



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**PARTICIPACIÓN DE LA KISSPEPTINA EN EL INICIO DE LA
PUBERTAD EN BECERRAS**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

RUBÉN SANTOS ECHEVERRÍA

TUTOR PRINCIPAL

MVZ. MSc. PhD. ALEJANDRO VILLA GODOY (FMVZ-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

MVZ. MC. PhD. HÉCTOR R. VERA ÁVILA (INIFAP)

MVZ. MC. PhD. CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR (FMVZ-UNAM)

MÉXICO DF. JULIO DE 2014



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.

DEDICATORIAS

De manera especial y con mucho cariño a:

Lilith, Karen y Rubén, mis hijos

Justy, mi esposa

Hortencia, mi madre

Albino, mi padre

Salo, Davi y Gella, mis hermanos.

“Todos ellos, fueron para mí un motivo de superación”

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Villa Godoy, mi tutor principal: por su apoyo, orientación y dirección en mi formación académica y científica; de igual manera, por su confianza y amistad. Desde mi perspectiva, lo obtenido de él fueron elementos fundamentales para la construcción de la presente tesis y la obtención del grado de Doctor en Ciencias.

- A los miembros de mi Comité Tutorial: Doctores Héctor R. Vera Ávila y Carlos G. Gutiérrez Aguilar, por su crítica constructiva en el diseño de la estrategia experimental y en la presentación de la información generada.
- A Jesús Alejandro Arreguín Arévalo, Investigador del Laboratorio de Reproducción Animal y Biotecnología de la Universidad Estatal de Colorado- USA, por su orientación en la estrategia experimental y apoyos con actividades de laboratorio.
- A René C. Calderón Robles y Jorge Rosete Fernández, Investigadores del Campo Experimental Las Margaritas – INIFAP, por su valiosa colaboración en las actividades de campo.
- A la MVZ. Clara Murcia Mejía y al Dr. Gerardo Perera Marín, Investigadores del Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM, por su valiosa colaboración en las actividades de laboratorio.
- A los miembros del Jurado: Doctores Everardo González Padilla, Alejandro Villa Godoy, Luis Alberto Zarco Quintero, Héctor Jiménez Severiano y Jaime Gallegos Sánchez, por la revisión y evaluación.

A todos ellos, también por su amistad.

