



# **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

## **TESIS DOCTORAL**

### **CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL SISTEMA NKB/NK3R EN EL CONTROL DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA**

**Francisco Ruiz Pino**

**Córdoba, octubre 2019**

TITULO: *CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL SISTEMA NKB/NK3R EN EL CONTROL DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA*

AUTOR: *Francisco Ruiz Pino*

---

© Edita: UCOPress. 2019  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---



# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

## CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL SISTEMA NKB/NK3R EN EL CONTROL DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Francisco Ruiz Pino**, licenciado en Biología por la Universidad de Córdoba, para optar al grado de **Doctor** en Ciencias.

Los Directores,

**Dr. Manuel Tena Sempere**  
Catedrático de Fisiología de la  
Universidad de Córdoba

**Dr. Juan Manuel Castellano Rodríguez**  
Investigador Postdoctoral Contratado de la  
Universidad de Córdoba





**TÍTULO DE LA TESIS:** CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL SISTEMA NKB/NK3R EN EL CONTROL DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA

**DOCTORANDO:** Francisco Ruiz Pino

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo de Tesis Doctoral titulado *“Caracterización del papel del sistema NKB/NK3R en el control de la función reproductora”* ha sido completado de forma muy satisfactoria por el doctorando Francisco Ruiz Pino en la Sección de Fisiología del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba bajo nuestra dirección. El objetivo general de este trabajo ha sido caracterizar el papel fisiológico del sistema NKB/NK3R en la puesta en marcha de la función reproductora y su posterior mantenimiento durante la edad adulta, haciendo especial hincapié en (i) su modulación por el estado metabólico, (ii) su papel en el control de la secreción de gonadotropinas, así como su interacción con otros neuropéptidos en dicho contexto, y (iii) su sensibilidad al ambiente esteroideo, incluyendo a xenoestrógenos, como el Bisfenol A.

Los resultados derivados de esta Tesis Doctoral se han traducido en: (i) 3 publicaciones científicas y 1 artículo, actualmente aceptado y en prensa, en la revista *“Environmental Health Perspectives”*, en los que el doctorando es el primer autor; (ii) >25 publicaciones colaborativas como coautor en el campo de la Neuro-endocrinología del Metabolismo y la Reproducción, un área directamente relacionada con los contenidos de esta Tesis; (iii) >10 contribuciones a congresos nacionales e internacionales; y (iv) 2 prestigiosos galardones, el *“Endocrinology Student Award for an Outstanding Publication”*, otorgado en el año 2015 por la Sociedad Americana de Endocrinología y el *“Premio Enrique Aguilar Benítez de Lugo”* a la publicación con filiación institucional del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) de mayor relevancia científica, otorgado por el IMIBIC en el año 2013.

Además, el doctorando ha participado durante su etapa formativa en los siguientes proyectos: (i) “MicroRNAs y Salud Reproductiva: Estudios Mecanísticos y Traslacionales” (Junta de Andalucía); (ii) “Pubertad-Nuevos Mecanismos de Control por Neuropeptidos y microRNAs, y su Interacción con Señales Metabólicas y Obesidad”, (Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO/MICINN); (iii) “Developmental Effects of Environment on Reproductive Health (DEER)” (European Commission, FP7; Program COOPERATION); y ha trabajado como investigador colaborador del Centro de Investigación Biomédica en Red FISIOPATOLOGÍA DE LA OBESIDAD Y NUTRICIÓN, (CIBERObn)/ISCIII.

Por todo lo anteriormente expuesto, se autoriza la presentación de esta Tesis Doctoral.

Córdoba, 22 de OCTUBRE de 2019

Firma del/de los director/es



Fdo.: Manuel Tena Sempere



Fdo.: Juan Manuel Castellano Rodríguez



## INFORME SOBRE LA CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES DE LA TESIS

Navarro, V.M; **Ruiz-Pino, F\***; Sánchez-Garrido, M.A; García-Galiano, D; Hobbs, S.J; Manfredi-Lozano, M; León, S; Sangiao-Alvarellos, S; Castellano, J.M; Clifton, D.K; Pinilla, L; Steiner, R.A; Tena-Sempere, M. Role of Neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *Journal of Neuroscience*. 15 - 32, pp. 2388 - 2397. 2012. Índice de impacto: **6.908** (2012). Posición de la publicación en la categoría WOS (JCR) Science Edition – NEUROSCIENCES: 22 de 252 revistas (**D1**). \*Co-primer autor.

**Ruiz-Pino, F**; Navarro, V.M; Bentsen, A.H; García-Galiano, D; Sánchez-Garrido, M.A; Ciofi, P; Steiner, R.A; Mikkelsen, J.D; Pinilla, L; Tena-Sempere, M. Neurokinin B and the control of the gonadotropic axis in the rat: Developmental changes, sexual dimorphism, and regulation by gonadal steroids. *Endocrinology*. 153 - 10, pp. 4818 - 2829. 2012. Índice de impacto: **4.514** (2012). Posición de la publicación en la categoría WOS (JCR) Science Edition – ENDOCRINOLOGY & METABOLISM: 28 de 122 revistas (**Q1**).

**Ruiz-Pino, F**; Garcia-Galiano, D; Manfredi-Lozano, M; Leon, S; Sanchez-Garrido, M.A; Roa, J; Pinilla, L; Navarro, V; Tena-Sempere, M. Effects and interactions of Tachykinins and Dynorphin on FSH and LH secretion in developing and adult rats. *Endocrinology*. 156 - 2, pp. 576 - 588. 2015. Índice de impacto: **4.286** (2015). Posición de la publicación en la categoría WOS (JCR) Science Edition – ENDOCRINOLOGY & METABOLISM: 29 de 138 revistas (**Q1**).

**Ruiz-Pino, F\***; Miceli, D\*; Franssen, D; Vazquez, M.J; Farinetti, A; Castellano, J.M; Panzica G.C; Tena-Sempere, M. Environmentally relevant perinatal exposures to bisphenol-A disrupt postnatal Kiss1/NKB neuronal maturation and puberty onset in female mice. *Environmental Health Perspectives* (aceptado; en prensa; DOI **10.1289/EHP5570**). Índice de impacto: **8.049** (2019). Posición de la publicación en la categoría WOS (JCR) Science Edition – TOXICOLOGY: 2 de 93 revistas (**D1**). \*Co-primer autor.





# ÍNDICE



# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

---

## RESUMEN / ABSTRACT

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 EJE-HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL (HHG)</b>                                      | <b>1</b>  |
| 1.1.1 HIPOTÁLAMO  | 4         |
| 1.1.1.1 Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)                                   | 5         |
| 1.1.2 HIPÓFISIS   | 9         |
| 1.1.2.1 Gonadotropinas: LH Y FSH  | 11        |
| 1.1.3 GÓNADAS   | 13        |
| 1.1.3.1 Testículos  | 13        |
| 1.1.3.2 Ovarios   | 15        |
| <b>1.2 CONTROL DEL EJE HHG</b>  | <b>19</b> |
| 1.2.1 REGULACIÓN POR ELEMENTOS CENTRALES  | 19        |
| 1.2.1.1 Reguladores centrales de naturaleza excitatoria                               | 19        |
| 1.2.1.2 Reguladores centrales de naturaleza inhibitoria                               | 22        |
| 1.2.2 REGULADORES PERIFÉRICOS   | 24        |
| 1.2.2.1 Gonadotropinas  | 24        |
| 1.2.2.2 Factores gonadales  | 24        |
| 1.2.2.3 Factores metabólicos  | 26        |
| <b>1.3 DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO</b>                       | <b>31</b> |
| <b>1.4 PUBERTAD</b>   | <b>33</b> |
| <b>1.5 SISTEMA KISS1/GPR54</b>  | <b>36</b> |
| 1.5.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS   | 36        |
| 1.5.2 ELEMENTOS PRINCIPALES: <i>KISS1</i> , KISSPEPTINAS Y GPR54                      | 37        |
| 1.5.3 EXPRESIÓN DEL SISTEMA KISS1/GPR54   | 38        |
| 1.5.4 PAPEL DE LAS NEURONAS KISS1 EN EL CONTROL DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS     | 39        |
| <b>1.6 TAQUIQUININAS</b>  | <b>42</b> |
| 1.6.1 ESTRUCTURA GÉNICA Y PEPTÍDICA DE LAS TAQUIQUININAS                              | 43        |
| 1.6.2 RECEPTORES TAQUIQUINÉRGICOS   | 47        |
| 1.6.3 IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LAS TAQUIQUININAS                                  | 50        |
| 1.6.4 TAQUIQUININAS Y FUNCIÓN REPRODUCTORA  | 51        |
| 1.6.4.1 Implicaciones funcionales de la SP y NKA en el sistema hipotálamo-hipofisario | 52        |
| 1.6.4.2 Implicaciones funcionales de la SP y NKA a nivel gonadal                      | 53        |
| 1.6.5 DISTRIBUCIÓN DE LA SP Y LA NKA EN EL SNC  | 55        |
| 1.6.6 DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR NK2 EN EL SNC   | 57        |
| <b>1.7 SISTEMA NKB/NK3R</b>   | <b>57</b> |
| 1.7.1 EXPRESIÓN DE LA NKB   | 58        |
| 1.7.2 DISTRIBUCIÓN DE LA NKB EN EL SNC.   | 58        |
| 1.7.3 RECEPTOR DE NKB, CARACTERIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN EN EL SNC                       | 59        |
| 1.7.4 REGULACIÓN DEL SISTEMA NKB/NK3R POR ESTEROIDES SEXUALES                         | 60        |

---

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 1.7.5      | CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA HIPOTALÁMICO DE NEURONAS KNDY  | 61         |
| 1.7.6      | EFFECTOS DE LA NKB SOBRE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS  | 62         |
| 1.7.7      | REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN PULSÁTIL DE GnRH  | 64         |
| <b>1.8</b> | <b>DISRUPCIÓN ENDOCRINA</b>  | <b>65</b>  |
| 1.8.1      | MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DE   | 65         |
| 1.8.2      | DISRUPCIÓN ENDOCRINA DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA  | 67         |
| 1.8.3      | DE CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA (XENO-ESTRÓGENOS)   | 68         |
| 1.8.4      | BPA Y FUNCIÓN REPRODUCTORA   | 69         |
| <b>2.</b>  | <b>OBJETIVOS</b>   | <b>71</b>  |
| <b>3.</b>  | <b>TRABAJOS PUBLICADOS</b>   | <b>76</b>  |
| 3.1        | ROLE OF ROLE OF NEUROKININ B IN THE CONTROL OF FEMALE PUBERTY AND ITS MODULATION BY METABOLIC STATUS (ARTÍCULO 1).   | 76         |
| 3.2        | NEUROKININ B AND THE CONTROL OF THE GONADOTROPIC AXIS IN THE RAT: DEVELOPMENTAL CHANGES, SEXUAL DIMORPHISM, AND REGULATION BY GONADAL STEROIDS (ARTÍCULO 2).   | 86         |
| 3.3        | EFFECTS AND INTERACTIONS OF TACHYKININS AND DYNORPHIN ON FSH AND LH SECRETION IN DEVELOPING AND ADULT RATS (ARTÍCULO 3).   | 98         |
| 3.4        | ENVIRONMENTALLY RELEVANT PERINATAL EXPOSURES TO BISPHENOL-A DISRUPT POSTNATAL KISS1/NKB NEURONAL MATURATION AND PUBERTY ONSET IN FEMALE MICE (VERSIÓN ENVIADA DEL ARTÍCULO 4; ESTADO: ACEPTADO; IN PRESS). | 111        |
| <b>4.</b>  | <b>DISCUSIÓN GENERAL</b>   | <b>145</b> |
| 4.1        | <b>PAPEL DEL SISTEMA NKB/NK3R EN EL CONTROL PUBERAL</b>  | <b>146</b> |
| 4.1.1      | ESTUDIOS DE EXPRESIÓN  | 146        |
| 4.1.2      | ESTUDIOS FUNCIONALES   | 147        |
| 4.2        | <b>MODULACIÓN DEL SISTEMA NKB/NK3R POR EL ESTADO METABÓLICO DEL ORGANISMO E IMPACTO SOBRE LA LLEGADA DE LA PUBERTAD</b>  | <b>148</b> |
| 4.3        | <b>PAPEL DEL SISTEMA NKB/NK3R EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS</b>   | <b>150</b> |
| 4.3.1      | ESTUDIOS A LO LARGO DEL DESARROLLO POSTNATAL   | 150        |
| 4.3.2      | ESTUDIOS SOBRE LA INTERACCIÓN Y/O PARTICIPACIÓN DE OTROS NEUROPEPTIDOS   | 152        |
| 4.4        | <b>SENSIBILIDAD DEL SISTEMA NKB/NK3R AL AMBIENTE ESTEROIDEO Y A DISRUPTORES ENDOCRINOS (BPA)</b>   | <b>155</b> |
| <b>5.</b>  | <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>163</b> |
| <b>6.</b>  | <b>REFERENCIAS</b>   | <b>167</b> |

---



# ABREVIATURAS





## ABREVIATURAS

- 3v: Tercer ventrículo lateral
- aa: aminoácido
- ACTH: hormona estimulante de la corteza adrenal
- ADH: hormona antidiurética
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AMPA: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
- AMPc: adenosín monofosfato cíclico
- AR: receptor de andrógenos
- ARC: núcleo arcuato
- Arg: arginina
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- ATP: adenosín trifosfato
- AVPV: área anteroventral del núcleo periventricular
- BHE: barrera hematoencefálica
- DE: Disruptor endocrino
- DMN: Núcleo dorsomedial
- Dyn: Dinorfina
- E2: estradiol
- EEAA: aminoácidos excitatorios
- ER: receptor de estrógenos
- FSH: hormona folículo-estimulante
- FSHR: receptor de la hormona folículo-estimulante
- GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- GALP: péptido similar a la galanina
- GAP: péptido asociado a GnRH
- GH: hormona de crecimiento
- GHS-R: receptor de secretagogos de GH
- GnIH: Hormona inhibidora de gonadotropinas
- GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas
- GnRH-R: receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas
- GPCR: receptor acoplado a proteína G
- IHC: Inmunohistoquímica
- ISH: Hibridación in situ
- GPR54: receptor acoplado a proteína G 54
- GT1-7: línea neuronal hipotalámica inmortalizada secretora de GnRH
- hCG: gonadotropina coriónica humana
- HHG: hipotálamo-hipófiso-gonadal
- icv: intracerebroventricular
- ip: intraperitoneal
- IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-trifosfato
- KA: kainato
- Kp-10: Kisspeptina-10
- Kp-R: Receptor de kisspeptina
- LH: hormona luteinizante
- LHA: área hipotalámica lateral
- LHR: receptor de la hormona luteinizante
- MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
- mPOA: área preóptica medial
- NIRKO: knockout neuronal del receptor de insulina
- NK1R: Receptor de taquiquininas tipo 1
- NK2R: Receptor de taquiquininas tipo 2
- NK3R: Receptor 3 de neuroquinina B
- NKA: Neuroquinina A
- NKB: neuroquinina B
- NMDA: N-metil D-aspartato
- NO: óxido nítrico
- NOS: óxido nítrico sintasa
- NPY: neuropéptido Y
- Ob: gen de la leptina (*obese*)
- Ob-R: receptor de leptina
- ORX: orquidectomía

## Abreviaturas

---

- OVX: ovariectomía
- PKA: proteína quinasa A
- PKC: proteína quinasa C
- PLC: fosfolipasa C
- POA: área preóptica
- POMC: proopiomelanocortina
- PG: progesterona
- PRL: prolactina
- PVN: núcleo paraventricular
- RFRP-1: péptido relacionado con RF-amida tipo 1.
- RFRP-3: péptido relacionado con RF-amida tipo 3
- RP3V: Región rostral periventricular del tercer ventrículo
- SNC: sistema nervioso central
- SP: Sustancia P
- TK: Taquiquininas
- TSH: hormona estimulante del tiroides
- VMN: núcleo ventromedial
- $\alpha$ -MSH: hormona  $\alpha$ -melanocito estimulante
- $\beta$ -END:  $\beta$ -endorfina



# RESUMEN / ABSTRACT



## RESUMEN

### Introducción

En mamíferos, la adquisición de la capacidad reproductora durante la pubertad y su mantenimiento en la edad adulta son el resultado de un proceso madurativo continuo que se inicia durante la etapa prenatal, con la diferenciación sexual, y continua a lo largo del desarrollo postnatal<sup>1,2</sup>. El éxito de este proceso madurativo depende, en gran medida, de la adecuada formación y función del denominado eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal (HHG), responsable de la integración coordinada de una gran variedad de señales internas y externas, que informan del estado energético del organismo y del medio que le rodea, permitiendo de este modo su modulación<sup>3,4</sup>.

A pesar de la complejidad organizativa y funcional del eje HHG, el conocimiento de las señales que lo regulan ha crecido considerablemente en las últimas décadas. Entre estas señales, destaca especialmente el sistema hipotalámico ligando-receptor Kiss1/GPR54, constituido por una familia de péptidos estructuralmente relacionados, denominados kisspeptinas (codificados por el gen *Kiss1*) y su receptor GPR54<sup>2</sup>. Actualmente sabemos que las kisspeptinas, además de considerarse los más potentes estimuladores del eje HHG, tienen un papel clave en aspectos esenciales de la reproducción, tales como la diferenciación sexual, la maduración puberal o la regulación de la secreción de GnRH/gonadotropinas<sup>5</sup>. Además, estudios neuroanatómicos llevados a cabo en diferentes especies han demostrado que las neuronas hipotalámicas responsables de la síntesis de kisspeptinas se localizan fundamentalmente en dos regiones del hipotálamo: el área preóptica y el núcleo arcuato (ARC). En roedores, estas poblaciones neuronales son funcionalmente diferentes. Mientras que las neuronas kiss1 del área preóptica responden a los estrógenos con un incremento en la síntesis de kisspeptinas, las neuronas kiss1 del ARC responden a estos esteroides sexuales con una inhibición de su síntesis. Estas observaciones sugieren que las neuronas kisspeptina del área preóptica podrían estar implicadas en la generación del pico preovulatorio de gonadotropinas, mientras que las del núcleo ARC podrían mediar el feedback negativo de los estrógenos sobre la secreción de gonadotropinas<sup>6</sup>.

Curiosamente, estudios recientes han demostrado que las neuronas Kiss1 del ARC, además de producir kisspeptinas, sintetizan otros neuropéptidos: Neuroquinina B (NKB; codificado por el gen *Tac2* en roedores) y Dinorfina A (Dyn)<sup>7-10</sup>. Por este motivo, esta población de neuronas se han denominado neuronas KNDy (acrónimo que representa las iniciales de los tres neuropéptidos que sintetizan estas neuronas: Kisspetina, NKB y Dyn)<sup>5</sup>. Además, evidencias recientes sugieren que estos neuropéptidos juegan un papel importante en el control de la secreción pulsátil de GnRH, a través de la modulación de la secreción de kisspeptinas. En concreto, se ha propuesto que la secreción dinámica de kisspeptinas, que actuarían como efectores finales en la activación de las neuronas GnRH, estaría regulada de forma recíproca por las acciones estimuladoras de NKB y las acciones inhibitoras de Dyn<sup>7-10</sup>. La presencia de receptores para NKB y Dyn (NK3R y Oprk1, respectivamente) en las neuronas KNDy avala este modelo de regulación<sup>11</sup>.

La relevancia fisiológica de NKB en este sistema se ha visto reforzada por la identificación de mutaciones inactivantes en los genes *TAC3* y *TACR3* (homólogos de los genes *Tac2* y *Tacr3* en roedores) en pacientes con hipogonadismo hipogonadotropo<sup>12,13</sup>; un fenotipo que sugiere el importante papel NKB en el control del eje HHG. A pesar de la importancia de este hallazgo, las acciones reguladoras de NKB y su receptor, NK3R, en el control de la función reproductora aún no han sido caracterizadas en profundidad. En este contexto, el objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido explorar el papel fisiológico del sistema NKB/NK3R en la puesta en marcha de la función reproductora y su posterior mantenimiento durante la edad adulta, haciendo especial hincapié en (i) su modulación por el estado metabólico, (ii) su papel en el control de la secreción de gonadotropinas, así como su interacción con otros neuropéptidos en dicho contexto, y (ii) su sensibilidad al ambiente esteroideo, incluyendo a compuestos estrogénicos con actividad disruptora endocrina, como el BPA.

### **Contenido de la investigación**

En un **primer bloque de experimentos**, decidimos explorar la posible contribución de la señalización de NKB a la llegada de la pubertad y su sensibilidad a alteraciones metabólicas en dicho contexto. Para ello, inicialmente analizamos los perfiles de expresión hipotalámica de los ARNm de *Tac2* y *Tacr3* en muestras

hipotalámicas de ratas hembra en diferentes etapas del desarrollo postnatal y su distribución neuroanatómica durante la transición puberal. Nuestros estudios demuestran que la expresión de ambos genes incrementa a lo largo de la maduración postnatal. Además, también observamos que en pubertad tanto *Tac2* como *Tacr3* se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro, siendo especialmente abundantes en los núcleos LHA (área hipotalámica lateral) y ARC, y que durante la transición puberal incrementa la expresión de *Tacr3*. Posteriormente llevamos a cabo una serie de estudios funcionales para caracterizar el posible papel de NKB/NK3R en el control central de la pubertad. Nuestros estudios demuestran que la administración central de senktide, un agonista del NK3R, induce la secreción de LH en ratas hembra prepuberales y peripuberales, mientras que la infusión crónica de un antagonista de NK3R durante la transición puberal retrasa moderadamente la llegada de la pubertad y tiende a disminuir los niveles de LH en estos animales. Finalmente decidimos explorar la influencia del estado metabólico del organismo sobre el sistema NKB/NK3R y su impacto sobre la llegada de la pubertad. Nuestros análisis de expresión en ratas hembras puberales sometidas a ayuno durante un periodo de 48h muestran una reducción en los niveles de ARNm de *Tacr3* y, en menor medida, de *Tac2*, sugiriendo que este sistema es sensible a cambios en el estado metabólico durante el periodo puberal. Sin embargo, las respuestas agudas de LH a la administración de senktide en hembras puberales no sólo se encuentran preservadas sino que incluso aumentan en estas condiciones de ayuno; un fenómeno que podría sugerir una cierta sensibilización de la ruta de señalización NKB/NK3R/GnRH a esta condición de estrés metabólico. En la línea de lo descrito anteriormente, nuestros estudios de administración central repetida de senktide en ratas hembra con pubertad retrasada inducida por un protocolo de subnutrición crónica del 30%, demostraron que el restablecimiento de los niveles de NKB mediante esta manipulación es capaz de rescatar la llegada de la pubertad (un 50% de los animales mostraron apertura vaginal, considerado un índice externo de llegada de la pubertad) e incrementar la secreción de LH.

