos obtenidos se les realizaron pruebas de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Dependiendo si se trata de datos paramétricos o no paramétricos, se usó la prueba t-student o de U de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos. Para comparar más de dos grupos y una categoría se utilizó la prueba de ANOVA de 1 vía seguida del análisis post hoc Holm-Sidak. Para la comparación de más de dos grupos con 2 categorías se usó ANOVA de dos vías seguida del análisis post hoc Holm-Sidak. Para la comparación de dos grupos con 3 categorías se usaron ANOVA de 3 vías seguida del análisis post hoc Holm-Sidak. Las categorías usadas para este análisis se presentan en la Tabla 8. Para la comparación de porcentajes se realizó una prueba Z. Para todos los casos se consideró como significativo un valor de  $p < 0.05$ .

Tabla 8. Categorías usadas en la ANOVA 2 vías.

| Categoría         | Parámetros que incluye               |
|-------------------|--------------------------------------|
| Cepa (C)          | taiep y SD                           |
| Ciclo estral (CE) | Diestro (D), Proestro (P), Estro (E) |
| Sexo (S)          | Macho, Hembra en diestro             |
| Lado (L)          | Izquierdo y derecho                  |

## Resultados

### Mielina presente en el hipotálamo

La tinción de Woelcke se utilizó para mostrar el contenido de mielina en los cerebros de las ratas *taiep* machos y hembras se observa una menor coloración en azul en comparación con lo observado en las ratas SD. Este efecto se puede observar en ambas estructuras analizadas, el ARC y AVPV (Ilustración 5 e Ilustración 6). Esto nos indica una menor presencia de mielina en los cerebros de las ratas *taiep* tanto hembras como machos.

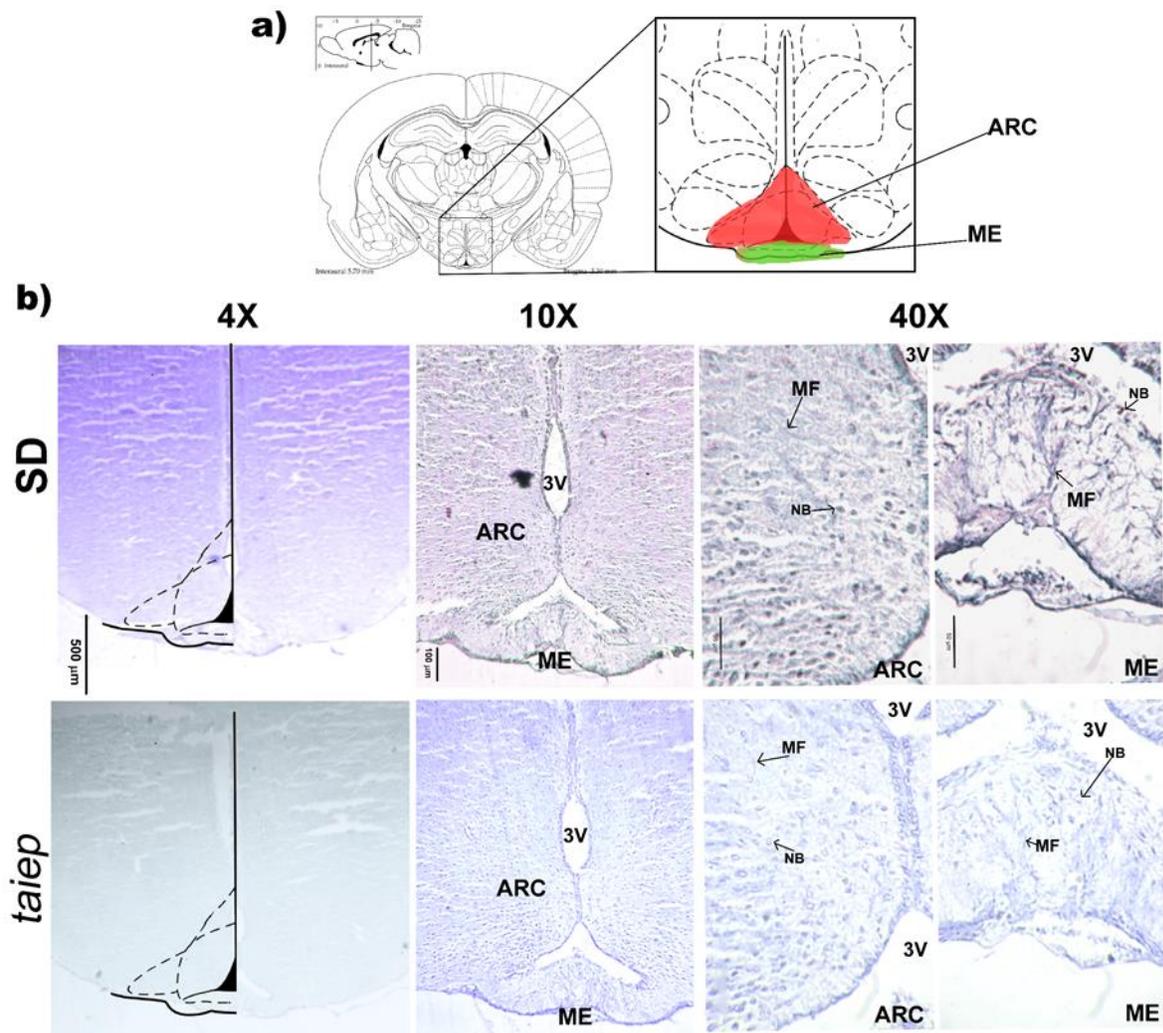


Ilustración 5. Presencia de mielina en el ARC y la ME de las ratas *taiep* y SD usando la técnica de Woelcke. En a) se muestra un esquema donde se indica en rojo el ARC y en verde la ME, imágenes tomadas de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestran cortes coronales del cerebro de ratas *taiep* y SD en diferentes aumentos. La tinción en azul indica la presencia de mielina. Abreviaturas: ARC:

núcleo arcuato, ME: eminencia media, SD: Sprague-Dawley, MF: fibra de mielina, NB: cuerpo neuronal, 3V: 3er ventrículo.

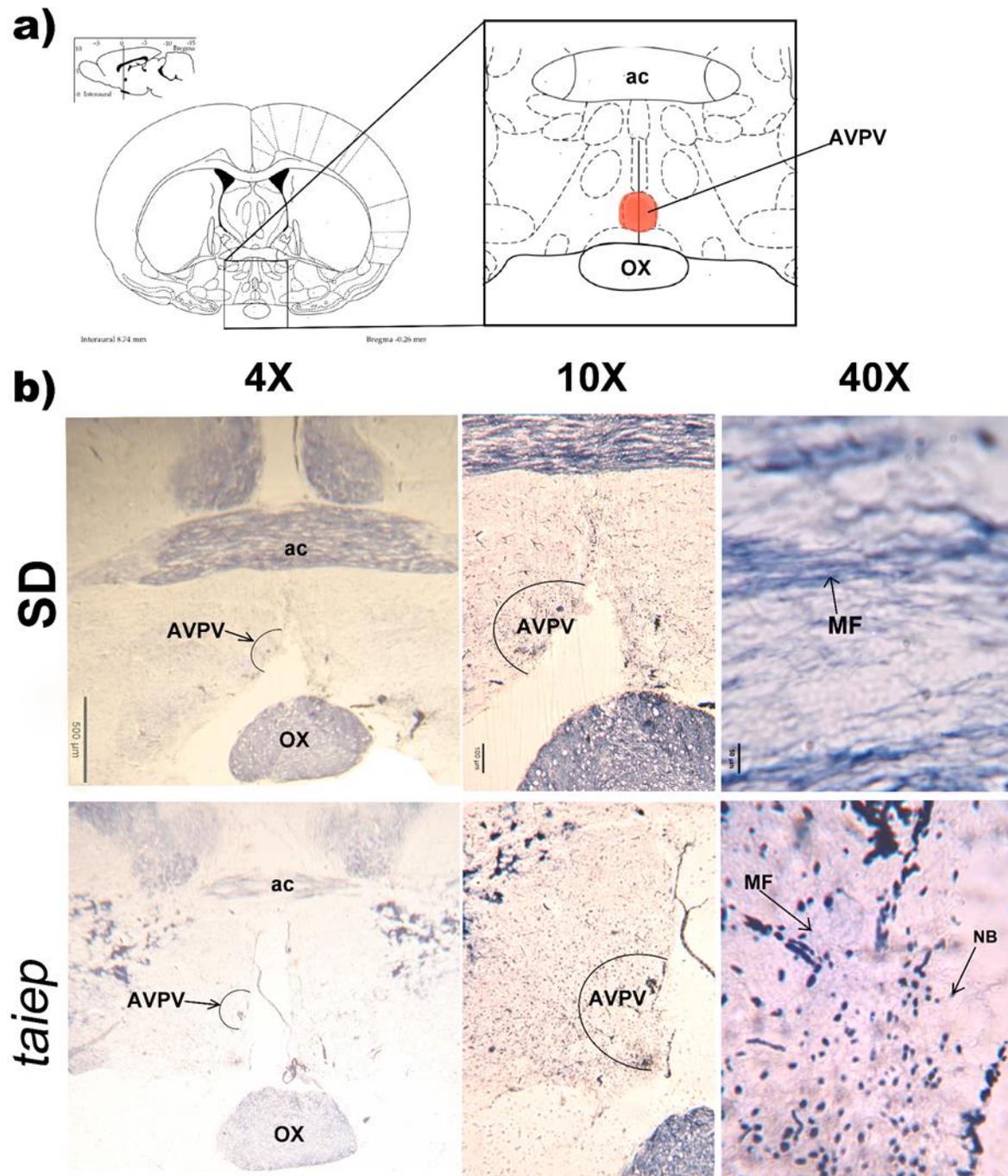


Ilustración 6. Presencia de mielina en el AVPV de las ratas *taiep* y SD usando la técnica de Woelcke. En a) se muestra un esquema donde se indica en rojo el AVPV, imágenes tomadas de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestran cortes coronales del cerebro de ratas *taiep* y SD en diferentes aumentos. La tinción en azul indica la presencia de mielina. Abreviaturas: AVPV: área

anteroventral periventricular, SD: Sprague-Dawley, MF: fibra de mielina, NB: cuerpo neuronal, Ox: quiasma óptico, ac: comisura anterior.

### Caracterización de las hembras *taiep* (90 días)

#### Caracterización del ciclo estral

Las ratas *taiep* presentan un ciclo estral irregular en comparación con las ratas SD (Ilustración 7); sin embargo al analizar el porcentaje de cuantos M, D, P y E observamos durante el periodo evaluado no observamos diferencias significativas entre ambas cepas (Tabla 9).

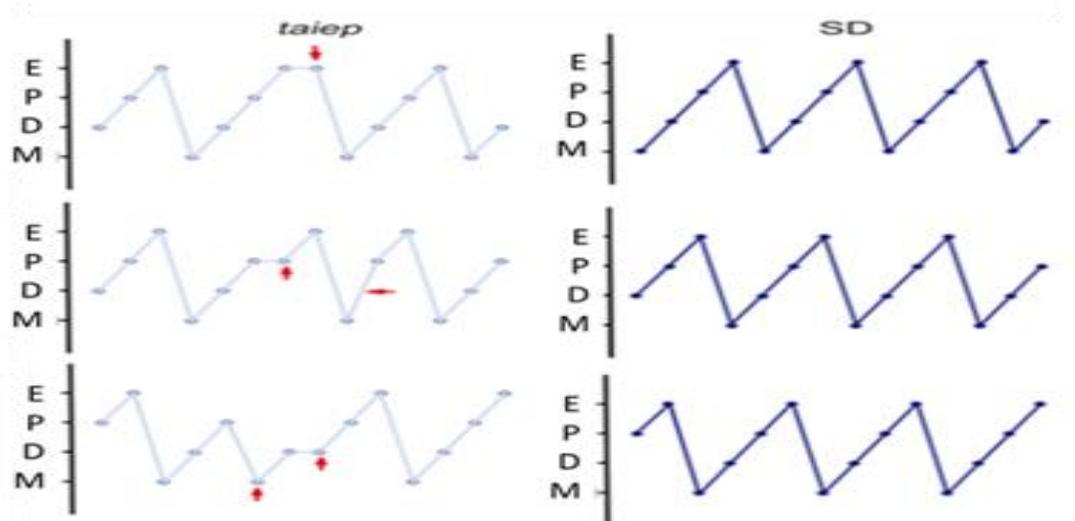


Ilustración 7. Ciclo estral de las ratas *taiep* y SD. Se muestra el ciclo estral de 6 ratas (3 *taiep* y 3 SD); las flechas rojas indican los puntos donde se pierde la continuidad del ciclo. Abreviaturas: M - metaestro, D - diestro, P - proestro temprano, E - estro, SD: Sprague-Dawley.

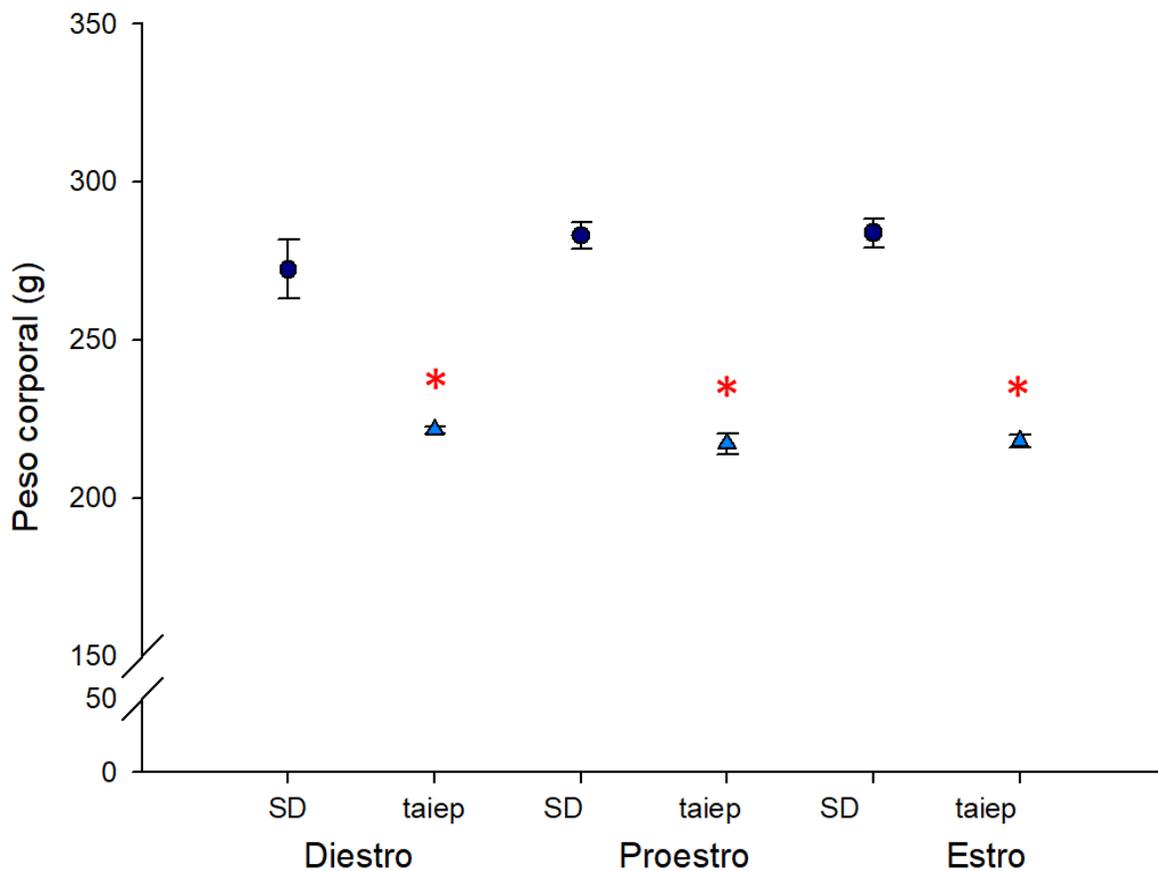
Tabla 9. Porcentaje de la presencia de cada etapa del ciclo estral.

| Etapa del ciclo estral | SD     | <i>taiep</i> | Z                   | p    |
|------------------------|--------|--------------|---------------------|------|
| M                      | 23.81% | 17.86%       | 1.54                | 0.13 |
| D                      | 26.19% | 31.35%       | 1.18                | 0.24 |
| P                      | 26.19% | 27.38%       | 0.20                | 0.84 |
| E                      | 23.81% | 23.41%       | 1.1E <sup>-15</sup> | 1    |
| TOTAL                  | 100%   | 100%         |                     |      |

Los datos están representados en porcentaje. n=18 por cepa. La prueba usada fue la prueba de Z. Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley, M - metaestro, D - diestro, P - proestro temprano, E - estro, SD: Sprague-Dawley.

## Peso corporal

En la Gráfica 1 se presentan los pesos corporales de las hembras *taiep* y SD a lo largo del ciclo estral. El análisis de ANOVA de 2 vías mostró que las ratas *taiep* tuvieron menor peso corporal que las ratas hembra SD (DF=1, F=237.44,  $p<0.001$ ), sin importar la etapa del ciclo estral en que se encontraran (DF=2, F=0.39,  $p=0.68$ ). También mostró que no hay interacción entre ambas factores (DF=2, F=1.63,  $p=0.21$ ), (Gráfica 1).



Gráfica 1. Peso corporal de las ratas *taiep* y SD hembras dependiendo su etapa del ciclo estral. Los valores mostrados en la gráfica se presentan como la media  $\pm$  e.e.m. Análisis ANOVA 2 vías seguida de post hoc Holm-Sidak \* *taiep* vs SD,  $p<0.001$ . Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley.

## Peso de los órganos

Con base al análisis se muestra que las ratas *taiep* tuvieron menor peso que las ratas hembra SD (DF=1, F=64.70,  $p<0.001$ ) (Tabla 10), sin mostrar diferencias entre las etapas del ciclo estral (DF=2, F=2.76,  $p=0.08$ ), ni en la interacción entre ambas categorías (DF=2, F=0.0947,  $p=0.910$ ).

El análisis del peso de la hipófisis no mostró diferencias significativas entre las ratas *taiep* y las ratas SD por la categoría cepa (DF=1, F=1.120,  $p=0.298$ ), etapa del ciclo estral (DF=2, F=2.237,  $p=0.124$ ) o interacción (DF=2, F=1.497,  $p=0.240$ ). Los valores de la media  $\pm$  error estándar de la media (e.e.m.) se muestran en la Tabla 10 para cada etapa del ciclo estral.

La masa adrenal de las ratas *taiep* es mayor en comparación con las ratas SD (DF=1, F=22.233,  $p<0.001$ ) (Tabla 10), sin mostrar diferencias entre las etapas del ciclo estral (DF=2, F=0.204,  $p=0.817$ ) o la interacción entre ambas categorías (DF=2, F=0.653,  $p=0.528$ ).

Con respecto al peso del útero el análisis no mostró diferencias entre las ratas *taiep* y SD por cepa (DF=1, F=0.208,  $p=0.652$ ), etapa del ciclo estral (DF=2, F=2.603,  $p=0.091$ ), o interacción entre ambas categorías (DF=2, F=1.685,  $p=0.203$ ). Los valores de cada etapa del ciclo estral se muestran en la Tabla 10.

Con base en los resultados del ANOVA de 3 vías se muestra que no hay diferencias significativas entre las ratas *taiep* y SD por cepa (DF=1, F= 1.769,  $p= 0.189$ ), ni etapa del ciclo estral (DF=2, F= 1.172,  $p= 0.317$ ), ni lado analizado (DF=1, F= 0.0654,  $p= 0.799$ ). Además no se observó ningún tipo de interacción entre las diferentes categorías (interacción C x CE, DF=2, F= 2.036,  $p= 0.140$ ; interacción C x L, DF=1, F= 0.355,  $p= 0.554$ ; interacción CE x L, DF=2, F= 0.879,  $p= 0.421$ ; interacción C x CE x L, DF=2 F= 1.105,  $p= 0.338$ ). El peso de los ovarios en cada etapa del ciclo estral se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Peso del cerebro (g), de las adrenales (mg/100g PC) y de los órganos del aparato reproductor (mg/100g PC) de las ratas *taiep* y SD hembras en las diferentes etapas del ciclo estral.

| CE | Órgano       | SD           | <i>taiep</i> | Diferencia de medias | t    | p      |   |
|----|--------------|--------------|--------------|----------------------|------|--------|---|
| D  | Cerebro      | 1.42±0.03    | 1.28±0.01    | 0.15                 | 4.32 | <0.001 |   |
|    | Hipófisis    | 7.94±0.49    | 8.45±0.55    | -                    | -    | -      |   |
|    | Masa adrenal | 28.81±3.04   | 34.34±0.91   | -                    | -    | -      |   |
|    | Útero        | 194.25±16.47 | 186.99±18.19 | -                    | -    | -      |   |
|    | Ovarios      | Izquierdo    | 19.23±0.61   | 23.81±3.41           | -    | -      | - |
|    |              | Derecho      | 18.33±1.08   | 19.27±3.88           | -    | -      | - |
| P  | Cerebro      | 1.43±0.01    | 1.27±0.02    | 0.16                 | 4.68 | <0.001 |   |
|    | Hipófisis    | 7.21±0.39    | 8.55±0.67    | -                    | -    | -      |   |
|    | Masa adrenal | 25.06±1.46   | 35.36±2.91   | 10.30                | 3.42 | 0.002  |   |
|    | Útero        | 255.45±27.03 | 226.09±19.24 | -                    | -    | -      |   |
|    | Ovarios      | Izquierdo    | 21.57±1.83   | 23.04±1.99           | -    | -      | - |
|    |              | Derecho      | 19.23±1.25   | 26.33±2.38           | -    | -      | - |
| E  | Cerebro      | 1.38±0.032   | 1.22±0.026   | 0.17                 | 4.93 | <0.001 |   |
|    | Hipófisis    | 7.35±0.48    | 6.87±0.55    | -                    | -    | -      |   |
|    | Masa adrenal | 26.45±1.96   | 35.24±1.67   | 8.79                 | 2.91 | 0.007  |   |
|    | Útero        | 215.14±13.51 | 282.69±52.05 | -                    | -    | -      |   |
|    | Ovarios      | Izquierdo    | 22.76±2.81   | 19.56±2.29           | -    | -      | - |
|    |              | Derecho      | 22.69±1.83   | 22.14±1.13           | -    | -      | - |

Los datos se presentan como la media ± e.e.m, n=6 por grupo. Además se muestran la diferencia de medias, t y p de las comparaciones en pares estadísticamente significativas obtenidas con la prueba post hoc Holm-Sidak realizada en las diferentes ANOVAs de 2 vías con un factor significativo. Abreviaturas: CE: ciclo estral, D: diestro, P: proestro, E: estro, mg/100g PC; miligramos por cada 100g de peso corporal, SD: Sprague-Dawley.

### Porcentaje de animales ovulantes y número de ovocitos ovulados

El análisis no muestra diferencias en el porcentaje de animales *taiep* ovulantes comparado con las ratas SD (Tabla 11). Por otro lado, se observó que el número promedio de ovocitos encontrados en los oviductos no fue diferente entre las ratas *taiep* y SD, sin importar el lado analizado (Tabla 11).

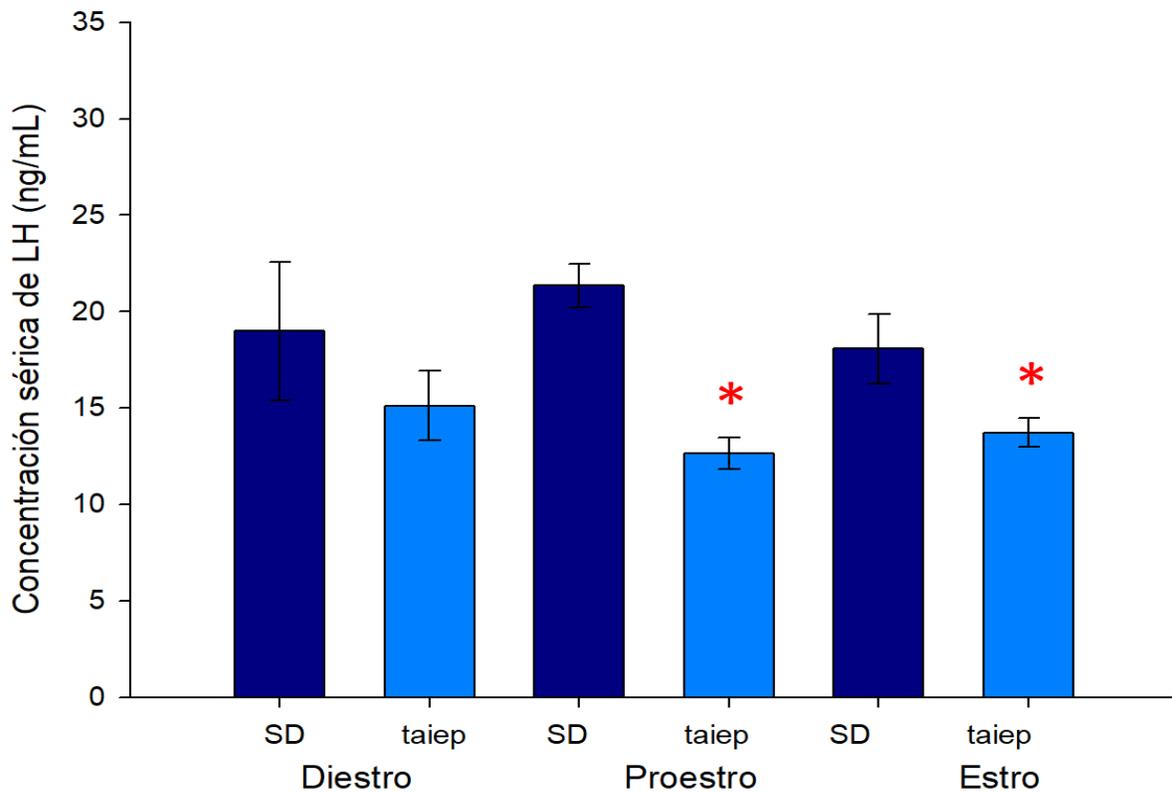
Tabla 11. Ovulación en las ratas SD y *taiep*.

|                                       |           | SD        | <i>taiep</i> |    | Z    | p    |
|---------------------------------------|-----------|-----------|--------------|----|------|------|
| % Animales ovulantes                  |           | 88.8%     | 66.8%        |    | 0.56 | 0.58 |
| % Animales no ovulantes               |           | 11.2%     | 33.4%        |    | 0.57 | 0.57 |
|                                       |           | SD        | <i>taiep</i> | DF | t    | p    |
| # de ovocitos encontrados en oviducto | Izquierdo | 4.63±0.59 | 2.25±1.25    | 10 | 1.97 | 0.08 |
|                                       | Derecho   | 3.88±0.61 | 3.00±2.00    | 10 | 0.54 | 0.59 |

Los datos están representados en porcentaje para los animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m para los ovocitos ovulados. n=9 para determinar la ovulación, n=6 para el conteo de ovocitos. Las pruebas usadas fueron la prueba de Z para porcentajes y t-Student para el conteo. Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley

### Concentración sérica de LH por etapa del ciclo estral

El análisis de la concentración sérica de LH en las hembras de 90 días mostró que las ratas *taiep* tienen una menor concentración en comparación con las ratas SD (DF=1, F=14.65,  $p < 0.001$ ), sin diferencias significativas de acuerdo con la etapa del ciclo estral (DF=2, F=0.326,  $p = 0.725$ ) ni con la interacción de ambas categorías (DF=2, F=1.097,  $p = 0.348$ ). El análisis de comparaciones por pares mostró la disminución de la concentración de LH en la rata *taiep* en proestro y estro (Gráfica 2).



Gráfica 2. Concentración sérica de LH en las ratas *taiep* y SD hembras en diferentes etapas del ciclo estral. Los valores mostrados en la gráfica se presentan como media  $\pm$  e.e.m. Análisis ANOVA 2 vías seguida de post hoc Holm-Sidak \* *taiep* vs SD,  $p < 0.05$ . Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley.

### Análisis de la expresión hipotalámica de kisspeptina, GnRH y el receptor Kiss1R por etapa del ciclo estral.

#### Expresión de kisspeptina en ARC por etapa del ciclo estral

Se observó la presencia IRcb a kisspeptina en el ARC de las ratas *taiep* y SD en las diferentes etapas del ciclo estral (Ilustración 8).

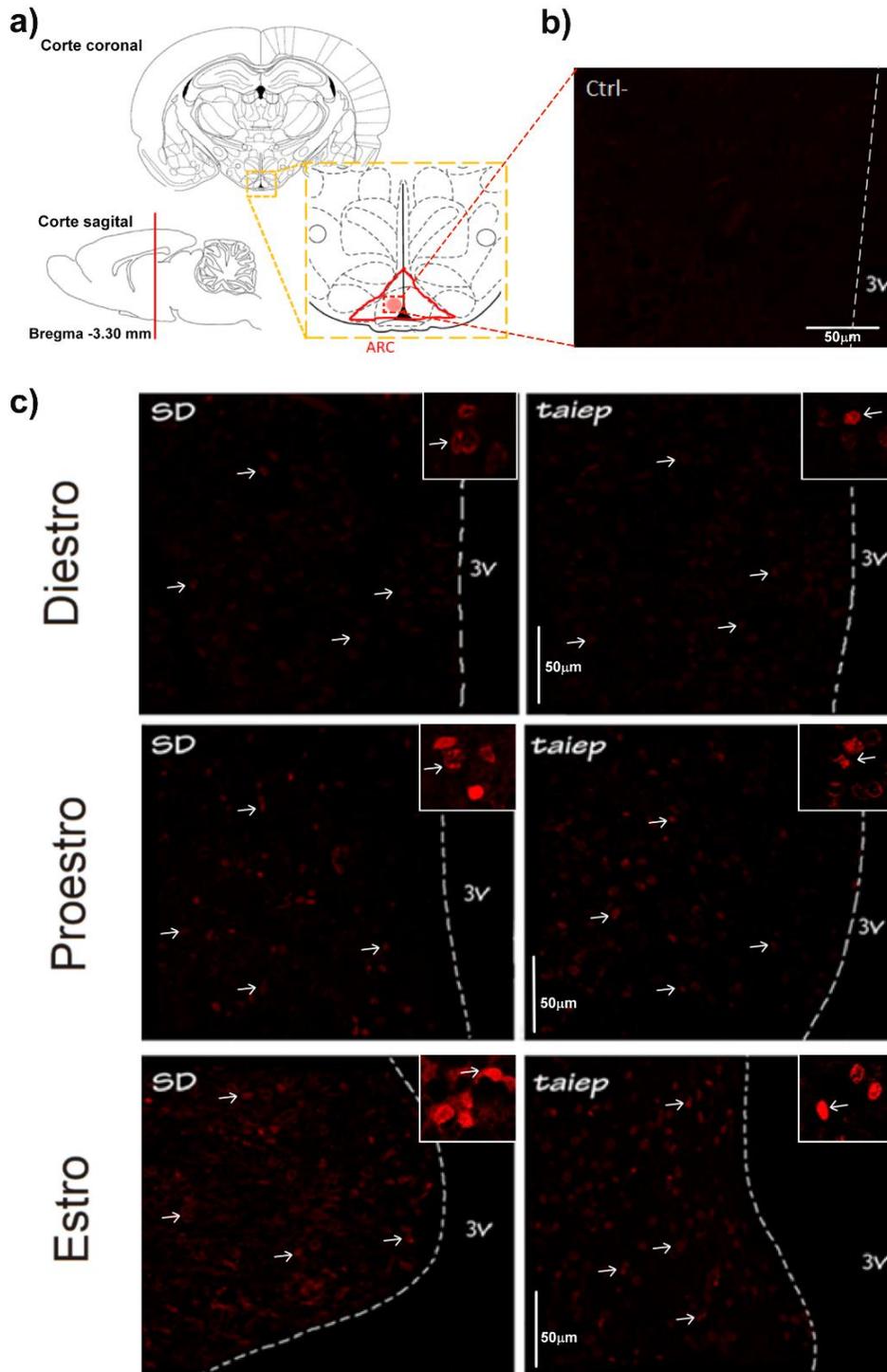
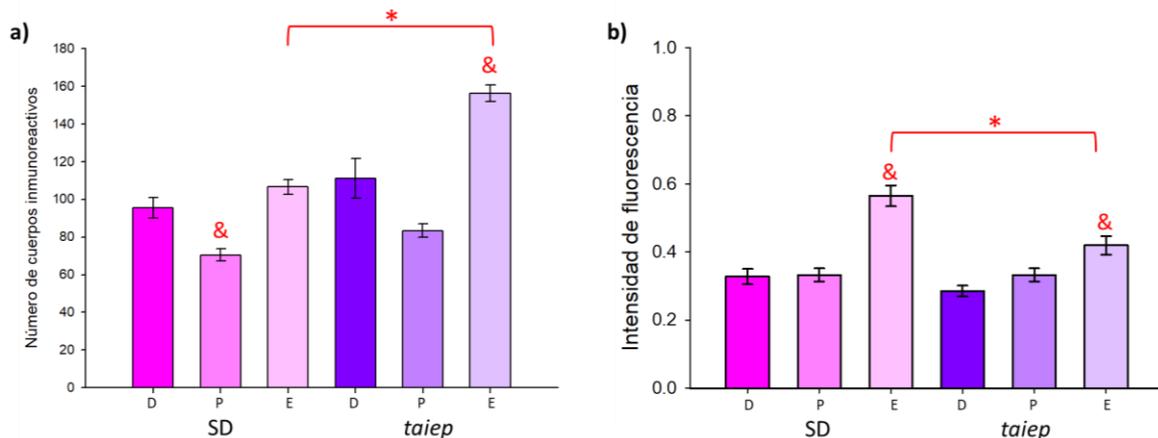


Ilustración 8. Expresión de kisspeptina en ARC por etapa del ciclo estral. En a) se muestra el esquema de la ubicación del ARC, modificado de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestra un control negativo de la expresión de kisspeptina y en c) se muestran las micrografías de kisspeptina en ARC de las ratas SD y *taiep* en diestro, proestro y estro. Las flechas blancas señalan los cuerpos celulares inmunorreactivos. En los recuadros se muestran acercamientos con zoom 4x de los cuerpos celulares inmunorreactivos señalados con la flecha blanca. Abreviaturas: ARC: núcleo arcuato, 3V: tercer ventrículo, SD: Sprague-Dawley.

El número de IRcb a kisspeptina es mayor en las ratas *taiep* en comparación con las ratas SD (DF=1, F=30.366, p<0.001) y varía de acuerdo con el ciclo estral (DF=2, F=44.354, p<0.001), el análisis también mostró la interacción de ambas categorías (DF=2, F=6.317, p=0.005). La prueba post hoc Holm-Sidak muestra que durante el proestro disminuye el número de IRcb en ambas cepas y en el estro la rata *taiep* presenta un aumento de IRcb en comparación con la rata SD en estro (Gráfica 3 a).