A: INIFAP, UNAM y CONACyT, por los apoyos económicos otorgados para el desarrollo de mis actividades académicas y de investigación.

~~~~~

*“La habilidad es lo que permite hacer ciertas cosas, la motivación determina lo que se hace y la actitud cuán bien se hace”*

*Lou Holtz (entrenador de fútbol americano)*

## INDICE

|                                                                                                                                                            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>DEDICATORIAS</b>                                                                                                                                        |            |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>                                                                                                                                     |            |
| <b>RESUMEN.....</b>                                                                                                                                        | <b>i</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                                       | <b>ii</b>  |
| <b>INDICE DE CUADROS.....</b>                                                                                                                              | <b>iii</b> |
| <b>INDICE DE FIGURAS.....</b>                                                                                                                              | <b>iv</b>  |
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>                                                                                                                                | <b>1</b>   |
| <b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>                                                                                                                     | <b>6</b>   |
| Eje gonadotrópico: desarrollo y maduración.....                                                                                                            | 7          |
| Eje somatotrópico y maduración sexual.....                                                                                                                 | 13         |
| Regulación de la secreción de GnRH.....                                                                                                                    | 20         |
| Kisspeptina (s).....                                                                                                                                       | 21         |
| Neuronas KNDy.....                                                                                                                                         | 26         |
| Regulación de la kisspeptina por estrógenos ováricos.....                                                                                                  | 29         |
| Regulación de la kisspeptina por leptina e IGF-I.....                                                                                                      | 31         |
| Regulación de la kisspeptina por el fotoperiodo.....                                                                                                       | 34         |
| Kisspeptina-GPR54: mecanismos potenciales de inicio de la<br>pubertad.....                                                                                 | 35         |
| <b>III. HIPÓTESIS.....</b>                                                                                                                                 | <b>40</b>  |
| <b>IV. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                  | <b>41</b>  |
| <b>V. RESPUESTA DE LH, FSH Y GH A KISSPEPTINA-10 Y SU<br/>ASOCIACIÓN CON IGF-I Y LEPTINA SÉRICOS EN BECERRAS<br/>PRE-PÚBERES.....</b>                      | <b>42</b>  |
| <b>VI. HORMONA LUTEINIZANTE Y ACTIVIDAD OVÁRICA EN<br/>RESPUESTA A KISSPEPTINA-10 Y SU ASOCIACIÓN CON IGF-1<br/>Y LEPTINA EN BECERRAS PRE-PÚBERES.....</b> | <b>72</b>  |
| <b>VII. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL EJE<br/>GONADOTRÓPICO A DOSIS BAJAS DE KISSPEPTINA-10 EN<br/>BECERRAS PRE-PÚBERES.....</b>                       | <b>73</b>  |
| <b>VIII RESPUESTA DE HORMONA LUTEINIZANTE A LA INFUSIÓN<br/>CONTINUA DE KISSPEPTINA-10 EN BECERRAS PRE-<br/>PÚBERES.....</b>                               | <b>91</b>  |
| <b>IX. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>                                                                                                                          | <b>120</b> |
| <b>X. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>                                                                                                                      | <b>123</b> |
| <b>XI. LITERATURA CITADA.....</b>                                                                                                                          | <b>125</b> |

## RESUMEN

Mediante cuatro experimentos (Exp) estudiamos los efectos de kisspeptina-10 (Kiss-10) en la secreción de LH, FSH y GH, y la ovulación en becerras pre-púberes. Exp 1: Veinte becerras recibieron un bolo intravenoso (IV) de 5 ó 50  $\mu\text{g}$  de Kiss-10/kg. Ambas dosis indujeron un aumento similar de FSH, pero la LH aumentó más con la dosis mayor; en cambio GH no fue afectada por ninguna de las dosis. Exp 2: Catorce becerras recibieron 0 ó 5  $\mu\text{g}$  de Kiss-10/kg cada 2 h/3 d. La Kiss-10 indujo incrementos sucesivos de LH en todas las becerras e indujo la ovulación en becerras con más IGF-I y menos leptina séricos. Exp 3: Seis becerras recibieron en 6 semanas, 6 dosis de Kiss-10: 5, 4, 3, 2, 1 ó 0.1  $\mu\text{g}$  de Kiss-10/kg (3 bolos IV cada 2 h; diseño Cuadrado Latino). Excepto la dosis menor, el resto de las dosis indujeron incrementos de LH que disminuyeron con cada aplicación. Exp 4a. Dieciocho becerras recibieron una infusión subcutánea por 2 días de Kiss-10 (0.1 ó 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ), GnRH (5  $\mu\text{g}/\text{h}$ ) o solución salina. Ninguna dosis de Kiss-10 indujo la liberación de LH o la ovulación. Exp 4b. Seis becerras agrupadas ( $n=2/\text{grupo}$ ) como pequeñas ( $146\pm 2$  kg), medianas ( $182\pm 10$  kg) o grandes ( $269\pm 26$  kg), en un diseño permutable repetido, recibieron por infusión IV continua, a intervalo de una semana, 0.5 ó 1.0  $\mu\text{g}$  de Kiss-10/kg/h por 6 h. Ambas dosis de Kiss-10 indujeron la liberación LH y la dosis mayor evocó una mayor liberación de LH sólo en becerras pequeñas. Con ambas dosis, la LH disminuyó a partir de la hora tres de infusión; durante la disminución, un bolo IV de GnRH indujo un aumento de LH. El eje gonadotrópico, pero no el somatotrópico, es sensible a Kiss-10. La administración pulsátil de Kiss-10 induce incrementos de LH, y ovulación en becerras con más desarrollo somático. La infusión continua de Kiss-10 inicialmente estimula la liberación de LH y luego de ello desensibiliza al hipotálamo. Los efectos de Kiss-10 en la LH y ovulación son modulados por IGF-I, mas no por leptina.

Palabras clave: becerras pre-púberes, kisspeptina, hormona luteinizante.

## **ABSTRACT**

By four experiments (Exp) we explored the effects of kisspeptin-10 (Kiss-10) in the secretion of LH, FSH and GH, and ovulation in prepubertal heifers. Exp 1: Twenty heifers received an intravenous (IV) bolus of 5 or 50  $\mu\text{g}$  of Kiss-10/kg body weight. Both doses of Kiss-10 induced a similar increase in FSH, but LH increased more with the higher dose; whereas GH was not affected by any doses. Exp 2: Fourteen heifers were treated with 0 or 5  $\mu\text{g}$  of Kiss-10/kg every 2 h during 3 d. Kiss-10 induced successive increments of LH in all animales but ovulation in heifers with more IGF-I and less leptin. Exp 3: Six heifers received in 6 weeks, 6 doses of Kiss-10: 5, 4, 3, 2, 1 or 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (3 boluses IV every 2 h) (Square Latin design). Except the smallest dose, the others induced a decrease in the response of LH in the successive applications. Exp 4. Eighteen heifers received a subcutaneous infusion during 2 days of Kiss-10 (0.1 or 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ), GnRH (5  $\mu\text{g}/\text{h}$ ) or saline. None dose of Kiss-10 induced LH increments and ovulation. 4b Exp. Six pre-pubertal heifers grouped (n = 2/group) on small (146 $\pm$ 2 kg), medium (182 $\pm$ 10 kg) or large (269 $\pm$ 26 kg) sized received by continuous intravenous infusion, a one-week interval, 0.5 or 1.0  $\mu\text{g}$  of Kiss-10/kg/h during 6 h (repeated Crossover design). Both doses of Kiss-10 induced LH release and the highest dose evoked greater LH release in small heifers only. With both doses, LH decreased from the third hour of infusion; when decreasing an IV GnRH bolus induced an LH increment. Conclusions: the gonadotropic axis but no the somatotropic axis was sensible to Kiss-10. The pulsatile administration of Kiss-10 induces LH increments and ovulation in heifers with more somatic development. Continuous infusion of Kiss-10 initially stimulates the release of LH and after that desensitizes the hypothalamus. Effects of Kiss-10 in the LH and ovulation are modulated by IGF-I, but not by leptin.

**Key words:** prepubertal heifers, kisspeptin, luteinizing hormone.

## INDICE DE CUADROS

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Distribución hipotalámica de neuronas y axones neuronales kisspeptinérgicos en diferentes mamíferos..... | 26 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1.</b> Diagrama de las relaciones funcionales del eje gonadotrópico.....                                                                                                                   | 9   |
| <b>Figura 2.</b> Cambios fisiológicos, endocrinos y anatómicos asociados con el inicio de la pubertad en las hembras bovinas.....                                                                    | 13  |
| <b>Figura 3.</b> Diagrama de las relaciones funcionales del eje somatotrópico.....                                                                                                                   | 15  |
| <b>Figura 4.</b> Estructura de la prepro-kisspeptina, codificada por el gen <i>Kiss1</i> y los péptidos (kisspeptinas) resultantes de su escisión proteolítica con su respectivo peso molecular..... | 23  |
| <b>Figura 5.</b> Secuencia de aminoácidos de la kisspeptina 54/metastina de diferentes especies.....                                                                                                 | 23  |
| <b>Figura 6.</b> Diagrama de las estructuras y factores neurales, hormonales y ambientales que regulan la actividad de las neuronas productoras de GnRH y de kisspeptina.....                        | 29  |
| <b>Figura 7.</b> Respuesta de LH a un bolo intravenoso de kisspeptina-10 en becerras pre-púberes de 4, 7 y 11 meses de edad.....                                                                     | 38  |
| <b>Figura 8.</b> Modelo propuesto de los efectos de la kisspeptina en la actividad de los ejes gonadotrópico y somatotrópico en becerras pre-púberes.....                                            | 124 |

## I. INTRODUCCIÓN

La pubertad es la etapa en la que los individuos adquieren la capacidad de reproducirse, y corresponde a un proceso complejo de maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG). En las hembras bovinas, la presentación temprana de este evento reproductivo tiene especial importancia para la fertilidad (Byerley *et al.*, 1987) y productividad de por vida (Perry *et al.*, 1991; Patterson *et al.*, 1992). En los sistemas de producción tropicales (bovinos de carne y doble propósito), las vaquillas generalmente presentan la pubertad tardíamente y por ello tienen su primer parto entre los 3.5 y 4 años de edad con bajo peso corporal (<400 kg vs >450 kg como peso ideal; Villa-Godoy y Arreguín, 1993) lo que tiene como secuela una baja producción de becerros y de leche durante su vida (Deresz *et al.*, 1987). Consecuentemente es importante conocer los mecanismos fisiológicos reguladores de la pubertad y los factores que los afectan, lo cual conducirá al desarrollo de nuevas estrategias de manejo para reducir la edad a la pubertad de las vaquillas, mejorar la eficiencia reproductiva y la rentabilidad de las unidades de producción ganadera.

La edad a la pubertad está estrechamente relacionada con el crecimiento y desarrollo corporal de los individuos, es decir con la actividad del eje somatotrópico (Veldhuis *et al.*, 2006); sin embargo, las concentraciones sanguíneas de metabolitos y hormonas relacionadas con el peso y la composición corporal presentan interacciones complejas con el inicio de la pubertad (Jones *et al.*, 1991; Yelich *et al.*, 1996; Velazquez *et al.*, 2008) por lo que no se han aclarado completamente las señales metabólicas que dirigen o modulan el establecimiento de la actividad del eje reproductivo. Desde el punto de vista neuroendocrino, el inicio de la pubertad es el resultado de una disminución progresiva de los efectos de retroalimentación negativa del estradiol sobre la secreción de la hormona luteinizante (**LH**), lo cual permite un incremento de la frecuencia de secreción de LH, lo que a su vez estimula el crecimiento y maduración de los folículos ováricos, la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo (Day *et al.*, 1984; 1987; Kinder *et al.*, 1995; Day y Anderson, 1998; Atkins *et al.*, 2013; Day y Nogueira, 2013). Las señales internas asociadas con el

almacenamiento de energía en el tejido adiposo (leptina), la alimentación (propionato, glucosa, insulina), la formación de tejidos (GH, IGF-I, hormonas tiroideas), así como con la interpretación de señales provenientes del medio externo (melatonina, prolactina y feromonas) son identificadas por el sistema nervioso central (SNC; Ebling, 2005; Castellano *et al.*, 2009; 2010; Okamura *et al.*, 2010) como indicadores que participan en mayor o menor grado en el cambio del funcionamiento del hipotálamo, que de ser hipersensible a las acciones inhibitorias de los estrógenos pasa a ser poco sensible a ellos (Gasser *et al.*, 2006ab).

La pubertad es precedida por un incremento progresivo en la secreción pulsátil de la hormona liberadora de las gonadotropinas (**GnRH**; Terasawa y Fernandez, 2001; Ebling, 2005; Amstalden *et al.*, 2011), siendo este cambio el componente clave de control para iniciar la pubertad (Ebling, 2005). Este cambio, a su vez, se deriva de la modificación funcional del “pulsador biológico”, el generador hipotalámico de pulsos de GnRH, cuya regulación neural y no neural es compleja y no ha sido dilucidada por completo (Moenter *et al.*, 2003).

La secreción de GnRH es regulada por múltiples neurotransmisores (Terasawa y Fernandez, 2001; Hrabovszky y Liposits, 2013), pero la mayoría de los expertos señalan a la kisspeptina como el elemento estimulador preponderante que gobierna la actividad de las neuronas hipofisiotrópicas productoras de GnRH (Clarkson *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2010; Pinilla *et al.*, 2012; Kauffman y Smith, 2013). A su vez, la kisspeptina es el principal intermediario entre las sustancias señalizadoras de origen somático y ambiental que modulan la función reproductiva y las neuronas productoras de GnRH (Roa *et al.*, 2008a; Oakley *et al.*, 2009; Castellano *et al.*, 2009; 2010; Okamura *et al.*, 2010; Smith 2008; 2009; 2012). La kisspeptina, también conocida como metastina, es una familia de cuatro péptidos hipotalámicos (Kiss-54, -14, -13 y -10; denominados de acuerdo al número de aminoácidos que los componen), altamente conservada en mamíferos (Roa *et al.*, 2008a; Oakley *et al.*, 2009; Kanda y Oka, 2012). Los cuatro péptidos se unen y activan eficientemente al receptor GPR54 ó Kiss1r (Kotani *et al.*, 2001), el cual ha sido localizado en las neuronas que producen GnRH (Irwing *et al.* 2004; Messenger *et al.* 2005). El patrón

de distribución anatómica de las neuronas hipotalámicas que producen kisspeptina está bien caracterizado en roedores, en los que existen dos poblaciones de neuronas: una en el núcleo arcuato (**ARC**) y otra en la porción anterior del hipotálamo que comprende el núcleo periventricular anteroventral (**AVPV**: Clarkson *et al.*, 2009a); sin embargo, en otras especies las neuronas productoras de kisspeptina son abundantes en el ARC (Mikkelsen y Simonneaux, 2009; Lehman *et al.*, 2010a), pero la población en la porción hipotalámica anterior no ha sido confirmada. En ovinos, las neuronas productoras de kisspeptina están localizadas en la región dorsomedial del área pre-óptica medial (**POA**) y en el ARC (Estrada *et al.*, 2006, Smith *et al.*, 2007a). Éstos y otros aspectos relacionados con la actividad de las neuronas hipotalámicas que producen kisspeptina no se han estudiado en bovinos.

El sistema en mención ha sido propuesto como un activador de las neuronas productoras de GnRH durante el inicio de la pubertad. En roedores se ha determinado que la falta funcional del gen del cual se derivan las kisspeptinas (*Kiss1*) o del gen que codifica a su receptor (GPR54 ó *Kiss1r*) provoca una baja secreción de gonadotropinas hipofisiarias e infertilidad (Seminaro *et al.* 2003). Los mecanismos potencialmente involucrados en la activación puberal del sistema GnRH (Roa y Tena-Sempere, 2010; Clarkson *et al.*, 2010; Tena-Sempere, 2012) son: 1) incremento del tono endógeno de kisspeptina, reflejado por un incremento de la expresión del gen *Kiss1* en determinados núcleos del hipotálamo; 2) mayor sensibilidad de las neuronas de GnRH a la acción estimuladora de la kisspeptina, debido a un aumento en la expresión del receptor GPR54, o a la activación de rutas adicionales de señalización intracelular asociadas con éste receptor; y 3) cambios plásticos que favorecen un incremento de los contactos sinápticos entre neuronas productoras de kisspeptina y las productoras de GnRH. Se desconoce si en bovinos operan estos mecanismos, pero las evidencias de que la kisspeptina exógena estimula la liberación de LH y de la hormona folículoestimulante (**FSH**) en becerras pre-púberes (Kadokawa *et al.*, 2008; Ezzat *et al.*, 2009; Alamilla, 2013) refuerza la idea de que el sistema kisspeptinérgico tiene un papel relevante en la activación puberal del eje reproductivo de los bovinos. Por otro lado, aunque de manera menos clara, la

kisspeptina parece intervenir en la actividad del eje somatotrópico, ya que bajo algunas condiciones experimentales la administración de Kiss-10 estimuló la liberación de la hormona de crecimiento (GH) en becerras pre-púberes (Kadokawa *et al.*, 2008) y vacas lecheras (Whitlock *et al.* 2008).

Recientemente, nuestro grupo (Alamilla, 2013) determinó en becerras pre-púberes de distintas edades que una aplicación intravenosa de 5 µg de Kiss-10/kg de peso, induce un aumento de LH, FSH y GH plasmática en el 100 % de las becerras de 11 meses de edad, y de LH en el 100 % de las de 4 y 7 meses de edad; no obstante solo una proporción de las de 4 y 7 meses respondieron con aumentos de FSH y GH a Kiss-10. En el mismo estudio se determinó que las becerras de 11 meses, mismas que también mostraron la mayor respuesta de LH a Kiss-10, tuvieron concentraciones plasmáticas significativamente mayores de IGF-I y estradiol, y menores de leptina que las becerras de menor edad; consecuentemente, se propone que IGF-I y leptina podrían ser agentes endógenos que modifican la actividad del sistema kisspeptina-GPR54-GnRH.

Hasta donde la literatura revisada nos permite afirmar, se desconoce si en becerras pre-púberes, una dosis mayor de Kiss-10 a la hasta ahora empleada (5 µg/kg de peso) induce una mayor liberación de LH, FSH y GH como se ha demostrado para LH en borregas (Wang *et al.*, 2012) y cerdas (Lents *et al.*, 2008) pre-púberes; así mismo se desconoce si un tratamiento crónico de Kiss-10, administrado ya sea en forma de pulso o de manera continua, induce la ovulación en hembras bovinas pre-púberes, como se ha documentado en ratas peri-puberales (Navarro *et al.*, 2004a; Castellano *et al.*, 2005; Roa *et al.*, 2008b), ratas adultas (Roa *et al.*, 2008b), corderas peri-puberales (Redmond *et al.*, 2011a) y borregas en anestro estacional (Caraty *et al.*, 2007; Sébert *et al.*, 2010). Sin embargo, conviene hacer notar que la aplicación crónica intravenosa de kisspeptina en roedores y primates inicialmente estimula la liberación de LH, pero después de 3 a 4 horas de la estimulación este incremento empieza a declinar, llegando a niveles similares a los que se presentan durante los pulsos espontáneos de animales testigo. Lo anterior, ha sido atribuido a la desensibilización del receptor GPR54 (Seminara *et al.*, 2006; Roa *et al.*, 2008b;

d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2008; Ramaswamy *et al.*, 2007), por lo que es conveniente considerar si la dosis hasta ahora usada en becerras pre-púberes es demasiado elevada como para provocar la desensibilización del eje gonadotrópico cuando se administra en forma de inyecciones repetidas o de infusión continua. La escueta información disponible en hembras bovinas es insuficiente para conocer con precisión la participación de algunos señalizadores somáticos como leptina e IGF-I, en la sensibilidad de los ejes gonadotrópico y somatotrópico a kisspeptina.

Por lo discutido previamente, el tema central de la presente tesis es evaluar los efectos de distintas dosis y formas de aplicación de la Kiss-10 sobre la función de los ejes gonadotrópico y somatotrópico, así como determinar la asociación de la respuesta de dichos ejes a Kiss-10 y las variaciones en las concentraciones circulantes de IGF-I y leptina.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

En vaquillas, la pubertad inicia cuando se presenta el primer estro, seguido de ovulación y formación de un cuerpo lúteo de duración normal (Calderón *et al.*, 1996). La edad y peso a los que se presenta la pubertad varían entre genotipos (Fajersson *et al.*, 1991; Calderón *et al.*, 1996), nivel de nutrición (Oyedipe *et al.*, 1982; Rincker *et al.*, 2011), estado metabólico (García *et al.*, 2003; Diskin *et al.*, 2003), actividades de manejo (Brickell *et al.*, 2009) y estación del año en que nace la vaquilla (Schillo *et al.*, 1992). El genotipo de las becerras determina en gran medida la edad a la que se presenta la pubertad (Martin *et al.*, 1992), sin embargo, la alimentación modula ampliamente la expresión del potencial genético inherente al citado rasgo reproductivo (Patterson *et al.*, 1992; Gasser *et al.*, 2006a). Por ejemplo, bajo las mismas condiciones de manejo alimenticio, las vaquillas Suizo Pardo son más precoces y menos pesadas a la pubertad que las vaquillas Cebú ( $13.65 \pm 0.90$  vs  $19.27 \pm 0.9$  meses de edad y  $266 \pm 8$  vs  $334 \pm 8$  kg, respectivamente; Calderón *et al.*, 1996). Por otro lado, se demostró que el 88 % de las becerras Angus x Simmental alimentadas pos-destete con una dieta alta en energía presentó la pubertad precozmente antes de los 300 días de edad, lo que no hizo ninguna de las becerras alimentadas con una dieta con menor contenido de energía (Gasser *et al.*, 2006a). En este mismo estudio, se demostró que el peso promedio a la pubertad de dichas vaquillas se redujo en 76 kg con una dieta alta en energía contra una dieta baja en energía.

Independientemente de la edad y peso en que se presenta la pubertad, las hembras bovinas cursan por los siguientes periodos de desarrollo y maduración sexual (Day y Anderson, 1998): 1) infantil/desarrollo (0 días de edad a destete); 2) pre-puberal (cuya duración es altamente variable), y 3) peri-puberal (aproximadamente de 2 meses previos a la pubertad al inicio de la misma). Cada periodo presenta diferencias sustanciales en la fisiología, endocrinología, desarrollo ovárico, crecimiento uterino (Atkins *et al.*, 2013), tamaño y composición corporal (Veldhuis *et al.*, 2005). Los fenómenos fisiológicos que llevan al inicio de la pubertad ocurren durante la etapa de crecimiento acelerado del individuo (Veldhuis *et al.*, 2005), por ello se ha propuesto la

existencia de una mutua influencia entre el desarrollo del eje gonadotrópico y del eje somatotrópico, relación que determina el inicio de la pubertad (Singh *et al.*, 2011). El objetivo de la presente revisión es describir los principales cambios fisiológicos y hormonales que gobiernan el funcionamiento del eje gonadotrópico y del somatotrópico, con énfasis en la regulación central del inicio de la pubertad en la hembra bovina. No obstante, debido a que los estudios efectuados en ese modelo animal son escasos y fragmentados, con el fin de comprender algunos conceptos, se hará una revisión de la información disponible sobre los factores que desempeñan un papel protagónico en la regulación de los ejes antes citados en varias especies.

## **Eje gonadotrópico: desarrollo y maduración**

### ***Descripción general del eje gonadotrópico***

Estructuralmente, el eje gonadotrópico de las hembras está integrado por: el hipotálamo, que es el órgano maestro de la reproducción, encargado de producir y liberar la hormona liberadora de las gonadotropinas (**GnRH**; **Figura 1**); la adenohipófisis, que sintetiza y secreta las hormonas luteinizante (**LH**) y folículoestimulante (**FSH**) en respuesta a GnRH; y los ovarios, que producen hormonas sexuales (progesterona por el cuerpo lúteo, estradiol e inhibina por folículos) y óvulos en respuesta a las gonadotropinas hipofisiárias. El estradiol y la progesterona, además de estimular el desarrollo del aparato reproductor y otros caracteres asociados a la maduración somática/sexual, también participan de manera preponderante en la regulación de la secreción de GnRH, mediante mecanismos de retroalimentación.

El hipotálamo está situado en torno del tercer ventrículo y por debajo del tálamo; su base ventral se encuentra por encima de la hipófisis, a la cual está unido por el tallo hipofisario. El hipotálamo está delimitado craneal y caudalmente por el quiasma óptico y los cuerpos mamilares, respectivamente. Anatómicamente, el hipotálamo está dividido en núcleos (agregados de cuerpos neuronales) y áreas neuronales (grupos de neuronas más dispersas), cada uno con funciones diferentes relacionadas con la regulación neuroendocrina/homeostática del organismo. El área

pre-óptica medial (**POA**), el área hipotalámica anterior (**AHA**), el núcleo ventromedial (**NVM**) y el núcleo arcuato (**ARC**) son estructuras que participan de manera destacada en la regulación de la secreción de la GnRH. Los cuerpos celulares de las neuronas productoras de GnRH están ampliamente distribuidos, formando un “*continuum*” que va desde los núcleos preópticos medios hacia la región mediobasal del hipotálamo (Herbison, 2006), con cierta variación entre especies. La mayoría de los axones de estas neuronas tienen su destino en la eminencia media (**EM**), lugar en el cual la GnRH es liberada para llegar a la adenohipófisis por la vía del sistema porta hipotálamo-hipofisiario (Herbison, 2006; Yin y Gore, 2010).

La GnRH es secretada en dos patrones principales: el pulsátil que corresponde al modo tónico de secreción de gonadotropinas hipofisarias que conduce a la foliculogénesis y esteroidogénesis, y que es regulado por medio de retroalimentación negativa de estrógenos y progesterona; y el de liberación fásica, que corresponde a la descarga preovulatoria de gonadotropinas para inducir la ovulación en respuesta a la retroalimentación positiva de los estrógenos. En la rata se identifican dos áreas distintas para las dos formas de secreción de GnRH, ya que la secreción pulsátil proviene de neuronas localizadas en la zona ventromedial (**VM**) del hipotálamo, mientras que la fásica se origina en neuronas de la zona anterior del hipotálamo (Freeman, 2006). En los rumiantes sin embargo, no existe una clara separación para los dos tipos de secreción de GnRH ya que ambos modos de secreción aparentemente provienen del POA y del ARC (Goodman e Inskeep, 2006). Los pulsos de GnRH determinan la secreción pulsátil de LH y FSH; sin embargo, en el control de la secreción de FSH intervienen, además del estradiol, la inhibina, activina y folistatina (Padmanabhan y McNeilly, 2001), por lo que ambas gonadotropinas en general presentan diferente patrón de secreción. En ausencia de pulsos y descarga preovulatoria, también existe la secreción basal de GnRH/LH.

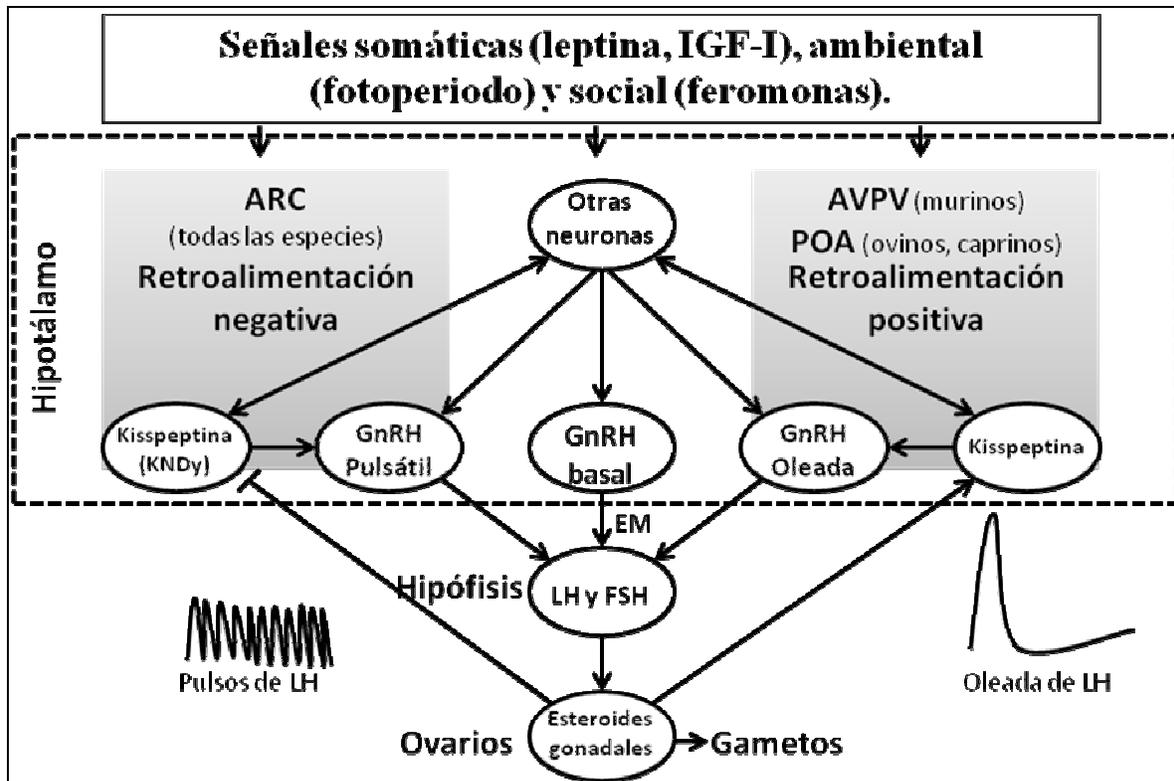


Figura 1. Diagrama de las relaciones funcionales del eje gonadotrópico. GnRH= hormona liberadora de las gonadotropinas; LH= hormona luteinizante, FSH= hormona folículoestimulante, KNDy= co-secreción de kisspeptina/neurokinina B/dinorfina A. ARC= núcleo arcuato, AVPV= núcleo periventricular anteroventral, POA= área preóptica medial, EM= eminencia media. Círculos de kisspeptina denotan grupos neuronales; círculos de GnRH denotan modo de secreción. Modificado de Millar *et al.*, 2010.

La secreción tónica (pulsos) y fásica (oleada o descarga) de LH y FSH, operan con regularidad en las hembras que han iniciado la pubertad y que manifiestan actividad ovárica cíclica; sin embargo, en las hembras infantiles, pre y peri-puberales el modo de secreción pulsátil opera con limitaciones, mientras que el modo de secreción de oleada, aunque potencialmente operativo, está ausente debido a la falta de un estímulo que lo active. Como se verá más adelante, en POA, núcleo AVPV (roedores) y ARC hay unas poblaciones de neuronas que producen kisspeptina (neuronas kisspeptinérgicas), además de neurokinina B y dinorfina A, péptidos involucrados en la secreción pulsátil o tónica de la GnRH (**Figura 1**; Goodman *et al.*, 2007; Merkley *et al.*, 2012; Wakabayashi *et al.*, 2010). Por añadidura, en la regulación neural de secreción de GnRH intervienen múltiples neuropéptidos hipotalámicos (mostrados en el esquema de la figura 1 como "otras neuronas"), así

como varios agentes señalizadores de origen somático y otros más provenientes del medio externo (Millar *et al.*, 2010; **Figura 1**).

### ***Desarrollo y maduración del eje gonadotrópico***

Durante las etapas de desarrollo y maduración del eje gonadotrópico, las becerras presentan marcadas diferencias en la secreción de hormonas sexuales a través del tiempo (Atkins *et al.*, 2013). Entre los 3 y 4 meses de edad, se observa un incremento transitorio de las concentraciones circulantes de LH y FSH (Evans *et al.*, 1994) y de estradiol (Nakada *et al.*, 2000) con respecto a edades más tempranas, alcanzando valores similares a los observados cuando se aproxima la pubertad. Después de ese periodo, las concentraciones hormonales disminuyen y vuelven a ser similares a las observadas desde el nacimiento hasta los 3 meses de edad. Dicho periodo de baja liberación hormonal permanece durante el resto de la etapa pre-puberal, hasta 1 ó 2 meses previos a la pubertad (periodo peri-puberal), cuando se observa un aumento en la secreción pulsátil de LH y estradiol. Durante el periodo pre-puberal, la liberación pulsátil de LH está disminuida, con pulsos que oscilan de 1 a 4 por día; sin embargo, durante el periodo peri-puberal la frecuencia se incrementa a un pulso por hora (Day *et al.*, 1984; Day *et al.*, 1987). A diferencia de la LH, durante los periodos pre y peri-puberal la FSH no presenta un aumento sustancial y más bien disminuye en su secreción durante el periodo peri-puberal (Evans *et al.*, 1994; Nakada *et al.*, 2000; Nogueira, 2004). A través de estos periodos, la FSH presenta incrementos periódicos que preceden al reclutamiento de grupos de folículos antrales pequeños y medianos, mismos que integran a las ondas de desarrollo folicular (Adams *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 2003). Este reclutamiento folicular en forma de ondas, sucede en las hembras bovinas desde la etapa infantil (Nakada *et al.*, 2000; Honaramooz *et al.*, 2004).

Se ha establecido que el aumento en la actividad pulsátil de la LH observado en el periodo peri-puberal, está asociado con un incremento en el número y diámetro de los folículos ováricos, con un aumento en las concentraciones de estradiol y con el rápido crecimiento y desarrollo del aparato reproductor (Day *et al.*, 1987; de Lucia *et al.*, 2002; Rawling *et al.*, 2003; Honaramooz *et al.*, 2004). Esto fue demostrado por

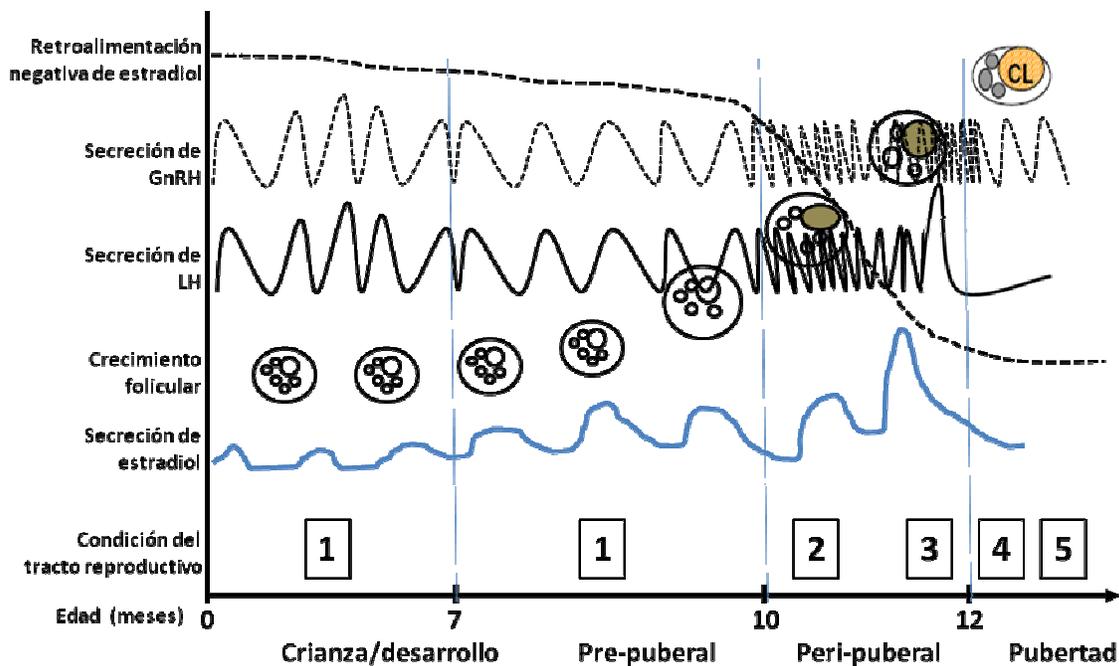
Madgwick *et al.* (2005) quienes redujeron en seis semanas (de 62.8 a 56.8 semanas) la edad al inicio de la pubertad de becerras mediante la aplicación diaria de GnRH entre las semanas 4 y 8 de edad, con lo cual se simuló el incremento transitorio de LH y FSH observado por Evans *et al.* (1994) durante los primeros 3 y 4 meses de edad y por McLeod *et al.* (1985) a los 5 meses de edad. Así mismo, con la aplicación de GnRH es posible inducir la liberación de las gonadotropinas hipofisiaria (Nakada *et al.*, 2002) y la liberación de óvulos fertilizables con un tratamiento superovulatorio en becerras de un mes de edad (Seidel *et al.*, 1971). Por otro lado, se ha demostrado que las becerras de 3 a 5 meses de edad son capaces de liberar LH en forma similar a la de una oleada preovulatoria si son estimuladas con estradiol (Staigmiller *et al.*, 1979). No obstante que la calidad y magnitud de la respuesta a los tratamientos descritos está asociada positivamente con la edad de los animales, las evidencias indican que el inicio de la pubertad depende, en gran medida, de la capacidad de determinadas neuronas hipotalámicas de producir GnRH en cantidad suficiente para estimular, a través de las gonadotropinas hipofisiarias, la foliculogénesis, esteroidogénesis y gametogénesis (Ebling, 2005; Atkins *et al.*, 2013).

El cambio en el patrón de secreción de GnRH que determina el inicio de la pubertad en los rumiantes se basa en la diferenciada sensibilidad del centro tónico hipotalámico, denominado históricamente como generador de pulsos de GnRH, a los efectos de retroalimentación negativa del estradiol (Amstalden *et al.*, 2011). En la construcción de este argumento, se determinó que durante el periodo pre-puberal, la secreción de LH está disminuida debido a la inhibición de la secreción de GnRH por un marcado efecto de retroalimentación negativa del estradiol, ejercido a nivel del centro tónico hipotalámico (Dodson *et al.*, 1989); sin embargo, en el periodo peri-puberal, el citado centro presenta progresivamente una menor sensibilidad al estradiol, lo cual resulta en un aumento cada vez mayor en la secreción de GnRH y por tanto de LH (Day *et al.*, 1987; Kinder *et al.*, 1995; **Figura 2**). En consecuencia, la LH estimula en los ovarios un mayor crecimiento folicular, así como una mayor secreción de estradiol, el cual eventualmente alcanza concentraciones que inducen una oleada preovulatoria de LH y la luteinización folicular (con o sin ovulación). Es pertinente mencionar que los efectos de los estrógenos ováricos sobre la secreción

de GnRH son ejercidos de forma indirecta, pues las neuronas GnRHérgicas no contienen en su estructura a los receptores alfa para dichos esteroides (Lehman *et al.*, 1993).

En el ganado bovino, como en otras especies, la maduración funcional del eje reproductivo ocurre en forma gradual y, de acuerdo a las evidencias presentadas en ésta sección, el hipotálamo es el integrante del eje que aparentemente madura más tardíamente. De igual manera, en esta parte de la revisión se evidencia el vacío de información con respecto a los cambios neurales/neurotransmisión que ocurren en el interior de hipotálamo y que se asume controlan la diferenciada sensibilidad a los efectos de retroalimentación negativa de los estrógenos ováricos sobre la secreción de GnRH, a lo largo del desarrollo puberal. Estudios recientes en bovinos y otras especies han puesto en evidencia que la kisspeptina y su sistema de señalización podrían intervenir en dichos efectos. En particular, se ha demostrado en becerras pre-púberes que la kisspeptina estimula la secreción de LH y FSH (Kadokawa *et al.*, 2008; Ezzat *et al.*, 2009; Alamilla, 2013). De la misma manera en ovinos está demostrado que la kisspeptina es un intermediario que comunica los efectos negativos y positivos del estradiol a las estructuras encargadas de la liberación de GnRH/LH (Messenger *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007a; Smith, 2009; Smith *et al.*, 2011). Además, en esta misma especie se observó que la mayoría de las neuronas kisspeptinérgicas albergan el receptor alfa de estradiol ( $93\pm 3$  % en el núcleo ARC y  $50\pm 12$  % en el POA; Franceschini *et al.*, 2006). A su vez, las neuronas GnRHérgicas albergan el receptor específico para kisspeptina (Irwing *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005).

En este proceso de maduración sexual el desarrollo del eje gonadotrópico está estrechamente asociado con el crecimiento y desarrollo corporal, mismos que cursan por periodos que se diferencian debido al cambio de peso, por el tipo y proporción de tejidos que se desarrollan y por modificaciones del metabolismo; eventos en los cuales el eje somatotrópico tiene funciones relevantes.



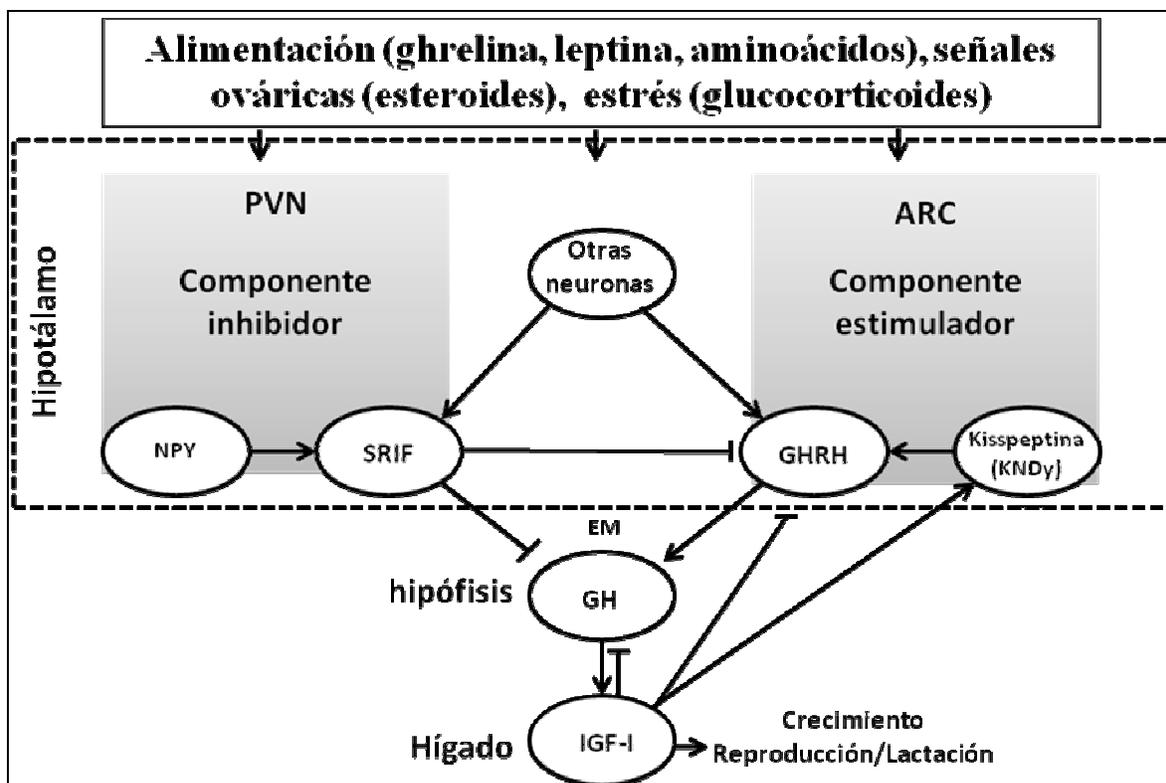
**Figura 2. Cambios fisiológicos, endocrinos y anatómicos asociados con el inicio de la pubertad en las hembras bovinas (esquema figurado para edad a la pubertad de un año; modificado de Day *et al.*, 1987; Day y Anderson 1998; Day y Nogueira, 2013). GnRH= hormona liberadora de las gonadotropinas, LH= hormona luteinizante, CL= cuerpo lúteo.**

## Eje somatotrópico y maduración sexual

### *Descripción general del eje somatotrópico*

El eje somatotrópico comprende fundamentalmente a la hormona de crecimiento (**GH** o **somatotropina**) de origen hipofisiario (somatotropos) y a los factores de crecimiento similares a la insulina I y II (**IGF-I** e **IGF-II**); además de las proteínas de unión de la GH 1 y 2 (**GHBP-1 y -2**), las proteínas de unión de IGF (**IGFBP-1 a 6**), la subunidad ácido lábil (**ALS**), los respectivos receptores de superficie celular para GH e IGF y las proteasas de IGFBP y GH (Hwa *et al.*, 1999; Buttler y Le Roit, 2001; Veldhuis *et al.*, 2006). La funcionalidad de este eje depende en gran medida de la expresión del receptor de GH en el hígado, que determina la cantidad de IGF-I liberada desde el hígado al torrente sanguíneo en respuesta a GH (Lucy *et al.*, 2001; Radcliff *et al.*, 2004). Los principales reguladores de la secreción de GH son la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (**GHRH**), la cual estimula la secreción de GH, y el factor inhibidor de la somatotropina (**SIRF** o **somatostatina**), el

cual inhibe la secreción de GH; ambos neuropéptidos tienen su origen en núcleos hipotalámicos diferentes (núcleo ARC y PVN respectivamente) y son descargados hacia el sistema porta hipotálamo-hipofisario para alcanzar por esta vía a los somatotropos, en donde actúan para regular la síntesis y secreción de GH (**Figura 3**). Adicionalmente, la Ghrelina (hormona peptídica orexigénica producida en el estómago en respuesta al ayuno) estimula la secreción de la GH (Katoh *et al.*, 2007) mediante la inducción de la liberación de GHRH del ARC (McMahon *et al.*, 2001). El IGF-I actúa como un factor pleiotrópico y también opera como la señal endocrina de retroalimentación negativa que controla la secreción de GH (Katoh *et al.*, 2007) en el hipotálamo (reduce la actividad de las neuronas productoras de GHRH y estimula a las de SS) y la hipófisis (reduce la secreción espontánea de GH y la estimulada por GHRH). Por otro lado, las IGFbps son reguladoras fisiológicas de las acciones del IGF-I, ya sea favoreciéndolas o inhibiéndolas (Hwa *et al.*, 1999). La GH además de inducir la síntesis y liberación de IGF-I hepático, también estimula su producción localmente en muchos tejidos corporales, en donde dicho factor actúa en forma paracrina y autocrina (Buttler y Le Roit, 2001). En el hígado la GH regula la síntesis y liberación de IGF-I, IGFbp (tipo 1 y 3) y ALS. Los tejidos extra-hepáticos en los que la expresión del IGF-I se correlaciona con los niveles sanguíneos de GH, son el adiposo y el muscular esquelético. La GH y el IGF-I ejercen funciones en la vida posnatal relacionadas con el crecimiento corporal y metabolismo energético/proteico (Etherton, 2004), por lo que ambas hormonas y otras relacionadas con el metabolismo manifiestan cambios dinámicos a través del crecimiento, desarrollo y maduración sexual.



**Figura 3. Diagrama de las relaciones funcionales del eje somatotrópico.** NPY= neuropéptido Y, SRIF= factor inhibidor de la liberación de la somatotropina, GHRH= hormona liberadora de la hormona de crecimiento, KNDy= co-secreción de kisspeptina/neurokinina B/dinorfina A; GH= hormona de crecimiento o somatotropina, IGF-I= factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I. Otras neuronas comprende: TRH= tirotropina, GABA= ácido y aminobutírico, NA= noradrenalina, 5HT= serotonina, DA= dopamina; PVN= núcleo paraventricular, ARC= núcleo arcuato, EM= eminencia media. Diseñado con base en Millar *et al.*, 2010.

### ***GH-IGF-I y maduración sexual***

Durante el crecimiento la GH ejerce efectos independientes de los de IGF-I en la zona terminal de la placa de crecimiento de los huesos largos (Wang *et al.*, 1999). Salvo algunas excepciones como la anterior, la GH actúa generalmente a través del IGF-I de origen hepático y de tejidos extra-hepáticos. La mayoría del IGF-I circulante es derivado del hígado, por lo que los niveles sanguíneos de esta hormona y de la GH se relacionan positivamente, en particular durante la etapa de crecimiento acelerado del individuo (Vicini *et al.*, 1991). En ovinos neonatales, los niveles de GH en sangre son bajos y éstos se incrementan gradualmente en las primeras semanas de vida en forma paralela con los receptores de GH en hígado y las concentraciones periféricas de IGF-I, los cuales están asociados con la curva de crecimiento posnatal

(Breier *et al.*, 1994). En la pubertad las concentraciones de GH y de IGF-I son máximas debido a que en el hígado también es máxima la expresión de receptores para GH (Christoforidis *et al.* 2005). Ambas hormonas permanecen elevadas mientras sucede la maduración sexual y a partir de ahí disminuyen gradualmente hasta alcanzar niveles similares a los de la vida neonatal (Rosen, 2000). La GH se secreta en un patrón pulsátil y presenta una amplia variación entre individuos. Por ejemplo, en becerras Holstein pre-púberes de seis meses edad, los niveles sanguíneos de GH varían de 6 a 32 ng/ml y de 1 a 9 pulsos en 9 horas (Swali *et al.*, 2008); no obstante, dicha variación esta asociada positivamente con el peso corporal, la altura a la cruz y el perímetro torácico (Swali *et al.*, 2008), lo cual evidencia sus efectos anabólicos en el crecimiento y desarrollo corporal (Hussain *et al.*, 1993).

Con relación a los efectos de la GH e IGF-I sobre el inicio de la pubertad, actualmente hay evidencias que los niveles de IGF-I aumentan en el periodo pre y peri-puberal (Roberts *et al.*, 1990; Garcia *et al.*, 2002; Velazquez *et al.*, 2008) lo que coincide con la etapa de crecimiento acelerado (Yelich *et al.*, 1996). A nivel ovárico, el sistema IGF-I estimula el desarrollo de los folículos (Zhou *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2009; Lucy, 2012) aumentando su proliferación y diferenciación al mismo tiempo que inhibe la apoptosis de las células de la granulosa (Beg y Ginther, 2006; Silva *et al.*, 2009) y potencializa la capacidad esteroideogénica de dichas células, en respuesta a las gonadotropinas hipofisarias (Kwintkiewicz y Giudice, 2009). Esos efectos aparentemente son independientes de las acciones de la GH (Zhou *et al.*, 1997; Lucy, 2012). A nivel hipofisario, el IGF-I estimula la secreción de gonadotropinas ya que aumenta la respuesta de LH/FSH a GnRH (Kanematsu *et al.*, 1991) y la de LH por un mecanismo independiente de GnRH (Adam *et al.*, 2000). Además, a nivel hipotalámico el IGF-I facilita la liberación de GnRH en la EM (Hiney *et al.*, 1996). En vaquillas pre-púberes alimentadas con una dieta alta en energía, la administración de GH recombinante indujo un aumento significativo en IGF-I total, IGF-I libre e IGFBP-3 (Vestergaard *et al.*, 2003; Radcliff *et al.*, 2004) en sangre, en comparación con lo observado en vaquillas alimentadas con una dieta convencional, aparentemente como resultado de un aumento en la síntesis de IGF-I hepático, acompañado de un

mayor número de receptores para GH e IGFBP-2 en hígado. Por otro lado, se ha establecido que una dieta alta en energía proporcionada a vaquillas, reduce la GH pero induce incrementos sostenidos de IGF-I en sangre periférica (Yelich *et al.*, 1996; Radcliff *et al.*, 2004) y reduce la edad a la pubertad (Hall *et al.*, 1994; Gasser *et al.*, 2006a, Rincker *et al.*, 2011). Con la tecnología actual ha sido posible identificar una marcada asociación negativa entre la actividad del gen del receptor de IGF-I y la edad a la pubertad en vaquillas *Bos indicus* (Fortes *et al.*, 2013). Por tanto, en adición a sus efectos sobre el crecimiento del animal, el IGF-I tiene notables acciones en el eje gonadotrópico que resultan en un mayor crecimiento folicular y generación de estradiol ovárico, lo cual podría significar que el IGF-I debe alcanzar niveles sanguíneos suficientes para que se establezca una secreción adecuada de estrógenos, los que a su vez conducen a una mayor secreción de GnRH/LH. No obstante lo anterior, debe tenerse en cuenta que los niveles de IGF-I son diferentes entre las novillas que alcanzan la pubertad precozmente y las que la inician de forma tardía; las primeras registraron incrementos de IGF-I antes de iniciar la fase peri-puberal, mientras que las segundas en el momento peri-puberal (Velazquez *et al.*, 2008; García *et al.*, 2002).

Además de los reguladores de GH antes descritos, otras hormonas y metabolitos actúan como agentes moduladores del eje somatotrópico, del metabolismo y de la reproducción; entre los que destaca la leptina, hormona de origen periférico que proporciona información al SNC del estado de adiposidad y metabólico del organismo, para llevar a cabo las adaptaciones homeostáticas correspondientes que a continuación se discuten.

### ***Leptina y maduración sexual***

Algunos estudios en roedores indican que la leptina modula la actividad del eje somatotrópico, ya que la secreción de GH es estimulada por la leptina (Cocchi *et al.*, 1999; Barb, 1999; McMahon *et al.*, 2001); sin embargo, dicho efecto depende de la duración/magnitud del aumento de la hormona cuyo origen es el tejido adiposo blanco (Salieri *et al.*, 2004). Los efectos de corto plazo de la leptina incrementan la secreción de GH mediante varias vías: el aumento de la secreción de GHRH (Cocchi

*et al.*, 1999), la inhibición de la SS (Cocchi *et al.*, 1999), así como la disminución del neuropéptido Y y del consumo de alimento (Barb 1999; McMahon *et al.*, 2001); pero los efectos de largo plazo disminuyen la GH al reducir la respuesta de la adenohipófisis a GHRH (resistencia a GHRH; Suttie *et al.*, 1991), lo cual podría ser una de las principales razones por las que los individuos obesos presentan bajas concentraciones de GH en sangre (Ostlund *et al.*, 1996). En becerras pre-púberes se determinó que los niveles sanguíneos de la leptina se mantienen en concentraciones cercanas a 2.3 ng/ml del nacimiento a los 300 días de edad, a partir de la cual se observó un incremento significativo de dicha hormona, el cual estuvo asociado positivamente con la cantidad de grasa y peso corporal, pero no con los niveles de GH en sangre (Block *et al.*, 2003). En borregas adultas, la infusión de leptina por tres días indujo un incremento de GH sin importar el peso de los animales (Henry *et al.*, 2001), al igual que en becerras pre-púberes bajo condiciones de ayuno por 72 horas (Maciel *et al.*, 2004b) pero en éstas, la leptina no afectó las concentraciones periféricas de IGF-I. En contraste, en becerras pre-púberes adecuadamente alimentadas el tratamiento crónico con leptina (40 días) no modificó las concentraciones plasmáticas de GH, pero al igual que en becerras en ayuno, tampoco alteró los niveles de IGF-I (Maciel *et al.*, 2004a), por lo que los efectos de la leptina en la secreción de GH y de IGF-I dependen de varios factores entre los que se incluyen el grado de aumento de los niveles circulantes de leptina, el tiempo en que este aumento se mantiene, la dieta, el estado metabólico del animal, su edad y grupo genético. Consecuentemente las concentraciones periféricas de GH e IGF-I podrían incrementarse antes, simultáneamente o después que la leptina alcance el umbral que caracteriza a la madurez somática.

Consecuentemente, la cantidad de los depósitos de energía y el estado metabólico del organismo son reguladores claves del inicio de la pubertad. En ganado bovino, como en muchos mamíferos, la subalimentación modula negativamente la actividad reproductiva (Foster y Nagatani, 1999; Williams *et al.*, 2002). En animales en crecimiento, la restricción energética en la dieta retrasa el crecimiento, la deposición de grasa corporal y el inicio de la pubertad (Foster y Nagatani, 1999). En mujeres y ratonas adultas deficientes en leptina, se observan deficiencias de la actividad

reproductiva, la cual se reanuda mediante la terapia a base de leptina (Chehab *et al.*, 1996; Mounzih *et al.*, 1997). Estas observaciones condujeron a la hipótesis de que la leptina podría ser una señal disparadora de la pubertad (Foster y Nagatani, 1999), por lo que las concentraciones peri-puberales de leptina deberían ser mayores que la de los animales pre-púberes. Dicho incremento de leptina en sangre ha sido observado en becerras que se aproximan a la pubertad (Díaz-Torga *et al.*, 2001; García *et al.*, 2002), sin embargo existen evidencias en vaquillas (Block *et al.*, 2003) y humanos (Pardini *et al.*, 1998; Andreelli *et al.*, 2000) de que la pubertad también se presenta en individuos con muy bajas concentraciones de leptina. Además, la administración intravenosa de leptina pudo restablecer parcialmente la producción de LH en vaquillas pre-púberes subalimentadas (Maciel *et al.*, 2004b), pero no fue capaz de adelantar la pubertad en corderas (Jackson *et al.*, 2002; Morrison *et al.*, 2002) o becerras (Maciel *et al.*, 2004a; Carvalho *et al.*, 2013). Por lo anterior se ha sugerido que la elevación de leptina en el periodo peri-puberal no necesariamente corresponde a un evento de desarrollo somático que sea el detonador de la pubertad en rumiantes. Tanto Zieba *et al.* (2004) como Williams *et al.* (2002) proponen que la leptina es una hormona permisiva del inicio de la pubertad y, por tanto, las evidencias mostradas en este párrafo sugieren que otros factores podrían contribuir a la activación/inducción de la actividad reproductiva en las hembras bovinas durante el desarrollo puberal.

Aunque no de manera unánime, diversos estudios desarrollados *in vitro* e *in vivo*, sugieren que la kisspeptina puede ejercer un efecto positivo sobre la liberación de la GH (**Figura 3**). Los elementos que han dado pie a proponer lo anterior son que la kisspeptina estimuló bajo algunas condiciones experimentales la secreción de la GH (Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2007; Kadokawa *et al.*, 2008; Whitlock *et al.*, 2008; Whitlock *et al.*, 2010; Alamilla, 2013) y que se ha informado que el receptor de kisspeptina (GPR54) está presente en los somatotropos de ovinos (Smith *et al.*, 2008), lo que proporciona una base fisiológica para la acción de kisspeptina a ese nivel. Además, se reportó que el IGF-I (Hiney *et al.*, 2009) estimula la expresión hipotalámica de kisspeptina, por lo que este sistema hipotalámico podría ser un elemento integrador a nivel central de los ejes somatotrópico con el gonadotrópico durante el inicio puberal.

Por otro lado, uno de los efectos de la leptina en el eje reproductivo parece involucrar de manera directa a las neuronas kisspeptinérgica, ya que al menos en ratones (Smith *et al.*, 2006) y borregas (Backholer *et al.*, 2010) las neuronas kisspeptinérgicas exhiben el receptor Ob-Rb de leptina, por lo que IGF-I y leptina podrían coordinadamente participar en la regulación de actividades del eje gonadotrópico a través de la kisspeptina.

### **Regulación de la secreción de GnRH**

El inicio de la pubertad es determinado por el cambio en los sistemas neurales que regulan la secreción de GnRH, pero este fenómeno no es simplemente una función de edad; por el contrario, la red neuronal que regula a la GnRH sirve de conductor de información proveniente de los combustibles metabólicos, el almacenamiento de energía, el desarrollo de los tejidos somáticos, las secreciones de las gónadas y, para muchas especies de mamíferos, información proveniente del medio externo relacionada con la estación del año y el ambiente social (Ebling, 2005).

Si bien son múltiples los mecanismos que modulan la secreción de GnRH, destacan dos fenómenos fisiológicos: **1)** Los efectos de retroalimentación negativa de los estrógenos ováricos, a los cuales la red de neuronas GnRHérgicas son extremadamente sensibles durante las etapas posnatales tempranas (Dodson *et al.*, 1989), seguido de una disminución progresiva de los efectos de retroalimentación negativa del estradiol que permite un gradual incremento en la secreción de la LH, que a su vez estimula un aumento en la secreción de estrógenos, aumentando éstos su secreción en edades cercanas a la pubertad, lo que desencadena una descarga masiva de GnRH, de LH y la primera ovulación (Day *et al.*, 1987), **2)** El incremento en señales internas asociadas con el almacenamiento de energía (leptina), alimentación (propionato, glucosa, insulina), formación de tejidos (GH, IGF-I, hormonas tiroideas), así como de señales provenientes del medio externo (melatonina, prolactina y feromonas), las cuales son identificadas e interpretadas por el SNC (Ebling, 2005; Castellano *et al.*, 2009; 2010; Okamura *et al.*, 2010). Estos últimos elementos podrían determinar el cambio del hipotálamo, que de ser hipersensible a las acciones inhibitorias de los estrógenos, pasa a ser poco sensible