En el **segundo bloque de experimentos**, decidimos explorar el papel de sistema NKB/NK3R en la regulación de la secreción de gonadotropinas y su interacción con otros neuropéptidos en dicho contexto. Nuestros estudios revelan que las respuestas de LH a la administración de senktide presentan un claro dimorfismo sexual en ratas,



con una estimulación persistente e independiente del estado del desarrollo en el caso de las hembras y una ausencia de respuesta, a partir del periodo puberal, en el caso de los machos. En términos de secreción de FSH, nuestros estudios documentan la capacidad de NKB de inducir claras respuestas estimuladoras en ratas infantiles/juveniles. Sin embargo, estas respuestas desaparecen en los periodos puberal y adulto; un fenómeno que contrasta con el dimorfismo sexual encontrado en la edad adulta en términos de respuesta secretora de LH a la estimulación de NKB. Posteriormente decidimos explorar el posible papel cooperativo de otros miembros de la familia de las taquiquininas (TKs), tales como la sustancia P (SP) y su receptor NK1R, y la Neuroquinina A (NKA) y su receptor NK2R, en el control de la secreción de GnRH/gonadotropinas. Nuestros datos muestran que durante el periodo prepuberal, al igual que sucede con senktide, la activación de los receptores de SP y NKA induce respuestas estimuladoras significativas de la secreción de gonadotropinas. Sin embargo, en los animales adultos la respuesta a NKA es más modesta. Finalmente, nos propusimos estudiar la posible interacción de NKB con otro de los componentes clave sintetizados en las neuronas KNDy, la Dyn. Para ello, evaluamos inicialmente las respuestas de LH y FSH a la estimulación central con senktide tras el bloqueo de las acciones endógenas de Dyn con nor-BNI, un antagonista de su receptor canónico (receptor- $\kappa$ -opioide de Dyn; KOR). Nuestros resultados demuestran que el bloqueo de la señalización de Dyn en ratas hembra adultas, no logra alterar ni los niveles de LH basales ni la respuesta de LH a senktide. Por el contrario, el pretratamiento con el antagonista de Dyn en ratas macho, las cuales, como hemos descrito anteriormente, no responden a senktide, no solo aumenta los niveles basales de LH y FSH sino que incluso induce respuestas estimuladoras tras la administración de senktide. En la misma línea, en ratas hembra el pretratamiento con nor-BNI fue capaz de inducir respuestas estimuladoras de la secreción de FSH tras la administración de senktide. Con el objetivo de identificar el mecanismo que subyace a los efectos en el tratamiento con nor-BNI sobre la secreción de gonadotropinas en respuesta a senktide, decidimos analizar la expresión de los genes que codifican Dyn (*Pdyn*) y KOR (*Opkr1*) en el hipotálamo mediobasal (MBH) y el área preóptica (POA) de ratas macho y hembra infantiles, prepuberales y puberales. Nuestros estudios documentan una mayor expresión de *Pdyn* y *Opkr1* en el MBH de machos que en el de hembras,

reforzando de esta forma la posible relevancia de la señalización central Dyn/KOR en la llegada de la pubertad (retrasada en los machos en relación a las hembras).

En el **tercer bloque de experimentos** decidimos estudiar la sensibilidad del sistema NKB/NK3R al ambiente esteroideo y su posible influencia en el dimorfismo sexual observado en términos de secreción de gonadotropinas. Además, también nos propusimos analizar el impacto específico de un disruptor endocrino con actividad estrogénica, el bisfenol A (BPA), sobre dicho sistema en el contexto específico de la pubertad. Para abordar la cuestión del impacto del ambiente esteroideo en el dimorfismo sexual, analizamos inicialmente la respuesta gonadotrópica a senktide tras la administración de testosterona en ratas hembra adultas, o la inyección de estradiol o dihidrotestosterona (un andrógeno no aromatizable) en ratas macho adultas. Nuestros resultados demuestran que ni la administración de testosterona evita las respuestas de LH a senktide en hembras adultas ni la administración de estradiol o dihidrotestosterona es capaz de restaurar la respuesta de LH a senktide en machos adultos. Sin embargo, la eliminación de los esteroides sexuales mediante gonadectomía en ratas macho y hembra cambia el efecto de senktide sobre la secreción de gonadotropinas, pasando de estimulador a inhibidor. Curiosamente, nuestros estudios también demuestran que el número de neuronas que sintetizan NKB en el núcleo ARC es mayor en ratas hembra adultas que en ratas macho; un fenómeno que podría deberse a las diferencias en el ambiente esteroideo en periodos tempranos de la diferenciación cerebral. En este sentido, nuestros experimentos muestran que la administración de altas dosis de estrógenos (estrogenización neonatal) disminuye tanto el número de neuronas NKB en el ARC en etapas posteriores del desarrollo como la secreción de LH, siendo esta última revertida tras la administración de senktide. Además, nuestros estudios también demuestran que la habilidad de los estrógenos para inhibir la expresión hipotalámica de *Tac2* podría ser específica de determinadas regiones hipotalámicas, ya que la administración de estrógenos reduce los niveles de *Tac2* en el ARC, pero los incrementa en el LHA. Finalmente, conviene destacar que las observaciones del modelo de estrogenización neonatal descritas anteriormente se vieron reforzadas por estudios adicionales en los que evaluamos el impacto de la exposición perinatal a diferentes dosis de BPA sobre la expresión del ARNm de *Tac2* en el núcleo ARC de ratones hembra infantiles (15 días) y puberales (30 días). En concreto,

nuestros resultados demuestran que todas las dosis de BPA testadas evitan el incremento en los niveles de ARNm de *Tac2* observado en el núcleo ARC durante la transición puberal. Además, este efecto inhibitor es detectado incluso con la dosis más baja de BPA, en las etapas infantil y puberal del desarrollo postnatal; un fenómeno que sugiere la elevada sensibilidad del sistema NKB/NK3R a los efectos organizativos de los compuestos con actividad estrogénica. En línea con estos resultados, los ratones hembra infantiles y puberales expuestos a diferentes dosis de BPA durante el periodo perinatal también presentan un descenso en los niveles de LH, similar al detectado en los animales estrogenizados neonatalmente.

### **Conclusiones**

Las principales conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. El sistema hipotalámico NKB/NK3R tiene un prominente papel estimulador en el control puberal en la rata hembra, como lo demuestra su incrementada expresión hipotalámica durante el periodo prepuberal, el aumento en la respuesta secretora de LH a la estimulación de NKB durante el periodo prepuberal/puberal y el impacto negativo del bloqueo central de la señalización NKB/NK3R sobre la llegada de la pubertad.
2. El sistema hipotalámico NKB/NK3R está sujeto a regulación metabólica durante la transición puberal en la rata hembra. Mientras su expresión disminuye en el núcleo ARC en condiciones de ayuno, su estimulación farmacológica a nivel central rescata la llegada de la pubertad en condiciones de restricción calórica crónica.
3. Las respuestas secretoras de LH y FSH a la estimulación con NKB varían en función del sexo y el estado del desarrollo. En la rata hembra, la respuesta secretora de LH aumenta independientemente del estado de maduración postnatal, mientras que en la rata macho adulta no se detecta dicho efecto estimulador. En cambio, la respuesta secretora de FSH a la estimulación central de NKB únicamente aumenta en ambos sexos antes de la pubertad, no detectándose ninguna respuesta en la edad adulta.
4. Los sistemas TKs SP/NK1R y NKA/NK2R estimulan la secreción de gonadotropinas en ratas prepuberales, mientras que los animales adultos únicamente presentan

respuestas moderadas a la activación de NKA/NK2R. El bloqueo de la señalización de Dyn, en cambio, no altera ni los niveles de LH basales ni la respuesta de LH a la estimulación central de NKB en ratas hembra adultas, mientras que en ratas macho sí que induce respuestas estimuladoras tras la administración de senktide; un fenómeno que sugiere la existencia de un mayor tono inhibitor de Dyn en este sexo. Este comportamiento sexualmente dimórfico se encuentra en consonancia con los datos de expresión de hipotalámica de los genes *Pdyn* and *Opkr1*, codificantes de Dyn y su receptor (KOR), cuyos niveles son más abundantes en el MBH de ratas macho en el periodo prepuberal.

5. La expresión hipotalámica del ARNm de *Tac2* se encuentra regulada por los niveles estradiol en la rata hembra, presentando un claro dimorfismo núcleo-específico, con un consistente efecto inhibitor en el ARC y un inequívoco efecto estimulador en el LHA. Además, el sistema hipotalámico NKB/NK3R es altamente sensible durante ventanas críticas del desarrollo a los efectos organizativos o disruptivos de los esteroides sexuales o xenoestrógenos (BPA), respectivamente, en roedores. La exposición neonatal a elevadas dosis de estrógenos o xenoestrógenos disminuye la expresión de *Tac2* en neuronas NKB del núcleo ARC de ratas de ambos sexos y ratones hembra, respectivamente; un fenómeno que se asocia a una disminución significativa en los niveles de LH circulantes. Por el contrario, el rescate de la señalización de NKB/NK3R en ratas estrogenizadas neonatalmente recupera la respuesta secretora de LH de estos animales.

## Bibliografía

1. Ojeda, S. & Skinner, M.K. Puberty in the rat. in *Knobil and Neill's physiology of reproduction* 2061-2126 (Elsevier Inc., 2006).
2. Tena-Sempere, M. Neuroendocrinology of puberty: recent milestones and new challenges. *Mol Cell Endocrinol* **324**, 1-2 (2010).
3. Parent, A.S. *et al.* The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* **24**, 668-93 (2003).
4. Gajdos, Z.K., Henderson, K.D., Hirschhorn, J.N. & Palmert, M.R. Genetic determinants of pubertal timing in the general population. *Mol Cell Endocrinol* **324**, 21-9 (2010).
5. Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P. & Tena-Sempere, M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* **92**, 1235-316 (2012).
6. 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* **29**, 48-69 (2008).

7. Goodman, R.L. *et al.* Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* **148**, 5752-60 (2007).
8. Navarro, V.M. *et al.* Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* **29**, 11859-66 (2009).
9. Wakabayashi, Y. *et al.* Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* **30**, 3124-32 (2010).
10. Ramaswamy, S. *et al.* Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* **151**, 4494-503 (2010).
11. Lehman, M.N., Coolen, L.M. & Goodman, R.L. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* **151**, 3479-89 (2010).
12. Topaloglu, A.K. *et al.* TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* **41**, 354-8 (2009).
13. Young, J. *et al.* TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 2287-95 (2010).

## ABSTRACT

### Introduction

In mammals, the acquisition of reproductive function at puberty and its maintenance in adulthood is the result of a continuum maturational process that starts at the prenatal period, with sexual differentiation, and progress throughout postnatal development<sup>1,2</sup>. The success of this developmental process largely depends on the proper maturation and function of the so-called hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis, which is responsible of the integrated coordination of a large array of internal and external signals that transmit the information of the metabolic status of the organism and the environment to the HPG, thus allowing its modulation<sup>3,4</sup>.

Despite the organizational and functional complexity of the HPG, our knowledge about the signals that regulate this system has grown considerably in the last decades. Among them, the hypothalamic ligand-receptor system Kiss1/GPR54, which is composed of a family of structurally-related peptides, named kisspeptins (encoded by *Kiss1* gene), and its receptor, GPR54, is especially relevant<sup>2</sup>. Currently, we know that kisspeptins are the most potent stimulators of the HPG axis and play a key role in essential aspects of reproduction, including sexual differentiation, pubertal maturation, and the regulation of the GnRH/gonadotropin secretion<sup>5</sup>. Further neuroanatomical studies performed in different species have shown that hypothalamic kisspeptin-expressing neurons are located in two major regions: the preoptic area (POA) and the arcuate nucleus (ARC). In rodents, these neuronal populations are functionally different. While POA kiss1 neurons respond to estrogen with an increase in kisspeptin synthesis, ARC kiss1 neurons respond to these sex steroids with the inhibition of its production. These observations suggest that POA kisspeptin neurons might be involved in the genesis of the preovulatory LH surge, whereas ARC kisspeptin neurons might mediate estrogen feedback inhibition on gonadotropin secretion<sup>6</sup>.

Interestingly, recent studies have shown that, in addition to producing kisspeptins, ARC kiss1 neurons synthesize two different neuropeptides: Neurokinin B (NKB; encoding by *Tac2* gene in rodents) and Dynorphin (Dyn)<sup>7-10</sup>. For this reason, this kisspeptin neuronal population has been termed KNDy neurons (acronym made using the underlined words for these three neuropeptides: Kisspetin, NKB y Dyn)<sup>5</sup>.

Additionally, recent evidence suggests that these neuropeptides play a relevant role in the control of GnRH pulsatile release, through the modulation of kisspeptin secretion. In particular, it has been proposed that the dynamic release of kisspeptins, which are the final effectors for the activation of GnRH neurons, might be regulated by the reciprocal stimulatory and inhibitory actions of NKB and Dyn, respectively<sup>7-10</sup>. The presence of NKB and Dyn receptors (NK3R and Oprk1, respectively) in KNDy neurons supports this mode of regulation<sup>11</sup>.

The physiological relevance of NKB in this system has been strengthened by the identification of inactivating mutations of *TAC3* y *TACR3* (*Tac2* y *Tacr3* in rodents) in patients with hypogonadotropic hypogonadism<sup>12,13</sup>, a phenotype that suggests the critical role of NKB in the control of HPG axis. Despite the importance of this finding, the regulatory actions of NKB and its receptor, NK3R, in the control of reproductive function have not yet been fully characterized. In this context, the aim of this Doctoral Thesis has been to explore the physiological role of NKB/NK3R in the acquisition of reproductive function and its maintenance in adulthood, with special emphasis to (i) its modulation by metabolic stress, (ii) its role in the control of gonadotropin secretion, as well as its interaction with other neuropeptides in such setting, and (iii) its sensitivity to steroid milieu, including endocrine disruptors with estrogenic activity, such as Bisphenol A (BPA).

## Research contents

In the **first set of experiments**, we decided to explore the potential contribution of NKB signaling to the onset of puberty and its sensitivity to metabolic alterations in such context. To this end, we firstly analyzed the hypothalamic expression pattern of *Tac2* y *Tacr3* mRNA in female rats at different stages of postnatal development, as well as its neuroanatomical distribution during the pubertal transition. Our studies show that the expression of both genes increases throughout pubertal maturation. Furthermore, we observed that both *Tac2* and *Tacr3* are widely expressed in the brain, being especially abundant in the hypothalamic nuclei LHA (lateral hypothalamic area) and the ARC. We also showed that *Tacr3* mRNA expression increase across the pubertal transition. Subsequently, we performed a series of functional studies to characterize the potential role of NKB/NK3R in the central control of puberty. Our studies demonstrate that central administration of senktide, an agonist of NK3R,

induce LH secretion in prepubertal and peripubertal female rats, while the chronic infusion of an antagonist of NK3R modestly delays the timing of puberty onset and tends to reduce LH levels in those animals. Finally, we decided to explore the influence of the metabolic status on NKB/NK3R system and its impact on the onset of puberty onset. Our expression analyses in pubertal female rats subjected to 48h fasting show a reduction in *Tacr3* and, to a lesser extent, *Tac2* mRNA levels, suggesting that this system is sensitive to changes in the metabolic status during the pubertal period. Yey, acute LH responses to senktide in pubertal females were preserved, if not augmented, under fasting conditions, suggesting sensitization of the NKB–NK3R–gonadotropin-releasing hormone signaling pathway under metabolic distress. In line with the above, our studies of repeated administration of senktide to female rats with pubertal arrest due to chronic undernutrition (30% rescue the timing of puberty (50% of animals show vaginal opening, an external marker of puberty onset) and potentially elicit LH release.

In the **second set of experiments**, we explored the role of NKB/NK3R in the regulation of gonadotropin secretion and its interaction with other neuropeptides in such context. Our studies reveal that LH responses to senktide are sexually dimorphic in rats, with persistent stimulation in females, regardless of the stage of postnatal development, and lack of LH responses in males from puberty onward. In terms of FSH secretion, our studies document the ability of NKB to induce robust stimulatory responses in infantile/juvenile rats. However, there is a lack of response in the pubertal and adult periods; a phenomenon that is in contrast to the sexual dimorphism detected in adulthood in terms of LH response to NKB. Subsequently, we explored the potential cooperative role of other members of tachykinin (TKs) family, such as substance P and its receptor, NK1R, and neurokinin A (NKA) and its receptor, NK2R, in the control of GnRH/gonadotropin secretion. Our data show that activation of SP and NKA receptors at the prepubertal period induces significant gonadotropin responses. However, the response to NKA in adult animals is more modest. Finally, we decided to study the potential interplay between NKB and other relevant component of KNDy neurons, Dyn. To this end, we first evaluated LH and FSH responses to senktide after blockade of endogenous Dyn actions with nor-BNI, an antagonist of its canonical receptor ( $\kappa$ -opioid receptor; KOR). Our data show that blockade of Dyn signaling in



female adult rats fails to alter basal gonadotropin levels as well as LH responses to the NKB agonist. In contrast, in male rats, which are unresponsive to senktide in terms of LH or FSH, pretreatment with the Dyn antagonist, nor-BNI, elevates the circulating levels of both gonadotropins and surfaced LH and FSH responses to senktide. In the same vein, nor-BNI pretreatment also permitted the manifestation of FSH responses to the NKB agonist in female rats. To identify the underlying mechanism for nor-BNI effects on gonadotropin response to senktide, we analyzed the expression of the genes encoding Dyn (*Pdyn*) and KOR (*Opkr1*) in the medial basal hypothalamus (MBH) and POA of male and female rats at infantile, prepubertal and pubertal ages. Our studies document a higher expression of both *Pdyn* and *Okpr1* genes in the MBH of males vs females, thus strengthened the potential relevance of central Dyn/KOR signaling for the actual timing of puberty (delayed in males vs females).

In the **third set of experiments**, we studied the sensitivity of NKB/NK3R to steroid milieu and its potential influence in sexual dimorphism in terms of gonadotropin secretion. Additionally, we explored the impact of a specific disruptor with estrogenic activity, BPA, on NKB/NK3R system in the context of puberty onset. To address the impact of steroid milieu on sexual dimorphism, we first analyzed the gonadotropic response to senktide after testosterone administration, in adult female rats, and estradiol and dihydrotestosterone (a nonaromatizable androgen) injection in adult male rats. Our results show that testosterone fails to prevent LH response to senktide in adult female rats, and estradiol or dihydrotestosterone administration are not able to restore LH response in adult male rats. However, removal of sex steroids by gonadectomy switched senktide effects to inhibitory, both in adult male and female rats. Interestingly, our studies also show that the number of NKB-expressing neurons in the ARC is higher in female than in male rats; a phenomenon that may be due to differences in steroid milieu in early periods of sexual brain differentiation. In this sense, our experiments show that administration to high doses of estrogen (neonatal estrogenization) reduces the number of NKB-positive neurons in the ARC in later developmental stages and LH secretion. Likewise, neonatal estrogenization resulted in lower serum LH levels that are normalized by senktide administration. Furthermore, our studies demonstrate that the ability of estrogen to inhibit hypothalamic *Tac2* expression seems region specific, because estrogen administration

decreases *Tac2* levels in the ARC but increases them in LHA. Finally, it is worth to note that further studies in which we analyzed the impact of perinatal exposure to different doses of BPA on *Tac2* mRNA expression in infantile and pubertal female mice strengthened the observations derived from the model of neonatal estrogenization. In particular, our results show that all BPA doses tested prevent the increase in the mRNA *Tac2* levels in the ARC during the pubertal transition. Furthermore, this inhibitory effect is detected, even with the lowest BPA dose, in the infantile and the pubertal period of development; a phenomenon that suggests the high sensitivity of NKB/NK3R system to the organizational effects of compounds with estrogenic activity. In line with these results, infantile and pubertal female mice exposed to different doses of BPA during the perinatal period also show a decrease in LH levels, similar to that detected in neonatally estrogenized animals.

## Conclusions

The major conclusions of this Doctoral Thesis are the following:

1. The hypothalamic NKB/NK3R system has a prominent stimulatory role in the control of puberty onset in the female rat since its hypothalamic expression is increased during the prepubertal period, its LH secretory response to NKB stimulation is augmented during the prepubertal/pubertal period, and the negative impact of the central blockade of NKB/NK3R on the timing of puberty onset.
2. The hypothalamic NKB/NK3R system is subjected to metabolic regulation during the pubertal transition in the female rat. While its expression decreases under fasting conditions in the ARC, its pharmacological stimulation at the central level rescues the timing of puberty in conditions of caloric restriction.
3. The LH and FSH secretory responses to NKB stimulation vary depending on gender and the stage of postnatal development. In the adult female rat, LH secretory response increases regardless of the maturational stage, while in the adult male rat no stimulatory effects are detected. In contrast, FSH secretory response to the central stimulation with NKB only increases in both sexes before puberty, while no responses are observed in adulthood.

4. The TKs systems SP/NK1R and NKA/NK2R stimulate gonadotropin secretion in prepubertal rats, while adult animals only display moderate responses to NKA/NK2R activation. In contrast, the blockade of Dyn signaling does not change either basal or stimulated LH responses to NKB in adult female rats. Yet, adult male rats display stimulatory responses to senktide administration, a phenomenon that suggests a higher inhibitory tone of Dyn in males. This sexually dimorphic behavior is in good agreement with our hypothalamic expression data for Pdyn and Opkr1, encoding genes of Dyn and its receptor (KOR), whose levels are more abundant in the MBH of male rats in the prepubertal period.
5. The hypothalamic mRNA expression of *Tac2* is regulated by estradiol levels in the female rat, showing an evident nuclei-specific dimorphism, with a consistent inhibitory effect in the ARC but an unambiguous stimulatory action in the LHA. Furthermore, the hypothalamic NKB/NK3R is highly sensitive to the organizational or disruptive effects of sex steroids or xenoestrogens (BPA) during critical periods of development in mice, respectively. The neonatal exposure to high doses of estrogens or xenoestrogens reduces the expression of *Tac2* in NKB neurons of the ARC in both sexes in rats and also in female mice, respectively; a phenomenon that is associated to a significant decrease in the circulating levels of LH. In contrast, the rescue of NKB/NK3R signaling in neonatally estrogenized rats restores the LH secretory response in these animals.

## Bibliography

1. Ojeda, S. & Skinner, M.K. Puberty in the rat. in *Knobil and Neill's physiology of reproduction* 2061-2126 (Elsevier Inc., 2006).
2. Tena-Sempere, M. Neuroendocrinology of puberty: recent milestones and new challenges. *Mol Cell Endocrinol* **324**, 1-2 (2010).
3. Parent, A.S. *et al.* The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* **24**, 668-93 (2003).
4. Gajdos, Z.K., Henderson, K.D., Hirschhorn, J.N. & Palmert, M.R. Genetic determinants of pubertal timing in the general population. *Mol Cell Endocrinol* **324**, 21-9 (2010).
5. Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P. & Tena-Sempere, M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* **92**, 1235-316 (2012).
6. 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* **29**, 48-69 (2008).

7. Goodman, R.L. *et al.* Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* **148**, 5752-60 (2007).
8. Navarro, V.M. *et al.* Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* **29**, 11859-66 (2009).
9. Wakabayashi, Y. *et al.* Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* **30**, 3124-32 (2010).
10. Ramaswamy, S. *et al.* Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* **151**, 4494-503 (2010).
11. Lehman, M.N., Coolen, L.M. & Goodman, R.L. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* **151**, 3479-89 (2010).
12. Topaloglu, A.K. *et al.* TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* **41**, 354-8 (2009).
13. Young, J. *et al.* TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 2287-95 (2010).

# INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

En mamíferos, la reproducción, entendida como la capacidad de generar gametos viables, posibilitar su fecundación y sustentar la gestación y posterior lactancia del embrión, es una función esencial para la supervivencia de las especies.

La complejidad que han ido adquiriendo ésta y otras funciones fundamentales a lo largo de la evolución ha favorecido la aparición de mecanismos sofisticados que aseguren su correcta regulación. Hoy día sabemos que estos mecanismos se integran en el sistema nervioso y el sistema endocrino.

En el ámbito de la función reproductora, los fenómenos de integración neuroendocrina se producen a nivel del hipotálamo y la hipófisis, que trabajan conjuntamente para regular el desarrollo y la actividad de las gónadas (testículo y ovario), dando lugar al denominado eje neuroendocrino de la reproducción o eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG).