La intensidad de fluorescencia de kisspeptina es menor en las ratas *taiep* en comparación con las ratas SD hembras de 90 días (DF=1, F=11.118, p=0.001), cambia de acuerdo al ciclo estral (DF=2, F=38.125, p<0.001), y con la interacción entre ambas categorías (DF=2, F=5.320, p=0.006). La prueba post hoc Holm-Sidak mostró que la mayor intensidad de fluorescencia se presenta en el estro de ambas cepas en comparación con las demás etapas del ciclo estral; y que la rata *taiep* en estro tiene menor intensidad de fluorescencia comparado con la rata SD en estro (Gráfica 3 b). Esta disminución en la intensidad de fluorescencia se ve compensada por el mayor número de IRcb que presentan las ratas *taiep* al compararse con las ratas SD. No se observan cambios en las demás etapas del ciclo estral entre las ratas *taiep* y SD.



Gráfica 3. Expresión de kisspeptina en el ARC de la rata *taiep* y SD en las diferentes etapas del ciclo estral. En a) se muestra el número de IRcb a kisspeptina en las ratas *taiep* y SD en las diferentes etapas del ciclo estral (total analizado: 288 cortes). En b) se muestra la intensidad de fluorescencia de los IRcb de las ratas *taiep* y SD en las diferentes etapas del ciclo estral (total analizado: 360 IRcb, n= 60 IRcb por grupo). Los valores mostrados en la gráfica se presentan como la media ± e.e.m. \* *taiep* vs SD, p<0.05; & comparación entre las diferentes etapas del ciclo estral de la misma cepa, p<0.05; análisis ANOVA 2 vías seguida de post hoc Holm-Sidak. Abreviaturas: IRcb: cuerpos celulares inmunorreactivos, SD: Sprague-Dawley, D: diestro, P: proestro, E: estro.

### Expresión de kisspeptina en AVPV por etapa del ciclo estral

Se observó la presencia IRcb a kisspeptina en AVPV en las ratas *taiep* y SD a lo largo del ciclo estral (Ilustración 9).

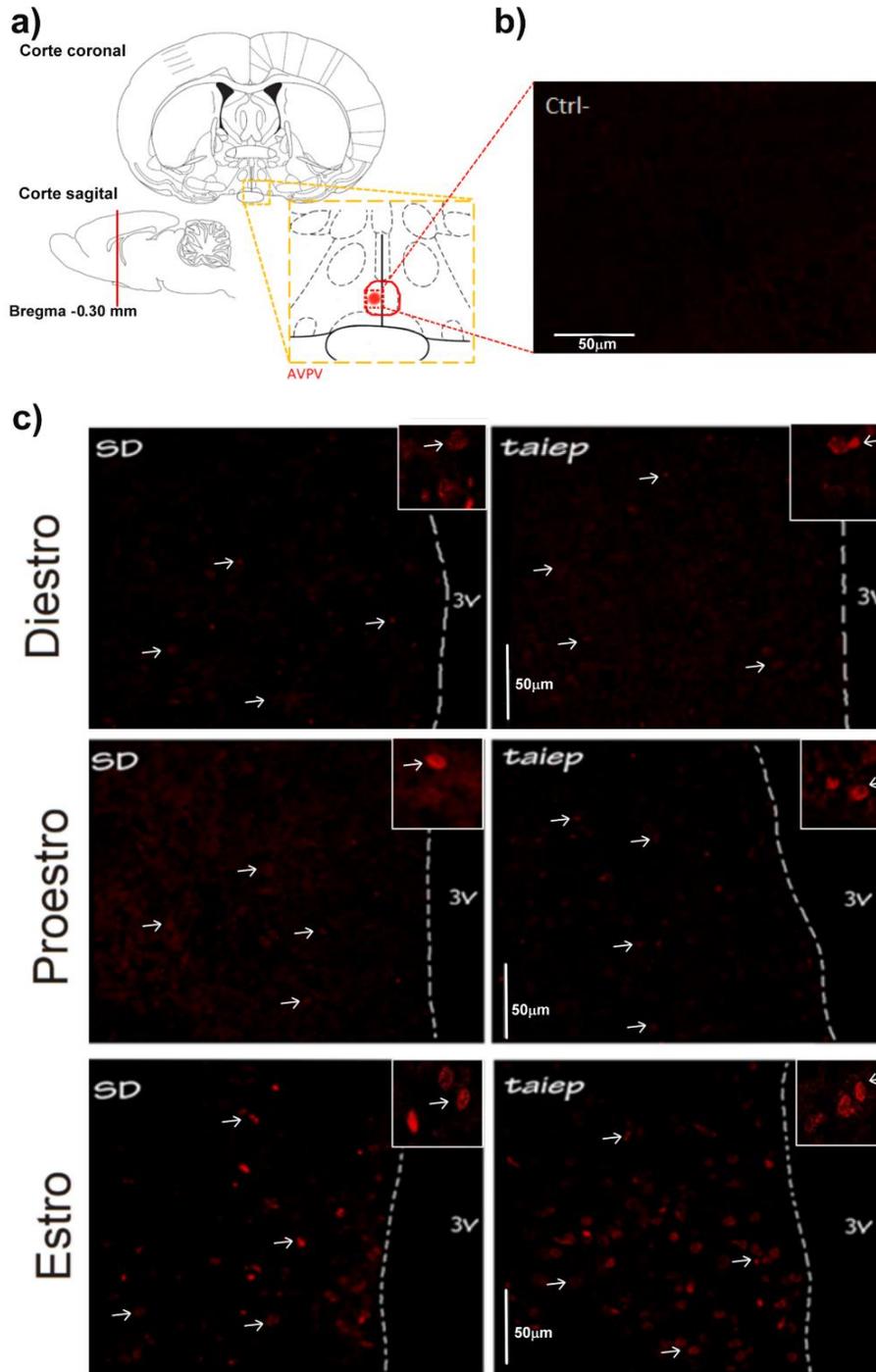
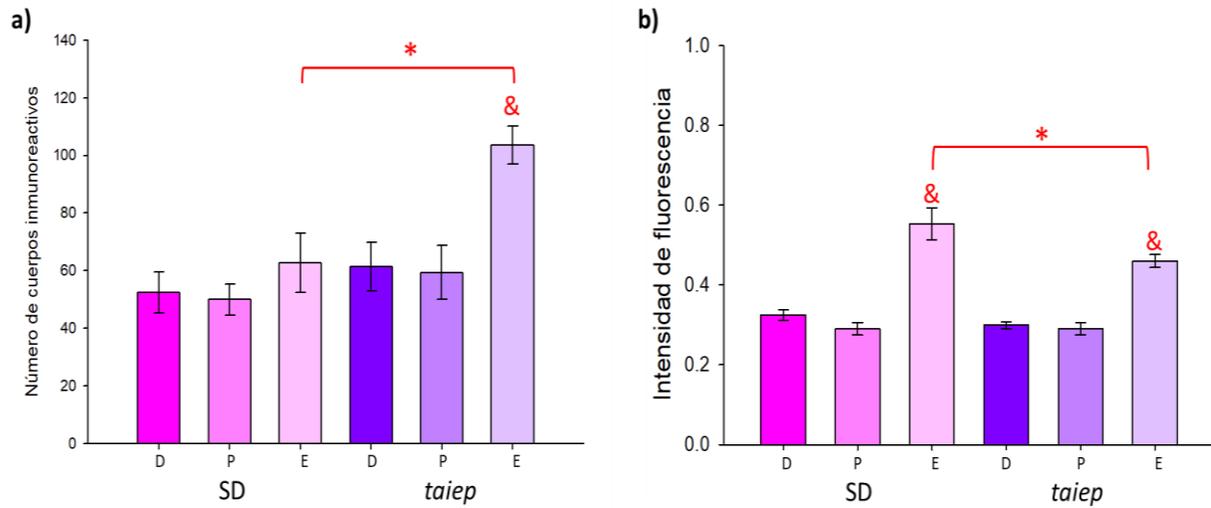


Ilustración 9. Expresión de kisspeptina en AVPV por etapa de ciclo estral. En a) se muestra el esquema de la ubicación del AVPV, modificado de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestra un

control negativo de la expresión de kisspeptina y en c) se muestran las micrografías de kisspeptina en AVPV de las ratas SD y *taiep* en diestro, proestro y estro. Las flechas blancas señalan los cuerpos celulares inmunorreactivos. En los recuadros se muestran acercamientos con zoom 4x de los cuerpos celulares inmunorreactivos señalados con la flecha blanca. Abreviaturas: AVPV: Área anteroventral periventricular, 3V: tercer ventrículo, SD: Sprague-Dawley.

Al analizar el número de IRcb la prueba de ANOVA de 2 vías mostró que las ratas *taiep* presentan un mayor número de IRcb en comparación con las ratas SD (DF=1, F=8.977, p=0.005) y que varía de acuerdo con la etapa del ciclo estral (DF=2, F=7.722, p=0.002), sin que exista interacción entre ambas categorías (DF=2, F=2.6, p=0.091). La prueba post hoc Holm-Sidak mostró que no hay diferencias significativas entre el número de IRcb de la rata SD a lo largo del ciclo estral. En el caso de la rata *taiep* se observa un incremento del número de IRcb durante el estro, que fue significativo en la comparación por pares. La rata *taiep* en estro presenta mayor número de IRcb en comparación con la rata SD en estro (Gráfica 4 a).

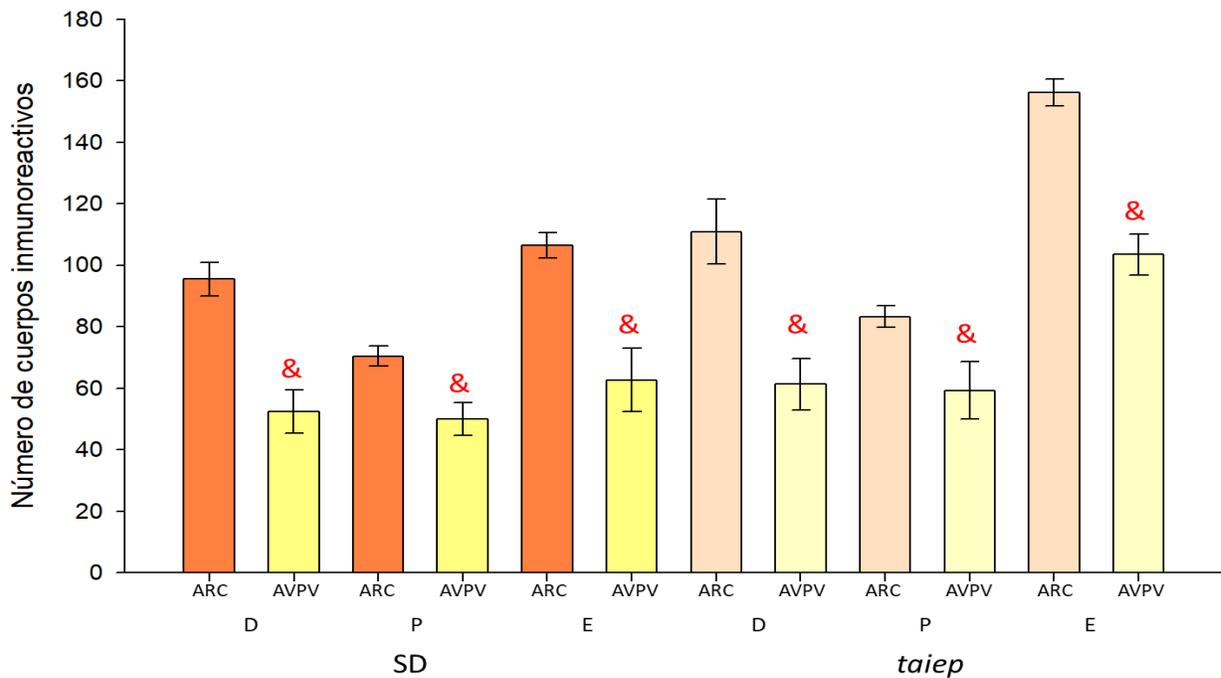
Al analizar la intensidad de fluorescencia con el ANOVA de 2 vías se observó que las ratas *taiep* presentan menor intensidad de fluorescencia en comparación con las ratas SD (DF=1, F=5.639, p=0.019) la cual varía de acuerdo con la etapa del ciclo estral (DF=2, F=67.159, p<0.001), pero no se observó interacción entre ambas categorías (DF=2, F=2.717, p=0.07). La prueba post hoc Holm-Sidak indicó que la mayor intensidad de fluorescencia se presenta en el estro de ambas cepas en comparación con las demás etapas del ciclo estral, además de que la rata *taiep* en estro presenta menor intensidad de fluorescencia que la rata SD en estro (Gráfica 4 b). Esta disminución en la intensidad de fluorescencia se ve compensada por el mayor número de IRcb que presentan las ratas *taiep* al compararse con las ratas SD. Además de que no se observan cambios en las demás etapas del ciclo estral entre las ratas *taiep* y SD.



Gráfica 4. Expresión de kisspeptina en AVPV de la rata *taiep* y SD en las diferentes etapas del ciclo estral. En a) se muestra el número de IRcb a kisspeptina en las ratas *taiep* y SD en las diferentes etapas del ciclo estral (total analizado 288 cortes). En b) se muestra la intensidad de fluorescencia de los IRcb de las ratas *taiep* y SD en las diferentes etapas del ciclo estral (total analizado 180 IRcb, n= 45 IRcb por grupo). Los valores mostrados en la gráfica se presentan como la media ± e.e.m.; análisis ANOVA de 2 vías seguido de post hoc Holm-Sidak \* *taiep* vs SD,  $p < 0.05$ ; & comparación entre las diferentes etapas del ciclo estral de la misma cepa,  $p < 0.05$ . Abreviaturas: IRcb: cuerpos celulares inmunoreactivos, SD: Sprague-Dawley, D: diestro, P: proestro, E: estro.

### Diferencia en la población de IRcb entre núcleos

Al comparar el número total de IRcb a kisspeptina observamos que tanto en la rata *taiep* como SD el núcleo ARC presenta un mayor número de IRcb en comparación con lo observado en AVPV (SD:  $90.83 \pm 18.47$  vs  $55.06 \pm 18.92$ ,  $t=5.740$ ,  $P<0.001$ ; *taiep*:  $116.83 \pm 34.74$  vs  $74.72 \pm 28.23$ ,  $t=3.991$ ,  $P<0.001$ , prueba t –Student para ambos casos). Al realizar el análisis considerando las etapas del ciclo estral observamos que se mantienen esta diferencia (Gráfica 5).



Gráfica 5. Número de IRcb en ARC y AVPV de la rata *taiep* y SD en las diferentes etapas del ciclo estral. Los valores mostrados en la gráfica se presentan como la media  $\pm$  e.e.m.; análisis t-Student & comparación entre el ARC vs AVPV entre las diferentes etapas del ciclo estral de la misma cepa,  $p<0.05$ . Abreviaturas: IRcb: cuerpos celulares inmunorreactivos, SD: Sprague-Dawley, D: diestro, P: proestro, E: estro.

### Expresión de GnRH y Kiss1R en ME y AVPV por etapa del ciclo estral

Se observó la coexpresión de GnRH y Kiss1R en ME de las ratas *taiep* y SD a lo largo del ciclo estral (Ilustración 10). También se observó que no hay diferencia en la localización de las fibras GnRH ni de la expresión de Kiss1R entre las ratas *taiep* y SD (Ilustración 11).

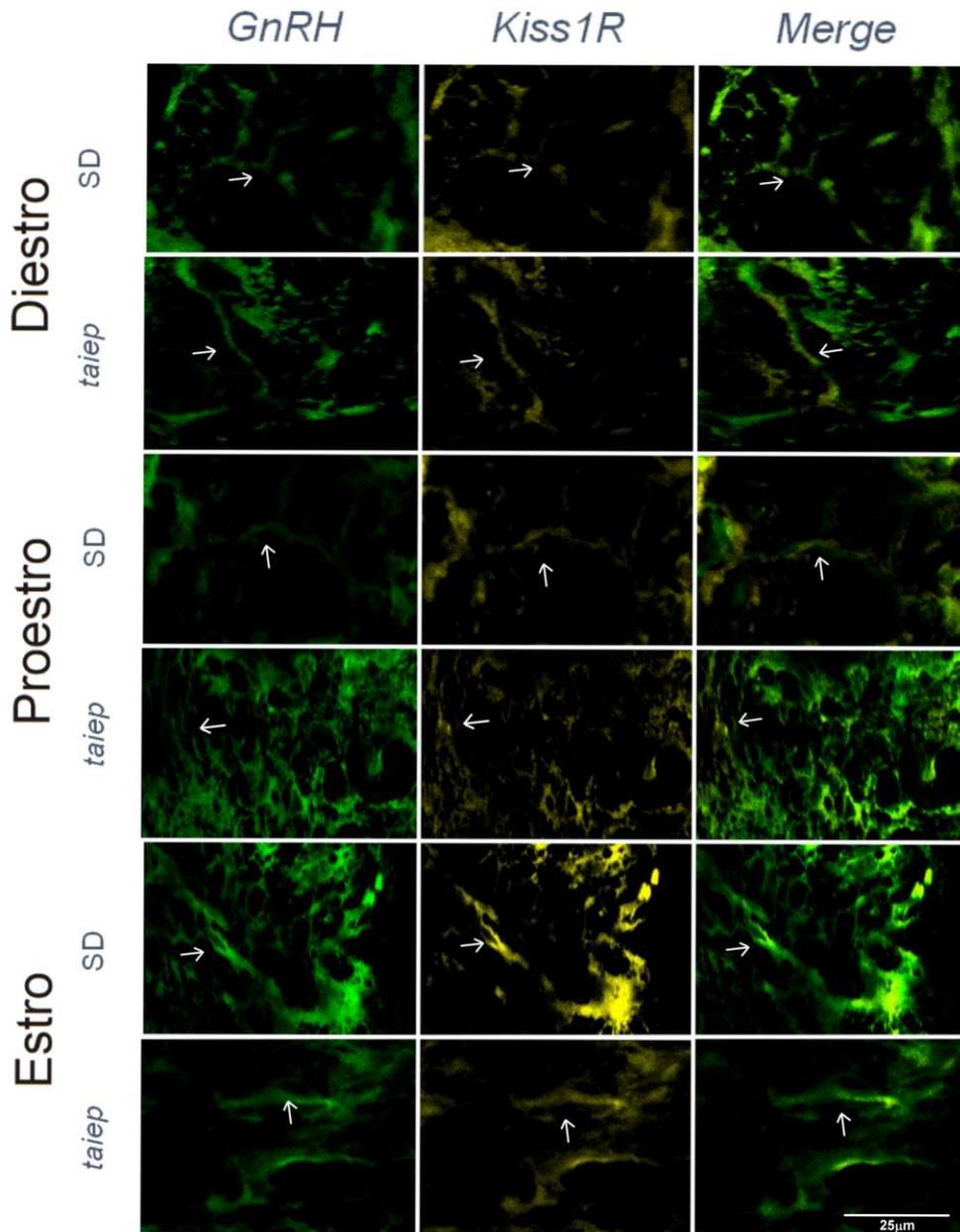


Ilustración 10. Merge de la expresión de GnRH y Kiss1R en la ME por etapa del ciclo estral de las ratas SD y *taiep*. Las flechas blancas señalan las fibras. Abreviaturas: ME: eminencia media, SD: Sprague-Dawley, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, Kiss1R: receptor a kisspeptina 1.

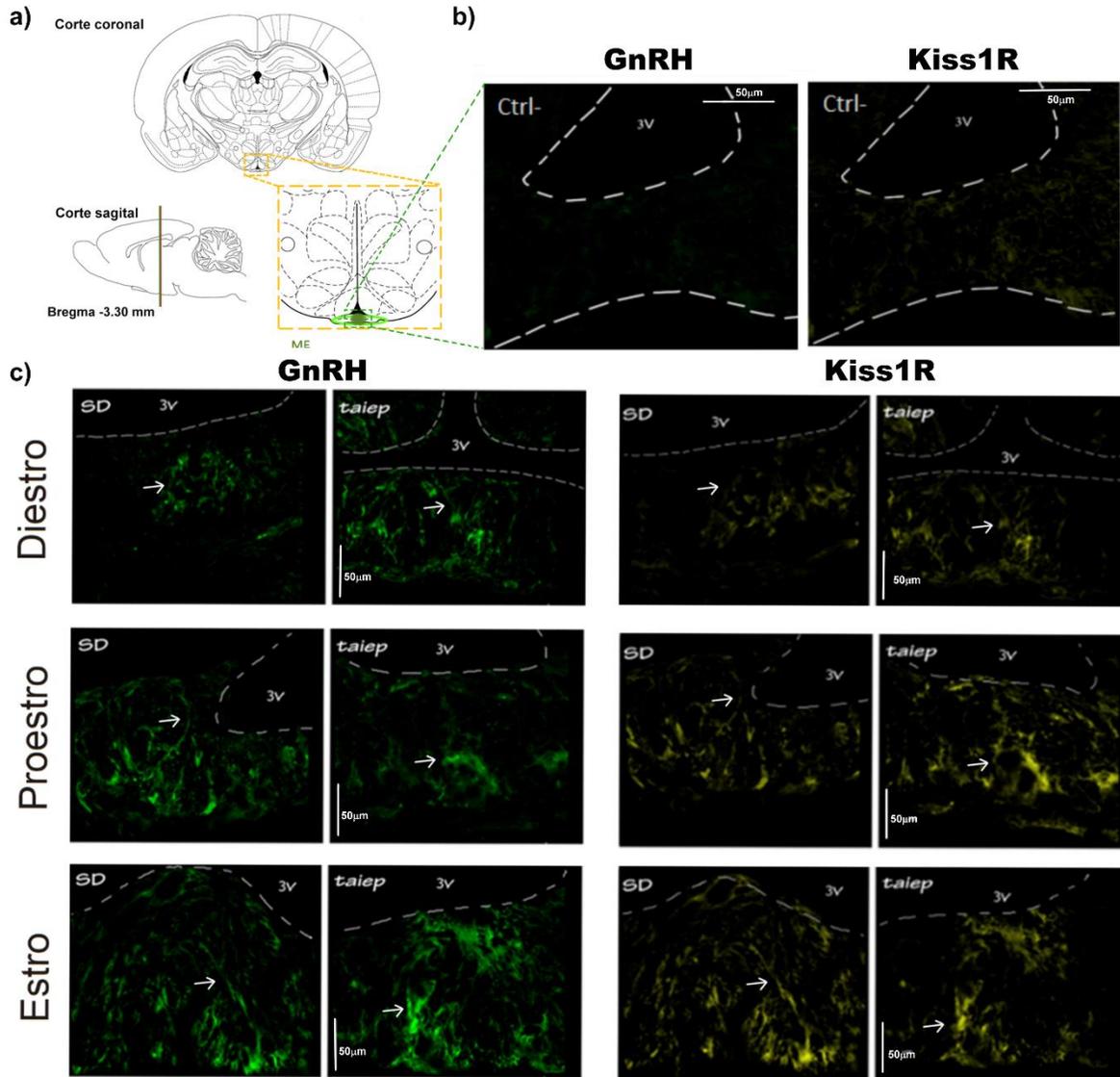
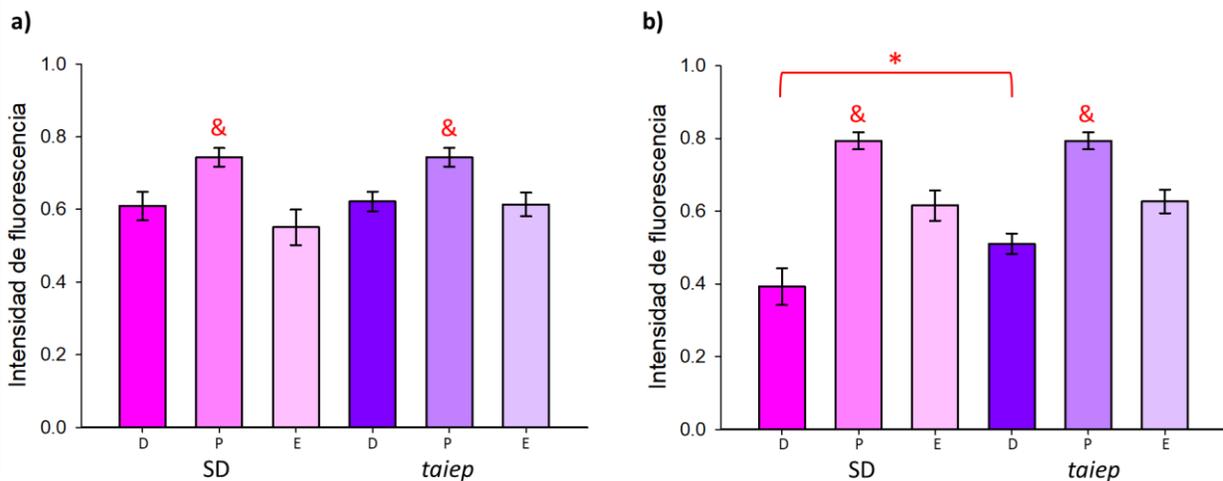


Ilustración 11. Expresión de GnRH y Kiss1R en la ME por etapa del ciclo estral. En a) se observa el esquema de la localización de la ME, modificado de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestran controles negativos de la expresión de GnRH y Kiss1R. En c) se muestran micrografías de la presencia de GnRH y Kiss1R en ME de las ratas SD y *taiep* en las diferentes etapas del ciclo estral. Las flechas blancas señalan las fibras que expresan GnRH y Kiss1R. Abreviaturas: ME: eminencia media, 3V: tercer ventrículo, SD: Sprague-Dawley, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, Kiss1R: receptor a kisspeptina 1.

El análisis mostro que no hay diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia de GnRH en ME entre ambas cepas (DF=1, F=0.809, p=0.371), pero mostró que la intensidad de fluorescencia varía de acuerdo con el ciclo estral (DF=2, F=12.313, p<0.001), tampoco se observó interacción entre ambas categorías

(DF=2, F=0.477, p=0.622). El análisis post hoc Holm-Sidak mostró que la mayor intensidad de fluorescencia se presenta en el proestro en ambas cepas en comparación con las demás etapas del ciclo estral (Gráfica 6 a).

Al analizar la intensidad de fluorescencia de Kiss1R en ME, la ANOVA de 2 vías mostró que no hay diferencias significativas entre las ratas *taiep* y SD (DF=1, F=2.309, p=0.132) pero se observa que la intensidad de fluorescencia varía de acuerdo con la etapa del ciclo estral (DF=2, F=48.311, p<0.001), tampoco se observó interacción entre ambas categorías (DF=2, F=1.747, p=0.179). La prueba post hoc Holm-Sidak mostró que la mayor intensidad de fluorescencia se presenta en el proestro en ambas cepas en comparación con las demás etapas del ciclo estral. Además de que la rata *taiep* en diestro presenta mayor intensidad de fluorescencia de Kiss1R en comparación con la rata SD en diestro (Gráfica 6 b).



Gráfica 6. Expresión de GnRH y Kiss1R en la ME por etapa del ciclo estral. En a) se muestran la intensidad de fluorescencia de GnRH y en b) la intensidad de fluorescencia de Kiss1R (total analizado 180 fibras inmunorreactivas por anticuerpo) de las ratas *taiep* y SD en diestro, proestro y estro, respectivamente. Los valores mostrados en las gráficas se presentan como la media  $\pm$  e.e.m. Análisis de la ANOVA 2 vías seguida de post hoc Holm-Sidak \* *taiep* vs SD, p<0.05; & comparación entre las diferentes etapas del ciclo estral de la misma cepa, p<0.05. Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley, D: diestro, P: proestro, E: estro.

Se observó la expresión de GnRH y Kiss1R en AVPV de las ratas *taiep* y SD a lo largo del ciclo estral (Ilustración 12).

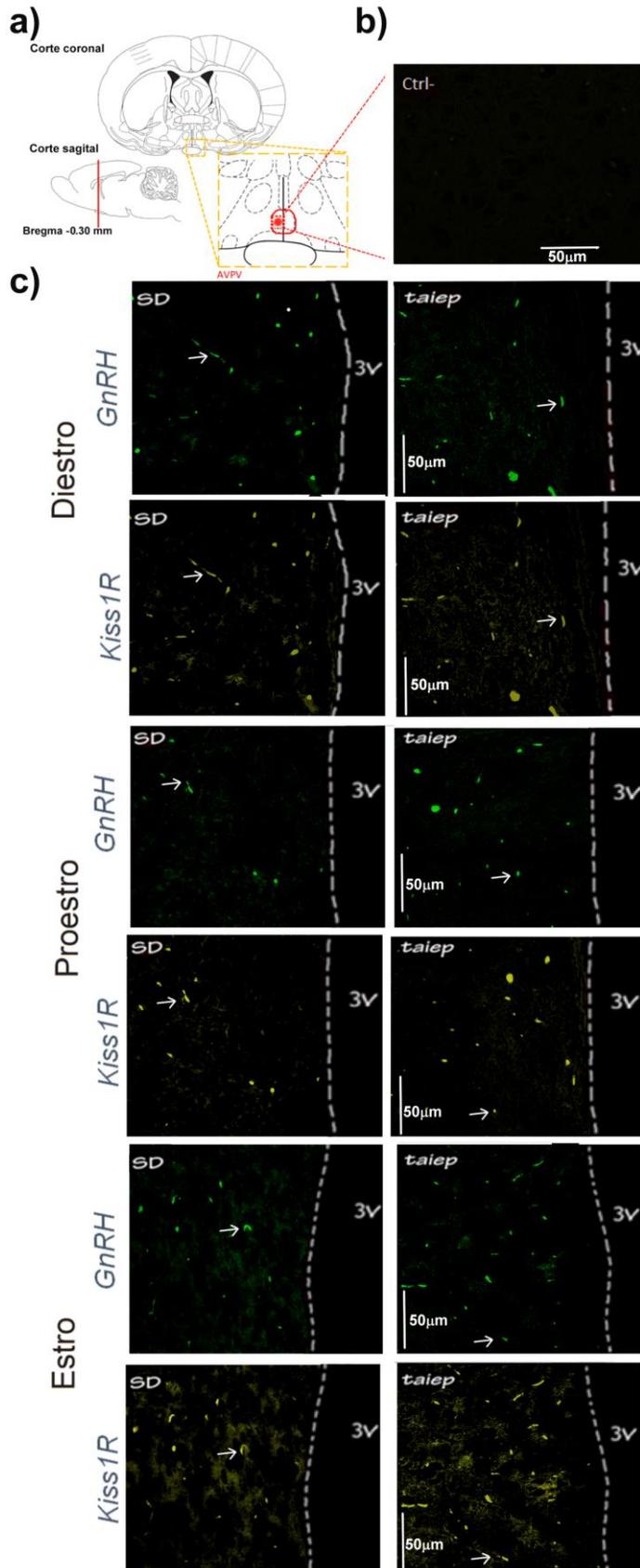
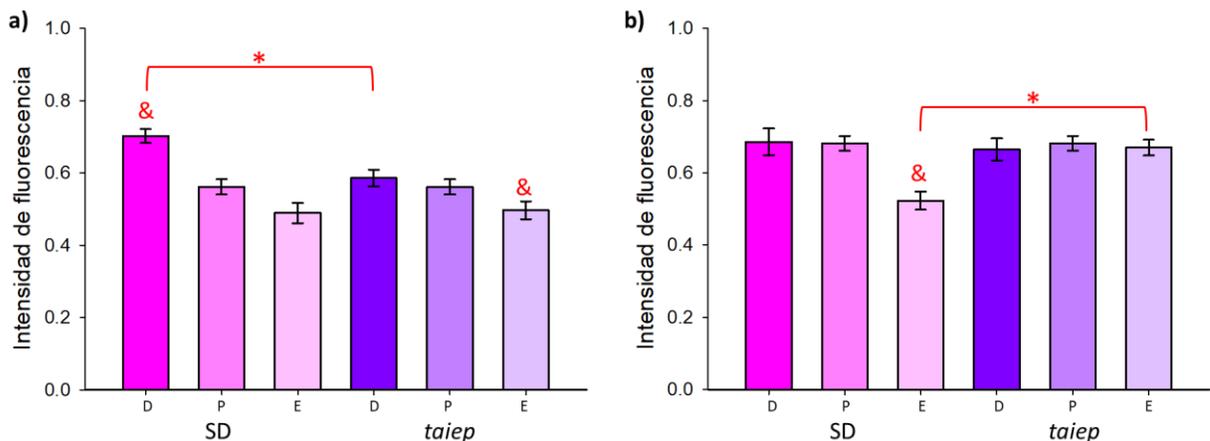


Ilustración 12. Expresión de GnRH y Kiss1R en AVPV por etapa del ciclo estral. En a) se observa el esquema de la localización del AVPV, modificado de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestra el control negativo de la expresión de GnRH y Kiss1R. En c) se muestran micrografías de la presencia de GnRH y Kiss1R en la región del AVPV de las ratas SD y *taiep*. Las flechas blancas señalan las fibras que expresan GnRH o Kiss1R. Abreviaturas: AVPV: área anteroventral periventricular, 3V: tercer ventrículo, SD: Sprague-Dawley, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, Kiss1R: receptor a kisspeptina 1.

Al analizar la intensidad de fluorescencia de GnRH en AVPV, la ANOVA de 2 vías no mostró diferencias significativas entre las ratas *taiep* y SD (DF=1, F=3.69, p=0.057), pero si observamos que la intensidad de fluorescencia cambia dependiendo de la etapa del ciclo estral (DF=2, F=21.476, p<0.001) y también mostró interacción entre ambas categorías (DF=2, F=4.546, p=0.012). La prueba post hoc Holm-Sidak mostró que la mayor intensidad de fluorescencia se presenta en el diestro de ambas cepas en comparación con el estro. Además de que en las ratas *taiep* en diestro hay menor intensidad de fluorescencia de GnRH en comparación con las ratas SD en diestro (Gráfica 7 a).

Al analizar la intensidad de fluorescencia de Kiss1R en AVPV, la ANOVA de 2 vías no mostró diferencias significativas entre las ratas *taiep* y SD (DF=1, F=3.782, p=0.054), pero observamos que la intensidad de fluorescencia varía dependiendo la etapa del ciclo estral (DF=2, F=6.461, p=0.002) y de la interacción entre ambas categorías (DF=2, F=6.002, p=0.003). De acuerdo con el análisis post hoc Holm-Sidak se observa que las ratas *taiep* en estro tienen mayor intensidad de fluorescencia de Kiss1R comparado con las ratas en SD en estro (Gráfica 7 b).



Gráfica 7. Expresión de GnRH y Kiss1R en AVPV por etapa del ciclo estral. En a) se muestran la intensidad de fluorescencia de GnRH y en b) la intensidad de fluorescencia de Kiss1R (total analizado 180 fibras inmunorreactivas por anticuerpo) de las ratas *taiep* y SD en diestro, proestro y estro, respectivamente. Los valores mostrados en las gráficas se presentan como la media  $\pm$  e.e.m. Análisis de ANOVA de 2 vías seguido de post hoc Holm-Sidak; \* *taiep* vs SD, p<0.05; & comparación entre las diferentes etapas del ciclo estral de la misma cepa, p<0.05. Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley, D: diestro, P: proestro, E: estro.

## Caracterización de los machos *taiep* (90 días)

### Peso corporal y de los órganos

Los machos *taiep* tienen menor peso corporal en comparación con los machos SD (Tabla 12). Con respecto al peso de los órganos se observaron diferencias significativas tales como menor peso del cerebro, mayor peso de la hipófisis, las vesículas seminales, la masa adrenal, la masa de los epidídimos y el testículo izquierdo y derecho de las ratas *taiep* al compararse con el peso de los órganos de las ratas SD (Tabla 12).