a ellos (Gasser *et al.*, 2006ab) y posiblemente muy sensible a los efectos estimulantes de los mismos (Amstalden *et al.*, 2011). La percepción de estas señales se produce a través de neurotransmisores neuronales (Amstalden *et al.*, 2011; De Bond y Smith, 2014) y factores de crecimiento de origen glial (Ojeda *et al.*, 2006) que son reconocido como reguladores positivos o negativos del sistema que controla la secreción pulsátil de la GnRH en el hipotálamo.

En revisiones relacionadas con los mecanismos que gobiernan al eje reproductivo (Terasawa y Fernández, 2001; Roa y Tena-Sempere, 2010; Amstalden *et al.*, 2011; Hrabovzky y Liposits, 2013), se reunieron evidencias con relación a los elementos que modulan negativa o positivamente la actividad de las neuronas GnRHérgicas durante la infancia y los período pre y peri-puberales; entre ellos se encuentran el glutamato (Glu), noradrenalina (NA) y melanocortinas (MSH), que actúan como estimulantes, así como los péptidos opioides hipotalámicos (APO) y la hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH) cuyas funciones son inhibitorias. Además debe mencionarse el ácido gama-butírico (GABA) y el neuropéptido Y (NPY) que en condiciones específicas actúan como estimuladores o bien como inhibidores de la secreción de GnRH. Entre los diferentes reguladores transinápticos de las neuronas GnRHérgicas, la kisspeptina ha recibido mucha atención en los últimos años. Las evidencias generadas en múltiples especies colocan a la kisspeptina como un elemento con acciones estimuladoras en el proceso que gobierna la actividad de las neuronas GnRHérgicas (Ojeda *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 2010). La mayoría de los expertos señalan a la kisspeptina como el elemento estimulador preponderante que gobierna la actividad de las neuronas hipofisiotrópicas productoras de GnRH (Dungan *et al.*, 2006; Smith, 2009; Pielecka-Fortuna y Moenter, 2010; Chalivoix *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2010), lo cual ha sido ampliamente documentado en revisiones recientes (Pinilla *et al.*, 2012; Kauffman y Smith, 2013; De Bond y Smith, 2014).

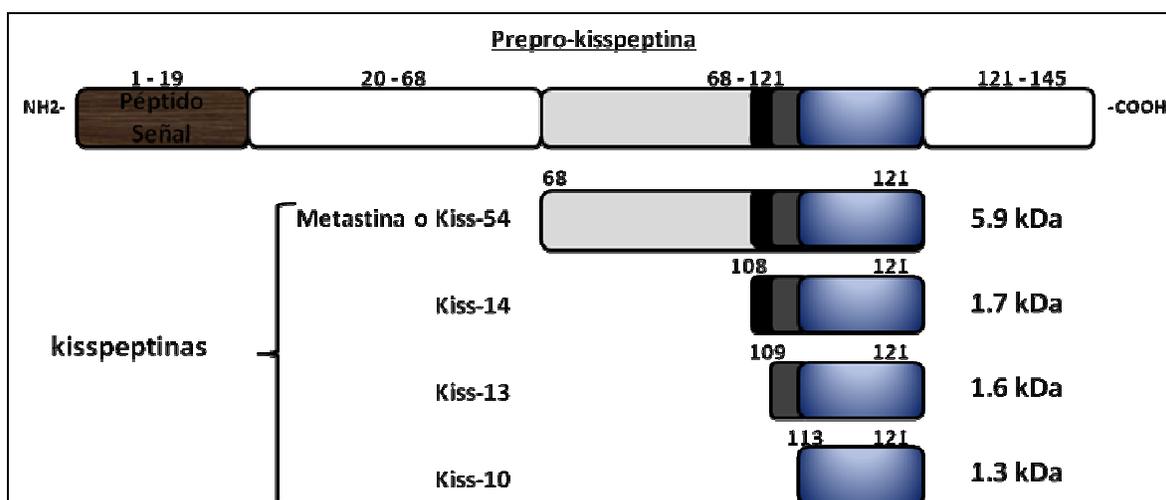
### **Kisspeptina (s)**

La o las kisspeptinas, también denominada metastina, constituye o constituyen una familia de péptidos relacionados estructuralmente, codificados por el gen *Kiss1*, que actúan a través del receptor GPR54 (Kiss1r en especies no humanas), estructura

que se acopla a proteínas G (Kotani *et al.*, 2001). Es un sistema (ligando y receptor) altamente conservado entre vertebrados (Oakley *et al.*, 2009; Kanda y Oka, 2012) con expresión en múltiples tejidos corporales (Makri *et al.*, 2008), particularmente en el hipotálamo en donde participa regulando la actividad reproductiva (Mikkelsen y Simonneaux, 2009; Lehman *et al.*, 2010a). El gen *Kiss1* fue inicialmente identificado y secuenciado en 1996 como un gen inhibidor de la metástasis tumoral (Lee *et al.*, 1996), función que se encuentra bajo intensa exploración científica (Makri *et al.*, 2008). La caracterización de las kisspeptinas que integran a la citada familia de péptidos (Kiss-54, -14, -13 y -10 por el número de aminoácidos que lo integran) y su actividad agonística sobre el receptor GPR54 fue propuesta por Kotani *et al.* (2001). Por su parte, el salto a la escena reproductiva del sistema kisspeptina fue establecido por dos grupos independientes de investigadores en el año 2003, quienes demostraron que el hipogonadismo hipogonadotrópico y la ausencia de pubertad presentada por niñas y niños se debió a una alteración genética y funcional del gen responsable de expresar el receptor GPR54 (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003).

La expresión del gen *Kiss1* origina a la preprokisspeptina de 145 aminoácidos (15.4 kDa) que incluye al péptido señal con 19 aminoácidos y una región central de 54 elementos que es flanqueado por dos sitios de corte, lo cual da origen a la metastina o Kiss-54 (**Figura 4**; Roa *et al.*, 2008a). Con base en la deducción de la secuencia de aminoácidos del gen *Kiss1* y su caracterización molecular, las kisspeptinas de los mamíferos (**Figura 5**) son: la Kiss-54 en porcinos y humanos, la Kiss-53 en bovinos, ovinos y caprinos, y la Kiss-52 en ratas y ratones (Tomikawa *et al.*, 2010); posteriores fraccionamientos de las Kiss-54, -53 ó -52 dan origen a un grupo bioactivo de menor peso molecular, cuyos integrantes por el número de aminoácidos que contienen sus moléculas se denominan: Kiss-14, -13 y -10 (Kotani *et al.*, 2001). Al interior de cada especie, todas las kisspeptinas comparten la misma secuencia terminal de 10 aminoácidos en la región C terminal (**Figura 4**). Este fragmento es suficiente para inducir la unión y activación del receptor GPR54/Kiss1r (Ohtaki *et al.*, 2001) y presenta el motivo Arg-Phe-NH<sub>2</sub> en humanos, y Arg-Tyr-NH<sub>2</sub> en especies no

humanas, característica que la hace formar parte de la superfamilia de péptidos RF-amida (Kotani *et al.*, 2001; Bechtold y Luckman, 2007).



**Figura 4.** Estructura de la prepro-kisspeptina, codificada por el gen *Kiss1* y los péptidos (kisspeptinas) resultantes de su escisión proteolítica con su respectivo peso molecular (modificado de Roa *et al.*, 2008a).

|           |   |                                            |         |        |       |
|-----------|---|--------------------------------------------|---------|--------|-------|
| Porcino   | 1 | GTSSCQPPESSSGPQRPGGLCTPRSLIPAPRGAVLVQREKDL | SAYNWN  | SFGLRY | 54    |
| Humano    | 1 | GTSLSPPESSSGSPQQPGLSAPHSRQIPAPQGAVLVQREKDL | PNYNWN  | SFGLRF | 54    |
| Chimpance | 1 | GTSLSPPESSSGSPQQPGLSAPNSRQIPAPQGAVLVQREKDL | PNYNWN  | SFGLRF | 54    |
| Bovino    | 1 | GAALCPP-ESSAGPQRLGPCAPRSRLIPSPRGAVLVQREKDV | SAYNWN  | SFGLRY | 53    |
| Ovino     | 1 | GAALCPS-ESSAGPRQGPCAPRSRLIPAPRGAALVQREKDV  | SAYNWN  | SFGLRY | 53    |
| Rata      | 1 | -TSPCPPVENPTGHQRP-PCATRSRLIPAPRGSVLVQREKDM | SAYNWN  | SFGLRY | 52    |
| Ratón     | 1 | -SSPCPPVEGPAGRQRP-LCASRSRLIPAPRGAVLVQREKDL | STYNWN  | SFGLRY | 52    |
|           |   | *                                          | ** ** * | *****  | ***** |

**Figura 5.** Secuencia de aminoácidos de la kisspeptina 54 ó metastina de diferentes especies; los números indican el número de aminoácidos que contiene la molécula. Los aminoácidos idénticos entre especie son marcados con un asterisco. En el área sombreada se muestra a la Kiss-10 (Tomado de Tomikawa *et al.*, 2010).

Todas las kisspeptinas activan eficientemente al receptor GPR54/Kiss1r, ya que el extremo C terminal es común en la mayoría de las kisspeptinas descritas, y aún la Kiss-10 retiene la máxima capacidad de unión al mencionado receptor (Kotani *et al.*, 2001). El mecanismo de señalización intracelular propuesto para la acción de las kisspeptinas en la secreción de GnRH a nivel del hipotálamo incluye la cascada

típica de las proteínas G $\alpha$  (G $\alpha$ q/11) (Castaño *et al.*, 2009), como la activación de la fosfolipasa C y la subsiguiente hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) para generar inositol-(1,4,5)-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> activa la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular, que en turno participa en la cascada de activación de otras proteínas; el DAG por su parte activa a la proteína quinasa C (PKC). El DAG induce la despolarización de membranas de las neuronas GnRHérgicas a través de la apertura de canales catiónicos no selectivos (TRPC) para el ingreso de Na y Ca, y el cierre de canales rectificadores de potasio (Zhang *et al.*, 2013). Adicionalmente, y en función del tipo celular, la actividad del sistema ligando-receptor puede activar otras rutas de señalización como el de las proteínas activadas por mitógeno (MAPK), especialmente ERK1/2, p38 y fosfatidil inositol-3-quinasa (PIP<sub>3</sub>)/Akt, lo cual posibilita a las células de diferentes tejidos para ejercer funciones adicionales como supresión de metástasis, modulación de la migración y apoptosis.

En múltiples estudios desarrollados en roedores (Roa *et al.*, 2009), primates (Shahab *et al.*, 2005), borregos (Arreguin-Arevalo *et al.* 2007; Caraty *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2011), cabras (Hashizume *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2011), cerdos (Lents *et al.*, 2008), ganado bovino (Kadokawa *et al.* 2008, Ezzat *et al.*, 2009; Withlock *et al.*, 2008, 2010) y equinos (Magee *et al.*, 2009) se ha demostrado que la administración de kisspeptina estimula la liberación de las gonadotropinas hipofisarias, lo cual se lleva a cabo por medio de la estimulación de las neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo (Shahab *et al.*, 2005; Messenger *et al.*, 2005; Arreguin-Arevalo *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2012). Este evento involucra la activación del receptor GPR54 (Messenger *et al.*, 2005) que es expresado en las neuronas GnRHérgicas (Irwing *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005). Lo anterior y otras evidencias (Ramaswamy *et al.*, 2008; d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2007b; 2011; Desroziers *et al.*, 2010; Wakabayashi *et al.*, 2010; Uenoyama *et al.*, 2011) dan pie a afirmar que la acción estimuladora sobre las neuronas GnRHérgicas por parte de las kisspeptinas, es realizada predominantemente por la vía de los contactos sinápticos directos; en forma adicional la kisspeptina eventualmente se comunica con las neuronas GnRHérgicas a través de la vía tran-sináptica indirecta, modulando la actividad de las neuronas productoras de GABA, Glu, NPY y MSH, quienes actúan

en las neuronas GnRHérgicas (Pielecka-Fortuna y Moenter, 2010; Backholer *et al.*, 2010).

Con respecto a las estructuras de origen de la kisspeptina (**Cuadro 1**), se han realizado estudios para identificar la distribución anatómica de las neuronas kisspeptinérgicas y las proyecciones de éstas hacia las neuronas GnRHérgicas. Mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (Mikkelsen y Simonneaux, 2009; Lehman *et al.*, 2010a), se ha establecido que la población mayor y más consistente de somas neuronales kisspeptinérgicas hipotalámicas en especies mamíferas está localizada en el núcleo ARC, y otra de menor tamaño se localiza en la porción anterior del hipotálamo, también referida como área periventricular rostral del tercer ventrículo (**RP3V**), la cual contiene el núcleo AVPV en ratones, ratas y hamsters, y el POA en humanos, monos y borregos (Mikkelsen y Simonneaux, 2009; Lehman *et al.*, 2010a). La ubicación de los axones de las neuronas kisspeptinérgicas sigue un patrón similar al de los cuerpos neuronales; sin embargo, gran parte de los axones kisspeptinérgicos también se localizan en la zona interna de la EM. En borregos (Franceschini *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2011), monos (Ramaswamy *et al.*, 2008), ratas (Desroziers *et al.*, 2010) y cabras (Wakabayashi *et al.*, 2010), se ha observado que algunas fibras kisspeptinérgicas procedentes del ARC también se encuentran en la zona externa de la EM, que junto con la zona interna son sitios de convergencia axonal en donde se liberan factores de liberación/inhibición hipotalámicos, entre ellos GnRH, GHRH y SS (Yin y Gore, 2010). Además, en algunas especies (monos, borregos, ratones y caballos) se ha determinado que en el RP3V y en la EM existe un íntimo contacto entre las terminales nerviosas de las neuronas kisspeptinérgicas y las neuronas GnRHérgicas (Clarkson y Herbison, 2006; Clarkson *et al.*, 2010; Decourt *et al.*, 2008; Ramaswamy *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2007b; 2011), fenómeno que ha sido implicado en el proceso de activación puberal en roedores (Clarkson y Herbison, 2006; Clarkson *et al.*, 2009b). En un estudio publicado recientemente, se indica que una parte de la población de neuronas kisspeptinérgicas del núcleo ARC se proyecta hacia los cuerpos celulares de las neuronas GnRHérgicas del POA (Yeo *et al.*, 2011), pero no hacia sus terminales nerviosas localizadas en la zona interna o externa de la EM. Por lo tanto, no está completamente aclarado en estas especies, y

menos aún en otros mamíferos incluyendo a los bovinos, las interacciones estructurales entre las neuronas kisspeptinérgicas y GnRHérgicas, así como sus implicaciones fisiológicas.

**Cuadro 1. Distribución hipotalámica de neuronas y axones neuronales kisspeptinérgicos en diferentes mamíferos (Mikkelsen y Simonneaux, 2009; Lehman *et al.*, 2010a)**

| Especie  | NEURONAS HIPOTALÁMICAS QUE EXPRESAN KISSPEPTINA |     |      |    | FIBRAS HIPOTALÁMICAS QUE EXPRESAN KISSPEPTINA |     |      |    |
|----------|-------------------------------------------------|-----|------|----|-----------------------------------------------|-----|------|----|
|          | ARC                                             | POA | AVPV | EM | ARC                                           | POA | AVPV | EM |
| Humanos  | +++                                             | +   | -    | -  | ++                                            | ++  | ++   | +  |
| Rhesus   | +++                                             | ++  | -    | +  | ++                                            | +   | -    | +  |
| Ratas    | +++                                             | -   | ++   | -  | ++                                            | +   | +    | ++ |
| Ratones  | ++                                              | ++  | +    | -  | ++                                            | -   | +    | ++ |
| Hamsters | +++                                             | ++  | -    | -  | ++                                            | -   | +    | -  |
| Ovinos   | +++                                             | ++  | -    | -  | ++                                            | +   | -    | ++ |
| Caprinos | +++                                             | -   | -    | -  | ++                                            | +   | -    | ++ |
| Bovinos  | NO HAN SIDO ESTUDIADOS AL RESPECTO              |     |      |    |                                               |     |      |    |

ARC= núcleo arcuato, POA= área pre-óptica medial, AVPV= núcleo periventricular anteroventral, EM= eminencia media. +++ altamente expresado, ++ medianamente expresado, + bajamente expresado, - no identificado.

### Neuronas KNDy

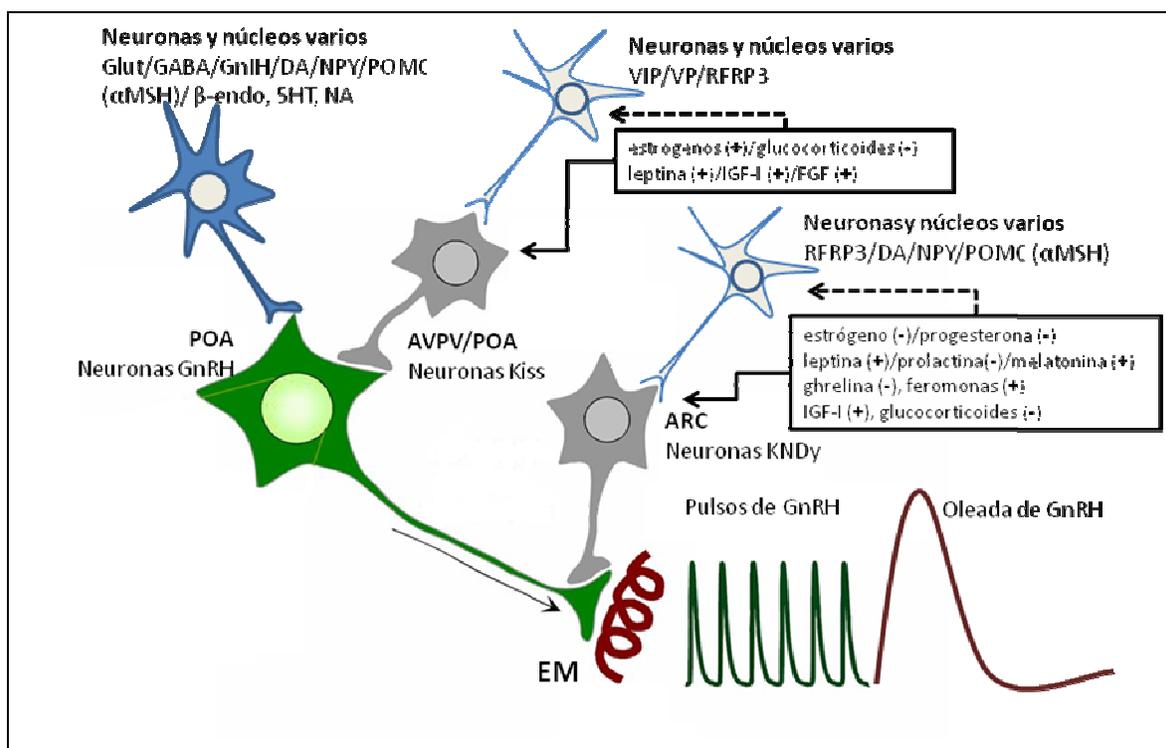
A pesar de la capacidad común para producir kisspeptina, las neuronas del ARC y del RP3V responden de manera diferente a sus reguladores y aparentemente juegan papeles diferentes en el control de los diversos aspectos de la reproducción (Goodman, 2007; Smith, 2008; Uenoyama *et al.*, 2009; Navarro, 2012). La naturaleza de las acciones y los mecanismos de regulación de dichas neuronas están siendo sometidos a intenso estudio y han sido dilucidados parcialmente (Uenoyama *et al.*, 2009; Navarro y Tena-Sempere, 2012; Navarro, 2012). Dos facetas del sistema

kisspeptinérgico que han despertado considerable interés, son la identificación de señales reguladoras y los componentes neurales que interactúan con el sistema kisspeptinérgico en el hipotálamo. Los estudios sobre estos temas han hecho posible la identificación de neurotransmisores que son expresados en poblaciones específicas de neuronas kisspeptinérgicas. Por ejemplo, la expresión de neurokinina B (**NKB**) ha sido demostrada en las neuronas kisspeptinérgicas del ARC en varias especies (Goodman *et al.*, 2007; Lehman *et al.*, 2010b); la relevancia de esa coexpresión y de las acciones de NKB en el hipotálamo fue inicialmente reforzada por los datos de estudios en humanos, con los que se demostró una asociación entre las mutaciones en el gen que codifica a la NKB o a su receptor (TAC3R) y la ausencia de pubertad (Topaloglu *et al.*, 2009). Para agregar más complejidad a este conocimiento, también se identificó a la dinorfina A (**Dy**), un péptido opioide en las neuronas que expresan kisspeptina/NKB (Goodman *et al.*, 2007; Lehman *et al.*, 2010b). La colocación de kisspeptina, NKB y Dy es una característica específica de la población de neuronas kisspeptinérgicas del ARC (Merkley *et al.*, 2012; Wakabayashi *et al.*, 2010), y el término de neuronas KNDy usado actualmente ha sido empleado para referirse a esas neuronas que producen los tres neuropéptidos a la vez. Por su ubicación, las neuronas KNDy parecen ser elementos clave en la generación de los pulsos de GnRH (Ohkura *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 2010; Sakamoto *et al.*, 2012; Navarro, 2012). En este sentido, la kisspeptina podría operar como la señal responsable de la activación directa de las neuronas GnRHérgicas; a su vez, la NKB puede actuar de modo autocrino/paracrino sobre las neuronas KNDy para estimular la liberación de kisspeptina (Navarro *et al.*, 2009; Navarro, 2012) y, por consiguiente, inducir la secreción de GnRH de una manera indirecta. Esta posibilidad es apoyada, al menos parcialmente, por las evidencias experimentales que indican que el receptor TAC3R está presente en las neuronas KNDy (Navarro *et al.*, 2009; Amstalden *et al.*, 2010; Croft *et al.*, 2013) mas no en las que producen la GnRH (Amstalden *et al.*, 2010; Navarro, 2012; Navarro *et al.*, 2012). La Dy, ha sido reconocida por mucho tiempo como inhibidora de la secreción de gonadotropinas a través de su capacidad para inhibir la liberación de GnRH. Entonces, el balance y las acciones recíprocas de kisspeptina, NKB y Dy podría ser un determinante de la

secreción dinámica de kisspeptina y por consiguiente de la secreción pulsátil de GnRH/LH (Rance *et al.*, 2010; Merkley *et al.*, 2012). Este componente no ha sido examinado en bovinos, sin embargo en roedores, humanos, ovinos y caprinos adultos se ha determinado la existencia de una red de neuronas KNDy recíprocamente interconectadas y con proyecciones directas hacia los cuerpos celulares y terminales nerviosas de las neuronas GnRHérgicas (Rance *et al.*, 2010; Wakabayashi *et al.*, 2010; Lehman *et al.*, 2010b; Croft *et al.*, 2013), lo cual posiciona al citado componente KNDy como elemento central en la regulación de las neuronas GnRHérgicas de las hembras adultas. De manera interesante, las evidencias recientemente generadas en ovinos (Nestor *et al.*, 2012) y ratas (Navarro *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012) apuntan a posicionar al sistema KNDy como un componente relevante en la activación pulsátil de la secreción de kisspeptina, y en turno de las neuronas GnRHérgicas durante el inicio de la pubertad. Asumiendo la coexpresión de péptidos, la evidencias en borregos indican que durante la transición puberal existe un aumento en la inmunexpresión tanto de kisspeptina como de NKB, así como de contactos sinápticos de neuronas kisspeptinérgicas hacia neuronas GnRHérgicas (Redmond *et al.*, 2011b; Nestor *et al.*, 2012).

El control de la actividad de las neuronas kisspeptinérgicas y KNDy proviene de una variedad de fuentes (Franceschini y Desroziers, 2013) incluyendo: hormonas esteroides (Oakley *et al.*, 2009; Poling y Kauffman, 2013), señales metabólicas (Backholer *et al.*, 2010; Amstalden *et al.*, 2011; Roa, 2013) y de procedencia externa (Chalivoix *et al.*, 2010; Okamura *et al.*, 2010; **Figura 6**). Por la acción de estos moduladores, las evidencias generadas en ratas, primates y rumiantes pequeños, se estableció que la secreción de KNDy del ARC y kisspeptina del RP3V a lo largo del desarrollo embrionario, posnatal y puberal sigue un patrón paralelo al de la secreción de GnRH/LH, con un aumento en la expresión de kisspeptina en el RP3V durante el periodo peri-puberal (Franceschini y Desroziers, 2013). Con base en información generada en ratas, en el 2013 se puso en evidencia la participación de mecanismos epigenéticos en el control de la actividad del gen *Kiss1* (Lomniczi *et al.*, 2013), pero debido a la naturaleza del presente estudio y al cúmulo de información generada a la

fecha en especies variadas acerca de los elementos que regulan la expresión de kisspeptina hipotalámica, en lo que resta de ésta sección, la revisión será enfocada hacia el control de las neuronas kisspeptinérgica y de las KNDy, con énfasis en las acciones de los estrógenos ováricos, leptina, IGF-I y el fotoperíodo.



**Figura 6. Diagrama de las estructuras y factores neurales, hormonales y ambientales que regulan la actividad de las neuronas productoras de GnRH y de kisspeptina.** GnRH= hormona liberadora de las gonadotropinas; Kiss= kisspeptina, KNDy: Co-secreción de kisspeptina/neurokinina B/dinorfina A,  $\beta$ -endo=  $\beta$  endorfina, Glut= glutamato, GABA= ácido y aminobutírico, NPY= neuropéptido Y, POMC= proopiomelanocortina, VIP= péptido intestinal vasoactivo, VP= vasopresina, NA= noradrenalina, 5HT= serotonina, DA= dopamina, RFRP3= péptido liberador de péptidos 3, IGF-I= factor de crecimiento parecido a la insulina I, FGF= factor de crecimiento de fibroblastos, POA= área pre-óptica medial, ARC= núcleo arcuato, AVPV= núcleo periventricular anteroventral, EM= eminencia media. (+) estimulación, (-) inhibición. Redibujado de Choe *et al.* (2013) con base en Franceschini y Desroziers (2013).

### Regulación de la kisspeptina por estrógenos ováricos

Se ha demostrado en roedores (Gottsch *et al.*, 2009), borregos (Smith *et al.*, 2007a; Smith, 2008) y cerdos (Tomikawa *et al.*, 2010) adultos que los niveles hipotalámicos del mRNA de *Kiss1* son modificados por los esteroides sexuales; y la kisspeptina es

factor limitante en la formación de la oleada preovulatoria de GnRH promovida por estradiol (Smith, 2009; Smith *et al.*, 2011). De acuerdo a revisiones efectuadas para múltiples especies y estudios filogenéticos del gen *Kiss1*, se ha determinado que la sensibilidad de la expresión de kisspeptina a los efectos de los estrógenos es un fenómeno altamente conservado entre especies (Smith, 2009; Oakley *et al.*, 2009; Kanda y Oka, 2012); sin embargo, la estructura anatómica-funcional del sistema kisspeptinérgico involucrada en el citado fenómeno es diferente entre especies. Tomando como base los resultados obtenidos en roedores (Uenoyama *et al.*, 2009), los efectos negativos de los estrógenos inhiben en el ARC la secreción de kisspeptina y con ello regulan la actividad pulsátil de GnRH, mientras que los efectos positivos de los mismos estimulan en el AVPV la secreción de kisspeptina y con ello se induce la oleada preovulatoria de GnRH (**Figura 6**). Al igual que en roedores, en ovinos el estradiol regula negativamente la expresión de kisspeptina en el ARC; sin embargo en esta especie la regulación positiva de los estrógenos durante la fase preovulatoria del ciclo estral parece involucrar una parte de la población de neuronas kisspeptinérgicas tanto del ARC como del POA (Smith, 2009; Smith *et al.*, 2007a; 2009a). Lo anterior, indica que en ambas especies la secreción tónica de GnRH/LH es gobernada por kisspeptina en el núcleo ARC, mientras que la regulación fásica de la GnRH/LH es gobernada por kisspeptina en el AVPV en roedores y por kisspeptina en el POA/ARC en ovinos (Smith, 2009; **Figura 1**). Una de las inquietudes actuales es conocer como el estradiol regula diferencialmente la actividad de las neuronas kisspeptinérgicas; al respecto se ha sugerido, con base en estudios desarrollado en ratones (Gottsch *et al.*, 2009), que el estradiol emplea la ruta clásica dependiente de elementos responsivos a estrógenos (ERE) en las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV y la ruta no clásica (independiente de ERE) en las neuronas kisspeptinérgicas del ARC, lo cual indica que en el AVPV la retroalimentación positiva del estradiol requiere la regulación transcripcional de genes, pero no en el ARC en donde se ejerce la regulación negativa del estradiol. Recientemente en ovinos se demostró que las neuronas KNDy del ARC también responden a la retroalimentación positiva del estradiol (Merkley *et al.*, 2012), por lo que la regulación estrogénica diferenciada en un mismo grupo de neuronas KNDy podría ocurrir empleando diferentes mecanismos

de señalización intracelular, lo cual requiere de comprobación en diferentes especies incluyendo los bovinos.

Por otro lado, en la indagación del elemento disparador del inicio de la pubertad, los estudios en ratones sugieren que la expansión de la población neuronal que sintetizan kisspeptina en el RP3V durante la pubertad, es impulsado por el aumento en las concentraciones de estradiol procedente del ovario (Clarkson y Herbison, 2009; Clarkson *et al.*, 2010), lo cual parecería contra intuitivo ya que como se ha intuido, la kisspeptina es el principal estimulador del tándem hipotálamo-hipófisis-gónada. Con base en los resultados de un estudio reciente desarrollado con hembras y machos ovinos pre y puberales (Nestor *et al.*, 2012), se deduce para tal fin una secuencia de eventos que inicia con una disminución en la inhibición esteroideogénica del tono kisspeptinérgico de las neuronas KNDy, dirigido a neuronas GnRH hipofisiotróficas, lo cual resulta en un aumento en la frecuencia de secreción pulsátil de GnRH/LH, a través del cual se estimula la maduración funcional final de folículos potencialmente ovulatorios con producción de más estrógenos y estos estrógenos, a su vez, aumentan el tono kisspeptinérgico del grupo RP3V que promueve la secreción preovulatoria de GnRH/LH. Se desconoce en bovinos cual o cuales de los componente neuroanatómicos kisspeptinérgicos participan en los mecanismo de retroalimentación de los esteroides gonadales. Se ha establecido que la transición puberal en ratones sucede con un cambio en la plasticidad de las neuronas kisspeptinérgicas, es decir que hay un incremento en el número de contactos sinápticos entre las neuronas kisspeptinérgica y las GnRHergicas, habiendo sido esto asociado con un aumento en las concentraciones séricas de estradiol (Clarkson y Herbison, 2006; Clarkson *et al.*, 2009b); sin embargo, los detalles del mecanismo que determina dicho fenómeno distan mucho de haberse entendido, y en bovinos se ignora la mayor parte.

### **Regulación de la kisspeptina por leptina e IGF-I**

La mayoría de las evidencias indican que la leptina ejerce un papel crucial como agente modulador de la actividad del eje reproductivo (Cunningham *et al.*, 1999;

Zieba *et al.*, 2004). Sin embargo, el reconocimiento del modo de acción indirecta de la leptina sobre las neuronas GnRHérgicas (Quennell *et al.*, 2009), ha dado lugar a las preguntas de cuáles son las estructuras blanco primarias y las rutas a través de las cuales se efectúan los efectos de la leptina en el control hipotalámico de la reproducción. La literatura apoya los siguientes modos potenciales de acción: **1)** Acciones directas de la leptina sobre las neuronas kisspeptinérgicas (Smith *et al.*, 2006; Backholer *et al.*, 2010), las cuales a su vez se contactan físicamente con las neuronas GnRHérgicas (Smith *et al.*, 2007b; 2011); **2)** Acciones indirectas de la leptina sobre neuronas aferentes que se contactan físicamente con las neuronas que sintetizan kisspeptina (Backholer *et al.*, 2010; Amstalden *et al.*, 2011); y/o **3)** Acciones de la leptina sobre núcleos hipotalámicos o extra-hipotalámicos que carecen de neuronas kisspeptinérgicas, como el núcleo premamilar (**PM**; Donato *et al.*, 2011; Tena-Sempere, 2012). Los resultados recientes generados en roedores permiten sugerir que el núcleo PM medía los efectos de la leptina como factor permisivo para el inicio de la pubertad y la coordinada secreción de LH durante condiciones de balance de energía negativo (Donato y Elias, 2011; Tena-Sempere, 2012). Sin embargo, se requiere determinar si el mecanismo de regulación puberal independiente de kisspeptina evocado por leptina, es conservado entre especies. Las evidencias en ovinos apoyan una regulación directa de la leptina en las neuronas kisspeptinérgicas del ARC y POA, así como interacciones recíprocas de éstas con neuronas productoras de NPY y POMC (Backholer *et al.*, 2010). En bovinos no se ha explorado este componente fisiológico pero resultados recientes en becerras alimentadas para obtener elevadas tasas de crecimiento, presentaron una menor interacción física de neuronas que sintetiza NPY con neuronas GnRHérgicas en la proximidad de la pubertad, en comparación con becerras con una menor tasa de crecimiento (Amstalden *et al.*, 2011), consecuentemente una acción indirecta de la leptina sobre neuronas aferentes que se proyectan sobre las neuronas que sintetizan kisspeptina es un probable mecanismo de regulación negativa a través del NPY en bovinos.

Con relación a IGF-I, las evidencias generadas en roedores indican que este factor actúa centralmente para estimular la secreción de GnRH (Hiney *et al.* 1996; Daftary y

Gore, 2005; Divall *et al.* 2010); recientemente se observó que el IGF-I también estimula la secreción hipotalámica de kisspeptina (Hiney *et al.* 2009) en el inicio de la pubertad, pero se desconoce si dicha regulación es directa o indirecta sobre las neuronas kisspeptinérgicas. En un nivel descendente, el IGF-I podría influir en la secreción de hormonas hipofisiarias en respuesta a kisspeptina o GnRH inducida por kisspeptina, ya que recientemente Alamilla (2013) observó que una inyección intravenosa de Kiss-10 induce un aumento en la secreción de LH, FSH y GH en becerras de 4, 7 y 11 meses de edad (**Figura 7**), con una asociación positiva entre la variación de esas respuestas y las concentraciones séricas de IGF-I. Estas observaciones permiten proponer por un lado a la kisspeptina como pivote entre los ejes somatotrópico y gonadotrópico durante el fenómeno de la pubertad y por otro, sugerir un mecanismo adicional de control de inicio de la pubertad evocado por kisspeptina. Lo anterior es sustentado en la revisión efectuada por Velazquez *et al.* (2008), donde se discuten varias líneas de investigación que apoyan el efecto positivo del IGF-I en el inicio de la pubertad. Por tanto el IGF-I ha sido propuesto como otro agente señalizador de la madurez somática requerida para que se disparen los mecanismos determinantes de la pubertad. Es evidente que el tono del eje somatotrópico es un elemento que dirige la velocidad de crecimiento, la composición corporal durante la etapa previa a la pubertad, y el inicio de la pubertad misma (Castellano *et al.*, 2010). Al respecto, se han generado evidencias en ratas pre-púberes de que una dieta excesiva o deficitaria, además de provocar obesidad o delgadez extrema respectivamente, induce un aumento o una disminución en la expresión del mRNA de kisspeptina en el hipotálamo, en comparación con ratas mantenidas con una dieta convencional (Castellano *et al.*, 2011). En el mismo estudio se observó que un bolo de Kiss-10 indujo un aumento de similar magnitud de LH y FSH, independientemente de la dieta y composición corporal de las ratas. Lo anterior es una evidencia más a favor del papel que desempeñan las neuronas kisspeptinérgicas como intérpretes de las señales provenientes de tejidos somáticos y gonadales. No obstante, el citado estudio y otros registrados en la revisión de Castellano *et al.* (2010), usan modelos de animales polarizados (obesos y

caquéticos), mientras que nuestro interés se enfoca en hembras bovinas en las que la tasa de crecimiento se encuentran dentro de rangos de normalidad.

### **Regulación de la kisspeptina por el fotoperiodo**

Se ha reconocido que la melatonina, la cual es un codificador endógeno del fotoperiodo, modula la secreción de GnRH (Malpaux, 2006), pero los mecanismos neurales que dirigen dicha secreción no son conocidos plenamente. Con base en información generada en ovinos se han propuesto varios sistemas de neurotransmisión (Malpaux, 2006; Chemineau *et al.*, 2010; Lehman *et al.*, 2010c; Ebling, 2010; Goodman *et al.*, 2010) para el control estacional de la reproducción y se ha involucrado a la kisspeptina como participante en la transmisión de mensajes del fotoperiodo hacia las neuronas GnRHérgicas (Smith *et al.*, 2007ab; Greives *et al.*, 2007; Smith, 2012; Smith y Clarke, 2010; Goodman *et al.*, 2012).

Las neuronas productoras de kisspeptina carecen de receptores para melatonina, al menos en el ARC de ovinos (Li *et al.*, 2011), sin embargo, estas neuronas cuentan con el receptor dopaminérgico D2-R (Goodman *et al.*, 2012), el cual es responsable de la inhibición de la secreción de LH en borregas en anestro estacional debido a una menor duración en la secreción de melatonina (Goodman *et al.*, 2010). Además, la administración central de un antagonista de kisspeptina bloqueó el incremento de la frecuencia de pulsos de LH inducidos por la administración sistémica del antagonista de receptor dopaminérgico D2-R (Goodman *et al.*, 2012) por lo que kisspeptina podría estar siendo inhibida por la dopamina durante el anestro estacional.

Por otro lado, es conocido que en el anestro estacional la secreción de GnRH es inhibida por un marcado efecto de retroalimentación negativa de los estrógenos ováricos (Malpaux, 2006), mismos que inducen un aumento en la actividad de las neuronas dopaminérgicas de núcleo A15 del hipotálamo retroquiasmático (Gallegos-Sánchez *et al.* 1997). A diferencia de éstas neuronas (Goodman *et al.*, 2010), las de kisspeptina sí cuentan con el receptor alfa de estradiol (Franceschini *et al.*, 2006) por lo tanto dicho efecto considera al menos un mecanismo de aferencia neuronal en el

núcleo A15 por neuronas GABAérgicas (Bogusz *et al.*, 2008) y a través del sistema kisspeptinérgico directamente, como se discutió antes.

Independientemente del estradiol, el fotoperiodo, vía la melatonina, modula la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (paso limitante para producir dopamina) en terminales nerviosas dopaminérgicas en la eminencia media de la borrega (Malpaux, 2006). Por tanto, un mecanismo potencial regulador de esta indolamina sobre las neuronas GnRHérgicas es a través de la inhibición de la dopamina en las terminales nerviosas dopaminérgicas de la eminencia media. En un estudio reciente se informó que en ratas cíclicas los contactos axonales de neuronas GnRHérgicas y dopaminérgica de ese lugar son menores que los contactos axonales de neuronas GnRHérgicas y kisspeptinérgicas (Clarkson y Herbison, 2010). Por tanto, este mecanismo podría ser un componente clave de inicio en la disminución de la inhibición de la retroalimentación de los esteroides ováricos durante la transición puberal estimulado por melatonina en la secreción de GnRH.

### **Kisspeptina-GPR54: mecanismos potenciales de inicio de la pubertad**

Un gran número de ensayos clínicos y experimentales permiten proponer a la kisspeptina como un componente neural esencial para el inicio de la pubertad. Lo anterior fue sugerido inicialmente por el hallazgo de ausencia de la pubertad en humanos y ratones con inactivación genética del receptor GPR54 (de Roux *et al.* 2003; Seminara *et al.* 2003) y apoyado por el reporte más reciente de falta de pubertad en ratones hembras y machos con mutaciones del gen *Kiss1* (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007). Durante la maduración puberal, el sistema kisspeptinérgico es sometido a un patrón complejo de activación, que parece incluir:

- 1) Incremento del tono endógeno de kisspeptina en torno a la pubertad (Guerriero *et al.*, 2012a), reflejado por un aumento de la expresión del gen *Kiss1* en determinados núcleos del hipotálamo, lo cual ha sido demostrado en los ratones (Han *et al.*, 2005), ratas (Sun *et al.*, 2007), primates (Keen *et al.*, 2008; Shahab *et al.*, 2005) y borregas (Redmond *et al.*, 2011b; Nestor *et al.*, 2012). En los roedores, dicho incremento se presenta en el núcleo AVPV, pero

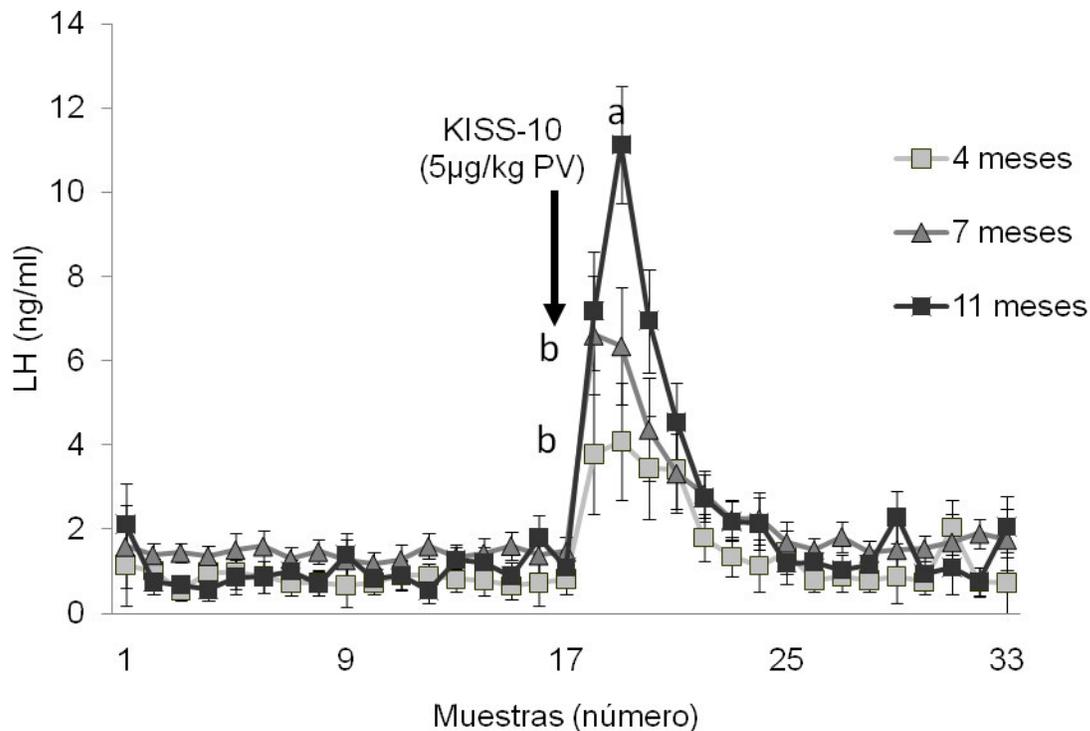
no en el ARC. Durante la pubertad de las monas Rhesus, la secreción pulsátil de kisspeptina aumentó en la EM hasta alcanzar un pulso por hora, misma que estuvo en estrecha asociación positiva (75 %) con la secreción pulsátil de la GnRH (Keen *et al.*, 2008).

- 2) Aumento en el número de receptores GPR54 ó mayor eficiencia en la señalización intracelular en las neuronas GnRHérgicas, lo cual posibilita una sensibilidad mayor del sistema GnRH a las acciones estimuladoras de la kisspeptina. En ratones se demostró que el número de neuronas GnRHérgicas despolarizadas en respuesta a un bolo de kisspeptina se incrementa conforme progresa el desarrollo puberal (Han *et al.*, 2005); por otro lado, se demostró que en ratas hembras (Navarro *et al.*, 2004b) y monas Rhesus (Shahab *et al.*, 2005), el número de neuronas con GPR54 en su membrana celular es mayor en adultos que en animales pre-púberes.
- 3) Cambios plásticos que aparentemente favorecen un incremento de los contactos sinápticos entre neuronas kisspeptinérgicas y neuronas GnRHérgicas en el transcurso de la pubertad. El acercamiento entre las neuronas que producen kisspeptina con las neuronas que producen GnRH en la EM ha sido demostrado en monos Rhesus (Ramaswami *et al.*, 2008), ratas (Uenoyama *et al.*, 2011) y borregas (Smith *et al.*, 2007b; 2011) adultos.

Se desconoce si en bovinos estos sistemas de regulación operan durante la transición puberal, pero las evidencias de que la kisspeptina exógena estimula la liberación de LH, FSH y GH en becerras pre-púberes (Kadokawa *et al.*, 2008; Ezzat *et al.*, 2009; Alamilla, 2013), posicionan al sistema kisspeptinérgico en un papel relevante en la activación puberal del eje reproductivo de los bovinos. En estudios efectuados en hembras bovinas pre-púberes, sólo se ha evaluado una dosis de Kiss-10 en forma de una aplicación intravenosa (IV): 5 µg/kg de peso vivo (PV), con becerras de 7 (Kadokawa *et al.*, 2008), 5 a 6 (Ezzat *et al.*, 2009) y de 4, 7 y 11 (Alamilla, 2013) meses de edad, con resultados que coincidieron en cuanto a un aumento en la liberación de gonadotropinas hipofisiárias, pero discreparon en cuanto al efecto liberador de kisspeptina sobre GH. Aunque menos consistente que en el eje

reproductivo, la kisspeptina parece intervenir en la actividad del eje somatotrópico, ya que bajo algunas condiciones experimentales la administración de Kiss-10 estimuló la liberación de GH en becerras pre-púberes (Kadokawa *et al.*, 2008) y vacas lecheras (Whitlock *et al.*, 2008). El interés por estudiar al eje somatotrópico asociado a trabajos referentes al eje gonadal, es porque en humanos, monos rhesus y roedores se ha establecido una interacción compleja entre ambos ejes que cambia a través de las etapas de desarrollo corporal (Veldhuis *et al.*, 2006).

Recientemente se determinó (Alamilla, 2013; **Figura 7**) que una aplicación IV de 5 µg de Kiss-10/kg de peso en becerras pre-púberes de distintas edades indujo un aumento de LH, FSH y GH en el 100% de las becerras de 11 meses de edad, y de LH en el 100 % de las de 4 y 7 meses de edad; no obstante solo una proporción de las de 4 y 7 meses respondieron con aumentos de FSH y GH a Kiss-10. En el mismo estudio se determinó que las becerras de 11 meses, mismas que también mostraron la mayor respuesta de LH a Kiss-10 (**Figura 7**), tuvieron concentraciones significativamente mayores de IGF-I y estradiol y menores de leptina que las becerras de menor edad. En ratas y primates se observó que la respuesta de GnRH (Castellano *et al.*, 2006; Guerriero *et al.*, 2012b) y de LH (Castellano *et al.*, 2006) a un tratamiento de Kiss-10 cambian según la etapa de desarrollo corporal de los animales. En un estudio realizado en ratas de 5, 15 y 25 días de edad, se observó que la restricción alimenticia inhibió la expresión hipotalámica de kisspeptina y de su receptor en hembras de 5 y 25 días de edad pero no en las de 15 (Iwasa *et al.*, 2010). En otro trabajo, la restricción alimenticia a ratas de 30 días (peri-puberales) inhibió la expresión hipotalámica del RNA mensajero de kisspeptina y en cambio estimuló la expresión hipotalámica del RNA mensajero del receptor GPR54 (Castellano *et al.*, 2005); por lo que la sensibilidad del sistema kisspeptinérgico a los cambios nutricionales cambia a través del desarrollo de los individuos. En el estudio de Iwasa *et al.* (2010) se reportó una asociación positiva entre el grado de expresión del receptor GPR54 con la concentración sanguínea de leptina; consecuentemente se propone que IGF-I y leptina podrían ser agentes endógenos que modifican los efectos de la kisspeptina en la actividad de los ejes gonadotrópico y somatotrópico.



**Figura 7.** Respuesta de LH a un bolo intravenoso de 5 µg de kisspeptina-10 (KiSS-10)/kg de peso en becerras pre-púberes de 4, 7 y 11 meses de edad. La flecha indica el momento de la administración de KiSS-10 (Alamilla, 2013).

Hasta donde la literatura revisada nos permite afirmar, se desconoce en becerras pre-púberes si una dosis mayor de Kiss-10 a la hasta ahora empleada (5 µg/kg de peso) induce una mayor liberación de LH, FSH y GH, como se ha demostrado para LH en borregas (Wang *et al.*, 2012) y cerdas (Lents *et al.*, 2008) pre-púberes; así mismo se desconoce si un tratamiento crónico de Kiss-10, administrado ya sea en forma de pulso o infusión continua, induce la ovulación en hembras bovinas pre-púberes, como se ha documentado en ratas peri-puberales (Navarro *et al.*, 2004a; Castellano *et al.*, 2005; Roa *et al.*, 2008b), ratas adultas (Roa *et al.*, 2008b), corderas peri-puberales (Redmond *et al.*, 2011a) y borregas en anestro estacional (Caraty *et al.*, 2007; Sébert *et al.*, 2010). Sin embargo, es importante hacer notar que las aplicaciones crónicas intravenosas de kisspeptina en roedores y primates inicialmente estimulan la liberación de LH, pero después de 3 a 4 horas de la estimulación este incremento empieza a declinar llegando a niveles similares al de los pulsos espontáneos de animales testigo, lo cual ha sido atribuido a la

desensibilización del receptor GPR54 (Seminara *et al.*, 2006; Roa *et al.*, 2008b; d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2008; Ramaswamy *et al.*, 2007), por lo que es conveniente considerar si la dosis hasta ahora usada en becerras pre-púberes es demasiado elevada como para provocar la desensibilización del eje gonadotrópico cuando se administra en forma de inyecciones repetidas o infusión continua.

De acuerdo a lo antes descrito, es pertinente enfatizar que en becerras pre-púberes la actividad del eje gonadotrópico está inhibida por la acción negativa que ejercen los estrógenos ováricos en la secreción de GnRH y gonadotropinas hipofisiarias. Durante la transición puberal, la inhibición esteroidogénica se debilita posiblemente por un incremento en señales metabólicas asociadas con el desarrollo corporal, de las cuales destacan IGF-I y leptina. Estas hormonas actúan a través de intermediarios neuronales, siendo la kisspeptina un componente potencialmente involucrado. Un mecanismo relevante de activación puberal es el cambio en la sensibilidad de los ejes neuroendocrinos reproductivo y somático a las acciones estimuladoras de la kisspeptina, misma sensibilidad que puede estar determinada por las concentraciones sanguíneas de IGF-I y leptina. En un estudio previo se informó que en becerras pre-púberes, un bolo intravenoso de Kiss-10 induce un incremento de LH y FSH, siendo la respuesta de LH a Kiss-10 mayor en las becerras cercanas a la pubertad comparada con las de menor edad. Por otro lado, algunas evidencias indican que la kisspeptina pudiera regular la actividad de eje somatotrópico ya que bajo algunas condiciones experimentales la kisspeptina exógena indujo la secreción de GH, pero la escueta información disponible no nos permite determinar si IGF-I y leptina modulan la respuesta de GH a kisspeptina. A la fecha, se desconoce en becerras pre-púberes si la actividad de los ejes gonadotrópico y somatotrópico es sensible a dosis mayores o menores de kisspeptina a la hasta ahora usada (5 µg/kg de peso) y si dicha sensibilidad está determinada por el IGF-I y leptina. Por otro lado, se desconocen también los efectos de Kiss-10 administrada en forma repetida o de infusión continua sobre la secreción de LH y la inducción de la ovulación. En borregas adultas, dichos tratamientos inducen la formación de cuerpos lúteos en más del 60 % de ellas. En ratas y borregas, la infusión de dosis altas de Kiss-10 inhiben la secreción de LH, por lo que

es conveniente identificar en becerras pre-púberes una dosis que en un protocolo de infusión continua induzca incrementos de LH y ovulación.

### **III. HIPÓTESIS**

1. La sensibilidad de los ejes gonadotrópico y somatotrópico en respuesta a kisspeptina-10 es modulada por las concentraciones sanguíneas de IGF-I y leptina.
2. La administración repetida de kisspeptina-10 induce incrementos de LH y provoca la ovulación en becerras pre-púberes, lo cual está asociado con los niveles sanguíneos de IGF-I y leptina.
3. La infusión continua de dosis bajas de kisspeptina-10 induce incrementos de LH y la ovulación.
4. La infusión continua de una dosis alta de kisspeptina-10 induce desensibilización del eje gonadotrópico a nivel hipotalámico.

#### IV. OBJETIVOS

**Objetivo general:** Determinar la participación de la kisspeptina en el inicio de la pubertad en becerras.

**Objetivo específico 1:** Evaluar la respuesta de LH, FSH y GH a dos dosis de kisspeptina-10 y su asociación con los niveles sanguíneos de leptina e IGF-I.

**Objetivo específico 2:** Evaluar el efecto de la kisspeptina-10, administrada repetidamente, sobre la liberación de LH y la actividad ovárica; asimismo, determinar la asociación del IGF-I y leptina séricos con dichos efectos.

**Objetivo específico 3:** Identificar una dosis de kisspeptina-10 capaz de inducir incrementos similares o crecientes de LH en aplicaciones sucesivas.

**Objetivo específico 4:** Determinar el efecto de la infusión continua de kisspeptina-10 en la liberación de LH y la ovulación.

**Objetivo específico 5:** Determinar el sitio de desensibilización del eje gonadotrópico a un tratamiento de infusión continuo de kisspeptina-10.

## **Capítulo V**

### **RESPUESTA DE LH, FSH Y GH A KISSPEPTINA-10 Y SU ASOCIACIÓN CON IGF-I Y LEPTINA SÉRICOS EN BECERRAS PRE-PÚBERES**

## **Respuesta de LH, FSH y GH a kisspeptina-10 y su asociación con IGF-I y leptina séricos en becerras pre-púberes**

### **Resumen**

En hembras bovinas, la pubertad está asociada con el desarrollo corporal y es precedida por un aumento en las concentraciones de IGF-I y leptina. En becerras pre-púberes, un bolo intravenoso (i.v.) de 5 µg de kisspeptina-10/kg induce un incremento de los niveles circulantes LH y FSH pero la respuesta sobre la liberación de GH es inconsistente. La hipótesis del presente estudio es que la liberación de LH, FSH y GH es determinada por la dosis de kisspeptina-10 y que las concentraciones endógenas de IGF-I y leptina alteran la liberación de dichas hormonas en respuesta a kisspeptina-10. Se usaron 20 becerras de 100 a 230 kg de peso y 7 a 11 meses de edad las cuales recibieron un bolo i.v. de 5 ó 50 µg de kisspeptina-10/kg. Ambos tratamientos indujeron un incremento de LH y FSH, mas no de GH. El área bajo la curva (AUC= unidades arbitrarias) de LH y la duración del incremento de FSH inducidos con la dosis alta de kisspeptina-10 fueron mayores ( $p < 0.05$ ) que con la dosis baja ( $510 \pm 40$  vs  $353 \pm 40$  AUC, y  $109 \pm 10$  vs  $63 \pm 10$  min, respectivamente). La dosis baja de kisspeptina-10 en becerras con  $>140$  ng/ml de IGF-I indujo un AUC de LH mayor que en becerras con  $\leq 140$  ng/ml de IGF-I, y la dosis alta indujo un AUC de LH mayor en becerras con  $\leq 140$  ng/ml de IGF-I que la dosis baja y al de las becerras con  $>140$  ng/ml de IGF-I tratadas con cualquiera de las dosis de kisspeptina-10. La magnitud del incremento de FSH inducido por kisspeptina-10 y las concentraciones de GH pos kisspeptina-10 no fueron alteradas por las concentraciones de IGF-I ( $p > 0.05$ ). De igual manera, las concentraciones de leptina no determinaron ( $p > 0.05$ ) la magnitud del incremento de LH y FSH inducidas por kisspeptina-10 ó las concentraciones de GH pos kisspeptina-10. En conclusión, la GH no respondió a ninguna dosis de kisspeptina-10. La FSH y la LH fueron sensibles al aumento de dosis de kisspeptina-10, y la magnitud de la respuesta de LH a kisspeptina-10 fue determinada por las concentraciones endógenas de IGF-I, pero no de leptina.

Palabras clave: kisspeptina-10, becerras pre-púberes, IGF-I, leptina, LH, FSH, GH.

## Introducción

La kisspeptina corresponde a una familia de cuatro neuropeptidos (kisspeptina-54, -14, -13 y -10) codificados por el gen *Kiss1* (Oakley *et al.*, 2009). El receptor que medía las acciones de las kisspeptinas es asociado a proteínas G (Gq/11) y denominado GPR54 ó Kiss1r (Oakley *et al.*, 2009). El sistema en mención está involucrado en el inicio de la pubertad en roedores y primates (Oakley *et al.*, 2009). En becerras pre-púberes, un bolo intravenoso (i.v.) de 5 µg de kisspeptina-10/kg de peso corporal induce la liberación de las hormonas luteinizante (LH; Kadokawa *et al.*, 2008a; Ezzat *et al.*, 2009) y folículoestimulante (FSH; Ezzat *et al.*, 2009), lo cual permitió sugerir que la kisspeptina-10 actúa en las neuronas productoras de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo (Messenger *et al.*, 2005; Arreguin-Arevalo *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008).

En las hembras bovinas, la edad a la pubertad está estrechamente asociada con el peso (Jones *et al.*, 1991; Endecott *et al.*, 2013) y composición corporal (Archbold *et al.*, 2012); sin embargo, las concentraciones sanguínea de metabolitos y hormonas relacionadas con estas variables presentan interacciones complejas (Jones *et al.*, 1991; Yelich *et al.*, 1996; Velazquez *et al.*, 2008) y no está del todo claro que señales de origen metabólico dirigen el inicio de la pubertad. El factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I; Yelich *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2002) y la leptina (Garcia *et al.*, 2002) se incrementan en sangre periférica antes de la pubertad, pero lo hacen de manera distinta con relación al inicio de la misma (Velazquez *et al.*, 2008; García *et al.*, 2002). Aparentemente, las concentraciones circulantes de IGF-I (Velazquez *et al.*, 2008) aumentan antes que las de leptina (Garcia *et al.*, 2002) y el incremento del primero está relacionado con la etapa de crecimiento acelerado de los animales (Yelich *et al.*, 1996), mientras que el aumento de la segunda se asocia con el grado de adiposidad (León *et al.*, 2004).

Tanto el IGF-I (Zulu *et al.*, 2002) como la leptina (Zieba *et al.*, 2005; Wylie, 2010) señalizan el estado nutricional de los individuos y ejercen varias funciones en la actividad reproductiva. Un mecanismo potencialmente involucrado en la activación puberal del eje gonadotrópico que se observa al inicio de la pubertad de las hembras,

es un cambio en la sensibilidad de los ejes neuroendocrinos reproductivo y somático a las acciones estimuladoras de la kisspeptina, fenómeno que puede ser modulado por IGF-I y leptina. Algunas evidencias que coinciden con esta idea son: en ratas y monos Rhesus hembras se observó que la magnitud de la respuesta de GnRH (Castellano *et al.*, 2006; Guerriero *et al.*, 2012a) y de LH (Castellano *et al.*, 2006) a un tratamiento de kisspeptina-10 cambia según la etapa de desarrollo corporal de los animales. Por otro lado, en ratas hembras de 25 días de edad se detectó una asociación positiva entre el grado de expresión del receptor de kisspeptina con la concentración sanguínea de leptina (Iwasa *et al.*, 2010); consecuentemente se propone que IGF-I y leptina podrían ser agentes endógenos que modifican los efectos de la kisspeptina en la actividad de los ejes gonadotrópico y somatotrópico.

Las evidencias indican que los animales pre-púberes son menos sensibles, en términos de liberación de LH (Han *et al.*, 2005; Castellano *et al.*, 2006), FSH (Alamilla, 2013) y GH (Alamilla, 2013) al tratamiento de kisspeptina-10, comparado con animales adultos o más próximos a la pubertad. En un estudio previo con becerras pre-púberes de 4, 7 y 11 meses de edad, se observó que a diferencia de las de 4 y 7 meses, todas las becerras de 11 meses de edad presentaron un incremento de LH, FSH y GH en respuesta aun bolo i.v. de 5 µg de kisspeptina-10/kg de peso (Alamilla, 2013); además, en estas becerras la magnitud de la respuesta de LH a kisspeptina-10 y la concentración sanguínea de IGF-I pre-tratamiento fueron mayores que en las becerras de menor edad.

Con relación a las dosis usadas, a la fecha sólo se ha evaluado una dosis de kisspeptina-10 en becerras pre-púberes (5 µg/kg en forma de bolo i.v.; Kadokawa, *et al.*, 2008a; Ezzat *et al.*, 2009; Alamilla, 2013) con resultados consistentes en la liberación de las gonadotropinas hipofisarias y resultados discrepantes en la liberación de la GH. En cerdas pre-púberes (Lents *et al.*, 2008) se han empleado dosis mayores a la hasta ahora usada en becerras, y los resultados indicaron que la respuesta de LH, mas no la de FSH y GH, aumenta al incrementar la dosis de kisspeptina-10. De igual manera, en roedores pre-púberes fue necesario incrementar significativamente la dosis de kisspeptina-10 para obtener una respuesta de LH