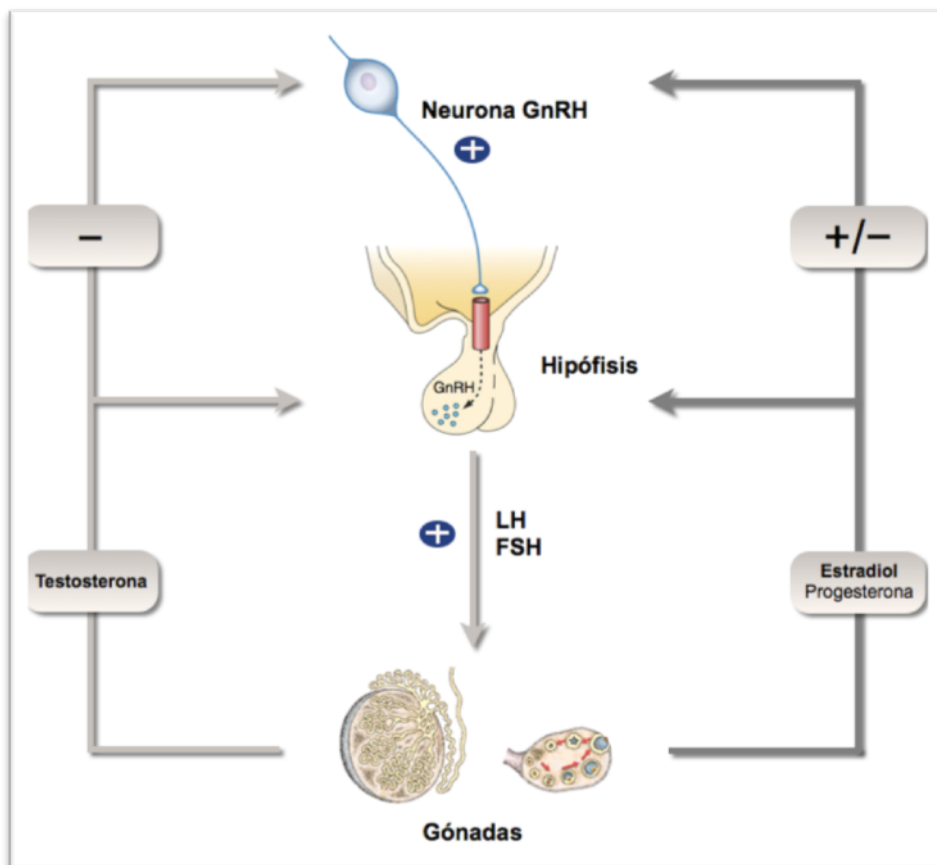
La correcta activación del eje HHG en la pubertad y el mantenimiento de la capacidad reproductora en la edad adulta requieren de la participación de un conjunto de señales centrales y periféricas que modulan y organizan funcionalmente dicho eje. Este conjunto de señales es capaz de transmitir e integrar la información procedente tanto de factores externos (p.ej. la información procedente del medioambiente) como de factores internos (p.ej. niveles de esteroides gonadales o estado energético del organismo).

### 1.1 EJE-HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL (HHG)

En el año 1930, los estudios realizados por Carl Moore y Dorothy Price sentaron las bases para caracterizar el eje HHG, aportando las primeras evidencias experimentales sobre su naturaleza y estructura. En sus trabajos de investigación, estos científicos demostraron que las hormonas testiculares provocaban una reducción en la secreción de gonadotropinas hipofisarias y que estas gonadotropinas eran indispensables para la espermatogénesis y la producción hormonal (hormonogénesis) en los testículos <sup>1</sup>. Posteriormente, en 1932, demostraron que los ovarios y la hipófisis tenían una relación recíproca similar a la de los testículos <sup>2</sup>. Ese mismo año, Walter

Hohlweg y Junkmann Karl, ampliaron los conceptos de Moore y Price identificando al hipotálamo como mediador entre las hormonas gonadales y la hipófisis, es decir, como el transductor neuroendocrino por excelencia <sup>3</sup>.

El eje HHG se organiza en torno a tres elementos fundamentales: el hipotálamo, donde se produce la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) <sup>4</sup>, la hipófisis anterior o adenohipófisis, donde se sintetizan las gonadotropinas, LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo-estimulante) <sup>5</sup>, y las gónadas (testículos en los machos y ovarios en las hembras).





**Figura 1:** Representación esquemática del eje HHG. Modificado de <sup>6</sup>.

El decapeptido GnRH, producido por un grupo de neuronas hipotalámicas reducido y relativamente disperso, representa al elemento jerárquico clave en el funcionamiento del eje neuroendocrino de la reproducción, siendo el principal estímulo fisiológico de la síntesis y liberación de las gonadotropinas hipofisarias <sup>5</sup>. Éstas a su vez operan sobre sus receptores específicos en las gónadas, propiciando la correcta producción de gametos maduros a partir de la pubertad y la secreción de esteroides y otras hormonas gonadales <sup>7,8</sup>. El control dinámico del eje HHG se apoya en circuitos de retroalimentación negativos y positivos de las señales hormonales procedentes de las gónadas, así como en la acción reguladora de numerosos factores adicionales, tanto centrales como periféricos, que actúan primariamente sobre el sistema GnRH hipotalámico (*Figura 1*).

El funcionamiento del eje HHG se caracteriza por presentar un patrón de secreción pulsátil. Por lo tanto, la acción de las neuronas GnRH no solo depende de cambios en la amplitud de su secreción, sino también, de cambios en la frecuencia de su pulsatilidad. Esta secreción pulsátil de GnRH (y en consecuencia también de LH y FSH) es crucial para el establecimiento y el mantenimiento de la función reproductora en la edad adulta <sup>5</sup>.

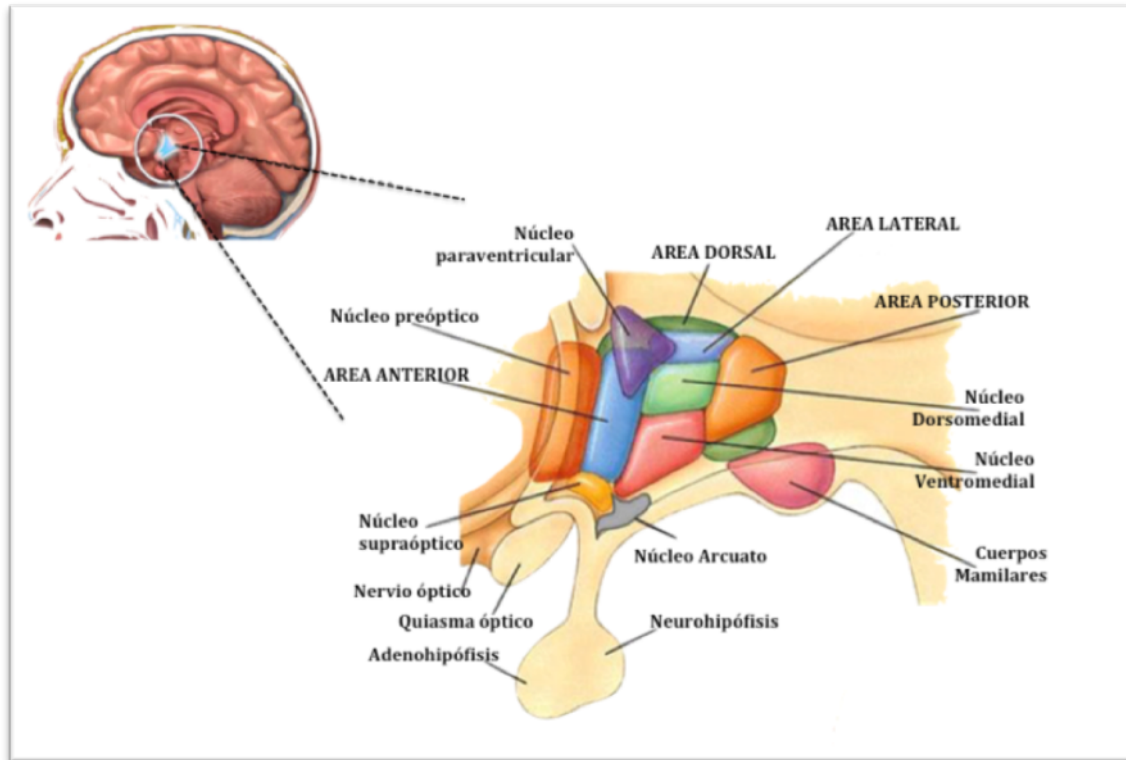
### 1.1.1 Hipotálamo

El hipotálamo actúa como un elemento regulador esencial del sistema endocrino mediante la síntesis y liberación de diferentes neurotransmisores y neuropéptidos que actúan, fundamentalmente, a nivel hipofisario.

Se trata de una estructura nerviosa situada en la porción más inferior del diencefalo, entre el tálamo y el tercer ventrículo. En su límite superior, una hendidura denominada surco hipotalámico o surco de Monro, lo separa del tálamo. Lateralmente, el hipotálamo se encuentra bordeado por el tracto óptico, la cápsula interna y estructuras subtalámicas. El límite inferior viene delimitado por una delgada pared en forma de embudo, el tuber cinereum, que se prolonga hacia abajo abarcando el tallo hipofisario y el proceso infundibular de la neurohipófisis. Longitudinalmente, el hipotálamo se puede dividir en tres zonas funcionalmente independientes e interrelacionadas (*Figura 2*):

- La región anterior o supraóptica, que limita con la lamina terminalis formando el límite rostral del hipotálamo. En esta zona se encuentra el área preóptica (POA) y el área hipotalámica anterior (AHA), así como los núcleos supraóptico (SON) y el paraventricular (PVN). El POA es un área clave para el control de la función reproductora, pues contiene la mayoría de las neuronas productoras de GnRH. Los núcleos SON y PVN contienen neuronas secretoras de oxitocina y arginina-vasopresina (AVP) y sus axones transcurren a lo largo del infundíbulo hasta llegar a la neurohipófisis formando el tracto hipotálamo-hipofisario.
- La parte medial o tuberal incluye el área hipotalámica lateral (LHA) y los núcleos ventromedial (VMN), dorsomedial (DMN) y arcuato (ARC); localizado este último por encima de la eminencia media y adyacente al tercer ventrículo. El área tuberal, junto con el PVN de la región rostral, proyecta sus axones hacia los capilares de la eminencia media y contiene la mayor parte de las neuronas reguladoras de la porción endocrina de la hipófisis<sup>9-11</sup>.
- La parte caudal o mamilar forma el límite posterior del hipotálamo y se encuentra delimitada por un plano vertical que pasa inmediatamente por detrás de los cuerpos mamilares. En ella se encuentra el complejo del cuerpo

mamilar (MBC), el núcleo hipotalámico posterior (PH), el núcleo supramamilar (SuM) y el núcleo tuberomamilar (TMN), que participa en procesos de modulación de la ingesta alimenticia y del ciclo sueño-vigilia <sup>9,11,12</sup>.



**Figura 2:** Localización de la unidad hipotálamo-hipofisaria (HH) en el encéfalo y representación esquemática de las principales áreas y núcleos hipotalámicos. Modificado de [www.diabetesobesity.org.uk/hypothalamic-nuclei.html](http://www.diabetesobesity.org.uk/hypothalamic-nuclei.html).

Las neuronas de los diferentes núcleos hipotalámicos presentan diferentes patrones de conexión y función. Existen conexiones (i) entre neuronas productoras del mismo neuropéptido, como es el caso de las neuronas GnRH, que permiten la sincronización de la liberación de dicho péptido <sup>11</sup>; y (ii) entre neuronas productoras de diferentes tipos de neuropéptidos, que permiten modular las señales estimuladoras e inhibitoras implicadas en el control de una determinada hormona hipofisaria <sup>13</sup>.

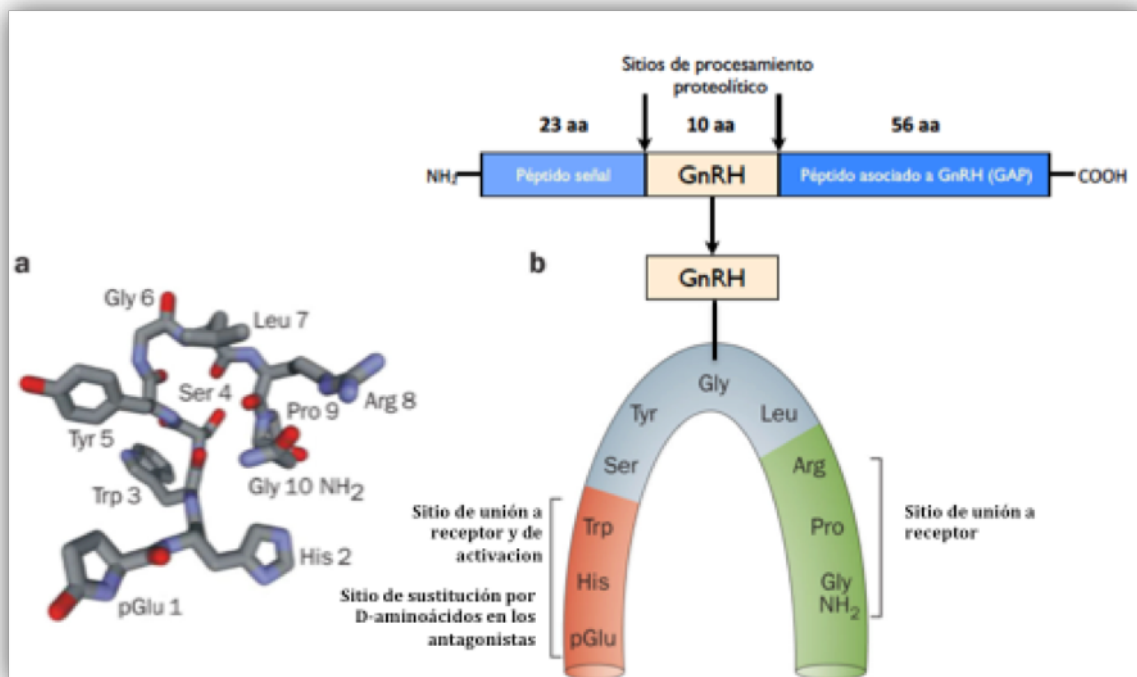
### 1.1.1.1 Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

En vertebrados, la existencia del sistema portal hipotálamo-hipofisario permite a neurotransmisores y neuropéptidos sintetizados por neuronas hipotalámicas llegar a la hipófisis y regular la función adenohipofisaria. En el ámbito de la función reproductora, la búsqueda de una neurohormona reguladora de la secreción

gonadotrópica hipofisaria tuvo uno de sus grandes hitos en el año 1971, cuando se aisló e identificó, en extractos hipotalámicos de cerdo y oveja, un decapeptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) denominado inicialmente hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH)<sup>14,15</sup>. Esta forma de GnRH hipotalámico fue denominada posteriormente GnRH-I debido a la identificación de nuevos miembros de la familia GnRH en el mesencéfalo de pollo (GnRH-II)<sup>16</sup> y en las terminales nerviosas del telencéfalo de salmón (GnRH-III)<sup>17,18</sup>.

En mamíferos, en general, y en roedores, en particular, el responsable del control endocrino de la función reproductora es el GnRH-I (al que denominaremos como GnRH en esta Tesis), ya que estimula la liberación de gonadotropinas por parte de la hipófisis anterior. GnRH-II parece estar implicado en la regulación del comportamiento sexual, la ingesta de comida y el balance energético y GnRH-III, además de estar implicada en el control del comportamiento reproductor, también se ha sugerido como un posible factor hipofisiotrópico y neuromodulador del cerebro anterior y el epitelio olfativo.

El empleo de técnicas inmunohistoquímicas (IHC) ha permitido mapear el sistema neuronal de GnRH en el hipotálamo, observándose que las neuronas GnRH se presentan como redes laxas dispersas a través de varias divisiones anatómicas. Su población es relativamente limitada (entre 1000 y 3000 neuronas en la especie humana) y presenta diferencias considerables en su distribución entre las diferentes especies de mamíferos. En los primates, incluidos los seres humanos, las neuronas GnRH están localizadas principalmente en el ARC del hipotálamo mediobasal y en el POA, mientras que en los roedores se han detectado pocas neuronas GnRH en el ARC<sup>19,20</sup>. La red más sobresaliente en el roedor está compuesta por neuronas que forman un *cotínium* laxo de la *vía septo-preóptica-infundibular*. A pesar de la amplia



distribución neuroanatómica de las neuronas GnRH, la práctica totalidad de ellas extiende sus prolongaciones axónicas sobre los plexos capilares del sistema portal hipotálamo-hipofisario en la eminencia media, donde liberan el neuropéptido en forma de pulsos altamente sincronizados<sup>21</sup>.

**Figura 3:** Estructura y procesamiento del GnRH. a) Estructura tridimensional de la proteína GnRH. b) Esquema de la prepro-GnRH y GnRH de mamíferos: los residuos aminotermiales (rojo) intervienen en la activación y unión al receptor, la Gly situada en posición 6 permite obtener la conformación activa del neuropéptido y los residuos del extremo

*carboxiterminal (verde) son necesarios para la especificidad y unión de alta afinidad al receptor. Modificado de <sup>22</sup>.*

En humanos, el gen que codifica GnRH consta de 4 exones y se localiza en el cromosoma 8. La proteína GnRH se origina a partir de un precursor peptídico de 92 aminoácidos, denominado preproGnRH. Esta preproteína contiene en su secuencia un péptido señal de 23 aminoácidos y un péptido de 56 aminoácidos, denominado péptido asociado a GnRH (GAP), que se libera junto con la proteína GnRH madura de 10 aminoácidos (*Figura 3*). La conformación biológicamente activa de GnRH contiene un pliegue en la región central de la molécula (Gly<sup>6</sup>) y los residuos del extremo amino-terminal, pGlu<sup>1</sup>, y el carboxi-terminal, Gly<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub><sup>23</sup>. Estos últimos son necesarios para la actividad de GnRH y pueden ser sustituidos únicamente por grupos similares en la obtención de formas biológicamente activas. En concreto, muchos análogos de GnRH contienen una sustitución etilamina del Gly-NH<sub>2</sub> carboxi-terminal. Las modificaciones de los residuos amino-terminales His<sup>2</sup> y Trp<sup>3</sup> conducen al desarrollo de antagonistas de GnRH, lo que implica que estos residuos son necesarios para la activación del receptor. El residuo Arg<sup>8</sup> tiene un papel importante, determinando la alta afinidad de unión a su receptor en mamíferos, aunque no es así en especies animales no mamíferas<sup>24</sup>.

El perfil de secreción de GnRH no es constante a lo largo de la vida. En roedores y humanos, la secreción de GnRH se incrementa durante el periodo fetal tardío y neonatal temprano, disminuyendo posteriormente y manteniéndose en niveles mínimos hasta la pubertad. Hay que destacar que el desarrollo de las neuronas GnRH y de su capacidad secretora es anterior a su activación durante la pubertad. De hecho, la estimulación eléctrica o neuroquímica de este sistema puede inducir su activación precoz<sup>25,26</sup>. La secreción de este péptido se realiza de forma pulsátil desde los terminales nerviosos al sistema portal hipofisario cada 30-120 min para estimular la biosíntesis y secreción de gonadotropinas por las células gonadotropas hipofisarias<sup>27</sup>.

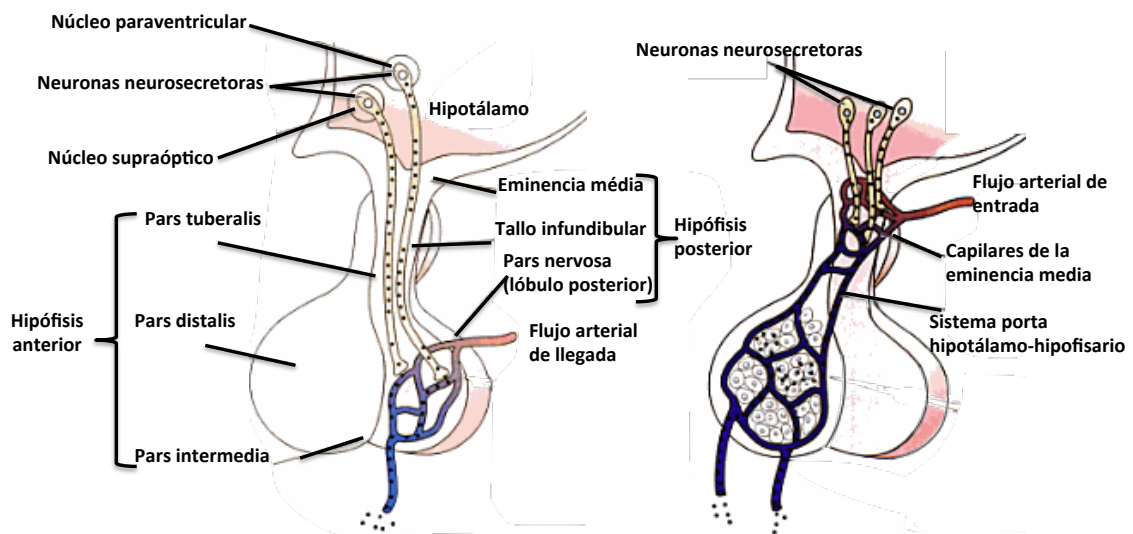
Las acciones biológicas de GnRH se llevan a cabo tras su interacción con un receptor de superficie acoplado a proteína G (GPCR) denominado GnRH-R. Éste posee un dominio NH<sub>2</sub>-terminal seguido de 7 hélices transmembrana conectadas entre sí por medio de 3 dominios extracelulares y 3 intracelulares. Los dominios extracelulares y las regiones superficiales de los dominios transmembrana son las responsables de la

unión a GnRH, mientras que las hélices transmembrana parecen estar implicadas en la configuración y el cambio conformacional que sufre el receptor como consecuencia de su activación <sup>28</sup>.

### 1.1.2 Hipófisis

La hipófisis, también llamada glándula pituitaria, es una de las glándulas que mejor representan la relación recíproca existente entre los sistemas nervioso y endocrino. Se encuentra situada en la silla turca del esfenoides (una cavidad ósea de la base del cráneo) y conectada con su principal regulador, el hipotálamo, a través del tallo hipofisario mediante una zona de unión llamada eminencia media. Fisiológicamente se puede dividir en dos regiones: una porción glandular o adenohipófisis y una porción neuronal o neurohipófisis (*Figura 4*) <sup>29</sup>.

La adenohipófisis deriva, desde un punto de vista embriológico, de una evaginación del techo de la faringe y se encuentra formada por tres partes fundamentales: la porción distal (*pars distalis*) y la porción tuberal (*pars tuberalis*), que forman el lóbulo anterior de la hipófisis, y la porción intermedia (*pars intermedia*). La neurohipófisis se origina a partir de una evaginación del suelo del diencéfalo y está compuesta por tres porciones: la porción nerviosa (*pars nervosa*) o lóbulo posterior, el infundíbulo y la eminencia media <sup>30</sup>.



**Figura 4:** Representación esquemática de la hipófisis y sus dos partes estructuralmente diferenciadas: La neurohipófisis y la adenohipófisis Modificado de <sup>31</sup>.