Tabla 12. Peso corporal (g), del cerebro (g), de la hipófisis, las adrenales y de los órganos reproductivos (mg/100gPC) de las ratas SD y *taiep* macho.

|                         | SD           | <i>taiep</i> | Diferencia de medias | t     | p      |
|-------------------------|--------------|--------------|----------------------|-------|--------|
| Peso corporal           | 441.97±7.01  | 308.27±5.15  | 133.70               | 15.36 | <0.001 |
| Cerebro                 | 1.47±0.019   | 1.33±0.02    | 0.14                 | 5.02  | <0.001 |
| Hipófisis               | 3.85±0.41    | 5.32±0.40    | -1.47                | -2.58 | 0.02   |
| Masa adrenal            | 13.95±1.219  | 17.90±1.10   | -3.95                | -2.41 | 0.03   |
| Vesícula seminal        | 284.43±17.88 | 428.23±31.29 | -143.80              | -3.99 | 0.003  |
| Masa de los epidídimos  | 309.92±20.64 | 377.85±12.06 | -67.93               | -2.84 | 0.02   |
| Testículos<br>Izquierdo | 416.38±16.43 | 521.42±19.71 | -105.05              | -4.09 | 0.002  |
| Derecho                 | 418.66±19.52 | 515.79±14.25 | -97.13               | -4.02 | 0.002  |

Los valores del peso se muestran como la media ± e.e.m.; con una n=6 por grupo; las comparaciones se hicieron mediante la prueba de t-Student, SD vs *taiep*. Abreviaturas: mg/100gPC: miligramos por cada 100 g de peso corporal, SD: Sprague-Dawley.

### Concentración sérica de LH y testosterona

Se observó una menor concentración sérica de LH en la rata *taiep* en comparación con las ratas SD; sin cambios en las concentraciones séricas de testosterona (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración sérica de LH y de Testosterona.

|                      | SD          | <i>taiep</i> | Diferencia de medias | t      | p     |
|----------------------|-------------|--------------|----------------------|--------|-------|
| LH (ng/mL)           | 17.53±3.308 | 13.312±0.389 | 4.217                | 3.001  | 0.013 |
| Testosterona (ng/mL) | 8.183±0.673 | 11.257±1.448 | -3.073               | -1.925 | 0.083 |

Los valores se muestran como la media  $\pm$  e.e.m.; con una n=6 por grupo; las comparaciones se hicieron mediante la prueba de t-Student SD vs *taiep*. Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley.

### Análisis de la expresión hipotalámica de kisspeptina, GnRH y el receptor Kiss1R

#### Expresión de kisspeptina en ARC

En la Ilustración 13 se muestra la expresión de IRcb a kisspeptina en el ARC. Se realizó el análisis del dimorfismo sexual del número de IRcb a kisspeptina, para esto se compararon los machos con las hembras en diestro, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Clarkson & Herbison, 2006; Takumi *et al.*, 2011; Overgaard *et al.*, 2013; Marraudino *et al.*, 2017).

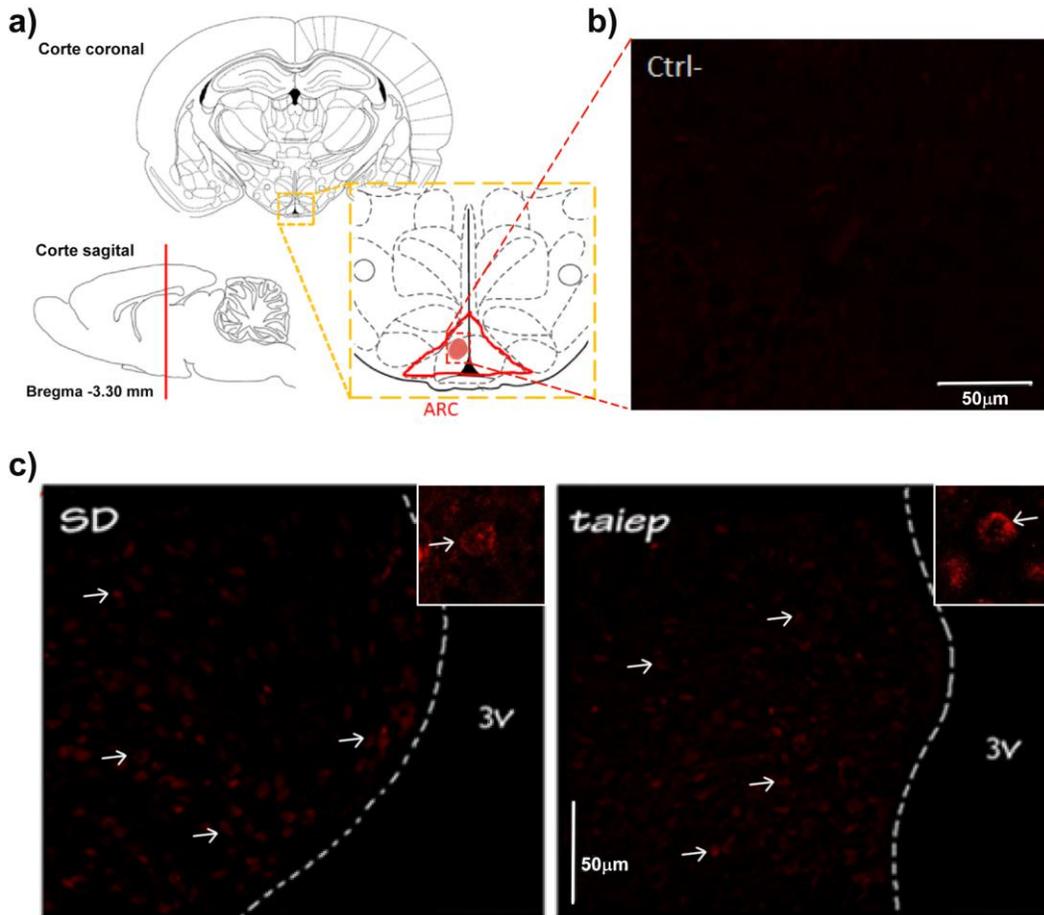
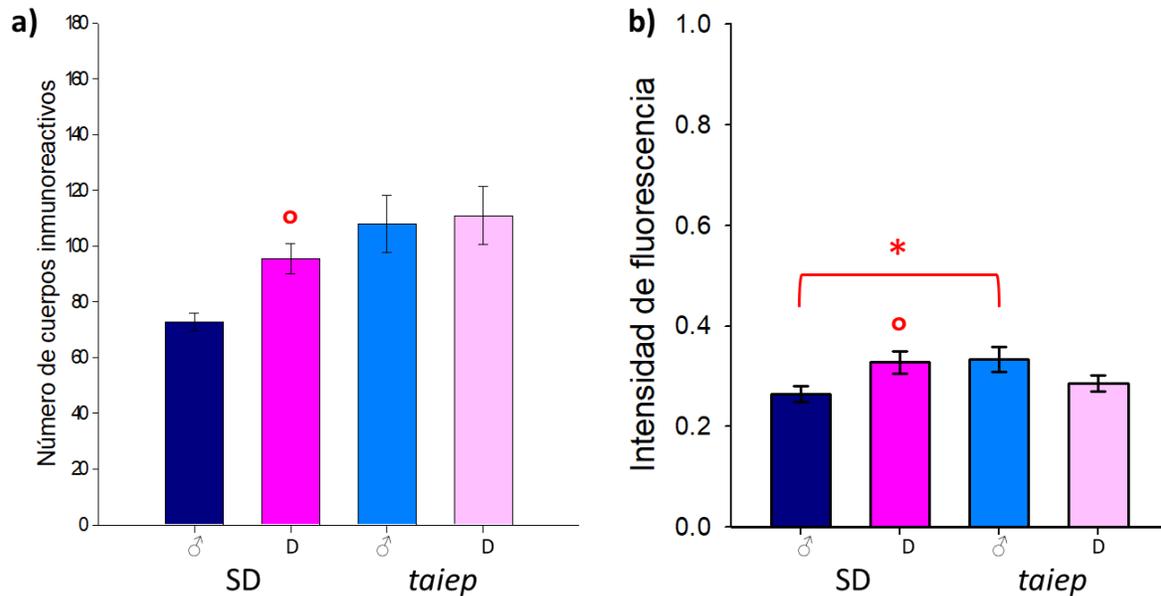


Ilustración 13. Expresión de kisspeptina en el macho a nivel del ARC. En a) se muestra un esquema con la localización del ARC, modificado de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestra el control negativo de la expresión de kisspeptina. En c) se muestran micrografías de la presencia de expresión de kisspeptina del ARC de las ratas *taiep* y SD macho; en los recuadros se presenta una ampliación con zoom 4X de los cuerpos celulares. Las flechas blancas señalan los cuerpos celulares inmunorreactivos a kisspeptina. Abreviaturas: IRcb: cuerpos celulares inmunorreactivos; ARC: núcleo arcuato, 3V: tercer ventrículo, SD: Sprague-Dawley.

Se observó la presencia de IRcb a kisspeptina en ARC de las ratas *taiep* y SD macho (Ilustración 13). Para analizar el número de IRcb se realizó una prueba ANOVA de 2 vías la cual mostró que las ratas *taiep* tienen mayor número de IRcb en comparación con las ratas SD (DF=1, F=10.052, p=0.005), no hay diferencia entre los machos y las hembras en diestro (DF=1, F=2.647, p=0.119), ni interacción de ambas categorías (DF=1, F=1.514, p=0.233). Las ratas *taiep* macho tienen mayor número de IRcb en comparación con las ratas SD macho (Gráfica 8 a).

Al realizar el análisis de intensidad de fluorescencia la prueba de ANOVA de 2 vías no mostró diferencias entre las ratas *taiep* y SD (DF=1, F=0.458, p=0.500), ni entre los diferentes sexos (DF=1, F=0.137, p=0.712), pero observamos que si hay interacción entre ambas categorías (DF=1, F=7.807, p=0.006). El análisis post hoc Holm-Sidak mostró que las ratas *taiep* macho tienen mayor intensidad de fluorescencia en comparación con los machos SD (Gráfica 8 b).



Gráfica 8. Expresión de kisspeptina en el ARC de la rata *taiep* y SD macho. En a) se muestra el número de IRcb a kisspeptina en las ratas *taiep* y SD (total analizado: 192 cortes). En b) se muestra la intensidad de fluorescencia de los IRcb de las ratas *taiep* y SD (total analizado: 240 IRcb, n= 60 IRcb por grupo). Los valores mostrados en la gráfica se presentan como la media ± e.e.m. Análisis de ANOVA 2 vías seguido de post hoc Holm-Sidak; \* *taiep* vs SD, p<0.05; ° comparación entre machos y hembras en diestro de la misma cepa, p<0.05. Abreviaturas: IRcb: cuerpos celulares inmunorreactivos, SD: Sprague-Dawley; D: diestro; ♂: macho.

### Expresión de kisspeptina en AVPV

En la Ilustración 14 se muestra la expresión de IRcb a kisspeptina en el AVPV. Se realizó el análisis del dimorfismo sexual del número de IRcb a kisspeptina, para esto se compararon los machos con las hembras en diestro, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Clarkson & Herbison, 2006; Takumi *et al.*, 2011; Overgaard *et al.*, 2013; Marraudino *et al.*, 2017).

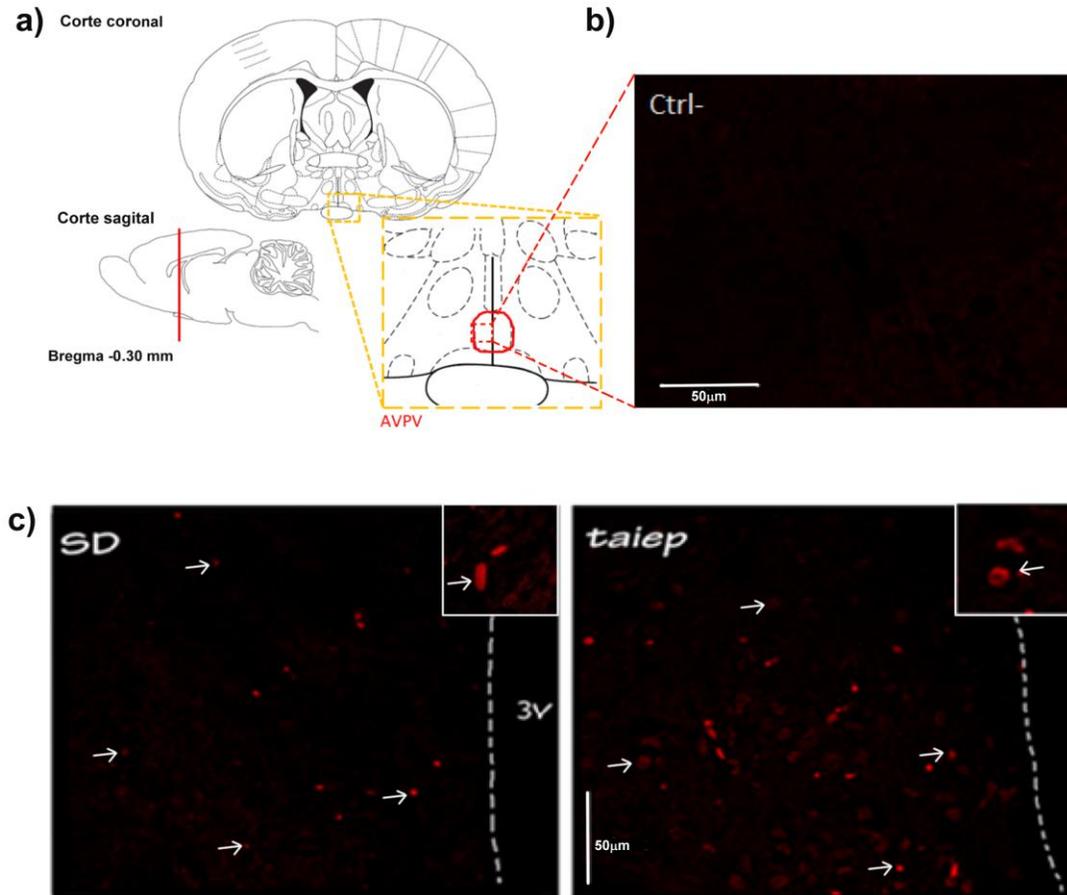
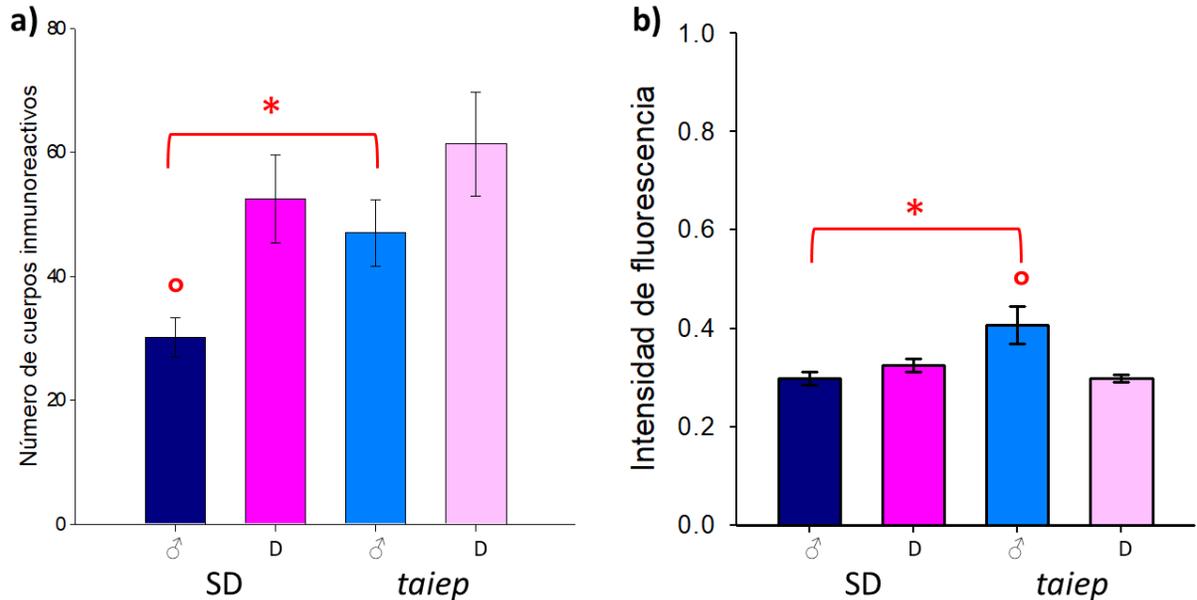


Ilustración 14. Expresión de kisspeptina en el macho a nivel del AVPV. En a) se muestra un esquema con la localización del AVPV, modificado de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestra el control negativo de la expresión de kisspeptina. En c) se muestran micrografías de la presencia de expresión de kisspeptina del AVPV de las ratas *taiep* y SD macho; en los recuadros se presenta una ampliación con zoom 4X de los cuerpos celulares. Las flechas blancas señalan los cuerpos celulares inmunorreactivos a kisspeptina. Abreviaturas: AVPV: área anteroventral periventricular, 3V: tercer ventrículo, SD: Sprague-Dawley.

Se observó la presencia de IRcb a kisspeptina en AVPV del hipotálamo de las ratas *taiep* y SD macho (Ilustración 14). El número de IRcb se analizó con una prueba ANOVA de 2 vías la cual no mostró diferencias entre las ratas *taiep* y SD (DF=1, F= 4.131,  $p=0.056$ ), pero se observa que el número de IRcb es diferente entre los machos y las hembras en diestro (DF=1, F= 8.431,  $p=0.009$ ). No se observa interacción entre ambas categorías (DF=1, F= 0.401,  $p=0.534$ ). Las ratas SD macho presentan un menor número de IRcb en comparación con las ratas SD en diestro, este efecto no se observa en las ratas *taiep* (Gráfica 9 a).

La prueba de ANOVA de 2 vías no mostró diferencias en la intensidad de fluorescencia entre las ratas *taiep* y SD (DF=1, F=3.653, p=0.059), o por sexo de los animales (DF=1, F=3.509, p=0.064), pero observamos que sí hay interacción entre ambas categorías (DF=1, F=9.749, p=0.002). El análisis post hoc Holm-Sidak mostró que la intensidad de fluorescencia es mayor en los machos *taiep* en comparación a los machos SD (Gráfica 9 b).



Gráfica 9. Expresión de kisspeptina en el AVPV de la rata *taiep* y SD macho. En a) se muestra el número de IRcb a kisspeptina en las ratas *taiep* y SD (total analizado: 192 cortes). En b) se muestra la intensidad de fluorescencia de los IRcb de las ratas *taiep* y SD (total analizado: 120 IRcb, n= 30 IRcb por grupo). Los valores mostrados en la gráfica se presentan como la media ± e.e.m. Análisis de ANOVA 2 vías seguido de post hoc Holm-Sidak; \* *taiep* vs SD, p<0.05; ° comparación entre machos y hembras en diestro de la misma cepa, p<0.05. Abreviaturas: IRcb: cuerpos celulares inmunorreactivos, SD: Sprague-Dawley; D: diestro; ♂: macho.

### Expresión de GnRH y Kiss1R en ME y AVPV

En la ME se observaron fibras que coexpresan GnRH y Kiss1R (Ilustración 15). No se observan diferencia en la distribución de las fibras inmunoreactivas a GnRH y Kiss1R en la ME (Ilustración 16), ni en el AVPV del hipotálamo de las ratas *taiep* y SD macho (Ilustración 17).

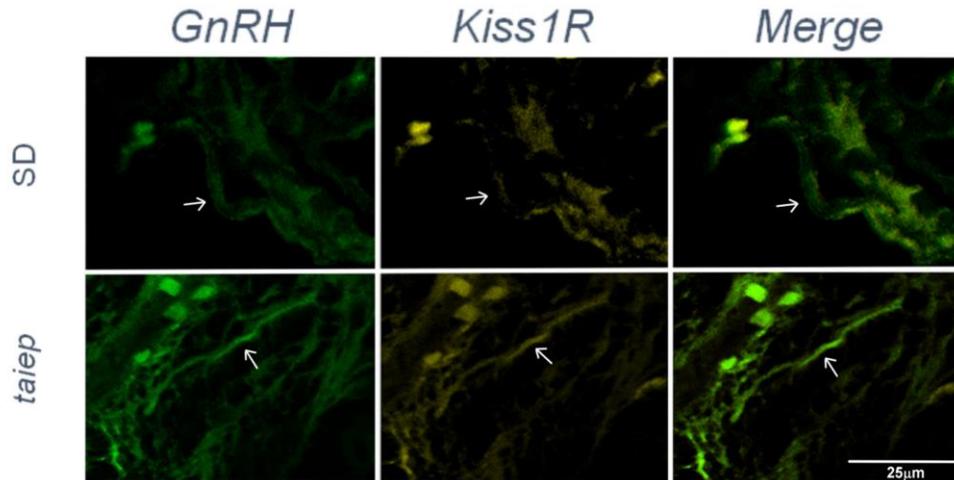


Ilustración 15. Merge de la expresión de GnRH y Kiss1R en la ME del macho SD y *taiep*. Las flechas blancas señalan las fibras. Abreviaturas: ME: eminencia media, SD: Sprague-Dawley, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, Kiss1R: receptor a kisspeptina 1.

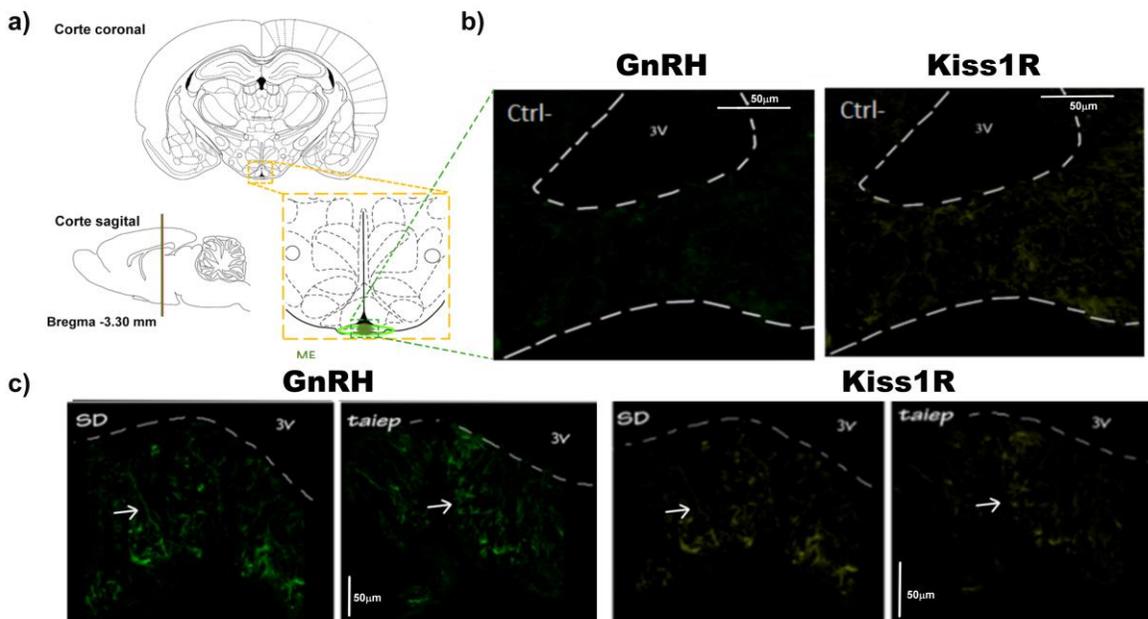


Ilustración 16. Expresión de GnRH y Kiss1R en el macho a nivel de la ME. En a) se muestra un esquema donde se indica en verde la ME, modificado de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestra

el control negativo de GnRH y Kiss1R. En c) se muestran micrografías de las fibras GnRHérgicas y de la expresión del Kiss1R en ME de las ratas SD y *taiep* macho. Las flechas blancas señalan las fibras inmunorreactivas. Abreviaturas: ME: eminencia media, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, Kiss1R: receptor a kisspeptina 1, 3V: tercer ventrículo, SD: Sprague-Dawley.

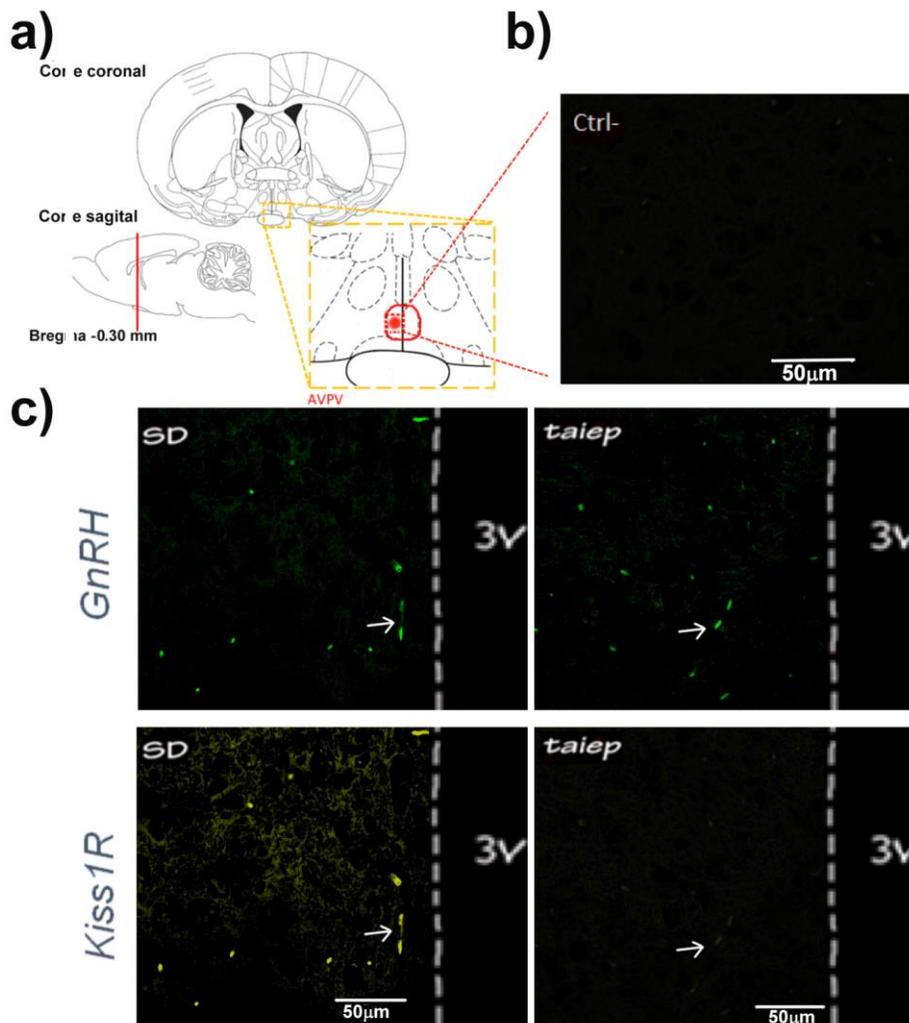
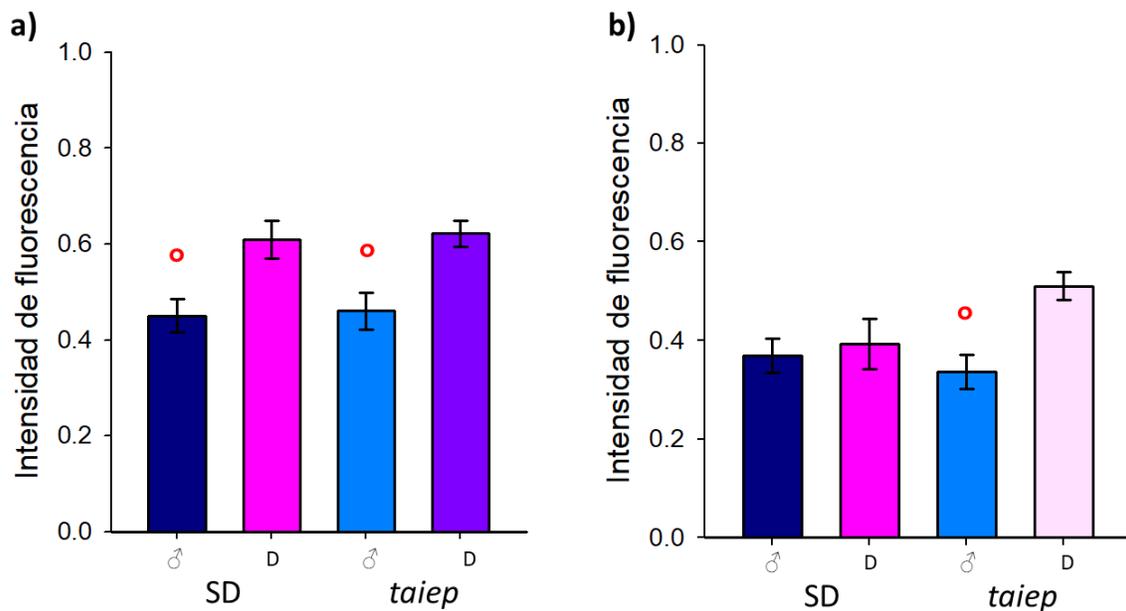


Ilustración 17. Expresión de GnRH y Kiss1R en el macho a nivel del AVPV. En a) se muestra un esquema donde se indica el AVPV, modificado de Paxinos y Watson, 1998. En b) se muestra el control negativo de GnRH y Kiss1R. En c) se muestran micrografías de las fibras GnRHérgicas y de la expresión del Kiss1R en ME de las ratas SD y *taiep* macho. Las flechas blancas señalan las fibras inmunorreactivas. Abreviaturas: AVPV: área anteroventral periventricular, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, Kiss1R: receptor a kisspeptina 1, 3V: tercer ventrículo, SD: Sprague-Dawley.

No se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia de GnRH ni de Kiss1R en la ME entre las ratas *taiep* y SD (GnRH: DF=1, F= 0.109, p=0.742; Kiss1R: DF=1, F= 1.238, p=0.270). Además, el análisis mostró que los machos

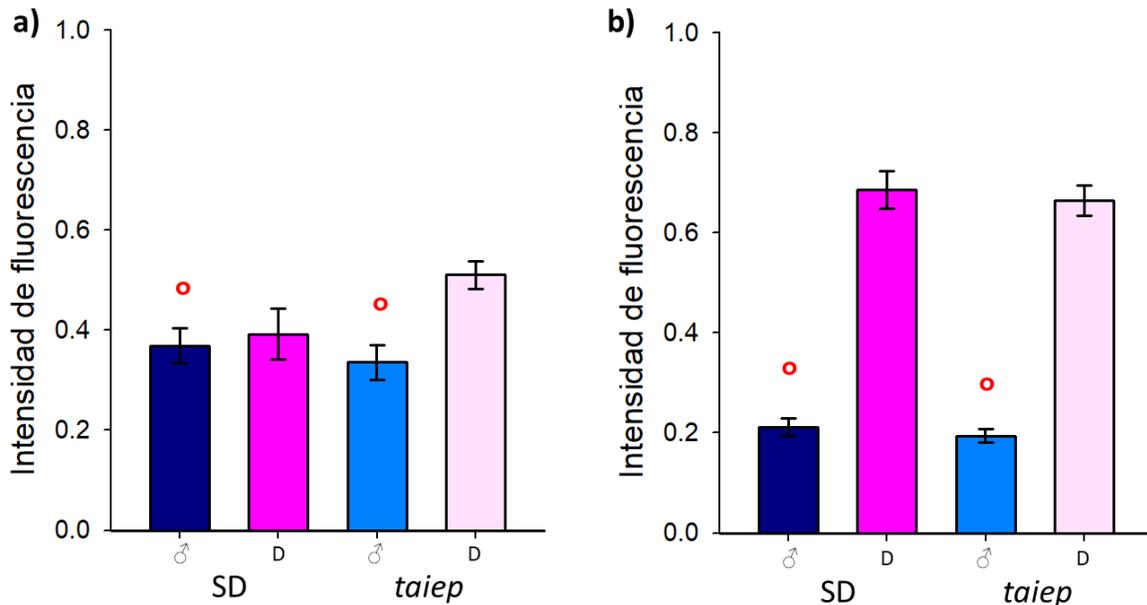
tienen una menor intensidad de fluorescencia de GnRH y Kiss1R que las hembras en diestro (GnRH: DF=1, F= 20.654,  $p < 0.001$ ; Kiss1R: DF=1, F= 6.735,  $p = 0.012$ ). No se observó interacción entre ambas categorías (GnRH: DF=1, F= 0.000403,  $p = 0.984$ ; Kiss1R: DF=1, F= 3.926,  $p = 0.052$ ). Las ratas *taiep* y SD macho presentan menor intensidad de fluorescencia de GnRH que las hembras en diestro; en el caso de la intensidad de fluorescencia de Kiss1R solo la rata *taiep* macho mostró menor intensidad al compararse con la hembra en diestro *taiep* (Gráfica 10).



Gráfica 10. Expresión de GnRH y Kiss1R en la ME del macho SD y *taiep*. En a) se muestran la intensidad de fluorescencia de GnRH y en b) la intensidad de fluorescencia de Kiss1R (total analizado: 60 fibras inmunorreactivas por anticuerpo) de las ratas *taiep* y SD macho y hembras en diestro. Los valores mostrados en las gráficas se presentan como la media  $\pm$  e.e.m. Análisis de ANOVA 2 vías seguido de post hoc Holm-Sidak,  $n = 6$  animales por grupo; ° comparación entre machos y hembras en diestro de la misma cepa,  $p < 0.05$ . Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley; D: diestro; ♂: macho.

Las ANOVAs de 2 vías no mostraron diferencias en la intensidad de fluorescencia de GnRH o de Kiss1R en el AVPV entre las cepas *taiep* y SD (GnRH: DF=1, F= 3.620,  $p = 0.061$ ; Kiss1R: DF=1, F= 0.529,  $p = 0.469$ ). Sin embargo, el análisis mostró que los machos tienen una menor intensidad de fluorescencia de GnRH y Kiss1R que las hembras en diestro (GnRH: DF=1, F= 36.817,  $p < 0.001$ ; Kiss1R: DF=1, F= 322.817,  $p < 0.001$ ). No se observó interacción entre ambas categorías (GnRH:

DF=1,  $F= 3.258$ ,  $p= 0.075$ ; Kiss1R: DF=1,  $F= 0.00556$ ,  $p=0.941$ ). Las ratas *taiep* y SD macho presentan menor intensidad de fluorescencia que las hembras en diestro tanto para GnRH como para Kiss1R en AVPV; sin diferencias estadísticamente significativas entre los machos ni entre las hembras (Gráfica 11).



Gráfica 11. Expresión de GnRH y Kiss1R en AVPV del macho SD y *taiep*. En a) se muestran la intensidad de fluorescencia de GnRH y en b) la intensidad de fluorescencia de Kiss1R (total analizado 60 fibras inmunorreactivas por anticuerpo) de las ratas *taiep* y SD macho y hembras en diestro. Los valores mostrados en las gráficas se presentan como la media  $\pm$  e.e.m. Análisis de ANOVA 2 vías seguido de post hoc Holm-Sidak,  $n= 6$  animales por grupo; ° comparación entre machos y hembras en diestro de la misma cepa,  $p<0.05$ . Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley; D: diestro; ♂: macho.