similar a la de los adultos (Han *et al.*, 2005; Castellano *et al.*, 2006). Por lo tanto, la hipótesis del presente estudio es que la magnitud de la respuesta de LH, FSH y GH a la kisspeptina-10 exógena es determinada por la dosis de ésta y que la calidad de dicha respuesta es alterada por las concentraciones endógenas de IGF-I y leptina.

## **Materiales y métodos**

Los procedimientos aplicados en el presente estudio fueron aprobados por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (Programa de Posgrado, FMVZ, UNAM). El sitio experimental (Las Margaritas, Hueytamalco, Puebla, México), está ubicado a 19° 51' 03" N y 97° 12' 48" O, a una altitud de 500 msnm.

### ***Tratamientos***

Se utilizaron 20 becerras pre-púberes, Suizo Pardo o Holstein por Cebú, de 100 a 232 kg de peso corporal y de 7 a 11 meses de edad. Las becerras fueron estratificadas por edad y peso, y con base en esos criterios fueron asignadas aleatoriamente para recibir un bolo i.v. de 5 (n=10) ó 50 (n=10) µg de kisspeptina-10 por kg de peso (3.75 ó 37.50 nmol/kg de peso). En el presente estudio se usó kisspeptina-10 bovina (YNWNSFGLRY-NH<sub>2</sub>; Proimmune, Oxford, UK) diluida en solución salina fisiológica (1:125) y administrada i.v. a través de un catéter (Sonda Kortex calibre 5 FR y longitud 90 cm; K-733, Trokar S.A de C.V) insertado en una de las venas yugulares. Antes de cateterizar, la zona periyugular fue rasurada y se aplicó analgesia en un área de 5x5 cm (lidocaína al 2%, 2 mg/cm<sup>2</sup>). Este mismo catéter fue utilizado para el muestreo sanguíneo que se describe posteriormente.

### ***Manejo general y registro de medidas corporales***

Las becerras fueron alojadas individualmente en corrales de 2.5 x 4.5 m, con piso de cemento, área techada (2.5 x 2.7 m), comederos y bebederos. Para la adaptación al manejo, las becerras fueron enjaquimadas y se introdujeron a los corrales un mes antes del experimento y, durante ese periodo se sometieron a sujeción con reata (2 h al día), cepillado de pelo y acostumbamiento a la presencia de personas. La

alimentación diaria consistió en forraje picado a libertad (heno de Avena; 95 % MS, 6.5 % PC y 2.42 Mcal de EM/kg), 4 kg de alimento concentrado (93.8 % MS, 16.53 % PC y 2.43 Mcal de EM/kg) y sales minerales y agua a libertad.

El peso corporal (PC) de los animales se registró a su llegada a los corrales de experimentación y cada siete días hasta el día de la administración de kisspeptina-10; a partir de estos registros se determinó la ganancia diaria de peso (GDP) promedio pre-tratamiento. El día de la administración de kisspeptina-10, además del PC, a cada becerro se le determinó la condición corporal (CC; escala de 1 a 5 puntos; Wildman *et al.*, 1982), grosor de la grasa dorsal (GD) y profundidad del músculo *Longissimus dorsi* (Mus), medidos entre las costillas 12 y 13, en el costado izquierdo del animal mediante ultrasonografía (Williams, 2002), utilizando un aparato Kaixin 5000 (Xuzhou Kaixin Electronic Instrument Co. Jiangsu, China) y transductor lineal de 3.5 MHz.

### ***Muestreo sanguíneo y medición de hormonas***

Cada tercer día desde dos semanas antes de iniciar el estudio hasta una semana después de la aplicación de kisspeptina-10, se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena coxígea y colección en tubos “vacutainer”. Las muestras fueron procesadas para obtención de suero (refrigeración por 3 h y posterior centrifugación a 1500 xg por 15 min). El suero fue congelado a -20 °C hasta determinar por radioinmunoanálisis (RIA) la concentración de progesterona (P4). La concentración de P4 fue utilizada como confirmación del estado pre-puberal (P4; valores < 1 ng/ml en todas las muestras) de las becerros.

El día de la aplicación de kisspeptina-10, se colectaron muestras sanguíneas cada 15 min, iniciando 6 h antes y finalizando 6 h después de la administración de kisspeptina-10; un muestreo sanguíneo similar de 6 h fue realizado 24 horas después de la administración de kisspeptina-10. La kisspeptina-10 fue administrada inmediatamente después de colectar la muestra de sangre correspondiente al tiempo 0. El suero de estas muestras fue obtenido y almacenado como se indicó anteriormente. En estas muestras se determinó LH, FSH y GH por RIA; y en las tres

muestras previas a la aplicación de kisspeptina-10 (muestras -2, -1 y 0) se determinó leptina e IGF-I mediante RIA. Para leptina e IGF-I, el promedio de estas determinaciones fue usado como la concentración basal.

El RIA para LH se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Niswender *et al* (1969). La hormona utilizada como referencia en la curva patrón fue NIH oLH-S24. Los coeficientes de variación (CV) intra e inter-ensayo fueron 6.22 % y 11.53 % respectivamente, la cantidad mínima detectable fue 33.22 pg/ml. Para FSH (L'Hermite *et al.* 1972), la hormona utilizada como referencia en la curva patrón fue la NIH-oFSH S12. Los CV intra e inter-ensayo fueron 7.13 % y 14.19 % respectivamente, la cantidad mínima detectable fue 35.95 pg/ml. Para GH (Powell y Keisler 1995), la hormona utilizada como referencia fue la AFP11182B. Los CV intra e inter-ensayo fueron 4.8 % y 9.2 % respectivamente, la cantidad mínima detectable fue 0.14 ng/ml. En todos los casos se incluyó una curva estándar por triplicado y las muestras se analizaron por duplicado.

El RIA para IGF-I y P4 fue usando un sistema en fase sólida (IGF-I RIACT® y PROG-CTRIA® de CisBio Bioassay, Sorgues, France), y para leptina un sistema de fase líquida (XL-85K de Linco Research Inc, St. Charles, MO, USA). La sensibilidad y los CV intra-ensayo para IGF-I, P4 y leptina fueron: 16 ng/ml y 5.1 %, 0.15 ng/ml y 8.8 % y 1.00 ng/ml y 3.8 %, respectivamente.

### ***Variables de respuesta y análisis de datos***

Se consideró que ocurrió un incremento de LH, FSH y GH inducido por kisspeptina-10 cuando la concentración hormonal después de la administración de kisspeptina superó en dos o más muestras consecutivas al promedio más dos desviaciones estándar de la concentración hormonal registrada en cada animal a las -2, -1 y 0 h de la aplicación de kisspeptina-10 (concentración basal). Para conocer las diferencias entre tratamientos a través del tiempo (-0.5 a 6 horas con relación a la aplicación de kisspeptina-10) en la concentración sanguínea de LH, FSH y GH se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con mediciones repetidas, usando para ello el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 2002), en cuyo modelo se incluyó la dosis, el

tiempo de muestreo y la interacción dosis x tiempo; en este modelo, el animal fue anidado en el tratamiento y usado como un efecto aleatorizado, mismo que fue el objeto de mediciones repetidas en una estructura de covarianza.

Por otro lado, para conocer las diferencias en la magnitud de la respuesta hormonal inducida por la dosis de kisspeptina-10, se determinó el promedio (Pmed), valor máximo (VMax), amplitud (Amp), área bajo la curva (AUC) y duración (Dur) de las concentraciones hormonales que superaron el umbral descrito. La Amp fue la diferencia entre Vmax y la concentración basal. Para estimar el AUC se usó la regla del trapecio y esta variable se reportó como unidades arbitrarias. Todas las variables fueron sujetas a un análisis de distribución normal (Shapiro-Wilk y métodos gráficos). Las variables que no se aproximaron a la distribución normal ( $p < 0.1$ ) fueron transformadas mediante raíz cuadrada, logaritmo natural o logaritmo base 10, en ese orden de prioridad, para asegurar la normalidad en la distribución de los datos durante el análisis. El análisis de las diferencias en la secreción hormonal, en respuesta al tratamiento, de kisspeptina-10 fue mediante t de student.

Con el propósito de explorar si leptina o IGF-I modulan la respuesta de LH, FSH y GH a kisspeptina-10, los animales experimentales se clasificaron de acuerdo a las concentraciones séricas consideradas basales de leptina o IGF-I, en animales con niveles bajo y alto, tomando como punto intermedio la concentración media para cada hormona. El nivel alto correspondió a concentraciones mayores al promedio general para cada hormona ( $>2.4$  ng/ml y  $>140$  ng/ml para leptina e IGF-I, respectivamente) y el nivel bajo a concentraciones iguales o menores a ese promedio ( $\leq 2.4$  ng/ml y  $\leq 140$  ng/ml para leptina e IGF-I, respectivamente). El análisis fue un ANDEVA con arreglo factorial en cuyo modelo se incluyó el efectos de dosis de kisspeptina-10, nivel sanguíneo de IGF-I o de leptina y la interacción. Adicionalmente, la relación entre la concentración sanguínea de IGF-I y leptina con la respuesta de LH, FSH y GH a kisspeptina-10 fue analizada mediante regresión lineal. Así mismo, la relación entre las medidas corporales (PC, CC, GD, Mus y GDP) con las concentraciones de leptina e IGF-I y la respuesta de LH, FSH y GH a kisspeptina-10 fue analizada mediante regresión lineal.

Durante el periodo previo al tratamiento y un día posterior al mismo, se determinó la concentración media y número de pulsos de LH por seis horas; el criterio para determinar un pulso de LH fue definido previamente (Arreguin-Arevalo y Nett, 2006). Para estos periodos de muestreo se determinó también la concentración media de las hormonas FSH y GH. Para determinar diferencias entre grupos experimentales y periodos de muestreo se realizó un ANDEVA para diseño en parcelas divididas (SAS, 2002). Para el análisis, la variable número de pulsos de LH fue transformada en arco seno.

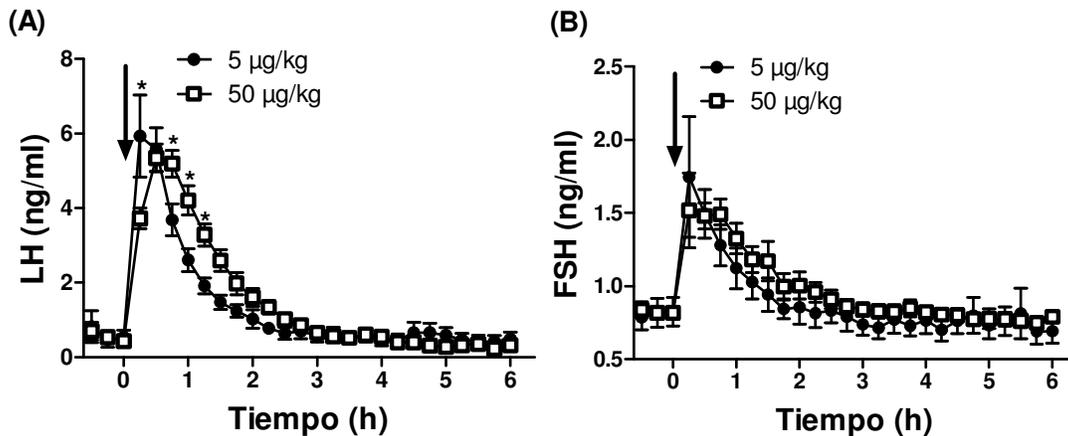
## **Resultados**

Al inicio del estudio, todas las becerras fueron pre-púberes ya que en ninguna de ellas se registró una concentración sanguínea de P4  $\geq$  a 1 ng/ml, y el número de pulsos de LH osciló entre 0 y 2 eventos cada seis horas. Los animales tuvieron una GDP promedio, de su ingreso a los corrales a la aplicación del tratamiento, de  $0.83 \pm 0.15$  kg/día, lo que indica un balance positivo de energía. Ambos grupos experimentales fueron homogéneos ( $p > 0.05$ ) en cuanto a las medidas corporales (PC, CC, GD y Mus), GDP, concentración sanguínea de progesterona, leptina e IGF-I y pulsatilidad de LH (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Media ( $\pm$  error estándar de la media) de la edad, medidas corporales, concentración sérica de leptina e IGF-I y frecuencia pulsátil de LH previa a la administración de 5 ó 50  $\mu$ g de kisspeptina-10/kg de peso corporal (3.75 ó 37.50 nmol/kg) en becerras prepúberes.**

| Variable                                     | Kisspeptina-10      |                      | p=    |
|----------------------------------------------|---------------------|----------------------|-------|
|                                              | 5 $\mu$ g/kg (n=10) | 50 $\mu$ g/kg (n=10) |       |
| Edad, mes                                    | 8.71 $\pm$ 0.34     | 8.80 $\pm$ 0.33      | 0.859 |
| Peso corporal, kg.                           | 164.0 $\pm$ 11.6    | 161.2 $\pm$ 11.39    | 0.865 |
| Condición corporal, punto                    | 3.2 $\pm$ 0.17      | 3.4 $\pm$ 0.17       | 0.409 |
| Grosor de grasa dorsal, mm                   | 2.5 $\pm$ 0.22      | 2.7 $\pm$ 0.26       | 0.604 |
| Profundidad del músculo <i>L. dorsi</i> , mm | 30.3 $\pm$ 2.41     | 28.9 $\pm$ 2.22      | 0.675 |
| Ganancia diaria de peso, kg                  | 0.74 $\pm$ 0.14     | 0.85 $\pm$ 0.16      | 0.379 |
| Leptina, ng/ml                               | 2.56 $\pm$ 0.20     | 2.21 $\pm$ 0.14      | 0.171 |
| IGF-I, ng/ml                                 | 144.3 $\pm$ 19.1    | 136.8 $\pm$ 16.5     | 0.770 |
| Progesterona, ng/ml                          | 0.20 $\pm$ 0.15     | 0.31 $\pm$ 0.15      | 0.709 |
| LH, pulsos/6 h                               | 0.64 $\pm$ 0.19     | 0.73 $\pm$ 0.17      | 0.735 |

Kisspeptina-10 indujo un incremento de LH y FSH, mismo que fue observado a partir de los 15 min pos-tratamiento (Fig. 1). La concentración máxima de LH y FSH se observó a los 30.0 $\pm$ 1.9 y 24.7 $\pm$ 2.5 min respectivamente. Es importante hacer notar que el aumento de LH y FSH inducido por 5 ó 50  $\mu$ g de kisspeptina-10/kg de peso (concentración máxima/concentración basal), fue en promedio de 16.6 y 2.29 veces respectivamente.



**Figura 1.** Media ( $\pm$  error estándar de la media) de los niveles séricos de LH (A) y FSH (B) en respuesta a un bolo intravenoso de 5 ó 50  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg de peso corporal (3.75 ó 37.50 nmol/kg) en becerras pre-púberes. La flecha indica el momento de la aplicación de kisspeptina-10. \*Indica diferencia entre dosis de kisspeptina-10 ( $p < 0.05$ ).

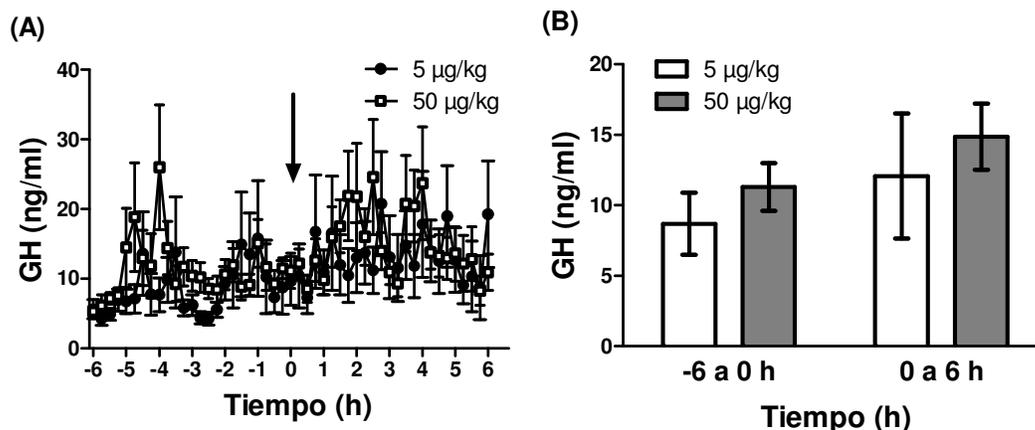
Comparado con la dosis baja, la dosis alta de kisspeptina-10 indujo una mayor liberación de LH ( $p < 0.05$ ), evidenciada por una área bajo la curva (AUC) mayor (Cuadro 2). Así mismo, la duración del incremento de FSH fue mayor ( $p < 0.05$ ) para la dosis de 50  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg (Cuadro 2). El resto de las características del incremento de LH y de FSH inducidos por kisspeptina-10 fueron similares entre dosis ( $p > 0.05$ ).

Kisspeptina-10 no indujo cambios en GH (Fig. 2), por ello el análisis se centró en la concentración media (Fig. 2-B), misma que fue similar ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos, periodos de muestreo (pre tratamiento =  $8.42 \pm 1.4$  ng/ml vs pos tratamiento =  $10.1 \pm 1.7$  ng/ml) o la combinación de ambos.

**Cuadro 2. Características del incremento de LH y FSH inducido por una inyección intravenosa de 5 ó 50 µg de kisspeptina-10/kg de peso corporal (3.75 ó 37.50 nmol/kg) en becerras pre-púberes (media ± error estandar de la media).**

| Variable            | LH                      |                         | FSH                    |                         |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
|                     | 5 µg/kg<br>(n=10)       | 50 µg/kg<br>(n=10)      | 5 µg/kg<br>(n=10)      | 50 µg/kg<br>(n=10)      |
| Basal, ng/ml        | 0.45±0.10               | 0.32±0.10               | 0.78±0.06              | 0.77±0.06               |
| Media, ng/ml        | 2.94±0.23               | 2.87±0.23               | 1.41±0.14              | 1.33±0.14               |
| Valor máximo, ng/ml | 7.22±0.60               | 5.51±0.60               | 1.84±0.33              | 1.75±0.33               |
| Amplitud, ng/ml     | 6.74±0.63               | 5.18±0.63               | 1.59±0.32              | 1.55±0.32               |
| AUC, u. arbitrarias | 352.5±37.8 <sup>a</sup> | 510.5±37.8 <sup>b</sup> | 116.4±26.8             | 159.2±26.8              |
| Duración, min       | 135.0±20.9              | 178.5±20.9              | 63.0±10.5 <sup>a</sup> | 109.5±10.5 <sup>b</sup> |

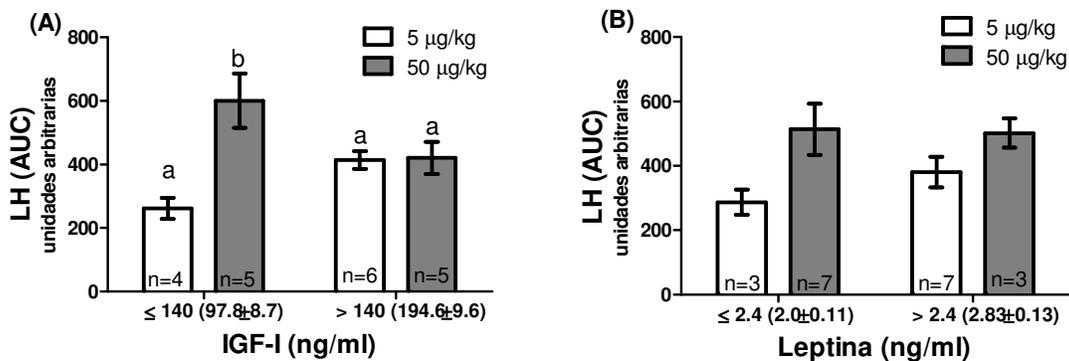
<sup>ab</sup> Literales distintas entre dosis difieren (p<0.05).



**Figura 2. Perfil (A) y concentración media (B) de GH en respuesta a un bolo intravenoso de 5 (n=10) ó 50 (n=10) µg de kisspeptina-10/kg de peso corporal (3.75 ó 37.50 nmol/kg) en becerras pre-púberes (media ± error estándar de la media). La flecha indica el momento de la aplicación de kisspeptina-10. En B, se presenta la concentración promedio de GH del periodo previo (-6 a 0 h) y posterior (0 a 6 h) a la aplicación de kisspeptina-10. La concentración de GH no presentó diferencias entre tratamientos (p=0.45), periodos (p=0.16) o interacción tratamiento por periodo (p=0.87).**

De acuerdo al análisis factorial (dosis, IGF-I o leptina e interacción), se confirmó el marcado efecto de dosis de kisspeptina-10 en el AUC de LH y la duración de FSH. Por otro lado, las variables de LH, FSH y GH no cambiaron en función del nivel sanguíneo de IGF-I ( $p>0.05$ ). Tampoco se detectó un efecto del nivel sanguíneo de leptina en la secreción de LH, FSH y GH en respuesta a kisspeptina-10 ( $p>0.05$ ).

A diferencia de FSH y GH, la magnitud del incremento de LH inducido por 5 ó 50  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg de peso fue modulada por IGF-I. La interacción dosis de kisspeptina-10 por nivel de IGF-I fue significativa para AUC de LH ( $p<0.06$ ; Fig. 3-A). Kisspeptina-10 en dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso indujo un AUC de LH similar en becerras con niveles de IGF-I  $>140$  ng/ml y en becerras con  $\leq 140$  ng/ml. En cambio, la dosis alta de kisspeptina-10 indujo un AUC de LH mayor en becerras con  $\leq 140$  ng/ml de IGF-I que la dosis baja, y que el de las becerras con  $>140$  ng/ml de IGF-I con cualquiera de las dosis de kisspeptina-10. No se detectó interacción de tratamiento por nivel de IGF-I en el resto de las variables de LH y tampoco en las de FSH y GH ( $p>0.05$ ). En este contexto, la interacción leptina por dosis de kisspeptina-10 tampoco afectó ( $p>0.05$ ) las variables de LH, FSH o GH. En la figura 3-B se presenta el AUC de LH inducido por 5 ó 50  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg para cada nivel de leptina.



**Figura 3.** Efecto de 5 ó 50  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg de peso en el área bajo la curva (AUC; media  $\pm$  error estándar de la media) de LH en becerras pre-púberes con concentración baja y alta del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I; A) y leptina (B); en paréntesis la media  $\pm$  error estándar de la media de la concentración sanguínea de IGF-I y leptina. En A se detectó una

interacción significativa ( $p < 0.06$ ) entre dosis de kisspeptina-10 x concentración sanguínea de IGF-I. <sup>ab</sup> Literales distintas indican diferencias ( $p < 0.05$ ).

En coincidencia con la figura 3, IGF-I no se relacionó significativamente con el AUC de LH en respuesta a la dosis baja de kisspeptina-10 ( $p > 0.05$ ) y, en cambio, dicho factor se relacionó negativamente con el AUC de LH en respuesta a la dosis alta de kisspeptina-10 ( $p < 0.05$ ; Fig. 4). Ninguna otra variable de LH y las de FSH y GH se relacionó con la concentración de IGF-I ( $p > 0.05$ ) o leptina ( $p > 0.05$ ).

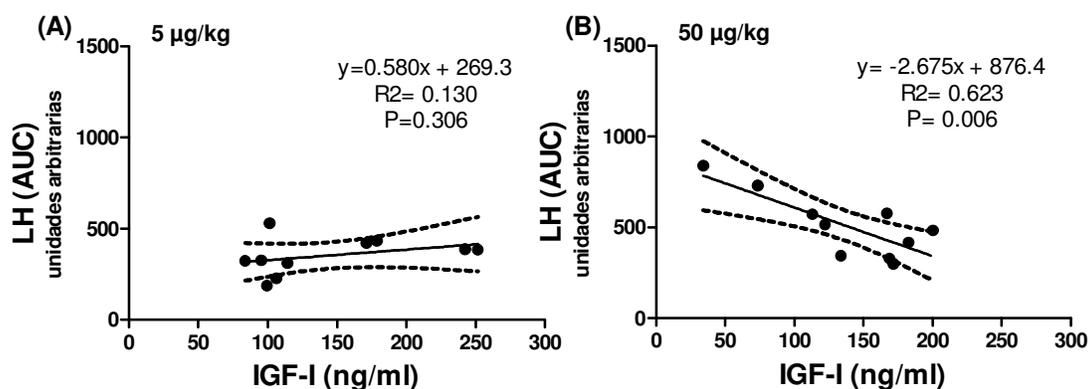


Figura 4. Relación entre la concentración sanguínea del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) y el área bajo la curva (AUC) de LH en respuesta a 5 (A) ó 50 (B) µg de kisspeptina-10/kg de peso en becerras pre-púberes. Los puntos representan valores individuales (n=10), la línea continua corresponde a la línea de regresión y las líneas punteadas corresponden al intervalo de confianza al 95 %.

No se detectó relación significativa entre la edad y las medidas corporales con la secreción de LH, FSH y GH en respuesta a kisspeptina-10 ( $p > 0.05$ ). En cambio, peso corporal se relacionó significativamente ( $p = 0.030$ ) con la concentración sanguínea de IGF-I ( $y = 8.5 + 0.81x$ ;  $R^2 = 0.24$ ) pero no ( $p = 0.236$ ) con la de leptina ( $y = 1.67 + 0.004x$ ;  $R^2 = 0.069$ ; Fig. 5).

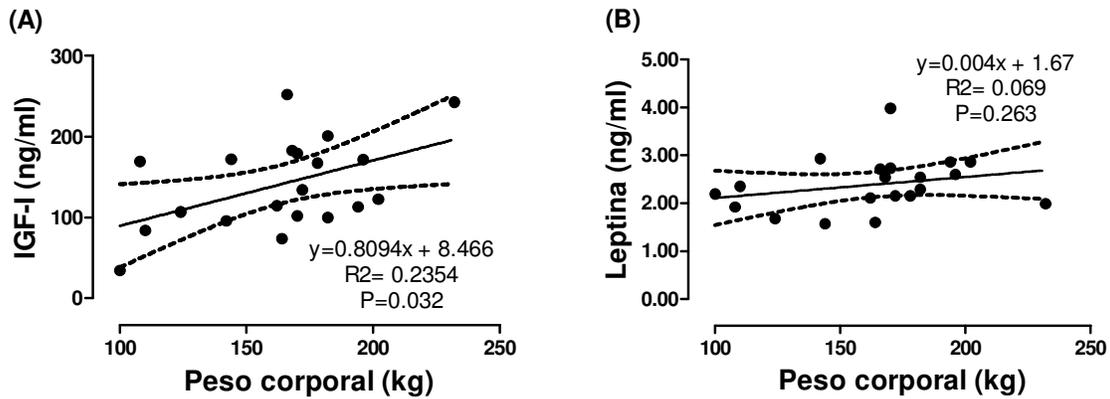


Figura 5. Relación entre el peso corporal y la concentración sanguínea del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I; A) y de leptina (B) en becerras pre-púberes. Los puntos representan valores individuales (n=20), la línea continua corresponde a la línea de regresión y las líneas punteadas corresponden al intervalo de confianza al 95 %.

Poco antes (-6 a 0 h) y un día después del tratamiento con kisspeptina-10 (24 a 30 h), el número de pulsos de LH y la concentración media de LH, FSH y GH fueron similares, independientemente de la dosis de kisspeptina-10 aplicada, como lo fueron también las concentraciones sanguíneas de progesterona (Cuadro 3). En estos periodos de muestreo, no se detectaron diferencias significativas atribuibles a la dosis de kisspeptina-10 ( $p>0.05$ ) o a la interacción de la dosis con el periodo de muestreo ( $p>0.05$ ).

**Cuadro 3. Media ( $\pm$  error estandar de la media) de la frecuencia de pulsos de LH y la concentración media de LH, FSH y GH antes y después del tratamiento de kisspeptina-10 en becerras pre-púberes (n=20).**

| Variable           | Pre kisspeptina-10 | Pos kisspeptina-10 | P=    |
|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
|                    | (-6 a 0 h)         | (24 a 30 h)        |       |
| LH, pulsos/6 h     | 0.68 $\pm$ 0.14    | 0.83 $\pm$ 0.14    | 0.361 |
| LH, ng/ml          | 0.40 $\pm$ 0.07    | 0.34 $\pm$ 0.07    | 0.297 |
| FSH, ng/ml         | 0.77 $\pm$ 0.05    | 0.76 $\pm$ 0.05    | 0.698 |
| GH, ng/ml          | 9.99 $\pm$ 1.39    | 12.84 $\pm$ 1.39   | 0.112 |
| Progesterona,ng/ml | 0.32 $\pm$ 0.15    | 0.35 $\pm$ 0.16    | 0.709 |

## Discusión

El presente estudio muestra que el eje gonadotrópico, pero no el somatotrópico, de las becerras prepúberes es altamente sensible a la kisspeptina exógena y que las becerras con bajas concentraciones sanguíneas de IGF-I liberan más LH al aumentar la dosis de kisspeptina-10 que las becerras con más IGF-I.

En estudios previos desarrollados en hembras bovinas pre-púberes (Kadokawa *et al.*, 2008a; Ezzat *et al.*, 2009) y adultas (Whitlock *et al.*, 2008), la kisspeptina-10 administrada como bolo i.v indujo un incremento de LH (Kadokawa *et al.*, 2008a; Ezzat *et al.*, 2009; Whitlock *et al.*, 2011) y FSH (Ezzat *et al.*, 2009) que inició dentro de los primeros 30 min pos-tratamiento. Independientemente de la dosis, en nuestro estudio la LH y FSH presentaron un aumento significativo en la concentración sanguínea a partir de los 15 min posteriores al tratamiento de kisspeptina-10 por lo que nuevamente se confirma el marcado efecto regulador del neuropéptido en la actividad del eje gonadotrópico de las becerras pre-púberes.

En el presente estudio, el aumento de la dosis de kisspeptina-10 indujo un incremento mayor de LH y de FSH; sin embargo, la LH fue más sensible al aumento de dosis y en esta sensibilidad se vió involucrado al IGF-I. En becerras con bajas concentraciones de IGF-I, la dosis alta de kisspeptina-10 indujo una respuesta de LH mayor que con la dosis baja, pero esta diferencia no se detectó en becerras con altas concentraciones de IGF-I. Lo anterior indica que: a) la kisspeptina-10 es capaz de activar a edades tempranas el sistema GnRH/LH, y b) el IGF-I, mismo que estuvo asociado positivamente con el peso corporal de los animales, modula la magnitud de la respuesta de LH a diferentes dosis de kisspeptina.

Las evidencias indican que la cantidad de receptores para kisspeptina en las neuronas productoras de GnRH se mantiene constante durante el periodo prepuberal y esta cantidad se aumenta durante la transición puberal (Navarro *et al.*, 2004a; Shahab *et al.*, 2005). Por otro lado, se demostró que, comparado con ratones juveniles y pre-púberes, los ratones adultos sexualmente presentaron un número y periodo mayor de neuronas GnRHérgicas despolarizadas en respuesta a kisspeptina-10 (Han *et al.*, 2005) por lo que la magitud de la respuesta de LH a una misma dosis de kisspeptina administrada a animales peripuberales y adultos fue mayor que la administrada durante las fases previas a la maduración sexual (Han *et al.*, 2005; Castellano *et al.*, 2006). Lo anterior indica que durante la transición puberal la sensibilidad del sistema GnRH a kisspeptina es mayor que durante la fase prepuberal. En nuestro estudio, la magnitud de la respuesta de LH a 5 µg de kisspeptina-10/kg de peso no estuvo relacionada con el peso corporal y tampoco se vió afectada por las concentraciones endógenas de IGF-I, lo cual permite sugerir que en estas becerras la sensibilidad de la LH a la dosis baja fue similar; sin embargo, el aumento de la dosis de kisspeptina-10 indujo una mayor liberación de LH sólo en becerras con bajas concentraciones de IGF-I, mismas que podrían corresponder a las becerras con menor desarrollo somático.

Esta observación fue evidente en roedores, en donde una dosis alta de kisspeptina-10 administrada a ratones juveniles indujo una respuesta de LH por encima de la inducida por una dosis similar o menor administrada a ratones adultos (Han *et al.*,

2005). El mecanismo asociado con esta mayor respuesta se desconoce y se ha sugerido que los animales prepúberes son menos sensibles a kisspeptina que los animales puberales requiriendo los primeros más kisspeptina exógena que los segundos para liberar LH en forma similar o mayor en magnitud (Han et al., 2005; Castellano *et al.*, 2006). Considerando la respuesta diferenciada de LH a kisspeptina-10 en becerras con diferentes concentraciones de IGF-I, se sugiere que kisspeptina-10 en dosis alta podría estar superando factores inhibidores a nivel hipotalámico o hipofisiario presentes en becerras prepúberes y con bajas concentraciones de IGF-I.

Con relación al efecto de edad, aspecto asociado con los niveles séricos de IGF-I (Alamilla, 2013), en un estudio con monas Rhesus se informó que la magnitud de la respuesta de GnRH a dos dosis de kisspeptina-10 fue similar en hembras púberes pero la respuesta aumentó con la dosis mayor en hembras pre-púberes (Guerriero *et al.*, 2012a), y en borregas adultas la administración intravenosa de kisspeptina-10 no indujo una respuesta adicional de LH con dosis mayores a 0.65 µg/kg de peso (Caraty *et al.*, 2007). Lo anterior parecería indicar que las neuronas GnRHérgicas de animales adultos alcanzan su límite de capacidad secretora en condiciones de hiperestimulación de kisspeptina; sin embargo es pertinente mencionar que la administración de dosis altas de kisspeptina-10 a ratas adultas en forma de infusión continua desensibiliza el eje reproductivo al inhibir la liberación de LH pero no en ratas pre-púberes (Roa *et al.*, 2008), por lo que ésta correspondería a una mejor posibilidad de la baja respuesta de LH a una dosis alta de kisspeptina-10 en becerras con elevadas concentraciones de IGF-I ya que en la transición puberal el sistema GnRH es capaz de responder a sus estimuladores, lo cual está evidenciado por un aumento en la frecuencia pulsátil de kisspeptina durante la transición puberal, al menos en primates (Keen *et al.*, 2008; Shahab *et al.*, 2005; Guerriero *et al.*, 2012b).

En un estudio previo se informó que las becerras de 11 meses de edad, mismas que mostraron las mayores concentración sanguínea de IGF-I y estradiol, presentaron un incremento de LH inducido por 5 µg de kisspeptina-10/kg de peso cuya concentración máxima fue mayor al de las becerras de 4 y 7 meses y con las menores concentraciones de IGF-I (Alamilla, 2013). En el presente estudio, este

mismo tratamiento indujo una respuesta de LH similar en magnitud independientemente del nivel sanguíneo de IGF-I y del peso de los animales, respuesta que podría estar determinada por los niveles sanguíneos de estradiol reducidos, mismos que son inferidos por la baja pulsatilidad de la LH de las becerras (0.7 pulsos cada seis horas) y los bajos niveles sanguíneos de progesterona (0.32 ng/ml), determinados éstos al momento del tratamiento y al día siguiente del mismo.

Es bien conocido que durante la etapa pre-puberal de las hembras bovinas, los estrógenos ováricos inhiben la secreción de gonadotropinas hipofisarias (Day *et al.*, 1984). Esto puede ocurrir a través de la regulación del hipotálamo, alterando la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH así como por una regulación directa en la hipófisis, alterando la respuesta de los gonadotropos a GnRH (Nett *et al.*, 2002). Es pertinente mencionar que, con base en información generada en ovinos y murinos, se ha establecido que el sistema kisspeptinérgico es un intermediario neural que comunica los efectos negativos y positivos de los esteroides ováricos a las estructuras encargadas de la liberación de GnRH (Smith, 2009); así mismo, que la liberación de LH y FSH en respuesta a kisspeptina-10 es el resultado de una acción sobre las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo (Messenger *et al.*, 2005; Arreguin-Arevalo *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008). Los efectos de kisspeptina en la actividad de las neuronas GnRH parecen ser potencializados por un aumento conjunto en los niveles sanguíneo de estradiol y de IGF-I, como fue sugerido por Alamilla (2013) en becerras prepúberes, lo cual aparentemente no sucedió en nuestro estudio. Lo anterior se basa en que el tratamiento de IGF-I a ratas prepúberes evocó un incremento en la LH sérica cuando las concentraciones endógenas de estradiol fueron superiores a 20 pg/ml pero no cuando éstas fueron menores a dicho valor (Hiney *et al.*, 2004); de igual manera, la incubación de células adenohipofisarias bovinas (Hashizume *et al.*, 2002) y de ratas (Xia *et al.*, 2001) con IGF-I evocó un incremento en la LH al medio de cultivo cuando se adicionó estradiol mas no cuando el IGF-I fue tratamiento único. Por tanto, en becerras cercanas a la pubertad la kisspeptina-10 en dosis de 5 µg/kg de peso podría ser un estímulo suficiente para inducir incrementos de LH de mayor magnitud que el observado en las becerras del presente estudio.

En el estudio que aquí se informa, la variación de la leptina sérica no estuvo asociada con la respuesta de LH, FSH o GH a kisspeptina-10. En cierta manera, dicho fenómeno se esperaba, ya que las evidencias obtenidas en roedores indican que la disminución de leptina, ya sea por restricción alimenticia, inmunoneutralización o en animales con resistencia a leptina, no altera los efectos de kisspeptina-10 en la liberación de LH (Navarro *et al.*, 2004a; Castellano *et al.*, 2005). No obstante, en ratas se detectó una asociación positiva de la concentración de la leptina sérica y el número de receptores GPR54 en neuronas GnRHérgicas en animales de 25 días de edad más no en ratas más jóvenes, (Iwasa *et al.*, 2010) por lo que la leptina podría influir en la respuesta de LH a kisspeptina-10 en edades cercanas a la pubertad, apoyando el concepto de papel permisivo de la leptina durante la etapa de transición puberal (Zieba *et al.*, 2005; Wylie, 2010). En el presente estudio, las concentraciones de leptina promediaron 2.4 ng/ml, valores similares a los reportados para becerras Holstein en estado pre-puberal (2.3 ng/ml; Block *et al.*, 2003). Por tanto, se sugiere que factores adicionales a leptina, mismos que aumentan o disminuyen antes que ella alcance un valor umbral, determinan o contribuyen en el proceso de maduración sexual desde edades tempranas.

En el presente estudio, como en otros efectuados con becerras pre-púberes (Ezzat *et al.*, 2009; Alamilla, 2013), la administración de 5 µg de kisspeptina-10/kg de peso indujo la liberación de FSH. Sin embargo, la secreción de esta gonadotropina no presentó un aumento adicional al incrementar la dosis de kisspeptina-10, lo cual coincide parcialmente con los resultados obtenidos en cerdas pre-púberes (Lents *et al.*, 2008), pero sí indujo una respuesta más duradera. Es importante señalar que el valor máximo de FSH en respuesta a una dosis alta de kisspeptina-10 se mantuvo elevado por más tiempo, comparado con una dosis baja (Fig.1-B), lo cual podría explicar en parte la respuesta más duradera observada con la dosis mayor. Independientemente de ello, los mecanismos de liberación de FSH fueron menos sensibles a kisspeptina-10 que los de LH y no se detectó variación alguna atribuible a alguna de las medidas corporales o concentración sanguínea de IGF-I o leptina. La mayor sensibilidad de la LH se basa en que el grado de incremento entre los valores basales y el valor máximo para cada hormona fue de un poco más de 2 veces para

FSH y de más de 16 veces para LH. Esta diferenciada sensibilidad también fue reportada por otros autores quienes trabajaron con borregas en anestro estacional (Caraty *et al.*, 2007) y con ratas machos pre-púberes (Navarro *et al.*, 2005), por tanto la regulación de kisspeptina-10 en la actividad del eje gonadotrópico parece ser más importante para LH que para FSH. Si bien es cierto que la liberación de FSH es regulada principalmente por GnRH, en el control de la secreción de FSH interviene además del estradiol, inhibina y activina (Padmanabhan y McNeilly, 2001). Por tanto, la presencia de factores inhibidores o la falta de factores estimuladores de FSH podrían estar limitando la liberación de FSH en respuesta a un tratamiento de kisspeptina-10.

Con respecto a GH, los resultados del presente estudio difieren a lo reportado por Kadokawa *et al.* (2008a) y concuerdan con lo reportado por Ezzat *et al.* (2009), ambos estudios con becerras pre-púberes y similar dosis de kisspeptina-10 (5 µg/kg de peso) ya que la GH no presentó un incremento significativo en el periodo posterior al tratamiento, por lo que un bolo i.v. de kisspeptina-10 no reguló la actividad del eje somatotrópico de estas becerras. En el presente estudio, una dosis diez veces mayor de kisspeptina-10 no indujo la liberación de GH, lo cual corresponde a lo reportado por Lents *et al.* (2008) en cuya investigación emplearon cerdas pre-púberes y dosis de kisspeptina-10 incluso mayores. En otros estudios efectuados con cabras en diestro (Hashizume *et al.*, 2010), borregas ovariectomizadas (Whitlock *et al.*, 2010) y vacas secas y lactantes (Whitlock *et al.*, 2011), tampoco se observó que la kisspeptina-10, administrada en forma de un bolo i.v., indujera la liberación de GH. En oposición a lo anterior y en coincidencia con los resultados de Kadokawa *et al.* (2008a), un incremento de GH en respuesta a kisspeptina-10 fue observado cuando el citado neuropéptido fue administrado a vacas ovariectomizadas presensibilizadas con esteroides ováricos (Whitlock *et al.*, 2008), a borregas adultas en anestro estacional (tratamiento prolongado de kisspeptina-10; Sébert *et al.*, 2010) y a becerras pre-púberes con concentraciones elevadas de estradiol (Alamilla, 2013). Lo anterior sugiere que los niveles circulantes de estradiol podrían determinar/modular los efectos de kisspeptina en la liberación de GH. En el presente estudio, la baja pulsatilidad de la LH de las becerras y los bajos niveles sanguíneos de progesterona,

al momento del tratamiento y al día siguiente del mismo, sugiere una limitada actividad ovárica, y en turno, reducidos niveles de estradiol en sangre, razón que podría explicar la falta de respuesta en esta variable. En vacas ovariectomizadas, la kisspeptina-10 no aumenta la respuesta de GH a GHRH (Whitlock *et al.*, 2010) pero varias evidencias derivadas de estudios *in vitro* sugieren una acción de la kisspeptina-10 a nivel hipofisiario en bovinos (Ezzat *et al.*, 2010; Kadokawa *et al.*, 2008b), ratas (Gutiérrez-Pascual *et al.*, 2007) y primates (Luque *et al.*, 2011). Por tanto, es pertinente proponer a los estrógenos ováricos como moduladores, a nivel hipofisiario, de la sensibilidad de los somatotropos a la kisspeptina exógena, lo cual podría estar asociado con la presencia de receptores específicos para dicho neuropéptido, mismos que han sido encontrados en somatotropos provenientes de borregos con ovarios intactos (Smith *et al.*, 2008).

Finalmente, es adecuado puntualizar que la secreción de LH, FSH y GH antes y 24 horas después del tratamiento de kisspeptina-10 fue similar en los animales de ambos tratamientos, lo cual exime a la kisspeptina-10 exógena de un efecto residual a nivel del generador de pulsos de GnRH o de los reguladores hipotalámicos de la GH. Las evidencias generadas en borregos indican que la liberación de LH y FSH en respuesta a kisspeptina-10 es el resultado de una acción sobre las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo (Messenger *et al.*, 2005; Arreguin-Arevalo *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008) y a nivel de las terminaciones nerviosas de esas neuronas en la eminencia media (Anglemont de Tassigny *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2011), por tanto la kisspeptina-10 exógena podría influir en la liberación de GnRH más que en su síntesis.

En conclusión, a diferencia del eje somatotrópico, el eje gonadotrópico es más sensible a la kisspeptina exógena. Además, a diferencia de la FSH, la sensibilidad de los mecanismos de liberación de la LH en respuesta a kisspeptina es mayor al aumentar la dosis de kisspeptina-10 y dicha sensibilidad está inversamente relacionada con los niveles endógenos de IGF-I, lo cual sugiere que las becerras con menor desarrollo somático liberan más LH en respuesta a una dosis mayor de kisspeptina-10. La sensibilidad de la LH a 5 µg de kisspeptina-10/kg no cambio a

través de los rangos de edad, composición corporal y concentración sérica de IGF-I de las becerras del presente estudio, por lo que factores adicionales como estradiol podría potencializar los efectos de kisspeptina-10 en becerras de más edad y al acercarse la pubertad. Leptina no fue un factor limitante en la secreción de LH y FSH inducida por kisspeptina-10 ó en la concentración de GH pos kisspeptina-10, siendo esta un factor potencial de cambio de sensibilidad del eje gonadotrópico a kisspeptina-10 a partir del inicio de la pubertad.

## Referencias

- Alamilla, R.M., 2013. Respuesta de LH, FSH y GH a una aplicación de kisspeptina en becerras prepúberes de diferentes edades y su asociación con las concentraciones circulantes de leptina, IGF-I y estradiol. [tesis maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 105 p.
- Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., 2008. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149(8):3926–3932.
- Archbold, H., Shalloo, L., Kennedy, E., Pierce, K.M., Buckley, F., 2012. Influence of age, body weight and body condition score before mating start date on the pubertal rate of maiden Holstein–Friesian heifers and implications for subsequent cow performance and profitability. *Animal* 6(07):1143-1151
- Arreguin-Arevalo, J.A., Lents, C.A., Farmieri, T.A., Nett, T.M., Clay, C.M., 2007. KiSS-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 10:265-275.
- Block, S.S., Smith, J. M., Ehrhardt, R. A., Diaz, M. C., Rhoads, R. P., Van Amburgh, M. E., Boisclair, Y. R., 2003. Nutritional and developmental regulation of plasma leptin in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86:3206–3214.
- Arreguin-Arevalo, J.A., Nett, T.M., 2006. A non-genomic action of estradiol as the mechanism underlying the acute suppression of secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes. *Biol. Reprod.* 74 (1):202–208.

- Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Said, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148:5258–5267.
- Castellano, J., Navarro, V., Fernandez-Fernandez, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., Vazquez, M., Vigo, E., Casanueva, F., Aguilar, E., 2005. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 146:3917-3925.
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Castaño, J.P., Malagón, M.M., Aguilar, E., Dieguez, C., Magni, P., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2006. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol. Cell. Endo.* 257:75–83.
- Day, M.L., Imakawa, K., Garcia-Winder, G., Zalesky, D.D., Schanbacher, B.D., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1984. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. *B. Reprod.* 31:332-341.
- Endecott, R.L., Funston, R.N. Mulliniks, J.T, Roberts, A.J., 2013. Joint alpha-beef species symposium: Implications of beef heifer development systems and lifetime productivity. *J. Anim. Sci.* 91:1329-1335.
- Ezzat, A.A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Yamashita, T., Hirata, T.I., Sawai, K., Hashizume, T., 2009. Characteristics of the stimulatory effect of Kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *J. Reprod. Dev.* 55:650-654.
- Ezzat, A.A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Goto, Y., Nakajima, Y., Jin, J., Yamashita, T., Sawai, K., Hashizume, T., 2010. The role of sexual steroid hormones in the direct stimulation by Kisspeptin-10 of the secretion of luteinizing

hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin from bovine anterior pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.* 121:267–272.

Garcia, M.R., Amstalden, M., Williams, S.W., Stanko, R.L., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Nizielski, S.E., Williams, G.L., 2002. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J. Anim. Sci.* 80:2158-2167.

Guerriero K.A., Keen, K.L., Millar, R.P., Terasawa, E. 2012a. Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): Implication for the mechanism of puberty. *Endocrinology* 153:825-836.

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

Gutiérrez-Pascual, E., Martínez-Fuentes, A.J., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Malagón, M.M., Castaño, J.P., 2007. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J. Neuroendocrinol.* 19:521–530.

Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Herbison, A.E., 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J. Neurosci.* 25:11349 –11356.

Hashizume, T., Kumahara, A., Fujino, M., Okada K., 2002. Insulin-like growth factor I enhances gonadotropin-releasing hormone stimulated luteinizing hormone release from bovine anterior pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.* 70:13–21.

Hashizume, T., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Ezzat, A.A., Sawai, K., Yamashita, T., 2010. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Anim. Reprod. Sci.* 118:37–41.

- Hiney, J.K., Srivastava, V., Dearth, R.K., Dees, W.I., 2004. Influence of estradiol on insulin-like growth factor-1-induced luteinizing hormone secretion. *Brain Research* 1013:91–97
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Murakami, M., Kinouchi, R., Gereltsetseg, G., Fujisawa, S., Kuwahara, A., Yasui, T., Irahara, I., 2010. Sensitivities of mRNA expression levels of Kiss1 and its receptor, Kiss1r, to nutritional status are changed during the developmental period in female rats. *J. Endocrinol.* 207:195–202.
- Jones, E.J., Armstrong, J.D., Harvey, R.W., 1991. Changes in metabolites, metabolic hormones, and luteinizing hormone before puberty in Angus, Bradford, Charolais and Simmental heifers. *J. Anim. Sci.* 60:1607-1615.
- Kadokawa, H., Matsui, M., Hayashi, K., Matsunaga, N., Kawashima, C., Shimizu, T., Kida, K., Miyamoto, A., 2008a. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *J. Endocrinol.* 196:331-334.
- Kadokawa, H., Suzuki, S., Hashizume, T., 2008b. Kisspeptin-10 stimulates the secretion of growth hormone and prolactin directly from cultured bovine anterior pituitary cells. *Anim. Reprod. Sci.* 105:404–408.
- Keen K.L., F.H. Wegner, S.R. Bloom, M.A. Ghattei, and E. Terasawa. 2008. An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology* 149:4151–4157.
- León, H.V., Hernández-Cerón, J., D.H., Gutierrez, C.G., 2004. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J. Anim. Sci.* 82:445-451.
- L’Hermite, M., Niswender, G.D., Reichert Jr, L.E., Midgley Jr, A.R., 1972. Serum follicle-stimulating hormone in sheep as measured by radioimmunoassay. *Biol. Reprod.* 6, 325–332.

- Lents, C.A., Heidorn, N.L., Barb, C.R., Ford, J.J., 2008. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction* 135:879-887.
- Luque, R.M., Córdoba-Chacón, J., Gahete, M.D., Navarro, V.M., Tena-Sempere, M., Kineman, R.D., Castaño, J.P., 2011. Kisspeptin regulates gonadotroph and somatotroph function in nonhuman primate pituitary via common and distinct signaling mechanisms. *Endocrinology* 152:957–966.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S.A.J.R., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:1761-1766.
- Navarro, V. M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2005. Effects of Kiss-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 146:1689–1697.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sánchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2004a. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of kiss-1 peptide. *Endocrinology* 145:4565–4574.
- Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Castellano, J.M., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M., 2004b. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J. Physiology* 561:379–386.

- Nett, T.M., Turzillo, A.M., Baratta, B., Rispoli, L.A., 2002. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Dom. Anim. Endo.* 23:33–42
- Niswender, G.D., Reichert Jr, L.E., Midgley Jr, A.R., Nalbandov, A.V., 1969. Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. *Endocrinology* 84:1166–1173.
- Oakley, A.E., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endo. Rev.* 30:713-743.
- Roa, J., E. Vigo, D. García–Galiano, J.M. Castellano, J.M. Navarro, R. Pineda, C. Diéguez, E. Aguilar, L. Pinilla, and M. Tena-Sempere. 2008b. Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294:1088-1096.
- Padmanabhan, V., McNeilly, A.S., 2001. Is there an FSH-releasing factor?. *Reproduction* 121:21–30.
- Powell, M., Keisler, D.H., 1995. A potential strategy for decreasing milk production in the ewe at weaning using a growth hormone release blocker. *J. Anim. Sci.* 73:1901–1905.
- SAS., 2002. Statistical Analysis System Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Sébert, M.E., Lomet, D., Ben Saïd, S., Monget, P., Briant, C., Scaramuzzi, R.J., Caraty A., 2010. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol. *Dom. Anim. Endo.* 38:289–298.
- Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., Plan, T.M. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:2129–2134.

- Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Caraty, A., Millar, R.P., Clarke, I.J., 2008. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* 149:1951–1959.
- Smith, J.T., 2009. Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. *Peptides* 30:94–102.
- Smith, J.T., Li, Q., Yap, K.S., Shahab, M., Roseweir, A.K., Millar, R.P., Clarke L.J., 2011. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology* 152:1001–1012.
- Velazquez, M. A., Spicer, L.J., Wathes, D.C., 2008. The role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Dom. Anim. Endo.* 35:325-342.
- Whitlock, B.K., Daniel, J.A., Wilborn, R.R., Maxwell, H.S., Steel, B.P., Sartin, J.L., 2011. Effect of kisspeptin on regulation of growth hormone and luteinizing hormone in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci. Biotech.* 2(3):131-140.
- Whitlock, B.K., Daniel, J.A., Wilborn, R.R., Maxwell, H.S., Steele, B.P., Sartin, J.L., 2010. Interaction of kisspeptin and the somatotrophic axis. *Neuroendocrinology* 92:178-88.
- Whitlock, B.K., Daniel, J.A., Wilborn, R.R., Rodning, S.P., Maxwell, H.S., Steele, B.P., Sartin, J.L. 2008. Interaction of estrogen and progesterone on kisspeptin-10-stimulated luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Neuroendocrinology* 88:212-215.
- Wildman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E., Bowman, R.L., Troutt, H.F., Lesch, T.N., 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495-501.
- Williams, A.R., 2002. Ultrasound applications in beef cattle carcass research and management. *J. Anim. Sci.* 80(Suppl. 2):183–188.

- Wylie, A.R.G., 2010. Leptin in farm animals: where are we and where can we go?. *Animal* 5(2):246-267.
- Xia, X-Y., Weiss, J-M., Polack, S., Diedrich, K., Ortmann, o., 2001. Interactions of insulin-like growth factor-I, insulin and estradiol with GnRH-stimulated luteinizing hormone release from female rat gonadotrophs. *Eu. J. Endo.* 144:73-79
- Yelich, J.V., Wettemann, R.P., Marston, T.T., Spicer, L.J., 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Dom. Anim. Endocrinol.* 13: 325–338.
- Zieba, D.A., Amstalden, M., Morton, S., Maciel, M.N., Keisler, D.H., Williams, G.L., 2004. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. *Biology of reproduction* 71:804–812.
- Zulu, V.Ch., Nakao, T., Sawamuka, Y., 2002. Insulin-growth like factor I as a possible hormonal mediator nutritional regulation of reproduction in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 64(8): 657-665.

## **Capítulo VI**

### **HORMONA LUTEINIZANTE Y ACTIVIDAD OVÁRICA EN RESPUESTA A KISSPEPTINA-10 Y SU ASOCIACIÓN CON IGF-1 Y LEPTINA EN BECERRAS PRE-PÚBERES**

# Hormona luteinizante y actividad ovárica en respuesta a kisspeptina-10 y su asociación con IGF-1 y leptina en becerras pre-púberes

## Luteinizing hormone and ovarian activity in response to kisspeptin-10 and its association with IGF-1 and leptin in prepubertal heifers

Rubén Santos Echeverría<sup>a,b</sup>, René Carlos Calderón Robles<sup>c</sup>, Héctor Raymundo Vera Ávila<sup>d</sup>, Gerardo Perera-Marín<sup>a</sup>, Jesús Alejandro Arreguín Arévalo<sup>e</sup>, Terry M. Nett<sup>e</sup>, Carlos Gutiérrez Aguilar<sup>a</sup>, Alejandro Villa-Godoy<sup>a</sup>

### RESUMEN

Se evaluó el efecto de la kisspeptina-10 (Kiss-10), administrada repetidamente, sobre la liberación de LH y la actividad ovárica en becerras pre-púberes. Asimismo, se determinó la asociación de IGF-1 y leptina séricas con dichos efectos. Catorce (14) becerras Holstein o Suizo Pardo por Cebú (11.2±0.2 meses de edad; 187.4±6.3 kg de peso), se asignaron aleatoriamente para recibir cada dos horas, durante tres días una aplicación i.v. de Kiss-10 (Kisspeptina-10; 5 µg/kg de peso; n=7) o solución salina fisiológica (Testigo, n=7). Se colectó sangre cada 15 min de las 0-6, 24-30 y 72-78 h, y cada 2 h hasta las 84 h. Cada aplicación de Kiss-10 fue seguida de un incremento de LH, cuya magnitud (área bajo la curva) disminuyó ( $P<0.05$ ) con el tiempo. La Kiss-10 indujo una oleada preovulatoria de LH y formación de cuerpo lúteo en 28.5 % de las becerras, mismas que presentaron las mayores ( $P<0.05$ ) concentraciones séricas de IGF-1 y las menores ( $P<0.05$ ) de leptina. Durante 63 días postratamiento no se detectaron cambios en las ondas foliculares atribuibles a Kiss-10 ( $P>0.05$ ), y ninguna becerca manifestó actividad ovárica cíclica. Se concluye que la Kiss-10 administrada repetidamente a becerras pre-púberes es un estímulo suficiente para evocar incrementos consistentes de LH, para inducir la ovulación y actividad lútea en animales con concentraciones séricas elevadas de IGF-1 y bajas de leptina, pero no para inducir la ciclicidad estral.

**PALABRAS CLAVE:** Becerras pre-púberes, Kisspeptina, IGF-1, Leptina, Hormona luteinizante.

### ABSTRACT

We evaluated the effect of kisspeptin-10 (Kiss-10) administered repeatedly on the release of LH and ovarian activity in prepubertal heifers. We also assessed the association of serum IGF-1 and leptin with these effects. Fourteen Holstein or Brown Swiss by Zebu female calves (11.2 ± 0.2 mo old, 187.4 ± 6.3 kg) were randomly assigned to receive every 2 h for three days an i.v. application of Kiss-10 (Kisspeptin-10; 5 µg/kg of body weight, n= 7) or saline solution (control, n= 7). Blood was collected every 15 min for 0-6, 24-30 and 72-78 h, and every 2 h until 84 h. Each application of Kiss-10 was followed by an increase of LH whose magnitude (area under the curve) decreased ( $P<0.05$ ) over time. Kiss-10 induced a preovulatory surge of LH and corpus luteum formation in 28.5 % of the calves. Ovulating calves had the highest ( $P<0.05$ ) serum concentrations of IGF-1 and the lowest ( $P<0.05$ ) leptin. During 63 post-treatment days, no changes were detected in follicular waves attributable to treatments ( $P>0.05$ ) and heifers did not show cyclic ovarian activity. The conclusion is that Kiss-10 given repeatedly to prepubertal heifers is sufficient to evoke consistent increases of LH, to induce ovulation and luteal activity in animals with high IGF-1 and low leptin in peripheral blood but it is insufficient to establish regular estrous cyclicity.

**KEY WORDS:** Prepubertal heifers, Kisspeptin, IGF-1, Leptin, Luteinizing hormone.

Recibido el 24 de septiembre de 2013. Aceptado el 26 de noviembre de 2013.

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior S/N, Cubículo 2314, Ciudad Universitaria, 04510 Coyoacán, México, DF. Tel. 52 55 56 22 59 80. aavillagodoy@gmail.com. Correspondencia al último autor.

<sup>b</sup> Campo Experimental Iguala, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Iguala, Guerrero, México.

<sup>c</sup> Campo Experimental San Martinito, INIFAP, Tlahuapan, Puebla, México.

<sup>d</sup> CENID Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP, Ajuchitlán, Querétaro, México.

<sup>e</sup> Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad Estatal de Colorado, Fort Collins, Colorado, USA.

Esta investigación fue parcialmente apoyada por: 1) Macroproyecto 7.03.02 de SDEI-UAIFE-UNAM. 2) DGAPA-PAPIIT- IN205510- UNAM. 3) Fondos fiscales INIFAP 2012: (Número SINASO 18341619576).

## INTRODUCCIÓN

La pubertad representa una condición crítica en el desarrollo de los mamíferos y en la rentabilidad de las unidades de producción pecuaria<sup>(1)</sup>. El inicio de este proceso reproductivo es precedido por un aumento en la frecuencia de pulsos de la hormona luteinizante (LH), en respuesta a un incremento en la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)<sup>(2)</sup>. La LH actúa en los ovarios estimulando el desarrollo terminal de los folículos y el incremento en la síntesis y secreción de estrógenos, los cuales a su vez son responsables de inducir el estro y la ovulación<sup>(2)</sup>. El cambio en el patrón de secreción pulsátil de la GnRH es el componente clave para iniciar la pubertad<sup>(3)</sup>. Este cambio a su vez se deriva de la modificación funcional del “pulsador biológico”, el generador hipotalámico de pulsos de GnRH, cuya regulación neural y no neural es compleja y no ha sido dilucidada por completo<sup>(4)</sup>.

La kisspeptina o metastina es una familia de péptidos hipotalámicos (Kiss-54, -14, -13 y -10; denominados de acuerdo al número de aminoácidos que los componen), altamente conservada en mamíferos<sup>(5)</sup>, que está involucrada en la regulación de las neuronas de GnRH<sup>(6)</sup>. La administración de kisspeptina, ya sea en forma sistémica<sup>(7)</sup> o central<sup>(8,9,10)</sup>, induce la liberación de GnRH e indirectamente de las gonadotropinas hipofisarias<sup>(8,11)</sup>, por lo que podría tener aplicaciones potenciales para manipular la reproducción.