Respecto a sus constituyentes celulares, en la adenohipófisis existen dos tipos fundamentales de células: las granulares, que producen hormonas y contienen numerosos gránulos de secreción y las agranulares, exentas de gránulos de secreción. La secreción hormonal de las células granulares adenohipofisarias se produce en respuesta a determinados péptidos hipotalámicos que alcanzan sus dianas a través del sistema portal hipotálamo-hipofisario. Atendiendo a la principal molécula de secreción, las células granulares se clasifican en <sup>29,30</sup>:

- Somatotropas, productoras de la hormona del crecimiento (GH), que está implicada en el control del crecimiento corporal y en la regulación del metabolismo.
- Lactotropas, producen prolactina (PRL) y su acción principal es la de estimular la producción de leche por parte de las glándulas mamarias.
- Lactosomatotropas, productoras tanto de GH como de PRL.
- Tirotropas, que producen la hormona estimulante del tiroides o tirotropina (TSH) y estimulan la síntesis y la liberación de hormonas tiroideas.
- Corticotropas, productoras de la hormona estimulante de la corteza adrenal (ACTH), que actúa sobre su órgano diana estimulando, fundamentalmente, la secreción basal de glucocorticoides en respuesta a situaciones de estrés.
- Gonadotropas, productoras de gonadotropinas <sup>32</sup>, LH y FSH. Sus principales características serán desarrolladas más adelante.

La neurohipófisis, a diferencia de lo que ocurre con la adenohipófisis, no presenta una conexión vascular directa con el hipotálamo sino que, desde un punto de vista funcional, las conexiones hipotálamo-neurohipófisis son fundamentalmente de tipo nervioso. El tejido que la forma contiene axones no mielinizados de neuronas cuyos somas se localizan en el SOP y el PVN del hipotálamo. Además de este componente, la neurohipófisis está formada por células gliales que proporcionan sostén a los axones y vasos sanguíneos procedentes de las arterias hipofisarias. Las dos hormonas peptídicas que se liberan desde la neurohipófisis son la hormona antidiurética o vasopresina (ADH), cuya principal acción es aumentar la reabsorción de



agua en los túbulos renales, y la oxitocina, que favorece la eyección de leche y estimula la contracción uterina.

### 1.1.2.1 Gonadotropinas: LH Y FSH

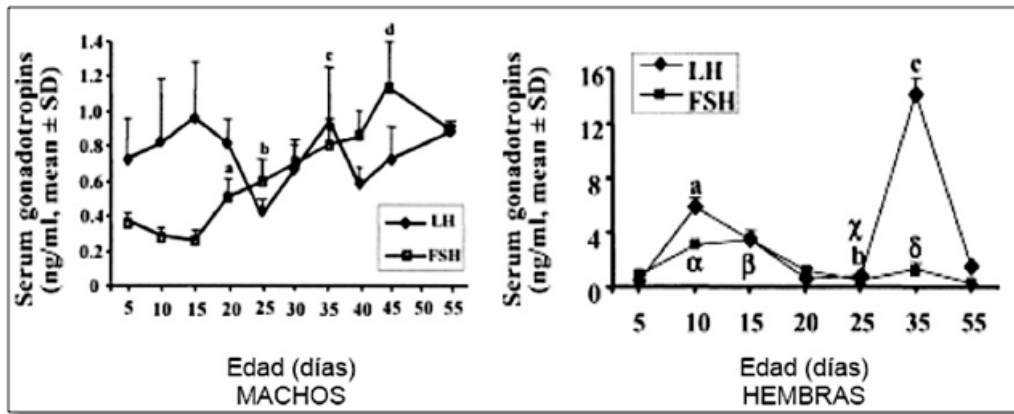
Las gonadotropinas LH y FSH son glicoproteínas formadas por dos subunidades, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , que necesitan estar unidas para que ambas hormonas desarrollen su actividad biológica<sup>33</sup>. Junto a la TSH y la gonadotropina coriónica (hCG), las gonadotropinas tienen en común la subunidad  $\alpha$ : una estructura peptídica de 92 aminoácidos codificada por un gen localizado, en humanos, en el cromosoma 6. Las subunidades  $\beta$  de cada hormona, con un tamaño de entre 111 y 145 aminoácidos, presentan un bajo grado de homología y en ellas reside la actividad específica de cada hormona<sup>34-36</sup>. Las subunidades  $\beta$  de la LH y la FSH se encuentran codificadas por los genes LH  $\beta$  y FSH  $\beta$ , que se localizan en humanos en las regiones 19q13.32 y 11p13, respectivamente. Mutaciones en la región que codifica para la subunidad LH  $\beta$  conducen a la síntesis de moléculas anómalas, que presentan una bioactividad disminuida y producen un hipogonadismo con niveles de LH que pueden ser normales, así como variantes moleculares que provocan retraso puberal<sup>37-39</sup>. Las mutaciones en el gen de la subunidad  $\beta$  de la FSH provocan siempre hipogonadismo e infertilidad en el sexo femenino<sup>40,41</sup> e hipogonadismo e infertilidad variables en el sexo masculino<sup>42,43</sup>.

Las gonadotropinas ejercen sus acciones mediante su unión a receptores específicos asociados a proteínas G, que se localizan en las membranas de sus células diana. Una vez unidas a su receptor, las gonadotropinas inducen la activación de la adenilato ciclasa en la membrana celular que cataliza la producción de AMPc a partir de ATP y con ello la activación de una proteína quinasa que produce la fosforilación y activación de los sistemas enzimáticos que participan en la síntesis de esteroides por los diferentes tipos celulares gonadales. Adicionalmente, se ha comprobado que estos receptores pueden activar otras rutas de señalización, como la de la fosfolipasa C (PLC), que produce un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular y activación de proteínas quinasas dependientes de mitógeno<sup>44-46</sup>. Se ha descrito que la estimulación prolongada de los receptores LH-R y FSH-R produce su desensibilización a través de un mecanismo de *down-regulation* y desacoplamiento a sus proteínas G<sup>47</sup>.

La localización de los receptores de gonadotropinas es fundamentalmente gonadal, aunque se ha demostrado que el receptor de LH, LH-R, también se expresa en tejidos extragonadales, incluyendo el sistema nervioso central (SNC) <sup>47</sup>. En el ovario, el LH-R se expresa mayoritariamente en las células de la teca y las células lúteas y media la síntesis de estrógenos y progesterona, la ovulación o la formación del cuerpo lúteo <sup>48</sup>. En el testículo, se ha identificado principalmente en las células de Leydig y se considera indispensable para la síntesis de testosterona por las mismas. En cuanto al receptor de FSH, FSH-R, se expresa en el ovario, fundamentalmente en las células de la granulosa, donde es necesario para el desarrollo folicular y la síntesis de hormonas de naturaleza proteica (activinas, inhibinas y folistatina) <sup>49</sup>, mientras que en el testículo ha sido identificado principalmente en las células de Sertoli, resultando imprescindible para la síntesis de proteínas tales como la proteína que fija andrógenos o las inhibinas <sup>50</sup>.

Como se ha descrito anteriormente, la liberación pulsátil de GnRH a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria induce la síntesis y liberación pulsátil de gonadotropinas. No obstante, se ha estudiado que a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo se producen cambios significativos en los niveles circulantes de LH y FSH (*Figura 5*).

En ratonas y en ratas hembra, los niveles circulantes de FSH se incrementan progresivamente desde el momento del nacimiento hasta el inicio del periodo infantil, alcanzando su máximo valor en torno al día 12 de vida. A partir de este momento, los valores de FSH circulantes disminuyen de forma progresiva, alcanzando su punto más bajo en torno al final del periodo infantil, coincidiendo con el destete. Posteriormente, entre el día 25 de vida y el inicio del periodo puberal (en torno al día 35 de vida), se ha visto que se produce un ligero incremento en la secreción de FSH sin llegar a alcanzar los valores detectados en el periodo infantil. Por su parte, los niveles circulantes de LH en estos animales aumentan entre los días 5 y 10 de vida, produciéndose posteriormente un descenso de los mismos hasta el día 25 (periodo juvenil), momento en el que se produce una rápida elevación que tiene su punto máximo coincidiendo con la llegada de la pubertad <sup>51</sup>.



**Figura 5:** Perfil de secreción de gonadotropinas durante el desarrollo postnatal en ratas macho y hembra. Modificado de <sup>51,52</sup>.

En machos, los niveles de FSH presentan una tendencia ascendente desde la segunda semana de vida hasta la llegada de la pubertad. De igual forma, la concentración de LH circulante se incrementa en estas etapas del desarrollo aunque con un patrón de secreción variable <sup>52</sup>.

### 1.1.3 Gónadas

Las gónadas, testículo y ovario, son glándulas sexuales caracterizadas por desempeñar una doble función: la producción de gametos maduros a partir de células germinales (gametogénesis) y la síntesis y secreción de hormonas (hormonogénesis) que regulan, entre otras, la producción de dichos gametos, el desarrollo y funcionamiento de los genitales y la aparición de los caracteres sexuales secundarios.

Teniendo en cuenta las diferencias morfológicas y funcionales que existen entre ambas gónadas, a continuación las describiremos por separado, revisando sus principales características estructurales y funcionales.

#### 1.1.3.1 Testículos

Los testículos poseen dos funciones diferentes pero, al mismo tiempo, íntimamente relacionadas con la función reproductora. Estas funciones son la producción de gametos o células germinales masculinas (espermatozoides), y la biosíntesis y secreción de hormonas esteroideas y peptídicas. Estructuralmente, el

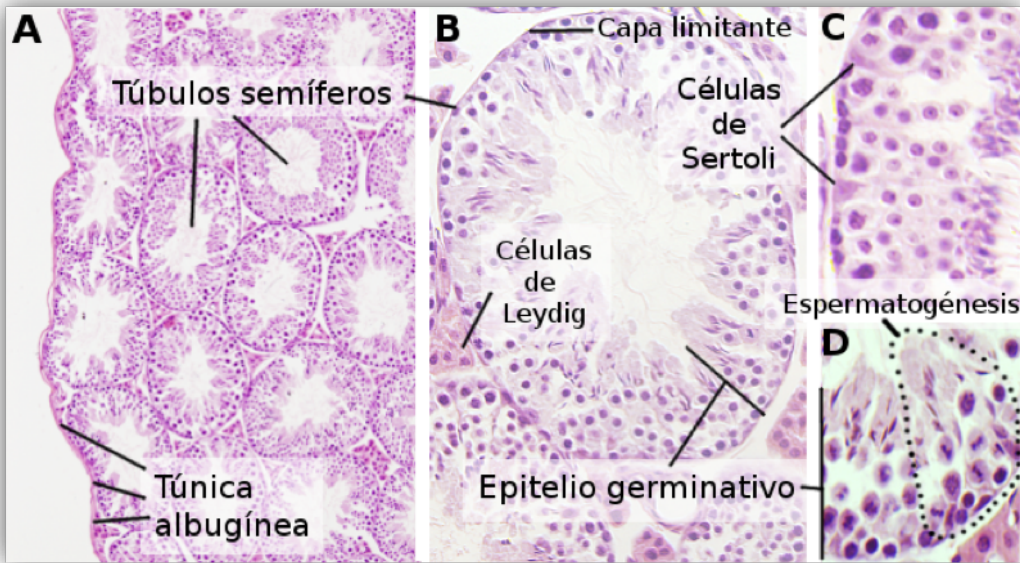
testículo se organiza en dos compartimentos, uno intersticial (espacio intersticial o intertubular) y otro tubular (constituido por los túbulos seminíferos) (*Figura 6*)<sup>53</sup>.

En el intersticio testicular el componente principal son las células de Leydig, aunque también podemos encontrar el resto de componentes propios del tejido conjuntivo laxo: macrófagos, linfocitos, células fibroblásticas del estroma y células endoteliales<sup>53</sup>. En las células de Leydig, la unión de LH a su receptor estimula la síntesis de un grupo de esteroides denominados globalmente andrógenos testiculares: testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT) y androstenediona .

Una parte de la T sintetizada actúa localmente en el testículo estimulando de forma paracrina la espermatogénesis y otra parte es secretada a la circulación sistémica donde se transporta de forma libre o unida a albúmina o globulinas tipo SHBG (globulina de unión a hormonas sexuales). El efecto androgénico de la T en tejidos periféricos viene dado por su transformación en DHT por medio de la enzima 5- $\alpha$ -reductasa<sup>54</sup>. Por el contrario, las acciones centrales de la T se llevan a cabo en su forma nativa o tras su aromatización a estradiol. Las principales funciones de los andrógenos son: la regulación de la secreción de las células gonadotropas mediante retroalimentación negativa, tanto hipotalámica como hipofisaria, la diferenciación sexual fenotípica del embrión, la maduración sexual en la pubertad, el estímulo de la espermatogénesis y la adquisición y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios<sup>54</sup>.

El compartimento tubular se encuentra formado por un epitelio poliestratificado que integra los dos elementos celulares que participan en el ciclo de la espermatogénesis: las células germinales y las células de Sertoli (*Figura 6*)<sup>53</sup>.

Las células germinales constituyen la mayor parte del túbulo seminífero y se distribuyen de forma ordenada desde la membrana basal a la luz tubular. Las que descansan sobre la membrana basal son las espermatogonias y experimentan, a partir de la pubertad, una serie de modificaciones cíclicas que finalizan con la formación de los espermatozoides maduros cerca del lumen tubular<sup>53</sup>.



**Figura 6.** Corte histológico del testículo donde se observan los diferentes compartimentos, tubular e intersticial, y los principales tipos celulares. Modificado de <sup>55</sup>.

Las células de Sertoli se extienden radialmente desde la membrana basal en dirección a la luz tubular y están íntimamente relacionadas con las células germinales, proporcionándoles el soporte adecuado. Las células de Sertoli presentan receptores para la FSH y, bajo su estímulo, sintetizan una serie de metabolitos entre los que se encuentran gran cantidad de intermediarios energéticos como el lactato y otras sustancias necesarias para que las células germinales lleven a cabo su metabolismo de forma eficaz <sup>56</sup>. Además, la estimulación con FSH induce en ellas la síntesis de diversas proteínas (proteína ligadora de andrógenos, activinas e inhibinas) implicadas en la regulación de la espermatogénesis y de la propia FSH <sup>56</sup>.

### 1.1.3.2 Ovarios

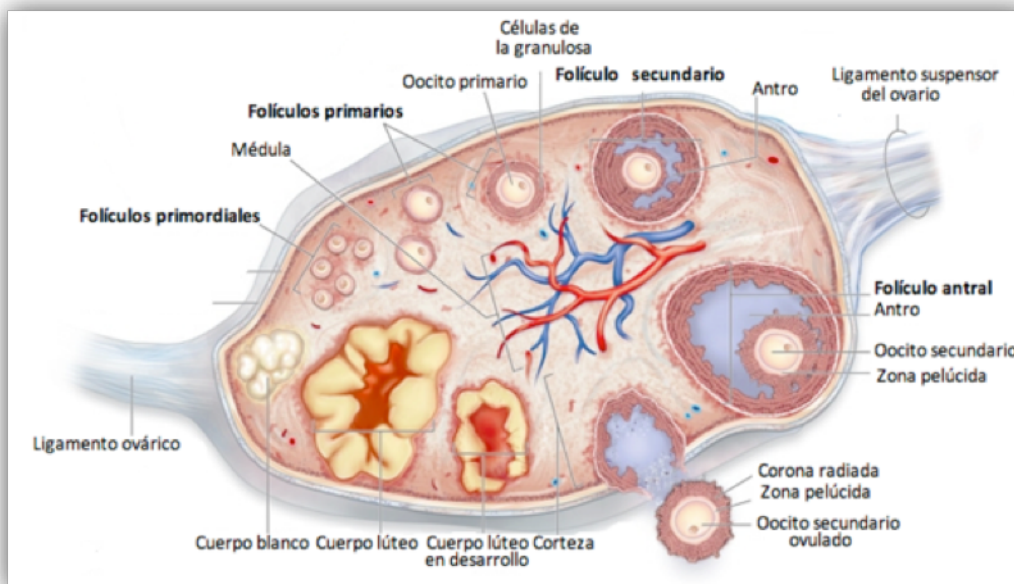
Constituyen el órgano esencial del sistema reproductor femenino. En el ovario de mamíferos se pueden apreciar dos regiones bien diferenciadas: la corteza y la médula, compuesta por tejido conjuntivo fibroso y en la que se albergan vasos sanguíneos y linfáticos, además de fibras nerviosas (*Figura 7*).

La corteza ovárica es la región más importante y donde van a ocurrir la mayoría de los cambios asociados con el funcionamiento de esta gónada. En ella destacan

como estructuras fundamentales los folículos ováricos, que contienen en su interior las células germinales femeninas (oocitos).

La organización y los componentes que forman los folículos van a sufrir una serie de cambios que coinciden con el grado de diferenciación y desarrollo de los oocitos que contienen, y que están íntimamente relacionados con la doble misión de los ovarios: la generación de gametos femeninos (oogénesis) y la secreción de hormonas esenciales en la regulación de la función reproductora (hormonogénesis) 54,57.

Los procesos de maduración que ocurren en los folículos se pueden dividir en varios niveles de organización o etapas (*Figura 7*).



**Figura 7.** Representación de la estructura del ovario y la maduración folicular. El ciclo folicular consta de dos fases separadas por la ovulación, la fase folicular, donde maduran los folículos y la fase lútea, que origina al cuerpo lúteo. Modificado de <sup>58</sup>.

El primer nivel de organización folicular es el folículo primordial, constituido por una capa de células de la granulosa que rodean al oocito primario y que están separadas del estroma adyacente por una lámina basal. Este folículo primordial es susceptible de iniciar un proceso de maduración dirigido hacia la formación del folículo primario, que va creciendo y profundizando en la corteza. En esta fase, las células de la granulosa se transforman en células maduras de mayor tamaño que comienzan a

dividirse, formando varias capas. Además, también se produce la acumulación de polisacáridos entre dichas capas y el oocito primario, dando lugar a la denominada membrana pelúcida.

En la siguiente etapa, continúa el crecimiento del folículo hasta formar el folículo secundario. En él, el oocito primario se encuentra rodeado de varias capas de células de la granulosa rodeadas a su vez por una capa de células intersticiales que forman la teca interna. La formación del folículo terciario o antral constituye el siguiente estadio, caracterizado por el incremento del número de capas de células de la granulosa y la formación de la teca externa. Se empieza a acumular líquido folicular en los espacios intercelulares, que se amplían y confluyen hasta formar una cavidad semilunar denominada antro folicular. Finalmente, el folículo terciario se transforma en el folículo preovulatorio o folículo de Graaf. En él, el oocito ocupa una posición excéntrica rodeado de dos o tres capas de células granulosas dando lugar al denominado cúmulo oóforo. Este estadio culmina con el proceso de ovulación en el que, una vez conseguida la maduración total del folículo de Graaf, se produce la ruptura de éste con liberación del oocito secundario que contiene y del cúmulo del oóforo que lo rodea. Tras la ovulación, las células foliculares se transforman (por acción de la LH) en células lúteas productoras de progesterona (PG) y estradiol (E2). La PG ejercerá un papel fundamental en la regulación del ciclo estral, en el crecimiento del útero y en el mantenimiento del embarazo.

A pesar de que diferentes factores participan en el crecimiento folicular, se ha demostrado que las gonadotropinas son las que realmente controlan la función ovárica, con variaciones según el estadio de crecimiento del folículo. Así, mientras que la formación de folículos primordiales no requiere de la acción de las gonadotropinas, su crecimiento exponencial requiere niveles elevados de FSH junto con niveles permisivos de LH.

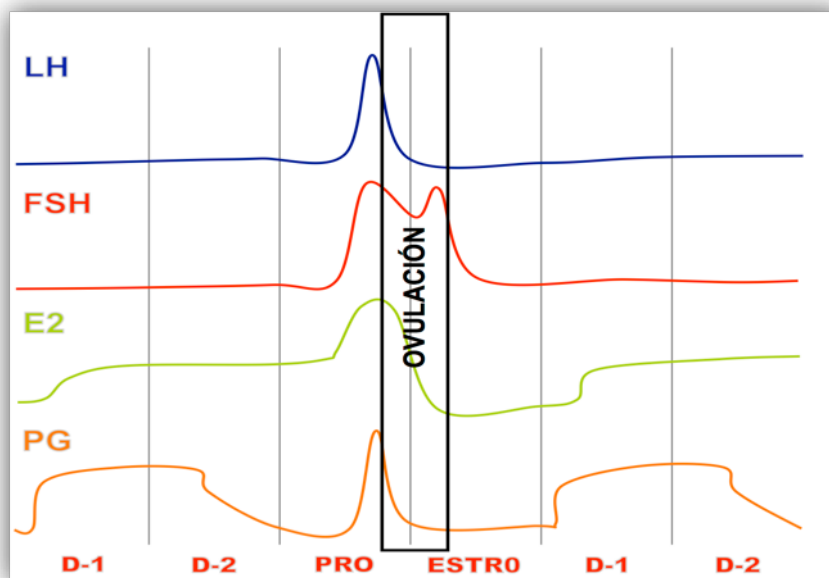
Adicionalmente, diversos factores paracrinos también intervienen en la modulación del crecimiento folicular, destacando entre ellos el E2, algunos factores de crecimiento y activinas/inhibinas<sup>59</sup>.

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente el  $17\beta$ -estradiol y la PG, aunque también se producen pequeñas

cantidades de estrona, androstenediona, T y  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona. Éstas se sintetizan fundamentalmente en las estructuras foliculares y en el cuerpo lúteo. Dentro del folículo, la biosíntesis de E2 requiere de la interacción entre las células de la teca interna y las células de la granulosa.

El proceso de foliculogénesis se repite en la mujer de forma cíclica, durante su periodo fértil, cada 28 días aproximadamente, produciéndose un único folículo preovulatorio y, con ello, una ovulación por cada ciclo.

En la rata hembra, las variaciones cíclicas de la actividad reproductora presentan una duración mucho más corta que en la mujer. El epitelio vaginal muestra cambios que se repiten cada 4 días (fases de proestro, estro, diestro 1 o metestro y diestro 2) y que surgen como consecuencia de los cambios en la secreción ovárica de E2 y PG (Figura 8). La ovulación se produce en las primeras horas del día de estro y viene desencadenada por la liberación preovulatoria de gonadotropinas. Esta liberación tiene lugar en la tarde del proestro a través de la retroalimentación positiva de la secreción de gonadotropinas inducida por E2. En cada ciclo se formarán 10-12 folículos preovulatorios y, con ello, 10-12 ovulaciones por ciclo<sup>60,61</sup>.



**Figura 8.** Perfiles de secreción de gonadotropinas y hormonas ováricas durante el ciclo estral de la rata. Fases del ciclo estral: D-1: diestro-1; D-2: diestro-2; PRO: proestro; Estro. Hormonas ováricas: E2: estradiol. PG: progesterona. Tomado de<sup>62</sup> con modificaciones.



## 1.2 CONTROL DEL EJE HHG

El correcto funcionamiento del eje HHG en ambos sexos depende de la adecuada función de las neuronas hipotalámicas productoras de GnRH. Estas neuronas actúan como elementos integradores y efectores de múltiples señales de origen central y periférico.

### 1.2.1 Regulación por elementos centrales

A nivel del SNC, el control del eje HHG es llevado a cabo por una multitud de neurotransmisores y neuropéptidos, de naturaleza excitatoria o inhibitoria, que actúan modulando la síntesis y liberación pulsátil de GnRH.

#### 1.2.1.1 Reguladores centrales de naturaleza excitatoria

**Sistema KISS1/GPR54:** es un sistema formado por una serie de ligandos, codificados por el gen *KISS1/Kiss1* y denominados kisspeptinas, que ejercen sus acciones tras su interacción con el receptor GPR54/Gpr54, codificado por el gen *GPR54/Gpr54*.