### Morfología testicular

Al realizar una comparación preliminar en busca de diferencias entre las estructuras presentes en los túbulos seminíferos de las ratas *taiep* y SD observamos en ambas cepas la presencia de espermatogonias, espermatocitos, espermátides, espermatozoides, sin alteraciones evidentes (Ilustración 18).

Profundizando el análisis de los túbulos seminíferos, éstos se clasificaron en 3 categorías según lo descrito en la sección de la metodología “Morfología de los túbulos seminíferos” y de acuerdo con la Tabla 7.

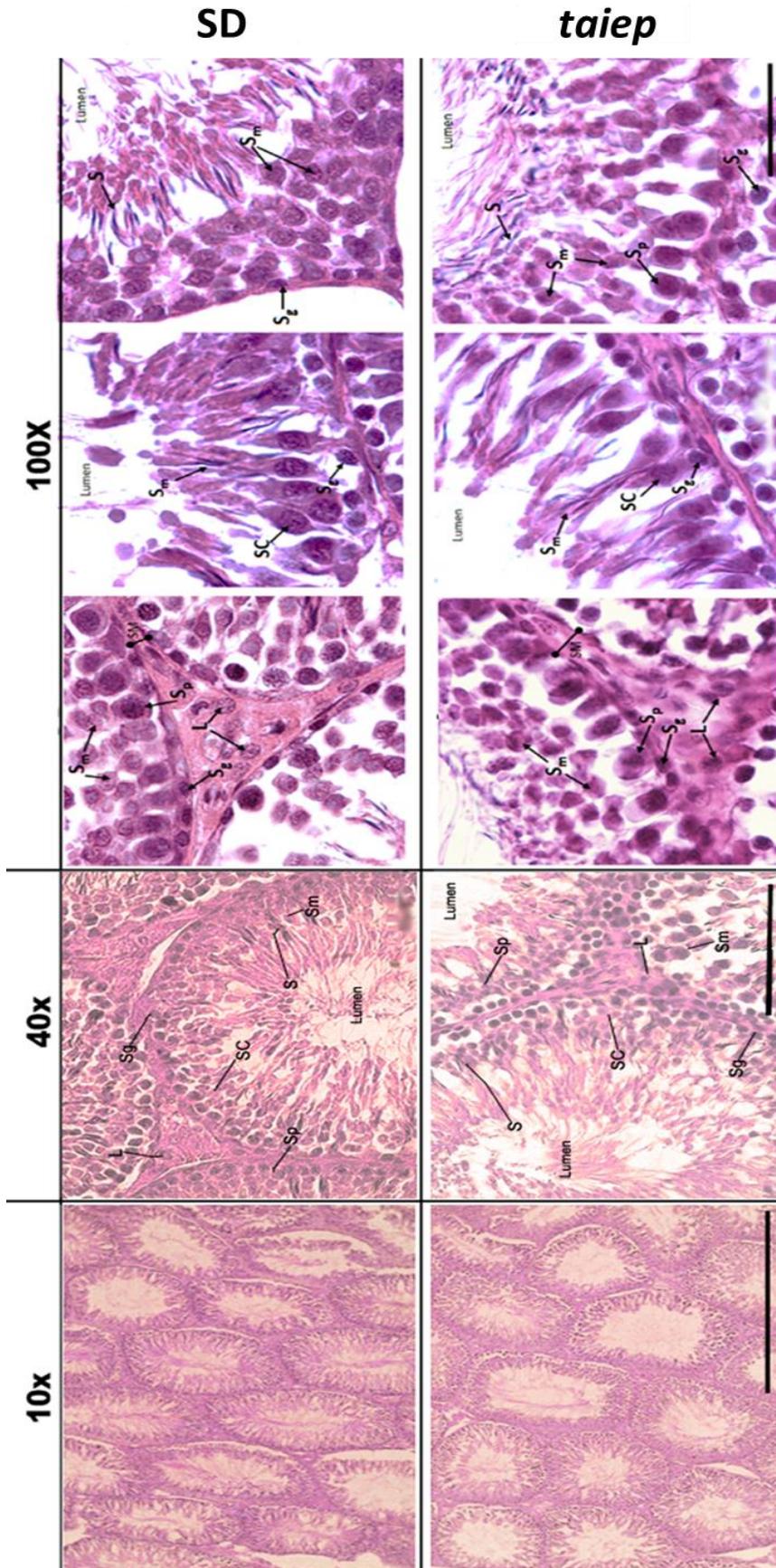
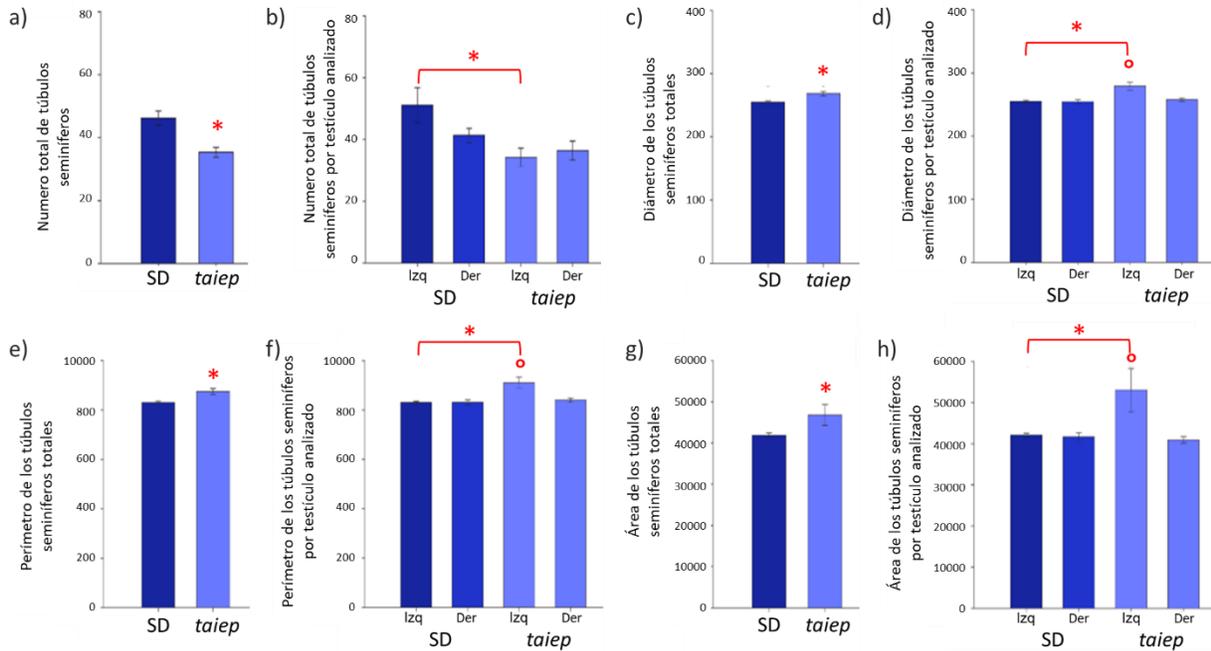


Ilustración 18. Composición de micrografías de los túbulos seminíferos de las ratas SD y *taiep*. Se señala en la imagen los diferentes tipos celulares presentes en los túbulos seminíferos. Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley, L: células de Leydig, SC: células de Sertoli, Sg: espermatogonias, Sp: espermatocitos, Sm: espermatídes, S: espermatídes elongadas. Escalas: 500 100 y 50  $\mu$ m respectivamente.

## Caracterización de los túbulos seminíferos de la categoría 1

El análisis por pares del número total de túbulos seminíferos mostró que las ratas *taiep* tienen menor número de túbulos seminíferos que las ratas SD (Gráfica 12 a). El análisis de ANOVA de 2 vías mostró que el número de túbulos seminíferos de la categoría 1 en las ratas *taiep* es menor en comparación con las ratas SD (DF=1, F=8.565, p=0.006), sin diferencias de acuerdo con el lado analizado del que se trate (DF=1, F=1.031, p=0.318), ni interacción entre ambas categorías (DF=1, F=2.601, p=0.117). El testículo izquierdo de las ratas *taiep* tiene un menor número de túbulos seminíferos de la categoría 1 en comparación con el testículo izquierdo de las ratas SD (Gráfica 12 b).

El diámetro, perímetro y área de los túbulos seminíferos de la categoría 1 es mayor en las ratas *taiep* en comparación con las ratas SD (Diámetro: DF=1, F= 15.702, p <0.001; Perímetro: DF=1, F= 14.765, p <0.001; Área: DF=1, F= 4.775, p= 0.029), (Gráfica 12 c, e, g). Además se observa que el testículo izquierdo es de mayor diámetro, perímetro y área de los túbulos seminíferos en comparación con el testículo derecho (Diámetro: DF=1, F= 10.081, p= 0.002; Perímetro: DF=1, F= 8.720, p= 0.003; Área: DF=1, F= 7.236, p= 0.007) y se observa interacción entre ambas categorías (Diámetro: DF=1, F= 9.078, p= 0.003; Perímetro: DF=1, F= 9.445, p= 0.002; Área: DF=1, F= 6.266, p= 0.013). El análisis post hoc Holm-Sidak mostró que el testículo izquierdo de las ratas *taiep* tienen túbulos seminíferos con un mayor diámetro, perímetro y área en comparación con el testículo contralateral de la rata *taiep* y con respecto al testículo izquierdo de las ratas SD (Gráfica 12 d, f, h).



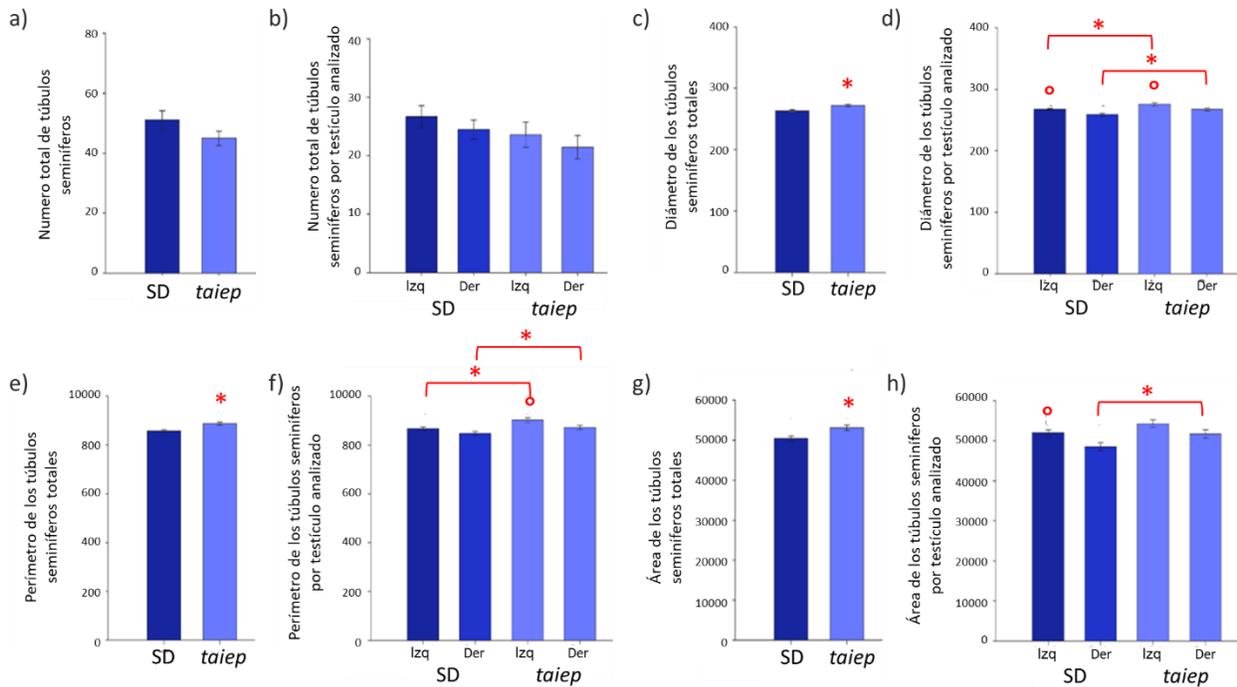
Gráfica 12. Análisis morfológico de los túbulos seminíferos de la categoría 1 de las ratas *taiep* y SD. En a) se muestra el número total de túbulos seminíferos. En c), e) y g) se muestra el diámetro, perímetro y área del total de túbulos seminíferos. En b) se muestra el número de túbulos seminíferos por testículo analizado. En d), f) y h) se muestra el diámetro, perímetro y área de los túbulos seminíferos por testículo analizado. Los valores mostrados en las gráficas se presentan como la media  $\pm$  e.e.m. Análisis de ANOVA 2 vías seguido de post hoc Holm-Sidak; \* *taiep* vs SD, ° comparación entre el lado izquierdo y derecho de la misma cepa,  $p < 0.05$ . Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley, Izq: Lado izquierdo, Der: Lado derecho.

## Caracterización de los túbulos seminíferos de la categoría 2

El análisis por pares del número total de túbulos seminíferos no mostró diferencias entre las ratas *taiep* y las ratas SD (Gráfica 13 a). El análisis de ANOVA de 2 vías no mostró diferencias entre las ratas *taiep* y las ratas SD (DF=1, F=2.545,  $p=0.120$ ), ni de acuerdo con lado analizado (DF=1, F=1.279,  $p=0.266$ ), ni interacción entre ambas categorías (DF=1, F=0.000841,  $p=0.977$ ), (Gráfica 13 b).

El diámetro, perímetro y área de los túbulos seminíferos de la categoría 2 es mayor en las ratas *taiep* en comparación con las SD (Diámetro: DF=1, F= 13.166,  $p < 0.001$ ; Perímetro: DF=1, F= 14.736,  $p < 0.001$ ; Área: DF=1, F= 8.581,  $p= 0.003$ ), (Gráfica 13 c, e, g). Además se observa que el testículo izquierdo presenta mayor diámetro, perímetro y área de los túbulos seminíferos en comparación con el testículo derecho (Diámetro: DF=1, F= 13.474,  $p < 0.001$ ; Perímetro: DF=1, F= 10.532,  $p= 0.001$ ; Área: DF=1, F= 10.794,  $p= 0.001$ ). No se observa interacción entre ambas categorías en ninguno de los parámetros analizados (Diámetro: DF=1, F= 0.000615,  $p= 0.980$ ; Perímetro: DF=1, F= 0.517,

$p= 0.472$ ; Área:  $DF=1$ ,  $F= 0.256$ ,  $p= 0.613$ ). El testículo izquierdo de las ratas *taiep* tienen túbulos seminíferos con un mayor diámetro y perímetro en comparación con su testículo contralateral y con respecto al testículo izquierdo de las ratas SD (Gráfica 13 d, f); también se observa que el área de los túbulos seminíferos del testículo derecho de las ratas *taiep* es mayor en comparación con los túbulos seminíferos del testículo derecho de las ratas SD (Gráfica 13 h).

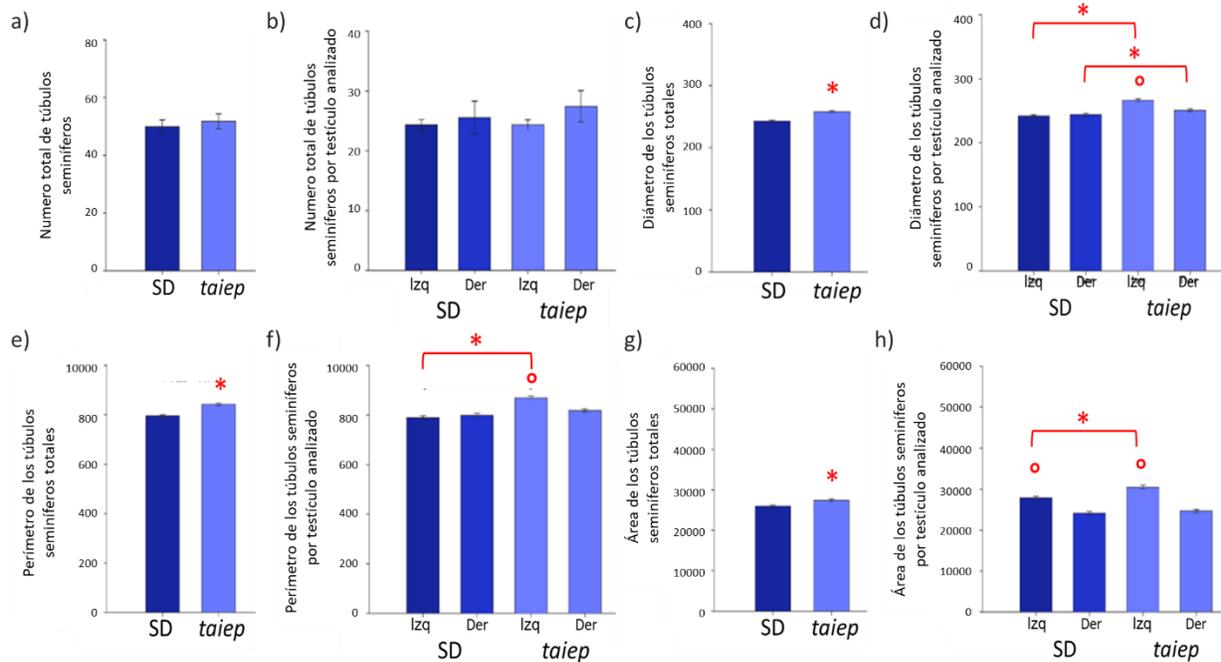


Gráfica 13. Análisis morfológico de los túbulos seminíferos de la categoría 2 de las ratas *taiep* y SD. En a) se muestra el número total de túbulos seminíferos. En c), e) y g) se muestra el diámetro, perímetro y área del total de túbulos seminíferos. En b) se muestra el número de túbulos seminíferos por testículo analizado. En d), f) y h) se muestra el diámetro, perímetro y área de los túbulos seminíferos por testículo analizado. Los valores mostrados en las gráficas se presentan como la media  $\pm$  e.e.m. Análisis de ANOVA 2 vías seguido de post hoc Holm-Sidak; \* *taiep* vs SD, ° comparación entre el lado izquierdo y derecho de la misma cepa,  $p<0.05$ . Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley, Izq: Lado izquierdo, Der: Lado derecho.

### Caracterización de los túbulos seminíferos de la categoría 3

El análisis por pares del número total de túbulos seminíferos no mostró diferencias entre las ratas *taiep* y las ratas SD (Gráfica 14 a). El análisis de ANOVA de 2 vías no mostró diferencias entre las ratas *taiep* y las ratas SD ( $DF=1$ ,  $F=0.225$ ,  $p=0.639$ ), sin diferencias de acuerdo al lado analizado ( $DF=1$ ,  $F=1.183$ ,  $p=0.285$ ), ni interacción entre ambas categorías ( $DF=1$ ,  $F=0.225$ ,  $p=0.639$ ), (Gráfica 14 b).

El diámetro, perímetro y área de los túbulos seminíferos de la categoría 3 es mayor en las ratas *taiep* en comparación con las ratas SD (Diámetro: DF=1, F= 51.615,  $p < 0.001$ ; Perímetro: DF=1, F= 45.904,  $p < 0.001$ ; Área: DF=1, F= 13.257,  $p < 0.001$ ), (Gráfica 14 c, e, g). El análisis también mostró que el testículo izquierdo presenta mayor diámetro, perímetro y área de los túbulos seminíferos en comparación con el testículo derecho (Diámetro: DF=1, F= 9.257,  $p = 0.002$ ; Perímetro: DF=1, F= 8.502,  $p = 0.004$ ; Área: DF=1, F= 118.159,  $p < 0.001$ ) y la presencia de interacción entre ambas categorías en los diferentes parámetros evaluados (Diámetro: DF=1, F= 16.311,  $p < 0.001$ ; Perímetro: DF=1, F= 16.518,  $p < 0.001$ ; Área: DF=1, F= 5.249,  $p = 0.022$ ). El análisis post hoc Holm-Sidak mostró que el testículo izquierdo de las ratas *taiep* tienen túbulos seminíferos con un mayor diámetro, perímetro y área en comparación con el testículo contralateral de la rata *taiep* y con respecto al testículo izquierdo de las ratas SD (Gráfica 14 d, f, h).



Gráfica 14. Análisis morfológico de los túbulos seminíferos de la categoría 3 de las ratas *taiep* y SD. En a) se muestra el número total de túbulos seminíferos. En c), e) y g) se muestra el diámetro, perímetro y área del total de túbulos seminíferos. En b) se muestra el número de túbulos seminíferos por testículo analizado. En d), f) y h) se muestra el diámetro, perímetro y área de los túbulos seminíferos por testículo analizado. Los valores mostrados en las gráficas se presentan como la media ± e.e.m. Análisis de ANOVA 2 vías seguido de post hoc Holm-Sidak; \* *taiep* vs SD, ° comparación entre el lado izquierdo y derecho de la misma cepa,  $p < 0.05$ . Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley, Izq: Lado izquierdo, Der: Lado derecho.

## Análisis espermático

### Número de espermatozoides

Con base en el análisis no se observaron diferencias significativas en el número total de espermatozoides presentes en 100 $\mu$ L de las muestras seminales obtenidas del epidídimo entre las ratas *taiep* y SD (Tabla 14). Al realizar el análisis de ANOVA de 2 vías no se observaron diferencias entre las ratas *taiep* y SD (DF=1, F=0.000108, p=0.992), sin importar el lado analizado (DF=1, F=1.406, p=0.250) y tampoco se observó interacción entre ambas categorías (DF=1, F=0.00213, p=0.964), (Tabla 14).

Tabla 14. Número de espermatozoides en las muestras seminales de 100 $\mu$ L de las ratas SD y *taiep*.

|                | SD                 | <i>taiep</i>       | DF | t     | p    |
|----------------|--------------------|--------------------|----|-------|------|
| Total          | 590.50 $\pm$ 83.09 | 591.67 $\pm$ 67.28 | 10 | -0.01 | 0.99 |
| Lado Izquierdo | 263.33 $\pm$ 19.77 | 327.17 $\pm$ 84.83 | -  | -     | -    |
| Lado Derecho   | 261.33 $\pm$ 24.57 | 330.33 $\pm$ 66.04 | -  | -     | -    |

Los valores se muestran como la media  $\pm$  e.e.m.; con una n=6 por grupo; la p mostrada se obtuvo mediante la prueba de T-Student, las demás comparaciones no se realizaron debido a los resultados de la ANOVA 2 de vías. Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley.

### Motilidad espermática

Al analizar el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, móviles no progresivos y no móviles de las muestras totales no se observan diferencias significativas entre la rata *taiep* y SD (Tabla 15).

Tabla 15. Evaluación total de la motilidad espermática.

| GRUPO                                    | SD    | <i>taiep</i> | Z     | P     |
|--|-------|--------------|-------|-------|
| % Espermatozoides móviles progresivos    | 27.38 | 29.86        | 0.878 | 0.380 |
| % Espermatozoides móviles no progresivos | 30.75 | 25.68        | 1.871 | 0.061 |
| % Espermatozoides no móviles             | 41.87 | 44.46        | 0.840 | 0.401 |
| %Total                                   | 100   | 100          | -     | -     |

Los valores se muestran como porcentaje, la p mostrada se obtuvo mediante la prueba de Z con respecto al número de espermatozoides. Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley

Al realizar los análisis por lado de obtención de la muestra, se observa que hay un incremento en el porcentaje de espermatozoides no móviles y un decremento de los espermatozoides móviles progresivos, en las muestras provenientes del lado izquierdo de la rata *taiep* comparado con la rata SD; el efecto contrario se observó en el lado derecho (Tabla 16).

Tabla 16. Evaluación de la motilidad espermática analizado por lado de obtención de la muestra en las ratas SD y *taiep*.

| GRUPO                                    | SD        |         | <i>taiep</i> |         | SD x <i>taiep</i> izquierdo |        | SD x <i>taiep</i> derecho |        |
|--|-----------|---------|--------------|---------|-----------------------------|--------|---------------------------|--------|
|  | Izquierdo | Derecho | Izquierdo    | Derecho | Z                           | p      | Z                         | p      |
| % Espermatozoides móviles progresivos    | 31.52     | 23.21   | 13.65        | 45.91   | 5.14                        | <0.001 | 5.63                      | <0.001 |
| % Espermatozoides móviles no progresivos | 31.39     | 30.10   | 25.57        | 25.78   | 1.47                        | 0.14   | 1.07                      | 0.28   |
| % Espermatozoides no móviles             | 37.09     | 46.68   | 60.77        | 28.31   | 5.64                        | <0.001 | 4.52                      | <0.001 |
| % Total                                  | 100       | 100     | 100          | 100     | -                           | -      | -                         | -      |

Los valores se muestran como porcentaje, la p mostrada se obtuvo mediante la prueba de Z con respecto al número de espermatozoides. Abreviaturas: SD: Sprague-Dawley

## Resumen resultados

En la Tabla 17 se muestra el resumen de resultado obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 17. Resumen de resultados en la rata *taiep*.

| Parámetro analizado |                            | Resultado  |
|---------------------|----------------------------|--|
| Desmielinización    |                            |  |
|                     | ARC-ME                     | ✓  |
|                     | AVPV                       | ✓  |
| Hembras             |                            |  |
|                     | Peso corporal              | ↓20%   |
|                     | Peso adrenales             | ↑40%   |
|                     | Peso órganos reproductivos | =SD  |
|                     | Ciclo estral               | Irregular  |
|                     | Ovulación                  | ✓  |
|                     | LH                         | ↓20%   |
|                     | Kisspeptina                | Estro:<br>ARC: ↑# ↓IF<br>AVPV: ↑# ↓IF  |
|                     | GnRH                       | =SD; ↑Proestro   |
|                     | KISS1R                     | =SD; ↑Proestro   |
| Machos              |                            |  |
|                     | Peso corporal              | ↓30%   |
|                     | Peso adrenales             | ↑30%   |
|                     | Peso órganos reproductivos | Testículo ↑24%<br>Vesícula seminal ↑50%<br>Epidídimos ↑22%   |
|                     | LH                         | ↓20%   |
|                     | Testosterona               | =SD  |
|                     | Kisspeptina                | ARC: =# ↑IF<br>AVPV: ↑# ↑IF  |
|                     | GnRH                       | =SD  |
|                     | KISS1R                     | =SD  |
|                     | Tubulos seminiferos        | ↑Tamaño total<br>↑ Tamaño testículo izquierdo  |
|                     | Espermatozoides            | =#<br>=Motilidad total<br>Muestra lado izquierdo<br>↓móviles progresivos<br>↑no móviles<br>Muestra lado derecho<br>↑móviles progresivos<br>↓no móviles |

Los porcentajes mostrados en la tabla se calcularon con base a los valores obtenidos en la rata SD. Simbología: ✓: indican la presencia del parámetro evaluado, =SD: indica que se observa el mismo valor en las ratas SD, =: indica que no hay cambio en el parámetro analizado, ↑: indica aumento, ↓: indica disminución. Abreviaturas: IRcb: cuerpos celulares inmunorreactivos, SD: Sprague-Dawley, IF: intensidad de fluorescencia, #: número de IRcb.

## Discusión

Los resultados del presente trabajo muestran que la rata *taiep* a nivel del ARC y AVPV tienen menor presencia de mielina, lo cual apoyan nuestra hipótesis y los reportes previos de que la rata *taiep* presenta la pérdida parcial de la mielina en el sistema nervioso central (Duncan *et al.*, 1992; O'Connor *et al.*, 2000; Alata *et al.*, 2021; Vargas-Castro *et al.*, 2021). La pérdida de mielina junto con los reportes del decremento del volumen cerebral (Alata *et al.*, 2021), podrían ser la razón del menor peso del cerebro en las ratas *taiep* que observamos en el presente estudio. Por otro lado, la disminución del peso corporal observada en la rata *taiep* también se ha reportado en el modelo EAE (Milosevic *et al.*, 2020), y en los pacientes con MS (Reder *et al.*, 1994; Bergamaschi *et al.*, 2006) y Huntington (Djousse *et al.*, 2002; Aziz *et al.*, 2008). Debido a que el proceso desmielinizante descrito para la rata *taiep* es acompañado de neuroinflamación crónica y de la disminución de TGF $\beta$ 1 a nivel central (Soto-Rodriguez *et al.*, 2015), es posible que ambos factores alteren algún mecanismo a nivel hipotalámico que participe en el control del metabolismo, lo que llevaría a la disminución del peso corporal observado en nuestro modelo animal. Se ha propuesto que la disminución de TGF $\beta$ 1 a nivel del hipotálamo medio basal incrementa el metabolismo, resultando en una baja ganancia de peso y poca acumulación de grasa corporal en ratas alimentadas con dietas altas en grasa (Mendes *et al.*, 2018). En el modelo de rata *taiep* no se ha cuantificado el porcentaje de grasa corporal, tampoco se han investigado los mecanismos de control de la ingestión de alimentos, por lo que el profundizar el estudio de estos parámetros podría brindar información que complementen la explicación del menor peso corporal y no solo atribuirlo a un mayor gasto energético.

La disminución del peso corporal observado en la rata *taiep* es más pronunciada en los machos que en las hembras, los machos *taiep* pesan 30% menos que los machos SD, por el contrario, las hembras *taiep* pesan 20% menos que las hembras SD. Este efecto se ha observado en humanos sometidos a dieta baja en calorías (Trouwborst *et al.*, 2021) esto podría deberse a que los requerimientos energéticos son mayores en hombres que en mujeres debido a

que presentan una mayor masa corporal (Christensen *et al.*, 2018) aunado al hecho de que el ambiente hormonal, dado por las hormonas esteroideas, es diferente entre ambos sexos afectando de forma diferenciada la pérdida muscular (Anderson *et al.*, 2017). Como se mencionó previamente no hay estudios de la pérdida de grasa corporal y la ingesta en la rata *taiep* tomando en cuenta esto por ahora solo podríamos suponer que la pérdida de peso es causado por los diferentes requerimientos energéticos y la diferencia en el ambiente hormonal entre machos y hembras que llevarían a que el macho presente una pérdida más rápida de peso que las hembras.

De acuerdo con nuestra hipótesis las ratas *taiep* de ambos sexos tuvieron mayor peso de las glándulas adrenales, lo que se ha observado también en pacientes con MS (Reder *et al.*, 1994). El incremento del tamaño de la adrenal tanto en los pacientes como en la rata *taiep* podría deberse a la constante activación del eje HHA causado por el proceso inflamatorio que lleva a la desmielinización. Lo cual estaría acompañado de alteraciones en la concentración de glucocorticoides, cuya actividad antiinflamatoria modula la respuesta inmune (Trifunovic *et al.*, 2021), además de su actividad neuroprotectora (Sugimura *et al.*, 2005). En el caso de los pacientes de MS (Berg *et al.*, 2004) y en el modelo EAE (Trifunovic *et al.*, 2021) se ha reportado un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este incremento de ROS en el modelo EAE, es causado por el decremento del ambiente antioxidante alrededor de la hipófisis, produciendo estrés oxidativo. Lo que resulta en el incremento de la concentración de la hormona adrenocorticotrópica y de corticosterona (Trifunovic *et al.*, 2021). Considerando lo anterior, es posible que en la rata *taiep* el incremento de citocinas proinflamatorias en el cerebro (Leon-Chavez *et al.*, 2006; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015), junto con posibles alteraciones en la presencia de ROS a nivel de la hipófisis, cause mayor secreción de corticosterona lo que llevaría al incremento del tamaño de la adrenal. Se sabe que la adrenal es una glándula con gran capacidad regenerativa y de adaptación a diferentes condiciones fisiológicas y patológicas (Kanczkowski *et al.*, 2017), por lo que, es posible que el incremento en el tamaño de la adrenal sea una adaptación del órgano, que le

permita mantener su función y mantener controlado el proceso inflamatorio ante la desmielinización progresiva que presenta el modelo animal utilizado en la presente investigación.

En los roedores las neuronas kisspeptidérgicas que controlan la función reproductiva están presentes en las regiones del ARC y AVPV; además de que se ha reportado una mayor población de neuronas kisspeptidérgicas en el ARC en comparación del AVPV (Takumi *et al.*, 2011; Overgaard *et al.*, 2013; Kinsey-Jones *et al.*, 2014). De acuerdo con lo anterior, observamos que el proceso desmielinizante presente en la rata *taiep* no altera la distribución de las neuronas kisspeptidérgicas en las regiones del AVPV y ARC, además de que se conserva la diferencia en el número de neuronas presente en ambas regiones, en el caso de las ratas SD la diferencia entre ambos núcleos es de un 38% y para las ratas *taiep* es de un 36% aproximadamente.

El AVPV presenta dimorfismo sexual con respecto a la presencia de neuronas kisspeptidérgicas (Kauffman *et al.*, 2007; Takumi *et al.*, 2011), ya que el macho tiene menor número de neuronas en comparación con las hembras en diestro (Marraudino *et al.*, 2017). En el presente estudio obtuvimos un estimado del número de IRcb a kisspeptina, ya que no usamos métodos estereológicos que nos permitieran aproximarnos a conteos absolutos, esto nos permite sugerir que las ratas SD macho presentan un menor número de neuronas en comparación con las hembras en diestro; sin embargo, en la rata *taiep* no encontramos el dimorfismo sexual que caracteriza al AVPV, ya que los machos y hembras (en diestro) de esta cepa presentaron el mismo número de IRcb a kisspeptina. Esto posiblemente se deba a una disminución de los andrógenos neonatales, ya que se ha reportado que la castración de ratas neonatas macho Wistar-Imamichi provoca el incremento del número de neuronas de kisspeptina en AVPV (Clarkson & Herbison, 2006; Homma *et al.*, 2009). Se desconocen las concentraciones de andrógenos en la etapa neonatal de la rata *taiep*, lo cual es algo que deberá ser explorado en estudios futuros para determinar si es la razón de la ausencia del dimorfismo sexual del AVPV.

Las neuronas kisspeptidérgicas son estimuladas por las hormonas esteroideas (Herbison, 2020) y los neuroesteroides sintetizados a nivel del sistema nervioso central (Zwain & Yen, 1999). Los astrocitos sintetizan neuroprogesterona (Lloyd-Evans & Waller-Evans, 2020) que, junto con estradiol, participa en la estimulación de las neuronas de kisspeptina (Micevych & Sinchak, 2008a, 2008b; Mittelman-Smith *et al.*, 2018; Herbison, 2020). Debido a que la rata *taiep* presenta astrocitosis y neuroinflamación (Leon Chavez *et al.*, 2001) es posible que la presencia de neuroprogesterona esté incrementada, causando así el aumento en la intensidad de fluorescencia de kisspeptina observada en el macho. Además también se tiene que considerar que se ha reportado un incremento en la aromatasa y el estradiol a nivel del SNC como respuesta a daños o traumas (Crespo-Castrillo & Arevalo, 2020). Como la rata *taiep* cursa un proceso desmilitante que causa inflamación, es altamente probable que tenga incrementada la aromatasa a nivel del SNC por lo que una proporción mayor de testosterona circulante podría ser convertida en estradiol. El estradiol estimularía la producción de canales de sodio en las neuronas kisspeptidérgicas, lo que incrementaría la conductancia del sodio y se traduciría en una mayor actividad neuronal (Zhang *et al.*, 2015), causando que se incremente la expresión de kisspeptina en el macho *taiep*. Esta propuesta tendrá que evaluarse posteriormente en el modelo animal utilizado en este trabajo.