En bovinos, la información disponible acerca de la participación de la kisspeptina en la activación puberal del eje reproductivo es limitada. En becerras pre-púberes, de las razas Holstein, Negra Japonesa y de las de cruza de Holstein y Suizo por Cebú, la administración de un bolo i.v. de Kiss-10 (5 µg/kg de peso) indujo un incremento transitorio en la liberación de LH y de la hormona folículo estimulante (FSH)<sup>(12-15)</sup>. La respuesta a Kiss-10 a esta dosis y vía de administración aumenta con la edad en becerras

## INTRODUCTION

Puberty is a critical condition during the mammals development and the profitability of livestock production units<sup>(1)</sup>. The beginning of this reproductive process is preceded by an increase in the frequency of luteinizing hormone (LH) pulses, in response to enhanced pulsatile secretion of gonadotropins releasing hormone (GnRH)<sup>(2)</sup>. LH acts in the ovaries by stimulating the final development of follicles as well as synthesis and secretion of estrogens, which in turn are responsible for inducing estrus and ovulation<sup>(2)</sup>. The change in the pulsatile GnRH secretion pattern is the critical step that leads to onset of puberty<sup>(3)</sup>. This change is induced by functional variations in the “biological switch”, the hypothalamic generator of GnRH pulses, whose neural and non-neural regulation is complex and has not been completely understood<sup>(4)</sup>.

Kisspeptin or metastin is the name given to a family of hypothalamic peptides that differ in the number of amino acid residues (Kiss-54, -14, -13 and -10), and that are highly conserved in mammals<sup>(5)</sup>. Kisspeptin participate in the regulation of the GnRH neurons functions<sup>(6)</sup>. Kisspeptin administered, either systemically<sup>(7)</sup> or centrally<sup>(8,9,10)</sup>, induces GnRH release and indirectly the rhythmicity of gonadotropins secretion<sup>(8,11)</sup>; therefore kisspeptin has a potential use for controlling reproduction in mammals.

In cattle, information relative to the role of kisspeptin on the peripuberal activation of the gonadal axis is limited. For instance, in prepuberal heifers of different breeds (Holstein, Black Japanese and crosses of Holstein or Brown Swiss by Zebu), a single i.v. administration of Kiss-10 (5 µg/kg of body weight) induced a transient increase in peripheral LH and follicle stimulating hormone (FSH)<sup>(12-15)</sup>; furthermore, the LH response to Kiss-10 given by the same route and in identical dose, increases with age in 4 to 11 mo-old calves<sup>(14)</sup>. Thus available data suggest that heifers become more sensitive

de 4 a 11 meses<sup>(14)</sup>, lo cual permite sugerir que los animales adquieren una mayor sensibilidad a la kisspeptina a medida que se acercan a la pubertad. Asimismo, en becerras de 7 a 11 meses de edad, se demostró que la magnitud y duración de la respuesta de LH y FSH no aumenta al incrementar la dosis de Kiss-10 de 5 a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso<sup>(15)</sup>. En los estudios previos también se observó<sup>(14,15)</sup> que la mayor respuesta de LH y FSH a Kiss-10 coincide con una elevada concentración circulante del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) y una concentración de leptina decreciente. Por lo tanto, es posible que la leptina esté involucrada en acciones pre-sensibilizadoras, mientras que el IGF-1 podría estar modulando los efectos de la Kiss-10 sobre el eje reproductivo de las becerras<sup>(14)</sup>.

En experimentos realizados para tratar de adelantar la pubertad, al administrar GnRH en becerras, imitando la liberación pulsátil de la GnRH endógena, se logró inducir la formación de cuerpo lúteo en 28 y 33 % de las becerras pero no la actividad cíclica ovulatoria<sup>(16,17)</sup>. Existen evidencias de que la Kiss-10 administrada en forma repetida induce la apertura vaginal en ratas pre-púberes<sup>(9,10)</sup>, así como la ovulación y formación de cuerpos lúteos en corderas próximas a la pubertad<sup>(18)</sup>, en una elevada proporción de animales (>60 %). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar los efectos de la Kiss-10, administrada repetidamente, sobre la liberación de LH, la función lútea y el desarrollo folicular ovárico en becerras pre-púberes; asimismo se determinó la asociación de IGF-1 y leptina séricas con dichos efectos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos empleados en este experimento fueron aprobados por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (SICUAE) del programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. El estudio se

to kisspeptin as they approach puberty. In addition, it is known that in 7 to 11 mo old heifer calves the magnitude and duration of LH and FSH response does not change by increasing the Kiss-10 dose from 5 to 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>(15)</sup>. It was also observed<sup>(14,15)</sup> that the greatest response of LH to Kiss-10 coincides with a high circulating concentration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and low leptin concentrations. Therefore, it is possible that leptin is involved in pre-sensitization actions, while IGF-1 may be modulating positively the effects of Kiss-10 on the reproductive axis of heifer calves as it was proposed in a previous work<sup>(14)</sup>.

In experiments designed to advance the onset of puberty, repeated administration of GnRH in heifers, induce formation of a corpus luteum in 28 and 33 % of the treated heifers, however cyclic ovulatory activity did not occur in any of them<sup>(16,17)</sup>. In contrast to observations in cattle, there is evidence that Kiss-10 administered repeatedly induces the vaginal opening in prepubertal rats<sup>(9,10)</sup>, as well as ovulation and formation of corpora lutea in a high proportion (>60 %) of lambs that were approaching puberty<sup>(18)</sup>. Consequently, the objective in the present study was to determine the effects of Kiss-10, administered repeatedly, on the release of LH, luteal function and ovarian follicular development in prepubertal heifers; collaterally we determined the association between changes in serum IGF-1 and leptin with the variations on LH and ovarian responses to Kiss-10.

## MATERIALS AND METHODS

All procedures used in this experiment were approved by the Institutional Sub-Committee for the Care and Use of Experimental Animals (SICUAE, acronym in Spanish) of the Faculty of "Medicina Veterinaria y Zootecnia", UNAM. The study was conducted at an experimental farm located at 19° 51' 03" N and 97° 12' 48" W; the site is 500 m asl, the climate is subtropical humid, warm and is classified as Af (c), with annual average temperature of 20.8 °C<sup>(19)</sup>.

realizó en un sitio experimental dependiente del INIFAP, ubicado en Hueytamalco, Pue. El sitio se encuentra a 19° 51' 03" N y 97° 12' 48" O, a 500 msnm. El clima es subtropical húmedo semicálido Af(c), con temperatura promedio anual de 20.8 °C<sup>(19)</sup>.

### *Tratamientos*

Se usaron 14 becerras pre-púberes de 11 a 13 meses de edad y 187.4 ± 6.26 kg de peso (media ± eem), resultantes de la cruce de animales Suizo Pardo o Holstein por Cebú. Las becerras se agruparon por genotipo, edad y peso, y de acuerdo a estos criterios, se asignaron aleatoriamente para recibir Kiss-10 (Kisspeptina-10; 5 µg/kg de peso, i.v., cada dos horas durante tres días; n=7) o solución salina fisiológica (SSF; Testigo; n=7). En el presente estudio se aplicó Kiss-10 bovina<sup>(6)</sup> cuya secuencia peptídica es YNWNSFGLRY-NH<sub>2</sub>, con >95 % de pureza (Proimmune, Oxford, UK). Tanto SSF como Kiss-10 fueron administrados a través de un catéter insertado en una de las venas yugulares, el cual a su vez se utilizó para obtener muestras de sangre de acuerdo al esquema que se describe en la sección correspondiente. Antes de su aplicación, la Kiss-10 fue diluida en SSF (1:125). El volumen total aplicado por becerro en el grupo Kiss-10 se usó como referencia para establecer el volumen de SSF que se aplicó en las becerras de dicho grupo.

### *Manejo general*

Las becerras se alojaron por pares en corrales de 4 x 6 m, con piso de cemento, área techada (4 x 3 m), comederos y bebederos. Para su adaptación al manejo y a la rutina de muestreo sanguíneo, las becerras se introdujeron a los corrales dos meses antes de la administración de tratamientos y durante este periodo se sometieron a sujeción con reata (2 h/día), cepillado de pelo y acostumbamiento a la presencia de personas. La alimentación consistió en forraje picado a libertad (heno de avena; 94.82 % MS, 8.13 % PC y 2.3 Mcal de EM/kg),

### *Treatments*

Fourteen (14) prepubertal Brown Swiss or Holstein by Zebu heifers that were 11 to 13 mo old and weighed 187.4 ± 6.26 kg (mean ± SEM) were blocked by genotype, age and weight, then they were randomly assigned to the following treatments: Kiss-10 (Kisspeptin-10; 5 µg/kg of body weight; n= 7) or physiological saline solution (FSS; Control; n= 7). Both treatments were given i.v., every two hours for three days. The peptide used<sup>(6)</sup> was a bovine Kiss-10 (YNWNSFGLRY-NH<sub>2</sub>) with > 95% purity (Proimmune, Oxford, UK). FSS and Kiss-10 were administered through a catheter inserted into a jugular vein, which in turn was used to obtain blood samples according to the schedule described in the corresponding section. Before the application, Kiss-10 was diluted in FSS (1:125) and the total volume of FSS and Kiss-10/heifer was similar.

### *General management*

Heifers were allotted by pairs in 4 x 6 m<sup>2</sup> pens with cement floor, a shaded area (4 x 3 m), and equipped with individual feeders and drinkers. For adaptation purposes, heifers were housed in experimental pens 2 mo before, during and after the administration of treatments. During the adaptation period, they were restraint, brushed and handled (2 h/d). Diet consisted of *ad libitum* chopped forage (oat hay; 94.82% MS, 8.13% PC and 2.3 Mcal EM/kg), 4 kg/d of concentrate (94.49% MS, 17.97% CP and 2.5 EM/kg Mcal), mineral salts and water *ad libitum*. The experiment ended 63 d after treatments administration was completed.

### *Body measurements*

Body weight was recorded every 14 d from the arrival of animals to pens and until the end of the experiment. A day before first treatments application, height, body condition (BC), thickness of the backfat and depth of the *Longissimus dorsi* muscle were determined. Height was the vertical distance between the

4 kg de alimento concentrado al día (94.49 % MS, 17.97 % PC y 2.5 Mcal de EM/kg), sales minerales y agua a libertad. El periodo experimental concluyó 63 días después de finalizados los tratamientos.

#### *Determinación de medidas corporales*

El peso vivo de los animales se registró cada 14 días desde su llegada a los corrales de experimentación y hasta el final del estudio; a partir de estos registros se determinó la ganancia diaria promedio de peso (GDP) previa al inicio del periodo experimental. Un día antes de la aplicación de tratamientos, a cada becerra se le determinó la altura a la cruz, condición corporal (CC), grosor de la grasa dorsal y profundidad del músculo *Longissimus dorsi*. La altura a la cruz fue la distancia vertical entre el piso y la unión escapular. La CC fue calificada de manera independiente por tres personas<sup>(20)</sup> (escala de 1 a 5 puntos, 1=emaciado y 5=obeso) y el promedio de estas calificaciones se usó como variable de respuesta. El grosor de la grasa dorsal y la profundidad del músculo *Longissimus dorsi* (medidos entre la 12va y la 13va costilla) se determinaron mediante ultrasonografía<sup>(21)</sup>, utilizando para ello un aparato Kaixin 5000 y transductor lineal de 3.5 MHz (Xuzhou Kaixin Electronic Instruments Co., Xuzhou, Jiangsu, China).

#### *Muestreo sanguíneo*

Cada tercer día desde dos semanas antes de iniciar el estudio y hasta finalizarlo, se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena coxígea y colección en tubos "vacutainer". Las muestras se procesaron para obtención de suero (refrigeración por 3 h y posterior centrifugación a 1,500 xg por 15 min). El suero se congeló a -20 °C hasta determinar por radioinmunoanálisis (RIA) la concentración de progesterona (P4). La concentración de P4 se utilizó como indicador de actividad lútea (P4; valores  $\pm 1$  ng/ml) y confirmación del estado pre-puberal (P4; valores  $< 1$  ng/ml) de las becerras.

Adicionalmente y una hora antes de iniciar los tratamientos correspondientes, a cada becerra

floor and the scapular union (withers). BC was scored independently by three people<sup>(20)</sup> and averaged (scale of 1 to 5 points, 1= emaciated and 5= obese). Backfat thickness and depth of *L. dorsi* muscle (between the 12th and the 13th rib) were determined by ultrasound<sup>(21)</sup>, using a Kaixin 5000 equipment and a linear transducer of 3.5 MHz (Xuzhou Kaixin Electronic Instruments Co., Xuzhou, Jiangsu, China).

#### *Blood sampling*

Every other day from 2 wk before through the end of the experiment, blood samples were obtained from heifers by puncture of the coccyxgeal vein, serum was obtained and frozen at -20 °C until progesterone concentration (P4) was quantified. P4 was used as indicator of luteal activity ( $\pm 1$  ng/ml) and for confirmation of prepubertal condition ( $< 1$  ng/ml) of heifers. In addition, one hour before the beginning of treatments a sterile, plastic catheter was inserted in one of the jugular veins (probe Kortex caliber 5 FR and 90 cm length; Catalogue K-733; Trokar S.A de C.V., Mexico). For this purpose, the perijugular area (5 x 5 cm) was previously shaved and anesthetized (2 % lidocaine, 2 mg/cm<sup>2</sup>). Through the catheter, blood was collected every 15 min in the following intervals: 0 to 6 h, 24 to 30, and 72 to 78 h relative to initiation of treatments, as well as every 2 h between intensive sampling intervals and during 84 h after the end of treatments application. The first samples were obtained immediately before each Kiss-10 or FSS administration. Serum samples were obtained and stored as described previously. LH concentrations were determined in all serum samples taken through catheters.

#### *Ultrasonography of ovaries and detection of signs of estrus*

Ultrasound images of the ovaries were obtained at the beginning and end of treatments application, and then every other day until the d 63 (intra-rectal transducer of 7.5 MHz for a 500 Kaixin ultrasound). From ultrasound images the presence of corpora lutea (CL) was identified, and the diameter of the two largest

se le insertó un catéter estéril de plástico en una de las venas yugulares (Sonda Kortex calibre 5 FR y longitud 90 cm; Catálogo K-733; Trokar S.A de C.V). Para ello, la zona peri-yugular (5x5 cm) fue previamente rasurada y anestesiada (lidocaína al 2 %, 2 mg/cm<sup>2</sup>). A través del catéter, se colectó sangre cada 15 min en los periodos: 0 a 6 h, 24 a 30 h, y 72 a 78 h de iniciados los tratamientos, así como cada 2 h entre muestreos intensivos, y al terminar estos hasta las 84 h. Las primeras muestras se obtuvieron inmediatamente antes de cada administración de Kiss-10 o SSF. El suero de estas muestras se obtuvo y almacenó como se indicó anteriormente.

#### *Ultrasonografía de ovarios y detección de signos de estro*

En cada becerro se obtuvieron imágenes ultrasonográficas de los ovarios el día previo al inicio de los tratamientos y, después de terminados estos cada tercer día hasta el día 63 (transductor intra-rectal de 7.5 MHz para equipo Kaixin 500). A partir de estos registros se identificó la presencia de cuerpo lúteo (CL) y se obtuvo el diámetro de los dos folículos de mayor tamaño, así como el número de folículos mayores a 5 mm<sup>(22)</sup>.

Desde dos meses antes de iniciar el estudio y hasta su final, se llevó a cabo una supervisión para identificar a las becerros que presentaran conducta de estro (dos periodos de observación/día en un corral comunal; 0700 a 0800 y 1900 a 2000 h).

#### *Medición de hormonas*

La LH se determinó mediante RIA en todas las muestras obtenidas entre las 0 y 84 h con relación a la aplicación de tratamientos. El RIA para LH fue en fase líquida de 120 h de incubación a 4° C, siguiendo el procedimiento descrito por Arrieta *et al*<sup>(23)</sup>. La hormona USDA-bLH (AFP11743B) se utilizó como trazador incorporando Na<sup>125</sup>I mediante el método del Iodo-gen y como curva patrón a dosis desde 0.01 hasta 10 ng por tubo. El primer anticuerpo

follicles as well as the number of follicles >5 mm were recorded<sup>(22)</sup>.

From two months before through the end of the study, heifers were moved twice a day to a farmyard to be observed for detection of signs of estrus (0700 to 0800 h and 1900 to 2000 h).

#### *Hormonal measurements*

LH was determined by a liquid phase radioimmunoassay (RIA) in all samples obtained between 0 and 84 h relative to treatments application, following the procedure described by Arrieta *et al*<sup>(23)</sup>. USDA-bLH (AFP11743B) was used as a tracer, incorporating Na<sup>125</sup>I by the Iodo-gen method. The standard curve was constructed from 0.01 through 10 ng per tube. The first antibody was obtained from rabbit to NIDDK-oLH-26 (anti-oLH-26), validated in cattle by Perera-Marin *et al*<sup>(24)</sup> and taken to a final dilution of 1:400,000. Separation of bound and free fractions was by the addition of a second antibody against rabbit IgG produced in donkey (1:80 dilution). In three assays, the sensitivity was 0.03 ng/ml and the intra- and inter-assay C.V. were 6.73 and 6.57 %, respectively. IGF-1 and leptin were quantified in samples obtained at 0, 24, 48 and 72 h from the beginning of treatments. IGF-1 was measured by an immunoabsorbent assay (IGF-1 ELISA®, ALPCO Diagnostics, Salem, NH, USA); the sensitivity of the assay was 5.86 ng/ml and the intra-assay CV was 0.57 %. Leptin was analyzed by a multi-species liquid phase RIA kit (XL - 85 K, Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA)<sup>(25)</sup>. The sensitivity of the assay was 1.0 ng/ml and the within assay CV was 3.8 %. Progesterone was determined by RIA by a solid phase RIA kit (PROG - CTRIA®, Cisbio Bioassay, Sorgues, France) with a sensitivity of 0.15 ng/ml, and an intra-assay CV of 8.8 %.

#### *Response variables*

From each increment of Kiss-10 induced LH in serum, the area under the curve (AUC) was calculated; similarly, during the same periods,

generado en conejo correspondió a la hormona NIDDK-oLH-26 (anti-oLH-26) validado en bovinos por Perera-Marín *et al.*<sup>(24)</sup> a una dilución final de 1:400,000. La separación de la fracción unida de la fracción libre se realizó con un segundo anticuerpo contra IgG de conejo generado en burro (dilución 1:80). En tres ensayos la cantidad mínima detectable fue 0.03 ng/ml y los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron 6.73 y 6.57 %, respectivamente. El IGF-1 y la leptina se determinaron en muestras obtenidas a las 0, 24, 48 y 72 h de iniciados los tratamientos. El IGF-1 se cuantificó mediante un ensayo inmunoabsorbente (IGF-1 ELISA®, ALPCO Diagnostics, Salem, NH); la sensibilidad del ensayo fue de 5.86 ng/ml y el CV intra-ensayo fue 0.57 %. La leptina se analizó mediante RIA con un estuche comercial multiespecies de fase líquida (XL-85K, Linco Research Inc, St. Charles, MO)<sup>(25)</sup>, con una sensibilidad de 1.0 ng/ml y un CV intra-ensayo de 3.8 %. La progesterona se cuantificó mediante RIA con un estuche comercial de fase sólida (PROG-CTRIA®, Cisbio Bioassay, Sorgues, France) cuya sensibilidad fue de 0.15 ng/ml, con un CV intra-ensayo de 8.8 %.

#### *Variables de respuesta*

Se determinó el área bajo la curva (AUC) de cada incremento en las concentraciones séricas de LH provocado por la administración de Kiss-10 y, en paralelo, durante periodos similares del pulso endógeno de LH de mayor tamaño en becerras del grupo testigo. Se consideraron como incrementos de LH inducidos por la administración de Kiss-10 o pulsos endógenos en el grupo testigo, cuando al menos en dos muestras consecutivas la concentración de LH fue mayor al promedio más dos desviaciones estándar de las concentraciones de la hormona a las 0, 2 y 4 h de iniciados los tratamientos. El AUC se calculó como la suma de las concentraciones de LH consideradas como incrementos asociados a la administración de Kiss-10, o a un pulso endógeno en el grupo testigo. Para ambos grupos se determinó la frecuencia de incrementos de LH sérica, durante

in the endogenous highest LH pulse in control calves, AUC was determined. Both, spontaneous pulse or Kiss-10 induced increments of LH occurred when at least in two consecutive samples LH concentration was higher than the mean values plus 2 SD of the hormone concentrations at 0, 2 and 4 h from the first treatments application. AUC was calculated as the sum of LH concentrations within a Kiss-10 induced increment or an endogenous pulse. Frequency of endogenous pulses or Kiss-10 induced increments of LH/6 h of each interval of intensive sampling was determined. LH concentrations determined in samples collected every two hours (0 to 84 h), were used to identify a preovulatory surge (increase of LH above the mean from all samples + 2 SD in two or more consecutive samples, followed by at least two samples at baseline level). The occurrence of ovulation was when a preovulatory LH surge was identified prior a CL detected by ultrasonography and a concomitant increase of serum P4 ( $\geq 1$  ng/ml) was observed. Records of ultrasound images of the ovaries were used to characterize the waves of follicular development during the experimental period<sup>(26)</sup>, as well as their number and duration.

#### *Statistical analyses*

Comparison between experimental groups for data relative to body measurements (body weight, pretreatment ADG, height, BC, backfat thickness, depth of *L. dorsi* muscle), total follicles  $\geq 5$  mm in diameter, diameter of the two largest follicles as well as mean serum levels of leptin and IGF-1, were performed by a "t" Student test. For data relative to response variables that were recorded repeatedly during the experiment, the analyses were by ANOVA for a repeated measurements design (serum concentrations of LH, leptin and IGF-1, AUC of LH increments, duration of dominant follicles and follicular waves). In addition, binomial responses were compared by Chi-square (occurrence of preovulatory LH surge and CL). To determine the association between body measurements and ovarian or endocrine

cada uno de los periodos de muestreo intensivo de 6 h (frecuencia=número de incrementos durante el periodo). A partir de las concentraciones de LH determinadas en las muestras colectadas cada dos horas (0 a 84 h), se identificó a las becerras que presentaron una oleada preovulatoria de LH (incremento de LH mayor a la media + 2 DE en dos o más muestras consecutivas). La presentación de ovulaciones se determinó mediante la identificación ultrasonográfica de CL, coincidente con un incremento de P4 ( $\pm 1$  ng/ml). Con base en los registros ultrasonográficos de los ovarios se caracterizaron las ondas de desarrollo folicular durante el periodo experimental<sup>(26)</sup>, estimando su número y duración.

*Análisis estadístico*

La comparación entre grupos experimentales de los valores al inicio del estudio para peso vivo, ganancia diaria promedio (GDP) de peso pre-tratamientos, altura a la cruz, CC, grosor de grasa dorsal, profundidad del músculo L.

variables, an analysis of multiple linear correlations was performed. The statistical package SAS was used in all cases<sup>(27)</sup> through the procedures for general linear models (PROC GLM) or frequency (PROC-FREQ) analysis and when necessary, separation of means was performed by the least square (LSMEANS) procedure.

**RESULTS**

Three weeks after application of treatments, one calf of the Kiss-10 group was withdrew from the study due to an infectious disease, so data from this animal related to the response variables associated with follicular waves were not recorded but data relative to hormones in response to Kiss-10 were taken, analyzed and included in results. At the beginning of the study, heifers in the two experimental groups were homogeneous in body measurements, ovarian condition as well as serum leptin and IGF-1 (Table 1;  $P > 0.05$ ). The ADG during the 2 mo previous to the treatments administration

Cuadro 1. Media  $\pm$  EEM de la edad, medidas corporales y ganancia diaria de peso pre-tratamientos; así como desarrollo folicular ovárico y concentraciones de leptina e IGF-1 al inicio del experimento en becerras pre-púberes tratadas con Kiss-10

Table 1. Mean  $\pm$  SEM of pre-treatment age, body measurements and daily weight gain; as well as follicular development and leptin and IGF-1 concentrations at the beginning of the experiment in prepubertal heifers treated with Kiss-10

| Variable                                    | Groups            |                   |        |
|---------------------------------------------|-------------------|-------------------|--------|
|                                             | Control           | Kisspeptin-10     | P=     |
| Age, month                                  | 11.4 $\pm$ 0.21   | 10.9 $\pm$ 0.32   | 0.2348 |
| Body weight, kg                             | 188.6 $\pm$ 9.3   | 186.1 $\pm$ 9.1   | 0.8510 |
| Wither height, cm                           | 111.0 $\pm$ 2.32  | 109.4 $\pm$ 2.64  | 0.6051 |
| Body condition score, point                 | 2.93 $\pm$ 0.09   | 2.92 $\pm$ 0.10   | 0.9923 |
| Backfat thickness, mm                       | 2.50 $\pm$ 0.13   | 2.32 $\pm$ 0.10   | 0.3294 |
| L. <i>dorsi</i> muscle depth, mm            | 26.87 $\pm$ 1.40  | 25.40 $\pm$ 0.85  | 0.3888 |
| Daily weight gain, kg                       | 0.71 $\pm$ 0.08   | 0.87 $\pm$ 0.16   | 0.3837 |
| Follicles larger than 5 mm, number          | 13.29 $\pm$ 1.3   | 10.71 $\pm$ 1.16  | 0.1798 |
| Diameter of the largest follicle, mm        | 7.71 $\pm$ 0.76   | 8.85 $\pm$ 0.52   | 0.2393 |
| Diameter of the second largest follicle, mm | 5.42 $\pm$ 0.42   | 6.42 $\pm$ 0.49   | 0.1518 |
| Serum leptin, ng/ml                         | 3.23 $\pm$ 0.44   | 3.32 $\pm$ 0.81   | 0.9206 |
| Serum IGF-1, ng/ml                          | 159.4 $\pm$ 13.43 | 175.7 $\pm$ 34.32 | 0.6677 |

*dorsi*, total de folículos  $\geq 5$  mm, diámetro del folículo mayor y del segundo en tamaño, concentraciones séricas de leptina e IGF-1, se realizó mediante la prueba “t” de Student. En el caso de variables de respuesta que se registraron en varias ocasiones durante el periodo experimental, la comparación fue mediante ANDEVA para un diseño de mediciones repetidas (concentraciones séricas de LH, leptina e IGF-1, AUC de incrementos de LH, duración de ondas foliculares y diámetros máximos de los folículos dominantes). A su vez, las respuestas binomiales se compararon por Ji cuadrada (presentación de oleada preovulatoria de LH y presentación de CL). Por otra parte, con el fin de determinar el grado de asociación entre variables corporales y de actividad ovárica y endocrina al inicio el periodo experimental, se realizó un análisis de correlación lineal múltiple. En todos los casos se utilizó el paquete estadístico SAS<sup>(27)</sup> con sus procedimientos para modelos lineales generales (PROC-GLM) o para análisis de frecuencias (PROC-FREQ) y, en su caso, la separación de medias por el procedimiento de medias de cuadrados mínimos (LSMEANS).

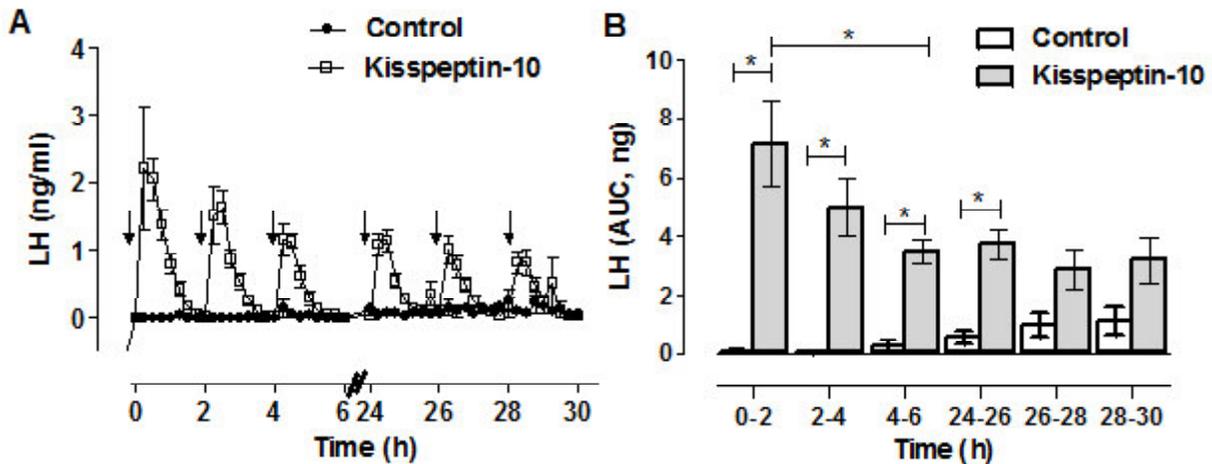
was also similar between groups, with an overall mean of  $0.79 \pm 0.12$  kg/d.

Repeated administration of Kiss-10 resulted in successive increments of LH (Figure 1-A). With each Kiss-10 application, AUC of the LH increments gradually decreased in each of the three first successive applications of Kiss-10 and then remained low and stable (Figure 1-B). Relative to endogenous LH pulses in control animals, AUC of the LH increments induced by Kiss-10 was 7.07, 4.95 and 3.20 times higher in the first three applications of the neuropeptide, respectively ( $P < 0.01$ ; Figure 1-B). From 26 h after the beginning of treatments to the end of the study, AUC corresponding to Kiss-10 induced increments and endogenous pulses of LH did not differ between them ( $P > 0.05$ ; Figure 1-B).

The AUC mean for LH during the 0 to 6 h interval (Table 2), was approximately nine times higher for the Kiss-10 animals than for pulses in the control group ( $P < 0.05$ ). In contrast, LH AUC did not differ between experimental groups during the 24 to 30 h and 72 to 78 h intervals

Figura 1. Respuesta de hormona luteinizante (LH) a Kisspeptin-10 o pulsos espontáneos de LH en animales testigo. A: Perfil de LH (media  $\pm$  EEM) después de iniciados los tratamientos (flecha). B: Área bajo la curva (AUC) de los incrementos de LH registrados en intervalos de dos horas relativos a cada aplicación de los tratamientos. \* ( $P < 0.01$ )

Figure 1. Response of luteinizing hormone (LH) to Kisspeptin-10 or LH spontaneous pulses recorded in Controls. A: Profile of LH (Mean  $\pm$  SEM) after the beginning of treatments (arrow). B: Area under the curve (AUC) of LH increments during the 2 h intervals following each treatment application. \* ( $P < 0.01$ )



Cuadro 2. Media  $\pm$  EEM del número y área bajo la curva (AUC) de la respuesta de LH a Kiss-10 o de pulsos espontáneos de LH (solución salina) en diferentes periodos de muestreo sanguíneo de becerras pre-púberes

Table 2. Mean  $\pm$  SEM of the number and area under the curve (AUC) of the LH response to Kiss-10 or LH spontaneous pulses (saline solution) during different blood sampling intervals in pre-pubertal heifers

| Sampling period (h) | Treatments (n=7 each group) | Pulse frequency (pulses/6 h) | AUC (ng)                      |
|---------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 0 to 6              | Control                     | 0.28 $\pm$ 0.18              | 0.78 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>  |
|                     | Kisspeptin-10               | —                            | 7.12 $\pm$ 1.45 <sup>c</sup>  |
| 24 to 30            | Control                     | 1.00 $\pm$ 0.21              | 1.76 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>  |
|                     | Kisspeptin-10               | —                            | 3.37 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>  |
| 72 to 78            | Control                     | 0.85 $\pm$ 0.34              | 1.47 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup> |
|                     | Kisspeptin-10*              | 0.40 $\pm$ 0.24              | 0.62 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>  |

<sup>abc</sup> Different letters within variable indicate difference between treatment means ( $P < 0.05$ ).

\* Two heifers that had an LH preovulatory surge were not included for the analysis of data.

## RESULTADOS

Tres semanas después del inicio de la aplicación de los tratamientos, una becerria del grupo Kisspeptina-10 se retiró del estudio por haber padecido una enfermedad infecciosa, por lo que no existieron datos de este animal relacionados con las variables de respuesta asociadas a las ondas de desarrollo folicular pos-tratamiento; en los análisis de respuesta hormonal a Kiss-10 sí fue contabilizada.

Al inicio del estudio, las becerras en los dos grupos experimentales fueron homogéneas en cuanto a medidas corporales, estado ovárico y concentración sérica de leptina e IGF-1 (Cuadro 1;  $P > 0.05$ ). La GDP registrada en los dos meses previos a la administración de los tratamientos también fue similar entre grupos, con una media general de 0.79  $\pm$  0.12 kg/día.

La administración repetida de Kiss-10 provocó incrementos sucesivos de LH (Figura 1-A). Con cada aplicación de Kiss-10, el AUC del incremento de LH disminuyó gradualmente en las primeras tres aplicaciones y después se mantuvo relativamente estable (Figura 1-B). Comparado con el AUC de los pulsos endógenos en el grupo testigo, el AUC del incremento de

( $P > 0.05$ ). Through these three first periods AUC mean had a progressive decrease in the Kisspeptin-10 group ( $P < 0.05$ ). In contrast, AUC mean increased in the control group during the 24 to 30 h interval when compared with 0 to 6 h; subsequently. Once treatments were removed (end of 72 to 78 h interval), number and amplitude of LH pulses were similar ( $P > 0.05$ ) between experimental groups.

A Kiss-10 induced preovulatory surge of LH followed by a CL occurred in 28.5 % of the treated heifers (*vs* 0 % in control animals). The preovulatory surges began at 48  $\pm$  5.65 h after the first application of Kiss-10 and the mean duration of them was 8.0  $\pm$  2.82 h. P4 serum levels during luteal activity of the responding heifers began 6 d after the first application of Kiss-10, and the CLs remained functional during 4 and 12 d. Subsequently progesterone concentrations returned to values  $< 1$  ng/ml that were sustained until the end of the study, thus after ovulation heifers returned to a prepubertal-like condition. None of the calves in both groups displayed signs of estrous behavior or cyclic estrous activity during the experimental period. At 63 d post-treatment, number and duration of follicular waves, and the maximum

LH en respuesta a Kiss-10 fue 7.07, 4.95 y 3.20 veces mayor en las tres primeras aplicaciones del neuropéptido ( $P < 0.01$ ; Figura 1-B). A partir de las 26 h de iniciados los tratamientos, el AUC del incremento de LH provocado por la Kiss-10 fue similar en magnitud comparado con el AUC de los pulsos endógenos de LH en el grupo testigo ( $P > 0.05$ ; Figura 1-B).

El promedio del AUC durante el periodo de 0 a 6 h de iniciados los tratamientos (Cuadro 2) fue mayor para el grupo en que se administró Kiss-10 ( $P < 0.05$ ; AUC 9 veces mayor en Kisspeptina-10 vs testigo), pero no difirió entre grupos experimentales en los periodos de 24 a 30 h y de 72 a 78 h. A través de estos tres periodos el valor promedio de AUC presentó una disminución progresiva en el grupo Kisspeptina-10 ( $P < 0.05$ ). En contraste, esta variable presentó un incremento en el grupo testigo durante el periodo de 24 a 30 h con respecto al de 0 a 6 h; posteriormente el AUC de LH se mantuvo. Una vez retirados los tratamientos (periodo 72 a 78 h), el número y la amplitud de los pulsos de LH fue similar ( $P > 0.05$ ) entre grupos experimentales.

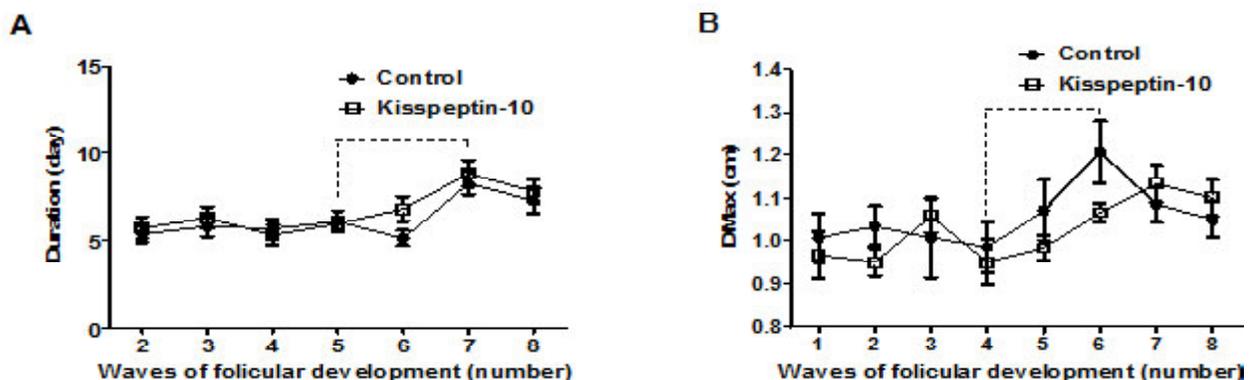
diameter of the dominant follicles were similar between experimental groups ( $P > 0.05$ ; Figure 2); during that interval, duration of follicular waves and the diameter of dominant follicles increased from the 6th and 5th wave and thereafter, relative to previous waves in control and Kisspeptin-10 groups, respectively ( $P < 0.05$ ).

Repeated application of Kiss-10 did not affect ( $P > 0.05$ ) serum concentrations of IGF-1 and leptin but heifers that ovulated in response to Kiss-10 had the highest serum concentrations of IGF-1 ( $P < 0.05$ ; Figure 3-A). In contrast, serum concentration of leptin (Figure 3-B), which did not vary during the sampling period, were the lowest in heifers that ovulated ( $P < 0.05$ ).

Serum concentrations of IGF-1 at the beginning of the experimental period were positively correlated ( $P < 0.05$ ) with body weight ( $r = 0.70$ ), body condition ( $r = 0.58$ ) and height of heifers ( $r = 0.78$ ). However, circulating leptin concentrations were significantly correlated only with age of heifers ( $r = 0.62$ ;  $P < 0.05$ ). Values at the beginning of the experimental period of thickness of back fat, *L. dorsi* muscle depth and variables

Figura 2. Media  $\pm$  EEM de la duración (A) y diámetro máximo (DMax) del foliculo dominante (B) de las ondas de desarrollo folicular registradas durante 63 días posteriores a la última aplicación de los tratamientos de Kisspeptina-10 o solución salina fisiológica en becerras pre-púberes. \* $P < 0.05$

Figure 2. Mean  $\pm$  SEM of duration (A) and maximum diameter (DMax) of dominant follicles (B) during follicular waves recorded during 63 d after the last application of Kisspeptin-10 or saline solution in prepubertal heifers. \* $P < 0.05$



There were no effects of treatment or treatment by follicular wave interaction ( $P > 0.05$ ).

La Kiss-10 indujo una oleada preovulatoria de LH seguida de formación de un CL en 28.5 % de las becerras tratadas, mientras que en el grupo testigo ninguna becerro la presentó. La oleada preovulatoria inició  $48 \pm 5.65$  h después de la primera aplicación de Kiss-10 y tuvo una duración de  $8.0 \pm 2.82$  h. De acuerdo a los niveles séricos de P4, la actividad lútea (concentración  $\pm 1$  ng/ml) en dichas becerras inició seis días después de la primera aplicación de Kiss-10 y los dos CL permanecieron funcionales durante 4 y 12 días; posteriormente las concentraciones de progesterona volvieron a ser inferiores a 1 ng/ml, lo cual se mantuvo hasta el final del estudio; es decir que después de ovular, las becerras volvieron a un estado similar al prepuberal.

Ninguna de las becerras en ambos grupos experimentales presentó signos conductuales de estro o actividad cíclica estral durante el periodo experimental. En los 63 días pos-tratamiento, el número y duración de las ondas de desarrollo

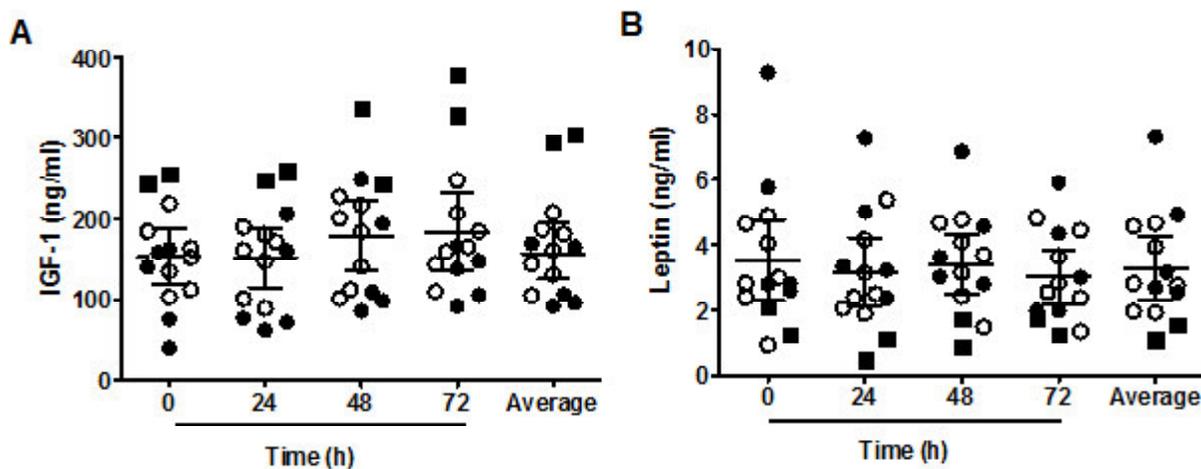
related to the ovarian follicles, were not correlated with serum concentrations of IGF-1 and leptin ( $P > 0.05$ ); similarly, changes in serum concentrations of IGF-1 and leptin were not correlated with each other ( $P > 0.05$ ).

## DISCUSSION

Successive applications of Kiss-10 given intravenously induced LH release in prepubertal heifers, nevertheless, LH increments decreased in amplitude over time. In agreement with our hypothesis, Kiss-10 applied repeatedly induced ovulation but only in those heifers that had high circulating concentrations of IGF-1 and low concentrations of leptin. Kiss-10 did not induce the establishment of ovulatory cyclical activity or estrus and did not affect ovarian follicular development after treatment; consequently it may be considered that exogenous Kiss-10 exerts a temporary and partial effect on the mechanisms that lead toward puberty.

Figura 3. Concentración sérica de IGF-1 (A) y leptina (B) de becerras pre-púberes tratadas cada dos horas por tres días con Kiss-10 (círculos negros) o solución salina fisiológica (círculos blancos) en muestras de sangre tomadas a 0, 24, 48 y 72 h de los tratamientos

Figure 3. Serum concentration of IGF-1 (A) and leptin (B) of pre-pubertal heifers treated every two hours for three days with Kiss-10 (black circles) or saline solution (white circles). Blood samples were taken at 0, 24, 48 and 72 h relative to treatments



Mean and confidence interval (95 %) for all heifers is depicted in each treatment. Black squares represent two heifers that had an LH preovulatory wave in response to Kiss-10.

There was no significant effect ( $P > 0.05$ ) of treatment, sampling time or treatment by sampling time interaction.

folicular, así como el diámetro máximo de los folículos dominantes fue similar entre grupos experimentales ( $P > 0.05$ ; Figura 2). En este intervalo, la duración de las ondas de desarrollo folicular y el diámetro máximo del folículo dominante aumentaron a partir de la 6ª y 5ª onda en los grupos testigo y Kisspeptina-10, respectivamente ( $P < 0.05$ ).

La aplicación repetida de Kiss-10 no modificó ( $P > 0.05$ ) las concentraciones séricas de IGF-1 y leptina, pero las becerras que ovularon en respuesta a Kiss-10 presentaron concentraciones séricas de IGF-1 mayores a las de sus compañeras de grupo ( $P < 0.05$ ; Figura 3-A), lo cual no ocurrió con las concentraciones séricas de leptina (Figura 3-B), las cuales no variaron durante el período de muestreo; por el contrario, las dos becerras que ovularon fueron de las que presentaron concentraciones de leptina más bajas ( $P < 0.05$ ).

Las concentraciones séricas de IGF-1 al inicio del periodo experimental se correlacionaron positivamente ( $P < 0.05$ ) con el peso corporal ( $r = 0.70$ ), la condición corporal ( $r = 0.58$ ) y la altura a la cruz de las becerras ( $r = 0.78$ ). Por su parte, las concentraciones circulantes de leptina sólo se correlacionaron con la edad de las becerras ( $r = 0.62$ ;  $P < 0.05$ ). Los valores al inicio del periodo experimental de grosor de grasa dorsal, profundidad del músculo *L. dorsii* y de variables relacionadas con poblaciones de folículos ováricos, no se correlacionaron con los de las concentraciones séricas de IGF-1 o de leptina ( $P > 0.05$ ); a su vez, las concentraciones séricas de estas hormonas no se correlacionaron entre sí ( $P > 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En becerras pre-púberes, la Kiss-10 administrada en forma repetida provocó incrementos sucesivos de LH, mismos que disminuyeron en amplitud con el tiempo. De acuerdo con lo que se hipotetizó, la Kiss-10 aplicada repetidamente sería capaz de inducir la ovulación, sin embargo, en el presente estudio esto solo ocurrió en las

Repeated application of Kiss-10 induced LH increments resembling LH spontaneous pulses that precede puberty. Therefore, Kiss-10 is a potential tool for regulating the reproductive axis in prepubertal heifers as it was reported for rats<sup>(9,10)</sup> and ewes<sup>(18)</sup>.

In the present study, LH response to Kiss-10 decreased gradually over time and was similar to spontaneous pulses of LH in the control group by 24 h after the initiation of treatments. A similar phenomenon was observed by McLeod *et al*<sup>(16)</sup> after administering GnRH to prepubertal heifers in a pattern resembling that used for Kiss-10 in the present work; authors attributed this response to the effects that ovarian steroids exert over the sensitivity of pituitary to GnRH, instead of the progressive desensitization due to repeated administration of the neurohormone as we propose in the case of Kiss-10 repeated application. It is known that Kiss-10 evokes LH secretion indirectly through the induction of GnRH release<sup>(11)</sup>, thus in both experiments, the present and that of McLeod *et al*<sup>(16)</sup> the desensitization effect could be attributed to the reduced action of GnRH in the pituitary; an alternative mechanism might be the desensitization of GnRH neurons to Kiss-10. This is possible because it was reported that GnRH neurons experienced refractory intervals to kisspeptin in juvenile mice<sup>(28)</sup>; besides, in the same study, the percentage of depolarized GnRH neurons and duration of the depolarization period in response to Kiss-10 were lower in prepubertal than in adult animals. Another possible mechanism that may cause the gradual decrease in LH release during intermittent administration of Kiss-10, is the sudden increase in the rate of LH secretion relative to pre-treatment values, as it was documented in proestrus ewes, in which estradiol induced a reduction in amplitude but not in frequency of LH pulses<sup>(29)</sup>. Regardless of the arguments above, it was demonstrated that in adult ewes intermittent administration of Kiss-10, applied intravenously induces the release of GnRH and LH<sup>(7)</sup>, as it was also observed for LH in lambs approaching puberty<sup>(18,30)</sup>, goats in diestrus<sup>(31)</sup>

becerras que presentaron elevadas concentraciones circulantes de IGF-1 y bajas concentraciones de leptina durante el período de muestreo. La Kiss-10 no indujo el establecimiento de actividad cíclica ovulatoria o estral, ni afectó el desarrollo folicular ovárico después del tratamiento, por lo que puede considerarse que su efecto fue transitorio.

La Kiss-10 administrada en un protocolo de aplicaciones repetidas provocó un aumento en la frecuencia y magnitud de incrementos de LH de manera similar a lo que ocurre durante la pubertad. Por lo anterior, es factible proponer a este neuropéptido como una herramienta potencial para la manipulación del eje reproductivo en becerras pre-púberes como se ha sugerido en ratas<sup>(9,10)</sup> y borregos<sup>(18)</sup>.

En el presente estudio, la magnitud del incremento de LH inducido por cada aplicación de Kiss-10 disminuyó gradualmente con el tiempo hasta llegar a equipararse con la magnitud de los incrementos de LH asociados a pulsos endógenos en el grupo testigo. Una disminución similar en la magnitud de incrementos de LH fue encontrada por McLeod *et al*<sup>(16)</sup> después de utilizar un esquema de administración de GnRH similar al de Kiss-10 empleado en el presente trabajo en becerras pre-púberes. Los autores citados, observaron que las becerras presentaron periodos alternados de mayor y menor respuesta a la GnRH exógena, atribuyendo este efecto a la modulación de la sensibilidad de la respuesta hipofisiaria a GnRH ejercida por esteroides ováricos y no a una desensibilización progresiva por efecto de la administración repetida de la neurohormona. El estímulo en la secreción de LH asociado con la administración de Kiss-10, representa un efecto indirecto mediado por la GnRH liberada a nivel hipotalámico en respuesta al neuropéptido<sup>(11)</sup>. En este sentido, no se puede descartar como explicación de la disminución en la magnitud de la respuesta de LH ante aplicaciones repetidas de Kiss-10 a una posible desensibilización de las neuronas GnRH-érgicas, ya que se ha demostrado que

and male rats during the beginning of puberty<sup>(32)</sup>. The cited results and data from the present study, provide indirect evidence of a differential sensitivity to Kiss-10 at GnRH neurons level between pre- and peri-pubertal animals, phenomenon that was reported in rodents<sup>(28,33)</sup> and Rhesus monkeys<sup>(34)</sup>.

Kiss-10 induced a preovulatory surge of LH and development of a functional CL in 28 % of heifers. A similar result was obtained in 12 to 14 mo old heifers treated with GnRH<sup>(17)</sup> given by the same route, frequency, and time than Kiss-10 in the present experiment. In 5 mo old heifer calves, GnRH induced a preovulatory surge of LH in 75 % of animals and 25 % of them developed a short-lived CL<sup>(16)</sup>; therefore, it is proposed that response of hypothalamus to Kiss-10 and pituitary to GnRH varies with age. That is possible because in prepubertal ewes approaching the onset of puberty, Kiss-10<sup>(18)</sup> and GnRH<sup>(35)</sup> administered every hour by 1 and 10 d respectively, induced an LH surge and luteal function in more than 60 % of the animals. Similarly, 74 % of rats that were approximately 8 d before the onset of puberty, a Kiss-10 treatment given every 12 h for 6 d, advanced the vaginal opening<sup>(9)</sup>. These studies provide evidence about the close association between body development and the proportion of females that present a preovulatory surge of LH and the subsequent functional CL, in response to intermittent Kiss-10 or GnRH treatments.

In a previous study, prepubertal heifers that were 11-mo old had a greater LH response to an intravenous Kiss-10 bolus than heifers that were 4 and 7 mo old<sup>(14)</sup>; the highest LH response to Kiss-10 in the 11 old animals coincided with higher concentrations of circulating estradiol and IGF-1, and lower leptin concentrations than in the younger heifers<sup>(14)</sup>. In the present study, calves that had an LH surge and developed of a CL in response to Kiss-10, had also the highest levels of IGF-1 and the lowest of leptin. Therefore, estradiol and IGF-1 could modulate positively the

estas neuronas pueden pasar por periodos refractarios al neuropéptido en ratones juveniles y pre-púberes<sup>(28)</sup>, en los que se observó además que el porcentaje de neuronas de GnRH despolarizadas y la duración del periodo de despolarización en respuesta a Kiss-10, fueron menores en animales pre-púberes que en los de mayor edad.

Por otra parte, la disminución de los incrementos de LH inducidos por la administración intermitente de Kiss-10 puede ser consecuencia del incremento en la frecuencia de secreción de LH con respecto a la del periodo pre-tratamiento, de manera similar a lo que ocurre en el proestro en animales con actividad cíclica ovulatoria, cuyo estradiol disminuye en amplitud pero no en frecuencia de los pulsos de LH<sup>(29)</sup>. Independientemente de lo anterior, en borregas adultas la administración i.v. de Kiss-10 en forma intermitente induce un incremento de GnRH y LH similar entre aplicaciones<sup>(7)</sup>, como lo ha sido también para LH en corderas cercanas a la pubertad<sup>(18,30)</sup>, cabras en diestro<sup>(31)</sup> y ratas macho que han cursado por la pubertad<sup>(32)</sup>. Los resultados citados y los del presente estudio, constituyen evidencias indirectas de una diferenciada sensibilidad a Kiss-10 a nivel de las neuronas GnRH entre animales pre y peri-puberales, fenómeno que fue confirmado para algunos roedores<sup>(28,33)</sup> y monos Rhesus<sup>(34)</sup>.

La Kiss-10 indujo una oleada preovulatoria de LH y la formación de un CL funcional en 28 % de las becerras. Un resultado similar se observó en becerras de 12 a 14 meses de edad tratadas con GnRH<sup>(17)</sup> por la misma vía, frecuencia y duración del tratamiento que en el presente experimento. En becerras de menor edad, un tratamiento de GnRH similar al señalado indujo una oleada preovulatoria de LH en 75 % de los animales, de los cuales solo el 25 % formó un CL de corta duración<sup>(16)</sup>. Por tanto, se propone que la respuesta del hipotálamo a Kiss-10 y de la hipófisis a GnRH exógenas varía en función de la edad de los animales. En apoyo a lo mencionado, en borregas pre-púberes en etapas cercanas al inicio de la pubertad, la Kiss-10<sup>(18)</sup>

kisspeptin effects over the gonadal axis activity. It seems that for induction of puberty, relatively high concentrations of endogenous IGF-1 and estradiol are required as somatic maturity signals, while the effects of leptin signaling may be exerted by increased concentrations during earlier stages of life that declined later on. This phenomenon was reported by our group in an earlier work<sup>(14)</sup>, where in 4 and 7 mo old heifer calves, leptin circulating levels were higher than in 11-mo-old animals. Other authors were unable to produce consistent data relative to the association between leptin circulating levels and the onset of puberty in heifers<sup>(36,37)</sup>.

In the study reported here, all heifers presented a pulsatile LH release of similar characteristics in response to intermittent administration of Kiss-10 during the first 30 h of treatment; therefore the LH surge and subsequent luteal function observed in some heifers treated with Kiss-10 could be explained, at least partially, by the gonadotropin-stimulation of ovarian steroidogenesis in synergy with high blood levels of IGF-1<sup>(38)</sup>, which in turn would act by a positive feedback action on the hypothalamus-hypophysial axis. The previous statement is supported by the fact that lambs and rats displayed signs of puberty concurrent with increments of estradiol peripheral concentrations in response to repeated administration of Kiss-10<sup>(9,10,18)</sup>. Likewise, Kiss-10 administered continuously to adult ewes induced an LH surge only in those animals that had elevated concentrations of estradiol<sup>(39)</sup>.

The results above suggest that in association with the somatic development which could be evidenced by IGF-1, Kiss-10 evokes an ovulatory response through the induction of a greater GnRH/LH-induced steroidogenic activity. Despite that in the present study circulating estradiol was not quantified, it confirms partially the available information that supports the concept that the IGF1 and estradiol interactions are important during the processes that determines the onset of puberty. Regarding the actions of IGF-1 and estradiol at central level, these

y la GnRH<sup>(35)</sup> administradas cada hora por 1 y 10 días respectivamente, indujeron una oleada de LH y la función lútea en más del 60 % de ellas. De igual manera, en ratas que aproximadamente se encontraban a ocho días del inicio de la pubertad, un tratamiento de Kiss-10 cada 12 h por seis días adelantó la apertura vaginal en 74 % de ellas<sup>(9)</sup>. Estos estudios ponen en evidencia la estrecha asociación que parece existir entre el grado de desarrollo corporal y la proporción de hembras que manifiestan una oleada preovulatoria de LH y la subsecuente función lútea, en respuesta a un tratamiento intermitente de Kiss-10 o GnRH.

En un estudio previo con becerras de 4, 7 y 11 meses de edad, se informó que las becerras de 11 meses en comparación de las de menor edad, presentaron la mayor respuesta de LH a un bolo i.v. de Kiss-10, lo cual coincidió con mayores concentraciones de IGF-1 y estradiol y las menores concentraciones de leptina<sup>(14)</sup>. En el presente estudio, las becerras que presentaron una oleada de LH y formación de CL en respuesta a Kiss-10 presentaron un comportamiento similar en cuanto a IGF-1 y leptina; por lo tanto, la IGF-1 y estradiol podrían modular positivamente los efectos de la kisspeptina en la actividad del eje gonadal, ya que, aparentemente, se requieren concentraciones endógenas relativamente elevadas de dichas hormonas como señal indicadora de desarrollo somático, mientras que los efectos señalizadores de la leptina, si es que se ejercen en becerras, pudieron haber ocurrido mediante incrementos en edades más tempranas, como fue documentado por nuestro grupo en un trabajo anterior<sup>(14)</sup>, donde se determinó que las becerras de 4 y 7 meses de edad tuvieron niveles circulantes de leptina mayores que las de 11 meses de edad; mientras que otros autores no encontraron una asociación consistente entre los niveles de leptina y el inicio de la pubertad en vaquillas<sup>(36,37)</sup>.