Siguiendo los criterios consensuados por la comunidad científica, los constituyentes de este sistema en humanos y primates se escribirán en mayúsculas y en el resto de especies en minúscula. En todas las especies, los genes y el ARNm derivado de la expresión de los mismos se escribirán en cursiva, mientras que no será así en el caso de las proteínas derivadas de los mismos. Adicionalmente, para indicar globalmente el sistema ligando/receptor sin referirnos al tipo de especie emplearemos el término KISS1/GPR54.

A pesar de que la identificación del sistema KISS1/GPR54 se realizó en el contexto de estudios no relacionados con la Fisiología de la reproducción, en los últimos quince años, multitud de estudios científicos han demostrado que este sistema posee un amplio espectro de acciones biológicas sobre el eje HHG y sobre la llegada de la pubertad, posicionándolo como uno de los moduladores más importantes de la función reproductora. Entre las acciones más relevantes de este sistema destacan (entre otras) su potente efecto estimulador sobre la secreción de gonadotropinas en numerosas especies, que incluyen roedores<sup>63-66</sup>, humanos, ovejas y monos<sup>67-69</sup>, y su papel mediador de las acciones de determinadas señales periféricas, tales como los

esteroides gonadales o las hormonas metabólicas leptina y ghrelina, sobre la función reproductora<sup>70</sup>.

Dada la importancia de la señalización kisspeptidérgica en el control de la función reproductora y su relevancia en el desarrollo de esta Tesis, este sistema será abordado de forma más amplia en la *sección 1.5*.

**Neuroquinina B (NKB):** A pesar de que los primeros estudios realizados sobre el papel que la NKB en la regulación de la función reproductora ofrecieron resultados contradictorios<sup>71-73</sup>, los trabajos publicados a partir del año 2009 en diversas especies, incluida la humana<sup>74</sup>, han demostrado que NKB participa activamente en la regulación del eje HHG, aportando datos consistentes sobre su papel estimulador en la secreción de GnRH/LH<sup>75-77</sup>.

Al igual que con el sistema KISS1/GPR54, el papel de la NKB en el ámbito de la función reproductora será desarrollado de forma más detallada en la *sección 1.6.*, dada su importancia en el desarrollo de esta Tesis,

**Aminoácidos excitatorios (EAA):** El más relevante de los AAEE es el glutamato (Glu) o ácido L-glutámico<sup>78</sup>. Su concentración en el hipotálamo de rata aumenta a lo largo del desarrollo postnatal<sup>79,80</sup>, alcanzando niveles máximos tras la llegada de la pubertad<sup>81</sup>. El Glu ejerce su acción a través de dos tipos de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. Los primeros son canales iónicos específicos que se caracterizan por su elevada conductancia al  $Ca^{2+}$ , lo que determina que las respuestas sinápticas sean del orden de milisegundos. Los receptores ionotrópicos se pueden subdividir en función de su agonista selectivo en: receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA), Kainato (KA) y ácido DL- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA)<sup>82,83</sup>. Por su parte, los receptores metabotrópicos actúan en una escala de tiempo mucho más lenta, del orden de segundos o minutos, ya que están acoplados a proteínas G y modulan la producción de segundos mensajeros tales como el inositol trifosfato (IP3) y/o el AMPc.

El efecto estimulador de los EAA sobre las neuronas GnRH ha sido puesto de manifiesto, tanto a nivel de secreción como a nivel de expresión, bajo diferentes condiciones experimentales. En este sentido, estudios *in vitro* demostraron que tanto el NMDA, como el KA y el AMPA son capaces de estimular la secreción de GnRH en

fragmentos hipotalámicos de rata, mientras que el tratamiento con antagonistas específicos de estos receptores bloquea este efecto estimulador<sup>84</sup>. Además, estudios desarrollados en neuronas GnRH inmortalizadas (GT1-7) pusieron de manifiesto la estimulación de la liberación de GnRH por las mismas en presencia de Glu, NMDA, AMPA, KA y t-ACPD (agonista de receptores metabotrópicos)<sup>85</sup>. Por otra parte, se ha observado en experimentos *in vivo* que la administración intracerebroventricular (icv) de NMDA y KA incrementa los niveles de LH circulantes<sup>84</sup>.

**Catecolaminas:** se ha demostrado que las neuronas adrenérgicas, a través de la síntesis y liberación de adrenalina y noradrenalina (NA), desempeñan un papel relevante en la activación de la secreción de GnRH. Las primeras evidencias de la implicación de las catecolaminas en el control de la secreción de GnRH surgieron de la observación de que, tanto la eliminación de neuronas noradrenérgicas en el tronco encefálico como la inhibición de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, provocaban una disminución de la secreción pulsátil de LH<sup>86</sup>. Adicionalmente, se ha demostrado que las neuronas noradrenérgicas del tronco encefálico emiten proyecciones hacia las neuronas GnRH, propiciando el establecimiento de sinapsis entre ambas y se ha detectado la presencia de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos tanto en neuronas GnRH como en las líneas neuronales GT1-7<sup>86</sup>.

**Óxido nítrico (NO):** se trata de un mensajero gaseoso sintetizado en el organismo por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de la oxidación de la L-arginina<sup>87</sup>. Numerosos estudios farmacológicos (*in vivo e in vitro*) han demostrado la capacidad del NO de modular la secreción hipotalámica de GnRH, participando en el establecimiento del pico preovulatorio de LH y la ovulación<sup>88</sup>. De hecho, se ha demostrado que la administración de L-NAME (un inhibidor de NOS) bloquea el pico preovulatorio de LH y que su administración en el POA o en la eminencia media, causa la disrupción de la ciclicidad estral en la rata. Por otra parte, la administración icv del precursor de NO, arginina, en estas mismas regiones hipotalámicas incrementa la duración y magnitud de este pico<sup>88</sup>. En apoyo de lo anterior, se ha comprobado que NO es capaz de estimular la liberación de GnRH en neuronas GT1-7<sup>89,90</sup>. Más recientemente, se ha demostrado el relevante papel que poseen poblaciones discretas de neuronas NO localizadas en el hipotálamo como elementos integradores capaces de

transmitir las señales metabólicas y gonadales a nivel central y permitir la llegada de la pubertad y la fertilidad en la edad adulta <sup>91</sup>.

### 1.2.1.2 Reguladores centrales de naturaleza inhibitoria

**Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA):** Está considerado como el principal neurotransmisor inhibitorio de la secreción de GnRH, actuando a través de dos subtipos de receptores: ionotrópicos (GABA<sub>A</sub>) y metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>).

Las acciones descritas para el GABA y su receptores en neuronas GnRH y en líneas celulares GT1-7 indican que este neuropéptido también puede regular la liberación de GnRH en sentido excitatorio. De esta forma, mientras que los estudios farmacológicos realizados en roedores con agonistas de GABA<sub>B</sub> le atribuyen un efecto inhibitor sobre la secreción pulsátil y pre-ovulatoria de GnRH/LH <sup>92</sup>, los estudios electrofisiológicos en ratonas adultas sugieren que el GABA podría tener también efectos excitatorios actuando a través del receptor GABA<sub>A</sub> <sup>93 94</sup>. Además, los estudios realizados en líneas neuronales de GnRH procedentes de ratón, GT1, demostraron un efecto bifásico del GABA, con una estimulación inmediata de la liberación de GnRH seguida de una supresión de su secreción <sup>95</sup>.

**Opioides endógenos:** Constituyen un componente inhibitorio importante de la secreción de GnRH/LH. De hecho, una reducción significativa del tono opioide inhibitorio ha demostrado ser crítica para la generación del pico preovulatorio de LH <sup>96</sup>. Los opioides endógenos se pueden clasificar en tres grupos: encefalinas,  $\beta$ -endorfinas ( $\beta$ -END) y dinorfinas (Dyn); y ejercen sus efectos a través de tres tipos de receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$ . La  $\beta$ -END y la Dyn actúan vía receptor  $\mu$  y receptor  $\kappa$ , respectivamente <sup>97,98</sup>. El sistema formado por la el  $\beta$ -END y su receptor parece ser importante en el control del pico preovulatorio de GnRH/LH y se le ha asignado un papel relevante en la transmisión de la información derivada del ambiente esteroideo a las neuronas GnRH <sup>99</sup>. Por su parte, el sistema Dyn/receptor  $\kappa$  sería responsable de la inhibición de la secreción de GnRH, actuando como mediador de la retroalimentación negativa ejercida por la PG en el establecimiento del patrón pulsátil de liberación de LH <sup>100</sup>.

Es importante destacar que, si bien inicialmente no se había documentado la expresión de receptores de opioides endógenos en las neuronas GnRH y se pensaba que su papel

modulador podría ser indirecto <sup>101,102,86</sup>, estudios más recientes, que demuestran la colocalización del receptor  $\kappa$  en las neuronas GnRH en ovejas y ratas, sugieren la posibilidad de que, al menos, las acciones reguladoras de Dyn también pudieran desarrollarse de forma directa sobre dichas neuronas <sup>103</sup>.

**Neuropéptido Y (NPY):** Es uno de los neurotransmisores más abundantes del SNC y un modulador esencial en el control de la función reproductora <sup>104</sup>. Se trata de un neuropéptido de 36 aminoácidos, muy conservado entre especies, que se expresa en diferentes áreas del cerebro, incluyendo el núcleo ARC, donde existe una gran población, y el tronco encefálico <sup>105</sup>. Ejerce sus efectos mediante la activación de receptores acoplados a proteína G, de los que se han descrito 5 tipos: Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6 <sup>106</sup>.

Se ha demostrado que la administración de NPY inhibe la secreción de GnRH/LH en una gran variedad de especies y condiciones <sup>107</sup>. En concreto, se ha visto que NPY ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de LH en condiciones de bajos niveles de estrógenos, probablemente a través de la supresión hipotalámica de GnRH, ya que la administración icv de NPY inhibe la secreción pulsátil de LH en ratas, conejas, ovejas y monas ovariectomizadas <sup>108-111</sup>. Además, se ha demostrado que los niveles de NPY disminuyen antes del pico preovulatorio de LH y que, en ratas macho, el tratamiento crónico con NPY en el ventrículo lateral inhibe el eje HHG <sup>112</sup>. Sin embargo, también se ha documentado que NPY puede llevar a cabo acciones estimuladoras sobre las neuronas GnRH dependiendo de la especie, el estado endocrino, la etapa del desarrollo, el subtipo de receptor al que se une y el patrón de administración (agudo vs. Crónico) <sup>107</sup>. Estudios iniciales en los que se administraba centralmente NPY en ratas demostraron que su acción inhibitoria sobre la secreción de LH se ejercía fundamentalmente a través del receptor Y5 <sup>113</sup>. Sin embargo, estudios electrofisiológicos más recientes desarrollados en ratones han demostrado que NPY podría tanto inhibir como estimular la actividad de GnRH a través de su unión a los receptores Y1 o Y4, respectivamente.

**Hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH):** GnIH es un neuropéptido hipotalámico de 12 aminoácidos que se descubrió en aves y que tiene la capacidad de inhibir directa e indirectamente la liberación de gonadotropinas hipofisarias. Este

neuropéptido es codificado por el gen GnIH, que codifica una proteína precursora de 173 aa a partir de la cual se generan tres péptidos: GnIH, y GnIH-RP-1 y 2<sup>114,115</sup>. Estos péptidos, que tienen un motivo común RF-amida en su extremo C-terminal, Arg-Phe-NH<sub>2</sub>, presentan homólogos en otras especies. En general, en mamíferos, el gen encargado de las síntesis de estos péptidos codifica dos péptidos, RFRP-1 y RFRP-3, de los que el último es considerado el ortólogo funcional del GnIH aviar<sup>116</sup>.

Estudios farmacológicos han demostrado que la administración icv o intraperitoneal (ip) de GnIH aviar a hembras de hámster ovariectomizadas reduce los niveles séricos de LH<sup>117</sup> y que este mismo efecto se reproduce en ratas tras la administración icv de RFRP-3 (ortólogo funcional de GnIH aviar en mamíferos)<sup>118-120</sup>.

### **1.2.2 Reguladores periféricos**

La función del eje HHG está regulada de manera precisa por la acción concertada de un grupo diverso de señales de origen periférico que, junto con las señales de origen central, actúan de un modo coordinado en el control de la función reproductora. A continuación revisaremos los principales factores periféricos que controlan el eje HHG entre los que destacan, por su importante papel en la modulación de la secreción de GnRH, las señales producidas por las gónadas y los factores metabólicos, responsables de transmitir la información del estado energético del organismo.

#### **1.2.2.1 Gonadotropinas**

Está demostrado que ambas gonadotropinas, ejercen un control inhibitorio de su propia síntesis mediante circuitos cortos de retroalimentación a nivel hipotalámico y mecanismos de acción paracrina a nivel hipofisario, actuando sobre las células gonadotropas adyacentes.

#### **1.2.2.2 Factores gonadales**

**Esteroides sexuales:** Los esteroides sexuales (E<sub>2</sub>, andrógenos y PG) son sintetizados fundamentalmente en las gónadas y, en menor medida, en las glándulas adrenales, el cerebro (neuroesteroides) y otros tejidos. A nivel del SNC, ejercen una gran variedad

de efectos como el mantenimiento de la función cognitiva, habilidades motrices, conducta afectiva, orientación espacial, estabilidad emocional y tolerancia al dolor, entre otros <sup>121</sup>.

A nivel del eje HHG, los esteroides sexuales tienen una doble función: por un lado participan en la diferenciación sexual del cerebro indiferenciado y por otro, son esenciales en la activación del cerebro sexualmente diferenciado, modulando la secreción de GnRH/gonadotropinas <sup>122,123</sup>.

Los esteroides sexuales actúan a través de su unión a receptores específicos, tales como (i) el receptor de andrógenos (AR), (ii) los receptores de PG (PR-A y PR-B) y (iii) los receptores de E2 (ERs), de los que existen dos isoformas, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , presentes no sólo en hipotálamo e hipófisis, sino en una amplia variedad de regiones cerebrales y otros tejidos periféricos.

A nivel hipotalámico, los ERs se localizan mayoritariamente en el núcleo ARC y el núcleo anteroventral periventricular AVPV <sup>124-126</sup>. En el AVPV de hembras adultas, la acción de los E2 circulantes provoca un incremento puntual en la secreción de GnRH/LH, esencial para que se produzca la ovulación, el cual se asocia con un aumento de los inputs kisspeptidérgicos hacia las neuronas GnRH. En el núcleo ARC de machos y hembras, los E2 y la T regulan la secreción de LH y FSH a través de circuitos de retroalimentación negativa <sup>127,128</sup>. Aunque los estrógenos ejercen una acción directa sobre las neuronas GnRH vía ER $\beta$ , sus principales efectos parecen estar mediados por neuronas intermedias que expresan los dos tipos de ERs. En este sentido, se ha demostrado, a través de estudios genéticos y farmacológicos, que el principal ER implicado en ambos mecanismos de retroalimentación es el ER $\alpha$  <sup>129,130</sup>. Por último, también conviene destacar que estudios muy recientes llevados a cabo en monos hembra han demostrado que el estradiol sintetizado y liberado por el hipotálamo, denominado neuroestradiol, también contribuye a la regulación del pico preovulatorio de GnRH <sup>131</sup>.

**Péptidos gonadales:** Los péptidos gonadales (inhibinas, activinas y folistatina) son hormonas que regulan la secreción de gonadotropinas actuando directamente a nivel hipofisario.

Las **inhibinas** A y B son dímeros glucoproteicos que se sintetizan en las células de Sertoli del testículo y en las células de la granulosa en el ovario. Ambas isoformas tienen la capacidad de inhibir selectivamente la secreción de FSH hipofisaria, sin afectar a la secreción de LH y sin necesitar la mediación de GnRH <sup>132</sup>. Actuando localmente sobre las gónadas, las inhibinas pueden modificar la producción hormonal además de regular la gametogénesis testicular y ovárica <sup>133</sup>.

Las **activinas** A y B son péptidos sintetizados en las gónadas y otros tejidos que son capaces de estimular directamente la secreción hipofisaria de FSH <sup>134,135</sup>. Cabe destacar la función de las activinas producidas a nivel hipofisario, que actúan de forma paracrina sobre las células gonadotropas <sup>136,137</sup>.

La **folistatina** es una proteína de cadena simple que transporta inhibinas y activinas en el líquido folicular. La folistatina regula la acción de las activinas, modulando su acción y biodisponibilidad <sup>138,139</sup>. Este hecho provoca, de manera indirecta, una inhibición secretora de FSH al bloquear el efecto estimulador que las activinas tienen sobre las células gonadotropas hipofisarias <sup>140</sup>.

### 1.2.2.3 Factores metabólicos

El hecho de que la capacidad reproductora se encuentre subordinada al estatus metabólico del organismo ha sido sugerida desde la antigüedad (*Figura 9*). Sin embargo, las bases científicas de esta asociación no comenzaron a conocerse hasta la década de los años 60 y 70 del siglo pasado, cuando las observaciones epidemiológicas y experimentales de Kennedy, en roedores, y Frisch, en humanos, permitieron proponer la existencia de unos valores umbrales de masa (grasa) corporal a fin de adquirir un adecuado desarrollo puberal y una completa capacidad reproductora en la edad adulta <sup>141,142</sup>.

A pesar de la formulación de esta hipótesis, las señales y mecanismos moleculares responsables del control integrado del balance energético y la fertilidad han permanecido en gran medida desconocidos durante años. No obstante, en las últimas décadas se ha producido un crecimiento exponencial de nuestro conocimiento acerca de estos sistemas fisiológicos, que incluyen tanto factores hormonales que señalizan el estado energético del organismo como circuitos neuronales que integran



esa información y la procesan en términos de activación o supresión del eje reproductor<sup>143</sup>.



**Figura 9:** Imagen de la Venus de Willendorf, Diosa de la Fertilidad (Paleolítico). Desde la Antigüedad se ha representado la fertilidad con figuras femeninas obesas, sugiriendo la asociación entre la reproducción y el estado energético del organismo.

Los principales factores metabólicos periféricos que van a informar a los centros del SNC implicados en el control de la reproducción sobre el estado energético y metabólico del organismo proceden, fundamentalmente, del tejido adiposo, del páncreas y del tracto gastrointestinal y serán detalladas a continuación:

**Leptina:** El descubrimiento de la hormona leptina, producto del gen *ob*, en 1994 puede considerarse como uno de los hallazgos más relevantes en la elucidación de los mecanismos responsables del control del balance energético<sup>144</sup>. Esta hormona es una proteína de 167 aminoácidos producida y secretada principalmente por los adipocitos<sup>144</sup>, pero también por la placenta<sup>145</sup> y el epitelio gástrico<sup>144</sup>. Un incremento de los niveles circulantes de leptina se correlaciona con un aumento de la masa del tejido adiposo, mientras que una disminución de sus niveles plasmáticos se asocia a un descenso de los depósitos energéticos<sup>146</sup>.

La leptina es transportada al cerebro, por un mecanismo saturable capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), donde ejerce sus funciones mediante su unión a un receptor de membrana, denominando Ob-R, que pertenece a la clase I de la familia de receptores de citoquinas con un solo dominio transmembrana<sup>147</sup>. Existen diferentes isoformas del receptor generadas por splicing alternativo a partir del mismo gen. Todas las isoformas (Ob-Ra - Ob-Rf) comparten el dominio extracelular, pero difieren en la longitud de sus dominios transmembrana y citosólico<sup>147,148</sup>. En este contexto, se

ha considerado a la isoforma Ob-Rb como el subtipo funcional en el hipotálamo, localizándose en los núcleos ARC, VMN, DMH así como en LHA y el área preóptica medial (mPOA). También se expresa en zonas del tronco encefálico implicadas en las rutas de control del apetito<sup>149-152</sup>.

A continuación se describen una serie de evidencias experimentales que demuestran el relevante papel de la leptina en el control de la función reproductora:

- La disminución en los niveles circulantes de leptina, que se produce en situaciones de balance energético negativo persistente (p. ej. subnutrición y ayuno) y en modelos de inactivación del gen *ob*, se asocia a la supresión del eje reproductor en diferentes especies de mamíferos, incluyendo humanos y roedores<sup>153-156</sup>.
- El déficit reproductor en las condiciones anteriormente descritas puede ser recuperado mediante la administración exógena de leptina<sup>156-158</sup>.
- La leptina juega un papel permisivo (necesario, aunque probablemente no suficiente por sí mismo de forma exclusiva) para la consecución de un desarrollo puberal completo<sup>154,157,159</sup>.

Los mecanismos de acción de la leptina sobre la secreción de GnRH han sido considerados principalmente indirectos, debido a la ausencia de receptores para esta hormona en las neuronas GnRH. Esta acción indirecta podría estar mediada por neuronas productoras de NPY, ya que la leptina tiene la capacidad de inhibir tanto la expresión del gen *NPY* como su secreción<sup>160-163</sup>. Dado que se ha observado expresión de Ob-R en neuronas que expresan POMC y péptido similar a Galanina (GALP)<sup>164</sup>, estas han sido consideradas mediadoras de los efectos de la leptina en el control metabólico de la función reproductora. Además, también se ha sugerido que las neuronas Kiss1 podrían mediar, al menos en parte, el efecto permisivo de la leptina sobre la puesta en marcha y mantenimiento de la función reproductora<sup>165,166</sup>. Sin embargo, este papel mediador no parece que sea directo ya que, si bien inicialmente se documentó la presencia de Ob-R en neuronas Kiss1, evidencias más recientes sugieren un modo de acción indirecto. En este sentido, se ha demostrado que (i) la ablación congénita de Ob-R en neuronas Kiss1 no afecta a la llegada de la pubertad<sup>167</sup>; (ii) sólo una pequeña proporción de neuronas Kiss1 expresan Ob-R en la edad adulta - de hecho, este

receptor no se detecta en las neuronas Kiss1 antes de la pubertad <sup>168</sup>; (iii) el neuropéptido  $\alpha$ -MSH participa en la mediación de las acciones de la leptina sobre las neuronas Kiss1 <sup>169</sup>; y (iv) el núcleo hipotalámico premamilar, en general, y las neuronas PACAP, (sintetizan el polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria) localizadas en dicha region, en particular, se han propuesto como mediadores relevantes de las acciones de GnRH sobre la liberación de GnRH a través de la modulación de las neuronas Kiss1 <sup>170,171</sup>.

Según estas observaciones, la leptina actuaría como una señal esencial en la integración funcional entre la magnitud de los depósitos energéticos del organismo y su capacidad para reproducirse <sup>153,154</sup>. No obstante, a pesar de la validez general de esta hipótesis, existen evidencias que apuntan a una posible acción inhibitoria de la leptina a nivel gonadal <sup>172</sup>. Así, se ha postulado un modo de acción bifásico de la leptina en el control de la reproducción. Según este modelo, un nivel mínimo umbral de leptina permitiría la completa maduración puberal y el correcto funcionamiento del eje reproductor, mientras que un nivel excesivo de ésta induciría el efecto contrario, mediado probablemente por su acción inhibitoria a nivel gonadal <sup>172</sup>.

**Insulina:** La insulina fue propuesta por Woods y cols. <sup>173</sup> como un regulador a largo plazo de la ingesta, el balance energético y la adiposidad corporal. Se trata de una señal de suficiencia energética y, por tanto, susceptible de participar en el control de la función reproductora. Su liberación por las células  $\beta$  del páncreas aumenta rápidamente tras la ingesta de alimentos, ejerciendo su efecto anorexigénico a través de acciones a diferentes niveles del SNC, al que accede atravesando la BHE de manera similar a la leptina <sup>174</sup>. A nivel hipotalámico, se han localizado receptores de insulina en núcleos relacionados con la regulación de la ingesta, tales como el ARC, el DMN y el PVN <sup>175</sup> También se ha demostrado la presencia de receptores de insulina en neuronas GnRH cultivadas in vitro <sup>176</sup>.