En el caso de la rata hembra ovariectomizada se ha reportado que el número de neuronas en ARC incrementa respecto a las que se les administra estradiol, y en AVPV se observa el efecto contrario (Kinsey-Jones *et al.*, 2014). En un estudio anterior se reportó que la rata *taiep* en estro tiene menor concentración sérica de estradiol a los 90 días (Muñoz-de-la-Torre *et al.*, 2018); lo cual nos lleva a pensar que el incremento en el número de IRcb observados en este estudio a nivel del ARC son consecuencia de la menor concentración de estradiol. En contraste, pese a la menor concentración sérica de estradiol encontramos un mayor número de IRcb a kisspeptina en AVPV de la rata *taiep* en estro (respecto a su par SD). Es posible que tal efecto sea causado por un aumento en la disponibilidad de receptores a estrógenos o incluso a un incremento en el

neuroestradiol presente en dicha región, como consecuencia de la neuroinflamación que presenta nuestro modelo animal; ya que este tipo de procesos causan el incremento del estradiol a nivel del SNC (Crespo-Castrillo & Arevalo, 2020), el cual es capaz de incrementar la expresión de receptores a estrógenos en astrocitos (Kuo *et al.*, 2010).

Actualmente se ha postulado que el control de las neuronas de kisspeptina en ARC y AVPV, es mediado por estradiol y progesterona (Kinsey-Jones *et al.*, 2014; Herbison, 2020). Durante la mañana del proestro, los niveles crecientes de estradiol comienzan a incrementar la actividad de las neuronas de kisspeptina en AVPV, pero no es hasta la tarde del proestro (entre las 5-8 pm) que las concentraciones de estradiol logran estimular la activación de las neuronas de kisspeptina del AVPV, con lo cual se estimula la liberación del pico de GnRH (Herbison, 2020). Por otro lado, a nivel del ARC las neuronas de kisspeptina son estimuladas por estradiol mantenido así el pulso de GnRH durante el metaestro, diestro y proestro en la mañana; pero después de la liberación del pico de GnRH comienzan a incrementarse los niveles de progesterona que junto con el estradiol van a inhibir la actividad de las neuronas de kisspeptina del ARC, resultando en la disminución del pulso durante el estro (Herbison, 2020). En el caso de la rata *taiep*, no pudimos observar el aumento en la actividad de las neuronas de kisspeptina del AVPV ni la disminución de la actividad de las neuronas de kisspeptina del ARC ya que nuestros animales fueron analizados durante la mañana del proestro. Lo que si pudimos notar es que en la mañana del proestro no hay diferencia en la intensidad de fluorescencia de kisspeptina entre las ratas *taiep* y SD, lo cual junto con el incremento en la expresión de GnRH y Kiss1R observado en la ME nos permite sugerir que el proceso de generación del pulso de GnRH no se alteró ya que si observamos ovulación, pero para ver si se llevó a cabo este pico es necesario evaluar durante la tarde del proestro.

Al analizar las alteraciones en las neuronas de kisspeptina usamos dos variables; el número y la intensidad de fluorescencia. Esto debido a que el número nos

estaría hablando de si el proceso desmielinizante está afectando el mantenimiento de la población neuronal y por otro lado la intensidad de fluorescencia nos indica si el péptido está presente en la misma proporción que en un animal sano. En nuestro modelo animal, la hembra *taiep* en estro presentó un mayor número de IRcb a kisspeptina acompañado de una menor intensidad de fluorescencia de kisspeptina en comparación con las ratas SD, esto posiblemente esté relacionado con la disminución del estradiol plasmático reportado previamente en el modelo animal (Muñoz-de-la-Torre *et al.*, 2018). Dado que estradiol estimula la síntesis de neuroprogesterona en los astrocitos hipotalámicos (Sinchak *et al.*, 2003; Micevych & Sinchak, 2008b), los bajos niveles del estrógeno podrían resultar en menor producción de progesterona, esto llevaría a disminuir la activación de las neuronas kisspeptidérgicas (Micevych & Sinchak, 2008a, 2008b) o incluso resultaría en el decremento de la producción de canales de sodio a nivel de la neurona kisspeptidérgica, lo cual disminuiría la corriente del ion (Zhang *et al.*, 2015) resultando en la disminución de la expresión de kisspeptina. Aunado a esto es posible que el incremento en el número de IRcb a kisspeptina en esta etapa del ciclo estral en la rata *taiep* sea para intentar compensar la disminución de estradiol, funcionando como un mecanismo compensatorio, pero esta idea tendría que evaluarse en futuros trabajos.

En ratas *taiep* de uno y otro sexo no se observaron cambios en la intensidad de fluorescencia de GnRH lo cual no coincide con nuestra hipótesis y coincide parcialmente con lo previamente reportado en el modelo EAE (Milosevic *et al.*, 2020). Esta ausencia de cambios en la expresión de GnRH, a pesar de las alteraciones de kisspeptina, está relacionado con la necesidad de un decremento mayor del 60% de la población kisspeptidérgica para que se altere la periodicidad del ciclo estral y la magnitud del pico de LH (Wang *et al.*, 2019; Herbison, 2020). Aunado a esto, confirmamos la hipótesis de la disminución de LH lo cual también se observa en el modelo de EAE (Milosevic *et al.*, 2020) y en pacientes con MS (Safarinejad, 2008). Lo anterior nos hace pensar que, pese a una expresión normal de la intensidad de fluorescencia de GnRH en la rata *taiep*, no se está

estimulando de forma adecuada la producción de LH lo cual podría deberse a una disminución en la disponibilidad de los receptores de GnRH en los gonadotropos, ya que se ha reportado que la exposición continua a GnRH, estradiol o progesterona, altera la expresión del receptor a GnRH (Quiñones-Jenab *et al.*, 1996; Lahlou *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003). No descartamos que se haya inhibido la liberación de la GnRH por acción del proceso inflamatorio en la rata *taiep*, ya que se ha reportado que el incremento en las concentraciones de IL-1 $\beta$  en la ME inhibe la secreción de GnRH (Wu & Wolfe, 2012), produciendo una disfunción hipotalámica-hipofisaria (Milosevic *et al.*, 2020).

En nuestro trabajo observamos menor concentración de LH en la rata *taiep*, lo que aparentemente no tuvo efectos sobre la ovulación, ni en el tamaño testicular, ni en la espermatogénesis. En el caso de la rata *taiep* macho, podemos observar que la menor concentración de LH no causó disminución del tamaño de las gónadas; por el contrario, observamos un incremento de tamaño que podría estar relacionado con una mayor concentración de FSH, ya que se ha reportado que la administración de dicha hormona en ratas hipofisectomizadas incrementa el tamaño testicular (O'Shaughnessy *et al.*, 2010). En el caso de la hembra se sabe que durante la tarde del proestro se presenta la mayor liberación de LH lo que resulta en la ovulación (Herbison, 2020). En este trabajo, los animales fueron evaluados durante la mañana por lo que no pudimos analizar el pico preovulatorio de LH. Pero dado que el número de ovocitos liberados fue igual entre el animal desmielinizado y la rata SD, es posible sugerir que la señal preovulatoria de LH en la tarde del proestro se presentó de manera normal o de suficiente magnitud para permitir la ovulación.

Las hembras *taiep* presentan el mismo porcentaje de cada una de las etapas del ciclo estral que las ratas SD, pero al analizar la periodicidad del ciclo estral, observamos que en algunos ejemplares hubo ausencia o repetición de alguna de las etapas del ciclo estral, interrumpiendo su continuidad de acuerdo con la progresión esperada de proestro, estro, metaestro y diestro. Estos cambios posiblemente estén relacionados con la disminución del peso corporal que

presentan estos animales, así como, al reporte previo de una alta concentración de testosterona durante la etapa juvenil (Muñoz-de-la-Torre *et al.*, 2018). Debido a que se ha reportado en ratas que el bajo peso corporal (Castellano *et al.*, 2011) y la presencia de altas concentraciones de testosterona en etapa juvenil (Kim *et al.*, 2002; Anesetti & Chávez-Genaro, 2016), causan un retraso en el inicio del ciclo estral y alteración en su periodicidad.

En las enfermedades desmielinizantes como la MS, los hombres presentan una progresión más rápida de la enfermedad en comparación de las mujeres (Bergamaschi, 2006; Crespo-Castrillo & Arevalo, 2020), lo cual se ha relacionado con el decremento en los niveles de testosterona (Bove *et al.*, 2014; Glazer *et al.*, 2018), lo cual también podría afectar el tamaño o función de las gónadas. Se ha reportado que los machos *taiep* presentan una mayor frecuencia de episodios de inmovilidad a comparación de las hembras (Cortés *et al.*, 2005) además de que en este trabajo observamos que los machos *taiep* tienen un mayor peso relativo de los órganos reproductivos respecto a las ratas SD, mostrando que el proceso desmielinizante afecta más a los machos como se observa en los pacientes con MS.

El incremento del peso de los órganos reproductivos podría ser derivado de la interacción de varios factores como testosterona, FSH y glucocorticoides. Justulin y cols., reportaron el incremento del tamaño de la vesícula seminal en ratas castradas que fueron tratadas con testosterona (Justulin *et al.*, 2006) por lo que en el caso de la rata *taiep* el incremento del tamaño de la vesícula seminal podría ser consecuencia de los niveles de testosterona ya que presentan una tendencia al incremento que podría ser suficiente para causar este efecto. Durante las diferentes etapas de desarrollo en diferentes mamíferos se observa el incremento en las señales del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), que desencadenan vías de señalización intracelular mediadas por PI3K/AKT y MAPK, las cuales participan en la actividad proliferativa a nivel testicular desencadenada por la unión de FSH a su receptor en la célula de Sertoli (Cannarella *et al.*, 2018). En roedores, la administración de FSH durante la

pubertad causa un incremento del volumen testicular (Vihko *et al.*, 1991; O'Shaughnessy *et al.*, 2010; Nurmio *et al.*, 2012), por lo que es posible sugerir que la rata *taiep* presente un incremento en la concentración de FSH que al llegar a nivel gonadal aumentaría la actividad de IGF1 originando este incremento de tamaño gonadal.

El incremento en el tamaño de la gónada correspondió con el incremento del perímetro, área y diámetro en los túbulos seminíferos de los diferentes grupos analizados en la rata *taiep* macho, lo que podría ser causado por un incremento en las concentraciones de FSH (O'Shaughnessy *et al.*, 2010; Oduwole *et al.*, 2021) y a la tendencia al incremento de testosterona. Al realizar el análisis por testículo, se observa claramente que los túbulos seminíferos del testículo izquierdo son los que presentan el mayor grado de alteración, lo cual también se ha observado en la rata hemicastrada donde el testículo izquierdo secreta una mayor concentración de testosterona (Frankel *et al.*, 1988; Brown & Chakraborty, 1991).

Las células de Leydig son las encargadas de sintetizar testosterona ante la presencia del estímulo de LH (Zirkin & Papadopoulos, 2018) y si disminuye la LH también disminuye testosterona (Oduwole *et al.*, 2021). Debido a que la rata *taiep* no presentó este comportamiento en la relación LH/testosterona, es posible sugerir que, el mantenimiento de la concentración de testosterona está dado por el aumento en el número de células de Leydig o por un incremento en la disponibilidad de los receptores de LH en dichas células, lo cual tendría que ser evaluado posteriormente. El incremento en la presencia de receptores a LH podría ser consecuencia de un incremento en la secreción de FSH, ya que se ha reportado que en la rata, la administración de dicha hormona incrementa el tamaño de la gónada, el número de receptores LH en la células de Leydig y es capaz de mantener la espermatogénesis en ausencia de la LH (Vihko *et al.*, 1991; O'Shaughnessy *et al.*, 2010; Oduwole *et al.*, 2021).

Es bien aceptado que existe comunicación entre el sistema nervioso central y las gónadas, a través de los nervios espermáticos superior (SSN) e inferior (ISN),

los cuales llevan la información a la médula espinal y ésta, posteriormente al encéfalo (Soon *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha descrito que en la MS se altera la conectividad asociada al control motor debido a la pérdida de mielina y al aumento de la inflamación (Peterson & Fling, 2018). En el caso de la rata *taiep* el proceso desmielinizante junto con el ambiente inflamatorio a nivel del sistema nervioso central (Soto-Rodriguez *et al.*, 2015), nos permite sugerir que la transmisión de la información del sistema nervioso central a las gónadas está alterado, desencadenando los cambios observados a nivel testicular. Causando alteraciones similares a las reportadas en el trabajo de Huo y cols. donde la denervación quirúrgica del SSN e ISN en ratas puberales resulta en la pérdida de la espermatogénesis cuando el animal llega al estado adulto, observándose una reducción del área de los túbulos seminíferos e incremento en la apoptosis de las espermatogonias redondas y las células de Leydig (Huo *et al.*, 2010). Por otro lado, Chow y cols. evaluaron las alteraciones de la sección del SSN y ISN en ratas adultas, mostrando que primero existe una pérdida parcial de la espermatogénesis y que después de 12 semanas se observa la ausencia de espermatogonias proliferantes y espermatoцитos en preleptoteno en el tejido de los túbulos seminíferos (Chow *et al.*, 2000). De acuerdo con lo anterior, es posible que el proceso desmielinizante que sufre la rata *taiep* aunado a la astrocitosis reactiva (Leon Chavez *et al.*, 2001) afecten la transmisión sináptica a la altura del tronco encefálico dificultando el correcto paso de la información a través de la vía neural hipotalámica testicular (Soon *et al.*, 2002) provocando que la información que llega de los nervios SSN y ISN al cerebro sea deficiente causando el incremento del tamaño de los túbulos seminíferos y las alteraciones espermáticas observadas.

En el presente estudio no encontramos cambios en el número de espermatozoides obtenidos del epidídimo en la rata *taiep*, al compararse con la rata SD; en lo que refiere a la movilidad se observa que al evaluar de forma conjunta las muestras obtenidas de los epidídimos, lo que equivaldría a un eyaculado, no hubo cambios significativos, lo cual coincide con lo observado en pacientes de MS (D'Amico *et al.*, 2020). Considerando que existe una asociación

entre las concentraciones de LH y la motilidad de los espermatozoides (Sheth *et al.*, 1976; Meeker *et al.*, 2006), es posible que ante la baja concentración de LH en la rata *taiep* macho se presente un incremento en la expresión de los receptores a LH para mantener la motilidad de los espermatozoides. Pero al realizar el análisis considerando si la muestra se obtuvo del epidídimo derecho o izquierdo, observamos que, el lado izquierdo presentó una mayor cantidad de espermatozoides no móviles, mientras que el epidídimo derecho tuvo mayor cantidad de espermatozoides móviles progresivos. Este efecto podría ser causado por un incremento en el tiempo que los espermatozoides pasan en el epidídimo (Fernandez *et al.*, 2008); posiblemente, la información que el epidídimo izquierdo recibe por parte del sistema nervioso es deficiente por la desmielinización que presenta la rata *taiep* a nivel de los ganglios basales y el cerebelo (Garduno-Robles *et al.*, 2020; Lopez-Juarez *et al.*, 2021), lo que provocaría la disminución de los movimiento peristálticos (Sakakibara, 2021) que facilitan el tránsito de los espermatozoides. Cabe señalar que estas alteraciones asimétricas responden parcialmente a nuestra hipótesis, ya que no se observa una clara alteración que afecte la capacidad reproductiva del macho. Sin embargo, nuestras evaluaciones fueron transversales, por lo que no se descarta que estas alteraciones asimétricas puedan exacerbarse conforme pase el tiempo y terminen provocando infertilidad, debido a que en la rata *taiep* los signos motores y las alteraciones encefálicas derivados de la desmielinización se incrementa con la edad (Lunn *et al.*, 1997; Alata *et al.*, 2021).

### **Contraste con otros modelos y el ser humano**

Al revisar la literatura y comparar lo reportado en humano, en el modelo EAE y lo obtenido en el presente trabajo observamos que:

- En los varones con MS se ha reportado disminución de la concentración de LH, FSH y testosterona, junto con la disminución en la motilidad espermática (Safarinejad, 2008). Aunque es importante mencionar que existen reportes contradictorios, posiblemente por el tamaño de la población analizada (Diaconu *et al.*, 2022).

- El modelo EAE hembra presenta disminución del ARNm de kisspeptina y los machos disminución del ARNm de GnRH (Milosevic *et al.*, 2020). En el macho se ha reportado disminución en la secreción de LH, sin presentar cambios en la concentración de testosterona, ni en el peso testicular (Milosevic *et al.*, 2021).
- En la rata *taiep* observamos que no se afecta la expresión de GnRH en ambos sexos y que las alteraciones en kisspeptina son sexo dependientes. El macho presenta disminución de la concentración de LH; sin alteración de las concentraciones de testosterona, acompañado del incremento del peso testicular. Al analizar la muestra espermática por epidídimo observamos alteración en la motilidad espermática.

Esta disparidad en lo observado en los diferentes modelos y el humano posiblemente esté relacionado al tipo de proceso desmielinizante que cursan. El modelo EAE usado en ese estudio, presenta signos similares a la MS tipo recaída-remisión. En el caso de la rata *taiep* es un modelo genético que presenta signos similares a la MS tipo progresiva. Por otro lado, en los estudios en humanos podemos encontrar aquellos que reportan pacientes con MS tipo recaída-remisión y aquellos que no diferencian entre tipos de MS.

Los resultados del presente estudio sugieren que en la rata *taiep* el proceso desmielinizante junto con las alteraciones hormonales, dan como resultado alteraciones del control hipotalámico y de las funciones gonadales de forma sexo dependiente (Ilustración 19).

Estos datos proporcionan información útil que permitirá entender el funcionamiento del eje HHG en un organismo con desmielinización progresiva, y también servirá como información base de posibles terapias que mejoren la calidad de vida de los pacientes con enfermedades desmielinizantes.

### **Limitaciones y perspectivas**

Durante el desarrollo del presente estudio se presentaron algunas limitaciones, la principal de ellas, el inicio de la pandemia de COVID19 ya que frenó el avance

del desarrollo experimental. Posteriormente, las complicaciones derivadas de esta pandemia dificultaron la obtención de animales para realizar el estudio. Con respecto a nuestra metodología, una de nuestras limitaciones fue el uso de anticuerpos policlonales, los cuales tienen menor especificidad en comparación a los monoclonales. Sin embargo, se obtuvo información sobre la distribución y la presencia del péptido en las estructuras analizadas. Otra limitación fue que no se investigaron los niveles de expresión de receptores a LH y FSH a nivel gonadal. Aunado a esto; no descartamos que la estimación del número de neuronas y los niveles de fluorescencia pudieron estar influenciados por el muestreo. Por otra parte, el fijador BNF10% que se utilizó durante el proceso de inclusión de los testículos limitó el análisis histológico; ya que dificultó determinar el estadio exacto del túbulo seminífero. Por esta razón; se decidió agrupar en categorías más amplias que nos permitieran ver alteraciones en diferentes puntos de la espermatogénesis.

Considerando las limitaciones, nuestros resultados, y la interpretación brindada, del presente estudio se desprenden varias perspectivas, una de ellas, es el análisis de la presencia de interleucinas a nivel de la eminencia media, así como, la presencia de receptores a hormonas esteroideas en las neuronas kisspeptidérgicas. En el caso de las hembras, proponemos realizar los mismos análisis en un grupo sacrificado en la tarde del proestro, para obtener mayor información de la expresión de kisspeptina, GnRH, Kiss1R y la secreción de hormonas esteroideas durante esta fase. En el caso de los machos, se plantea realizar el análisis del número de células de Leydig así como un análisis más profundo de los diferentes tipos celulares del túbulo seminífero, lo que permitirá determinar los mecanismos subyacentes al proceso de espermatogénesis y sus alteraciones en la rata *taiep*. También se propone analizar la presencia de receptores a LH y FSH a nivel testicular para entender por qué la disminución de LH no afecta de forma crítica la función testicular en la rata *taiep*.

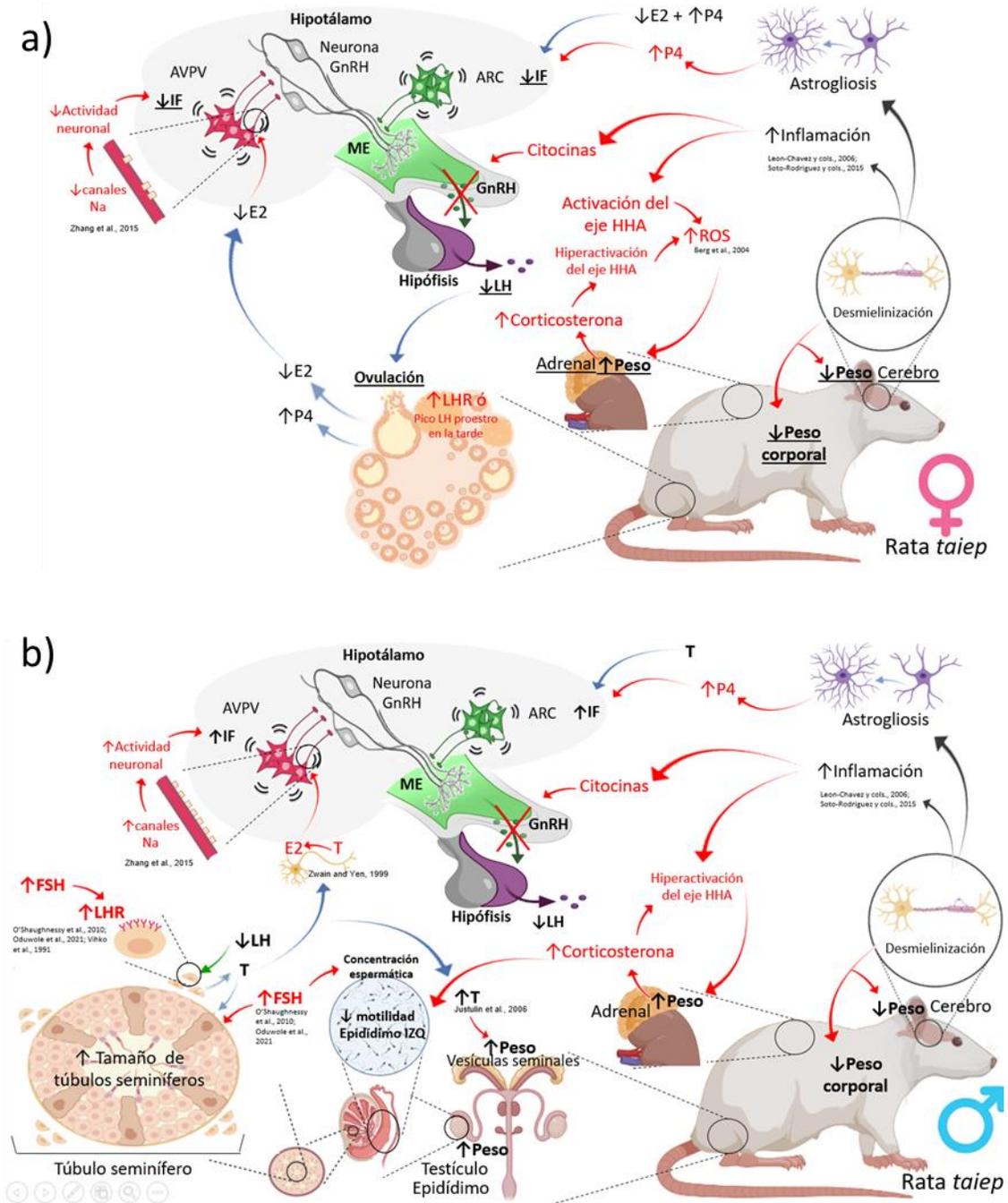


Ilustración 19. Esquemas resumen. a) Esquema de la rata *taiep* hembra en estro. b) Esquema de la rata *taiep* macho. En negritas se indican las alteraciones mostradas en el presente estudio respecto a las ratas SD. En rojo se indican los posibles cambios que explican lo observado en el presente trabajo. Abreviaturas: AVPV: área anteroventral periventricular, ME: eminencia media, ARC: núcleo arcuato, GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona folículo estimulante, E2: estradiol, P4: progesterona, T: testosterona, HHA: eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, ROS: especies reactivas de oxígeno, IF: intensidad de fluorescencia, LHR: receptor a la hormona luteinizante, IZQ: lado izquierdo.

## Conclusiones

Con base a nuestros resultados se concluye:

- La rata *taiep* tiene alteraciones sexo-dependientes en la expresión de kisspeptina en el ARC y AVPV.
- La rata *taiep* tiene una menor concentración sérica de LH, en comparación de la rata SD.
- No se observan alteraciones en la expresión de GnRH ni KISS1R en las ratas *taiep* de ambos sexos.
- La rata *taiep* de ambos sexos tiene menos mielina en AVPV, ARC y ME, en comparación de la rata SD.
- La rata *taiep* de ambos sexos tienen una mayor masa adrenal y menor peso corporal respecto a la rata SD.
- La disminución de LH no altera la concentración de testosterona en el macho *taiep*.
- El macho *taiep* presenta alteraciones a nivel testicular de forma asimétrica, siendo más afectado el testículo izquierdo.
- No se observan alteraciones en la motilidad espermática de la muestra total, pero si respecto al epidídimo del cual se obtuvo la muestra siendo el lado izquierdo el que tiene un mayor número de espermatozoides inmóviles.
- Las hembras *taiep* no presentan cambios en el peso de los órganos reproductivos, a comparación de los machos *taiep*, que tienen mayor peso de los órganos reproductivos respecto al control; posiblemente relacionados con las diferencias hormonales entre sexos.

## Referencias

Alata, M. *et al.* (2021) 'Longitudinal Evaluation of Cerebellar Signs of H-ABC Tubulinopathy in a Patient and in the taiep Model', *Frontiers in Neurology*, 12. doi: 10.3389/fneur.2021.702039.

Amoss, M. *et al.* (1971) 'Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44(1), pp. 205–210. doi: 10.1016/S0006-291X(71)80179-1.

Anderson, L. J., Liu, H. and Garcia, J. M. (2017) 'Sex Differences in Muscle Wasting', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 153–197. doi: 10.1007/978-3-319-70178-3\_9.

Anesetti, G. and Chávez-Genaro, R. (2016) 'Ovarian follicular dynamics after aromatizable or non aromatizable neonatal androgenization', *Journal of Molecular Histology*, 47(5), pp. 491–501. doi: 10.1007/s10735-016-9692-1.

Avila, M. *et al.* (2018) 'The Role of Sex Hormones in Multiple Sclerosis', *European Neurology*, 80(1–2), pp. 93–99. doi: 10.1159/000494262.

Aziz, N. A. *et al.* (2008) 'Weight loss in neurodegenerative disorders', *Journal of Neurology*, 255(12), pp. 1872–1880. doi: 10.1007/s00415-009-0062-8.

Barabás, K., Szabó-Meleg, E. and Ábrahám, I. M. (2020) 'Effect of Inflammation on Female Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neurons: Mechanisms and Consequences', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), p. 529. doi: 10.3390/ijms21020529.

Berg, D., Youdim, M. B. H. and Riederer, P. (2004) 'Redox imbalance', *Cell and Tissue Research*, 318(1), pp. 201–213. doi: 10.1007/s00441-004-0976-5.

Bergamaschi, R. *et al.* (2006) 'Brain White Matter Impairment in Congenital Adrenal Hyperplasia', *Archives of Neurology*, 63(3), p. 413. doi:

10.1001/archneur.63.3.413.

Bergamaschi, R. (2006) 'Prognosis of multiple sclerosis: clinical factors predicting the late evolution for an early treatment decision', *Expert Review of Neurotherapeutics*, 6(3), pp. 357–364. doi: 10.1586/14737175.6.3.357.

Bergh, F. T. *et al.* (1999) 'Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is related to the clinical course of MS', *Neurology*, 53(4), pp. 772–772. doi: 10.1212/WNL.53.4.772.

Bermejo Velasco, P. E. *et al.* (2011) 'Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. Concepto, clasificación y epidemiología', *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(75), pp. 5065–5068. doi: 10.1016/S0304-5412(11)70056-7.

Bohn, M. and Friedrich, V. (1982) 'Recovery of myelination in rat optic nerve after developmental retardation by cortisol', *The Journal of Neuroscience*, 2(9), pp. 1292–1298. doi: 10.1523/JNEUROSCI.02-09-01292.1982.

Bonansco, C., Fuenzalida, M. and Roncagliolo, M. (2004) 'Altered synaptic and electrical properties of lumbar motoneurons in the neurological glial mutant taiep rat', *Experimental Brain Research*, 156(1), pp. 104–110. doi: 10.1007/s00221-003-1768-y.

De Bond, J.-A. P. and Smith, J. T. (2014) 'Kisspeptin and energy balance in reproduction', *REPRODUCTION*, 147(3), pp. R53–R63. doi: 10.1530/REP-13-0509.

Bove, R. *et al.* (2014) 'Low testosterone is associated with disability in men with multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis Journal*, 20(12), pp. 1584–1592. doi: 10.1177/1352458514527864.

Bove, R. *et al.* (2015) 'Patients report worse MS symptoms after menopause: Findings from an online cohort', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 4(1), pp. 18–24. doi: 10.1016/j.msard.2014.11.009.

Bove, R. *et al.* (2020) 'Effect of assisted reproductive technology on multiple sclerosis relapses: Case series and meta-analysis', *Multiple Sclerosis Journal*, 26(11), pp. 1410–1419. doi: 10.1177/1352458519865118.

Brailoiu, G. C. *et al.* (2005) 'KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain', *The Journal of Comparative Neurology*, 481(3), pp. 314–329. doi: 10.1002/cne.20350.

Brinkmeyer-Langford, C. *et al.* (2018) 'Myelin and Myelination', in *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, pp. 120–140. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.65384-9.

Brown, J. L. and Chakraborty, P. K. (1991) 'Comparison of compensatory pituitary and testicular responses to hemicastration between prepubertal and mature rats.', *Journal of andrology*, 12(2), pp. 119–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1904849>.

Butcher, R. L., Collins, W. E. and Fugo, N. W. (1974) 'Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 $\beta$  Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat', *Endocrinology*, 94(6), pp. 1704–1708. doi: 10.1210/endo-94-6-1704.

Cannarella, R. *et al.* (2018) 'Effects of the insulin-like growth factor system on testicular differentiation and function: a review of the literature', *Andrology*, 6(1), pp. 3–9. doi: 10.1111/andr.12444.

Carpentier, P., Foquin, A. and Dorandeu, F. (2012) 'A new use for an old method: The Woelcke myelin stain for counting degenerating neurons in the brain of mice following status epilepticus', *NeuroToxicology*, 33(4), pp. 789–795. doi: 10.1016/j.neuro.2011.11.007.

Castellano, J. M. *et al.* (2011) 'Early Metabolic Programming of Puberty Onset: Impact of Changes in Postnatal Feeding and Rearing Conditions on the Timing of Puberty and Development of the Hypothalamic Kisspeptin System', *Endocrinology*, 152(9), pp. 3396–3408. doi: 10.1210/en.2010-1415.

Cavalla, P. *et al.* (2006) 'Fertility in patients with multiple sclerosis: Current knowledge and future perspectives', *Neurological Sciences*, 27(4), pp. 231–239. doi: 10.1007/s10072-006-0676-x.

Çelik, D. B. *et al.* (2013) 'Sexual dysfunction in multiple sclerosis: Gender differences', *Journal of the Neurological Sciences*, 324(1–2), pp. 17–20. doi: 10.1016/j.jns.2012.08.019.

Cernea, M. *et al.* (2015) 'Prenatal Testosterone Treatment Leads to Changes in the Morphology of KNDy Neurons, Their Inputs, and Projections to GnRH Cells in Female Sheep', *Endocrinology*, 156(9), pp. 3277–3291. doi: 10.1210/en.2014-1609.

Cheng, C. K., Chow, B. K. C. and Leung, P. C. K. (2003) 'An Activator Protein 1-Like Motif Mediates  $17\beta$ -Estradiol Repression of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Promoter via an Estrogen Receptor  $\alpha$ -Dependent Mechanism in Ovarian and Breast Cancer Cells', *Molecular Endocrinology*, 17(12), pp. 2613–2629. doi: 10.1210/me.2003-0217.

Choe, H. K. *et al.* (2013) 'Synchronous activation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription and secretion by pulsatile kisspeptin stimulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), pp. 5677–5682. doi: 10.1073/pnas.1213594110.

Chow, S.-H. *et al.* (2000) 'The Effects of Testicular Denervation on Spermatogenesis in the Sprague- Dawley Rat', *Neuroendocrinology*, 72(1), pp. 37–45. doi: 10.1159/000054569.

Christensen, P. *et al.* (2018) 'Men and women respond differently to rapid weight loss: Metabolic outcomes of a multi-centre intervention study after a low-energy diet in 2500 overweight, individuals with pre-diabetes (PREVIEW)', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(12), pp. 2840–2851. doi: 10.1111/dom.13466.

Christian, C. A. (2017) 'Neurophysiology of Gonadotropin-Releasing Hormone

Neurons', in *Hormones, Brain and Behavior*. Third Edit. Elsevier, pp. 379–400. doi: 10.1016/B978-0-12-803592-4.00061-4.

Clarke, H., Dhillo, W. S. and Jayasena, C. N. (2015) 'Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders', *Endocrinology and Metabolism*, 30(2), p. 124. doi: 10.3803/EnM.2015.30.2.124.

Clarkson, J. (2013) 'Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 34(2), pp. 120–131. doi: 10.1016/j.yfrne.2013.02.002.

Clarkson, J. *et al.* (2014) 'Sexual Differentiation of the Brain Requires Perinatal Kisspeptin-GnRH Neuron Signaling', *Journal of Neuroscience*, 34(46), pp. 15297–15305. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3061-14.2014.

Clarkson, J. and Herbison, A. E. (2006) 'Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons', *Endocrinology*, 147(12), pp. 5817–5825. doi: 10.1210/en.2006-0787.

Clarkson, J. and Herbison, A. E. (2016) 'Hypothalamic control of the male neonatal testosterone surge', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1688), p. 20150115. doi: 10.1098/rstb.2015.0115.

Constantinescu, C. S. *et al.* (2011) 'Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)', *British Journal of Pharmacology*, 164(4), pp. 1079–1106. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x.

Correale, J., Farez, M. F. and Ysraelit, M. C. (2012) 'Increase in multiple sclerosis activity after assisted reproduction technology', *Annals of Neurology*, 72(5), pp. 682–694. doi: 10.1002/ana.23745.

Cortés, M. D. C. *et al.* (2005) 'Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on taiep rats', *Synapse*, 58(2), pp. 95–101. doi: 10.1002/syn.20188.

Couve, E. *et al.* (1997) 'Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant taiep rat', *Journal of Neuroscience Research*, 47(6), pp. 573–581. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19970315)47:6<573::AID-JNR2>3.0.CO;2-A.

Crespo-Castrillo, A. and Arevalo, M.-A. (2020) 'Microglial and Astrocytic Function in Physiological and Pathological Conditions: Estrogenic Modulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), p. 3219. doi: 10.3390/ijms21093219.

D'Albora, H., Lombide, P. and Ojeda, S. R. (2000) 'Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study', *Cell and Tissue Research*, 300(1), pp. 47–56. doi: 10.1007/s004419900130.

D'Amico, E. *et al.* (2020) 'Gonadal Steroids and Sperm Quality in a Cohort of Relapsing Remitting Multiple Sclerosis: A Case-Control Study', *Frontiers in Neurology*, 11(August), pp. 1–8. doi: 10.3389/fneur.2020.00756.