En el estudio que aquí se informa, todas las becerras presentaron una liberación pulsátil de LH de características similares en respuesta a

hormones interact to affect multiple neural maturation processes<sup>(38,40)</sup>, including: synaptic plasticity in the GnRH neurons<sup>(41)</sup>, expression of kisspeptin in the anteroventral periventricular nucleus<sup>(42)</sup>, as well as secretion of GnRH and LH<sup>(43,44)</sup>. These processes take place in hypothalamic regions that regulate, at least in rodents, the occurrence of the LH preovulatory surge<sup>(42)</sup>. In heifers under different growth rates, circulating levels of IGF-1 increased during the accelerated growth phase that precedes the onset of puberty<sup>(45)</sup>. In the present work, IGF-1 was positively associated with variables related to body growth, providing support for the idea that IGF-1 is a signal from somatic tissues which participates in the neuroendocrine maturation events that lead toward puberty, including among them the direct or indirect actions involved on kisspeptin secretion and (or) GnRH/LH release. Other evidence that gives support to this concept is that IGF-1 administered to prepuber Rhesus monkeys decreases the LH sensitivity to the negative feedback effects of estrogens<sup>(46)</sup>; besides, in the same animal model, estradiol is essential for the GnRH release evoked by Kiss-10<sup>(47)</sup>. Therefore, IGF-1 and estradiol seem to promote a greater sensitivity of hypothalamus to kisspeptin; once this action is carried out, a change from negative to positive feedback to estradiol in the hypothalamus follows as well as an increase on frequency of LH secretion, then the LH surge and consequently the first ovulation and the onset of puberty.

In prepubertal heifers, circulating leptin increases several weeks prior puberty<sup>(48)</sup>; however, exogenous leptin did not affect LH or age to puberty<sup>(49,50)</sup>, therefore it was proposed that leptin may be a permissive hormone for subsequent actions of other agents such as IGF-1 or estradiol<sup>(49,50)</sup>. In addition, suppressed levels of circulating leptin by food restriction<sup>(9,10)</sup> or by application of antibody against leptin in rats<sup>(9)</sup>, Kiss-10 induced a higher LH rise than control animals who had normal leptin levels; furthermore, Kiss-10 induced puberty in 60 % of underfed rats with low circulating leptin, whereas none of the control animals with normal

la administración intermitente de Kiss-10 durante las primeras 30 h de tratamiento. Por tanto, la oleada de LH y la subsecuente función lútea observada en algunas becerras tratadas con Kiss-10 podrían explicarse, en parte, por un mayor estímulo a la actividad esteroideogénica inducida por las gonadotropinas hipofisarias, en sinergia con un elevado nivel sanguíneo de IGF-1<sup>(38)</sup>, retroalimentando con ello positivamente al componente hipotálamo-hipófisis. Es pertinente mencionar que las borregas y ratas con signos de pubertad en respuesta a la administración repetida de Kiss-10<sup>(9,10,18)</sup>, cursaron también por intervalos de aumentos en las concentraciones sanguíneas de estradiol. Así mismo, en otro estudio se puntualizó que la Kiss-10 administrada en forma continua a borregas adultas, indujo una oleada de LH sólo en aquéllas que respondieron al tratamiento con una elevación de estradiol<sup>(39)</sup>. Estos resultados son sugerentes de que en asociación con el desarrollo somático, el cual podría ser evidenciado indirectamente por IGF-1, la Kiss-10 evoca una respuesta ovulatoria a través de la promoción de una mayor actividad esteroideogénica inducida por la actividad GnRH/LH. En el presente estudio no se cuantificó el estradiol circulante, pero considerando la información existente en la literatura no se puede ignorar la posible interacción entre IGF1 y estradiol en el inicio de la pubertad.

Por otro lado, a nivel del sistema nervioso central, el IGF-1 y el estradiol interactúan en múltiples procesos de maduración neural<sup>(38,40)</sup>, entre los que destacan: plasticidad sináptica en las neuronas GnRH<sup>(41)</sup>, expresión de kisspeptina en el núcleo anteroventral periventricular<sup>(42)</sup> y secreción de GnRH y LH<sup>(43,44)</sup>; procesos que tienen lugar en regiones hipotalámicas encargadas de regular la liberación de LH en forma de oleada<sup>(42)</sup> al menos en roedores, lo cual podría ser un condicionamiento neural en preparación al eventual inicio de la pubertad. En un estudio efectuado en vaquillas productoras de carne con diferente tasa de crecimiento, se puso de manifiesto el incremento de IGF-1 en sangre

leptin began puberty<sup>(10)</sup>. The above discussion allows us to propose that leptin might be an essential element that should increase to threshold levels before puberty, pre-sensitizing the hypothalamus for a subsequent IGF-1 positive action. Once leptin declines, IGF-1 augments and remains elevated in blood for several weeks; then the hypothalamus responds with an enhanced pulsatile release of kisspeptin and GnRH who determine the accelerated rhythm of gonadotropins secretion, which subsequently induces the increased ovarian follicular activity and the rise in circulating estradiol. Increased estrogens evoke the LH surge and thus the first ovulation occurs during the onset of puberty.

In this study, influences of Kiss-10 treatment were transitory and without further effects beyond those described in the preceding paragraphs. After removal of treatment, LH secretion and follicular development returned to values similar to those in the control group; besides in both groups, post-treatment follicular development followed a pattern resembling the reported in growing heifers, namely the diameter of the dominant follicle and number of follicles increased with age<sup>(51,52)</sup>.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

It is concluded that Kiss-10 applied repeatedly to prepubertal heifers evokes a consistent release of LH and induces ovulation and luteal activity in animals with high IGF-1 but low leptin circulating concentrations; however, Kiss-10 did not induce estrous cyclicity. An implication is that factors that were not evaluated in this work could be present or absent in prepubertal heifers, modulating the kisspeptin effects that would lead to the ovulatory response and the subsequent cyclic activity.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of the first author doctoral dissertation. Authors wish to express their

durante el desarrollo somático precedente al inicio de la pubertad<sup>(45)</sup>. En el presente trabajo, el IGF-1 se asoció positivamente con variables relacionadas con el crecimiento corporal, proporcionando apoyo al concepto de que el IGF-1 es la señal de origen somático que inicia eventos de maduración neuroendocrina conducentes a la pubertad, incluyendo acciones directas o indirectas en la regulación de la secreción de la kisspeptina hipotalámica o los efectos de la Kiss-10 en la secreción de GnRH/LH. Otras evidencias a favor de dicho concepto se refieren a que el IGF-1 administrado a monas Rhesus durante la adolescencia, disminuye la sensibilidad de la LH a la retroalimentación negativa de los estrógenos<sup>(46)</sup>. Por otro lado, también en monas Rhesus en fase puberal se demostró que el estradiol es indispensable para evocar un aumento de GnRH en respuesta a Kiss-10<sup>(47)</sup>. Por tanto, el IGF-1 y estradiol parecen promover a nivel central una mayor sensibilidad del hipotálamo a la kisspeptina, con lo cual se podría inducir un cambio de retroalimentación negativo a positivo del estradiol en la secreción de LH, y consecuentemente la ovulación.

Con relación a leptina, se ha reportado en vaquillas que los niveles de ésta aumentan en las semanas próximas a la pubertad<sup>(48)</sup>, sin embargo, se ha determinado que sus efectos son permisivos mas no inductivos para el inicio de la misma, pues la leptina exógena no fue suficiente estímulo para aumentar la LH y adelantar la pubertad en vaquillas<sup>(49,50)</sup>. Además, en ratas con niveles suprimidos de leptina mediante restricción alimenticia<sup>(9,10)</sup> o mediante la aplicación de anticuerpo contra leptina<sup>(9)</sup>, la Kiss-10 indujo un mayor incremento de LH comparado con los testigos que mostraron niveles normales de leptina. Por otro lado, la supresión de leptina por restricciones de la dieta, indujo la pubertad en 60 % de las ratas tratadas con Kiss-10 en comparación de las ratas con niveles normales de leptina (0 %)<sup>(10)</sup>. Lo anterior, nos permite proponer que antes del inicio de la pubertad la leptina alcanza una concentración umbral que posteriormente declina antes de la primera ovulación; en

appreciation to UNAM, CONACyT and INIFAP for the economic support provided to the first author. Authors also express their gratitude to Dr. Clara Murcia Mejía, who quantified all hormones studied here.

*End of english version*

---

seguida el IGF-1 aumenta en sangre y se mantiene elevado, señalizando positivamente al hipotálamo, quien responde con un aumento en la frecuencia pulsátil de kisspeptina y de GnRH, ocasionando aumentos sincrónicos de las gonadotropinas hipofisarias, lo que a su vez evocaría el aumento de actividad folicular, un incremento del estradiol circulante, la presentación de la oleada preovulatoria de LH y con ello el desencadenamiento de la pubertad.

En términos prácticos, el tratamiento de Kiss-10 fue transitorio y sin repercusión posterior, ya que luego de retirar el tratamiento tanto la secreción de LH como el desarrollo de las ondas foliculares fueron similares a los del grupo testigo. En ambos grupos experimentales, el desarrollo folicular postratamiento siguió un comportamiento característico de las vaquillas en crecimiento, es decir hubo un aumento asociado con la edad<sup>(51,52)</sup>.

## **CONCLUSIONES E IMPLICACIONES**

Se concluye que la Kiss-10 administrada repetidamente a becerras pre-púberes es un estímulo suficiente para evocar incrementos consistentes de LH, para inducir la ovulación y actividad lútea en animales con concentraciones séricas elevadas de IGF-1 y bajas de leptina, pero no para inducir la ciclicidad estral. Una implicación es que factores diferentes a los aquí evaluados, que están presentes o ausentes en la becerria pre-púber, determinan los efectos de la kisspeptina en la respuesta ovulatoria y subsecuente actividad ovárica cíclica.

## AGRADECIMIENTOS

Esta información es parte del proyecto de investigación del programa de estudios de Doctorado del primer autor (FMVZ-UNAM). Se agradece a la UNAM, CONACyT e INIFAP por los apoyos económicos proporcionados al primer autor para el desarrollo de sus actividades académicas y de investigación. Se agradece a la MVZ Clara Murcia Mejía, por la cuantificación de hormonas.

## LITERATURA CITADA

- Patterson DJ, Perry RC, Kiracofe GH, Bellows RA, Staigmiller RB, Corah LR. Management considerations in heifer development and puberty. *J Anim Sci* 1992;70:4018-4035.
- Williams GL, Amstalden M. Understanding postpartum anestrus and puberty in the beef. *Proc Appl Reprod Strategies in Beef Cattle 2010*. San Antonio, TX. [on line] [http://www.appliedreprostrategies.com/2010/January/pdfs/Gary\\_Williams.pdf](http://www.appliedreprostrategies.com/2010/January/pdfs/Gary_Williams.pdf). Accessed May, 2013.
- Ebling JP. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 2005;129(6):675-683.
- Moenter SM, DeFazio AR, Pitts GR, Nunemaker CS. Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 2003;24(2):79-97.
- Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. New *frontiers* in Kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 2008;29:48-69.
- Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009;30:713-743.
- Caraty A, Smith JT, Lomet D, Said SB, Morrissey A, Cognie J, *et al.* Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 2007;148:5258-5267.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, *et al.* Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *PNAS* 2005;102:1761-1766.
- Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, *et al.* Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 2004;561:379-386.
- Castellano J, Navarro V, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, *et al.* Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 2005;146:3917-3925.
- Arreguin-Arevalo JA, Lents CA, Farmieri TA, Nett TM, Clay CM. KiSS-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci* 2007;10:265-275.
- Kadokawa H, Matsui M, Hayashi K, Matsunaga N, Kawashima C, Shimizu T, *et al.* Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *J Endocrinol* 2008;196:331-334.
- Ezzat-Ahmed A, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Yamashita T, Hirata T-I, *et al.* Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *J Reprod Dev* 2009;55:650-654.
- Alamilla RM. Respuesta de LH, FSH y GH a una aplicación de kisspeptina en becerras prepúberes de diferentes edades y su asociación con las concentraciones circulantes de leptina, IGF-1 y estradiol [tesis maestría]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
- Santos ER, Calderón RRC, Rosete FVJ, Arreguín AJA, Vera AHR, Gutiérrez ACG, *et al.* Efecto de dos dosis de kisspeptina-10 (Kiss-10) en la liberación de LH y FSH y su asociación con la composición corporal y leptina sérica en becerras prepúberes [resumen]. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. 2011:113.
- McLeod BJ, Peters AR, Haresign W, Lamming GE. Plasma LH and FSH responses and ovarian activity in prepubertal heifers treated with repeated injections of low doses of GnRH for 72 h. *J Reprod Fert* 1985;74:589-595.
- Skaggs CL, Able BV, Stevenson JS. Pulsatile or continuous infusion of luteinizing hormone-releasing hormone and hormonal concentrations in prepubertal beef heifers. *J Anim Sci* 1986;62:1034-1048.
- Redmond RS, Macedo GG, Velez IC, Caraty A, Williams GL, Amstalden M. Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction* 2011;141:541-548.
- García E. Modificaciones al Sistema de Clasificación climática de Köppen. 4th ed., Instituto de Geografía, UNAM, México, 194; 1988.
- Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Bowman RL, Troutt HF, Lesch TN. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *JDS* 1982;65:495-501.
- Williams AR. Ultrasound applications in beef cattle carcass research & management. *J Anim Sci* 2002;80(Suppl 2):183-188.
- Calderón RRC, Villa-Godoy A, Lagunes LJ, Fajersson P. Desarrollo folicular en vaquillas cebú y suizo pardo peripúberes en condiciones tropicales. *Téc Pecu Méx* 2000;38:163-175.
- Arrieta E, Porrás A, González-Padilla E, Murcia C, Rojas S, Perera-Marín G. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinising hormone during the luteal phase. *Reprod Fert Dev* 2006;18:485-495.
- Perera-Marín G, Murcia C, Rojas S, Hernández-Cerón J, González-Padilla E. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Anim Reprod Sci* 2005;86:53-69.
- Delavaud C, Ferlay A, Faulconnier Y, Bocquier F, Kann G, Chilliard Y. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J Anim Sci* 2002;80:1317-1328.
- Pierson RA, Ginther JO. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 1984;21(3):495-504.

27. SAS. Statistical Analysis System Institute Inc, Cary, NC, USA. 2002.
28. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, *et al.* Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005;25:11349-11356.
29. Goodman RL, Karsch FJ. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology* 1980;107:1286-1290.
30. Wang J, Sun L, Zhang T, Zhou H, Lou Y. Effect of peripheral administration of kisspeptin-10 on dynamic LH secretion in prepubertal ewes. *AJAS* 2012;25:785-788.
31. Hashizume T, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Ezzat AA, Sawai K, *et al.* Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Anim Reprod Sci* 2010;118:37-41.
32. Tovar S, Vázquez MJ, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Vigo E *et al.* Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology* 2006;147:2696-2704.
33. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, *et al.* Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 2004;145:4565-4574.
34. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plan TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *PNAS* 2005;102:2129-2134.
35. Pirl KG, Adams TE. Induction of precocious puberty in ewe lambs by pulsatile administration of GnRH. *J Reprod Fert* 1987;80:355-359.
36. Zulu VCh, Nakao T, Sawamuka Y. Insulin-growth like factor I as a possible hormonal mediator nutritional regulation of reproduction in cattle. *J Vet Med Sci* 2002;64(8):657-665.
37. Block SS, Smith JM, Ehrhardt RA, Diaz MC, Rhoads RP, Van Amburgh ME Boisclair YR. Nutritional and developmental regulation of plasm leptin in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2003;86:3206-3214.
38. Chelikani PK, Ambrose DJ, Keisler DH, Kennelly JJ. Effects of dietary energy and protein density on plasma concentration of leptin and metabolic hormones in dairy heifers. *J Dairy Sci* 2009;92:1430-1441.
39. Sébert ME, Lomet D, Ben Saïd S, Monget P, Briant C, Scaramuzzi RJ, *et al.* Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol. *Dom Anim Endo* 2010;38:289-298.
40. Mendez, P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Interdependence of oestrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: potential for analysing neuroprotective mechanisms. *J Endocrinol* 2005;185:11-17.
41. DiVall SA, Williams TR, Carver SE, Koch L, Brüning JC, Kahn R, *et al.* Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. *JCI* 2010;120:2900-2909.
42. Hiney JK, Srivastava VK, Pine MD, Dees WL. Insulin-like growth factor-I activates KiSS-1 gene expression in the brain of the prepubertal female rat. *Endocrinology* 2009;150:376-384.
43. Hiney JK, Srivastava V, Nyberg CL, Ojeda SR, Dees WL. Insulin-like growth factor-I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology* 1996;137:3717-3727.
44. Hiney JK, Srivastava V, Dearth RK, Dees WL. Influence of estradiol on insulin-like growth factor-1-induced luteinizing hormone secretion. *Bra Res* 2004;1013:91-97.
45. Yelich JV, Wettemann RP, Marston TT, Spicer LJ. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Dom Anim Endocrinol* 1996;13:325-338.
46. Wilson ME. IGF-I administration advances the decrease in hypersensitivity to oestradiol negative feedback inhibition of serum LH in adolescent female rhesus monkeys. *J Endocrinol* 1995;145(1):121-130.
47. Guerriero KA, Keen KL, Millar RP, Terasawa E. Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): implication to the mechanism of puberty. *Endocrinology* 2012;153:825-836.
48. Garcia MR, Amstalden M, Williams SW, Stanko RL, Morrison CD, Keisler DH, Nizielski SE, Williams GL. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J Anim Sci* 2002;80:2158-2167.
49. Maciel MN, Zieba DA, Amstalden M, Keisler DH, Neves JP, Williams GL. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: Effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. *J Anim Sci* 2004;82:2930-2936.
50. Zieba DA, Amstalden M, Morton S, Maciel MN, Keisler DH, Williams GL. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. *BOR* 2004;71:804-812.
51. Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci* 2003;78:259-270.
52. Nogueira GP. Puberty in south american bos indicus (Zebu) cattle. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:361-372.

## **Capítulo VII**

### **EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL EJE GONADOTRÓPICO A DOSIS BAJAS DE KISSPEPTINA-10 EN BECERRAS PRE-PÚBERES**

## EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL EJE GONADOTRÓPICO A DOSIS BAJAS DE KISSPEPTINA-10 EN BECERRAS PRE-PÚBERES

### RESUMEN

En becerras pre-púberes, la kisspeptina-10 ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal) aplicada repetidamente durante 3 d induce incrementos de hormona luteinizante (LH) que disminuyen en magnitud con cada aplicación y provoca la ovulación en 28 % de ellas. El objetivo de este estudio fue determinar si a dosis menores a  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  la kisspeptina-10 es capaz de inducir incrementos similares o crecientes de LH en aplicaciones sucesivas. Se usaron seis becerras Holstein o Suizo Pardo por Cebú (8 a 9 meses de edad y  $145.2 \pm 1.57$  kg de peso). El diseño experimental fue un Cuadrado Latino 6x6 (semanas x unidades experimentales) y seis dosis de kisspeptina-10 como tratamientos: 0.1, 1, 2, 3, 4 y  $5 \mu\text{g/ kg}^{-1}$  de peso. Cada semana de prueba las dosis fueron administradas intravenosamente de manera repetida de acuerdo a la aleatorización de tratamientos entre becerras (tres aplicaciones separadas entre sí por periodos de 2 h). Para cuantificar LH (RIA), en cada tratamiento se recolectó sangre cada 15 min de -0.5 a +6 h de la primera aplicación. Cada aplicación de kisspeptina-10 indujo un incremento de LH cuyo valor máximo se observó 15 min pos-tratamiento. El área bajo la curva (AUC) del incremento de LH inducido por  $0.1 \mu\text{g}$  de kisspeptina-10  $\text{kg}^{-1}$  ( $1.87 \pm 0.23$  ng) fue menor ( $p \leq 0.05$ ) que el inducido por 1, 2, 3, 4 ó  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , y similar entre estas últimas dosis ( $6.59 \pm 0.51$ ,  $8.47 \pm 0.51$ ,  $6.94 \pm 0.45$ ,  $7.31 \pm 0.45$  y  $7.72 \pm 0.52$  ng, respectivamente;  $p > 0.05$ ). Excepto la dosis menor de kisspeptina-10, el resto de las dosis indujeron una disminución en el AUC de LH ( $p \leq 0.05$ ) en las aplicaciones sucesivas. Se concluye que el eje gonadotrópico de becerras pre-púberes es sensible a kisspeptina-10 en dosis menores a  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , y que de las dosis probadas la única capaz de inducir incrementos de LH similares en aplicaciones sucesivas fue la de  $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso.

Palabras clave: becerras pre-púberes, kisspeptina-10, hormona luteinizante.

## INTRODUCCIÓN

La kisspeptina corresponde a una familia de cuatro neuropéptidos codificados por el gen *Kiss1*, los cuales son producidos principalmente por neuronas del hipotálamo; estos neuropéptidos contienen 54, 14, 13 y 10 aminoácidos (kisspeptina-54, -14, -13 y -10) y todos activan eficientemente al receptor GPR54 (Oakley *et al.*, 2009).

Las kisspeptinas son activadoras del eje reproductivo, regulando la secreción de las gonadotropinas hipofisarias (hormona luteinizante, LH y folículo estimulante, FSH), mediante el control de la actividad de las neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Arreguin-Arevalo *et al.*, 2007). En becerras pre-púberes, un bolo intravenoso de 5  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10  $\text{kg}^{-1}$  de peso induce un incremento en la concentración circulante de LH (Kadokawa *et al.*, 2008; Ezzat *et al.*, 2009) y FSH (Ezzat *et al.*, 2009). El tratamiento con kisspeptina-10 en forma repetida induce incrementos sucesivos de LH en forma de pulsos (Santos *et al.*, 2014), y en animales con concentraciones altas del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), dicho tratamiento induce una oleada preovulatoria de LH, ovulación y formación de cuerpo lúteo (CL) (Santos *et al.*, 2014). Sin embargo, en el estudio anterior también se observó una disminución en la respuesta de secreción de LH inducida por kisspeptina-10 a medida que se repetían las aplicaciones de ésta, posiblemente debido a una desensibilización de los receptores GPR54 en las neuronas productoras de GnRH.

En vacas, el eje gonadotropotrópico es sensible a dosis tan bajas como 0.6  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10  $\text{kg}^{-1}$  de peso, al menos en la respuesta de LH (Whitlock *et al.*, 2011). Asimismo, dosis relativamente bajas de kisspeptina estimulan la liberación de LH en cabras (1  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10  $\text{kg}^{-1}$  p.v.; Hashizume *et al.*, 2010) y borregas adultas (0.15  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10  $\text{kg}^{-1}$  p.v.; Caraty *et al.*, 2007). No obstante, queda pendiente determinar si a dosis bajas de kisspeptina-10, se manifiesta la disminución en la respuesta de secreción de LH por administración repetida del neuropéptido cómo fue observado en becerras pre púberes con dosis de 5  $\mu\text{g}$   $\text{kg}^{-1}$  de p.v. (Santos *et al.*, 2014). La hipótesis del presente estudio fue que el eje gonadotrópico de las becerras pre-púberes es sensible a kisspeptina-10 en dosis menores a 5  $\mu\text{g}$   $\text{kg}^{-1}$  de

peso y que bajo estas condiciones es posible evitar la desensibilización de la respuesta de LH por administración repetida del neuropéptido. El objetivo fue identificar si a dosis bajas la kisspeptina-10 es capaz de inducir incrementos similares o crecientes de LH en aplicaciones sucesivas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los procedimientos aplicados en el presente estudio fueron aprobados por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (Programa de Posgrado, FMVZ, UNAM). El sitio experimental (Las Margaritas, Hueytamalco, Pue.) está ubicado a 19° 51' 03" N, 97° 12' 48" O y 500 msnm.

### **Tratamientos**

Se usaron seis becerras Holstein o Suizo Pardo por Cebú (8 a 9 meses de edad y 145.2±1.57 kg de peso), a las cuales se les administraron seis dosis diferentes de kisspeptina-10: 0.1, 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal. Cada dosis fue administrada intravenosamente de manera repetida (tres aplicaciones separadas entre sí por 2 h), con un intervalo entre aplicaciones de dosis/becerra de 7 días. En el presente estudio se usó kisspeptina-10 bovina (YNWNSFGLRY-NH<sub>2</sub>; Oakley *et al.*, 2009) con >95 % de pureza (Proimmune, Oxford, UK). La kisspeptina-10 fue diluida en solución salina fisiológica (1:125) y administrada a través de un catéter (Sonda Kortex calibre 5 FR y longitud 90 cm; K-733, Trokar S.A de C.V) insertado en una de las venas yugulares. Este mismo catéter fue utilizado para el muestreo sanguíneo que se describe posteriormente.

### **Manejo general y registro de medidas corporales**

Las becerras fueron alojadas individualmente en corrales de 2.5 x 4.5 m, con piso de cemento, área techada (2.5 x 2.7 m), comederos y bebederos. Las becerras se introdujeron a los corrales un mes antes del experimento y, durante ese periodo, se sometieron a sujeción con reata (2 h d<sup>-1</sup>), cepillado de pelo y acostumbramiento a la presencia de personas. La alimentación consistió en heno de avena a libertad (95 %

MS, 8 % PC y 2.3 Mcal de EM kg<sup>-1</sup>), 2 kg d<sup>-1</sup> de alimento concentrado (95 % MS, 18 % PC y 2.5 Mcal de EM kg<sup>-1</sup>) y sales minerales y agua a libre consumo.

El peso vivo de los animales se registró a su llegada a los corrales de experimentación y al inicio y al final del estudio; a partir de estos registros se determinó la ganancia diaria de peso (GDP) durante los periodos de adaptación y experimental. Al inicio y al final del periodo experimental, en cada becerro se determinó la altura a la cruz (distancia entre el piso y la unión escapular), condición corporal (escala de 1 a 5 puntos; Wildman *et al.*, 1982), grosor de la grasa dorsal y profundidad del músculo *Longissimus dorsi*. El grosor de la grasa dorsal y la profundidad del músculo *Longissimus dorsi* (medidos entre las costillas 12 y 13, en el costado izquierdo del animal), fueron determinados mediante ultrasonografía, utilizando un aparato Kaixin 5000 y transductor lineal de 3.5 MHz (Xuzhou Kaixin Electronic Instrument Co. Jiangsu, China).

### **Muestras sanguíneas**

Asociado con la administración repetida de cada dosis de kisspeptina-10 se recolectaron muestras sanguíneas cada 15 min, iniciando 30 min antes y finalizando 6 h después de la primera inyección. En estas muestras se determinó LH por radioinmunoanálisis (RIA) y en las muestras recolectadas antes de la primera aplicación de kisspeptina-10 (muestras -2, -1 y 0) de la primer y última semana de estudio se cuantificó leptina mediante RIA e IGF-I mediante un ensayo inmunoabsorbente (ELISA). Para los análisis estadísticos de leptina e IGF-I se uso el promedio de esas tres muestras.

### **Análisis de hormonas**

El RIA para LH fue en fase líquida siguiendo el procedimiento descrito por Arrieta *et al.* (2005). La hormona USDA-bLH (AFP11743B) se utilizó como trazador incorporando Na<sup>125</sup>I mediante el método del lodo-gen y como curva patrón las mediciones para dosis de 0.01 a 10 ng tubo<sup>-1</sup>. El primer anticuerpo generado en conejo correspondió a la hormona NIDDK-oLH-26 (anti-oLH-26), fue validado en suero de bovinos por Perera-Marín *et al.* (2005) y se aplicó en el presente estudio a

una dilución de 1:400,000. La separación de la fracción unida de la fracción libre fue realizada con un segundo anticuerpo contra IgG de conejo generado en burro (dilución 1:80). La sensibilidad de los ensayos fue  $0.03 \text{ ng mL}^{-1}$  y los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron 6.73 % y 6.57 %. El ELISA para IGF-I fue un sistema cuantitativo (IGF-I ELISA®, 22-IGFHU-E01; ALPCO Diagnostics, Salem, NH), con sensibilidad de  $5.86 \text{ ng mL}^{-1}$  y CV intra-ensayo de 0.57 %. EL RIA para leptina fue un sistema multiespecie de fase líquida (XL-85K, Linco Research Inc, St. Charles, MO), con sensibilidad de  $1.0 \text{ ng mL}^{-1}$  y CV intra-ensayo de 6.42 %.

### **Variables de respuesta**

Un incremento de LH inducido por kisspeptina-10 fue considerado cuando luego de su administración, la concentración de LH fue mayor al promedio más dos desviaciones estándar de las concentraciones de la hormona en las muestras -2, -1 y 0 con relación al inicio de los tratamientos (concentración basal).

Para conocer las diferencias en la magnitud de la respuesta de LH inducida por las dosis de kisspeptina-10, se determinó el valor máximo (VMax), amplitud (Amp) y área bajo la curva (AUC) de las concentraciones hormonales que superaron el umbral descrito. La Amp fue la diferencia entre Vmax y la concentración basal. Para estimar el AUC se usó la regla del trapecio y esta variable se reportó como unidades arbitrarias. El VMax fue la concentración mayor detectada en cada incremento de LH inducido por kisspeptina-10.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Los cambios en las medidas corporales (peso corporal, GDP, altura a la cruz, condición corporal, grosor de la grasa dorsal y profundidad del músculo *Longissimus dorsi*) y la concentración de IGF-I y leptina a través del periodo experimental fueron analizados mediante una prueba de t para medidas pareadas.

El diseño fue un Cuadrado Latino 6x6x6 (filas=becerras, columnas=semanas, tratamientos=dosis de kisspeptina-10) y para el análisis de los datos que se registraron en varias ocasiones a través del periodo experimental (concentración

media, Ampl, VMax y AUC) fue mediante ANDEVA con mediciones repetidas (GLM de SAS, 2002); en el model se incluyó fila, columna, tratamientos, tiempo tratamiento\*tiempo. La separación de medias se realizó con el procedimiento LSMEANS y el criterio para definir significancia de los efectos probados y diferencias entre medias fue ( $p \leq 0.05$ ).

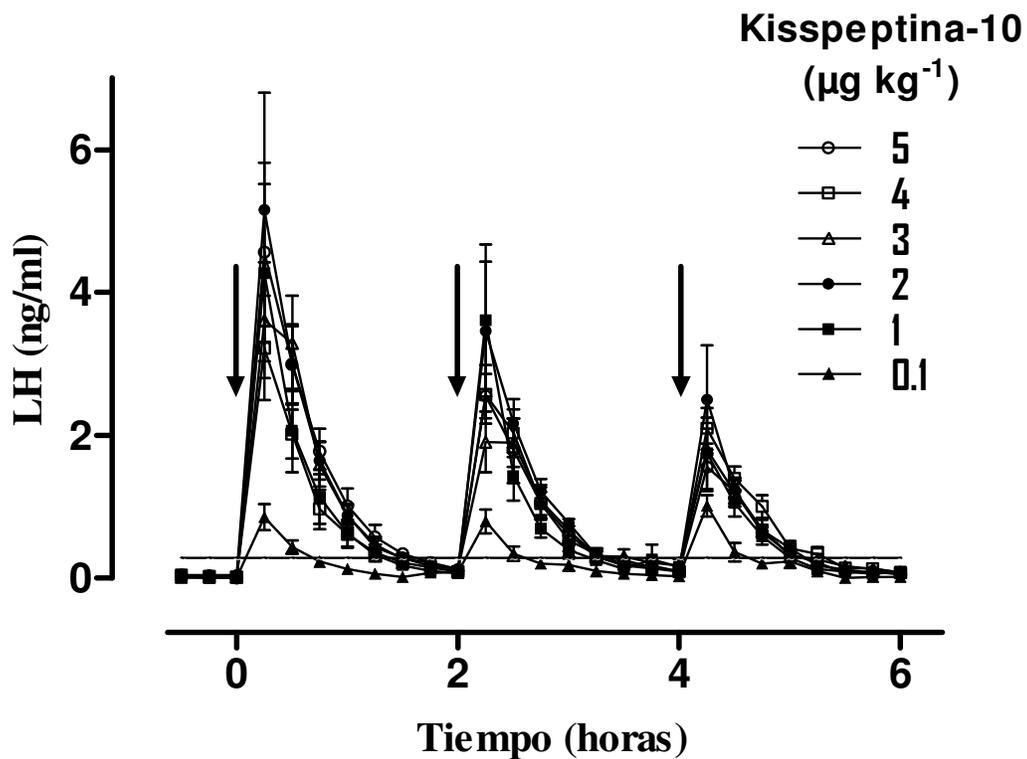
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los animales tuvieron una GDP, de su ingreso a los corrales a la finalización del periodo de adaptación de  $0.896 \pm 0.09 \text{ kg d}^{-1}$  y de  $0.653 \pm 0.05 \text{ kg d}^{-1}$  del inicio al final del periodo experimental, lo que indica que estaban en balance positivo de energía. Durante el periodo experimental, las becerras ganaron peso, estatura y masa muscular indicada por la profundidad del músculo *Longissimus dorsi*; por el contrario, los animales no aumentaron su condición corporal ni el grosor de la grasa dorsal (Cuadro 1). Debido a que el tejido adiposo no se acrecentó, las concentraciones de leptina se mantuvieron sin cambio a lo largo del estudio; en contraste, se observó un incremento en las concentraciones de IGF-I, como corresponde a becerras en la fase de crecimiento (Yelich *et al.*, 1996).

**Cuadro 1. Media  $\pm$  error estándar de las medidas corporales y concentración sérica de leptina e IGF-I en becerras pre-púberes previo a los desafíos inicial y final con kisspeptina-10.**

| Variable                                | Periodo experimental |                   | p=    |
|-----------------------------------------|----------------------|-------------------|-------|
|                                         | Inicial (n=6)        | Final (n=6)       |       |
| Peso corporal, kg                       | 146.8 $\pm$ 5.59     | 164.6 $\pm$ 5.59  | 0.001 |
| Ganancia diaria de peso, kg             | 0.896 $\pm$ 0.09     | 0.653 $\pm$ 0.05  | 0.156 |
| Altura a la cruz, cm                    | 104.0 $\pm$ 1.86     | 106.0 $\pm$ 1.48  | 0.039 |
| Condición corporal, punto               | 2.50 $\pm$ 0.12      | 2.66 $\pm$ 0.10   | 0.465 |
| Grosor de grasa dorsal, mm              | 2.28 $\pm$ 0.11      | 2.38 $\pm$ 0.15   | 0.557 |
| Profundidad músculo <i>L dorsi</i> , mm | 23.56 $\pm$ 1.36     | 27.21 $\pm$ 0.93  | 0.035 |
| Leptina en suero, ng mL <sup>-1</sup>   | 1.26 $\pm$ 0.35      | 1.89 $\pm$ 0.67   | 0.345 |
| IGF-I en suero, ng mL <sup>-1</sup>     | 114.8 $\pm$ 20.3     | 181.9 $\pm$ 11.92 | 0.019 |

El eje gonadotrópico de las becerras fue sensible a todas las dosis de kisspeptina-10, ya que las concentraciones séricas de LH se incrementaron con la aplicación de cada una de éstas (Figura 1). En todas las dosis probadas, el VMax del incremento de LH inducido por kisspeptina-10 fue observado a los 15 min pos-tratamiento. Lo observado en este estudio y uno previo (Santos *et al.*, 2014) confirman el potente efecto de kisspeptina-10, administrada repetidamente, en la actividad del eje gonadotrópico de becerras pre-púberes, como sucede en corderas (Redmond *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Perfil de hormona luteinizante (LH; media  $\pm$  error estándar de la media) en becerras pre-púberes tratadas con diferentes dosis de kisspeptina-10 (flechas), aplicadas tres veces a intervalos de 2 h. La línea horizontal corresponde a la media + dos desviaciones estándar de la concentración basal. n= 6 becerras para cada tratamiento

En un análisis detallado, se observó que la magnitud de la respuesta de LH a kisspeptina-10 dependió de la dosis (efecto de dosis,  $p \leq 0.05$ ). El VMax, Ampl y AUC de LH en respuesta a kisspeptina-10 fue menor ( $p \leq 0.05$ ) cuando las becerras fueron tratadas con  $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$  comparado con el resto de las dosis (Cuadro 2). De acuerdo a VMax y Ampl, la magnitud de la respuesta de LH a kisspeptina-10 fue similar cuando las becerras fueron tratadas con 1 a  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 2. Media  $\pm$  error estándar del valor máximo (VMax), amplitud (Ampl) y área bajo la curva (AUC; unidades arbitrarias) de las concentraciones de hormona luteinizante (LH) posteriores a la administración de diferentes dosis de kisspeptina-10  $\text{kg}^{-1}$  de peso en becerras pre-púberes.**

| Kisspeptina-10<br>( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | Concentración LH ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) |                              |                              |
|---------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                             | VMax <sup>†</sup>                        | Ampl <sup>†</sup>            | AUC <sup>†</sup>             |
| 5.0 (n=6)                                   | 2.91 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>             | 2.77 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup> | 115.7 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup> |
| 4.0 (n=6)                                   | 2.64 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>             | 2.53 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup> | 104.0 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup> |
| 3.0 (n=6)                                   | 2.62 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>             | 2.48 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup> | 117.0 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup> |
| 2.0 (n=6)                                   | 3.74 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>             | 3.59 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup> | 127.8 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup> |
| 1.0 (n=6)                                   | 3.26 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>             | 3.19 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup> | 93.6 $\pm$ 9.8 <sup>b</sup>  |
| 0.1(n=6)                                    | 0.88 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>             | 0.83 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup> | 25.2 $\pm$ 9.8 <sup>c</sup>  |

<sup>†</sup>literales distintas entre líneas difieren ( $p \leq 0.05$ )

No se encontró en la literatura disponible algún estudio en becerras pre-púberes donde examinaran el efecto de kisspeptina-10 administrada en varias dosis y en dosis menores a 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso. Por tanto, aparentemente el presente estudio es el primero donde se informa que la sensibilidad del eje gonadotrópico de becerras pre-púberes a kisspeptina-10, al menos en lo que a la liberación de LH se refiere, es mucho mayor a la que asumíamos (Santos *et al.*, 2014). En el presente estudio se demostró que las becerras pre-púberes responden a una dosis que es 50 veces menor a la dosis experimental comúnmente usada (Kadokawa *et al.*, 2008; Ezzat *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2014). Estos resultados confirman los de Redmond *et al.* (2011) en corderas, Caraty *et al.* (2007) en borregas adultas y Whitlock *et al.* (2011) en vacas lecheras quienes informaron que el eje gonadotrópico de las hembras peripuberales y adultas responde a una dosis menor a 1  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10  $\text{kg}^{-1}$  de peso, antecedentes que permitieron emitir la hipótesis de este estudio. Por tanto, en becerras pre-púberes es factible bajar significativamente la dosis de kisspeptina-10 obteniendo una la respuesta de LH similar, lo cual representaría una disminución

significativa en el costo por concepto de adquisición del péptido para cuando se diseñen tratamientos reproductivos “comerciales” basados en kisspeptina.

Con respecto a las aplicaciones repetidas del neuropéptido, se detectó un efecto de periodo ( $p \leq 0.05$ ) para VMax, Ampl y AUC, mismo que indicó que la magnitud de la LH liberada disminuyó con cada cada aplicación del kisspeptina-10 (Cuadro 3). Adicionalmente se detectó un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) de la interacción dosis de kisspeptina-10 por periodo en el AUC de LH (Figura 2). Dicha interacción indicó que la magnitud de la respuesta de LH a inyecciones sucesivas de kisspeptina-10 disminuyó cuando las becerras fueron tratadas con dosis de entre 5 y 1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso, fenómeno que no fue observado cuando las becerras recibieron 0.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Figura 2), ya que en esta dosis, el AUC de LH fue similar ( $p \geq 0.05$ ) entre aplicaciones. Además, el AUC de LH producto de la tercera aplicación de kisspeptina-10 fue similar en todas las dosis evaluadas ( $p > 0.05$ ). Lo anterior significa que la dosis menor induce una respuesta similar entre aplicaciones y similar a la de dosis mayor después de la segunda aplicación.

**Cuadro 3. Media  $\pm$  error estándar del valor máximo (VMax), amplitud (Ampl) y área bajo la curva (AUC; unidades arbitrarias) de las concentraciones de hormona luteinizante (LH) posteriores a cada aplicación de kisspeptina-10 en becerras pre-púberes.**

| Aplicación                | Concentración LH ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) |                               | AUC <sup>†</sup>               |
|---------------------------|------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                           | VMax <sup>†</sup>                        | Ampl <sup>†</sup>             |                                |
| 1 <sup>a</sup> Iny (n=36) | 3.75 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>             | 3.73 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>  | 130.6 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>   |
| 2 <sup>a</sup> Iny (n=36) | 2.47 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>             | 2.30 $\pm$ 0.27 <sup>bc</sup> | 98.2.0 $\pm$ 6.9 <sup>bc</sup> |
| 3 <sup>a</sup> Iny (n=36) | 1.80 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>             | 1.66 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>  | 62.8 $\pm$ 6.8 <sup>c</sup>    |

<sup>†</sup>literales distintas entre líneas difieren ( $p \leq 0.05$ ).

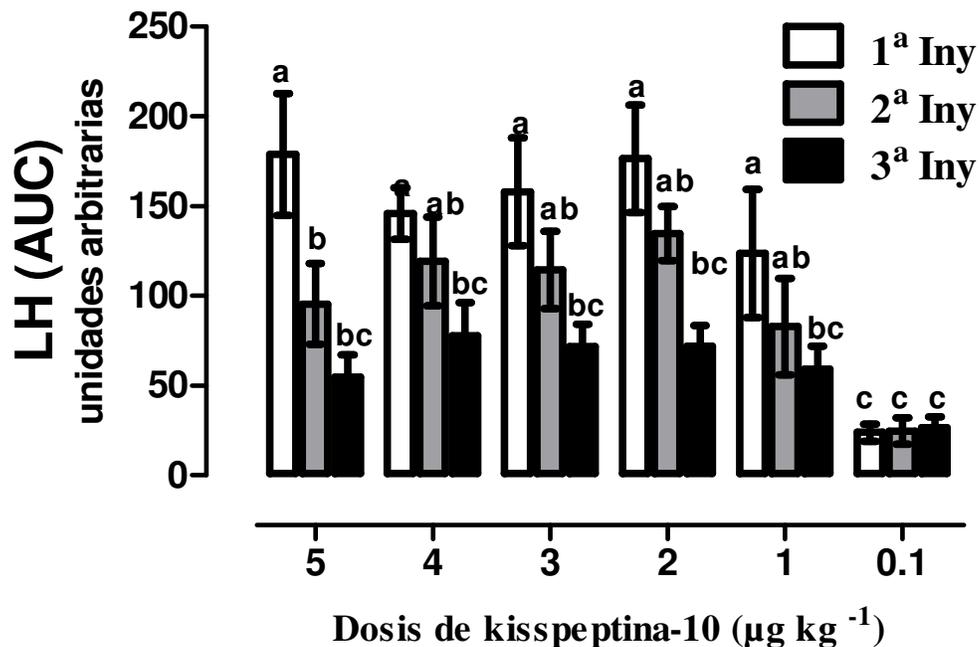


Figura 2. Área bajo la curva (AUC) del incremento de hormona luteinizante (LH) inducido por diferentes dosis de kisspeptina-10 administrada en tres aplicaciones cada 2 h. Interacción dosis de kisspeptina-10 por periodo ( $p \leq 0.05$ ). <sup>abc</sup> Literales distintas denotan diferencias ( $p \leq 0.05$ ).  $n = 6$  becerras para cada tratamiento.

Con base en estos resultados, es factible proponer que la kisspeptina-10 podría provocar una desensibilización del eje gonadotrópico cuando se administra en dosis de 1 a 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso pero no cuando se administra a la dosis menor. Al respecto, está demostrado que en animales peri-puberales y bajo condiciones normales de alimentación, la infusión de kisspeptina-10 en dosis mayores a 2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso provoca desensibilización del eje gonadotrópico en monos Rhesus (Seminara *et al.*, 2006) y ratas hembras (Roa *et al.*, 2008). Con base en información generada en tejidos hipotalámicos de ratones se sugirió que el tratamiento intermitente de kisspeptina desensibiliza la secreción de GnRH cuando los procesos de transcripción y secreción de GnRH no están acoplados (Choe *et al.*, 2013) y por tanto la GnRH liberable disminuye. Sin embargo, el hecho de que la administración de NMDA (ácido aspartic N-Methyl-DL) durante la infusión continua de kisspeptina-10 induce un

aumento de LH (Seminara *et al.*, 2006) sugiere que el mecanismo implicado es una desensibilización del receptor GPR54.

Por otro lado, en primates se observó que la secreción hipotalámica de kisspeptina aumenta durante el período de transición de la condición pre-puberal a la puberal (Keen *et al.*, 2008; Guerriero *et al.*, 2012) y que este incremento es concomitante con el de secreción de GnRH (Keen *et al.*, 2008); así mismo, que la mutación espontánea con sobre-expresión del gen *Kiss1* indujo la pubertad prematura en humanos (Teles *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2010). Por tanto, la administración de kisspeptina-10 en dosis, frecuencia y periodo apropiados podría tener implicaciones prácticas en la inducción temprana de la pubertad en hembras bovinas de sistemas tropicales de producción, ya que éstas se caracterizan por una edad tardía al inicio de la actividad reproductiva (Abeygunawardena y Dematawewa, 2004). Una interpretación de los resultados discutidos en este párrafo es que con una dosis de kisspeptina-10 situada entre 1 y 0.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  por h, pudiera ser factible inducir una oleada preovulatoria de LH, ovulación y formación de CL en vaquillas pre-púberes, después de promover un incremento de estradiol salguíneo como ocurre en borregas anéstricas tratadas con kisspeptina-10 (Sébert *et al.*, 2010).

Lo anterior es posible puesto que en borregas peri-púberes, la administración de 0.47  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10  $\text{kg}^{-1}$ , cada hora durante un día, indujo la formación de CL en el 67 % de ellas (Redmond *et al.*, 2011); así mismo, la infusión continua de 0.3  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10  $\text{h}^{-1}$  durante dos días lo hizo en más del 80 % de borregas adultas durante a la mitad del periodo de anestro estacional (Caraty *et al.*, 2007; Sébert *et al.*, 2010). A diferencia de lo observado en ovejas, en becerras pre-púberes la kisspeptina-10 administrada en dosis de 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de peso, cada dos horas durante tres días, indujo la ovulación sólo en 2 de 7 becerras (Santos *et al.*, 2014). Considerando lo observado en roedores (Han *et al.*, 2005) y en un estudio nuestro (capítulo V), dosis elevadas de kisspeptina-10 podrían ser justificadas para aumentar la respuesta de LH solo cuando los individuos son muy jóvenes (Han *et al.*, 2005), que cursan con bajas concentraciones de IGF-I (capítulo V), o cuando se encuentran en balance negativo de energía (Roa *et al.*, 2008). El empleo de dosis menores a 1

$\mu\text{g}$  de kisspeptina-10  $\text{kg}^{-1}$ , en presencia de cantidades adecuadas de agentes señalizadores de origen somático, podrían estimular la ovulación en la mayoría de los individuos, como parece haber ocurrido en las borregas que ovularon en los trabajos antes citados.

Con base en información nuestra (capítulo V), los datos del presente estudio con becerras en crecimiento y la información discutida en el párrafo anterior permite proponer que un tratamiento prolongado con las dosis bajas de kisspeptina-10 empleadas en el presente estudio podrían inducir en becerras de más edad que las aquí utilizadas, una respuesta de LH de mayor magnitud, apoyando el concepto de que la pubertad se presenta cuando hay un aumento sostenido en la secreción endógena de kisspeptina (Guerriero *et al.*, 2012), mayor número de receptores GPR54 (Navarro *et al.*, 2004) y/o mayor eficiencia en el sistema kisspeptidérgico de señalización intracelular a nivel de las neuronas productoras de GnRH (Han *et al.*, 2005).

## **CONCLUSIONES**

El eje gonadotrópico de las becerras pre-púberes es sensible a kisspeptina-10 en dosis menores a  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ , lo cual representa una disminución significativa en el costo por concepto de adquisición del péptido; sin embargo, el citado neuropéptido inhibe el eje gonadotrópico cuando se administran dosis repetidas iguales o mayores a  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso. Aunque de menor magnitud que dosis de  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  o mayores, la dosis de kisspeptina-10 capaz de inducir incrementos de LH similares en aplicaciones sucesivas es  $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Una implicación de lo anterior es que con la aplicación repetida o infusión continua de kisspeptina-10 para intentar promover la pubertad en hembras bovinas, la dosis deberá ser menor a  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso.

## **AGRADECIMIENTOS**

La información que se presenta en este documento forma parte del proyecto de investigación del programa de estudios de Doctorado del primer autor (Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal; FMVZ-UNAM). Se

agradece al CONACyT, UNAM e INIFAP por los apoyos económicos proporcionados al primer autor para el desarrollo de sus actividades académicas. Se agradece a la MVZ Clara Murcia Mejía del Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción, FMVZ-UNAM, por la cuantificación de hormonas. Esta investigación fue parcialmente apoyada por DGAPA-UNAM (PAPIIT- IN205510- UNAM) y fondos fiscales INIFAP (SINASO 18341619576).

### LITERATURA CITADA

- Abeygunawardena H. and C.M.B. Dematawewa. 2004. Pre-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. *Animal Reproduction Science*. 82–83:373–387.
- Arreguin-Arevalo J.A., and T.M. Nett. 2006. A nongenomic action of estradiol as the mechanism underlying the acute suppression of secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes. *Biology of Reproduction* 74: 202-208
- Arreguin-Arevalo J. A., A. Lents C., A. Farmieri T., M. Nett T., and M. Clay C. 2007. KiSS-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Animal Reproduction Science*. 10:265-275.
- Arrieta E., A. Porras, E. González-Padilla, C. Murcia, S. Rojas, and G. Perera-Marín. 2006. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinising hormone during the luteal phase. *Reproduction, Fertility and Development*. 18:485–495.
- Caraty A., T. Smith J, D. Lomet, S. Ben Saíd, A. Morrissey, J. Cognie, B. Doughton, G. Baril, C. Briant, and I. J. Clarke. 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*. 148:5258–5267.
- Choe H.K., H.E. Kim, S.H. Park, H.E. Lee, J.Y. Park, J.Y. Seong, L. S. Lightman, G.H. Son, and K. Kim 2013. Synchronous activation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription and secretion by pulsatile kisspeptin

stimulation. Proceedings of the National Academy of Sciences 110(14): 5677–5682.

Ezzat A. A., H. Saito, T. Sawada, T. Yaegashi, T. Yamashita, T-I. Hirata, K. Sawai, and T. Hashizume. 2009. Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 55:650-654.

Guerriero K.A., K. L. Keen, and E. Terasawa. 2012. Developmental increase in kisspeptin-54 release *in vivo* is independent of the pubertal increase in estradiol in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*. 153:1887-1897.

Han S.K., M. L. Gottsch, K. J. Lee, S. M. Popa, J. T. Smith, S. K. Jakawich, D. K. Clifton, R. A. Steiner, and A. E. Herbison. 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *The Journal of Neuroscience*. 25:11349-11356.

Hashizume T., H. Saito, T. Sawada, T. Yaegashi, A. A. Ezzat, K. Sawai, and T. Yamash. 2010. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Animal Reproduction Science*. 118: 37–41.

Kadokawa H., M. Matsui<sup>1</sup>, K. Hayashi, N. Matsunaga, C. Kawashima, T. Shimizu, K. Kida and A. Miyamoto. 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *Journal of Endocrinology*. 196:331-334.

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

Navarro, V.M., J.M. Castellano, R. Fernández-Fernández, M.L. Barreiro, J. Roa, J.E. Sánchez-Criado, E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla, and M. Tena-

- Sempere. 2004. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of kiss-1 peptide. *Endocrinology* 145:4565–4574.
- Oakley A.E., D. K. Clifton, and R. A. Steiner. 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrine Reviews*. 30:713-743.
- Perera-Marín G., C. Murcia, S. Rojas, J. Hernández-Cerón, and E. González-Padilla. 2005. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Animal Reproduction Science*. 86: 53–69.
- Redmond R. S., G. G. Macedo, I. C. Velez, A. Caraty, G. L. Williams, and M. Amstalden. 2011. Kisspeptin activates the hypothalamic–adenohypophyseal–gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction*. 141:541–548.
- Roa J., E. Vigo, D. García–Galiano, J. M. Castellano, J. M. Navarro, R. Pineda, C. Diéguez, E. Aguilar, L. Pinilla, and M. Tena-Sempere. 2008. Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 294:1088-1096
- Santos E, R., R C Calderón R., H R Vera Ávila, M Perera G, J A Arreguín A, T M Nett, T. M. C G Gutiérrez A, Villa-Godoy A. 2014. Secreción de hormona luteinizante y actividad ovárica en respuesta a kisspeptina-10 administrada en forma repetida y su asociación con IGF-I y leptina séricos en becerras pre-púberes. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuaria*. 5(2):181-200.
- SAS (Statistical Analysis System). 2002. *SAS User's Guide Statistics, Version 9.0*. SAS Institute Inc., Cary, N.C. USA. 956 p.

- Sébert M. E., D. Lomet, S. B. Saïd, P. Monget, C. Briant, R. J. Scaramuzzi, and A. Caraty. 2010. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol. *Domestic Animal Endocrinology*. 38: 289–298.
- Seminara S.B., J. D. Meloni, S. Ramaswamy, F. W. Jr. Crowley, and T. M. Plant. 2006. Continuous human metastin 45–54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology*. 147: 2122–2126.
- Silveira L.G., S. D. Noel, A. P. Silvera-Neto, A. P. Abreu, V. N. Brito, M. G. Santos, S. D. Bianco, W. Kuohung, S. Xu, M. Gryngarten, M. E. Escobar, I. J. Arnhold, B. B. Mendonca, U. B. Kaiser, and A. C. Latronico. 2010. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 95:2276–2280.
- Teles M. G., S. D. Bianco, V. N. Brito, E. B. Trarbach, W. Kuohung, S. Xu, S. B. Seminara, B. B. Mendonca, U. B. Kaiser, and A. C. Latronico. 2008. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *The New England Journal of Medicine*. 358:709–715.
- Whitlock B. K., J. L. Daniel, R. R. Wilborn, H. S. Maxwell, B. P. Steele, and J. L. Sartin. 2011. Effect of kisspeptin on regulation of growth hormone and luteinizing hormone in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2:131-140.
- Wildman E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Bowman, H. F. Troutt, and T. N. Lesch. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*. 65: 495-501.
- Yelich J. V., R. P. Wettemann, T. T. Marston, and L. J. Spicer. 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and

metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domestic Animal Endocrinology*. 13:325–338.