Entre las observaciones experimentales que sugieren la posible implicación de la insulina en el control de la secreción de GnRH/LH podemos destacar las siguientes:

- La secreción pulsátil de LH disminuye en estados insulino-deficientes (p. ej. ayuno y diabetes), mientras que la administración central de insulina revierte la deficiencia de LH derivada de estas condiciones <sup>177</sup>.

- Al igual que ocurre con la leptina, la falta del receptor de insulina en neuronas en ratones genéticamente modificados (ratones NIRKO) da lugar a un fallo reproductor asociado a una disminución de los niveles de GnRH/LH <sup>174</sup>.
- Por otra parte, también resulta destacable que el conjunto de déficits reproductores que se asocian a la patología diabética, tales como retraso puberal, ovulación reducida, infertilidad, alteraciones del ciclo estral, ausencia o disminución de la secreción pulsátil de GnRH/LH y fallos en el comportamiento sexual, pueden ser revertidos o mejorados mediante la administración de insulina <sup>177</sup>.

**Ghrelina:** La ghrelina es un péptido de 28 aminoácidos identificado en 1999 como el ligando endógeno del receptor de secretagogos de GH (GHS-R) <sup>178</sup>. Se expresa principalmente en estómago aunque, en humanos y roedores, se ha demostrado su expresión en otros tejidos como el hipotálamo y las gónadas <sup>178-181</sup>.

Los niveles circulantes de ghrelina se correlacionan inversamente con el índice de masa corporal, por lo que actúa como señal de insuficiencia energética. Además de su papel estimulador de la liberación de GH, una de las facetas fisiológicas más importantes de la ghrelina es su capacidad de estimular la ingesta de alimentos y adecuar la función reproductora al grado de reservas energéticas del organismo <sup>182,183</sup>.

En los últimos años, varios trabajos han sugerido que la ghrelina podría actuar, en ambos sexos, como un modulador de la actividad del eje HHG, aunque con un papel menos relevante que en el caso de la leptina, ya que los ratones deficientes para el gen que codifica esta hormona no presentan trastornos severos de la fertilidad <sup>184</sup>.

Varios experimentos realizados en roedores confirman esta hipótesis, demostrando que la administración central de ghrelina produce un retraso en la edad de llegada a la pubertad en la rata y una disminución de los niveles circulantes de LH <sup>185</sup>. En concordancia con estos datos, se ha demostrado que su administración crónica a ratas gestantes reduce significativamente el número de crías por embarazo <sup>186</sup>.

En cuanto a los efectos de la ghrelina a nivel gonadal, hay que destacar que, en machos, produce una inhibición de la esteroidogénesis testicular y de la proliferación de la células de Leydig <sup>187</sup>.

**Otros péptidos:** Aunque leptina, insulina y ghrelina son las señales metabólicas periféricas más destacables en el control de la función reproductora, existe una gran cantidad de péptidos implicados en el control de la ingesta y/o en el metabolismo energético que también participan en el control del eje HHG. Entre estas señales se encuentran las orexinas, implicadas en el control de la ingesta y la secreción de LH<sup>188</sup>. Adicionalmente, diversos péptidos producidos por el tejido adiposo, como la adiponectina o la resistina, forman parte de este entramado de señales metabólicas con posibles acciones de control de la función reproductora, si bien su interacción con el eje HHG no ha sido definida aun de forma exhaustiva<sup>189</sup>.

### 1.3 DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO

En mamíferos, la adquisición de la capacidad reproductora completa y del fenotipo masculino o femenino adulto a partir de la pubertad requiere de una serie concatenada de eventos que tienen lugar en diferentes etapas del desarrollo.

Esta serie de eventos se inicia con la diferenciación sexual cromosómica, que ocurre tras la unión del gameto femenino y masculino y da lugar a la determinación genética del sexo<sup>190</sup>. Esta diferenciación sexual determina la posterior diferenciación sexual gonadal en sentido masculino o femenino, que en humanos se produce antes de los tres primeros meses de desarrollo embrionario.

De esta forma, en el humano cromosómicamente diferenciado en sentido masculino, a partir de la 6ª-7ª semana post-fecundación se produce la diferenciación sexual de las gónadas indiferenciadas hacia testículos. En este sentido, se ha caracterizado un conjunto de factores de transcripción (SF-1, GATA-4, WT-1, entre otros) responsables de la expresión temprana del gen *SRY*, que a su vez permite la translocación al núcleo del factor SOX-9 y la expresión de otros factores determinantes en el testículo, responsables últimos de la diferenciación testicular. La diferenciación gonadal en sentido femenino ocurre a partir de la 10ª-12ª semana post-fecundación. Aunque inicialmente se pensaba que era una ruta defectiva activada en ausencia de *SRY*, actualmente se han identificado factores esenciales para la diferenciación ovárica, tales como WNT-4 y DAX-1<sup>191</sup>.

Una vez formadas, las gónadas inician la síntesis de esteroides gonadales. En el caso de los testículos, la síntesis de T se pone en marcha entre la 8<sup>a</sup>-9<sup>a</sup> semana post-fecundación y en el caso de los ovarios, la síntesis de E2 se inicia entre la 10<sup>a</sup>-12<sup>a</sup> semana.

Una vez definida la diferenciación gonadal, los siguientes eventos que tienen lugar en la diferenciación sexual son completamente dependientes de señales hormonales. Así, la secreción por el testículo fetal de T y hormona anti-Mülleriana (AMH) es responsable de la diferenciación en sentido masculino de los precursores indiferenciados, para dar lugar a los genitales internos y externos <sup>192</sup>, mientras que la ausencia de estas hormonas determina el desarrollo de genitales femeninos a partir de precursores sexualmente indiferenciados <sup>193</sup>. Del mismo modo, la diferenciación sexual de la unidad hipotálamo-hipofisaria (HH), responsable del control neuroendocrino de la reproducción y del comportamiento sexual, tiene lugar durante periodos tempranos (críticos) del desarrollo. En estos periodos, la acción de los esteroides sexuales gonadales va a determinar la diferenciación de la unidad HH en sentido masculino o femenino. Esto hace que la diferenciación sexual sea potencialmente sensible a la acción de compuestos exógenos con actividad endocrina, que pueden alterar el proceso de diferenciación sexual. El papel de estos compuestos, denominados comúnmente disruptores endocrinos, en la diferenciación del SNC y el desarrollo puberal se describirá con más detalle en la sección 1.8, dada su relevancia en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

En humanos, el SNC del feto permanece sexualmente indiferenciado hasta el 4<sup>º</sup> mes de desarrollo intrauterino. A partir de este momento y hasta el 7<sup>º</sup> mes de desarrollo, la acción de altos niveles de andrógenos y estrógenos (procedentes de la aromatización intraneuronal de la T producida por el testículo fetal) sobre las neuronas del POA, el ARC y el VMN inducirá su organización en sentido masculino. Este hecho determinará, una vez llegada la pubertad, la aparición de un patrón tónico de liberación de GnRH y gonadotropinas responsable de la producción continua de gametos fertilizantes por el testículo. Por tanto, la diferenciación de estos núcleos dotará al varón de una capacidad reproductora continua durante el periodo fértil.

Por otro lado, la acción de bajos niveles de estrógenos sobre las neuronas de los núcleos hipotalámicos antes indicados y sobre el AVPV, las diferenciará en sentido femenino, determinando, tras la llegada de la pubertad, la aparición de un patrón tónico y cíclico de liberación de GnRH y gonadotropinas, que será responsable de la liberación cíclica de gametos fertilizables por el ovario. Por tanto, la diferenciación sexual femenina de estos núcleos dotará a la mujer de una capacidad reproductora discontinua durante el periodo fértil.

Hay que destacar que los periodos críticos de diferenciación sexual del SNC no abarcan la misma ventana de desarrollo en distintas especies, existiendo importantes diferencias en cuanto a su extensión y finalización. En ratas, este periodo crítico de diferenciación sexual se extiende desde el día embrionario 17.5 hasta el día 10 después del nacimiento<sup>194</sup>. En base a esto, la rata constituye un modelo experimental idóneo para el estudio de la diferenciación sexual del SNC, dada la facilidad para poder modificar la organización y función de la unidad HH mediante la manipulación del ambiente esteroideo neonatal incluso durante el periodo postnatal temprano.

## 1.4 PUBERTAD

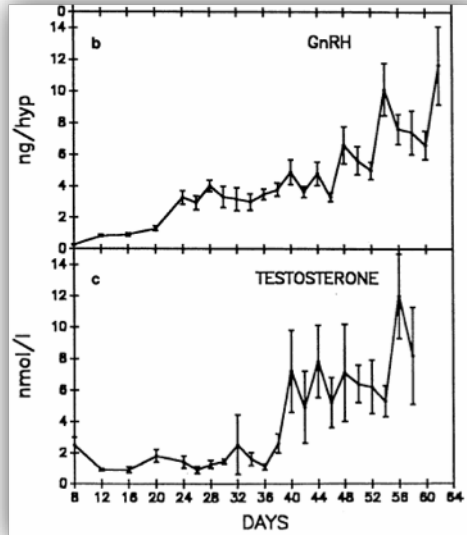
La pubertad se define como el periodo de transición entre la etapa juvenil y la etapa adulta, durante el cual se alcanza la capacidad reproductora. A lo largo de este periodo aparecen los caracteres sexuales secundarios, se produce un marcado crecimiento de la talla corporal, las gónadas empiezan a producir gametos maduros (espermatozoides u ovocitos) capaces de la fertilización y, en humanos, tienen lugar grandes cambios psicológicos y comportamentales<sup>4</sup>.

El desarrollo puberal depende de una secuencia de procesos madurativos que incluyen estados de activación/desactivación del eje HHG y que comienzan durante el periodo fetal. En humanos, hacia la mitad de la gestación, el GnRH comienza a ser liberado de forma pulsátil y se encuentran niveles circulantes de esteroides gonadales prácticamente similares a los que se encuentran durante la edad adulta<sup>195-197</sup>. Debido al aumento en la liberación de T en esta fase del desarrollo, los niveles de gonadotropinas en sangre son más bajos en el sexo masculino que en el femenino. Conforme van elevándose los niveles de esteroides placentarios, estos ejercen un mayor feedback negativo sobre la liberación de GnRH, por lo que son responsables de

la disminución progresiva de los niveles de LH y FSH en el feto, que se mantendrán bajos hasta el final de la gestación.

Tras el nacimiento, la ausencia de esteroides de origen placentario provoca en el neonato una disminución del feedback negativo y con ello el aumento de la liberación de gonadotropinas, que dan lugar al aumento de T en el niño y de E2 en la niña <sup>198-200</sup>. Los niveles de gonadotropinas disminuyen muy significativamente a partir del 6º ó 7º mes de vida tras el nacimiento en el varón y de 1 a 2 años en la niña, manteniéndose así hasta la pubertad.

Es destacable que, a diferencia de otras especies animales con periodos de vida mayores, en la rata el periodo de quiescencia del sistema GnRH no es tan acusado durante la etapa infantil/juvenil. Así, el periodo de activación fetal/neonatal de las neuronas GnRH es seguido de un descenso notable en la etapa neonatal. A continuación, los niveles de gonadotropinas aumentan progresivamente hasta alcanzar la activación puberal del eje HHG, lo que se traduce en un incremento progresivo de los niveles de esteroides gonadales (*Figura 10*) <sup>201-203</sup>.



**Figura 10:** Contenido hipotalámico de GnRH y niveles de T en suero durante el desarrollo post-natal en la rata macho <sup>25</sup>.

En el periodo prepuberal tardío, la unidad HH se reactiva a través de un proceso que implica la activación de un patrón pulsátil de liberación de GnRH <sup>204</sup>. En este sentido, diversos mecanismos (no necesariamente excluyentes) han sido formulados para explicar este fenómeno. Éstos incluyen: (i) un descenso en la sensibilidad



hipotalámica al feedback negativo de los esteroides sexuales –hipótesis del gonadostato-<sup>205</sup>; y (ii) una disminución de la inhibición del generador de pulsos de GnRH durante el periodo prepuberal en combinación con un aumento de señales excitatorias centrales que proyectan sobre el sistema GnRH a través de circuitos transinápticos y gliales –hipótesis central-<sup>206</sup>.

Diversas evidencias experimentales indican que la modificación en el balance entre inputs excitadores e inhibidores sobre las neuronas GnRH es un evento crucial en la activación del eje gonadotropo en la pubertad. Una parte relevante del control excitatorio de la pubertad proviene de las neuronas que sintetizan glutamato, kisspeptinas y NKB, mientras que el circuito inhibitor responsable del control de la pubertad depende en gran medida de las neuronas que producen GABA, péptidos opioides endógenos y péptidos RF-amida. Además de los inputs neuronales, las células gliales, como los astrocitos, participan en la regulación de las neuronas GnRH a través de dos mecanismos: (i) la liberación de factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas, y (ii) cambios plásticos en los contactos que establecen las células gliales con las neuronas GnRH<sup>206</sup>. El elemento efector final de esta cascada de señales centrales es GnRH. Así, la activación de la liberación de GnRH durante la pubertad determina un incremento de sus acciones sobre las células gonadotropas de la hipófisis anterior, produciendo en primer lugar una regulación positiva de su propio receptor, lo que aumenta la síntesis, almacenamiento y secreción de ambas gonadotropinas. A continuación, ocurre un aumento en la expresión de los receptores LHR y FSHR en las gónadas, que resulta a su vez en un incremento en la producción y secreción de hormonas gonadales. El aumento de los niveles circulantes en plasma de estas hormonas inducen el desarrollo progresivo de los caracteres sexuales secundarios, refuerzan el feedback negativo de los estrógenos sobre la unidad HH y establecen el feedback positivo sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas responsable de la ovulación.

Dada la relevancia de las kisspeptinas, las taquiquininas y, dentro de éstas, la NKB, en el control central de la reproducción y el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, los contenidos relacionados con estos neuropéptidos serán desarrollados en detalle en las secciones 1.5, 1.6 y 1.7, respectivamente.

## 1.5 SISTEMA KISS1/GPR54

La identificación del sistema KISS1/GPR54 como un elemento crucial en el control central del eje HHG ha revolucionado de una manera extraordinaria el conocimiento sobre los mecanismos neuroendocrinos implicados en la regulación de la función reproductora. A continuación detallaremos las características más relevantes de este sistema.

### 1.5.1 Antecedentes históricos

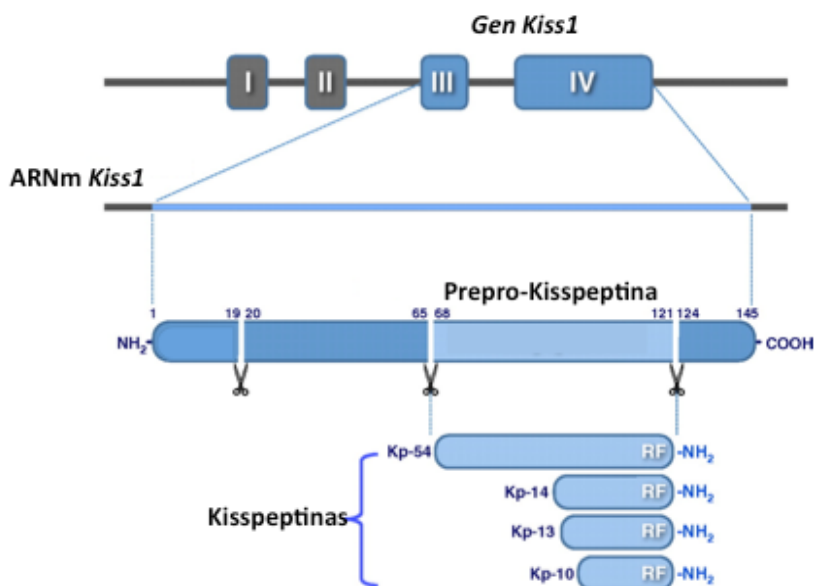
El sistema KISS1/GPR54 es un sistema ligando (KISS1)/receptor (GPR54), inicialmente identificado en el área de la biología del cáncer. Por un lado, en 1996, se identificó, mediante técnicas de hibridación substractiva, el gen *KISS1* como un gen supresor de metástasis en líneas celulares de melanoma con distinta capacidad invasiva<sup>207,208</sup>, de ahí que al producto derivado de la expresión del gen se le denominara inicialmente metastina. De forma independiente, en 1999, el gen *Gpr54* fue aislado y clonado del cerebro de rata, identificándose en principio como un receptor huérfano asociado a proteínas G, con una homología de más del 40% con el receptor de galanina, pero que no era activado por este péptido<sup>209</sup>. Finalmente, en 2001, tres grupos independientes vincularon funcionalmente al gen *Kiss1* y a la metastina con el receptor *Gpr54*, definiendo el denominado sistema KISS1/GPR54<sup>210-212</sup>.

A pesar de estos descubrimientos, no fue hasta finales del año 2003 cuando aparecieron los primeros datos experimentales que apuntaron la estrecha asociación entre el sistema KISS1/GPR54 y el control de la función reproductora. En ese momento, se identificaron diversas deleciones y mutaciones inactivantes del gen *GPR54* en pacientes con formas familiares (y esporádicas) de hipogonadismo hipogonadotropo idiopático (HHI)<sup>213,214</sup>. Estos resultados fueron confirmados posteriormente en ratones manipulados genéticamente a los que se les inactivó el gen *Gpr54* o *Kiss1*, y en humanos con mutaciones inactivantes de *KISS1*; resultados que demostraron de forma concluyente en ambas especies el papel crucial de este sistema entre los mecanismos de regulación del eje gonadotrópico y documentaron su alto grado de conservación en mamíferos superiores.

El análisis combinado de los modelos humano y murino de inactivación de *GPR54/Gpr54* reveló una profunda hipoplasia de los genitales internos y externos, así como muy bajos niveles circulantes de esteroides sexuales y gonadotropinas<sup>215,216</sup>. Sin embargo, la respuesta hipofisaria a GnRH estaba conservada y presentaban niveles normales de este neuropéptido a nivel hipotalámico, sugiriendo la existencia de un fallo primario en los sistemas controladores de la secreción de GnRH en el hipotálamo y apuntando a un papel crucial, previamente insospechado, del sistema *KISS1/GPR54* en la regulación central del eje reproductor.

### 1.5.2 Elementos principales: *KISS1*, kisspeptinas y *GPR54*

Las kisspeptinas (Kp) derivan del procesamiento proteolítico de un precursor común denominado pre-prokisspeptina, que va a generar a la Kp-54 o metastina, formada por 54 aminoácidos y que es considerada el principal producto del gen *Kiss1*<sup>210</sup>. A partir del procesamiento proteolítico de la Kp-54 se generan otras Kp de menor tamaño y que por el número de aminoácidos que contienen reciben el nombre de Kp-14, Kp-13 y Kp-10<sup>212</sup>. Estos péptidos comparten una secuencia de aminoácidos en el extremo carboxiterminal que presenta un motivo Arg-Phe-NH<sub>2</sub> propio de los péptidos de la familia RFamida, y que es necesario para la activación de su receptor, *Gpr54*, también denominado Kp-R<sup>210</sup> (Figura 11).



**Figura 11.** Representación esquemática de las diferentes kisspeptinas generadas tras el procesamiento proteolítico del precursor común pre-prokisspeptina. Tomado de<sup>6</sup>.

### 1.5.3 Expresión del Sistema KISS1/GPR54

La distribución del sistema KISS1/GPR54 ha sido estudiada en una gran diversidad de especies y, aunque su localización y patrones de expresión pueden variar entre ellas, ésta se encuentra íntimamente relacionada con los centros neuroendocrinos reguladores de la función reproductora.

Los primeros estudios en humanos indicaban la presencia del ARNm de *KISS1* en placenta, páncreas, intestino delgado, hígado, testículo y en distintas áreas del SNC, con una expresión destacada en los ganglios de la base y el hipotálamo <sup>208,210,211</sup>. La expresión de *Kiss1* en el hipotálamo ha sido demostrada igualmente en otras especies de mamíferos, incluidos los primates no humanos <sup>129,217-220</sup>. Conviene destacar que, independientemente del sexo, la expresión de *Kiss1* en el hipotálamo va incrementándose progresivamente desde el nacimiento hasta alcanzar sus niveles más altos con la llegada de la pubertad, tanto en roedores como en primates.

En roedores, estudios neuroanatómicos han analizado de manera más precisa la distribución de las neuronas kisspeptidérgicas en el hipotálamo, demostrándose la existencia de dos poblaciones neuronales en las cuales la expresión de kisspeptinas es especialmente prominente, una ubicada en el núcleo ARC y otra en la zona más rostral del tercer ventrículo (RP3V), que incluye a los núcleos AVPV y periventricular (PeVN) <sup>72,76,218,219,221</sup>.

En cuanto a la población de neuronas Kiss1 localizadas en RP3V, hay que destacar que muestran un claro dimorfismo sexual, ya que son mucho más numerosas en hembras que en machos <sup>127,222</sup>. En relación a las neuronas kisspeptidérgicas del núcleo ARC conviene destacar que se ha identificado una subpoblación que, además de Kp, coexpresa, otros neuropéptidos, tales como NKB y Dyn, así como sus correspondientes receptores, NK3R y el KOR. En base a esto, estas neuronas han recibido el nombre de neuronas KNDy <sup>223,224</sup>. Esta caracterización será tratada en profundidad en la *sección 1.6.5* de esta Introducción.

Por otro lado, conviene destacar que recientemente se ha demostrado la existencia de una tercera población de neuronas Kiss1 en la amígdala <sup>225</sup>. Si bien la relevancia de esta población en el control de la función reproductora aún no se ha caracterizado en detalle, evidencias muy recientes sugieren que una subpoblación de

estas neuronas, concretamente la localizada en la amígdala medial, podría mediar la estimulación de LH inducida por feromonas, al menos en ratones macho<sup>226</sup>.

En cuanto el receptor de Kp, numerosos datos indican que presenta una distribución similar a la descrita para *Kiss1*. Así, se localiza principalmente en placenta, páncreas, hígado, músculo esquelético, gónadas, hipófisis, y en distintas áreas del SNC como la corteza cerebral, el cerebelo, el putamen, el tálamo, la médula espinal y el hipotálamo<sup>129,217-220,227</sup>.

En contraste con la detallada caracterización del patrón de expresión de *Kiss1* en el hipotálamo, la distribución de *Gpr54* ha permanecido mal definida durante años, lo que podría ser debido a la falta de un buen anticuerpo contra el mismo. En cualquier caso, mediante estudios de hibridación *in situ* (ISH) se ha demostrado la expresión de *Gpr54* en el hipotálamo, específicamente en neuronas GnRH, y en otras áreas más relacionadas con la corteza cerebral, como el hipocampo<sup>228</sup>. La relevancia funcional de la expresión de *Gpr54* en el hipocampo no está bien caracterizada pero, en estas regiones, las Kp parecen estar involucradas en la modulación de la transmisión sináptica<sup>229</sup>.

En ratas macho y hembra, al igual que ocurre con la expresión de *Kiss1*, la expresión de *Gpr54* va incrementándose progresivamente en el hipotálamo desde el nacimiento hasta la llegada de la pubertad<sup>65</sup>.