Dennis, K. E. and Valentine, W. M. (2018) 'Degenerative and Regenerative Events in the Central and Peripheral Nervous System', in *Comprehensive Toxicology*. Third Edit. Elsevier, pp. 50–69. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.02189-9.

Diaconu, C. *et al.* (2022) 'Hypogonadism in men with multiple sclerosis: Prevalence and clinical associations', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 59(January), pp. 2021–2023. doi: 10.1016/j.msard.2022.103508.

Djousse, L. *et al.* (2002) 'Weight loss in early stage of Huntington's disease', *Neurology*, 59(9), pp. 1325–1330. doi: 10.1212/01.WNL.0000031791.10922.CF.

Duncan, I. D. *et al.* (1992) 'The taiep rat: A myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect', *Journal of Neurocytology*, 21(12), pp. 870–884. doi: 10.1007/BF01191684.

Duncan, I. D. *et al.* (2017) 'A mutation in the Tubb4a gene leads to microtubule

accumulation with hypomyelination and demyelination', *Annals of Neurology*, 81(5), pp. 690–702. doi: 10.1002/ana.24930.

Eguibar, J. R. *et al.* (2014) 'The Myelin Mutant Rat Taiep as a Model of Neuroimmunological Disease', *Advances in Neuroimmune Biology*, 5(1), pp. 9–17. doi: 10.3233/NIB-140081.

Eguibar, J. R. and Cortes, C. (2010) 'El mutante de mielina taiep como un modelo de crisis de ausencia', *Gaceta Medica de Mexico*, 146(1), pp. 11–18.

Falaschi, P. *et al.* (2001) 'High incidence of hyperandrogenism-related clinical signs in patients with multiple sclerosis.', *Neuro endocrinology letters*, 22(4), pp. 248–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524631>.

Fernandez, C. D. B. *et al.* (2008) 'Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality', *International Journal of Andrology*, 31(4), pp. 427–437. doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00788.x.

Fernández, O., Fernández, V. E. and Guerrero, M. (2015) 'Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central', *Medicine*, 11(77), pp. 4601–4609. doi: 10.1016/j.med.2015.04.001.

Ferrini, M. *et al.* (2001) 'Aging-Related Increased Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cytotoxicity Markers in Rat Hypothalamic Regions Associated with Male Reproductive Function', *Neuroendocrinology*, 74(1), pp. 1–11. doi: 10.1159/000054665.

Foley, F. and Beier, M. (2006) 'Assessment and treatment of sexual dysfunction in Multiple Sclerosis', *New York: National Multiple Sclerosis Society*, pp. 1–16.

Foote, A. K. and Blakemore, W. F. (2005a) 'Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination', *Brain*, 128(3), pp. 528–539. doi: 10.1093/brain/awh417.

Foote, A. K. and Blakemore, W. F. (2005b) 'Repopulation of oligodendrocyte

progenitor cell-depleted tissue in a model of chronic demyelination', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 31(4), pp. 374–383. doi: 10.1111/j.1365-2990.2005.00647.x.

Forbes, S. *et al.* (2009) 'Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat', *Neuroscience Letters*, 460(2), pp. 143–147. doi: 10.1016/j.neulet.2009.05.060.

Frankel, A. I., Chapman, J. C. and Cook, B. (1988) 'Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat', *Journal of Endocrinology*, 122(November), pp. 485–488.

Fuenzalida, M. *et al.* (2004) 'Immature developmental pattern of the monosynaptic reflex in isolated spinal cord of glial mutant taiep rats', *Developmental Brain Research*, 153(2), pp. 197–202. doi: 10.1016/j.devbrainres.2004.08.007.

Fuenzalida, M. *et al.* (2009) 'Developmental increase of asynchronic glutamate release from hippocampal synapses in mutant Taiep rat', *Synapse*, 63(6), pp. 502–509. doi: 10.1002/syn.20622.

Funabashi, T. *et al.* (2001) 'Gonadotropin-Releasing Hormone Exhibits Circadian Rhythm in Phase with Arginine-Vasopressin in Co-Cultures of the Female Rat Preoptic Area and Suprachiasmatic Nucleus', *Journal of Neuroendocrinology*, 12(6), pp. 521–528. doi: 10.1046/j.1365-2826.2000.00481.x.

Garduno-Robles, A. *et al.* (2020) 'MRI Features in a Rat Model of H-ABC Tubulinopathy', *Frontiers in Neuroscience*, 14(June), pp. 1–12. doi: 10.3389/fnins.2020.00555.

Ghoumari, A. M. *et al.* (2003) 'Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum', *Journal of Neurochemistry*, 86(4), pp. 848–859. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01881.x.

Ghoumari, A. M. *et al.* (2020) 'Roles of Progesterone, Testosterone and Their Nuclear Receptors in Central Nervous System Myelination and Remyelination', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), p. 3163. doi: 10.3390/ijms21093163.

Glazer, C. H. *et al.* (2018) 'Male factor infertility and risk of multiple sclerosis: A register-based cohort study', *Multiple Sclerosis Journal*, 24(14), pp. 1835–1842. doi: 10.1177/1352458517734069.

Goodin, D. S. (2014) 'Glucocorticoid treatment of multiple sclerosis', in *Handbook of Clinical Neurology*. 1st edn. Elsevier B.V., pp. 455–464. doi: 10.1016/B978-0-444-52001-2.00020-0.

Gottsch, M. L. *et al.* (2004) 'A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse', *Endocrinology*, 145(9), pp. 4073–4077. doi: 10.1210/en.2004-0431.

Hardelin, J.-P. (2001) 'Kallmann syndrome: towards molecular pathogenesis', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179(1–2), pp. 75–81. doi: 10.1016/S0303-7207(01)00462-2.

Harris, G. (1948) 'Neural control of the pituitary gland', *Physiological Reviews*, 28(2), pp. 139–179. Available at: [http://www.pnei-it.com/1/upload/neural\\_control\\_pituitary\\_gland\\_first.pdf](http://www.pnei-it.com/1/upload/neural_control_pituitary_gland_first.pdf).

Hassaneen, A. *et al.* (2016) 'Immunohistochemical characterization of the arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) and preoptic kisspeptin neuronal populations in the hypothalamus during the estrous cycle in heifers', *Journal of Reproduction and Development*, 62(5), pp. 471–477. doi: 10.1262/jrd.2016-075.

Heidbrink, C. *et al.* (2010) 'Reduced cortisol levels in cerebrospinal fluid and differential distribution of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in multiple sclerosis: Implications for lesion pathogenesis', *Brain, Behavior, and Immunity*,

24(6), pp. 975–984. doi: 10.1016/j.bbi.2010.04.003.

Helena, C. V. *et al.* (2015) 'KNDy Neurons Modulate the Magnitude of the Steroid-Induced Luteinizing Hormone Surges in Ovariectomized Rats', *Endocrinology*, 156(11), pp. 4200–4213. doi: 10.1210/en.2015-1070.

Herbison, A. E. *et al.* (1996) 'Relationship of Neuronal Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity to GnRH Neurons in the Ovariectomized and Intact Female Rat', *Journal of Neuroendocrinology*, 8(1), pp. 73–82. doi: 10.1111/j.1365-2826.1996.tb00688.x.

Herbison, A. E. (2016) 'Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons', *Nature Reviews Endocrinology*, 12(8), pp. 452–466. doi: 10.1038/nrendo.2016.70.

Herbison, A. E. (2020) 'A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 57(March), p. 100837. doi: 10.1016/j.yfrne.2020.100837.

Herbison, A. E. and Pape, J.-R. (2001) 'New Evidence for Estrogen Receptors in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 22(4), pp. 292–308. doi: 10.1006/frne.2001.0219.

Hirst, J. J. *et al.* (2016) 'Loss of neurosteroid-mediated protection following stress during fetal life', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 160, pp. 181–188. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.09.012.

Holmgren, B. *et al.* (1989) 'Sprague Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis.', *Laboratory animal science*, 39(3), pp. 226–228.

Homma, T. *et al.* (2009) 'Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats', *Biology of Reproduction*, 81(6), pp. 1216–1225. doi: 10.1095/biolreprod.109.078311.

Houtchens, M. K. *et al.* (2020) 'Live birth rates, infertility diagnosis, and infertility treatment in women with and without multiple sclerosis: Data from an administrative claims database', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 46(May), p. 102541. doi: 10.1016/j.msard.2020.102541.

Huo, S. *et al.* (2010) 'Testicular denervation in prepuberty rat inhibits seminiferous tubule development and spermatogenesis', *Journal of Reproduction and Development*, 56(4), pp. 370–378. doi: 10.1262/jrd.10-009N.

Ismael, Z. K., Al-Anbari, L. A. and Mossa, H. A. L. (2017) 'Relationship of FSH, LH, DHEA and testosterone levels in serum with sperm function parameters in infertile men', *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(11), pp. 2056–2061.

Jean-faucher, C. *et al.* (1983) 'Ontogeny of the secretory pattern of LH and FSH in male mice during sexual maturation', *International Journal of Andrology*, 6, pp. 575–584.

Justulin, L. A. *et al.* (2006) 'Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement', *Cell Biology International*, 30(4), pp. 354–364. doi: 10.1016/j.cellbi.2006.01.002.

Kanasaki, H. *et al.* (2017) 'How is GnRH regulated in GnRH-producing neurons? Studies using GT1-7 cells as a GnRH-producing cell model', *General and Comparative Endocrinology*, 247, pp. 138–142. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.01.025.

Kanczkowski, W., Sue, M. and Bornstein, S. R. (2017) 'The adrenal gland microenvironment in health, disease and during regeneration', *Hormones*, 16(3), pp. 251–265. doi: 10.14310/horm.2002.1744.

Kaprara, A. and Huhtaniemi, I. T. (2018) 'The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 86, pp. 3–17. doi: 10.1016/j.metabol.2017.11.018.

Kauff, A. S. and Editors, J. T. S. (2013) 'Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology', 784, pp. 3–7. doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9.

Kauff, A. S. and Smith, J. T. (2013) *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology*. Edited by A. S. Kauffman and J. T. Smith. New York, NY: Springer New York (Advances in Experimental Medicine and Biology). doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9.

Kauffman, A. S. *et al.* (2007) 'Sexual Differentiation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Rat', *Endocrinology*, 148(4), pp. 1774–1783. doi: 10.1210/en.2006-1540.

Kenealy, B. P., Keen, K. L. and Terasawa, E. (2011) 'Rapid action of estradiol in primate GnRH neurons: The role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta', *Steroids*, 76(9), pp. 861–866. doi: 10.1016/j.steroids.2011.02.019.

Kim, H. S. *et al.* (2002) 'Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide', *Toxicological Sciences*, 67(1), pp. 52–62. doi: 10.1093/toxsci/67.1.52.

Kinsey-Jones, J. S. *et al.* (2014) 'Quantification of Rat Kisspeptin Using a Novel Radioimmunoassay', *PLoS ONE*, 9(5), p. e97611. doi: 10.1371/journal.pone.0097611.

Korenbrodt, C. C., Huhtaniemi, I. T. and Weiner, R. I. (1977) 'Prepubertal separation as an external sign of pubertal development in the male rat.', *Biology of reproduction*, 17(2), pp. 298–303. doi: 10.1095/biolreprod17.2.298.

Kuo, J. *et al.* (2010) 'Sex differences in hypothalamic astrocyte response to estradiol stimulation', *Biology of Sex Differences*, 1(1), p. 7. doi: 10.1186/2042-6410-1-7.

Lahlou, N. *et al.* (2000) 'Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of GnRH Agonists: Clinical Implications in Pediatrics', *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 13(Supplement). doi: 10.1515/JPEM.2000.13.S1.723.

Layman, W. S., Hurd, E. A. and Martin, D. M. (2011) 'Reproductive dysfunction and decreased GnRH neurogenesis in a mouse model of CHARGE syndrome', *Human Molecular Genetics*, 20(16), pp. 3138–3150. doi: 10.1093/hmg/ddr216.

Leon-Chavez, B. A. *et al.* (2006) 'Increased nitric oxide levels and nitric oxide synthase isoform expression in the cerebellum of the taiep rat during its severe demyelination stage', *Brain Research*, 1121(1), pp. 221–230. doi: 10.1016/j.brainres.2006.08.097.

Leon Chavez, B. A. *et al.* (2001) 'Regional and temporal progression of reactive astrocytosis in the brain of the myelin mutant taiep rat', *Brain Research*, 900(1), pp. 152–155. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02284-3.

Lewis, E. M. *et al.* (2002) 'Sexual maturation data for Crl sprague-dawley rats: Criteria and confounding factors', *Drug and Chemical Toxicology*, 25(4), pp. 437–458. doi: 10.1081/DCT-120014794.

Li, F. Y., Song, J. and Duncan, I. D. (2003) 'Mapping of taiep rat phenotype to rat Chromosome 9', *Mammalian Genome*, 14(10), pp. 703–705. doi: 10.1007/s00335-003-2302-z.

Li, X.-F. *et al.* (2009) 'Kisspeptin Signalling in the Hypothalamic Arcuate Nucleus Regulates GnRH Pulse Generator Frequency in the Rat', *PLoS ONE*. Edited by M. Tena-Sempere, 4(12), p. e8334. doi: 10.1371/journal.pone.0008334.

Link, H. and Xiao, B.-G. (2001) 'Rat models as tool to develop new immunotherapies', *Immunological Reviews*, 184(1), pp. 117–128. doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1840111.x.

Lloyd-Evans, E. and Waller-Evans, H. (2020) 'Biosynthesis and signalling functions of central and peripheral nervous system neurosteroids in health and disease', *Essays in Biochemistry*. Edited by J. Harwood and E. Lloyd-Evans, 64(3), pp. 591–606. doi: 10.1042/EBC20200043.

Lopez-Juarez, A. *et al.* (2021) 'Auditory impairment in H-ABC tubulinopathy',

*Journal of Comparative Neurology*, 529(5), pp. 957–968. doi: 10.1002/cne.24990.

Love, S. (2006) 'Demyelinating diseases', *Journal of Clinical Pathology*, 59(11), pp. 1151–1159. doi: 10.1136/jcp.2005.031195.

Lunn, K. F., Clayton, M. K. and Duncan, I. D. (1997) 'The temporal progression of the myelination defect in the taiep rat', *Journal of Neurocytology*, 26(5), pp. 267–281. doi: 10.1023/A:1018548400536.

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. and Tanno, A. P. (2002) 'Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations', *Brazilian Journal of Biology*, 62(4a), pp. 609–614. doi: 10.1590/S1519-69842002000400008.

Marin-Husstege, M. *et al.* (2004) 'Oligodendrocyte Progenitor Proliferation and Maturation Is Differentially Regulated by Male and Female Sex Steroid Hormones', *Developmental Neuroscience*, 26(2–4), pp. 245–254. doi: 10.1159/000082141.

Marraudino, M. *et al.* (2017) 'Kisspeptin innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus: sexual dimorphism and effect of estrous cycle in female mice', *Journal of Anatomy*, 230(6), pp. 775–786. doi: 10.1111/joa.12603.

Marty, M. S. *et al.* (2003) 'Development and Maturation of the Male Reproductive System', *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 68(2), pp. 125–136. doi: 10.1002/bdrb.10015.

Massarotti, C. *et al.* (2021) 'Effect of Multiple Sclerosis and Its Treatments on Male Fertility: Cues for Future Research', *Journal of Clinical Medicine*, 10(22), p. 5401. doi: 10.3390/jcm10225401.

Mayer, C. *et al.* (2010) 'Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor -signaling in kisspeptin neurons', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(52), pp. 22693–22698. doi: 10.1073/pnas.1012406108.

McCutcheon, J. E. and Marinelli, M. (2009) 'Age matters', *European Journal of Neuroscience*, 29(5), pp. 997–1014. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06648.x.

McGee, E. A. and Hsueh, A. J. W. (2000) 'Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles\*', *Endocrine Reviews*, 21(2), pp. 200–214. doi: 10.1210/edrv.21.2.0394.

Meeker, J. D., Godfrey-Bailey, L. and Hauser, R. (2006) 'Relationships Between Serum Hormone Levels and Semen Quality Among Men From an Infertility Clinic', *Journal of Andrology*, 28(3), pp. 397–406. doi: 10.2164/jandrol.106.001545.

Melief, J. *et al.* (2019) 'Transcriptome analysis of normal-appearing white matter reveals cortisol- and disease-associated gene expression profiles in multiple sclerosis', *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), p. 60. doi: 10.1186/s40478-019-0705-7.

Mendes, N. F. *et al.* (2018) 'TGF- $\beta$ 1 down-regulation in the mediobasal hypothalamus attenuates hypothalamic inflammation and protects against diet-induced obesity', *Metabolism*, 85, pp. 171–182. doi: 10.1016/j.metabol.2018.04.005.

Merchenthaler, I. *et al.* (1984) 'Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain', *Cell and Tissue Research*, 237(1), pp. 15–29. doi: 10.1007/BF00229195.

Merghati-Khoei, E. *et al.* (2013) 'Sexual problems among women with multiple sclerosis', *Journal of the Neurological Sciences*, 331(1–2), pp. 81–85. doi: 10.1016/j.jns.2013.05.014.

Micevych, P. and Sinchak, K. (2008a) 'Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), pp. 44–50. doi: 10.1016/j.mce.2008.04.016.

Micevych, P. and Sinchak, K. (2008b) 'Synthesis and Function of Hypothalamic Neuroprogesterone in Reproduction', *Endocrinology*, 149(6), pp. 2739–2742. doi:

10.1210/en.2008-0011.

Millar, R. P. *et al.* (2010) 'Kisspeptin antagonists: Unraveling the role of kisspeptin in reproductive physiology', *Brain Research*, 1364, pp. 81–89. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.044.

Miller, R. H. (2002) 'Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS', *Progress in Neurobiology*, 67(6), pp. 451–467. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00058-8.

Milosevic, A. *et al.* (2020) 'The sex-specific patterns of changes in hypothalamic-pituitary-gonadal axis during experimental autoimmune encephalomyelitis', *Brain, Behavior, and Immunity*, 89, pp. 233–244. doi: 10.1016/j.bbi.2020.06.025.

Milosevic, A. *et al.* (2021) 'Testicular steroidogenesis is suppressed during experimental autoimmune encephalomyelitis in rats', *Scientific reports*, 11(1), p. 8996. doi: 10.1038/s41598-021-88305-5.

Mittelman-Smith, M. A., Wong, A. M. and Micevych, P. E. (2018) 'Estrogen and Progesterone Integration in an in vitro Model of RP3V Kisspeptin Neurons', *Neuroendocrinology*, 106(2), pp. 101–115. doi: 10.1159/000471878.

Muñoz-de-la-Torre, L. P. *et al.* (2018) 'Follicular Development and Secretion of Ovarian Hormones during the Juvenile and Adult Reproductive Lives of the Myelin Mutant taiep Rat: An Animal Model of Demyelinating Diseases', *International Journal of Endocrinology*, 2018, pp. 1–11. doi: 10.1155/2018/5718782.

Navarro, V. M. *et al.* (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), pp. 379–386. doi: 10.1113/jphysiol.2004.072298.

Nurmio, M. *et al.* (2012) 'Peritubular myoid cells have a role in postnatal testicular growth Do not distribute.', *Landes Bioscience*, 2(2), pp. 79–87.

O'Connor, L. T. *et al.* (2000) 'Intracellular distribution of myelin protein gene products is altered in oligodendrocytes of the taiep rat', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 16(4), pp. 396–407. doi: 10.1006/mcne.2000.0889.

O'Shaughnessy, P. J. *et al.* (2010) 'Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors', *Reproduction*, 139(1), pp. 177–184. doi: 10.1530/REP-09-0377.

Oduwole, O. O., Huhtaniemi, I. T. and Misrahi, M. (2021) 'The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), p. 12735. doi: 10.3390/ijms222312735.

Overgaard, A. *et al.* (2013) 'Comparative analysis of kisspeptin-immunoreactivity reveals genuine differences in the hypothalamic Kiss1 systems between rats and mice', *Peptides*, 45, pp. 85–90. doi: 10.1016/j.peptides.2013.04.013.

Oyola, M. G. and Handa, R. J. (2017) 'Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity', *Stress*, 20(5), pp. 476–494. doi: 10.1080/10253890.2017.1369523.

Paccola, C. C. *et al.* (2013) 'The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis', *Anim. Reprod*, 10(4), pp. 677–683.

Pakpoor, J. *et al.* (2014) 'Testicular hypofunction and multiple sclerosis risk: A record-linkage study', *Annals of Neurology*, 76(4), pp. 625–628. doi: 10.1002/ana.24250.

Parhar, I. S. (2002) 'Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes', in *Progress in Brain Research*, pp. 3–17. doi: 10.1016/S0079-6123(02)41080-1.

Paxinos, G. and Watson, C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4 edition. Academic Press.

Pepling, M. E. (2012) 'Follicular assembly: Mechanisms of action', *Reproduction*, 143(2), pp. 139–149. doi: 10.1530/REP-11-0299.

Peterson, D. S. and Fling, B. W. (2018) 'How changes in brain activity and connectivity are associated with motor performance in people with MS', *NeuroImage: Clinical*, 17(June 2017), pp. 153–162. doi: 10.1016/j.nicl.2017.09.019.

Pham, S. B. T. *et al.* (2005) 'Is the testis intraperitoneal?', *Pediatric Surgery International*, 21(4), pp. 231–239. doi: 10.1007/s00383-005-1364-2.

Phumsatitpong, C. and Moenter, S. M. (2018) 'Estradiol-Dependent stimulation and suppression of gonadotropin-Releasing hormone neuron firing activity by corticotropin-Releasing hormone in female mice', *Endocrinology*, 159(1), pp. 414–425. doi: 10.1210/en.2017-00747.

Pimpinelli, F. *et al.* (2006) 'Presence of delta opioid receptors on a subset of hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons', *Brain Research*, 1070(1), pp. 15–23. doi: 10.1016/j.brainres.2005.11.001.

Pinilla, L. *et al.* (2012) 'Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms', *Physiological Reviews*, 92(3), pp. 1235–1316. doi: 10.1152/physrev.00037.2010.

Plant, T. M. (2015) 'Neuroendocrine control of the onset of puberty', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 38, pp. 73–88. doi: 10.1016/j.yfrne.2015.04.002.

Plant, T. M. and Zeleznik, A. J. (2015) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier. doi: 10.1016/C2011-1-07288-0.

Prevot, V. *et al.* (2010) 'Function-related structural plasticity of the GnRH system. A role for neuronal-glial-endothelial interactions', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(3), pp. 241–258. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.05.003.

Quiñones-Jenab, V. *et al.* (1996) 'Estrogen regulation of gonadotropin-releasing

hormone receptor messenger RNA in female rat pituitary tissue', *Molecular Brain Research*, 38(2), pp. 243–250. doi: 10.1016/0169-328X(95)00322-J.

Reder, A. T., Makowiec, R. L. and Lowy, M. T. (1994) 'Adrenal Size Is Increased in Multiple Sclerosis', *Archives of Neurology*, 51(2), pp. 151–154. doi: 10.1001/archneur.1994.00540140057015.

Rivera, V. M. (2017) 'Multiple Sclerosis in Latin Americans: Genetic Aspects', *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(8), p. 57. doi: 10.1007/s11910-017-0768-4.

Roa, J. (2013) 'Role of GnRH Neurons and Their Neuronal Afferents as Key Integrators between Food Intake Regulatory Signals and the Control of Reproduction', *International Journal of Endocrinology*, 2013, pp. 1–10. doi: 10.1155/2013/518046.

Roncagliolo, M. *et al.* (2006) 'Developmental impairment of compound action potential in the optic nerve of myelin mutant taiep rats', *Brain Research*, 1067(1), pp. 78–84. doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.010.

Roved, J., Westerdahl, H. and Hasselquist, D. (2017) 'Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences', *Hormones and Behavior*, 88, pp. 95–105. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.11.017.

Rowan, C. (2002) 'Esperanza en la Investigación', *Vasculares, Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos y Accidentes (NINDS)*, (02–75), p. 70.

Russell, L. D. *et al.* (1993) 'Histological and Histopathological Evaluation of the Testis', *International Journal of Andrology*, 16(1). doi: 10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x.

Safarinejad, M. R. (2008) 'Evaluation of endocrine profile, hypothalamic-pituitary-testis axis and semen quality in multiple sclerosis', *Journal of Neuroendocrinology*, 20(12), pp. 1368–1375. doi: 10.1111/j.1365-

2826.2008.01791.x.

Sakakibara, R. (2021) 'Gastrointestinal dysfunction in neuroinflammatory diseases: Multiple sclerosis, neuromyelitis optica, acute autonomic ganglionopathy and related conditions', *Autonomic Neuroscience*, 232(March), p. 102795. doi: 10.1016/j.autneu.2021.102795.

Salud, S. de (2016) *Secretaria de Salud, 25 de mayo 2016, consultado junio 2020*. Available at: <https://www.gob.mx/salud/articulos/sabias-que-hoy-es-el-dia-mundial-de-la-esclerosis-multiple>.

Sanders, A. S. *et al.* (2000) 'The multiple sclerosis intimacy and sexuality questionnaire-19 (MSISQ- 19)', *Sexuality and Disability*, 18(1), pp. 3–26. doi: 10.1023/A:1005421627154.

Schally, A. V. *et al.* (1971) 'Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43(2), pp. 393–399. doi: 10.1016/0006-291X(71)90766-2.

Schneider, F., Tomek, W. and Gründker, C. (2006) 'Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review', *Theriogenology*, 66(4), pp. 691–709. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.025.

Schwarting, G., Wierman, M. and Tobet, S. (2007) 'Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Migration', *Seminars in Reproductive Medicine*, 25(5), pp. 305–312. doi: 10.1055/s-2007-984736.

Seed, J. *et al.* (1996) 'Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report', *Reproductive Toxicology*, 10(3), pp. 237–244. doi: 10.1016/0890-6238(96)00028-7.

Sepúlveda, M. *et al.* (2016) 'Pituitary-ovary axis and ovarian reserve in fertile women with multiple sclerosis: A pilot study', *Multiple Sclerosis Journal*, 22(4), pp. 564–568. doi: 10.1177/1352458515602339.

Sheth, A. R., Shah, G. V and Mugatwala, P. V. (1976) 'Levels of Luteinizing Hormone in Semen of Fertile and Infertile Men and Possible Significance of Luteinizing Hormone in Sperm Metabolism', *Fertility and Sterility*, 27(8), pp. 933–936. doi: 10.1016/S0015-0282(16)42015-7.

Sinchak, K. *et al.* (2003) 'Estrogen Induces de novo Progesterone Synthesis in Astrocytes', *Developmental Neuroscience*, 25(5), pp. 343–348. doi: 10.1159/000073511.

Smith, J. T. *et al.* (2005) 'Differential Regulation of KiSS-1 mRNA Expression by Sex Steroids in the Brain of the Male Mouse', *Endocrinology*, 146(7), pp. 2976–2984. doi: 10.1210/en.2005-0323.

Smith, J. T. *et al.* (2006) 'Kiss1 Neurons in the Forebrain as Central Processors for Generating the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge', *Journal of Neuroscience*, 26(25), pp. 6687–6694. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1618-06.2006.

Smith, P., Wilhelm, D. and Rodgers, R. J. (2014) 'Development of mammalian ovary', *Journal of Endocrinology*, 221(3), pp. R145–R161. doi: 10.1530/JOE-14-0062.

Soon, L., Miselis, R. and Rivier, C. (2002) 'Anatomical and functional evidence for a neural hypothalamic-testicular pathway that is independent of the pituitary', *Endocrinology*, 143(11), pp. 4447–4454. doi: 10.1210/en.2002-220392.

Soto-Rodriguez, G. *et al.* (2015) 'Analysis of Chemokines and Receptors Expression Profile in the Myelin Mutant Taiep Rat', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Edited by C. Signorini, 2015, pp. 1–8. doi: 10.1155/2015/397310.

Spence, R. D. *et al.* (2011) 'Neuroprotection mediated through estrogen receptor-in astrocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), pp. 8867–8872. doi: 10.1073/pnas.1103833108.

Spence, R. D. and Voskuhl, R. R. (2012) 'Neuroprotective effects of estrogens

and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(1), pp. 105–115. doi: 10.1016/j.yfrne.2011.12.001.

Stamatiades, G. A. and Kaiser, U. B. (2018) 'Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 463, pp. 131–141. doi: 10.1016/j.mce.2017.10.015.

Steiner, R. A. (2013) 'Kisspeptin: Past, Present, and Prologue', in *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology*, pp. 3–7. doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9\_1.

Sugimura, Y. *et al.* (2005) 'Protective effect of dexamethasone on osmotic-induced demyelination in rats', *Experimental Neurology*, 192(1), pp. 178–183. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.10.018.

Takumi, K., Iijima, N. and Ozawa, H. (2011) 'Developmental Changes in the Expression of Kisspeptin mRNA in Rat Hypothalamus', *Journal of Molecular Neuroscience*, 43(2), pp. 138–145. doi: 10.1007/s12031-010-9430-1.

Terasawa, E. (2018) 'Neuroestradiol in regulation of GnRH release', *Hormones and Behavior*, 104(April), pp. 138–145. doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.04.003.

Terasawa, E., Guerriero, K. A. and Plant, T. M. (2013) *Kisspeptin and Puberty in Mammals*. doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9\_12.

Terasawa, E. and Kenealy, B. P. (2012) 'Neuroestrogen, rapid action of estradiol, and GnRH neurons', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(4), pp. 364–375. doi: 10.1016/j.yfrne.2012.08.001.

Thompson, I. R. and Kaiser, U. B. (2014) 'GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 385(1–2), pp. 28–35. doi: 10.1016/j.mce.2013.09.012.

Tobet, S. A. and Schwarting, G. A. (2006) 'Minireview: Recent Progress in Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Migration', *Endocrinology*, 147(3), pp. 1159–1165. doi: 10.1210/en.2005-1275.

Tomassini, V. (2005) 'Sex hormones modulate brain damage in multiple sclerosis: MRI evidence', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76(2), pp. 272–275. doi: 10.1136/jnnp.2003.033324.

Toro, J. (2000) 'Enfermedades desmielinizantes y dismielinizantes', *Neurología de próxima aparición*, pp. 189–203.

Trewin, A. L. *et al.* (1998) 'Cyclic Changes in Serum Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone and Inhibin During the Guinea Pig Estrous Cycle', 44(4), pp. 353–357.

Trifunovic, S. *et al.* (2021) 'The Function of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Involvement of Oxidative Stress Mediators', *Frontiers in Neuroscience*, 15(June), pp. 1–14. doi: 10.3389/fnins.2021.649485.

Trouwborst, I. *et al.* (2021) 'Sexual Dimorphism in Body Weight Loss, Improvements in Cardiometabolic Risk Factors and Maintenance of Beneficial Effects 6 Months after a Low-Calorie Diet: Results from the Randomized Controlled DiOGenes Trial', *Nutrients*, 13(5), p. 1588. doi: 10.3390/nu13051588.

Turi, G. F., Liposits, Z. and Hrabovszky, E. (2008) 'Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat', 52, pp. 723–728. doi: 10.1016/j.neuint.2007.09.001.

Uenoyama, Y. *et al.* (2011) 'Ultrastructural Evidence of Kisspeptin-Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Interaction in the Median Eminence of Female Rats: Implication of Axo-Axonal Regulation of GnRH Release', *Journal of Neuroendocrinology*, 23(10), pp. 863–870. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02199.x.

Uenoyama, Y. *et al.* (2015) 'Central estrogen action sites involved in prepubertal restraint of pulsatile luteinizing hormone release in female rats', *Journal of Reproduction and Development*, 61(4), pp. 351–359. doi: 10.1262/jrd.2014-143.

Uenoyama, Y., Tomikawa, J., *et al.* (2016) 'Molecular and Epigenetic Mechanism Regulating Hypothalamic Kiss1 Gene Expression in Mammals', *Neuroendocrinology*, 103(6), pp. 640–649. doi: 10.1159/000445207.

Uenoyama, Y., Pheng, V., *et al.* (2016) 'The roles of kisspeptin revisited: inside and outside the hypothalamus', *Journal of Reproduction and Development*, 62(6), pp. 537–545. doi: 10.1262/jrd.2016-083.

Usuda, K. *et al.* (2014) 'Neonatal Exposure to 17 $\alpha$ -Ethinyl Estradiol Affects Kisspeptin Expression and LH-Surge Level in Female Rats', *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(8), pp. 1105–1110. doi: 10.1292/jvms.14-0148.

Vargas-Castro, V. *et al.* (2021) 'Long-term taurine administration improves motor skills in a tubulinopathy rat model by decreasing oxidative stress and promoting myelination', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 115(March), p. 103643. doi: 10.1016/j.mcn.2021.103643.

Vihko, K. K. *et al.* (1991) 'Stimulatory Effects of Recombinant Follicle-Stimulating Hormone on Leydig Cell Function and Spermatogenesis in Immature Hypophysectomized Rats\*', *Endocrinology*, 129(4), pp. 1926–1932. doi: 10.1210/endo-129-4-1926.

Voskuhl, R. R. *et al.* (2016) 'Estriol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial', *The Lancet Neurology*, 15(1), pp. 35–46. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00322-1.

Wakabayashi, Y. *et al.* (2010) 'Neurokinin B and Dynorphin A in Kisspeptin Neurons of the Arcuate Nucleus Participate in Generation of Periodic Oscillation of Neural Activity Driving Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion in the Goat', *Journal of Neuroscience*, 30(8), pp. 3124–3132. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5848-09.2010.

Walton, C. *et al.* (2020) 'Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide:

Insights from the Atlas of MS, third edition', *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), pp. 1816–1821. doi: 10.1177/1352458520970841.

Wang, L. *et al.* (2019) 'Genetic dissection of the different roles of hypothalamic kisspeptin neurons in regulating female reproduction', *eLife*, 8, pp. 1–26. doi: 10.7554/eLife.43999.

Watanabe, Y. *et al.* (2020) 'Mating-induced increase in Kiss1 mRNA expression in the anteroventral periventricular nucleus prior to an increase in LH and testosterone release in male rats', *Journal of Reproduction and Development*, 66(6), pp. 579–586. doi: 10.1262/jrd.2020-067.

Waubant, E. (2018) 'Effect of puberty on multiple sclerosis risk and course', *Multiple Sclerosis*, 24(1), pp. 32–35. doi: 10.1177/1352458517737393.

Wei, T. and Lightman, S. L. (1997) 'The neuroendocrine axis in patients with multiple sclerosis', *Brain*, 120(6), pp. 1067–1076. doi: 10.1093/brain/120.6.1067.

Westwood, F. R. (2008) 'The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging', *Toxicologic Pathology*, 36(3), pp. 375–384. doi: 10.1177/0192623308315665.

Wierman, M. E., Kiseljak-Vassiliades, K. and Tobet, S. (2011) 'Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: Initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(1), pp. 43–52. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.07.005.

Wilkins, A. *et al.* (2010) 'Slowly progressive axonal degeneration in a rat model of chronic, nonimmune-mediated demyelination', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 69(12), pp. 1256–1269. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181ffc317.

Witkin, J. W. *et al.* (1991) 'Effects of Gonadal Steroids on the Ultrastructure of GnRH Neurons in the Rhesus Monkey: Synaptic Input and Glial Apposition\*', *Endocrinology*, 129(2), pp. 1083–1092. doi: 10.1210/endo-129-2-1083.

Witkin, J. W., O'Sullivan, H. and Silverman, A. J. (1995) 'Novel associations among gonadotropin-releasing hormone neurons.', *Endocrinology*, 136(10), pp. 4323–4330. doi: 10.1210/endo.136.10.7664651.