**Capítulo VIII**  
**RESPUESTA DE HORMONA LUTEINIZANTE A LA INFUSIÓN CONTINUA DE**  
**KISSPEPTINA-10 EN BECERRAS PRE-PÚBERES**

## **RESPUESTA DE HORMONA LUTEINIZANTE A LA INFUSIÓN CONTINUA DE KISSPEPTINA-10 EN BECERRAS PRE-PÚBERES**

### **RESUMEN**

En borregas adultas en anestro estacional, la infusión constante de 0.3  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg/h, durante 48 h, induce incrementos de LH y la ovulación. En becerras pre-púberes, dosis de 1 a 5  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg de peso inducen incrementos de LH que disminuyen con cada aplicación intravenosa (IV). La hipótesis es que la infusión continua de dosis menores a 1  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg de peso induce la liberación de LH y la ovulación en becerras pre-púberes. Se efectuaron dos experimentos (EX). EX1: Se usaron becerras pre-púberes Holstein o Suizo Pardo por Cebú (n=18; 21.2 $\pm$ 0.6 m de edad; 264 $\pm$ 9.5 kg de peso), las cuales recibieron durante 48 h una infusión subcutánea (SC) de solución salina fisiológica (Control), kisspeptina-10 (0.1 ó 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) ó GnRH (1  $\mu\text{g}$  de gonadorelina®/animal/h más un bolo IV de 4  $\mu\text{g}$  de gonadorelina/animal/h). La GnRH, pero no la kisspeptina-10, indujo la liberación de LH y función lútea de corta duración en 40 % de las becerras. EX2: Se usaron becerras Cebú Sardo Negro agrupadas (n= 2/grupo) como pequeñas (146 $\pm$ 2 kg), medianas (182 $\pm$ 10 kg) o grandes (269 $\pm$ 26 kg) que, de acuerdo a un diseño permutable repetido, recibieron por infusión IV continua, a intervalo de una semana, 0.5 ó 1.0  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg/h durante 6 h. Ambas dosis de kisspeptina-10 indujeron la liberación LH pero ésta disminuyó a partir de la tercera hora de infusión, debido a una desensibilización hipotalámica. Con respecto a 0.5  $\mu\text{g}$ , 1.0  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg indujo una mayor liberación de LH en becerras pequeñas pero no en las medianas y grandes. Ninguna de las becerras involucradas en ambos EX ovularon. En conclusión, la infusión IV más no la SC de 0.5  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10 induce la liberación de LH en becerras pequeñas, medianas o grandes, por lo que en un tratamiento de 48 a 72 horas podría inducir la ovulación en becerras relativamente cercanas a la pubertad, como lo hace en borregas adultas.

**PALABRAS CLAVE:** becerras pre-púberes, kisspeptina, hormona luteinizante.

## INTRODUCCIÓN

La kisspeptina es una familia de cuatro neuropéptidos estructuralmente relacionados (kisspeptina-54, -14, -13 y -10), resultantes de la escisión proteolítica de la pre-kisspeptina, la cual es codificada por el gen *Kiss-1* (Roa *et al.*, 2008a). La kisspeptina ha sido propuesta como un activador del eje reproductor, a través de la regulación de la actividad de las neuronas productoras de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo (Messenger *et al.*, 2005). Los cuatro neuropéptidos mencionados se unen y activan al receptor de membrana denominado GPR54 ó Kiss1r (Kotani *et al.*, 2001) y está localizado en las neuronas productoras de GnRH (Messenger *et al.*, 2005).

Una vez activadas, las neuronas productoras de GnRH regulan la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH) y la foliculoestimulante (FSH). En ratas (Roa *et al.*, 2008b), borregas (Messenger *et al.*, 2005; Caraty *et al.*, 2007) y becerras (Santos *et al.*, 2014) se ha evidenciado que la kisspeptina puede ser usada como herramienta para manipular la secreción de gonadotropinas hipofisarias e inducir la ovulación. En borregas en anestro estacional, la infusión continua de 0.6 µg de kisspeptina-10/kg de peso por hora, durante seis horas indujo un incremento de LH y FSH en sangre a partir de los 15 a 30 min de haber iniciado la infusión, induciendo la concentración máxima entre las 3 y las 4 h para luego retornar a niveles basales entre las 8 y 10 h posteriores al inicio del tratamiento (Caraty *et al.*, 2007); no obstante, en un tratamiento de 24 ó 48 h y con una dosis 50 % menor de kisspeptina-10 (0.3 µg/kg por hora) se detectó un incremento adicional de LH de mayor magnitud y la formación de cuerpos lúteos en más del 80 % de las borregas (Caraty *et al.*, 2007; Sébert *et al.*, 2010) por lo que la kisspeptina-10 aplicada en dosis relativamente bajas y de una manera constante estimula la secreción de las gonadotropinas hipofisarias en un formato adecuado para inducir la ovulación en hembras adultas.

Previamente demostramos que en becerras pre-púberes la aplicación de 5 µg de kisspeptina-10/kg de peso, en forma repetida induce incrementos de LH pero la máxima respuesta disminuye con cada aplicación sucesiva (Santos *et al.*, 2014).

Dicho tratamiento indujo la la formación de cuerpo lúteo en 2 de 7 becerras, mismas que presentaron las mayores concentraciones circulantes del factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I) y las menores de leptina. Es factible que las becerras que no formaron un cuerpo lúteo en respuesta a kisspeptina-10 con pulsos repetidos pudieran haber experimentado la desensibilización del eje gonadotrópico, fenómeno observado en ratas (Roa *et al.*, 2008b), borregas (Messenger *et al.*, 2005) y monos Rhesus (Seminara *et al.*, 2006; Ramaswamy *et al.*, 2007) adultos, tratadas mediante la infusión de dosis elevadas de kisspeptina-10. Tomando esto en consideración, en un estudio con becerras pre-púberes de 8 a 9 meses de edad, en el que evaluamos los efectos de 5, 4, 3, 2, 1 y 0.1  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg de peso vivo administrada en forma de bolos cada dos horas (capítulo VII), se observó que excepto la dosis menor, todas las demás disminuyeron la liberación de LH en las aplicaciones subsecuentes a la primera por lo que asumimos que la dosis de kisspeptina-10 capaz de inducir incrementos crecientes de LH en aplicaciones sucesivas, se encuentra entre 0.1 y 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Con base en lo antes discutido, en el presente estudio se probaron las siguientes hipótesis: a) En becerras pre-púberes la dosis de kisspeptina-10 en forma de infusión continua capaz de inducir incrementos de LH y ovulación es menor a 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hora}$ , b) La sensibilidad a la infusión continua de kisspeptina-10 en términos de la respuesta de LH es dependiente el peso de las becerras, y c) La infusión continua de 1.0  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg de peso induce desensibilización del eje gonadotrópico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Manejo general de los animales***

Los procedimientos aplicados en el presente estudio fueron aprobados por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (Programa de Posgrado, FMVZ, UNAM). El sitio experimental (Las Margaritas, Hueytamalco, Puebla, México) está ubicado en 19° 51' 03" N y 97° 12' 48" O y a 500 msnm. Al inicio del tratamiento y durante una semana previa al mismo, todas las becerras usadas en el presente estudio fueron pre-púberes, lo cual fue determinado por la ausencia de actividad estral (dos observaciones/día: 0700 y 1800 h), de cuerpo lúteo

(registro ultrasonográfico de ovarios cada dos días) y niveles sanguíneos de progesterona (P4) <1 ng/ml en muestras colectadas de la vena coccígea cada 2 a 3 días. Los animales se alojaron individualmente en corrales de 2.5 x 4.5 metros, con piso de cemento, área techada (2.5 x 2.7 metros), comederos y bebederos. En este lugar permanecieron desde un mes antes de la administración del tratamiento, periodo en el que se sometieron a sujeción con reata (2 h/día), cepillado de pelo y acostumbramiento a la presencia de personas para su adaptación al manejo. La alimentación consistió en forraje picado a libertad (heno de Avena; 94.82 % MS, 8.13 % PC y 2.3 Mcal de EM/kg), 2 a 4 kg de alimento concentrado al día (94.49 % MS, 17.97 % PC y 2.5 Mcal de EM/kg), sales minerales y agua a libertad.

### ***Materiales.***

La kisspeptina-10 (Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub>; Proimmune, Oxford, UK) fue garantizada para 95 % de pureza. La GnRH empleada fue gonadoterina (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>; Sanfer® D.F., México). El dimetil sulfóxido (DMSO) se adquirió de Fort Dodge® (D.F., México) y las bombas osmóticas Alzet® (modelo 2ML1) de Durect Corporation (Cupertino, CA).

### ***Experimento 1. Efecto de la infusión subcutánea de kisspeptina-10 en la liberación de LH y ovulación.***

Dieciocho becerras pre-púberes, Holstein o Suizo Pardo por Cebú (21.2±0.6 m de edad; 264±9.5 kg de peso; media ± EEM), fueron estratificadas por genotipo, edad y peso, y asignadas al azar para recibir una infusión subcutánea durante 48 h de solución salina fisiológica (Control), kisspeptina-10 (0.1 ó 0.5 µg/kg/h) o GnRH (1µg/h/animal; 4 a 5 animales/grupo). La GnRH fue empleada para comprobar la capacidad hipofisiaria de las becerras para liberar LH, por lo que adicionalmente las becerras de este grupo recibieron 4 µg de gonadoterina/animal cada hora mediante bolo intravenoso. Tanto kisspeptina-10 como GnRH fueron diluidas en solución salina fisiológica (SSF) con 15 % de DMSO, misma proporción de diluyentes usada en el grupo Control.

La infusión de los tratamientos fue realizada mediante bomba osmótica Alzet, previa incubación de cada solución en forma individual por 12 h en tubos de centrífuga (estériles de 50 ml; Nirko®) que contenían SSF a 37°C. La instalación de cada bomba fue subcutáneamente, en un área situada en la inmediación posterior a la escápula izquierda de los animales y cuyo método quirúrgico consistió en: rasurado de piel (5x5 cm), desinfección del área con jabón y solución de Iodopovidona (Germisin®, Altamirano farmacéuticos de México; D.F., México), anestesia local (lidocaína al 2 %, 2 mg/cm<sup>2</sup>; Pisacaina®, laboratorios Pisa; D.F., México), incisión de piel con bisturí (2 cm en forma vertical), inserción subcutánea de la bomba osmótica (con el portal de liberación hacia arriba), sutura con nylon (dos puntos) y desinfección del área (Furazolidona®, laboratorios Pisa; D.F., México). Por su parte, el retiro de las bombas (50 h post-instalación) consistió en: desinfección del área con jabón y yodo, anestesia local, retiro de suturas, expulsión de las bombas mediante presión digital, aplicación local de antibiótico a base de penicilina y estreptomina (Cambicilin®; Wittney de México SA de CV, D.F., México), sutura con nylon y desinfección (Furazolidona® Pisa Agropecuaria SA de CV, D.F., México). Una vez retiradas, las bombas osmóticas, fueron lavadas con SSF e incubadas nuevamente en SSF con antibiótico (Cambicilin®; Wittney de México SA de CV, D.F., México) durante 12 h, de manera similar a lo descrito anteriormente.

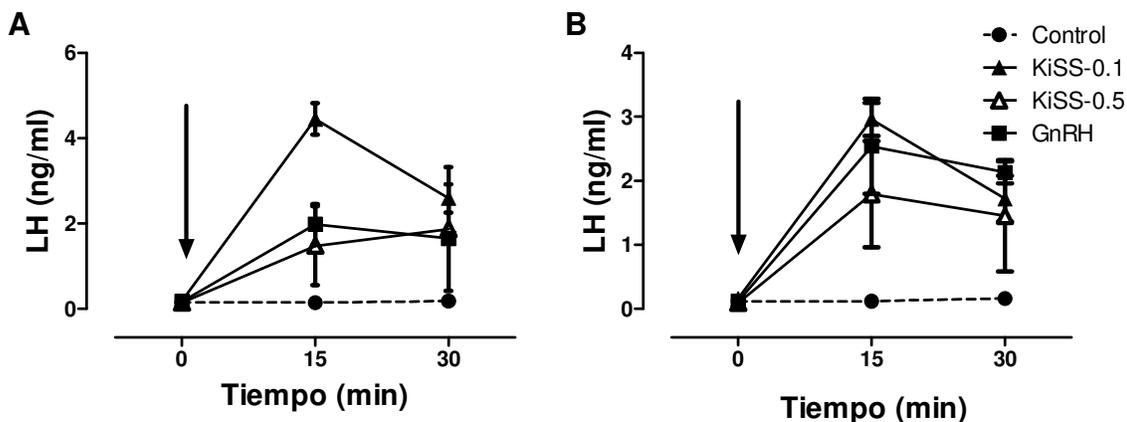
Para evaluar el efecto de los tratamientos en la secreción de LH, se colectó una muestra de sangre cada 15 min en los periodos -0.5 a 6, 24 a 30 y 48 a 54 h con respecto a la instalación de las bombas osmóticas; así mismo se colectó una muestra de sangre cada dos horas entre muestreos intensivos hasta las 72 h. La colección sanguínea se realizó a través de un catéter estéril de plástico en una de las venas yugulares (Sonda Kortex calibre 5 FR y longitud 90 cm; Catálogo K-733; Trokar S.A de C.V). Para ello, la zona periyugular (5x5 cm) fue previamente rasurada y anestesiada (lidocaína al 2 %, 2 mg/cm<sup>2</sup>). Las muestras fueron procesadas para obtención de suero (refrigeración por 3 h y posterior centrifugación a 1500 xg por 15 min). El suero fue congelado a -20 °C hasta determinar por radioinmunoanálisis (RIA) la concentración de LH.

Durante el tratamiento y hasta 32 días de iniciado el mismo, la ovulación fue monitoreada de acuerdo a la metodología establecida por Calderón *et al.* (1996): concentración sanguínea de P4 mediante RIA, supervisión de conducta estral (2/día: 0700 y 1800 h), inspección ultrasonográfica de ovarios (cada dos días). El equipo de ultrasonografía fue un Kaixin 500 (Xuzhou Kaixin Electronic Instrument Co. Xuzhou, Jiangsu, China) con transductor trans-rectal de 7.5 MHz.

Para determinar el estado corporal, metabólico y reproductivo de las becerras al inicio de la infusión, se registraron las siguientes variables: 1). Peso corporal, 2). Ganancia diaria de peso (GDP) determinada a partir del registro de peso corporal a su llegada a los corrales de experimentación y al inicio del experimento; 3). Condición corporal (CC), calificada de manera independiente por tres personas (Wildman *et al.*, 1982; escala de 1 a 5 puntos, 1=emaciado y 5=obeso) y el promedio de estas calificaciones se usó como variable de respuesta; 4). Concentración sanguínea de IGF-I y leptina-(promedio de las concentraciones determinadas por RIA de muestras tomadas a las -2, -1 y 0 h con relación al inicio de la infusión); 5). Diámetro del folículo dominante (FD), determinado por ultrasonografía un día antes de la infusión.

Para determinar la viabilidad de las bombas osmóticas para administrar kisspeptina-10 (ambas dosis) y GnRH, en ocho becerras adicionales (7 a 8 meses de edad y  $140 \pm 11$  kg de peso) se administró un bolo intravenoso de la solución salina fisiológica contenida en los tubos de centrifuga en los cuales fueron incubadas las bombas osmóticas con kisspeptina-10, GnRH o SSF (2 animales por tratamiento). El procedimiento fue realizado al inicio y al final del periodo experimental. En estos animales, se determinó la LH mediante RIA de muestras sanguíneas colectadas de la vena yugular a los 0, 15 y 30 min de la administración de cada solución incubadora; el RIA para LH se describe posteriormente. Por otra parte, se determinó la cantidad de solución remanente en las bombas osmóticas al finalizar los procedimientos descritos, cuyos valores estuvieron dentro de valores pre-establecidos para el modelo de bomba usada. Al inicio y final del periodo experimental, la solución incubadora de bombas osmóticas Alzet® conteniendo

kisspeptina-10 ó GnRH, indujo un incremento de LH en sangre (Fig. 1). Lo anterior significa que durante el estudio las bombas osmóticas liberaron la kisspeptina-10 ó GnRH y que ambas sustancias permanecieron activas durante el periodo experimental.



**Figura 1.** Respuesta de LH a una inyección intravenosa (flecha) de la solución incubadora de bombas osmóticas (ALZET® model 2ML1), conteniendo ya sea kisspeptina-10 (KISS-0.1, KISS-0.5), GnRH o solución salina (Control), al inicio (A) y final (B) del experimento (media  $\pm$  error estandar de la media). Las bombas osmóticas permanecieron durante 12 horas en la solución incubadora. Los grupos con kisspeptina-10 y GnRH difieren del Control a los 15 y 30 min ( $p < 0.05$ ).  $n = 2$ /grupo.

**Experimento 2. Efecto de la infusión intravenosa de kisspeptina-10 en la liberación de LH en becerras de de distinto peso corporal.**

Seis becerras Cebú de la raza Sardo Negro, de  $146 \pm 2$  (pequeñas;  $n=2$ ),  $182 \pm 10$  (medianas;  $n=2$ ) y  $269 \pm 26$  kg (grandes;  $n=2$ ) fueron usadas en un diseño experimental permutable repetido (Kuehl, 2001). Para ello, con un intervalo de una semana, cada becerro recibió una infusión intravenosa de 0.5 ó 1.0  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg/h durante 6 h (asignación aleatoria en las semanas 1 y 3); de esta manera, cada becerro recibió ambos tratamientos en dos ocasiones y semanas diferentes. El manejo y alimentación de los animales fue similar al del experimento 1.

La kisspeptina-10 fue administrada a través de una de las venas yugulares, mediante sonda Tygon® (I.D. 2.52 y O.D. 9.7 mm; Cole Palmer, IL, USA) conectada a una bomba de infusión kdScientific® (modelo KDS270; Holliston, MA, UK) con jeringas

individuales (Terumo® de 60 ml; Terumo Medical de México SA de CV, D.F., México). De acuerdo al peso semanal, para cada animal y antes de su aplicación, la dosis de kisspeptina-10 correspondiente fue diluida en 30 ml de SSF con 0.5 % de albumina sérica bovina (BSA; A7284; Sigma-Aldrich Química S.A. De C.V., Toluca, México, México) y se administró simultáneamente a los seis animales, con una tasa de liberación de 5 ml de solución/hora. Cada semana, las sondas fueron esterilizadas en autoclave y doce horas antes de su uso fueron incubadas en SSF con 0.5 % de BSA.

En cada semana de evaluación, se colectaron muestras sanguíneas cada 15 min, desde 2 h antes del inicio de la infusión de kisspeptina-10 hasta dos horas después de finalizado el tratamiento. En estas muestras, se determinó LH por RIA, previa obtención y almacenamiento del suero como fue descrito anteriormente. Además, en cada semana de evaluación se determinó la concentración sanguínea de IGF-I y leptina por RIA de muestras tomadas a las -2, -1 y 0 h con relación al inicio de la infusión, de cuyos valores se obtuvo el promedio de cada hormona. La obtención de sangre se realizó a través de un catéter que fue insertado en la vena yugular opuesta a la de la infusión de kisspeptina-10. El catéter usado y el procedimiento empleado para su instalación fueron similares a los descritos en el experimento 1. Para la colocación de la sonda de infusión se siguió un procedimiento similar al descrito para el catéter con que se obtuvieron las muestras sanguíneas.

Al inicio del experimento y cada semana hasta el final del mismo, se registró el peso corporal y la condición corporal de las becerras como fue descrito antes. De estos registros se determinó el promedio de la ganancia diaria de peso (GDP) y la condición corporal durante el estudio.

Para discriminar el sitio de desensibilización de la respuesta de LH a la infusión continua de kisspeptina-10, una semana después de finalizado el presente estudio (semana 5), cinco de las seis becerras recibieron una infusión intravenosa de 1.0 µg de kisspeptina-10/kg/h durante 7 h y un bolo intravenoso de 5 µg de GnRH a las 5 y 7 h de iniciada la infusión. Se colectaron muestras sanguíneas cada 30 min de las 0 a las 4.5 h y a partir de ahí cada 15 min hasta la hora 8 posterior al inicio de la

infusión. La obtención de suero sanguíneo fue de manera similar a la antes descrita y de este material se cuantificó la LH mediante RIA.

### **Medición de hormonas**

El RIA para LH fue en fase líquida de 120 h de incubación a 4° C, siguiendo el procedimiento descrito por Arrieta *et al* (2006). La hormona USDA-bLH (AFP11743B) se utilizó como trazador, incorporando Na<sup>125</sup>I mediante el método del lodo-gen y para la curva patrón se usaron dosis desde 0.01 hasta 10 ng por tubo. El primer anticuerpo generado en conejo correspondió a la hormona NIDDK-oLH-26 (anti-oLH-26), validado en bovinos por Perera-Marín *et al* (2005), a una dilución final de 1:400,000. La separación de la fracción unida de la fracción libre fue realizada con un segundo anticuerpo contra IgG de conejo generado en burro (dilución 1:80). En cinco ensayos la cantidad mínima detectable de LH fue 0.03 ng/ml y los coeficientes de variación (CV) intra- e inter-ensayo fueron 6.73% y 6.57%, respectivamente. El RIA para IGF-I fue un sistema en fase sólida (IGF-I-RIACT®, Cisbio Internacional, Francia); la sensibilidad del ensayo fue de 5.86 ng/ml y el CV intra-ensayo fue 6.89 %. El RIA para leptina fue un sistema en fase líquida multiespecies (XL-85K, Linco Research Inc, St. Charles, MO, USA), con una sensibilidad de 1.0 ng/ml y un CV intra-ensayo de 7.93 %. El RIA para P4 fue un sistema en fase sólida (PROG-CTRIA®, Cisbio Bioassay, Sorgues, France) cuya sensibilidad fue de 0.14 ng/ml, con un CV intra-ensayo de 2.4 %.

### **Variables de respuesta.**

Un incremento de LH inducido por kisspeptina-10 fue considerado cuando luego de la instalación de la bomba osmótica (experimento 1) o la bomba de infusión (experimento 2), la concentración de LH fue mayor al promedio más dos desviaciones estándar de la concentración basal. En el experimento 1, la concentración basal fue el promedio de la LH registrada en las muestras -2, -1 y 0 con relación a la instalación de la bomba de infusión. En el experimento 2, la concentración basal fue el promedio de la LH registrada en las muestras recolectadas durante las dos horas previas a la instalación de la bomba de infusión.

Las variables asociadas con la magnitud del incremento de LH en respuesta a la dosis de kisspeptina-10 fueron:

Experimento 1: Concentración media y número de pulsos de LH registrados en los periodos 0 a 6, 24 a 30 y 48 a 54 h de iniciados los tratamientos. El criterio para determinar un pulso de LH fue definido previamente (Arreguin-Arevalo y Nett, 2006); para el análisis, la variable número de pulsos de LH fue transformada en arco seno. Oleada preovulatoria de LH, misma que fue definida a partir del muestreo sanguíneo cada dos horas (0 a 72 h), usando como criterio un aumento en la concentración de LH en al menos dos muestras consecutivas mayores al promedio más dos desviaciones estándar de la concentración basal.

Experimento 2. Área bajo la curva (AUC) y duración del incremento de LH inducido por kisspeptina-10. Para el AUC se usó el método del trapecio y ésta se registró como unidades arbitrarias. La duración fue el periodo entre inicio de infusión y última concentración de LH registrada en el AUC.

### **Análisis estadístico**

La comparación entre grupos experimentales de los valores al inicio de cada experimento para peso corporal, CC, GDP, diámetro del FD, concentración sanguínea de leptina, IGF-I ó LH, se realizó mediante ANDEVA para diseños completamente aleatorizados (DCA).

Para conocer las diferencias entre dosis de kisspeptina-10 a través del tiempo en la concentración sanguínea de LH se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con mediciones repetidas usando para ello el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 2002), en cuyo modelo se incluyó la dosis, el tiempo de muestreo y la interacción dosis\*tiempo; en este modelo, el animal fue anidado en el tratamiento y usado como un efecto aleatorizado, mismo que fue el objeto de mediciones repetidas en una estructura de covarianza.

En el caso de variables de respuesta que se registraron en varias ocasiones a través del periodo experimental (concentración media y número de pulsos de LH) la

comparación fue mediante ANDEVA para un DCA con mediciones repetidas. En el modelo experimental se incluyó dosis de kisspeptina-10, periodo y la interacción dosis x periodo.

El efecto de diferentes dosis de kisspeptina-10 en el AUC y la duración del incremento de LH para becerras de diferente peso corporal (experimento 2), fue analizado mediante ANDEVA de dos factores (GLM de SAS, 2002); en el modelo se incluyó al grupo de peso corporal, dosis de kisspeptina-10 y la interacción de ambos. La concentración máxima de LH en respuesta a cada bolo intravenoso de GnRH durante la infusión continua de kisspeptina-10 fue analizada mediante una prueba de t para medidas pareadas. De igual manera, para conocer los cambios en la concentración de IGF-I y leptina a través de periodo experimental se aplicó una prueba de t para medidas pareadas (inicial vs 2, 3 y 4<sup>a</sup> semana de estudio).

La separación de medias se realizó con el procedimiento LSMEANS y el criterio para definir significancia de los efectos probados y diferencias entre medias fue ( $p \leq 0.05$ ).

## **RESULTADOS**

### ***Experimento 1***

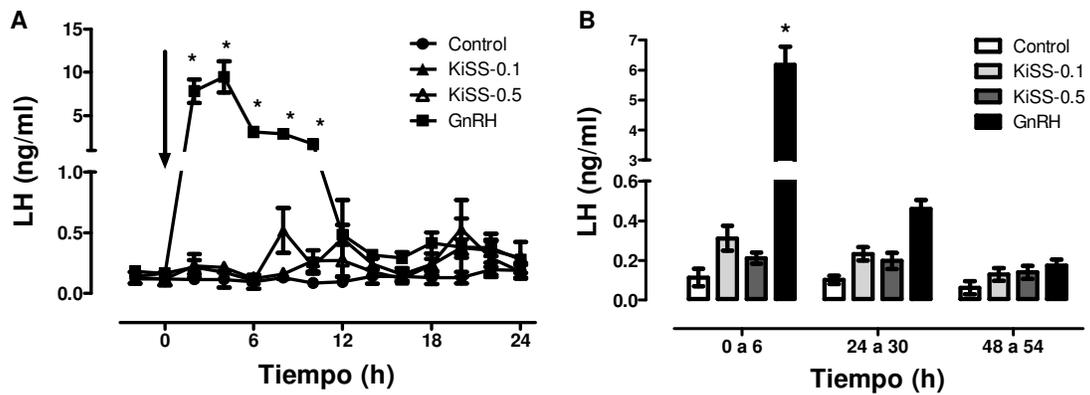
Al inicio del estudio, las becerras en los cuatro grupos experimentales fueron homogéneos en las medidas corporales, estado ovárico y concentración sérica de IGF-I (Cuadro 1;  $p > 0.05$ ). Por coincidencia, la concentración sérica de leptina fue mayor en los animales del grupo KiSS-0.5 que en los de los grupos restantes ( $p < 0.05$ ), los cuales a su vez fueron similares entre sí ( $p > 0.05$ ).

**Cuadro 1. Media ( $\pm$  error estandar de la media) de las medidas corporales, diámetro del folículo dominante (FD) y concentraciones sanguíneas de leptin e IGF-I en becerras pre-púberes de los grupos experimentales al inicio del estudio.**

|                             | Tratamiento                |                            |                             |                             | p=    |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
|                             | Control<br>(n=4)           | KISS-0.1<br>(n=5)          | KISS-0.5<br>(n=4)           | GnRH<br>(n=5)               |       |
| Peso corporal, kg           | 264 $\pm$ 18               | 284 $\pm$ 20               | 286 $\pm$ 18                | 294 $\pm$ 18                | 0.753 |
| Condición corporal, punto   | 2.9 $\pm$ 0.12             | 2.6 $\pm$ 0.20             | 2.8 $\pm$ 0.12              | 2.7 $\pm$ 0.15              | 0.782 |
| Ganancia diaria de peso, kg | 0.40 $\pm$ 0.25            | 0.67 $\pm$ 0.25            | 0.74 $\pm$ 0.18             | 0.86 $\pm$ 0.23             | 0.581 |
| Leptina en suero, ng/ml     | 3.6 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup> | 5.4 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup> | 11.8 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup> | 4.8 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup> | 0.039 |
| IGF-I en suero, ng/ml       | 103 $\pm$ 24               | 142 $\pm$ 24               | 103 $\pm$ 18                | 130 $\pm$ 7                 | 0.304 |
| Diámetro del FD, mm         | 7.7 $\pm$ 0.7              | 9.9 $\pm$ 1.0              | 7.6 $\pm$ 0.7               | 8.3 $\pm$ 1.3               | 0.693 |

<sup>ab</sup> = literales distintas entre columnas indican diferencia entre medias.

La capacidad hipofisiaria de las becerras para liberar LH fue comprobada, ya que la GnRH indujo un marcado incremento en la concentración sanguínea de dicha gonadotropina (Fig. 2-A). En respuesta a GnRH, la LH alcanzó una concentración máxima entre las 2 y 3 h, disminuyendo progresivamente a partir de entonces, para alcanzar niveles similares al resto de los grupos a las 12 h de iniciado el tratamiento. Por ello, en el grupo GnRH, la concentración media de LH de la 0 a las 6 h de iniciados los tratamientos también fue mayor ( $p < 0.01$ ) que la del resto de los grupos (Fig. 2-B). A diferencia de GnRH, la infusión continua de kisspeptina-10 a dosis de 0.1 ó 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  no alteró ( $p < 0.05$ ) las concentraciones sanguíneas de LH (Fig. 2-A y B) ni la pulsatilidad de la misma (Fig. 3), ya que los valores de estas variables fueron similares ( $p > 0.05$ ) a los del grupo Control. Una vez retirados los tratamientos (periodo de 48 a 54 h), la concentración media (Fig. 2-B) y el número de pulsos de LH (Fig. 3) fueron similares ( $p > 0.05$ ) en los cuatro grupos experimentales.



**Figura 2.** Perfil (A) y concentración media (B) de la hormona luteinizante (LH) en becerras pre-púberes tratadas durante 48 horas con una infusión subcutánea mediante bomba osmótica Alzet® de solución salina (Control), kisspeptina-10 (0.1 ó 0.5 µg/kg/h) o GnRH (1 µg of gonadorelina®/animal/h, más un bolo intravenoso de 4 µg de gonadorelina/animal/h). En A, los valores de LH corresponden a muestras de de sangre colectadas cada 2 h a partir de la instalación de la bomba osmótica (flecha o tiempo 0). En B son valores de LH del promedio de muestras de sangre colectadas cada 15 min registradas de las 0 a 6, 24 a 30 y 48 a 54 h, desde la instalación de la bomba osmótica (tiempo 0). \*p<0.01 vs resto de los grupos.

Durante el tratamiento y los siguientes 30 días después de finalizados los tratamientos, ninguna becerras manifestó comportamiento de estro o actividad ovárica cíclica. Sin embargo, 2 de 5 becerras del grupo GnRH (40 %) presentaron un aumento transitorio de 2 a 3 días en la concentración sanguínea de P4 a partir del día 6 de iniciado el tratamiento. El aumento de progesterona no fue precedido por oleada preovulatoria de LH, en el periodo de muestreo sanguíneo, o por evidencias ultrasonográficas de ovulación o formación de cuerpo lúteo.

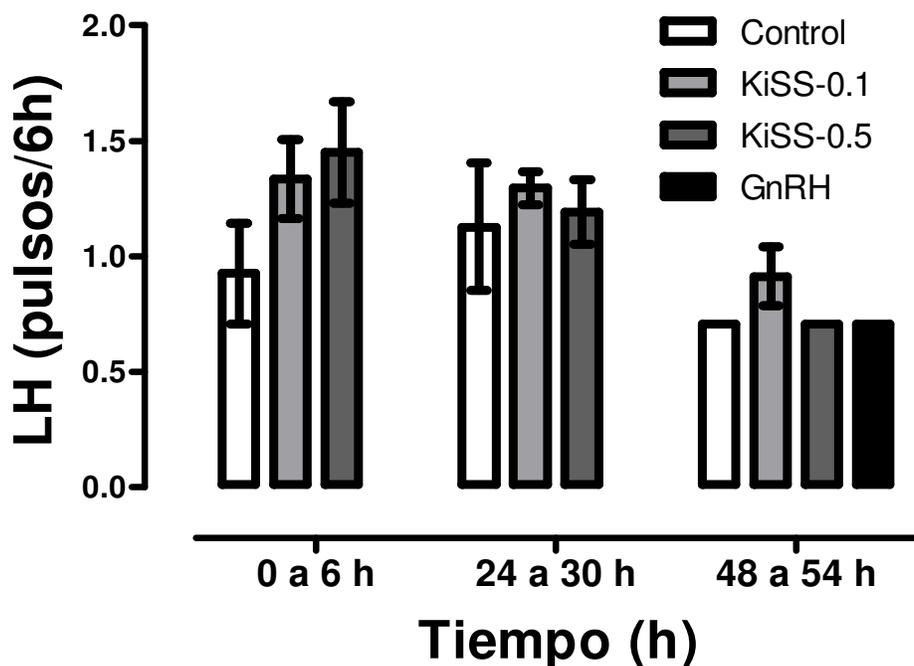


Figura 3. Media ( $\pm$  error estándar de la media) del número de pulsos de hormona luteinizante (LH) en becerras pre-púberes tratadas durante 48 horas con una infusión subcutánea mediante bomba osmótica Alzet® de solución salina (Control), kisspeptina-10 (0.1 ó 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) o GnRH (1  $\mu\text{g}$  de gonadorelina®/animal/h más un bolo IV de 4  $\mu\text{g}$  of gonadorelina/animal/h). Los valores son la media ( $\pm$  error estándar de la media) de los pulsos registrados en los diferentes periodos de muestreo sanguíneo.

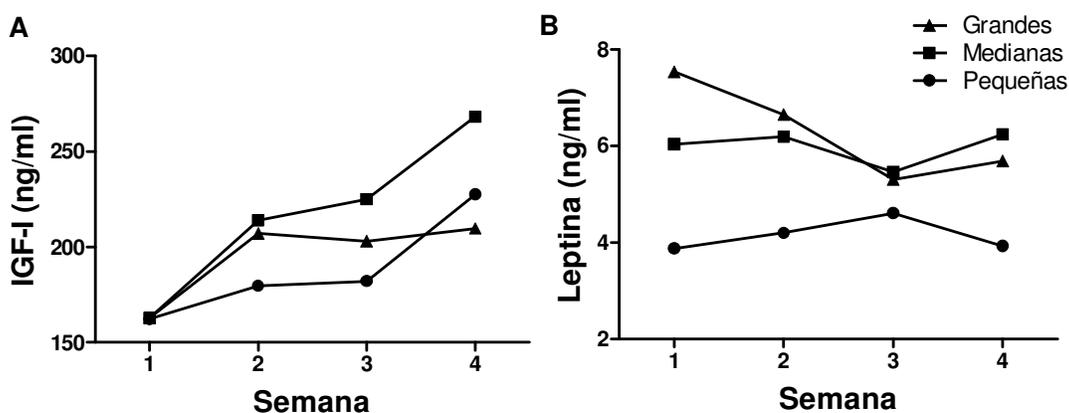
### **Experimento 2**

En el cuadro 2 se presenta el peso corporal, la condición corporal y la concentración sanguínea de IGF-I, leptina y LH al inicio del estudio. De la primera a la última semana de experimentación, la condición corporal de las becerras fue en promedio de  $2.8 \pm 0.15$  puntos y la GDP de 0.34 kg/día, sin diferencias entre grupos de peso ( $p > 0.05$ ). Desde una semana antes y hasta una semana posterior al último tratamiento, todas las becerras presentaron concentraciones basales de P4 ( $< 0.5 \pm 0.01$  ng/ml, promedio general) por lo que fueron consideradas pre-púberes.

**Cuadro 2. Media ( $\pm$  error estandar de la media) de las medidas corporales y concentraciones sanguíneas de leptina, IGF-I y LH en becerras pre-púberes de los grupos experimentales al inicio del estudio.**

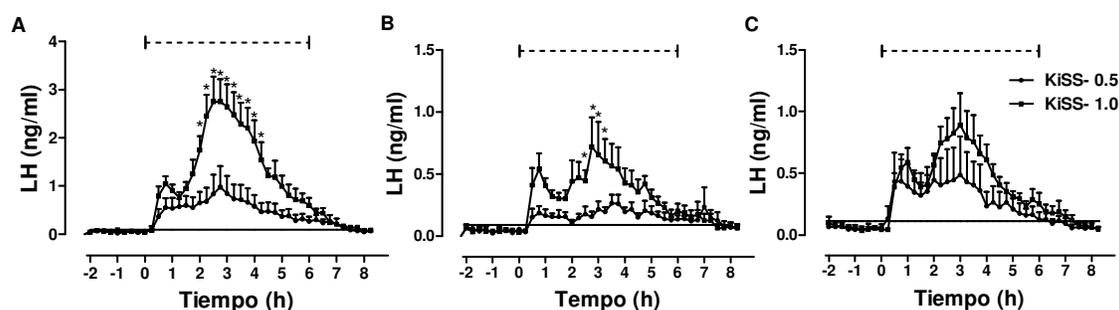
|                           | Grupo de becerras            |                               |                               | p=    |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
|                           | Pequeñas<br>(n=2)            | Medianas<br>(n=2)             | Grandes<br>(n=2)              |       |
| Peso corporal, kg         | 146.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup> | 182.0 $\pm$ 10.0 <sup>b</sup> | 269.0 $\pm$ 26.0 <sup>c</sup> | 0.026 |
| Condición corporal, punto | 2.5 $\pm$ 0.0                | 2.75 $\pm$ 0.25               | 2.75 $\pm$ 0.25               | 0.650 |
| IGF-I en suero, ng/ml     | 162.2 $\pm$ 44.0             | 162.9 $\pm$ 22.0              | 162.8 $\pm$ 401.0             | 1.000 |
| Leptina en suero, ng/ml   | 3.88 $\pm$ 1.25              | 6.04 $\pm$ 1.42               | 7.54 $\pm$ 4.16               | 0.650 |
| LH basal, ng/ml           | 0.044 $\pm$ 0.027            | 0.032 $\pm$ 0.011             | 0.023 $\pm$ 0.008             | 0.736 |

Durante el transcurso del estudio, la concentración sanguínea de IGF-I presento un incremento progresivo en todas las becerras ( $p < 0.05$ ; Fig. 4-A) y la de leptina se presentó sin cambios a través del estudio ( $p > 0.05$ ; Fig. 4-B). En el periodo de estudio no se detectaron diferencias significativas entre grupos de peso corporal ( $p > 0.05$ ).



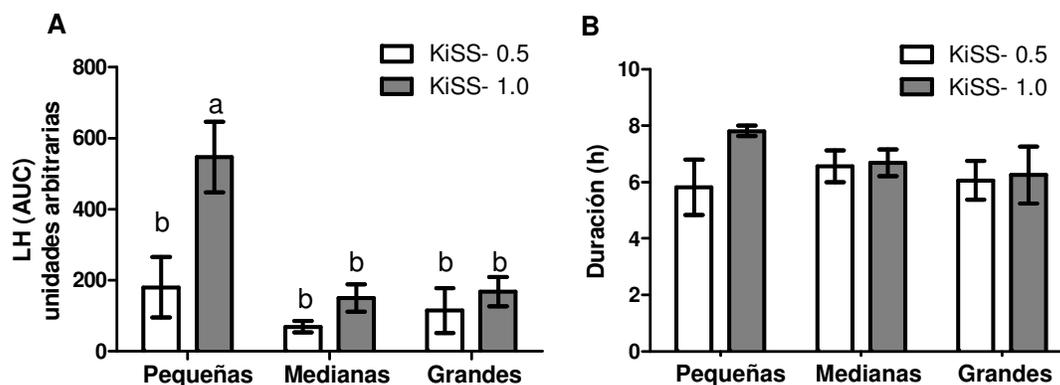
**Figura 4. Media de la concentración sanguínea del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) y leptina a través del estudio en becerras pre-púberes de los diferentes grupos de peso corporal. n=2/grupo de peso.**

Independientemente del peso de los animales, 0.5 y 1.0  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg/h aplicadas mediante infusión continua, por vía intravenosa, indujeron un aumento en la concentración sanguínea de LH (Fig. 5-A, B y C). El patrón hormonal para ambas dosis de kisspeptina-10 consistió en un primer incremento de LH, seguido de un segundo incremento de mayor magnitud cuyo valor máximo se registró alrededor de las 3 h de iniciada la infusión; luego de ello, se observó una disminución progresiva hasta alcanzar niveles basales a las 7-8 h de iniciado el tratamiento (1 a 2 h de finalizado el tratamiento).



**Figura 5.** Respuesta de LH a la infusión continua intravenosa de 0.5 (KiSS- 0.5) ó 1.0 (KiSS-1.0)  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg/h, durante 6 h (línea punteada) en becerras pequeñas (A;  $146 \pm 2$  kg), medianas (B;  $182 \pm 10$  kg) y grandes (C;  $269 \pm 26$  kg). Los valores de LH provienen de muestras sanguíneas colectadas cada 15 min desde 2 horas antes y hasta dos horas después de finalizada la infusión de kisspeptina-10. La línea horizontal corresponde a la media + dos desviaciones estándar de la concentración basal. \* $p < 0.05$ . Nótese los cambios en la escala del eje Y.  $n = 4$ /dosis y grupo de peso corporal.

La magnitud de la respuesta de LH a kisspeptina-10 dependió de la dosis y peso de los animales (interacción dosis x peso:  $p < 0.05$ ). En becerras pequeñas, el AUC de LH en respuesta a 1  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg/h fue mayor ( $p < 0.05$ ) que a dosis de 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  (Fig. 6-A); en cambio, en becerras medianas y grandes dicha variable fue similar entre dosis de kisspeptina-10. La duración del incremento de LH inducido por 0.5 ó 1  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg de peso fue similar en todos los grupos de peso (Fig. 6-B).



**Figura 6.** Area bajo la curva (AUC; A) y duración (B) del incremento de hormona luteinizante (LH) inducido por una infusión intravenosa de 0.5 (KiSS-0.5) ó 1.0 (KiSS-1.0)  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg/h durante seis horas en becerras clasificadas como pequeñas (A;  $146 \pm 2$  kg), medianas (B;  $182 \pm 10$  kg) o grandes (C;  $269 \pm$  kg). <sup>ab</sup>literales distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La administración de GnRH como bolo intravenoso, durante la disminución progresiva de LH inducida por la infusión de 1  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg/hora, indujo un aumento de LH (Fig. 7); el valor máximo de la respuesta de LH a la segunda aplicación de GnRH fue menor que la de la primera ( $p < 0.05$ ).

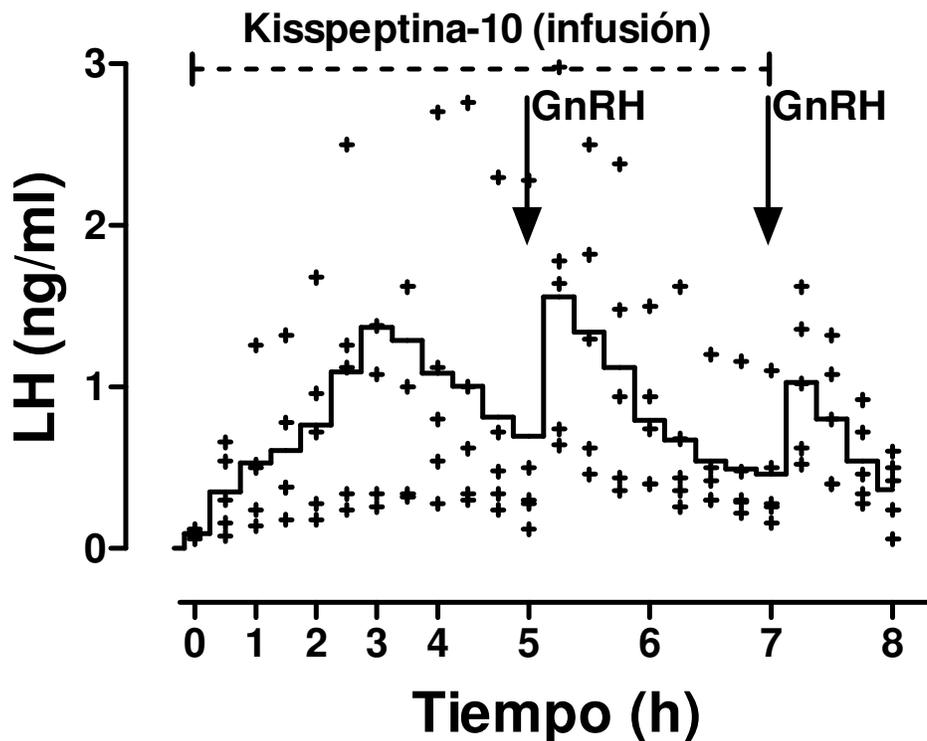


Figura 7. Respuesta de LH a la infusión continua de 1.0  $\mu\text{g}$  de kisspeptina-10/kg/h durante 7 h (línea punteada) y un bolo intravenoso de 5  $\mu\text{g}$  of GnRH/animal (flecha) aplicada a las 5 y 7 horas después del inicio de la infusión en becerras pre-púberes ( $n=5$ ). + Representa valores individuales y la línea continua es el promedio de valores contemporáneos.

## DISCUSIÓN

Para el primer experimento se eligió la infusión de kisspeptina-10 por vía subcutánea, por ser ésta una manera práctica para administrar tratamientos de relativa larga duración que potencialmente induzcan la ovulación. Existen antecedentes que demuestran la viabilidad de aplicar kisspeptina-54 por esa vía y en dosis equimolares (0.4 nmol/kg) con respecto a las usadas en el primer experimento (0.1 y 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) para elevar significativamente los niveles sanguíneos de las gonadotropinas hipofisarias en mujeres (Dhillon *et al.*, 2007). Usamos la kisspeptina-10 debido a que la actividad biológica de las cuatro kisspeptinas se ejerce a través de la fracción C-terminal, la cual se conserva a través de todas ellas (Kotani *et al.*, 2001); además en dosis equimolares (3.0 nmol/kg de peso, IV), la kisspeptina-10 y la kisspeptina-54

estimulan una respuesta similar de LH en ratas (Tovar *et al.*, 2006). A pesar de lo anterior, en el presente trabajo ninguna de las dosis de kisspeptina-10 administradas en forma continua mediante bomba osmótica y vía subcutánea indujo cambios en la secreción de LH y tampoco se detectó actividad ovulatoria o lútea en las becerras tratadas con dicho neuropéptido. Una posibilidad de la falta de efectos de los tratamientos aplicados es que las bombas utilizadas no son un vehículo viable para liberar kisspeptina; sin embargo, en este trabajo se corroboró que las bombas liberaron el péptido hacia la solución donde éstas se incubaron durante 12 h, antes y después del periodo experimental (Fig. 1). Por tanto, las bombas liberaron el péptido por lo que se determinó que sí es viable en método de administración de kisspeptina-10, quedando como causa alternativa que ambas dosis de kisspeptina-10 administradas por vía subcutánea son insuficientes para inducir la liberación de LH en becerras pre-púberes. En apoyo de lo anterior, en el segundo experimento usamos la vía intravenosa para aplicar 0.5 µg (dosis mayor del experimento 1) y 1.0 µg de kisspeptina-10/kg de peso. En contraste con lo registrado con la vía subcutánea, ambas dosis aplicadas intravenosamente estimularon un aumento en la liberación de LH, resultado que enfatiza la insuficiencia de la dosis cuando se administra por vía subcutánea. Aparentemente, la degradación o hidrolización de kisspeptina-10 ocurrió antes de alcanzar niveles sanguíneos efectivos para inducir una respuesta a nivel hipotalámico; lo anterior es posible, ya que se ha documentado que la presencia en sangre periférica de péptidos similares a kisspeptina-10 cuando son administrados por vía subcutánea es 34 % menor que cuando se administran por vía intravenosa (Handelsman *et al.*, 1984) y que la vida media de la kisspeptina-10 en plasma de humanos es de 3.8 a 4.1 min (Jayasena *et al.*, 2011). A diferencia de la kisspeptina-10, la vida media de la kisspeptina-54 en plasma de humanos es de 24.9±1.7 min (Dhillon *et al.*, 2005), por lo que aparentemente la degradación antes descrita no ocurre cuando se emplea kisspeptina-54 aun por vía subcutánea (Thompson *et al.*, 2006; 2009).

Si bien la infusión intravenosa de 0.5 ó 1.0 µg de kisspeptina-10 indujo la liberación de LH en el 100 % de las becerras; el efecto fue transitorio ya que tres horas después del inicio de la infusión del péptido, la liberación de LH fue inhibida,

aparentemente debido a una desensibilización del eje gonadal a nivel hipotalámico; fenómeno reportado en ratas hembras adultas (Roa *et al.*, 2008b) y monos Rhesus cercanos a la pubertad (Seminara *et al.*, 2006) que recibieron en forma de infusión continua, respectivamente, kisspeptina-10 por vía intracerebroventricular y kisspeptina-54 por vía intravenosa.

La magnitud de la respuesta de LH a la infusión intravenosa de kisspeptina-10 fue afectada por la interacción entre el peso de los animales y la dosis de kisspeptina-10, ya que en becerras pequeñas, la kisspeptina-10 en dosis de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso indujo una mayor liberación de LH que con la dosis menor, pero tal diferencia no fue observada en las becerras medianas y grandes. Una respuesta similar fue observada en becerras de 100 a 232 kg de peso y de 7 a 11 meses de edad tratadas mediante bolo intravenoso con dos dosis de kisspeptina-10 (capítulo V) en donde las becerras con menor concentración de IGF-I en sangre, y presumiblemente con menor desarrollo somático, presentaron una mayor respuesta de LH a una dosis alta de kisspeptina-10 que con una dosis menor. Lo anterior indica que: a) las becerras pequeñas son altamente responsivas a una dosis alta de kisspeptina, y b) las becerras pre-púberes con más desarrollo somático, responden de una manera similar a diferentes dosis de kisspeptina-10. Lo anterior fue evidente en ratas hembras (Castellano *et al.*, 2006) en donde una dosis alta de kisspeptina-10 (1  $\mu\text{g}/10$  gr de peso) administrada en los ventrículos cerebrales indujo una mayor respuesta de LH en los animales de 5 que en los de 15 días de edad. Como discutido en capítulo V, aparentemente la cantidad de receptores para kisspeptina en las neuronas productoras de GnRH se mantiene constante durante el periodo pre-puberal y esta cantidad se aumenta justo en la transición puberal (Navarro *et al.*, 2004; Shahab *et al.*, 2005) por lo que no está claro el mecanismo implicado en la variación de la respuesta a la dosis mayor de kisspeptina-10 entre becerras pequeñas vs medianas y grandes. Una posibilidad, es que una dosis alta de kisspeptina-10 mediante bolo intravenoso (capítulo V) o infusión continua (presente estudio) induzca una mayor inhibición del eje gonadotropico en becerras con más desarrollo somático como parece ocurrir en ratas adultas alimentadas de manera normal y ciclando que cuando estaban restringidas nutricionalmente o en fase pre-

puberal que fueron tratadas mediante infusión intracerebroventricular de kisspeptina-10 (Roa *et al.*, 2008b).

La respuesta de LH a 0.5 ó 1.0 de kisspeptina-10/kg/hora por infusión intravenosa, siguió un patrón de liberación similar e independientemente de la dosis y del peso de los animales, es decir se observó un incremento de LH entre los 15 y 30 min con dos picos de liberación, seguidos de una inhibición a partir de la hora tres de iniciado el tratamiento que se mantuvo hasta el final del intervalo de muestreo. En coincidencia con nuestros resultados, ambos picos de liberación de LH fueron observados en mujeres en fase lútea del ciclo menstrual tratadas con un bolo subcutáneo de 0.4 nmol de kisspeptina-54/kg de peso (Dhillon *et al.*, 2007) y en hombres adultos tratados mediante infusión continua con GnRH (Bremner *et al.*, 1974) por lo que la respuesta bifásica de LH a una exposición sostenida de kisspeptina puede ser atribuida a los gonadotropos al ser éstos activados por la GnRH inducida por la kisspeptina.

Con respecto a la inhibición de la LH, en este estudio observamos que durante el periodo de disminución de LH inducida por la infusión intravenosa de kisspeptina-10, una aplicación de GnRH en forma de bolo intravenoso fue capaz de inducir un aumento de LH, lo cual indica que en becerras pre-púberes la desensibilización de la secreción de la LH es en un nivel superior a la hipófisis, posiblemente inhibiendo la activación del receptor GPR54 a nivel de la terminales nerviosas de las neuronas productoras de GnRH en la eminencia media, como se sugiere de estudios realizados en ratones (d'Anglemont *et al.*, 2008) y monos Rhesus (Seminara *et al.*, 2006). Alternativamente, es factible que la GnRH, inducida por kisspeptina-10, también desensibilice a los gonadotropos ya que la segunda aplicación de GnRH (experimento 2) indujo una menor respuesta que la primera, mientras que en el experimento 1, la GnRH administrada continuamente y en forma de bolo intravenoso inhibió la secreción de LH a partir de la hora 4 de iniciado el tratamiento. De hecho, la información parece apoyar este mecanismo alternativo como más viable, ya que se determinó (Messenger *et al.*, 2005) que la infusión continua de kisspeptina-10 en borregas adultas anéstricas indujo una fuerte inhibición de la secreción de LH pero una débil inhibición de GnRH, lo cual pudiera indicar que los rumiantes presentan, en

repuesta a la infusión continua de kisspeptina-10, una mayor inhibición de los gonadotropos a GnRH que de las neuronas productoras de GnRH a kisspeptina-10.

En el presente estudio, el patrón de LH inducido por la infusión intravenosa de kisspeptina-10 fue similar al reportado en borregas en anestro estacional tratadas por un tiempo similar (Caraty *et al.*, 2007). En un estudio adicional con tratamientos de mayor duración (12, 24 y 48 horas; Sébert *et al.*, 2010), se determinó que la kisspeptina-10 (0.3 µg/kg/h) induce un incremento inicial de LH, similar al descrito por nosotros; sin embargo el aumento de LH en ese experimento fue seguido por un incremento sostenido de estradiol que retroalimentó positivamente al hipotálamo para inducir una oleada preovulatoria de LH. En nuestro estudio, ninguna becerca manifestó actividad lútea después de los tratamientos de kisspeptina-10, lo cual permite sugerir que la ovulación seguida de actividad lútea requiere de un tratamiento de mayor duración que induzca un aumento de estradiol y formación de cuerpo lúteo, como fue demostrado en borregas en anestro estacional (Sébert *et al.*, 2010), en las que se indujo la ovulación en un 75 % y 82 % de las borregas con la infusión de kisspeptina-10 de 24 y 48 horas, respectivamente.

En ratas, el IGF-I induce la activación transcripcional del gen *Kiss1* en el inicio de la pubertad (Hiney *et al.*, 2009); mientras que en bovinos se determinó que los niveles sanguíneos de IGF-I están asociados positivamente con la respuesta de LH a kisspeptina-10 (Alamilla *et al.*, 2013). En el experimento 1 del presente estudio, los niveles sanguíneos de IGF-I fueron similares entre tratamientos; y como consecuencia la secreción endógena de LH también fue similar. En becerras del experimento 2, el IGF-I fue similar al inicio del estudio y éste se incrementó progresivamente a través del experimento en una manera similar entre grupos de peso, razón que podría explicar en parte la respuesta similar de la LH a la dosis baja de kisspeptina-10. En cambio, la leptina fue mayor en el grupo tratado con 0.5 µg de kisspeptina-10 (experimento 1) pero la concentración media y el número de pulsos de LH fueron similares al resto de los grupos. En estudios previos de la presente investigación, se demostró que la leptina no altera los efectos de kisspeptina-10 en la liberación de LH (Santos *et al.*, 2014) y otros investigadores la han propuesto como

señal de origen metabólico que permite el inicio de la pubertad (Garcia *et al.*, 2002); sin embargo, los resultados del presente estudio apoyan el concepto propuesto por investigadores, quienes trabajaron con vaquillas lecheras (Block *et al.*, 2003; Chelikani *et al.*, 2009), de que en bovinos no se requiere de un aumento de leptina en sangre como condición para el inicio de la pubertad. De hecho, en el experimento 2, la concentración de leptina, aunque no difirió significativamente, las becerras de más peso corporal tuvieron la mayores concentraciones de dicha hormona y la respuesta de LH a la dosis menor de kisspeptina-10 de estas becerras fue similar comparada con la de las becerras de menor peso.

### **CONCLUSIONES**

La infusión subcutánea de 0.5 µg de kisspeptina-10 o dosis menores, no es estímulo suficiente para inducir la liberación de LH y la ovulación en becerras en edad cercana a la pubertad. En cambio, la infusión intravenosa de kisspeptina-10 en dosis de 0.5 µg/kg de peso induce la liberación de LH en becerras de cualquier tamaño y una desensibilización del eje gonadotropico a nivel del hipotálamo.

### **AGRADECIMIENTOS**

La información que se presenta en este documento forma parte del proyecto de investigación del programa de estudios de Doctorado del primer autor (Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal; FMVZ-UNAM). Se agradece a CONACyT, UNAM e INIFAP por los apoyos económicos proporcionados al primer autor para el desarrollo de sus actividades académicas. Hacemos patente nuestro agradecimiento a la MVZ Clara Murcia Mejía del Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción, FMVZ-UNAM, por la cuantificación de hormonas. Esta investigación fue parcialmente apoyada por DGAPA-UNAM (PAPIIT- IN205510- UNAM) y fondos fiscales INIFAP (SINASO 18341619576).

### **LITERATURA CITADA**

Alamilla, RM., 2013. Respuesta de LH, FSH y GH a una aplicación de kisspeptina en becerras prepúberes de diferentes edades y su asociación con las

concentraciones circulantes de leptina, IGF-1 y estradiol. [tesis de maestría en Ciencias]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Arreguin-Arevalo J.A., Nett, T.M., 2006. A nongenomic action of estradiol as the mechanism underlying the acute suppression of secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes. *Biology of Reproduction* 74: 202-208.
- Arrieta, E., Porras, A., González-Padilla, E., Murcia, C., Rojas, S., Perera-Marín, G., 2006. Ovine serum and pituitary isoforms of luteinising hormone during the luteal phase. *Reproduction, Fertility and Development*; 18:485–495.
- Bremner, W.J., Paulsen, C.A., 1974. Two pools of luteinizing hormone in the human pituitary: evidence from constant administration of luteinizing hormone-releasing hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 39:811–815
- Block S.S., Smith, J.M., Ehrhardt, R.A., Diaz, M.C., Rhoads, R.P., Van Amburgh, M.E., Boisclair, Y.R., 2003. Nutritional and developmental regulation of plasma leptin in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86:3206–3214.
- Calderón, R.R.C., Villa-Godoy, A., Lagúnes, L.J., Fajersson, P., 1996. determinacion ultrasonografica de la primera ovulacion: asociacion con la presentacion de ciclos estrales regulares en vaquillas cesu y suizo pardo mantenidas en el tropico. *Téc Pecu Méx* 1996; 34(2):79-88.
- Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Said, S.B., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C., Clarke, J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148:5258–5267.
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Castaño, J.P., Malagón, M.M., Aguilar, E., Dieguez, C., Magni, P., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2006. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol. & Cel. Endo.* 257–258:75–83

- Chelikani P. K., Ambrose, D.J., Keisler, H.H., Kennelly, J.J., 2009. Effects of dietary energy and protein density on plasma concentrations of leptin and metabolic hormones in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 92:1430-1441.
- d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., 2008. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149:3926–3932.
- Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Ramachandran R., Nijher, G.K., Amber, V., Kokkinos, A., Donaldson, M., Ghatei, M.A., Bloom S.R., 2007. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92:3958-3966.
- Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Patterson, M., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Badman, M.K., McGowan, B.M., Amber, V., Patel, S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in human males. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(12):6609–6615.
- Garcia, M.R., Amstalden, M., Williams, S.W., Stanko, R.L., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Nizielski, S.E., Williams, G.L., 2002. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *Journal of Animal Science* 80:2158-2167.
- Handelsman, D.J., Jansen, R.S., Boylan, L.M., Spaliviero, J.A., Turtle, J.R., 1984. Pharmacokinetics of gonadotropin-releasing hormone: comparison of subcutaneous and intravenous routes. *The Journal of Clinical Endocrinology y Metabolism*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-59-4-739>.
- Hiney, J.K., Srivastava, V.K., Pine, M.D., Dees, W.L., 2009. Insulin-like growth factor-I activates KISS-1 gene expression in the brain of the prepubertal female rat. *Endocrinology* 150:376–384.

- Jayasena, C.N., Nijher, G.M.K., Comninou, A.N., Januszewski, A.A.A., Vaal, M.L., Sriskandarajah, L., Murphy, K.G., Farzad, S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Dhillon, W.S., 2011. The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & metabolism* 96: E1963–E1972.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenberghe, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *Journal of Biology and Chemical* 276:34631–34636.
- Kuehl, O.R., 2001. Diseños de experimentos: Principios estadísticos de diseños y análisis de investigación. 2nd ed. Thompson, México, D.F. pp: 520-549.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S.A.J.R., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1761-1766.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sánchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2004. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of kiss-1 peptide. *Endocrinology* 145:4565–4574.
- Perera-Marín, G., Murcia, C., Rojasm S., Hernández-Cerón, J., González-Padilla, E., 2005. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Animal Reproduction Science* 86: 53–69.
- Ramaswamy, S., Seminara, S., Pohl, C.R., DiPietro, M.J., Crowley, Jr. W. F., Plant, T.M., 2007. Effect of continuous intravenous administration of human metastatin 45–54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-

- pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 148(7):3364–3370.
- Roa, J., E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla, and M. Tena-Sempere. 2008a. New frontiers in Kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front. Neuroendocrinology* 29:48-69.
- Roa, J., E. Vigo, D. García–Galiano, J.M. Castellano, J.M. Navarro, R. Pineda, C. Diéguez, E. Aguilar, L. Pinilla, and M. Tena-Sempere. 2008b. Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294:1088-1096
- Santos, E.R., Calderón, R. R. C., Vera, A.V. R., Perera-Marín, G., Arreguín, A. J. A., Nett, T. M., Gutiérrez, C., Villa-Godoy, A., 2014. Hormona luteinizante y actividad ovárica en respuesta a kisspeptina-10 y su asociación con IGF-1 y leptina en becerras pre-púberes. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 5(2):181-200.
- SAS. Statistical Analysis System Institute Inc, Cary, NC, USA. 2002.
- Sébert, M.E., Lomet, D., Ben Saïd, S., Monget, P., Briant, C., Scaramuzzi, R.J., Caraty, A., 2010. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol. *Domestic Animal and Endocrinology* 38: 289–298.
- Seminara, S.B., DiPietro, M.J., Ramaswamy, S., Crowley, Jr. W.F., Plant T.M., 2006. Continuous human metastatin 45–54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin- releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* 147: 2122–2126.
- Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., Plan, T.M. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:2129–2134.

- Thompson, E.M., Murphy, K.G., Patterson, M., Bewick, G.A., Stamp, G.W.H., Curtis, A.E., Cooke, J.H., Jethwa, P., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2006. Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 291:1074–1082.
- Thompson, E.M., Amber, V., Stamp G.W.H., Patterson, M., Curtis, A.E., Cooke, J.H., Appleby, G.F., Dhillon, W.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Murphy, K.G., 2009. Kisspeptin-54 at high doses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central mechanisms. *British Journal of Pharmacology* 156:609–625.
- Tovar, S., Vázquez, M.J., Navarro, V.M., Fernández-Fernández, M., Castellano, M.J., Vigo, E., Roa, R., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M., 2006. Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology* 147(6):2696–2704.