#### **1.5.4 Papel de las neuronas *Kiss1* en el control de la secreción de gonadotropinas**

Un año después de la descripción del cuadro de HH en pacientes con alteraciones del gen que codifica para GPR54 y del estudio con ratones mutantes para este gen, cuatro trabajos de investigación independientes demostraron el potente efecto estimulador de la Kp-10 y la metastina sobre la secreción de LH en roedores de ambos sexos<sup>63-66</sup>. Estudios posteriores confirmaron y ampliaron estos conocimientos a otras especies como oveja, mono y humano indicando que la administración, tanto icv como periférica, de Kp induce una potente secreción de LH y FSH en diferentes etapas del desarrollo y diferentes estados fisiológicos, como el embarazo y la lactancia<sup>63,66,230-</sup>

<sup>236</sup>. De hecho, hoy día se admite que las Kp son, junto a GnRH, los más potentes estimuladores de la liberación de gonadotropinas que se han descrito hasta la fecha.

Así, en estudios en ratas macho, se detecta una rápida respuesta (entre 5 a 15 min) y un efecto muy potente en la secreción de LH tras la administración central de Kp-10 (un aumento de hasta 10 veces sobre los niveles basales). En cambio, la secreción de FSH se incrementa solo a partir de los 30 min tras la administración del péptido y el aumento que se produce es de aproximadamente 2 veces respecto a la basal <sup>231</sup>. Esto podría estar justificado por el hecho de que la secreción de FSH es más constitutiva que la de LH <sup>237</sup> y que la secreción de FSH está regulada, de forma selectiva, por péptidos gonadales, como las inhibinas <sup>238</sup>.

Asimismo, la respuesta de gonadotropinas a las Kp difiere en cuanto a duración y sensibilidad, según se administre a nivel central o periférico. Estudios llevados a cabo en rata demostraron un incremento rápido y prolongado (>3-h) de LH después de la administración central y periférica de Kp-10 <sup>232,239</sup>. También conviene resaltar el rango de sensibilidad a Kp en términos de secreción de gonadotropinas, con dosis mínimas efectivas de 100 fmol/1pmol para la administración central y 0.5 µg/kg para la administración periférica <sup>63,231,232,235,239</sup>, si bien la duración de la respuesta en este último caso es menor.

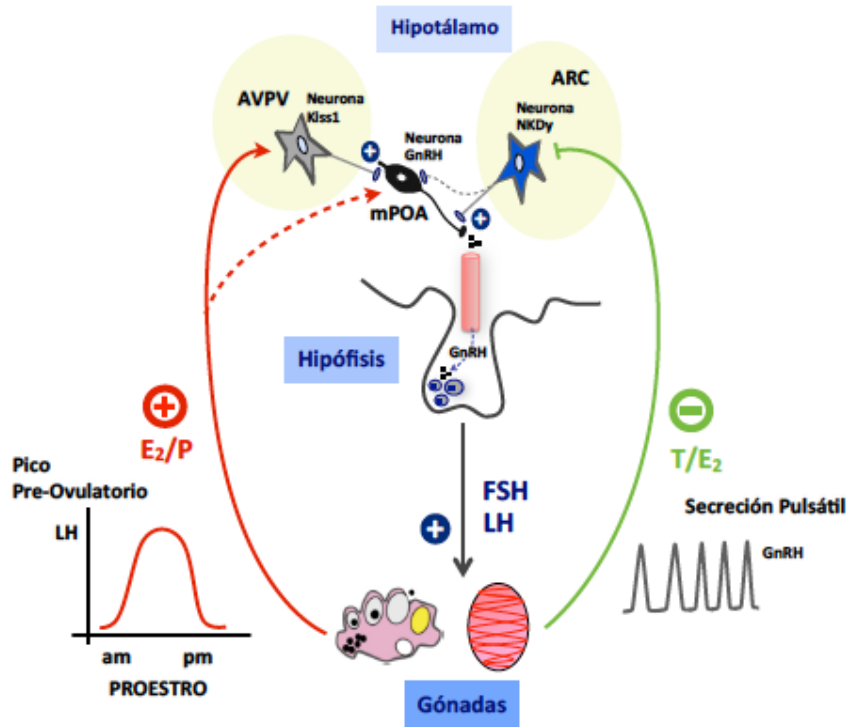
Otro aspecto relevante de la farmacología de las Kp es la desensibilización de la respuesta de gonadotropinas tras la exposición mantenida a análogos de este neuropéptido. Así, la infusión continua de Kp en ratas, tras una primera fase de hipersecreción de LH, cursa con una falta de respuesta de LH a las 48 horas de iniciarse la administración <sup>240-242</sup>.

Tras conocerse el potente efecto que ejercen las Kp sobre la liberación de gonadotropinas, varios estudios se dirigieron a determinar su principal sitio de acción. Actualmente, se sabe que las Kp llevan a cabo su acción estimuladora de LH y FSH fundamentalmente a través de la activación directa de las neuronas GnRH. Esta vía de acción fue sugerida inicialmente en roedores y monos, tras documentarse que la administración de antagonistas de GnRH bloqueaba el efecto estimulador de las Kp sobre la liberación de gonadotropinas <sup>63,64,231,232,243</sup>. Este modo de acción directo fue confirmado posteriormente por varios estudios llevados a cabo en roedores, en los

que se demostró que las Kp eran capaces de inducir la expresión de c-fos en neuronas GnRH<sup>64,236</sup>, así como su despolarización<sup>230,244</sup>. Una evidencia más de la acción directa de las Kp sobre GnRH son los estudios realizados sobre la línea neuronal GT1-7, que responde a la administración de Kp con un aumento de liberación de GnRH<sup>244,245</sup>.

Los estudios de caracterización del papel de las dos principales poblaciones neuronales de Kisspeptina, RP3V y ARC, en el control de la secreción de gonadotropinas, evidencian que éstas podrían desempeñar funciones diferentes. Mientras que las neuronas kisspeptidérgicas del RP3V responden a los esteroides gonadales con un incremento en la síntesis de kisspeptina, las neuronas kisspeptidérgicas del núcleo ARC ven reducida la expresión de este neuropéptido ante la presencia de esteroides gonadales. Estas y otras observaciones sugieren que las neuronas kisspeptina del RP3V podrían estar implicadas en la generación del pico preovulatorio de gonadotropinas, mientras que las neuronas kisspeptina del núcleo ARC mediarían el efecto inhibitor de los esteroides gonadales sobre la secreción de gonadotropinas y serían responsables de su secreción pulsátil. En cuanto al modo de acción de estas poblaciones neuronales sobre las neuronas GnRH, se ha demostrado que las neuronas kisspeptina del RP3V proyectan preferencialmente hacia los somas de las neuronas GnRH, mientras que las neuronas kisspeptina del ARC proyectan hacia el dendrón distal de dichas neuronas (el dendrón es una región de la neurona que puede funcionar simultáneamente como axón y como dendrita)<sup>246</sup>.

Hay que destacar que, prácticamente, en todas las neuronas kisspeptidérgicas del núcleo ARC, se expresan AR, PRA y B y ER $\alpha$ <sup>247</sup>, mientras que solo una minoría expresa ER $\beta$ <sup>129</sup>. Este último dato sugiere la importancia del ER $\alpha$  en el control por retroalimentación negativa de los E2 sobre la liberación de GnRH/gonadotropinas. Análisis comparativos han demostrado que el control que ejerce la T sobre la expresión de *Kiss1* en el núcleo ARC es mediado a través del AR y el ER $\alpha$ , tras la aromatización de la T a E2<sup>129</sup> (Figura 12). En el caso de las neuronas Kiss1 del RP3V destaca la presencia de ER $\alpha$  y, en un 50%, de PR<sup>219</sup>.



**Figura 12:** Representación esquemática de los efectos reguladores de los esteroides gonadales (T, E2 y PG), sobre la transcripción del gen Kiss1. Se ha propuesto a la población de neuronas KNDy del ARC como mediador de los efectos por retroalimentación negativa de la T y el E2 y como reguladora de la secreción pulsátil de GnRH; en cambio, los efectos estimuladores de los E2 sobre el pico preovulatorio estarían mediados por la población neuronal Kiss1 del AVPV. Tomado de <sup>248</sup>, con modificaciones.

## 1.6 TAQUIQUININAS

En el año 1931, durante su estancia de postgrado en Inglaterra, Ulf Von Euler y el farmacólogo británico John Henry Gaddum encontraron un nuevo agente, extraído de intestino de caballo, que era capaz de provocar vasodilatación y contracción muscular en conejos. Cinco años más tarde se constató que aquel había sido el descubrimiento de la primera taquiquinina (TK) en mamíferos, a la que se le dio el nombre de Sustancia P (SP) <sup>249</sup>. Sin embargo, hubo que esperar unos cuarenta años hasta lograr la purificación y caracterización química de la SP <sup>250</sup> y no fue hasta la década de los ochenta cuando se descubrieron otras TKs, como la neuroquinina A (NKA) y NKB <sup>251-253</sup>.



En las últimas décadas, el interés de la comunidad científica por caracterizar esta nueva familia de péptidos ha posibilitado el descubrimiento de nuevos miembros de esta familia y su implicación en diferentes funciones fisiológicas y en el desarrollo de numerosas patologías.

### 1.6.1 Estructura génica y peptídica de las Taquiquinas

Las TKs, llamadas así por su rápido efecto espasmogénico sobre el musculo intestinal (al contrario de la acción lenta que promueven las bradiquininas), son una familia de péptidos relacionados estructuralmente y conservados a lo largo de la evolución.

Por definición, las TKs comparten una región hidrofóbica C-terminal conservada: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, donde X es Phe o Val y la metionina final está amidada <sup>254</sup> (Tabla 1). Esta zona hidrofóbica del péptido es determinante en la activación de los receptores taquiquinérgicos <sup>255,256</sup>, mientras que en el extremo N-terminal, las TKs poseen regiones divergentes e hidrofílicas que parecen estar implicadas en la especificidad hacia un determinado receptor <sup>257</sup>.

En humanos, todas las TKs están codificadas por tres genes: *TAC1*, *TAC3*, y el más recientemente descubierto *TAC4*. En cada uno de estos genes, la ARN polimerasa II origina un transcrito primario de ARNm que posteriormente será sometido a modificaciones postranscripcionales dando lugar a los transcritos maduros, más cortos y con distintas combinaciones de los exones originales <sup>258,259</sup>.

La traducción del ARNm maduro, generará un polipéptido llamado pre-propéptido, que contiene un péptido señal, una o varias copias de neuropéptido, y una o varias partes espaciadoras. El péptido señal permite la unión e introducción del precursor en el retículo endoplasmático para, posteriormente, ser eliminado, generándose el propéptido. Éste, a su vez, es transportado al aparato de Golgi, donde los espaciadores son eliminados <sup>259</sup>.

| Taquiquininas | Secuencia de los péptidos                          |
|---------------|--|
| <i>TAC1</i>   |  |
| SP            | RPKPQQFFGLM-NH2                                    |
| NKA           | HKTDSFVGLM-NH2                                     |
| NPK           | DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKTDSFVGLM-NH2           |
| NPI           | DAGHGQISHKRHKTDSFVGLM-NH2                          |
| NKA (3–10)    | TDSFVGLM-NH2                                       |
| <i>TAC3</i>   |  |
| NKB           | DMHDFVGLM-NH2                                      |
| NKB (50-91)   | LYDSRSISLEGLLKVLSKASVGPKETS LPQKRDMHDFVGLM-NH2     |
| <i>TAC4</i>   |  |
| Humano        |  |
| EKA           | DGGEEQTLSTEAEWVIVALEEGAGPSIQLQLQEVKTGKASQFFGLM-NH2 |
| EKB           | DGGEEQTLSTEAEWEGAGPSIQLQLQEVKTGKASQFFGLM-NH2       |
| EKA/B         | GKASQFFGLM-NH2                                     |
| hHK-1         | TGKASQFFGLM-NH2                                    |
| hHK-1 (4-11)  | ASQFFGLM-NH2 EKC KKAYQLEHTFQGLL-NH2                |
| EKD           | VGAYQLEHTFQGLL-NH2                                 |
| Conejo        |  |
| EK-1          | GKASQFFGLM-NH2                                     |
| EK-2          | 2VRGYQMGQRGLL-NH2                                  |
| Ratón/rata    |  |
| HK-1          | SRTRQFYGLM-NH2                                     |

**Tabla 1.** Secuencia de aminoácidos de las diferentes TKs en mamíferos, codificadas por los genes *TAC1*, *TAC3* y *TAC4*. Modificado de <sup>259</sup>.

Generalmente, el precursor peptídico de las TKs presenta dos dianas de corte dibásicas que flanquean la secuencia peptídica final. Sobre ellas actúan convertasas de prohormonas, que la cortan en el extremo amino-terminal y carboxipeptidasas, que eliminan los residuos dibásicos C-terminales. Finalmente, una peptidilglicina  $\alpha$ -amidante convierte la glicina expuesta en una amida C-terminal <sup>260-262</sup>. Tras el procesamiento postranscripcional y postraducciona se obtiene la secuencia definitiva, que se presenta en la mayoría de los casos como decapeptido o undecapeptido (*Tabla*

1), aunque también se pueden encontrar formas más cortas, resultado de la degradación enzimática por enzimas endógenas, como la neutral endopeptidasa (NEP)<sup>263,264</sup>.

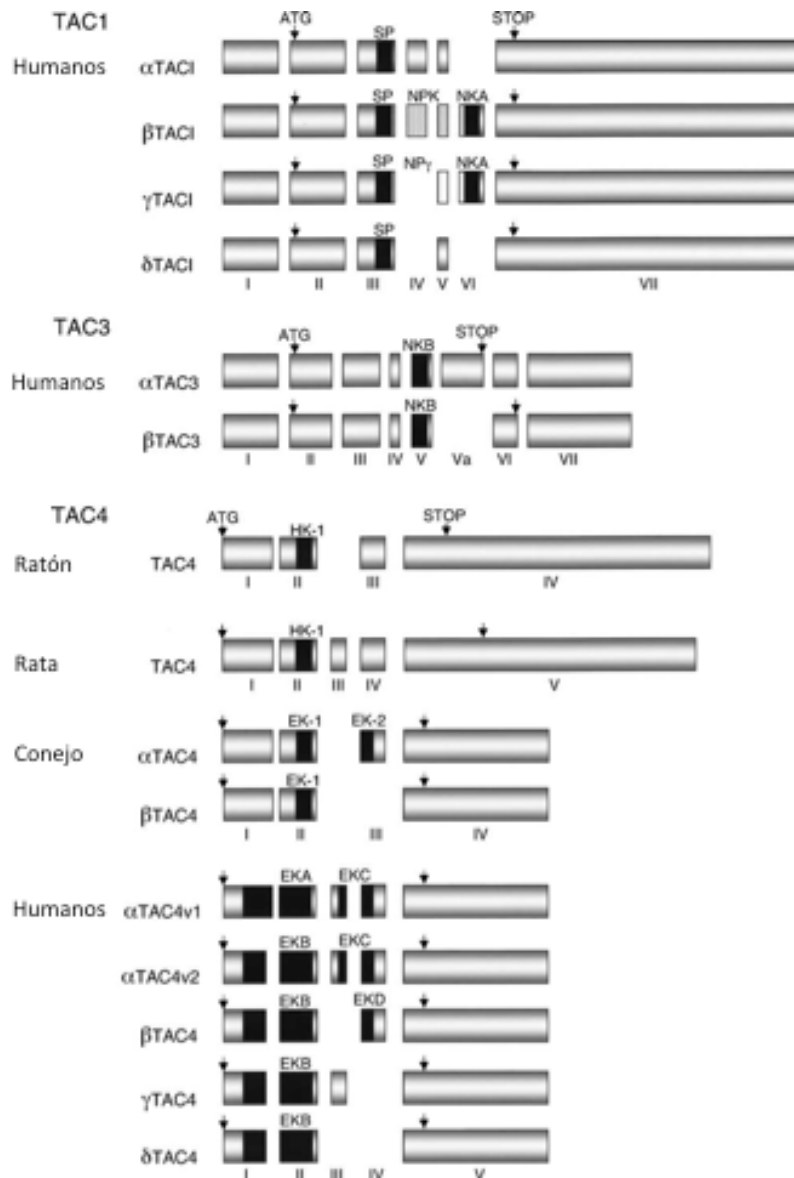
**TAC1** es el gen a partir del cual se generan la SP, la NKA, y los neuropéptidos K y  $\gamma$  (NPK y NP $\gamma$ )<sup>253,265</sup>. En humanos y ratas, este gen presenta siete exones, mientras que en ratones presenta seis. Además, para este gen existen cuatro isoformas en humanos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Figura 13). Así, mientras el ARNm de  $\beta$  **TAC1** conserva todos los exones, el transcrito  $\alpha$  carece del exón VI, el transcrito  $\gamma$  del exón IV, y el transcrito  $\delta$  no presenta ni el exón IV ni el VI.

Respecto a la forma molecular que codifica **TAC1**, se ha demostrado que la SP está contenida en el exón III, la NKA en el exón VI, el NP $\gamma$  en los exones III, V y VI, y el NPK en los exones III, IV, V, y VI<sup>254,259,266</sup>. De ello se puede deducir, por ejemplo, que cualquiera de los transcritos es capaz de producir SP, mientras que NKA sólo puede ser codificado por las isoformas  $\beta$  y  $\gamma$ . Por tanto, la distribución cuantitativa de SP y NKA va a depender del procesamiento alternativo de los pre-ARNm de **TAC1**. Se ha propuesto un posible modelo de regulación de este procesamiento de **TAC1** en células estromales de la médula ósea, en el que la ratio SP:NKA estaría regulada por mecanismos que involucran tanto microARNs como proteínas de unión al ARN<sup>267</sup>.

El gen **TAC3** codifica exclusivamente para la NKB<sup>254,268</sup>. El homólogo de este gen en rata y ratón (denominado *Tac2* en la bibliografía) presenta 7 exones. En humanos también se han descrito 7 exones para **TAC3**, aunque nuevas evidencias han identificado un exón adicional entre los exones V y VI, al que se llamó V-a, y otros dos no-codificantes entre los exones VI y VII, a los que se les dio el nombre de VI-a y VI-b (Figura 13). La secuencia que codifica NKB está localizada en el exón V<sup>259,266</sup>.

El gen **TAC4** se descubrió en ratones y codifica para una TK denominada Hemoquinina 1 (HK-1), debido a su clara expresión en médula ósea y su implicación en la maduración de células B en esta especie<sup>269,270</sup>. En humanos, este gen presenta una pequeña diferencia en su secuencia con respecto a los otros dos genes de TKs, ya que carece del punto de corte dibásico típico en el extremo N-terminal, por lo que se ha sugerido una diana monobásica como lugar de corte<sup>269</sup>, a partir de la cual se

generarían dos posibles péptidos: HK-1 y una isoforma de HK-1 que comprendería desde los aminoácidos 4 al 11.



**Figura 13:** Representación de los diferentes genes que codifican las TKs con sus respectivas isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , donde se representan las regiones correspondientes a los principales productos codificados: SP, NKA, NKB, HK-1 y las diferentes EKs. Tomado de <sup>259</sup>.

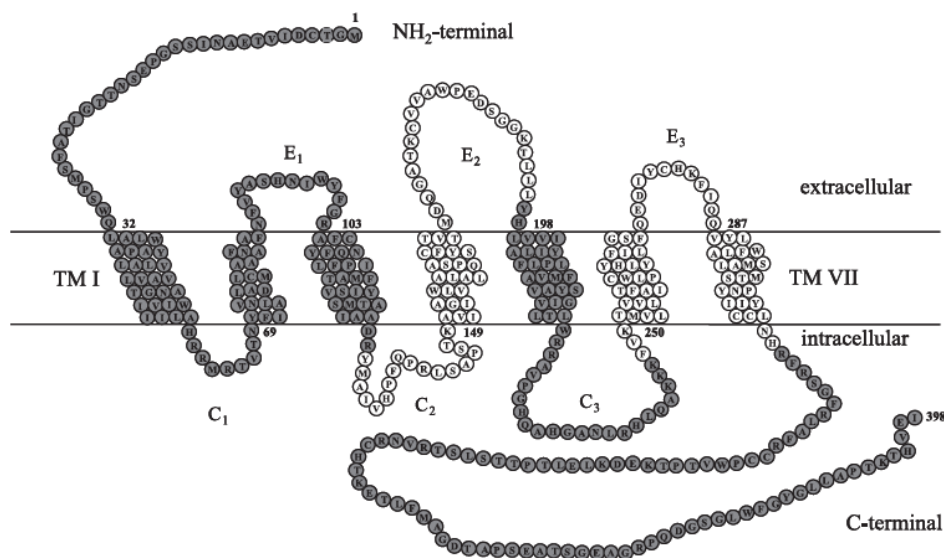
En el año 2003, Page y cols, demostraron que el gen *TAC4* estaba formado por cinco exones en humanos. El splicing alternativo de *TAC4* da lugar a cuatro posibles transcritos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Figura 13). La traducción de éstos transcritos y la acción posterior de enzimas convertasas/peptidasas genera la HK-1, codificada por el exón II y presente en todas los transcritos. Adicionalmente, pueden generarse 2 variantes, consideradas como formas extendidas de la HK-1, denominadas endoquininas A (EKA)

y B (EKB), que sí presentarían puntos de corte dibásicos<sup>261,271</sup>. Además, también se han descrito dos nuevas endoquininas procedentes de *TAC4*, EKC y EKD, las cuales poseen un motivo consenso distinto a las TKs tradicionales, FQGLL-NH<sub>2</sub>, y son codificadas por las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ . Sin embargo, su actividad biológica es desconocida y discutida por la comunidad científica<sup>261,271,272</sup>.

La actividad biológica de las TKs clásicas SP, NKA y NKB ha sido ampliamente estudiada, y está mediada, en la mayoría de los casos, por la unión de éstos péptidos a sus receptores: los receptores taquiquinérgicos.

### 1.6.2 Receptores Taquiquinérgicos

Los receptores de las TKs pertenecen a la familia 1 (rodopsina-like) de receptores de membrana asociados a proteína G (GPCRs)<sup>273</sup> (Figura 14).

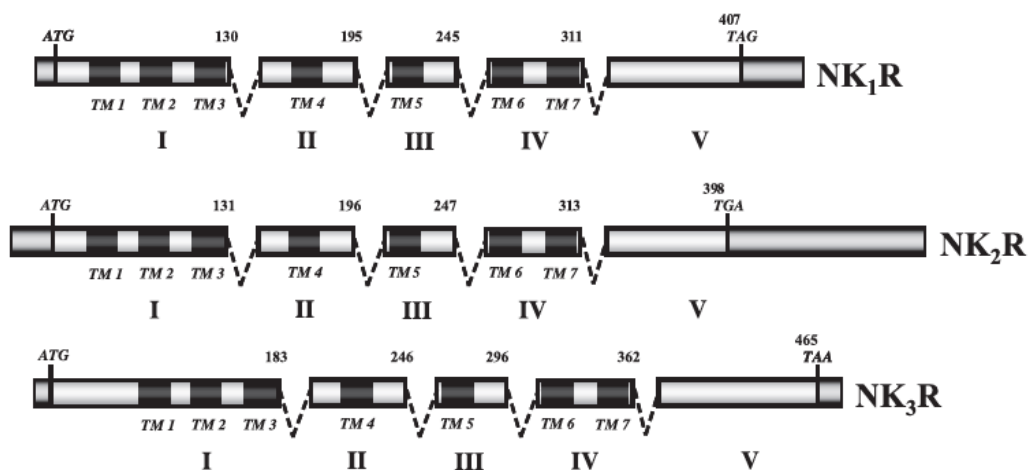


**Figura 14:** Representación gráfica de la estructura de un receptor taquiquinérgico. En concreto, en el dibujo se muestran los dominios transmembrana y los lazos extracelulares e intracelulares del receptor de Neuroquinina A, NK2R. Tomado de<sup>258</sup>.