Wu, S. and Wolfe, A. (2012) 'Signaling of cytokines is important in regulation of GnRH neurons', *Molecular Neurobiology*, 45(1), pp. 119–125. doi: 10.1007/s12035-011-8224-y.

Zhang, C. *et al.* (2015) '17 $\beta$ -Estradiol Increases Persistent Na<sup>+</sup> Current and Excitability of AVPV/PeN Kiss1 Neurons in Female Mice', *Molecular Endocrinology*, 29(4), pp. 518–527. doi: 10.1210/me.2014-1392.

Zhang, G. X. *et al.* (2023) 'Incidencia y prevalencia de la esclerosis múltiple en China y países asiáticos', *Neurología*, 38(3), pp. 159–172. doi: 10.1016/j.nrl.2020.07.022.

Zirkin, B. R. and Papadopoulos, V. (2018) 'Leydig cells: Formation, function, and regulation', *Biology of Reproduction*, 99(1), pp. 101–111. doi: 10.1093/biolre/i0y059.

Zwain, I. H. and Yen, S. S. C. (1999) 'Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain', *Endocrinology*, 140(8), pp. 3843–3852. doi: 10.1210/endo.140.8.6907.

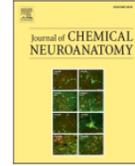
## Anexo

Journal of Chemical Neuroanatomy 123 (2022) 102120



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Chemical Neuroanatomy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jchemneu](http://www.elsevier.com/locate/jchemneu)

## Sex-specific hypothalamic expression of kisspeptin, gonadotropin releasing hormone, and kisspeptin receptor in progressive demyelination model

Luz Patricia Muñoz de la Torre<sup>a,b</sup>, Angélica Trujillo Hernández<sup>c,\*</sup>, Jose R Eguibar<sup>d</sup>, Carmen Cortés<sup>d</sup>, Leticia Morales-Ledesma<sup>b,\*\*</sup><sup>a</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrados, Edificio A, 1° piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510 Ciudad de México, Mexico<sup>b</sup> Laboratorio de Fisiología Reproductiva, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 09230 Ciudad de México, Mexico<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Mexico<sup>d</sup> Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, Mexico

## ARTICLE INFO

Keywords:  
Demyelination  
Taiep  
Kisspeptin  
LH

## ABSTRACT

Demyelinating diseases, such as multiple sclerosis, decrease the quality of life of patients and can affect reproduction. Assisted reproductive therapies are available, which although effective, aggravate motor symptoms. For this reason, it is important to determine how the control of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis is affected in order to develop better strategies for these patients. One way to determine this is using animal models such as the *taiep* rat, which shows progressive demyelination of the central nervous system, and was used in the present study to characterize the expression of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), Kisspeptin, and kisspeptin receptor (Kiss1R) and luteinizing hormone (LH) secretion. The expression of kisspeptin, GnRH, and Kiss1R was determined at the hypothalamic level by immunofluorescence and serum LH levels were determined by ELISA. The expression of kisspeptin at the hypothalamic level showed sexual dimorphism, where there was an increase in males and a decrease in females during oestrus. There was no change in the expression of GnRH or kisspeptin receptor, regardless of sex. However, a decrease in serum LH concentration was observed in both sexes. The *taiep* rat showed changes in the expression of kisspeptin at the hypothalamic level. These changes are different from those reported in the literature with the use of animals with experimental allergic encephalomyelitis, this is because both animal models represent different degrees of progression of multiple sclerosis. Our results suggest that the effects on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis depend on the differences between the demyelinating processes, their progression, and even individual factors, and it is thus important that fertility treatments are individualized to maximize therapeutic effects.

## 1. Introduction

Demyelinating diseases affect the quality of life of patients because their symptoms complicate the performance of daily activities (Burg, 2018; Dahmardeh et al., 2021; Franek et al., 2019; Merghati-Khoei et al., 2013; Mrosková et al., 2021). One of the most common demyelinating diseases is multiple sclerosis (MS) (Cañellas et al., 2007). This disease can occur throughout an individual's life, with a higher presence in populations aged 20–40 years (Dahmardeh et al., 2021; Love, 2006), and its incidence has increased worldwide in recent years (Rivera, 2017;

Walton et al., 2020; Zhang et al., 2020). Different studies have reported the presence of reproductive problems in patients with MS, such as increased gonadotropic hormone levels, decreased steroid hormone levels, and altered gonadal function; these alterations show sexual dimorphism and can lead to infertility (Bove et al., 2015; Cavalla et al., 2006; D'Amico et al., 2020; Glazer et al., 2018; Pakpoor et al., 2014; Sepúlveda et al., 2016).

Due to these reproductive problems, women with MS have opted to use assisted reproductive techniques, which include the administration of GnRH agonists and recombinant FSH (Correale et al., 2012). One side

\* Correspondence to: Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edificio BIO1 Ciudad Universitaria, Colonia Jardines de San Manuel, Puebla, Mexico.

\*\* Correspondence to: Laboratorio de Fisiología Reproductiva, FES Zaragoza UNAM, Fuerte de Loreto, Batalla 5 de mayo s/n Esq, Iztapalapa, Mexico.

E-mail addresses: [angelica.trujillo@correo.buap.mx](mailto:angelica.trujillo@correo.buap.mx) (A. Trujillo Hernández), [leticiamorales@comunidad.unam.mx](mailto:leticiamorales@comunidad.unam.mx) (L. Morales-Ledesma).

<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2022.102120>

Received 25 March 2022; Received in revised form 24 May 2022; Accepted 13 June 2022

Available online 16 June 2022

0891-0618/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

effect of these techniques are increased relapse episodes, which are associated with an increase in CD4 + cells, which produce IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ , and TGF- $\beta$  (Bove et al., 2020; Correale et al., 2012). It is necessary to investigate possible alterations at the hypothalamic level in MS patients in order to develop successful fertility treatments that do not alter the course of the disease.

Animal models are used to understand the reproductive alterations caused by demyelination. One of the most widely used models is that of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) (Constantinescu et al., 2011; Link and Xiao, 2001). Rats with acute monophasic EAE show sex-dependent hypothalamic alterations, where males exhibit a down-regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) mRNA and decreased testosterone levels, females exhibit a down-regulation of kisspeptin mRNA and increased progesterone levels, and both males and females exhibit decreased luteinizing hormone (LH) levels (Milosevic et al., 2020). The EAE model is highly heterogeneous in terms of the induction methods, the developed symptomatology, and the animal models used, which implies certain limitations when compared with the human disease (Constantinescu et al., 2011). Given that the development of MS is influenced by the interaction of genetic and environmental factors (Thompson et al., 2018), it is necessary to use animal models that exhibit a demyelination of genetic origin which would allow us to analyze the possible reproductive alterations that may occur in such models.

In the present study, we used the myelin mutant *taiep* rat, which was obtained by B. Holmgren and R.Urbá-Holmgren at the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla through selective crossbreeding of the Sprague-Dawley (SD) rat (Holmgren et al., 1989). This animal exhibits hypomyelination of the central nervous system (CNS), which evolves to progressive demyelination in the adult stage, affecting regions such as the optic nerve, the fasciculus gracilis, and the corticospinal tract (Duncan et al., 1992; Lunn et al., 1997a; O'Connor et al., 2000). Hypomyelination in the *taiep* rat is caused by an abnormal accumulation of microtubules in the smooth endoplasmic reticulum (Couve et al., 1997; Song et al., 1999) resulting from a mutation of the Tubb4a gene in the Ala302Thr region of  $\beta$ -tubulin (Duncan et al., 2017; Garduno-Robles et al., 2020). As a consequence of this mutation, the *taiep* rat exhibits a progressive neurological motor syndrome characterized by tremors, ataxia, immobility episodes, epilepsy, and hindlimb paralysis, and the acronym of these signs is the name of the rat (Holmgren et al., 1989). The symptoms start at 30 days of age with tremors, then ataxia is observed at 4 months, immobility episodes and epilepsy occur at 4–5 months, and it is until 7 months of age when hindlimb paralysis is observed (Holmgren et al., 1989; Li et al., 2003; Lunn et al., 1997b). In addition, the *taiep* rat has been shown to exhibit sexual dimorphism in gripping-induced immobility episodes, with males showing a higher incidence of these episodes (Cortés et al., 2005).

The *taiep* rat has been reported to show neuroinflammation caused by increased nitrosative stress, lipid peroxidation, and presence of pro-inflammatory cytokines (Leon-Chavez et al., 2006). A reduction in remyelinating factors, such as FGF2 and CXCL1, has also been reported, as well as a down-regulation of IL-1 $\beta$ , IL-10, TGF $\beta$ 1 (Soto-Rodríguez et al., 2015; Soto-Rodríguez et al., 2012). These alterations are observed in animals of 1 and 6 months of age, indicating that the *taiep* rat shows a chronic neuroinflammation profile (Soto-Rodríguez et al., 2015). At the reproductive level, both sexes of the *taiep* rat have been shown to be fertile, but their fertility is lower compared to SD rats (Holmgren et al., 1989). Females of 30 days of age have been observed to show increased testosterone concentrations, delayed vaginal opening, and a reduced follicular population accompanied by an increase in atretic follicles and a decrease in the expression of ovarian catecholamines (Muñoz-de-la-Torre et al., 2018). Female *taiep* rats of 90 days of age show irregular oestrous cycles, and rats in oestrus have been reported to show increased progesterone and decreased estradiol concentrations, increased follicular atresia, the presence of follicular cysts, and a decrease in the expression of ovarian catecholamines

(Muñoz-de-la-Torre et al., 2018). In the case of male rats, there are currently no reports of reproductive alterations at the gonadal level.

Considering the evidence of reproductive alterations caused by demyelinating problems both in patients and animal models, the present study aimed to use the *taiep* rat to characterize the expression of kisspeptin, GnRH, and kisspeptin receptor (Kiss1R) in the hypothalamic areas involved in the control of reproductive function: the anteroventral periventricular area (AVPV), the arcuate nucleus (ARC), and the median eminence (ME). In addition, we measured serum LH levels. The objective was to determine how progressive demyelination affects reproductive function at the level of the CNS and contribute with useful information for the implementation of therapies to improve the quality of life of patients with demyelinating diseases.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

All experiments were performed according to the Mexican law of protection and treatment of animals and followed the specifications of the official Mexican standard NOM-062-ZOO-1999, and the experiment was approved by the committee for animal care and laboratory animal use of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla under protocol number 100274222-UALVIEP-20/1 to reduce as much as possible the number of animals and prevent their suffering.

For this study, *taiep* rats were obtained from the Animal Facility of the Institute of Physiology of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, where they were obtained from *taiep* x *taiep* crosses, and the colony is maintained by crossing F1 hybrids (Holmgren et al., 1989). We used 48 animals, 24 *taiep* and 24 SD, which were distributed in 4 groups (males, females in diestrus, females in proestrus, and females in oestrus), with  $n = 6$  animals per group. All animals were kept in boxes of 3 individuals (males and females were separated) under controlled light-darkness conditions (12–12 hrs, lights turned on at 7 am), a temperature of  $22 \pm 2$  °C, and free access to food and water. Vaginal smears were performed on females for 2 weeks between 9:00–10:00 am prior to sacrifice.

Male rats were sacrificed at 90 days of age. Females were sacrificed at  $90 \pm 2$  days according to the oestrous cycle. Rats in oestrus were sacrificed if it was preceded by proestrus, rats in proestrus were sacrificed only if it was preceded by diestrus, and in the case of diestrus, only if it was preceded by metestrus. The visible symptoms of *taiep* rats of both sexes at sacrifice were tremors.

All the animals were weighed in a digital scale (Nahita, series 5041) and sacrificed using an overdose of pentobarbital (63 mg/mL; normal dosage 20 I.U./100 g of body weight) between 9:00–11:00 hrs. The reproductive organs were obtained and weighed fresh (ovaries and testicles), and in the case of females in oestrus, the oviduct was obtained to evaluate the number of oocytes released using standard laboratory methodology (Morales-Ledesma et al., 2010; Morales et al., 1998). Blood was collected and kept at ambient temperature for 30 min, then it was centrifuged at 3500 rpm for 15 min. The serum was separated and stored at  $-20$  °C in microcentrifuge tubes until LH quantification.

### 2.2. LH quantification

LH levels were quantified using ELISA kits following the manufacturer's specifications (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), which use a mouse anti-LH monoclonal antibody that recognizes human and rat LH. The intra-assay coefficient of variation was 5.3%, while the inter-assay coefficient was 15.5%. The sensibility of the assay was 0.612 ng/mL with a confidence limit of 2. The specificity of the assay was the following: LH (100%), FSH ( $\leq 0.004\%$ ), TSH (0.3%), and hCG ( $\leq 0.004\%$ ). Absorbance values were measured with a microplate reader (ELx8<sup>™</sup>, BioTek instruments, Inc, USA) at 450 nm and the final concentrations are reported in ng/mL.

2.3. Section preparation for immunohistochemistry

After dissection, the brains were fixed in 10% Formalin Neutral Buffer, dehydrated, and embedded in paraffin. The tissue was obtained following the methodology according to Salehi (2013) and the subsequent identification of the structures was made according to the Paxinos & Watson atlas (Paxinos and Watson, 1998); AVPV: bregma – 0.26 to – 0.40; ARC-ME: Bregma – 2.12 to – 3.30 mm. For the analysis of each structure (ARC-ME, AVPV), eight 10-µm thick sections were obtained per animal (Table 1). The sections were mounted on gelatinized slides.

2.4. Tissue pretreatments and immunohistochemistry

The sections were subjected to antigen retrieval in citrate buffer (10 mM Citric Acid, 0.05% Tween 20, pH 6.0) for 2 min at 90 °C. They were allowed to cool for 30 min and then rinsed with Tris-Buffered Saline with Tween® 20 (TBST 10X, Cell Signaling technology, #9997). Finally, the sections were blocked by incubation in 0.25% casein for 2 h.

In the case of the AVPV and the ARC, the sections were incubated using a Cy5-conjugated rabbit kisspeptin polyclonal antibody (1:150; Bioss Antibodies; bs-0749R-Cy5; this antibody detects the Kisspeptin-10 region of Kisspeptin). In the case of the ME, the sections were double-labeled and incubated using a Cy3-conjugated KISS1 receptor Polyclonal Antibody (1:150; Bioss Antibodies; bs-2501R-Cy3) and an Alexa fluor 488-conjugated Gonadoliberin 1 Polyclonal Antibody, (1:150; Bioss Antibodies; bs-10369R-A488). In both cases, samples were kept in darkness for 24 h at 4 °C and then washed and mounted. Sections without the antibody were used as a negative control.

2.5. Confocal microscopy

Fluorescent signals were studied with a Zeiss LSM5 PASCAL confocal microscope. High resolution images were obtained using a plan-neofluar 40x/1.3 oil objective lens. Different fluorochromes were used and detected with the following laser lines: 488 nm for Alexa fluor 488, 514 nm for Cy3, and 633 nm for Cy5. Emission filters were as follows: 530 nm for Alexa fluor 488, 560 nm for Cy3, and 650 nm for Cy5. Images were captured using the Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510, Red (For kisspeptin), Green (for GnRH), and yellow (for Kiss1R); the images were saved and exported in TIFF format using LSM Image Browser version 3.4.0.359.

2.6. Image analysis

The obtained images of the AVPV and the ARC were used to count the number of kisspeptin-immunoreactive cell bodies (IRcb), which are those that showed a defined oval shape. The color histogram tool of ImageJ 1.50i (NiH, USA, https://imagej.nih.gov/ij/index.html) was used to determine the fluorescence intensity, which is interpreted as an approximation of the amount of kisspeptin, GnRH, or Kiss1R in the cell bodies or fibers. A total of 720 IRcb were evaluated, 480 in the ARC and 240 in the AVPV. A total of 240 randomly selected areas of 1000px were analyzed to determine the fluorescence intensity for GnRH and Kiss1R in

**Table 1**  
Number of coronal sections used to analyze each area of interest per experimental group.

| Experimental Group |           | AVPV | ARC-ME |
|--------------------|-----------|------|--------|
| <i>Taiep</i>       | Male      | 48   | 48     |
|                    | Diestrus  | 48   | 48     |
|                    | Proestrus | 48   | 48     |
|                    | Oestrus   | 48   | 48     |
|                    | Male      | 48   | 48     |
| SD                 | Diestrus  | 48   | 48     |
|                    | Proestrus | 48   | 48     |
|                    | Oestrus   | 48   | 48     |
|                    | Male      | 48   | 48     |

the EM.

2.7. Statistical analysis

The obtained data were analyzed with a Shapiro-Wilk normality test. The comparisons of number of IRcb, fluorescence intensity, and serum LH concentration between the different groups were made with a two-way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ). The categories used in the ANOVA were “Strain”, *taiep* and SD rats, and “Sex-Oestrus Cycle”, females in different stages of the oestrus cycle and male rats. All pairwise multiple comparison procedures were performed using the Holm-Sidak method for group comparisons. The comparisons of number of IRcb in the different regions analyzed, body and reproductive organ weight, and number of oocytes were made with a Student’s t-test. Differences in probabilities equal or lower than 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed in Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc.).

3. Results

The weight of male and female *taiep* rats was lower compared to SD rats (Table 2). Male *taiep* rats showed increased testicular weight compared to SD rats. Female *taiep* rats exhibited irregular estrous cycles without changes in the percentage of each stage of the cycle (Fig. 1). No differences were observed in ovarian weight or in the mean number of oocytes released with respect to SD rats (Table 2).

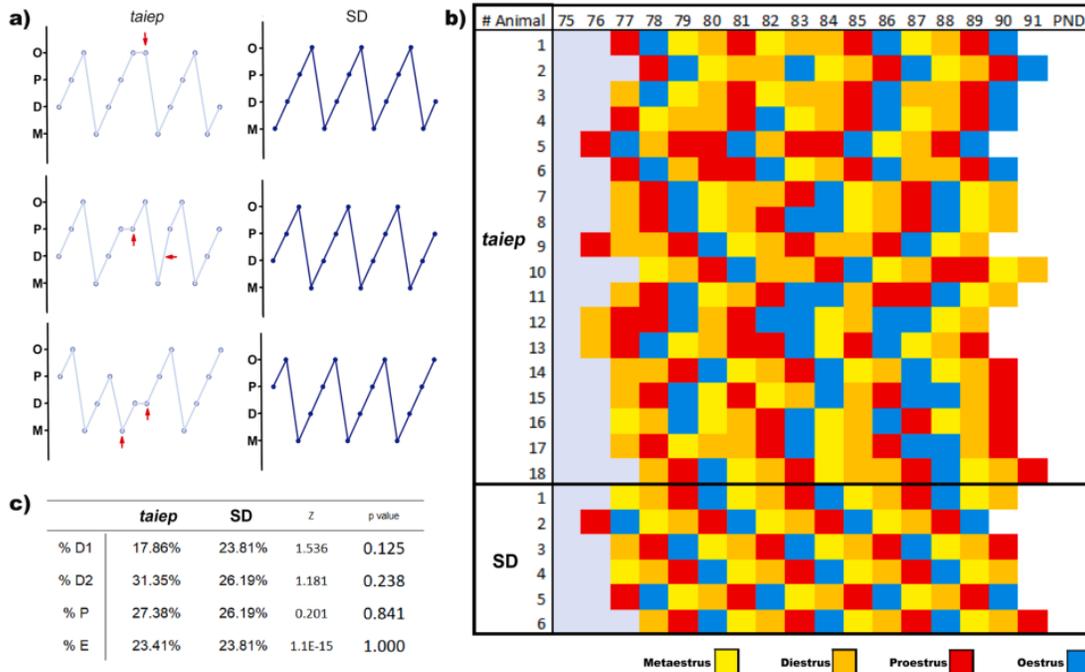
3.1. Presence of kisspeptin in the ARC

The immunohistochemical analysis using Kisspeptin antibodies showed numerous IRcb in the ARC sections (Fig. 2. a) of *taiep* and SD rats from the four “Sex-Oestrus Cycle” groups; this is shown in Fig. 2. d. When analyzing the count of IRcb with the two-way ANOVA, there were statistically significant differences between the groups of “Sex-Oestrus Cycle” ( $F= 27.446, p < 0.001$ ) and “Strain” ( $F= 40.696, p < 0.001$ ). There was also a significant interaction between “Strain” and “Sex-Oestrus Cycle” ( $F= 3.842, p = 0.017$ ). Male *taiep* rats showed a higher number of IRcb compared to male SD rats. In addition, *taiep* rats in oestrus showed a higher number of IRcb compared to the other stages of the oestrous cycle (Fig. 2. c).

In the case of fluorescence intensity for kisspeptin (Fig. 2. b), the Two-way ANOVA identified a significant effect of “Sex-Oestrus Cycle” ( $F= 38.682, p < 0.001$ ) but no effect of “Strain” ( $F= 1.270, p = 0.27$ ). There was also a significant interaction between “Strain” and “Sex-Oestrus Cycle” ( $F=9.184, p < 0.001$ ). A comparison between the four

**Table 2**  
Body and organ weight of male and female *taiep* rats. The table includes the number of oocytes found in the oviducts of *taiep* rats. Data are expressed as the mean±SEM with units in milligrams per 100 g of body weight (mg/100gBW). (Total number analyzed: 6 males and 18 females per group). Significant values are marked with \*.

|  | <i>taiep</i>      | Sprague-Dawley   | df       | t       | p-value   |
|--|-------------------|------------------|----------|---------|-----------|
| <b>Males</b>                             |                   |                  |          |         |           |
| <b>Body weight (g)</b>                   | 299.900 ± 4.538   | 437.083 ± 8.495  | -137.183 | -14.243 | < 0.001 * |
| <b>Testicles (mg/100gBW)</b>             | 1050.434 ± 35.910 | 836.846 ± 35.201 | 213.589  | 4.248   | 0.002 *   |
| <b>Females</b>                           |                   |                  |          |         |           |
| <b>Body weight (g)</b>                   | 216.739 ± 1.799   | 275.800 ± 3.688  | -59.061  | -14.394 | < 0.001 * |
| <b>Ovaries (mg/100gBW)</b>               | 45.717 ± 2.756    | 40.822 ± 1.261   | 4.895    | 1.615   | 0.116     |
| <b>Number of oocytes in the oviducts</b> | 5.250 ± 1.974     | 8.500 ± 0.681    | 3.250    | 1.968   | 0.077     |



**Fig. 1.** Schematic diagram of the oestrous cycle of *taiep* and SD rats. a) Diagrams of the oestrous cycles of *taiep* and SD rats; red flags indicate the points where the oestrous cycle was altered. O: oestrus, P: proestrus, D: diestrus, M: metestrus. b) Oestrous cycle of all the *taiep* rats used in this study and 6 SD rats. c) Percentages of oestrous cycle stages; comparisons were made with a Z-test. SD: Sprague-Dawley.

“Sex-Oestrus Cycle” groups using the Holm-Sidak post hoc test showed a higher fluorescence intensity in male *taiep* rats compared to male SD rats (Fig. 2. b). In female rats, diestrus and proestrus showed no difference in fluorescence intensity regardless of strain. The oestrus stage showed lower fluorescence intensity in *taiep* rats compared to SD rats, but both showed higher fluorescence intensity in this stage when compared to the other stages of the oestrus cycle (Fig. 2. b).

### 3.2. Presence of kisspeptin in the AVPV

In both strains, the immunohistochemical analysis using Kisspeptin antibodies showed IRcb (Fig. 3. d). When analyzing the count of IRcb with the two-way ANOVA, we observed a significant effect of “Sex-Oestrus Cycle” ( $F=12.780, p < 0.001$ ) and “Strain” ( $F=12.633, p < 0.001$ ), but there was no interaction between these two factors ( $F=2.092, p = 0.117$ ). Male *taiep* rats showed a higher number of IRcb compared to male SD rats. *Taiep* rats in oestrus showed a higher number of IRcb compared to SD rats in oestrus (Fig. 3. c). In addition, *taiep* rats in oestrus showed a higher number of IRcb compared to the other stages of the oestrous cycle (Fig. 3. c).

In this area (Fig. 3. a), the Two-way ANOVA identified a significant effect of “Sex-Oestrus Cycle” ( $F=38.305, p < 0.001$ ) and of the interaction between “Strain” and “Sex-Oestrus Cycle” ( $F=4.991, p = 0.002$ ) on the expression of kisspeptin. However, there were no effects related to “Strain” ( $F=0.282, p = 0.596$ ). The comparison of the four “Sex-Oestrus Cycle” groups using the Holm-Sidak post hoc test showed that female rats in oestrus exhibit the highest fluorescence intensity compared to the other oestrus cycle stages and male rats (Fig. 3. b). Male *taiep* rats showed higher fluorescence intensity compared to male SD rats (Fig. 3. b). In female *taiep* rats, only the oestrus stage showed significant changes, with lower fluorescence intensity compared to female SD rats (Fig. 3. b), but higher intensity compared to the other stages of the oestrus cycle.

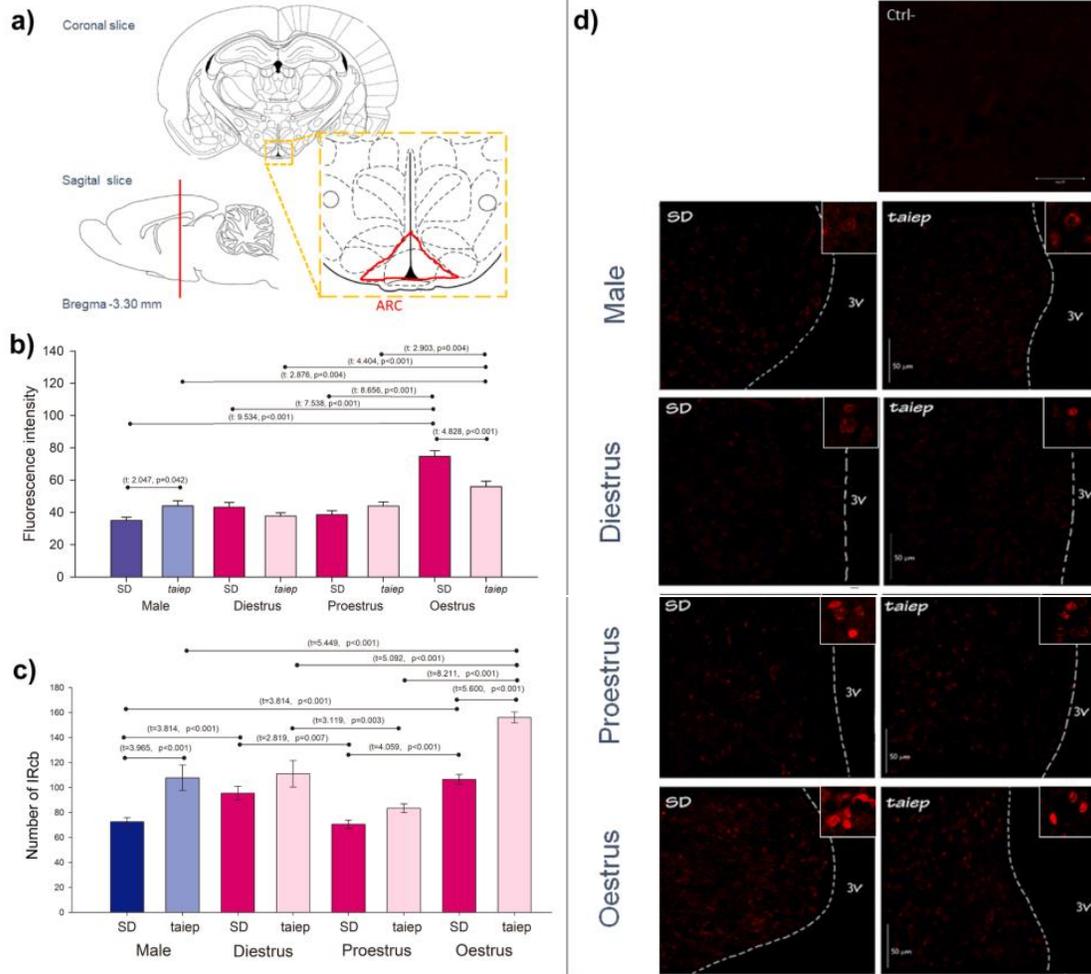
### 3.3. Comparison of the number of IRcb in the AVPV and ARC

There was a higher number of IRcb in the ARC in both *taiep* and SD rats compared to that observed in the AVPV (Fig. 4).

### 3.4. Presence of GnRH and Kiss1R in ME

In the ME (Fig. 5. a), the Two-way ANOVA of the expression of GnRH did not identify any effect of “Strain” ( $F=0.891, p = 0.346$ ) or of the interaction between “Strain” and “Sex-Oestrus Cycle” ( $F=0.579, p = 0.629$ ), but “Sex-Oestrus Cycle” showed a significant effect ( $F=28.754, p < 0.001$ ). The comparison of the four “Sex-Oestrus Cycle” groups using the Holm-Sidak post hoc test showed that female rats in proestrus exhibit the highest fluorescence intensity compared to the other oestrus cycle stages (Fig. 5. b). Male *taiep* rats showed the lowest fluorescence intensity compared to any of the oestrus cycle stages (Fig. 5. b). The Two-way ANOVA of the expression of Kiss1R showed only a significant effect of “Sex-Oestrus Cycle” ( $F=70.715, p < 0.001$ ), but there was no effect of “Strain” ( $F=0.631, p = 0.428$ ) or of the interaction between “Strain” and “Sex-Oestrus Cycle” ( $F=1.194, p = 0.313$ ). The comparison of the four “Sex-Oestrus Cycle” groups using the Holm-Sidak post hoc test showed the same results as those for GnRH, where the highest fluorescence intensity can be observed in females during proestrus and the lowest intensity is observed in males (Fig. 5. c).

The immunohistochemical analysis using gonadoliberein 1 antibodies showed immunoreactive fibers in the ME sections of males and of females in different oestrus cycle stages of both strains (Fig. 5. d). The use of Kiss1R antibodies showed the coexpression of Kiss1R in the same fibers (Fig. 5. e).



**Fig. 2.** Analysis of kisspeptin in the arcuate nucleus (ARC) of *taiep* and Sprague-Dawley (SD) rats. a) Location of the ARC, modified from Paxinos and Watson (1998). b) Fluorescence intensity for kisspeptin; values are expressed as the mean ± SEM of 60 immunoreactive cell bodies (IRcb) per analyzed group (Total number analyzed: 480 IRcb). c) Number of kisspeptin-IRcb; values are expressed as the mean ± SEM of 8 sections per brain from 6 independent animals (Total number analyzed: 48 brain sections per group). d) Representative images of the ARC of the different analyzed groups showing kisspeptin-immunoreactive cell bodies; 4x magnifications are shown on the upper right corner of each image.

### 3.5. Serum LH levels

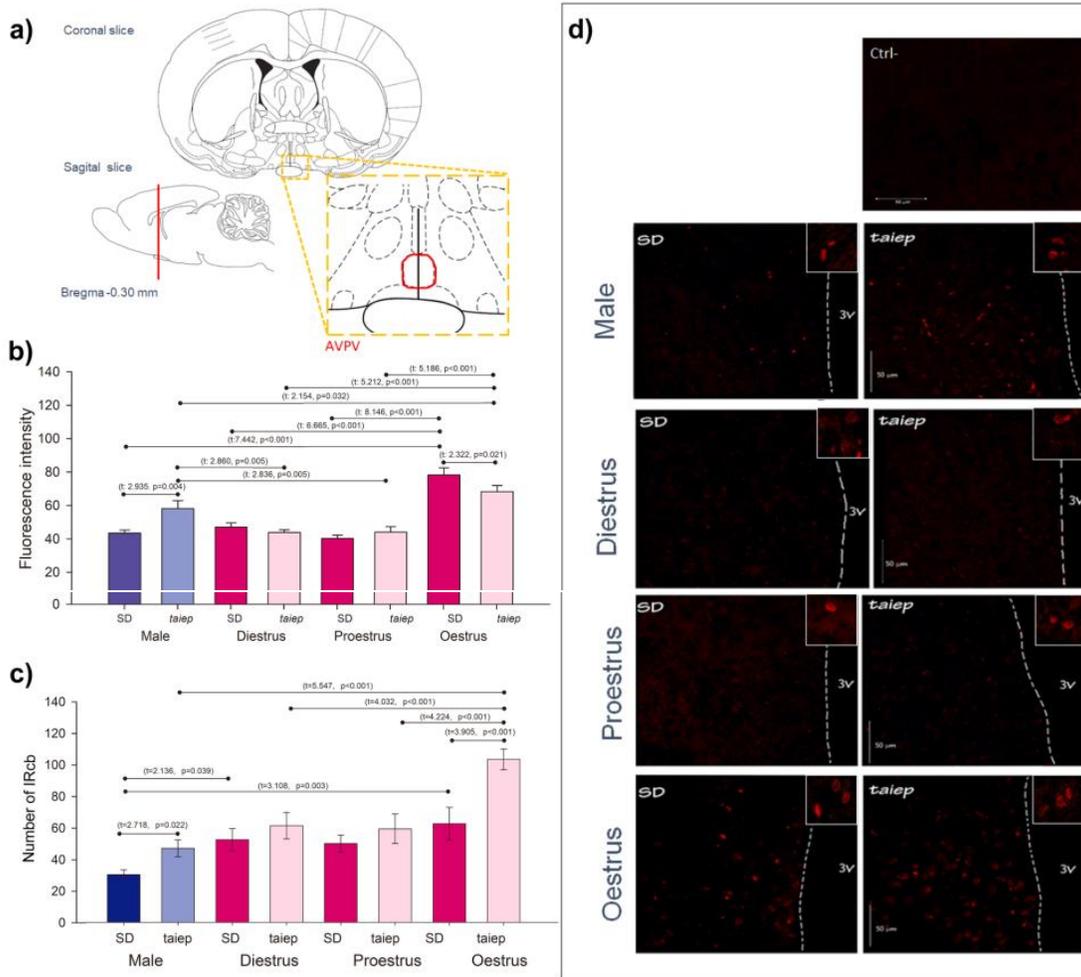
The Two-way ANOVA identified a significant effect of “Strain” ( $F=14.66, p < 0.001$ ) but not of “Sex-Oestrus Cycle” ( $F=0.32, p = 0.72$ ) on serum LH levels, and there was also no effect of the interaction between “Strain” and “Sex-Oestrus Cycle” ( $F=1.09, p = 0.35$ ). Female *taiep* rats showed low serum LH levels compared to SD rats and serum LH levels in male *taiep* rats showed the same pattern (Fig. 6).

### 4. Discussion

Our results show that the *taiep* rat, a model of progressive demyelination of the CNS similar to progressive MS (Wilkins et al., 2010), exhibits alterations in the fluorescence intensity for kisspeptin in both sexes, with an increase in males and a decrease in females, without changes in the expression of GnRH and Kiss1R. These findings differ from those reported by Milosevic in the EAE model, since they described

a decrease in GnRH mRNA expression in males, while females showed a down-regulation of kisspeptin mRNA (Milosevic et al., 2020). These differences suggest that the hypothalamic alterations in reproductive control observed in models of demyelination depend on the type of demyelinating process, the animal species used, and the progression of the disease.