- Wildman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E., Bowman, R.L., Troutt, H.F., Lesch, T.N., 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science* 65: 495-501.

## IX. DISCUSIÓN GENERAL

En la presente disertación se profundizó en el conocimiento relacionado con los efectos de kisspeptina-10, administrada en forma de bolo intravenoso, en la liberación de LH, FSH y GH en becerras pre-púberes. Considerando la información disponible, aparentemente esta es la primera vez que se reporta en becerras pre-púberes la sensibilidad de la LH a diferentes dosis de kisspeptina-10, así como los efectos de ésta cuando se administra en forma repetida o de infusión continua sobre la liberación de la LH y la actividad ovárica.

En el **experimento 1**, se confirmó el potente efecto estimulador de kisspeptina en la liberación de LH y FSH. Adicionalmente se muestra que comparado con la FSH, la vía de liberación de LH en los gonadotropos es más sensible a kisspeptina y que la variación de esa sensibilidad está determinada, al menos parcialmente, por la concentración sanguínea de IGF-I, misma que aumenta con el peso y al acercarse la pubertad. A diferencia de LH y FSH, el mecanismo de secreción de GH en los somatotropos no fue sensible a la kisspeptina exógena, por lo que este neuropéptido podría regular al eje somatotrópico a nivel central o su efecto periférico podría estar siendo modulado por factores no evaluados en el presente estudio, posiblemente estradiol. A diferencia de IGF-I, la concentración de leptina en sangre no moduló la respuesta de LH, FSH o GH a kisspeptina-10 por lo que aparentemente dicha hormona no es un factor limitante para las acciones de kisspeptina en la actividad de los ejes neuroendocrinos reproductivo y somático de las becerras pre-púberes.

En el **experimento 2**, la kisspeptina-10 (5 µg/kg de peso) administrada de manera repetida indujo incrementos de LH y la ovulación en 28.5 % de las becerras. Esta respuesta es semejante a la registrada en becerras pre-púberes tratadas con GnRH. Aún así, los resultados obtenidos en estos estudios se encuentran muy por debajo de los obtenidos en corderas cercanas a la pubertad que fueron tratadas con kisspeptina o GnRH, lo cual permiten sugerir que bajo las mismas condiciones fisiológicas, kisspeptina y GnRH administradas repetidamente tienen una capacidad similar de inducir la ovulación. En el presente estudio se demostró que las becerras que formaron un cuerpo lúteo en respuesta a kisspeptina-10 presentaron las

mayores concentraciones de IGF-I y éstas concentraciones estuvieron correlacionadas positivamente con el peso corporal, la condición corporal y la altura a la cruz; por lo que es pertinente proponer al IGF-I como un factor asociado al desarrollo somático que potencializa los efectos de kisspeptina en la actividad del eje gonadotrópico de las becerras durante el inicio de la pubertad (Figura 8). En este estudio, las becerras con cuerpo lúteo en respuesta a kisspeptina-10 presentaron las menores concentraciones de leptina en sangre, por lo que esta hormona no representó una limitante para que la kisspeptina ejerciera su efecto estimulador en LH y la formación de cuerpo lúteo en becerras pre-púberes, apoyando con ello el concepto propuesto por otros autores de que en vaquillas y humanos la pubertad también se presenta en individuos con muy bajas concentraciones de leptina.

En el **experimento 3** se buscó una dosis de kisspeptina que fuera capaz de inducir incrementos de LH similares o ascendentes en aplicaciones sucesivas, ya que en el experimento anterior se observó que en la mayoría de las becerras la respuesta de LH a aplicaciones repetidas de kisspeptina-10 disminuía a través del tiempo. Además, los antecedentes indican que la infusión de kisspeptina en dosis menores a 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso, ya sea por uno o dos días induce la ovulación en borregas en anestro estacional. Para ello, en este estudio se probaron seis dosis de kisspeptina-10: 5, 4, 3, 2, 1 y 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso administradas en forma de bolos intravenosos (3 bolos cada 2 h). Los resultados indicaron que todas las dosis estimularon la liberación de LH y que, excepto la dosis menor, el resto de las dosis indujeron una disminución en la magnitud de la respuesta de LH en las aplicaciones sucesivas. La primera interpretación de los resultados de este experimento es que la sensibilidad del eje gonadotrópico a la kisspeptina, en lo que se refiere a la liberación de LH, se encuentra dentro de un rango 50 veces menor a la dosis hasta ahora usada en becerras pre-púberes. La segunda interpretación, partiendo de que la dosis de 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso indujo una liberación sostenida en aplicaciones sucesivas, es que la dosis mínima de kisspeptina capaz de inducir la liberación de LH en una forma ascendente se encuentra entre 0.1 y 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso.

Los resultados del estudio anterior parecieron representar un avance hacia la identificación de la dosis adecuada de kisspeptina-10 para inducir la ovulación, mediante la infusión continua en hembras bovinas de sistemas tropicales de producción, los que se caracterizan por una edad tardía a la pubertad de sus vaquillas de reemplazo. No obstante, la kisspeptina en dosis de 0.5 µg/kg aplicadas mediante infusión subcutánea no indujo un aumento de LH y tampoco la actividad ovulatoria/lútea en las becerras tratadas con dicho neuropéptido (**experimento 4**), posiblemente debido a una degradación que evitó niveles sanguíneos efectivos para inducir una respuesta a nivel hipotalámico. A diferencia de la vía subcutánea, la kisspeptina-10 aplicada en forma de infusión intravenosa en dosis de 0.5 ó 1.0 µg/kg/h durante seis horas, indujo un aumento de LH en becerras de 140 a 295 kg de peso. Si bien la infusión intravenosa de 0.5 µg de kisspeptina-10 indujo la liberación de LH en todas las becerras, el efecto fue transitorio ya que luego de tres horas de infusión se observó una disminución de la LH, aparentemente debido a una desensibilización del receptor GPR54, como ha sido propuesto para ratas hembras adultas y monos Rhesus cercanos a la pubertad tratadas con dosis mayores de kisspeptina-10. Una interpretación de los resultados de este experimento es que la dosis baja de kisspeptina-10, ya sean administradas en forma de bolo intravenoso o infusión continua, es más adecuada para usarse en las becerras más pesadas, consecuentemente más cercanas a la pubertad, y las dosis mayor en las becerras con menor peso y por tanto más alejadas temporalmente de la misma. Es importante señalar que un patrón de LH inducido por la infusión intravenosa de kisspeptina-10, también fue reportado en borregas en anestro estacional, y que en un tratamiento en borregas adultas de mayor duración que el aquí efectuado, se indujo la ovulación; por lo que la inhibición inducida por 0.5 µg de kisspeptina-10/kg/h puede ser temporal y con un tratamiento de mayor duración podría inducir la ovulación en becerras peripuberales como lo hace en borregas adultas.

## X. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados del presente estudio permitieron profundizar e inferir sobre los mecanismos fisiológicos de la kisspeptina en la activación puberal de las hembras bovinas (Figura 8). En este aspecto se concluye que en becerras pre-púberes:

1. El eje gonadotrópico, pero no el somatotrópico, es altamente sensible a la kisspeptina exógena.
2. La sensibilidad del sistema kisspeptinérgico y GnRHérgico cambia con el desarrollo corporal y este cambio puede involucrar al IGF-I pero no a la leptina.
3. La administración de kisspeptina-10, imitando su liberación pulsátil endógena, es capaz de inducir incrementos consistentes de LH en todas las becerras y la ovulación seguida de formación de un cuerpo lúteo sólo en becerras con un desarrollo somático que más se aproxima al de las becerras puberales.
4. La administración de kisspeptina-10, imitando una secreción constante, inicialmente estimula la liberación de LH y luego de ello la inhibe; posiblemente debido a una desensibilización hipotalámica.

Desde un punto de vista práctico, en el presente estudio se concluye que:

1. La manipulación de la secreción de la LH y por tanto del eje gonadotrópico de las becerras pre-púberes puede ser ejercida con dosis de kisspeptina-10 muy por debajo de la hasta ahora usada en becerras, lo cual representa una disminución significativa del costo para cuando se diseñen tratamientos reproductivos “comerciales” basados en dicho neuropéptido.
2. Es necesario evaluar otras dosis de kisspeptina que, mediante infusión continua subcutánea o aplicación intramuscular, evoquen los fenómenos fisiológicos que dirigen hacia el inicio de la pubertad de manera similar a los

que la kisspeptina intravenosa dirige hacia la ovulación en hembras adultas. Solamente entonces, será factible el desarrollo de una herramienta útil/práctica para optimizar la reproducción en hembras bovinas.

3. Considerando el efecto inhibitorio de la infusión continua de kisspeptina-10 sobre la secreción de LH, un uso potencial del neuropéptido es el control de la reproducción en especies cuyo propósito zootécnico no es la producción alimentos destinados a la alimentación de los humanos.

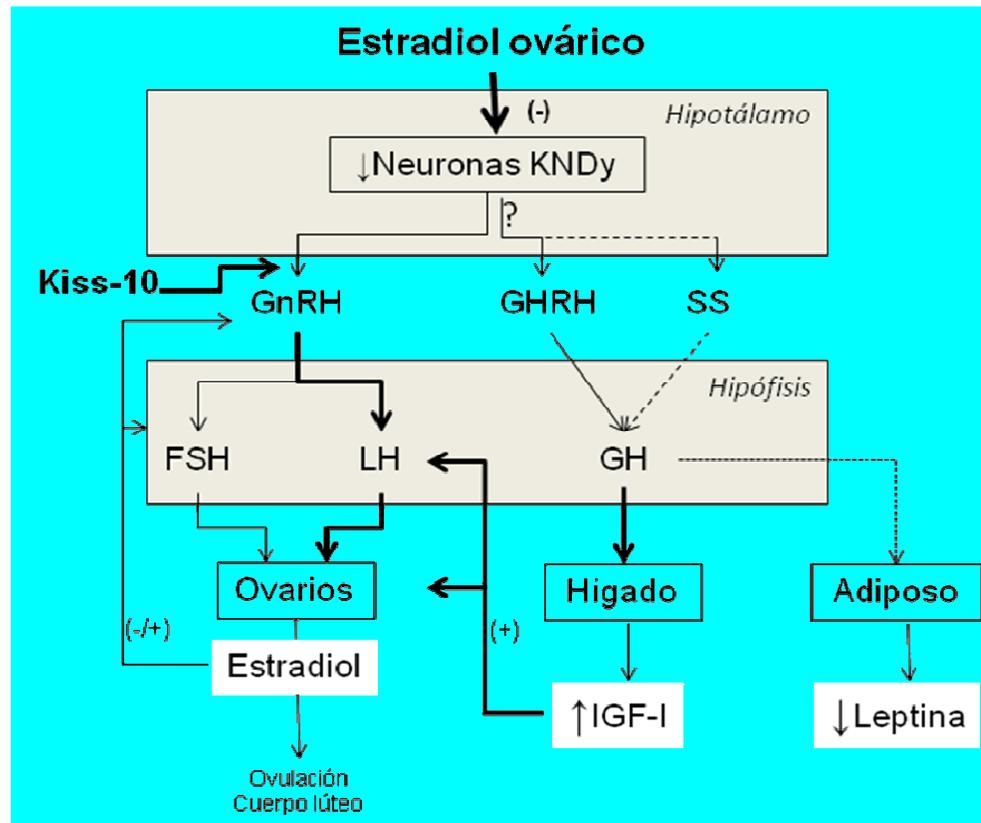


Figura 8. Modelo propuesto de los efectos de la kisspeptina en la actividad de los ejes gonadotrópico y somatotrópico en becerras pre-púberes. Durante esta etapa reproductiva, se infiere una baja secreción endógena de kisspeptina (s) desde las neuronas KNDy (de kisspeptina/neurokinina B/dinorfina A) inducida por la retroalimentación negativa del estradiol ovárico; lo anterior resulta en una actividad de las neuronas GnRHérgicas limitada y por tanto la secreción pulsátil de GnRH disminuida. Los efectos de la kisspeptina-10 (Kiss-10) en la actividad de los ejes gonadotrópico y somatotrópico para el inicio de la pubertad se resumen en Conclusiones generales.

## XI. LITERATURA CITADA

Adam, C.L., Gadd, T.S., Findlay, P.A., Wathes, D.C., 2000. IGF-I stimulation of luteinizing hormone secretion, IGF-binding proteins (IGFBPs) and expression of mRNAs for IGFs, IGF receptors and IGFBPs in the ovine pituitary gland. *J Endocrinology* 166(2):247-254.

Adams, G.P., Evans, A.C.O., Rawlings, N.C., 1994. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 100:27–33.

Alamilla, R.M., 2013. Respuesta de LH, FSH y GH a una aplicación de kisspeptina en becerras prepúberes de diferentes edades y su asociación con las concentraciones circulantes de leptina, IGF-1 y estradiol. [tesis de maestría en Ciencias]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México.

Amstalden, M., Alves, B.R.C., Liu, S., Cardoso, R.C., Williams, G.L., 2011. Neuroendocrine pathways mediating nutritional acceleration of puberty: insights from ruminant models. *Frontiers in Endocrinology* 2:1-7.

Amstalden, M., Coolen, L.M., Hemmerle, A.M., Billings, H.J., Connors, J.M., Goodman, R.L., Lehman, M.N., 2010. Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but not in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Journal of Neuroendocrinology* 22:1-12.

Andreelli, F., Hanaire-Broutin, H., Laville, M., Tauber, J.P., Riou, J.P., Thivolet, C., 2000. Normal reproductive function in leptin deficient patients with lipoatropic diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85:715–719.

Arreguin-Arevalo, J.A., Lents, C.A., Farmieri, T.A., Nett, T.M., Clay, C.M., 2007. KiSS-1 peptide induces release of LH by a direct effect on the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Animal Reproduction Science* 10:265-275.

Atkins, J.A., Pohler, K.G., Smith, M.S., 2013. Physiology and endocrinology of puberty in heifers. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.07.008>

Backholer, K., Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Iqbal, J., Ogawa, S., Li, K., Clarke, I.J., 2010. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 151:2233–2243.

Barb, C.R., 1999. The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. *Journal of Animal Science* 77:1249–1257.

Bechtold, D.A., Luckman, S.M., 2007. The role of RFamide peptides in feeding. *Journal of Endocrinology* 192:3–15.

Beg, M.A., Ginther, O.J., 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 132: 365–377.

Block, S.S., Smith, J.M., Ehrhardt, R.A., Diaz, M.C., Rhoads, R.P., Van Amburgh, M.E. Boisclair, Y.R., 2003. Nutritional and developmental regulation of plasma leptin in dairy cattle. *Journal Dairy Science* 86:3206-3214.

Bogusz, A.L., Hardy, S.L., Lehman, M.N., Connors, J.M., Hileman, S.M., Sliwowska, J.H., Billings, H.J., McManus, C.J., Valent, M., Singh, S.R., Nestor, C.C., Coolen, L.M., Goodman, R.L., 2008. Evidence that  $\epsilon$ -aminobutyric acid is part of the neural circuit mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. *Endocrinology* 149(6):2762–2772.

Breier, B.H., Ambler, G.R., Sauerwein, H., Surus, A., Gluckman, P.D., 1994. The induction of hepatic somatotrophic receptors after birth in sheep is dependent on parturition-associated mechanisms. *Journal of Endocrinology* 141:101–108.

Brickell, J.S., McGowan, M.M., Wathes, D.C., 2009. Effect of management factors and blood metabolites during the rearing period on growth in dairy heifers on UK farms. *Domestic Animal Endocrinology* 36:67–81.

Butler, A.A., Le Roith, D., 2001. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annual Review of Physiology* 63:141–164.

Byerley, D.J., Staigmiller, R.B., Berardinelli, J.G., Short, R.E., 1987. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. *Journal of Animal Science* 65:645–650.

Calderón, R.R.C., Villa-Godoy, A., Lagúnes, L.J., 1996. Determinación ultrasonográfica de la primera ovulación: asociación con la presentación de ciclos estrales regulares en vaquillas cebú y suizo pardo mantenidas en el trópico. *Técnica Pecuaria en México* 34(2):79-88.

Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Said, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148:5258–5267.

Carvalho, M.V., Diniz-Magalhães, J., Pereira, A.S.C., Santos, M.V., Silva, L.F.P., 2013. Effect of chronic infusion of leptin and nutrition on sexual maturation of zebu heifers. *Journal of Animal Science* 91:1207-1215.

Castaño, J.P., Martínez-Fuentes, A.J., Gutiérrez-Pascual, E., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., Malagón, M.L., 2009. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity?. *Peptides* 30:10–15.

Castellano, J., Navarro, V., Fernandez-Fernandez, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., Vazquez, M., Vigo, E., Casanueva, F., Aguilar, E., 2005. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 146:3917-3925.

Castellano, J.M., Bentsen, A.H., Mikkelsen, J.D., Tena-Sempere, M., 2010. Kisspeptins: bridging energy homeostasis and reproduction. *Brain Research* 1364:129–138.

Castellano, J.M., Bentsen, A.H., Sánchez-Garrido, M.A., Ruiz-Pino, F., Romero, M., Garcia-Galiano, D., Aguilar, E., Pinilla, L., Diéguez, C., Mikkelsen, J.D., Tena-Sempere, M., 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* 152:3396–3408.

Castellano, J.M., Roa, J., Luque, R.M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2009. KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: Physiologic roles and putative physiopathological implications. *Peptides* 30:139–145.

Chalivoix, S., Bagnolini, A., Caraty, A., Cognié, J., Malpoux, B., Dufourny, L., 2010. Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *Journal of Neuroendocrinology* 22(2):110-118.

Chehab, F.F., Lim, M.R., Lu, R., 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics* 12:318-320.

Chemineau, P., Bodin, L., Migaud, M., Thiéry, J.C., Malpoux, B., 2010. Neuroendocrine and genetic control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reproduction in Domestic Animals* 45(Suppl. 3):42–49; doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01661.x

Choe, H.K., Kim, D.E., Park, S.H., Lee, H.W., Park, J.K., Seong, J.Y., Lightman, S.L., Hoon, Son G.H., Kim, K., 2013. Synchronous activation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription and secretion by pulsatile kisspeptin stimulation. *PNAS* 110(14):56775682. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1213594110](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1213594110).

Christoforidis, A., Maniadaki, I., Stanhope, R., 2005. Growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis during puberty. *Pediatric Endocrinology Reviews* 3:5–10.

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.

Clarkson, J., Herbison, A.E., 2010. Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurons. *Journal of Neuroendocrinology* 23: 293–301

Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W.H., Caraty, A., Herbison, A.E., 2009a. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *Journal of Neuroendocrinology* 21:673–682.

Clarkson, J., Boon, W.C., Simpson, E.R., Herbison, A.E., 2009. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 150:3214–3220.

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

Cocchi, D., De Gennaro Colonna, V., Bagnasco, M., Bonacci, D., Muller, E.E., 1999. Leptin regulates GH secretion in the rat by acting on GHRH and somatostatinergic functions. *Journal of Endocrinology* 162:95-99.

Croft, S., Boehm, U., Herbison, A.E., 2013. Neurokinin B activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse. *Endocrinology* doi: 10.1210/en.2013-1231.

Cunningham, M.J., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biology of reproduction* 60: 216–222.

d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., 2008. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149:3926–3932.

d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P.C., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B.L., Aparicio, S.A.J.R., Colledge, W.H., 2007. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a

functional Kiss1 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(24):10714–10719.

Daftary, S.S., Gore, A.C., 2005. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. Experimental Biology and Medicine 230:292-306.

Day, M.L., Imakawa, K., Garcia-Winder, G., Zalesky, D.D., Schanbacher, B.D., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1984. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: Estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. Biology of Reproduction 31:332-341.

Day, M.L., Nogueira, G.P., 2013. Management of age at puberty in beef heifers to optimize efficiency of beef production. Animal Frontiers 3(4):6-11.

Day, M.L., Anderson, L.H., 1998. Current concepts on the control of puberty in cattle. Journal of Animal Science 76(Suppl. 3):1–15.

Day, M.L., Imakawa, K., Wolfe, P.L., Kittok, R.J., Kinder, J.E., 1987. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo- pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. Biology of Reproduction 37:1054–1065.

De Bond, J.A., Smith J., 2014. Kisspeptin and energy balance in reproduction. Reproduction 147: R53-R67.

de Lucia, R.F.S., Pereira, F.V., Nogueira, G.P., 2002. Follicular population in precocious and non precocious Nelore heifers during prepubertal period. Theriogenology 57(Suppl. 1):603 (Abstr.)

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss-1-derived peptide receptor GPR54. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:10972–10976.

Decourt, C., Tillet, Y., Caraty, A., Franceschini, I., Briant, C., 2008. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *The Journal of Chemical Neuroanatomy* 36(3-4):131-137.

Deresz, F., Jaime, C.M.J., Carvalho, M.R., González, C.A., 1987. The effect of body weight at calving on milk production and reproductive performance of Friesian x Zebu heifers. *Animal Production* 45:325-333.

Desroziers, E., Mikkelsen, J., Simonneaux, V., Keller, M., Tillet, Y., Caraty, A., Franceschini, I., 2010. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrus rat. *Journal of Neuroendocrinology* 22:1101–1112.

Díaz-Torga, G.S., Mejía, M.E., González-Iglesias, A., Formía, N., Becú-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I.M., 2001. Metabolic cues for puberty onset in free grazing Holstein heifers naturally infected with nematodes. *Theriogenology* 56:111–22.

Diskin, M.G., Mackey, D.R., Roche, J.F., Sreenan, J.M., 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science* 78:345–370.

DiVall, S.A., Williams, T.R., Carver, S.E., Koch, L., Brüning, J.C., Kahn, R., Wondisford, F., Radovick, S., Wolfe, A., 2010. Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 120:2900-2909.

Dodson, S.E., McLeod, B.J., Haresign, W., Peters, A.R., Lamming, G.E., Das, D., 1989. Ovarian control of gonadotrophin secretion in the prepubertal heifer. *Animal Reproduction Science* 21:1-10.

Donato, Jr, J., Elias, F.C., 2011. The ventral premammillary nucleus links metabolic cues and reproduction. *Frontiers in endocrinology* 2:1-10. doi: 10.3389/fendo.2011.00057

Donato, Jr. J., Cravo, R.M., Frazão, R., Gautron, L., Scott, M.M., Lachey, J., Castro, I.A., Margatho, L.O., Lee, S., Lee, C., Richardson, J.A., Friedman, J., Chua Jr, S.,

Coppari, R., Zigman, J.M., Elmquist, J.K., Elias, C.F., 2011. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *The Journal of Clinical Investigation* 121(1):355–368. doi:10.1172/JCI45106

Dungan, H.M., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2006. Minireview: Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of the Gonadotropin-Releasing Hormone secretion. *Endocrinology* 147:1154-1158.

Ebling, J.P., 2005. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 129(6): 675–683.

Ebling, F.J.P., 2010. Photoperiodic regulation of puberty in seasonal species. *Molecular and Cellular Endocrinology* 324:95–101.

Etherton, T.D., 2004. Somatotropic function: the somatomedin hypothesis revisited. *Journal of Animal Science* 82:239-244.

Estrada, K.M., Clay, C.M., Pompolo, S., Smith, J.T., Clarke, I.J., 2006. Elevated KiSS-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *Journal of Neuroendocrinology* 18 806–809. (doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01485.x)

Evans, A.C.O., Adams, G.P., Rawlings, N.C., 1994. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 100:187-194.

Ezzat, A.A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Yamashita, T., Hirata, T-I., Sawai K., Hashizume T., 2009. Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *Journal of Reproduction and Development* 55:650-654.

Fajersson, P., Barradas, H.V., Roman-Ponce, H., Cook, R.M., 1991. The effects of dietary protein on age and weight at the onset of puberty in brown swiss and zebu heifers in the tropics. *Theriogenology* 35(4):845-855.

Fortes, M.R., Li, Y., Collis, E., Zhang, Y., Hawken, R.J., 2013. The IGF1 pathway genes and their association with age of puberty in cattle. *Animal Genetics* 44:91–95.

Foster, D.L., Nagatani, S., 1999. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biology of Reproduction* 60:205–215.

Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., Caraty, A., 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters*. 401:225–230.

Franceschini, I., Desroziers, E., 2013. Development and aging of the kisspeptin–GPR54 system in the mammalian brain: what are the impacts on female reproductive function?. *Frontiers in Endocrinology* 4:1-20. doi: 10.3389/fendo.2013.00022.

Freeman, M. E., 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, NJD (ed.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, pp. 2327-2388.

Gallegos-Sánchez, J., Delaleu, B., Caraty, A., Malpoux, B., Thiéry, J.C., 1997. Estradiol acts locally within the retrochiasmatic area to inhibit pulsatile luteinizing-hormone release in the female sheep during anestrus. *Biology of Reproduction* 56: 1544–1549.

Garcia, M.R., Amstalden, M., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Williams, G.L., 2003. Age at puberty, total fat and conjugated linoleic acid content of carcass, and circulating metabolic hormones in beef heifers fed a diet high in linoleic acid beginning at four months of age. *Journal of Animal Science* 81:261-268.

Garcia, M.R., Amstalden, M., Williams, S.W., Stanko, R.L., Morrison, C.D., Keisler, D.H., Nizielski, S.E., Williams, G.L., 2002. Serum leptin and its adipose gene

expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *Journal of Animal Science* 80:2158-2167.

Gasser, C.L., Grum, D.E., Mussard, M.L., Fluharty, F.L., Kinder, J.E., Day, M.L., 2006a. Induction of precocious puberty in heifers I: enhanced secretion of luteinizing hormone. *Journal of Animal Science* 84:2035-2041.

Gasser, C.L., Burke, C.R., Mussard, M.L., Behlke, E.J., Grum, D.E., Kinder, J.E., Day, M.L., 2006b. Induction of precocious puberty in heifers II: Advanced ovarian follicular development. *Journal of Animal Science* 84: 2042-2049.

Goodman R.L., Inskeep, E.K., 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. In: Knobil E, NJD (ed.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, pp. 2389–2447.

Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., de Oliveira, C.V.R., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe also express dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148:5752–5760.

Goodman, R.L., Maltby, M.J., Millar, R.P., Hileman, S.M., Nestor, C.C., Whited, B., Tseng, A.S., Coolen, L.M., Lehman, M.N., 2012. Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrous ewes. *Endocrinology* 153:0000–0000; doi:10.1210/en.2012-1611

Gottsch, M.L., Navarro, V.M., Zhao, Z., Glidewell-Kenney, C., Weiss, J., Jameson, J.L., Clifton, D.K., Levine, J.E., Steiner, R.A., 2009. Regulation of Kiss1 and Dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *The Journal of Neuroscience* 29(29):9390–9395.

Greives, T.J., Mason, A.O., Scotti, M.A.L., Levine, J., Ketterson, E.D., Kriegsfeld, L.J., Demas, G.E., 2007. Environmental control of kisspeptin: Implications for seasonal reproduction. *Endocrinology* 148:1158–1166.

Guerriero, K.A., Keen, K. L. Terasawa, E., 2012a. Developmental increase in kisspeptin-54 release in vivo is independent of the pubertal increase in estradiol in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*. 153:1887-1897.

Guerriero, K.A., Keen, K.L., Millar, R.P., Terasawa, E., 2012b. Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female Rhesus monkeys (*macaca mulatta*): implication for the mechanism of puberty. *Endocrinology* 153: 825–836.

Gutierrez-Pascual, E., Martinez-Fuentes, A.J., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Malagon, M.M., Castano, J.P., 2007. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology* 19:521–530.

Hall, J.B., Schillo, K.K., Fitzgerald, B.P., Bradley, N.W., 1994. Effects of recombinant bovine somatotropin and dietary energy intake on growth, secretion of luteinizing hormone, follicular development, and onset of puberty in beef heifers. *Journal of Animal Science* 72:709-718.

Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Herbison, A.E., 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *The Journal of Neuroscience* 25:11349–11356.

Hashizume, T., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Ezzat, A.A., Sawai, K., Yamashita, T., 2010. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Animal Reproduction Science* 118:37–41.

Henry, B.A., Goding, J.W., Tilbrook, A.J., Dunshea, F.R., Clarke, I.J., 2001. Intracerebroventricular leptin infusion elevates the secretion of luteinizing hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of body weight. *Journal of Endocrinology* 168:67–77.

Herbison, A.E., 2006. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Knobil E, NJD (ed.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, pp. 1415–1482.

Hiney, J.K., Srivastava, V., Nyberg, C.L., Ojeda, S.R., Dees, W.L., 1996. Insulin-like growth factor-I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology* 137:3717–3727

Hiney, J.K., Srivastava, V.K., Pine, M.D., Dees, W.L., 2009. Insulin-like growth factor-I activates KiSS-1 gene expression in the brain of the prepubertal female rat. *Endocrinology* 150:376–384.

Honaramooz, A., Aravindakshan, J., Chandolia, R.K., Beard, A.P., Bartlewski, P.M., Pierson, R.A., Rawlings, N.C., 2004. Ultrasonographic evaluation of the prepubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *Animal Reproduction Science* 80:15–29.

Hrabovszky, E., Liposits, Z., 2013. Afferent neuronal control of type-I gonadotropin releasing hormone neurons in the human. *Frontiers in endocrinology* 4:1-19.

Hussain, M.A., Schmitz, O., Mengel, A., Keller, A., Christiansen, J.S., Zapf, J., Froesch, E.R., 1993. Insuline-like growth factor I stimulates lipid oxidation, reduces protein oxidation, and enhances insulin sensitivity in humans. *Journal of Clinical Investigation* 92:2249-2256.

Hwa, V., Oh ,Y., Rosenfeld, R.G., 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews* 20(6):761–787.

Irwing, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of kiss-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80:264-272.

Iwasa, T., Matsuzaki, T., Murakami, M., Kinouchi, R., Gereltsetseg, G., Fujisawa, S., Kuwahara, A., Yasui, T., Irahara, I., 2010. Sensitivities of mRNA expression levels of

*Kiss1* and its receptor, *Kiss1r*, to nutritional status are changed during the developmental period in female rats. *Journal of Endocrinology* 207:195–202.

Jackson, L.M., Ichimaru, T., Jaffe, C.A., Foster, D.L., 2002. Effects of leptin on LH secretion during developmental and nutritional hypogonadotropism. 84th Annual Meeting Endocrine Society 84:125. (Abstract).

Kadokawa, H., Matsui, M., Hayashi, K., Matsunaga, N., Kawashima, C., Shimizu, T., Kida, K., Miyamoto, A., 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *Journal of Endocrinology* 196:331-334.

Kanda, S., Oka, Y., 2012. Evolutionary insights into the steroid sensitive *kiss1* and *kiss2* neurons in the vertebrate brain. *Frontiers in Endocrinology* 3(28):1-10.

Kanematsu, T., Irahara, M., Miyake, T., Shitsukawa, K., Aono, T., 1991. Effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-pituitary axis in vitro. *Acta Endocrinology* 125, 227-233.

Katoh, K., Takahashi, T., Kobayashi, Y., Obara, Y., 2007. Somatotropic axis and nutrition in young ruminants around weaning time. *Asian-Australian Journal Animal Science* 20:1156-1168.

Kauffman, A.S., Smith, J.T., 2013. Kisspeptin signaling in reproductive biology. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 784. Springer. DOI 10.1007/978-1-4614-6199-9

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

Kinder, J.E., Bergfeld, E.G., Wehrman, M.E., Peters, K.E., Kojima, F.N., 1995. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *Journal Reproduction and Fertility (Suppl.)* 49:393-407.

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

Kwintkiewicz, J., Giudice, L.C., 2009. The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. *Seminars in Reproductive Medicine* 27:43–51. doi:10.1055/S-0028-1108009

Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute* 88(23):1731-1737.

Lehman, M.N., Karsch, F.J., 1993. Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology* 133:887–895.

Lehman, M.N., Merkley, C.M., Coolen, L.M., Goodman, R.L., 2010a. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Research* 1364:90-102.

Lehman, M.N., Coolen, L.M., Goodman, R.L., 2010b. Minireview: Kisspeptin/neurokinin b/dynorphin (kndy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151:3479–3489.

Lehman, M.L., Ladha, Z., Coolen, L.M., Hileman, S.M., Connors, J.M., Goodman, R.L., 2010c. Neuronal plasticity and seasonal reproduction in sheep. *European Journal of Neuroscience* 32:2152–2164.

Lents, C.A., Heidorn, N.L., Barb, C.R., Ford, J.J., 2008. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction* 135:879-887.

Li, X.F., Lin, Y.S., Kinsey-Jones, J.S., O'Byrne, K.T., 2012. High-fat diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin b expression in puberty- advanced female rats. *Endocrinology* 153:000-000. doi:10.1210/en.2012-1223.

Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I.J., Smith J.t. Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *Journal of Neuroendocrinology* 23, 871–882

Lomniczi, A., Loche, A., Castellano, J.M., Ronnekleiv, O.L., Bosch, M., Kaidar, G., Knoll, J.J., Wright, H., Pfeifer, G.P., Ojeda, S.R., 2013. Epigenetic control of female puberty. *Nature Neuroscience* 16:281–289.

Lucy, M.C., Jiang, H., Kobayashi, Y., 2001. Changes in the somatotropin axis associated with the initiation of lactation. *Journal of Dairy Science* 84:113–119.

Lucy, M.C., 2012. Growth hormone regulation of follicular growth. *Reproduction, Fertility and Development* 24:19–28.

Maciel, M.N., Zieba, D.A., Amstalden, M., Keisler, D.H., Neves, J.P., Williams, G.L., 2004a. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: Effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. *Journal of Animal Science* 82:2930-2936.

Maciel, M.N., Zieba, D.A., Amstalden, M., Keisler, D.H., Neves, J.P., Williams, G.L., 2004b. Leptin prevents fasting-mediated reductions in pulsatile secretion of luteinizing hormone and enhances its gonadotropin-releasing hormone-mediated release in heifers. *Biology of Reproduction* 70:229–235.

Madgwick, S., Evans, A.C.O., Beard, A.P., 2005. Treating with GnRH 4 to 8 weeks of age advanced growth and age at puberty. *Theriogenology* 63:2323–2333.

Maeda, K., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., Oka, Y., Tsukamura, H., Okamura, H., 2010. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Research* 1364:103–115.

Magee, C., Foradori, C.D., Bruemmer, J.E., Arreguin-Arevalo, J.A., McCue, P.M., Handa, R.J., Squires, E.L., Clay, C.M., 2009. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology* 150:2813–2821.

Makri, A., Pissimissis, N., Lembessis, P., Polychronakos, C., Koutsilieris, M., 2008. The kisspeptin (KiSS-1)/GPR54 system in cancer biology. *Cancer Treatment Reviews* 34:682–692.

Malpaux, B., 2006. Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. In: Knobil E, NJD (ed.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, pp. 2231–2281.

Martin, L.C., Brinks, J.S., Bourdon, R.M., Cundiff, L.V., 1992. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. *Journal of Animal Science* 70:4006–4017.

McLeod, B.J., Peters, A.R., Haresign, W., Lamming, G.E., 1985. Plasma LH and FSH responses and ovarian activity in prepubertal heifers treated with repeated injections of low doses of GnRH for 72 h. *Journal of Reproduction and Fertility* 74:589–595.

McMahon, C.D., Radcliff, R.P., Lookingland, K.J., Tucker, H.A., 2001. Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 20:65–87.

Merkley, C.M., Porter, K.L., Coolen, L.M., Hileman, S.M., Billings, H.J., Drews, S., Goodman, R.L., Lehman, M.N., 2012. KNDy (Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin) neurons are activated during both pulsatile and surge secretion of LH in the ewe. *Endocrinology* 153(11):5406–5414.

Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H. Caraty, A., Aparicio, S.A.J.R., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:1761–1766.

Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V., 2009. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides* 30:26–33.

Millar, R.P., Roseweir, A.K, Tello,J.A., Anderson, R.A., George, J.T., Morgan,K., Pawson, A.J., 2010. Kisspeptin antagonists:Unraveling the role of kisspeptin in reproductive physiology. *Brain Research* 1364: 81-89.

Moenter, S.M., DeFazio, A.R., Pitts, G.R., Nunemaker, C.S., 2003. Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology* 24(2):79-97.

Morrison, C.D., Daniel, J.A., Holmberg, B.J., Djiane, J., Raver, N., Gertler, A., Keisler, M.C.D., Wood, R., McFadin, E.L., Whitley, N.C., Keisler, D.H., 2002. Effect of intravenous infusion of recombinant ovine leptin on feed intake and serum prepubertal ewe lambs. *Domestic Animal Endocrinology* 22:103-112.

Mounzih, K. Lu, R., Chehab, F.F., 1997. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 138:1190–1193.

Nakada, K., Moriyoshi, M., Nakao, T., Watanabe, G., Taya, K., 2000. Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, E2-17 $\beta$ , testosterone, progesterone and inhibin in heifers from birth to puberty. *Domestic Animal Endocrinology* 18:57-69.

Nakada, K., Ishikawa, Y., Nakao, T., Sawamukai, Y., 2002. Changes in responses to GnRH on luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion in prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Development* 48:545-551.

Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Castellano, J.M., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinillam L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M., 2004a. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *Journal of Physiology* 561:379–386.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sánchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2004b. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of kiss-1 peptide. *Endocrinology* 145:4565–4574.

Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *Journal of Neuroscience* 29:11859-11866.

Navarro, V.M., Ruiz-Pino, F., Sánchez-Garrido, M.A., García-Galiano, D., Hobbs, S.J., Manfredi-Lozano, León, M.S., Sangiao-Alvarellos, S., Castellano, J.M., Clifton, D.K., Pinilla, L., Steiner, R.A., Tena-Sempere, M., 2012. Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *Journal of Neuroscience* 15:2388–2397.

Navarro, V.M., Tena-Sempere, M., 2012. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nature Reviews Endocrinology* 8:40-53.

Navarro, V.M., 2012. New insights into the control of pulsatile GnRH release: the role of Kiss1/neurokinin B neurons. *Frontiers in endocrinology* doi: 10.3389/fendo.2012.00048.

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

Nogueira, G.P., 2004. Puberty in south american *bos indicus* (Zebu) cattle. *Animal Reproduction Science* 82–83:361–372.

Oakley, A.E., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrine Reviews* 30:713-43.

Ohkura, S., Takase, K., Matsuyama, S., Mogi, K., Ichimaru, T., Wakabayashi, Y., Uenoyama, Y., Mori, Y., Steiner, R.A., Tsukamura, H., Maeda, K.I., Okamura, H., 2009. Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *Journal of Neuroendocrinology* 21:813–821.

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613–617.

Ojeda, S.R., Lomniczi, A., Mastronardi, C., Heger, S., Roth, C., Parent, A.S., Matagne, V., Mungenast, A.E, 2006. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: Is the time ripe for a systems biology approach?. *Endocrinology* 147:1166–1174.

Okamura, H., Murata, K., Sakamoto, K., Wakabayashi, Y., Ohkura, S., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2010. Male effect pheromone tickles the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator. *Journal of Neuroendocrinology* 22:825–832.

Ostlund, R.E., Yang, J.W., Klein, S., Gingerich, R., 1996. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81:3909-3913.

Oyedipe, E.O., Osori, D.I.K., Akerejola, O., Saror, D., 1982. Effect of level of nutrition on onset of puberty and conception rates of Zebu heifers. *Theriogenology* 18:525-539.

Padmanabhan, V., McNeilly, A.S., 2001. Is there an FSH-releasing factor?. *Reproduction* 121, 21–30.

Pardini, V.C., Victoria, I.M.N., Rocha, S.M.V., Andrade, D.G., Rocha, A.M., Pieroni, F.B., Milagres, G., Purisch, S., Velho, G., 1998. Leptin levels, b-cell function, and insulin sensitivity in families with congenital and acquired generalized lipoatropic diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83:503–508.

Patterson, D.J., Perry, R.C., Kiracofe, G.H., Bellows, R.A., Staigmiller, R.S., Corah, L.R., 1992. Management considerations in heifer development and puberty. *Journal of Animal Science* 70:4018-4035.

Perry, R.C., Corah, L.R., Cochran, R.C., Brethour, J.R., Olson, K.C., Higgins, J.J., 1991. Effects of hay quality, breed, and ovarian development on onset of puberty and reproductive performance of beef heifers. *Journal of Production Agriculture* 4:13-18.

Pielecka-Fortuna, J., Moenter, S.M., 2010. Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner. *Endocrinology* 151:291–300.

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., Tena-Sempere, M., 2012. Kisspeptins and Reproduction: Physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiology Reviews* 92:1235-1316.

Poling, M.C., Kauffma, A.S., 2103. Organizational and activational effects of sex steroids on kisspeptin neuron development. *Frontiers in Neuroendocrinology* 34:3–17.

Quennell, J.H., Mulligan, A.C., Tups, A., Liu, X., Phipps, S.J., Kemp, C.J., Herbison, A.E., Grattan, D.R., Anderson, G.M., 2009. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 150:2805–2812.

Radcliff, R.P., Bandera, M.J., Kobayashi, Y., Sharma, B.K., Tucker, H.A., Lucy, M.C., 2004. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotropic axis in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 87:1229-1235.

Ramaswamy, S., Guerriero, K.A., Gibbs, R.B., Plant, T.M., 2008. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 149:4387–4395.

Ramaswamy, S., Seminara, S.B., Pohl, C.R., DiPietro, M.J., Crowley, Jr. D.F., Plant, T.M., 2007. Effect of continuous intravenous administration of human metastin 45–54

on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 148:3364–3370.

Rance, N.E., Krajewski, S.J., Smith, M.A., Cholanian, M., Dacks, P.A., 2010. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Research* 1364:116–128.

Rawlings, N.R., Evans, A.C.O., Honaramooz, A., Bartlewski, P.M., 2003. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal Reproduction Science* 78:259–270.

Redmond, R.S., Macedo, G.G., Velez, I.C., Caraty, A., Williams, G.L., Amstalden, M., 2011a. Kisspeptin activates the hypothalamic–adenohypophyseal–gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction* 141:541–548.

Redmond, J.S., Baez-Sandoval, G.M., Spell, K.M., Spencer, T.E., Lents, C.A., Williams, G.L., Amstalden, M., 2011b. Developmental changes in hypothalamic Kiss1 expression during activation of the pulsatile release of Luteinising Hormone in maturing ewe lambs. *Journal of Neuroendocrinology* 23:815–822.

Rincker, L.E.D., VandeHaar, M.J., Wolf, C.A., Liesman, J.S., Chapin, L.T., Nielsen S.w., 2011. Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *Journal of Dairy Science* 94:3554–2567.

Rius, A.G., Connor, E.E., Capuco, A.V., Kendall, P.E., Auchtung-Montgomery, T.L., Dahl, G.E., 2005. Long-day that enhances puberty does not limit body growth in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 88:4356-4365.

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*.<http://dx.doi.org/10.1155/2013/518046>

Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2008a. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29:48–69.

Roa, J., Vigo, E., García-Galiano, D., Castellano, J.M., Navarro, V.M., Pineda, R., Diéguez, D., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Semperem M., 2008b. Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 294:1088–1096.

Roa, J., Castellano, J.M., Navarro, V.M., Handelsman, D.J., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2009. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides* 30:57–66.

Roa, J., Tena-Sempere, M., 2010. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21:519–528.

Roberts, C.A., McCutcheon, S.N., Blair, H.T., Gluckman, P.D., Breier, B.H., 1990. Developmental patterns of plasma insulin-like growth factor-1 concentrations in sheep. *Domestic Animal Endocrinology* 7:457-464.

Rosen, C.J., 2000. Growth hormone and aging. *Endocrine* 12:197–202.

Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Goto, Y., Jin, J., Sawai, K., Hashizume, T., 2011. Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats. *Animal Science Journals* doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00978.x

Sakamoto, K., Murata, K., Wakabayashi, Y., Yayou, K., Ohkura, S., Takeuchi, Y., Mori, Y., Okamura, H., 2012. Central administration of neurokinin B activates kisspeptin/NKB neurons in the arcuate nucleus and stimulates luteinizing hormone secretion in ewes during the non-breeding season. *Journal of Reproduction and Development* 58(6):700-706.

Saleri, R., Giustina, A., Tamanini, C., Valle, D., Burattin, A., Wehrenberg, W.B., Baratta, M., 2004. Leptin stimulates growth hormone secretion via a direct pituitary effect combined with a decreased somatostatin tone in a median eminence-pituitary perfusion study. *Neuroendocrinology* 79:221-228.

Schillo, K., Hall, J.B., Hileman, S.M., 1992. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *Journal of Animal Science* 70:3994-4005.

Schneider, J.E., 2004. Energy balance and reproduction. *Physiology and Behavior* 81:289–317.

Sébert, M.E., Lomet, D., Ben Saïd, S., Monget, P., Briant, C., Scaramuzzi, R.J., Caraty, A., 2010. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol. *Domestic Animal Endocrinology* 38:289–298.

Seidel, G.E. Jr., Larson, L.L., Foorv, R.H., 1971. Effects of age and gonadotropin treatment on superovulation in the calf. *Journal of Animal Science* 33:617-622.

Seminara, S.B., DiPietro, M.J., Ramaswamy, S., Crowley, W.F. Jr., Plant, T.M., 2006. Continuous human metastin 45–54 infusion desensitizes g protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin- releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* 147:2122–2126.

Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O’Rahilly, S., Carlton, M.B.L., Crowley, W.F.Jr., Aparicio, A.J.R., Colledge, W.H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England Journal of Medicine* 349:1614-1627.

Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., Plan, T.M. 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:2129–2134.

Silva, J.R.V., Figueiredo, J.R., van den Hurk, R., 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 71:1193–1208.

Singh, D., Sanyal, S., Chattopadhyay, N., 2011. The role of estrogen in bone growth and formation: changes at puberty. *Cell Health and Cytoskeleton* 3:1-12.

Smith, J.T., Acohido, B.V., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2006. Kiss-1 neurons are direct targets for leptin in the db/db mouse. *Journal of Neuroendocrinology* 18:298-303.

Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A., Clarke, I.J., 2007a. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 148(3):1150–1157.

Smith, J.T., Coolen, L.M., Kriegsfeld, L.J., Sari, I.P., Jaafarzadehshirazi, R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., Ubuka, T., Bentley, J.E., Clarke, I.J., Lehman, M.N., 2007b. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 149(11):5770–5782.

Smith, J.T., 2008. Kisspeptin signalling in the brain: Steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Research Reviews* 57:288–298.

Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Caraty, A., Millar, R.P., Clarke, I.J., 2008. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory Luteinizing Hormone surge: Evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* 149:1951–1959.

Smith, J.T., 2009. Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. *Peptides* 30:94–102.

Smith, J.T., Saleh, S.N.H., Clarke, L.J., 2009b. Seasonal and cyclical change in the luteinizing hormone response to kisspeptin in the ewe. *Neuroendocrinology* 90:283-291.

Smith, J.T., Clarke, L.J., 2010. Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. *Molecular and Cellular Endocrinology* 324:102–109.

Smith, J.T., Li, Q., Yap, K.S., Shahab, M., Roseweir, A.K., Millar, R.P., Clarke, I.J. 2011. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology* 152:1001–1012.

Smith, J.T., 2012. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. *Domestic Animal Endocrinology* 43:75–84.

Staigmiller, R., Short, R., Bellows, R., 1979. Induction of LH surges with 17-beta estradiol in prepuberal beef heifers: An age dependent response. *Theriogenology* 11:453-459.

Sun, Y., Tian, Z., Zhao, H., Wong, S.T.C., Chen, B., 2007. Characteristic of hypothalamic kisspeptin expression in the pubertal development of precocious female rats. *Neuroscience Letters* 420:12–17.

Sunderland, S.J., Crowe, M.A., Boland, M.P., Roche, J.F., Ireland, J.J., 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 101(3):547-55.

Suttie, J.M., Lord, E.A., Gluckman, P.D., Fennessy, P.F., Littlejohn, R.P., 1991. Genetically lean and fat sheep differ in their growth hormone response to growth hormone-releasing factor. *Domestic Animal Endocrinology* 8:323–329.

Swali, A., Cheng, Z., Bourne, N., Wathes, D.C., 2008. Metabolic traits affecting growth rates of pre-pubertal calves and their relationship with subsequent survival. *Domestic Animal Endocrinology* 35:300–313.

Tanaka, T., Ohkura, S., Wakabayashi, Y., Okamura, H., 2012. Effect of peripherally administered kisspeptin-10 on GnRH neurosecretion into the hypophyseal portal circulation in ovariectomized goat does. *Small Ruminant Research* 105:273–276.

Tena-Sempere, M., 2012. Deciphering puberty: novel partners, novel mechanisms. *European Journal of Endocrinology* 167:733–747.

Terasawa, E., Fernandez, D.L., 2001. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocrine Reviews* 22:111–151.

Tomikawa, J., Homma, T., Tajima, S., Shibata, T., Inamoto, J., Takase, K., Inoue, N., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Maeda, K., Tsukamura, H., 2010. Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic KiSS1 gene in the pig. *Biology of Reproduction* 82:313–319.

Topaloglu, A.K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A.S., Kotan, L.D., Porter, K.M., Serin, A., Mungan, N.O., Cook, J.R., Ozbek, M.N., Imamoglu, S., Akalin, N.S., Yuksel, B., O’Rahilly, S., Semple, R.K., 2009. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nature Genetics* 41:354–358

Uenoyama, Y., Inoue, N., Pheng, V., Homma, T., Takase, K., Yamada, S., Ajiki, K., Ichikawa, M., Okamura, H., Maeda, K.I., Tsukamura, H., 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* 23:863–870.

Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.I., 2009. Kisspeptin/Metastin: a key molecule controlling two modes of gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone release in female rats. *Journal of Neuroendocrinology* 21:299–304.

Velazquez, M.A., Spicer, L.J., Wathes, D.C., 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domestic Animal Endocrinology* 35:325–342.

Veldhuis, J.D., Roemmich, J.N., Richmond, E.J., Rogol, A.D., Lovejoy, J.C., Sheffield-Moore, M., Mauras, N., Bowers, C.Y., 2005. Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. *Endocrine Reviews* 26(1):114–146.

Veldhuis, J.D., Roemmich, J.N., Richmond, E.J., Bowers, C.Y., 2006. Somatotropic and gonadotropic axes linkages in infancy, childhood, and the puberty-adult transition. *Endocrine Reviews* 27(2):101–140.

Vestergaard, M., Purup, S., Frystyk, J., Løvendahl, P., Sørensen, T.M., Riis, P.M., Flint, D.J., Sejrsen, K., 2003. Effects of growth hormone and feeding level on endocrine measurements, hormone receptors, muscle growth and performance of prepubertal heifers. *Journal of Animal Science* 81:2189–2198.

Vicini, J.L., Buonomo, F.C., Veenhuizen, J.J., Miller, M.A., Clemmons, D. .R, Collier, R.J., 1991. Nutrient balance and stage of lactation affect responses of insulin, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor-binding protein 2 to somatotropin administration in dairy cows. *Journal of Nutrition* 121:1656–1664.

Villa-Godoy, A., Arreguín, A.J.A., 1993. Tecnología disponible para optimizar el desempeño reproductivo en hembras bovinas del trópico. *Memorias del XVI Simposium de Ganadería Tropical*. Veracruz, Ver. 55-84.

Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, M., Navarro, V.M., Klifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K-I., Steiner, R,A,, Okamura, H., 2010. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *The Journal of Neuroscience* 30(8):3124–3132.

Wang, J., Zhou, H., Zhang, T., Sun, L., Xu, J., Lou, Y., 2012. Evidence for a role of KISS-1/GPR54 system in decreased luteinizing hormone (LH) secretion in fasted prepubertal ewes. *African Journal of Biotechnology* 11:687-693. DOI: 10.5897/AJB11.2853

Wang, J., Zhou, J., Bondy, C.A. 1999. IGF1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *The FASEB Journal* 13:1985–90127.

Yin, W., Gore, A.C., 2010. The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1204:113-122.

Whitlock, B.K., Daniel, J.A., Wilborn, R.R., Rodning, S.P., Maxwell, H.S., Steele, B.P., Sartin, J.L., 2008. Interaction of estrogen and progesterone on kisspeptin-10-

stimulated luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Neuroendocrinology* 88:212-215.

Whitlock, B.K., Daniel, J.A., Wilborn, R.R., Maxwell, H.S., Steele, B.P., Sartin, J.L., 2010. Interaction of kisspeptin and the somatotrophic axis. *Neuroendocrinology* 92:178-188.

Williams, G.L., Amstalden, M., Garcia, M.R., Stanko, R.L., Nizielski, S.E., Morrison, C.D., Keisler, D.H., 2002. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 23:339-349.

Yelich, J.V., Wettemann, R.P., Marston, T.T., Spicer, L.J., 1996. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domestic Animals Endocrinology* 13:325–338.

Yeo, S.H., Herbison, A.E., 2011. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology* doi:10.1210/en.2011-0164.

Zhang, C., Bosch, M.A., Rønnekleiv, O.K., Kelly, M.J., 2013. Kisspeptin activation of TRPC4 channels in female GnRH neurons requires PIP2 depletion and cSrc kinase activation. *Endocrinology* 154:2772–2783.

Zhou, J., Kumar, T.R., Matzuk, M.M., Bondy, C., 1997. Insulin-like growth factor-I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Molecular Endocrinology* 11:1924–1933.

Zieba, D.A., Amstalden, M., Morton, S., Maciel, M.N., Keisler, D.H., Williams, G.L., 2004. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. *Biology of reproduction* 71:804–812.