In recent years, it has been established that kisspeptin neurons are involved in reproductive control at the hypothalamic level (Pinilla et al., 2012; Terasawa et al., 2018). In the case of rats, two regions expressing these neurons have been identified: the ARC (Herbison, 2020; Uenoyama et al., 2016) and the AVPV (Herbison, 2020; Ieda et al., 2020), also known as the rostral periventricular region of the 3rd ventricle (Harter et al., 2018). In our model, the demyelinating process does not affect the distribution of kisspeptin-IRcb since they were identified in both the ARC and AVPV. It has also been established that the number of kisspeptin neurons in the AVPV of adult rats is lower compared to the ARC (Kinsey-Jones et al., 2014; Overgaard et al., 2013;



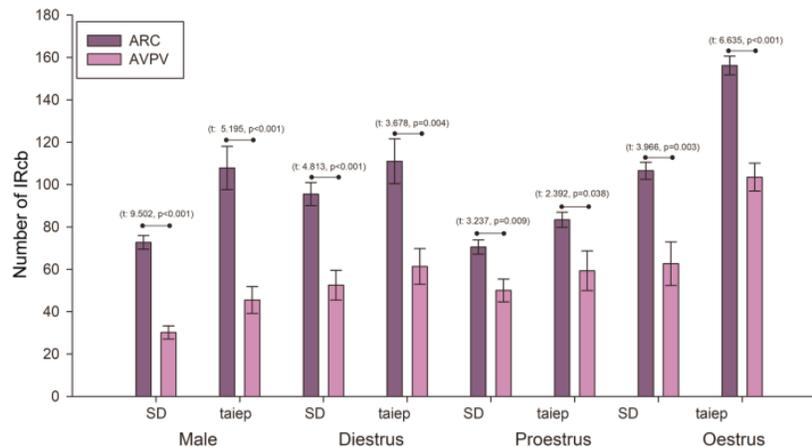
**Fig. 3.** Analysis of kisspeptin in the anteroventral periventricular area (AVPV) of *taiep* and Sprague-Dawley (SD) rats. a) Location of the AVPV, modified from Paxinos and Watson (1998). b) Fluorescence intensity for kisspeptin; values are expressed as the mean ± SEM of 30 immunoreactive cell bodies (IRcb) per analyzed group (Total number analyzed: 240 IRcb). c) Number of kisspeptin-IRcb; values are expressed as the mean ± SEM of 8 sections per brain from 6 independent animals (Total number analyzed: 48 brain sections per group). d) Representative images of the AVPV of the different analyzed groups showing kisspeptin-immunoreactive cell bodies; 4x magnifications are shown on the upper right corner of each image.

Takumi et al., 2011), which is consistent with that observed in the *taiep* rat.

Sexual dimorphism has been reported in the presence of kisspeptin neurons in the AVPV (Kauffman et al., 2007; Takumi et al., 2011), where males show a lower number of kisspeptin neurons compared to females in diestrus (Marraudino et al., 2017). In the present study, we were able to corroborate this dimorphism in the AVPV of SD rats, but it was not observed in *taiep* rats since males showed the same number of kisspeptin-IRcb as female *taiep* rats in diestrus. Given that neonatal androgens have been reported to be involved in the establishment of this sexual dimorphism, since castration of neonatal male rats causes an increase in the number of kisspeptin neurons in the AVPV (Clarkson and Herbison, 2006; Homma et al., 2009), we can hypothesize that male *taiep* rats exhibit a decrease in androgens during the neonatal stage, which would have to be evaluated in future studies.

In addition to the alteration of an increased number of kisspeptin-IRcb in male *taiep* rats, an increase in the fluorescence intensity for

kisspeptin was also observed in the AVPV as well as in the ARC, compared to male SD rats. This increase in the fluorescence intensity for kisspeptin in male *taiep* rats is likely caused by changes in the presence of peripheral steroids and neurosteroids. It is known that neurosteroid synthesis at the level of the CNS occurs in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons (Lloyd-Evans and Waller-Evans, 2020; Zwaen and Yen, 1999). Furthermore, neuroprogesterone synthesized by astrocytes, together with estradiol, has been described to be crucial for the stimulation of kisspeptin neurons in the ARC (Herbison, 2020; Micevych and Sinchak, 2008; Mittelman-Smith et al., 2018). Given that the *taiep* rat exhibits astrocytosis and neuroinflammation (Leon Chavez et al., 2001), it is possible that neuroprogesterone is increased, resulting in an increased fluorescence intensity for kisspeptin in the ARC. In adult male mice, testosterone has been reported to up-regulate kisspeptin mRNA in the AVPV and down-regulate it in the ARC (Smith et al., 2005). In the case of the *taiep* rat, an increase in testicular size suggests an increase in peripheral testosterone, which could be responsible for the increased



**Fig. 4.** Comparison of the number of kisspeptin-immunoreactive cell bodies (IRcb) between the arcuate nucleus (ARC) and the anteroventral periventricular area (AVPV) of *taiep* and Sprague-Dawley (SD) rats. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 8 sections per brain from 6 independent animals per group (Total number analyzed: 768 brain sections). The comparison of the number of IRcb between the ARC and AVPV was made with a Student's t-test.

fluorescence intensity in the AVPV.

In the case of female rodents, reproductive control is more complex due to the presence of the oestrous cycle (Herbison, 2020). Each stage of the oestrous cycle shows differences in the presence of pituitary and steroid hormones (Butcher et al., 1974). This variation causes changes in kisspeptin neuron activity and number according to the stage of the oestrous cycle (Herbison, 2020). A higher immunoreactivity to kisspeptin in the AVPV compared to the ARC has been reported in female mice in diestrus, and the opposite effect is observed in oestrus, which is explained by an increase in estradiol (Marradino et al., 2017). This effect was not observed in either *taiep* or SD rats, which could be due to the type of model used, since the expression of kisspeptin neurons has been reported to differ between mice and rats (Overgaard et al., 2013). However, we do not discard that it may be related to the antibodies used in the analysis, and thus it is necessary to use monoclonal antibodies to evaluate this effect.

In the case of rats, neuron number has been reported to increase in the ARC and decrease in the AVPV in the absence of estradiol (Kinsey-Jones et al., 2014). This effect can be partially observed in *taiep* rats in oestrus, since an increase in the number of kisspeptin-IRcb is observed in the ARC when there is a decrease in serum estradiol concentrations (Muñoz-de-la-Torre et al., 2018), but there is no decrease in IRcb in the AVPV. In contrast, there is an increase in the number of kisspeptin-IRcb in the AVPV of *taiep* rats in oestrus, possibly caused by an increase in the availability of estrogen receptors or even an increase in the presence of neuroestradiol in this region resulting from the neuroinflammation observed in our animal model.

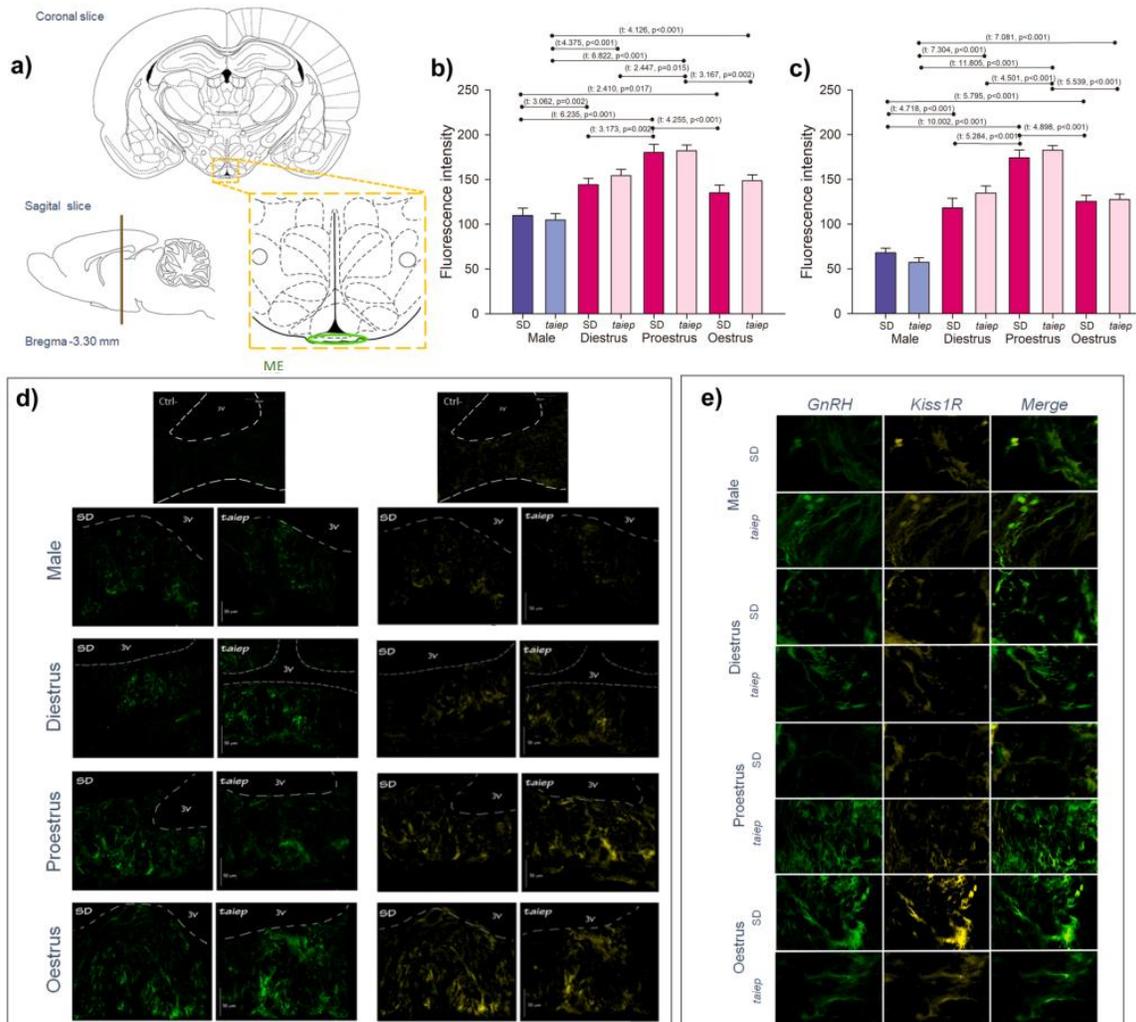
It is currently proposed that the control of kisspeptin neurons in the ARC and AVPV is mediated by estradiol and progesterone (Herbison, 2020; Kinsey-Jones et al., 2014). At the start of proestrus, increasing estradiol levels increase kisspeptin neuron activity in the AVPV, and estradiol, combined with progesterone, which increases hours after the start of proestrus, inhibits kisspeptin neuron activity in the ARC, resulting thus in the generation of a GnRH/LH pulse (Herbison, 2020). In the case of the *taiep* rat, no changes were observed in the proestrus stage because the measurements were obtained in the morning, and thus it is necessary to evaluate these parameters on the afternoon of proestrus in future studies.

It is well established that kisspeptin neurons are involved in the regulation of GnRH synthesis by GnRH neurons (Oakley et al., 2009; Roa et al., 2006). It has been reported that a loss of over 60% of kisspeptin neurons is necessary for there to be a change in GnRH expression in

females (Herbison, 2020; Wang et al., 2019). Given that *taiep* rats showed an increase in the number of kisspeptin-IRcb and that the decrease in fluorescence intensity for kisspeptin was not higher than 30%, we can propose that there are not enough changes in the regulation of GnRH neurons by kisspeptin to modify the fluorescence intensity for GnRH and Kiss1R in the ME of *taiep* rats. Our demyelinated model does not show changes in the expression of the GnRH label in the ME; however, there is a decrease in LH secretion. Given that the *taiep* rat exhibits a chronic neuroinflammatory profile (Soto-Rodríguez et al., 2015), it is possible to suggest that there will be proinflammatory cytokines at the level of the ME that inhibit GnRH secretion, causing a decrease in serum LH, since the presence of proinflammatory cytokines, such as IL1 $\beta$ , has been reported to inhibit GnRH release (Wu and Wolfe, 2012).

LH is a hormone that regulates spermatogenesis in males and ovulation in females (Herbison, 2020; Kaprara and Huhtaniemi, 2018). In rats with acute monophasic EAE, there is a decrease in LH secretion (Milosevic et al., 2020), whereas mice with passive EAE show an increase in this hormone (Foster et al., 2003). In our study, we observed a decrease in LH secretion in demyelinated rats, which did not have apparent effects on ovulation or testicular size. In the case of male *taiep* rats, this decrease in LH was not observed to affect gonadal size, which could be related to an increase in follicle stimulating hormone (FSH) secretion, since the administration of this hormone in hypophysectomized rats has been reported to increase gonadal size (O'Shaughnessy et al., 2010). In the case of females, it is known that the highest LH release occurs during the afternoon of proestrus, which results in ovulation (Herbison, 2020). In the present study, the animals were evaluated in the morning, and thus we were not able to analyze pre-ovulatory LH peaks. However, given that the number of oocytes released was similar between demyelinated and SD rats, it is possible to suggest that the preovulatory LH surge occurred normally on the afternoon of proestrus.

*Taiep* rats of both sexes showed a decrease in body weight, which has been observed in other animal models of demyelination (Milosevic et al., 2020) and MS patients (Bergamaschi, 2006; Reder et al., 1994). Body weight loss could be a result of the crossbreeding to obtain the animal model. However, we suggest that the decrease in body weight may be related to a down-regulation of TGF $\beta$ 1 at the central level (Soto-Rodríguez et al., 2015), since a decrease in TGF $\beta$ 1 at the hypothalamic level has been reported to increase locomotor activity and reduce adipose tissue (Mendes et al., 2018).



**Fig. 5.** Analysis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and kisspeptin receptor (Kiss1R) immunoreactive labeling in the median eminence (ME) of *taiep* and Sprague-Dawley (SD) rats. a) Location of the ME, modified from Paxinos and Watson (1998). b) Fluorescence intensity of GnRH-immunoreactive fibers; values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 30 immunoreactive fibers per analyzed group (Total number analyzed: 240 immunoreactive fibers). c) Fluorescence intensity of Kiss1R-immunoreactive fibers; values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 30 immunoreactive fibers per analyzed group (Total number analyzed: 240 immunoreactive fibers). d) Representative images of the expression of GnRH and coexpression of Kiss1R in the ME of the different analyzed groups. e) Merge of the expression of GnRH and Kiss1R.

**5. Conclusion**

In the present study, we characterized the presence of kisspeptin-Rcb, the fluorescence intensity for kisspeptin, GnRH, and Kiss1R, as well as serum LH concentrations in female and male *taiep* rats. We show that our animal model with progressive demyelination exhibits sex-dependent alterations in the expression of kisspeptin and suggest that the presence of neuroinflammation and proinflammatory cytokines influence the process of GnRH release, affecting thus the release of LH. Our data are consistent with the hypothesis that reproduction is altered differently according to the origin and type of progression of the demyelinating process. This is relevant because it allows to identify action points for the development of assisted reproductive therapies according to the type of demyelinating disease that the patient presents. According to our results, future studies in *taiep* rats should focus on

determining which proinflammatory cytokines are affecting GnRH release and determining neurosteroid and steroid hormone concentrations at different developmental stages of the animal to clarify the origin of the alterations observed in the present study.

**Funding Sources**

This work was supported by the DGAPA-PAPIIT, UNAM, Mexico [grant number IN207022] and by the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico (VIEP-BUAP) who provided a grant to the Cuerpo Académico en Neuroendocrinología (CA-BUAP-288), [grant 100274222-VIEP2019]. CONACyT, Mexico provided a PhD scholarship to Muñoz-de-la-Torre LP [scholarship No. 736730].

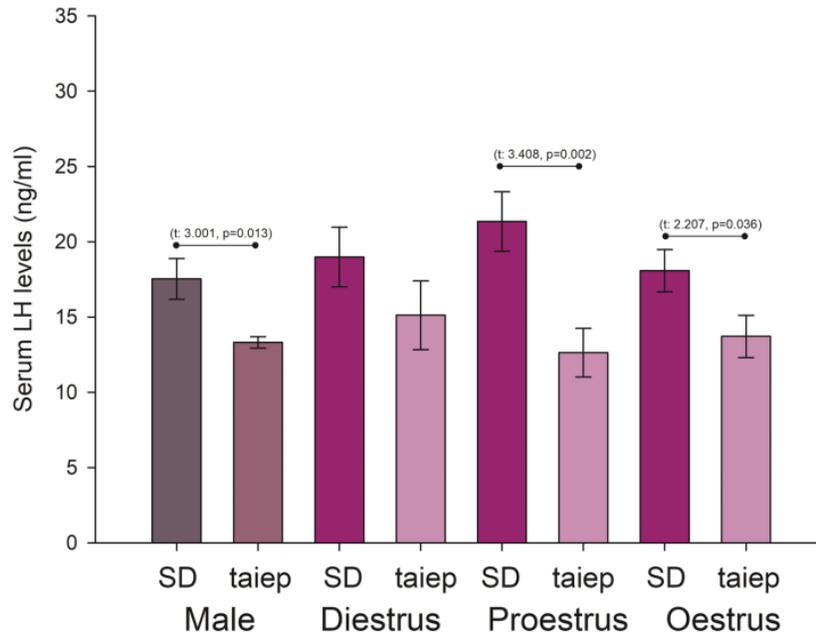


Fig. 6. Serum LH concentrations in taiep and Sprague-Dawley (SD) rats; values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 6 rats per analyzed group (Total number analyzed: 48 rats). The data were analyzed using a two-way ANOVA followed by a Holm-Sidak test.

#### CRedit authorship contribution statement

**Luz Patricia Muñoz de la Torre:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Research, Writing – original draft, Visualization. **Angélica Trujillo Hernández:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition. **José Ramón Eguibar:** Methodology, Resources, Writing – review & editing. **Carmen Cortés:** Writing – review & editing. **Leticia Morales-Ledesma:** Conceptualization, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition.

#### Data Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### Conflict of Interest Statement

The Authors declare that they have no conflict of interest.

#### Data Availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgements

We want to thank the “Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM” and CONACyT for their support to carry out this study. This work is a requirement to obtain the degree of Doctor in Biological Sciences. We are very grateful to the Instituto de Fisiología BUAP for their collaboration, to Biol. José Luis Córdova de la Luz for their technical support in the microscopy lab, and to M.V.Z. Omar Isidro and M.C. Araceli Ugarte for their help in taking care of the animals.

#### References

- Bergamaschi, R., 2006. Prognosis of multiple sclerosis: clinical factors predicting the late evolution for an early treatment decision. *Expert Rev. Neurother.* 6, 357–364. <https://doi.org/10.1586/14737175.6.3.357>.
- Bove, R., Healy, B.C., Secor, E., Vaughan, T., Katic, B., Chitnis, T., Wicks, P., De Jager, P. L., 2015. Patients report worse MS symptoms after menopause: findings from an online cohort. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 4, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2014.11.009>.
- Bove, R., Rankin, K., Lin, C., Zhao, C., Correale, J., Hellwig, K., Michel, L., Laplaud, D.A., Chitnis, T., 2020. Effect of assisted reproductive technology on multiple sclerosis relapses: case series and meta-analysis. *Mult. Scler. J.* 26, 1410–1419. <https://doi.org/10.1177/1352458519865118>.
- Burg, M.M., 2018. Assessment and treatment of sexual dysfunction, in: *Psychological Treatment of Cardiac Patients*. American Psychological Association, Washington, pp. 109–119. <https://doi.org/10.1037/0000070-008>.
- Butcher, R.L., Collins, W.E., Fugo, N.W., 1974. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94, 1704–1708. <https://doi.org/10.1210/endo-94-6-1704>.
- Cañellas, A.R., Gols, A.R., Izquierdo, J.R., Subirana, M.T., Gairin, X.M., 2007. Idiopathic inflammatory-demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroradiology* 49, 393–409. <https://doi.org/10.1007/s00234-007-0216-2>.
- Cavalla, P., Rovei, V., Masera, S., Vercellino, M., Massobrio, M., Mutani, R., Revelli, A., 2006. Fertility in patients with multiple sclerosis: current knowledge and future perspectives. *Neurol. Sci.* 27, 231–239. <https://doi.org/10.1007/s10072-006-0676-x>.
- Clarkson, J., Herbison, A.E., 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus: sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147, 5817–5825. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0787>.
- Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B., 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharm.* 164, 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>.
- Correale, J., Farez, M.F., Ysraelit, M.C., 2012. Increase in multiple sclerosis activity after assisted reproduction technology. *Ann. Neurol.* 72, 682–694. <https://doi.org/10.1002/ana.23745>.
- Cortés, M.D.C., Gavito, B., Ita, M.L., Valencia, J., Eguibar, J.R., 2005. Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on taiep rats. *Synapse* 58, 95–101. <https://doi.org/10.1002/syn.20188>.
- Couve, E., Cabello, J.F., Krsulovic, J., Roncagliolo, M., 1997. Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant taiep rat. *J. Neurosci. Res.* 47, 573–581. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19970315\)47:6<573::AID-JNR2>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19970315)47:6<573::AID-JNR2>3.0.CO;2-A).
- D'Amico, E., Zanghì, A., Burgio, G., Chisari, C.G., Condorelli, R.A., La Vignera, S., Calogero, A.E., Patti, F., 2020. Gonadal steroids and sperm quality in a cohort of

- relapsing remitting multiple sclerosis: a case-control study. *Front. Neurol.* 11, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00756>.
- Dahmardeh, H., Sadooghi, A., Mohammadi, E., Kazemnejad, A., 2021. The experiences of patients with multiple sclerosis of self-compassion: a qualitative content analysis. *Biomed. J.* 35, 42. <https://doi.org/10.37796/2211-8039.1211>.
- Duncan, I.D., Bugiani, M., Radcliff, A.B., Moran, J.J., Lopez-Anido, C., Duong, P., August, B.K., Wolf, N.L., van der Knaap, M.S., Svaren, J., 2017. A mutation in the *Tubb4a* gene leads to microtubule accumulation with hypomyelination and demyelination. *Ann. Neurol.* 81, 690–702. <https://doi.org/10.1002/ana.24930>.
- Duncan, I.D., Lunn, K.F., Holmgren, B., Urba-Holmgren, R., Brignolo-Holmes, L., 1992. The taiep rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *J. Neurocytol.* 21, 870–884. <https://doi.org/10.1007/BF01191684>.
- Foster, S.C., Daniels, C., Bourdette, D.N., Bebo, B.F., 2003. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 140, 78–87. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(03\)00177-2](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(03)00177-2).
- Franeck, G., Bieniak, M., Cieślak, A., 2019. Quality of life in patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Nurs.* 8, 95–101. <https://doi.org/10.15225/PNN.2019.8.3.1>.
- Garduno-Robles, A., Alata, M., Piazza, V., Cortes, C., Eguibar, J.R., Pantano, S., Hernandez, V.H., 2020. MRI features in a rat model of H-ABC tubulinopathy. *Front. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00555>.
- Glazer, C.H., Tottenborg, S.S., Giwercman, A., Bräuner, E.V., Eisenberg, M.L., Vassard, D., Magyari, M., Pinborg, A., Schmidt, L., Bonde, J.P., 2018. Male factor infertility and risk of multiple sclerosis: A register-based cohort study. *Mult. Scler. J.* 24, 1835–1842. <https://doi.org/10.1177/1352458517734069>.
- Harter, C.J.L., Kavanagh, G.S., Smith, J.T., 2018. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *J. Endocrinol.* 238, R173–R183. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0108>.
- Herbison, A.E., 2020. A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion. *Front. Neuroendocrinol.* 57, 100837. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2020.100837>.
- Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Riboni, L., Vega-SaenzdeMiera, E.C., 1989. Sprague Dawley rat mutant with tremor, ataxia, tonic immobility episodes, epilepsy and paralysis. *Lab. Anim. Sci.* 39, 226–228.
- Homma, T., Sakakibara, M., Yamada, S., Kinoshita, M., Iwata, K., Tomikawa, J., Kanazawa, T., Matsui, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Maeda, K.I., Tsukamura, H., 2009. Significance of neonatal testicular sex steroids to define intervertebral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biol. Reprod.* 81, 1216–1225. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078311>.
- Ieda, N., Assadullah, Minabe, S., Ikegami, K., Watanabe, Y., Sugimoto, Y., Sugimoto, A., Kawai, N., Ishii, H., Inoue, N., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., 2020. GnRH(1-5), a metabolite of gonadotropin-releasing hormone, enhances luteinizing hormone release via activation of kisspeptin neurons in female rats. *Endocr. J.* 67, 409–418. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ19-0444>.
- Kaparra, A., Huhtaniemi, I.T., 2018. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism* 86, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.018>.
- Kaufman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., Tena-Sempere, M., 2007. Sexual differentiation of kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148, 1774–1783. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1540>.
- Kinsey-Jones, J.S., Beale, K.E., Cuenco, J., Li, X.F., Bloom, S.R., O'Byrne, K.T., Murphy, K.G., 2014. Quantification of rat kisspeptin using a novel radioimmunoassay. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097611>.
- Leon-Chavez, B.A., Aguilar-Alonso, P., Antonio Gonzalez-Barrios, J., Eguibar, J.R., Ugarte, A., Brambila, E., Ruiz-Arguelles, A., Martinez-Fong, D., 2006. Increased nitric oxide levels and nitric oxide synthase isoform expression in the cerebellum of the taiep rat during its severe demyelination stage. *Brain Res* 1121, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.097>.
- Leon Chavez, B.A., Guevara, J., Galindo, S., Luna, J., Ugarte, A., Villegas, O., Mena, R., Eguibar, J.R., Martinez-Fong, D., 2001. Regional and temporal progression of reactive astrocytosis in the brain of the myelin mutant taiep rat. *Brain Res* 900, 152–155. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02284-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02284-3).
- Li, F.Y., Song, J., Duncan, I.D., 2003. Mapping of taiep rat phenotype to rat Chromosome 9. *Mamm. Genome* 14, 703–705. <https://doi.org/10.1007/s00335-003-2302-z>.
- Link, H., Xiao, B.-G., 2001. Rat models as tool to develop new immunotherapies. *Immunol. Rev.* 184, 117–128. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2001.1840111.x>.
- Lloyd-Evans, E., Waller-Evans, H., 2020. Biosynthesis and signalling functions of central and peripheral nervous system neurosteroids in health and disease. *Essays Biochem* 64, 591–606. <https://doi.org/10.1042/EB020200043>.
- Love, S., 2006. Demyelinating diseases. *J. Clin. Pathol.* 59, 1151–1159. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.031195>.
- Lunn, K.F., Baas, P.W., Duncan, I.D., 1997. Microtubule organization and stability in the oligodendrocyte. *J. Neurosci.* 17, 4921–4932.
- Lunn, K.F., Clayton, M.K., Duncan, I.D., 1997. The temporal progression of the myelination defect in the taiep rat. *J. Neurocytol.* 26, 267–281. <https://doi.org/10.1023/A:1018548400536>.
- Marraudino, M., Miceli, D., Farinetti, A., Ponti, G., Panzica, G.C., Gotti, S., 2017. Kisspeptin innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus: sexual dimorphism and effect of estrous cycle in female mice. *J. Anat.* 230, 775–786. <https://doi.org/10.1111/joa.12603>.
- Mendes, N.F., Gaspar, J.M., Lima-Júnior, J.C., Donato, J., Velloso, L.A., Aradjo, E.P., 2018. TGF- $\beta$ 1 down-regulation in the mediobasal hypothalamus attenuates hypothalamic inflammation and protects against diet-induced obesity. *Metabolism* 85, 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.04.005>.
- Merghati-Khoei, E., Qaderi, K., Amini, L., Korte, J.E., 2013. Sexual problems among women with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 331, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.05.014>.
- Micevych, P., Sinchak, K., 2008. Synthesis and function of hypothalamic neuroprogesterone in reproduction. *Endocrinology* 149, 2739–2742. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0011>.
- Milosevic, A., Janjic, M.M., Lavrnja, I., Savic, D., Bozic, I.D., Tesovic, K., Jakovljevic, M., Pekovic, S., Stojilkovic, S.S., Bjelobaba, I., 2020. The sex-specific patterns of changes in hypothalamic-pituitary-gonadal axis during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain. Behav. Immun.* 89, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.06.025>.
- Mittelman-Smith, M.A., Wong, A.M., Micevych, P.E., 2018. Estrogen and progesterone integration in an in vitro model of rp3v kisspeptin neurons. *Neuroendocrinology* 106, 101–115. <https://doi.org/10.1159/000471878>.
- Morales-Ledesma, L., Linares, R., Rosas, G., Morán, C., Chavira, R., Cárdenas, M., Domínguez, R., 2010. Unilateral sectioning of the superior ovarian nerve of rats with polycystic ovarian syndrome restores ovulation in the innervated ovary. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-99>.
- Morales, L., Chávez, R., Ayala, M.E., Domínguez, R., 1998. Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration. *J. Endocrinol.* 158, 213–219. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1580213>.
- Mrosková, S., Klímová, E., Majerníková, L., Tkáčová, L., 2021. Quality of life of children and adolescents with multiple sclerosis—a literature review of the quantitative evidence. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 8645. <https://doi.org/10.3390/ijerph18168645>.
- Muñoz-de-la-Torre, L.P., Eguibar, J.R., Ugarte, A., Cortés, C., Trujillo, A., 2018. Follicular development and secretion of ovarian hormones during the juvenile and adult reproductive lives of the myelin mutant taiep rat: an animal model of demyelinating diseases. *Int. J. Endocrinol.* 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/5718782>.
- O'Connor, L.T., Goetz, B.D., Couve, E., Song, J., Duncan, I.D., 2000. Intracellular distribution of myelin protein gene products is altered in oligodendrocytes of the taiep rat. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 396–407. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0889>.
- O'Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., Verhoeven, G., De Gendt, K., Abel, M.H., 2010. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction* 139, 177–184. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0377>.
- Oakley, A.E., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr. Rev.* 30, 713–743. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0005>.
- Overgaard, A., Tena-Sempere, M., Franceschini, I., Desroziers, E., Simonneaux, V., Mikkelsen, J.D., 2013. Comparative analysis of kisspeptin-immunoreactivity reveals genuine differences in the hypothalamic Kiss1 systems between rats and mice. *Peptides* 45, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.04.013>.
- Pakpoor, J., Goldacre, R., Schmierer, K., Giovannoni, G., Goldacre, M.J., 2014. Testicular hypofunction and multiple sclerosis risk: a record-linkage study. *Ann. Neurol.* 76, 625–628. <https://doi.org/10.1002/ana.24250>.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. ed. Fourth ed. Academic Press.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., Tena-Sempere, M., 2012. Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. *Physiol. Rev.* 92, 1235–1316. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2010>.
- Reeder, A.T., Makowicz, R.L., Lowy, M.T., 1994. Adrenal Size Is Increased in Multiple Sclerosis. *Arch. Neurol.* 51, 151–154. <https://doi.org/10.1001/archneur.1994.00540140057015>.
- Rivera, V.M., 2017. Multiple Sclerosis in Latin Americans: Genetic Aspects. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 17. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0768-4>.
- Roa, J., Vigo, E., Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Casanueva, F.F., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2006. Hypothalamic expression of Kiss-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female rat. *Endocrinology* 147, 2864–2878. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1463>.
- Salehi, M.S., 2013. A simple method for isolation of the anteroventral periventricular and arcuate nuclei of the rat hypothalamus. *Anat. (International J. Exp. Clin. Anatomy)* 6–7, 48–51. <https://doi.org/10.2399/ana.11.212>.
- Sepúlveda, M., Ros, C., Martínez-Lapiscina, E.H., Solá-Valls, N., Hervás, M., Llufrú, S., La Puma, D., Casals, E., Blanco, Y., Villoslada, P., Graus, F., Castelo-Branco, C., Saiz, A., 2016. Pituitary-ovary axis and ovarian reserve in fertile women with multiple sclerosis: a pilot study. *Mult. Scler. J.* 22, 564–568. <https://doi.org/10.1177/1352458515602339>.
- Smith, J.T., Dungan, H.M., Stoll, E.A., Gottsch, M.L., Braun, R.E., Eacker, S.M., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2005. Differential regulation of KISS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146, 2976–2984. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0323>.
- Song, J., O'Connor, L.T., Yu, W., Baas, P.W., Duncan, I.D., 1999. Microtubule alterations in cultured taiep rat oligodendrocytes lead to deficits in myelin membrane formation. *J. Neurocytol.* 28, 671–683. <https://doi.org/10.1023/A:1007060832459>.
- Soto-Rodríguez, G., Gonzalez-Barrios, J.-A., Martinez-Fong, D., Blanco-Alvarez, V.-M., Eguibar, J.R., Ugarte, A., Martinez-Perez, F., Brambila, E., Millán-Perez Peña, L., Pazos-Salazar, N.-G.G., Torres-Soto, M., Garcia-Robles, G., Tomas-Sanchez, C., Leon-Chavez, B.A., 2015. Analysis of chemokines and receptors expression profile in the myelin mutant taiep rat. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/397310>.

- Soto-Rodríguez, G., Martínez-Fong, D., Arroyo, R., Aguilar-Alonso, P., Rubio, H., Eguibar, J.R., Ugarte, A., Torres-Soto, M., González-Barrios, J.A., Cebada, J., Brambila, E., Leon-Chavez, B.A., 2012. Nitric oxide production is associated to increased lipoperoxidation and active caspase-3 in demyelinated brain regions of the taiep rat. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 03, 695–704. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.326090>.
- Takumi, K., Iijima, N., Ozawa, H., 2011. Developmental changes in the expression of kisspeptin mRNA in rat hypothalamus. *J. Mol. Neurosci.* 43, 138–145. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9430-1>.
- Terasawa, E., García, J.P., Seminara, S.B., Keen, K.L., 2018. Role of Kisspeptin and Neurokinin B in puberty in female non-human primates. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00148>.
- Thompson, A.J., Baranzini, S.E., Geurts, J., Hemmer, B., Ciccarelli, O., 2018. Multiple sclerosis. *Lancet* 391, 1622–1636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1).
- Uenoyama, Y., Pheng, V., Tsukamura, H., Maeda, K., 2016. The roles of kisspeptin revisited: inside and outside the hypothalamus. *J. Reprod. Dev.* 62, 537–545. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-083>.
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R.A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., Baneke, P., 2020. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult. Scler. J.* 26, 1816–1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>.
- Wang, L., Vanacker, C., Burger, L.L., Barnes, T., Shah, Y.M., Myers, M.G., Moenter, S.M., 2019. Genetic dissection of the different roles of hypothalamic kisspeptin neurons in regulating female reproduction. *Elife* 8, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.43999>.
- Wilkins, A., Kondo, Y., Song, J., Liu, S., Compston, A., Black, J.A., Waxman, S.G., Duncan, I.D., 2010. Slowly progressive axonal degeneration in a rat model of chronic, nonimmune-mediated demyelination. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 1256–1269. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181ffc317>.
- Wu, S., Wolfe, A., 2012. Signaling of cytokines is important in regulation of GnRH neurons. *Mol. Neurobiol.* 45, 119–125. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8224-y>.
- Zhang, G.X., Carrillo-Vico, A., Zhang, W.T., Gao, S.S., Izquierdo Ayuso, G., 2020. Incidencia y prevalencia de la esclerosis múltiple en China y países asiáticos. *Neurología*. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.07.022>.
- Zwain, I.H., Yen, S.S.C., 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140, 3843–3852. <https://doi.org/10.1210/endo.140.8.6907>.