Estos receptores se caracterizan por compartir la misma estructura, que incluye siete dominios transmembrana (TM I-VII), con tres lazos en la cara extracelular (E 1-3) y otros tres en la cara intracelular (C 1-3), un terminal amino en el exterior, y un terminal carboxilo en el lado citosólico<sup>274</sup> (Figura 14).

Hasta la fecha, se han descrito tres receptores taquiquinérgicos, denominados receptores de Neuroquinina 1, 2 y 3 (NK1R, NK2R y NK3R)<sup>255,273,275,276</sup>. En humanos, la longitud de su secuencia varía entre los distintos receptores, siendo de 407 nucleótidos en NK1R, de 398 en NK2R y de 465 en NK3R<sup>277-279</sup> (Figura 15). Las TKs pueden interactuar indistintamente con cualquiera de los tres receptores taquiquinérgicos, aunque las mayores afinidades se observan entre NK1R y SP, NK2R y NKA, y NK3R y NKB<sup>254</sup>.

Los genes que codifican estos receptores son *Tac1r*, *Tac2r* y *Tac3r*, respectivamente. Cabe destacar el origen monofilético de estos genes como un aspecto evolutivo interesante. Artrópodos, nematodos, urocordados y vertebrados apenas presentan diferencias en la secuencia nucleotídica, observándose este grado de conservación incluso en la posición de los intrones. Además, estos genes presentan una estructura similar entre ellos, distinguiéndose en cada uno de ellos cinco exones<sup>254</sup> (Figura 15). El exón I codifica los dominios transmembrana (TM) I-III, C1 y E1, el exón II contiene la secuencia para TM IV, C2, y E2, el exón III contiene TM V y C3, el exón IV codifica TM VI, TM VII y E3, mientras que el exón V contiene el extremo C-terminal citoplasmático<sup>254</sup>.



**Figura 15:** Esquema de la organización de los genes que codifican los tres receptores taquiquinérgicos, NK1, NK2 y NK3, mostrando la ubicación de las secuencias correspondientes a cada dominio transmembrana (TM). Tomado de<sup>258</sup>.

Los genes codificantes de los receptores taquiquinérgicos presentan intrones, siendo esta una característica poco habitual dentro de la familia de los GPCRs<sup>280</sup>. Precisamente esta característica permite la formación de diferentes variantes del ARNm, que podrían desempeñar funciones importantes tanto en su localización, en el tráfico intracelular y en su señalización. En este sentido, varios estudios indican la existencia de una isoforma del receptor NK1, que difiere en la longitud del extremo C-terminal y que desempeña un importante papel tanto en la modulación de la respuesta inmune como en la transformación oncogénica<sup>281,282</sup>. Para NK2R, también se ha descubierto una nueva variante que se origina por splicing alternativo y que se denomina NK2R-β. Sin embargo, se desconoce si esta variante da lugar a una proteína funcional<sup>283</sup>.

Al igual que en el resto de GPCRs, los mecanismos de señalización intracelular desencadenados por la unión de las TKs a sus receptores son complejos. Se ha demostrado que los receptores taquiquinérgicos son capaces de inducir respuestas mediadas por calcio ( $Ca^{2+}$ ) o por adenosín monofosfato cíclico (AMPC)<sup>284-286</sup>. La proteína G responsable de la ruta de señalización que implica un aumento en las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  es la proteína  $G_{\alpha q}$ , mientras que la proteína  $G_{\alpha s}$  es la que activa a las adenilato ciclasas responsables de la formación de AMPC<sup>284</sup>. Además, se ha visto que los receptores taquiquinérgicos también pueden asociarse a la proteína  $G_{\alpha i}$ , que es la responsable de la inhibición de las adenilato ciclasas<sup>287</sup>.

Tras la activación de la proteína G, se inicia una cascada de transducción de señales en la que participan diversos mediadores, como las proteínas quinasas A (PKA) o C (PKC), Ras, Raf-1, MAPK/ERK o NFκB<sup>276,284,288</sup>. Estudios recientes también han demostrado una cascada inducida por activación de NK1R que implica la participación de PI3K-Akt<sup>289,290</sup>. Sin embargo, la ruta clásica de transducción de señales del receptor NK1 es la que se inicia con la fosfolipasa C (PLC) como mensajero secundario y produce inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), dando lugar a la liberación de  $Ca^{2+}$  y la activación de PKC<sup>291</sup>.

Además de poder ejercer sus acciones a través de su unión a las diferentes variantes de receptores taquiquinérgicos descritos anteriormente, las TKs pueden tener un modo de acción independiente de dichos receptores<sup>292-294</sup>. Por ejemplo, se

han identificado receptores atípicos de SP acoplados a proteína G $\alpha$ i, PLC, fosfolipasa D (PLD) y MAPK<sup>295,296</sup>. Además, se han identificado receptores selectivos y se ha visto que SP, a altas concentraciones, puede actuar directamente sobre la proteína G<sup>297,298</sup>.

### 1.6.3 Implicaciones funcionales de las Taquiquininas

Como hemos indicado, la mayor parte de la actividad biológica de las TKs está mediada por su unión a los receptores NKR. Por tanto, la acción de estos péptidos en nuestro organismo estará en función de la localización tanto de las TKs como de sus receptores. Inicialmente, las TKs fueron consideradas como neuropéptidos debido a su amplia distribución en el sistema nervioso central (SNC) y periférico. Sin embargo, y sobre todo con el descubrimiento de las EKs, se ha producido un cambio en el concepto que se tenía de las TKs como meros neurotransmisores en el SNC<sup>254,299,300</sup>. Así, estudios recientes demuestran que *TAC1* se expresa en la práctica totalidad de tejidos humanos, destacando el corazón, el colon, las glándulas mamarias, las células endoteliales y el cerebro<sup>271,301,302</sup>, así como en la mayor parte de las células sanguíneas inmunes<sup>303-306</sup>.

Respecto a *TAC3*, se ha demostrado que NKB se expresa incluso en la placenta<sup>307</sup>, un tejido que carece de cualquier forma de innervación nerviosa, mientras que *TAC4* presenta una expresión principalmente no-neuronal<sup>270</sup>.

Al igual que las TKs, los receptores NKR también están ampliamente distribuidos en multitud de tejidos y tipos celulares<sup>302</sup>. En mamíferos, el receptor NK1 se expresa de forma ubicua, encontrándose en neuronas, endotelio vascular, músculo, células inmunes y médula ósea, entre otros. El receptor NK2 presenta una distribución mayoritaria en tejidos periféricos, mientras que el receptor NK3 se expresa en mayor grado en el SNC<sup>258,302</sup>. Como se describirá a continuación, la activación de los receptores taquiquinérgicos se traduce en un amplio rango de respuestas fisiológicas. Este hecho, unido a su extensa distribución, ha permitido relacionar a las TKs con multitud de funciones biológicas y el desarrollo de numerosas patologías.

Dada su expresión en el sistema nervioso, resultan coherentes los estudios que relacionan las TKs con la respuesta al estrés, y con diversos desórdenes psiquiátricos, como la ansiedad y la depresión. Por ejemplo, estudios con antagonistas de los



receptores de TKs muestran que el bloqueo de NK1R y NK2R induce un efecto ansiolítico y antidepresivo<sup>308-310</sup>, mientras que agonistas y antagonistas de NK3R pueden provocar respuestas ansiolíticas y ansiogénicas, respectivamente<sup>311</sup>. Asimismo, las TKs han sido relacionadas con trastornos neurológicos tales como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, traumatismos cerebrales, la encefalopatía isquémica, y la epilepsia<sup>312-315</sup>.

En tejidos periféricos se ha demostrado que las TKs intervienen en procesos como el mantenimiento de la homeostasis, actuando en el control de la presión arterial<sup>271</sup>, la hematopoyesis y la regulación neuroendocrina del sistema inmune<sup>291,316</sup>. Por su parte, en el tracto digestivo, lugar en el que se describieron por primera vez las TKs, se ha visto que regulan la motilidad gastrointestinal<sup>317</sup>. De esta forma, en la hematopoyesis, SP y NKA tienen efectos antagónicos sobre las células progenitoras: la SP, a través del receptor NK1, promueve la proliferación y maduración celular, mientras que NKA, a través de NK2R, inhibe esta proliferación<sup>318,319</sup>.

En lo que a los mecanismos de nocicepción e inflamación se refiere, se ha documentado que las fibras nerviosas pueden liberar SP a nivel de la columna vertebral o en tejidos periféricos tras un estímulo nocivo<sup>273,300,320-323</sup>. Estos hechos se han estudiado en ratones con deficiencia en el gen *Tac1* o *Tac1r*<sup>324,325</sup>. Además de NK1R, se ha demostrado la implicación de NK2R y NK3R en la transmisión del dolor y la inflamación<sup>326,327</sup>. Entre las respuestas inflamatorias que promueven las TKs, destacan las del tracto gastrointestinal<sup>328,329</sup>, el tracto urogenital<sup>330</sup> y las vías respiratorias<sup>263,323,331</sup>.

#### **1.6.4 Taquiquininas y función reproductora**

En las tres últimas décadas, las evidencias experimentales obtenidas en los estudios con modelos preclínicos y humanos han puesto de manifiesto la participación de las TKs en la regulación de la función reproductora. Sin embargo, cabe destacar que a pesar de estos resultados, su relevancia funcional en periodos críticos del desarrollo como la transición puberal o su posible papel como mediadores entre la homeostasis energética y la función reproductora han permanecido en gran medida desconocidos hasta principios de esta década.

En el siguiente subapartado se describirán brevemente las implicaciones funcionales más relevantes de las TKs en el contexto de la función reproductora, así como sus patrones de expresión a nivel del eje HHG. Nos centraremos exclusivamente en los miembros más estudiados de esta familia: SP, NKA y NKB y pondremos especial atención a esta última por su importancia en los trabajos de investigación incluidos en esta Tesis.

#### **1.6.4.1 Implicaciones funcionales de la SP y NKA en el sistema hipotálamo-hipofisario**

A pesar de los esfuerzos invertidos durante las últimas décadas en caracterizar las acciones biológicas de la SP y de la NKA, sus implicaciones funcionales en el contexto de la función reproductora no se han analizado de forma tan profunda como en el caso de la NKB. En cualquier caso, como veremos a continuación, existen evidencias sólidas que demuestran la participación de estas TKs en el control de la actividad del eje HHG en ambos sexos y en diferentes especies de mamíferos<sup>330,332</sup>:

- En primates se ha demostrado que la SP tiene un papel destacado en la generación del pico preovulatorio de gonadotropinas y la ovulación. Además, se han descrito cambios en los niveles circulantes de SP durante las fases del ciclo menstrual, los cuales son más elevados durante la fase folicular y más bajos durante la fase lútea. Estos niveles se correlacionaron negativamente con las concentraciones de E2<sup>333</sup>.
- En mujeres con una menstruación regular se ha detectado un incremento significativo de los niveles de SP durante la fase ascendente del pico preovulatorio de LH, alcanzando valores máximos en los días posteriores a la ovulación<sup>334</sup>.
- En cultivos adenohipofisarios porcinos se ha comprobado que la SP estimula tanto la secreción basal de LH como la inducida por GnRH<sup>335</sup>.
- En ratas viejas acíclicas se ha descrito un incremento en los niveles hipotalámicos e hipofisarios de SP y NKA, sugiriendo la posible implicación de este fenómeno en la pérdida de la ciclicidad sexual asociada a la senescencia

<sup>336</sup>.

#### 1.6.4.2 Implicaciones funcionales de la SP y NKA a nivel gonadal

A nivel gonadal, las TKs, clásicamente consideradas como neuropéptidos, están presentes en las neuronas sensibles a capsaicina que inervan el tracto genital masculino y femenino<sup>258,337,338</sup>. Además, como se describe a continuación, se expresan en otros tipos celulares no neuronales<sup>271,339-342</sup>:

- En humanos, Sastry y col. demostraron en el año 1991 la expresión de SP tanto en espermatozoides maduros como en el plasma seminal y glándulas anexas: próstata, vesículas seminales y epidídimo<sup>343</sup>. Además, en sus trabajos sugieren que esta TK podría estar implicada en el control de la motilidad espermática de una manera dependiente de concentración.

Más recientemente, en el año 2007, un equipo del CSIC dirigido por la doctora Luz Cadenas ha ampliado esta información demostrando, a través de RT-PCR e inmunohistoquímica, la expresión tanto de *TAC1*, *TAC3* y *TAC4* como de NK1, NK2 y NK3 en espermatozoides. Asimismo, este trabajo nos ha permitido conocer la capacidad que tienen SP, NKA, NKB y HK-1 para modular la motilidad del esperma humano a concentraciones nanomolares, reforzando la idea de que las TKs, mediante señalización autocrina, se encuentran implicadas en los procesos de reproducción y fertilización<sup>344,345</sup>.

- En ratas adultas sometidas a condiciones de luz constante se ha comprobado un descenso de los niveles de SP en de las células de Leydig, probablemente asociado al efecto inhibitorio que estas mismas condiciones producen sobre la secreción de LH<sup>346</sup>. Además, esta caída en la expresión de SP a nivel gonadal también se ha detectado en rata macho adultas tratadas con E2<sup>347</sup>. En ausencia de cualquier tipo de manipulación, la expresión de SP a nivel testicular también se ha estudiado en etapas claves del desarrollo (como la maduración puberal), observándose un descenso de su concentración en animales adultos respecto a animales más jóvenes<sup>348</sup>.
- En ratas OVX, el tratamiento con benzoato de estradiol (BE) produce una disminución de la concentración de SP plasmática, mientras que los niveles de NKA no se ven afectados. A nivel hipotalámico, la administración de BE incrementa la expresión de SP y NKA, mientras que la PG reduce el contenido

de SP. En la hipófisis anterior, el contenido de SP se ha visto incrementado tras la administración de PG, efecto que se bloquea al administrar BE<sup>349</sup>.

- En otros modelos animales, como el hámster siberiano, también se ha confirmado la expresión del gen *Tac1* en las células de Sertoli, sugiriendo la posibilidad de que estas células también puedan expresar además de SP otras TKs<sup>350</sup>.

A nivel ovárico, diversos estudios han demostrado la presencia de SP, NKA y NPK (además de NK1 y NK2) en diversas estructuras como el cuerpo lúteo, células intersticiales, fibras nerviosas y vasos sanguíneos<sup>351-355</sup>, postulándose la hipótesis de que las TKs podrían participar en el control del funcionamiento ovárico actuando sobre los diferentes tipos celulares de forma paracrina y autocrina. Esta hipótesis se sustenta en datos que indican que:

- En ratonas prepuberales, el tratamiento con gonadotropinas reduce de forma significativa la concentración de SP, NKA y NPK en el ovario<sup>337,356</sup>.
- En ratas, se ha demostrado que en animales prepuberales la concentración de SP se ve incrementada desde la etapa juvenil hasta la llegada del primer estro. Asimismo, en hembras con 25 meses de edad, en las que los ciclos estrales han desaparecido, se ha documentado un incremento de su concentración.<sup>356</sup>
- Las TKs tienen un papel fundamental en la implantación del óvulo así como en la estimulación contráctil del músculo liso de las Trompas de Falopio<sup>342</sup>.
- El tratamiento neonatal con Capsaicina, una droga que induce la liberación y agotamiento de las TKs en los terminales axónicos, reduce la fertilidad en ratones y ratas<sup>342</sup>.

Además de su papel a nivel ovárico, en útero de ratonas se ha comprobado la expresión de *Tac1* y *Tac2* y de sus respectivos receptores, así como su regulación por los niveles de esteroides ováricos<sup>357,358</sup>. Asimismo, en humanos, se ha localizado la expresión de los ARNm que codifican para SP, NKB y los receptores NK1 y NK2, a nivel placentario, sugiriéndose su implicación en la regulación paracrina del tono vascular en este tejido.<sup>359,360</sup>

### 1.6.5 Distribución de la SP y la NKA en el SNC

La SP se expresa en la mayor parte de las regiones del SNC de todos los mamíferos, con concentraciones variables y una distribución característica, acumulándose en gran cantidad en algunas áreas y siendo casi imperceptible en otras.

Las concentraciones más elevadas se han localizado en el mesencéfalo, el hipotálamo y el POA, mientras que en el cerebelo la cantidad es casi insignificante. Más detalladamente, se ha detectado que la SP se encuentra en rinencéfalo, telencéfalo, ganglios basales, hipocampo, amígdala, áreas septales, diencefalo, el puente troncoencefálico, bulbo raquídeo y médula espinal<sup>361-371</sup>. Por su parte, en la periferia, se ha localizado en el trigémino, ganglio dorsal y neuronas intrínsecas del intestino<sup>371-377</sup>.

A nivel hipotalámico, se ha localizado la mayor cantidad de cuerpos neuronales reactivos frente a SP y NKA en los núcleos premamilares, VMN, POA medial, PVN, ARC y DMN. Adicionalmente, en núcleos ventrales, POA dorsolateral, supraquiasmático, retroquiasmático y núcleos supramamilares, se ha demostrado la presencia de poblaciones de estas neuronas taquiquinérgicas<sup>332,366</sup>.

De todas las regiones hipotalámicas citadas anteriormente, cabe destacar el papel fundamental del ARC en el control de la función reproductora ya que, como se menciona en epígrafes previos de esta Tesis, en él se sintetizan numerosas hormonas que intervienen en el control del eje HHG. A continuación se enumeraran algunas de las evidencias que, en el contexto de la señalización taquiquinérgica, refuerzan la importancia de este núcleo en el control del eje neuroendocrino de la reproducción:

- Diversos estudios han demostrado que el ARC es un área hipotalámica con un gran contenido de TKs<sup>378,379</sup>.
- Se ha documentado la presencia de numerosas proyecciones taquiquinérgicas que inervan el ARC y que proceden de regiones extra-hipotalámicas (tronco encefálico)<sup>327</sup>, intra-hipotalámicas (VMN, DMN, SuM) e intranucleares, lo que respalda su importancia como centro modulador de la regulación neuroendocrina de la función reproductora<sup>380</sup>.
- Análisis histológicos y de transporte axonal retrógrado, entre otros, han demostrado que el ARC también se encuentra inervado por una densa red de

proyecciones taquiquinérgicas (principalmente SP y NKA) que se originan en otra región hipotalámica esencial para el control de la secreción de gonadotropinas, el área preóptica medial (MPA) <sup>332,381</sup>. Además de esta conexión directa (MPA-ARC), se ha demostrado que dentro del propio MPA existen contactos sinápticos entre axones de neuronas NKA-IR y neuronas intermedias que inervan el ARC <sup>382</sup>.

- Análisis de IHC realizados en ratas, han confirmado que un cierto número de neuronas positivas para SP/NKA, localizadas tanto en el ARC como en la región ventrolateral del hipotálamo anterior, establecen contactos sinápticos con las neuronas GnRH localizadas en el septo medio y POA <sup>383</sup>. Asimismo, se ha demostrado que la densidad de estas poblaciones taquiquinérgicas varía a lo largo del ciclo estral y la lactancia, apuntando a un efecto directo de los esteroides sexuales circulantes sobre dichas poblaciones hipotalámicas de TKs <sup>383</sup>. Esta hipótesis se ha visto reforzada en estudios posteriores en los que se ha demostrado una disminución en la expresión de NKA y SP en el hipotálamo tras la OVX y un incremento significativo de los mismos tras el reemplazamiento con BE <sup>384</sup>.

En el resto de áreas hipotalámicas, la proyecciones más importantes de fibras taquiquinérgicas se distribuyen de la siguiente forma:

- En la región hipotalámica anterior las poblaciones más abundantes de fibras inmunoreactivas para SP y NKA se encuentran (junto a las proyecciones que acabamos de describir en el MPA), en el núcleo supraquiasmático (SCN) anterior y el PVN <sup>362,369,385</sup>.
- En el hipotálamo lateral también se ha detectado una elevada densidad de estas fibras taquiquinérgicas (SP/NKA).
- En el hipotálamo medial, además de localizarse en el ARC, se han encontrado proyecciones en el DMN, área perifornical y en la eminencia media, donde se localizan los axones de las neuronas GnRH.
- En la parte posterior del hipotálamo se han localizado proyecciones taquiquinérgicas a nivel de los núcleos premamilares.

Durante la década del los 90 y a principio de este siglo, con el perfeccionamiento de herramientas moleculares como la ISH y la IHC, se amplió el conocimiento de la localización neuroanatómica del receptor NK1 a otras áreas del SNC, como el área tegmental dorsal y ventral, los ganglios de la base, la estría terminal y las regiones laterales, posterior y medial del hipotálamo<sup>386-391</sup>. A partir de esa década, el uso de anticuerpos específicos permitió a la comunidad científica observar por primera vez la presencia de NK1 tanto en somas como en axones<sup>392</sup>, así como su colocalización con la SP en diferentes áreas del SNC de modelos animales y humanos<sup>390,392-399</sup>.

### **1.6.6 Distribución del receptor NK2 en el SNC**

Como se ha comentado anteriormente, el receptor NK2 presenta una distribución mayoritaria en tejidos periféricos, especialmente en el musculo liso de las vías respiratorias, tracto gastrointestinal y sistema urinario<sup>400,401</sup>, mientras que los receptores NK1 y NK3 son los principales receptores taquiquinérgicos presentes en el SNC. En todo caso, el NK2R se ha encontrado en algunos núcleos cerebrales específicos como algunos núcleos talámicos, en las capas II y IV de la corteza prefrontal y en el hipocampo<sup>402 403</sup>. A nivel hipotalámico, se ha detectado cierta expresión de NK2, aunque en muy bajo porcentaje comparado con los otros receptores taquiquinérgicos. Cabe destacar que en esta región los niveles de ARNm codificante para su ligando de mayor afinidad, la NKA, son bastante elevados<sup>385,404,405</sup>.

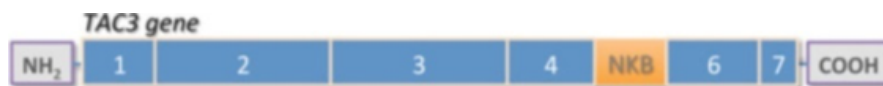
## **1.7 SISTEMA NKB/NK3R**

A pesar de que el papel de NKB en el feedback negativo ejercido por los esteroides gonadales sobre GnRH/LH se comenzó a caracterizar a principios de la década de los 90<sup>406,407</sup>, su relevancia funcional en el ámbito de la neuroendocrinología de la reproducción ha permanecido en un segundo plano hasta finales de la última década. Así, en el año 2009, dos trabajos de investigación realizados en humanos, demostraron que la presencia de mutaciones inactivantes en los genes que codifican para la NKB y su receptor, cursaban con un cuadro de hipogonadismo hipogonadotropo e infertilidad<sup>74,408</sup>.

Estos datos, además de presentar un llamativo paralelismo con los estudios clínicos que permitieron iniciar la caracterización del sistema KISS1/GPR54 en la regulación central del eje reproductor, indicaban que la NKB, al igual que las Kp, ocuparía un lugar destacado en el control nervioso de la secreción de gonadotropinas.

### 1.7.1 Expresión de la NKB

Como hemos visto a nivel molecular, el gen de la NKB (*TAC3* en humanos y *Tac2* en roedores) está formado por 7 exones que codifican para un precursor denominado preprotaquiquinina B <sup>254,266,409</sup>. Posteriormente, una serie de modificaciones proteolíticas en este precursor darán lugar a la formación de la proneuroquinina B y finalmente a la NKB <sup>254</sup>. En concreto, los nucleótidos que codifican la síntesis de esta señal se localizan en el exón 5 (*Figura 16*).



**Figura 16:** Representación esquemática del gen TAC3; tomado de <sup>410</sup>

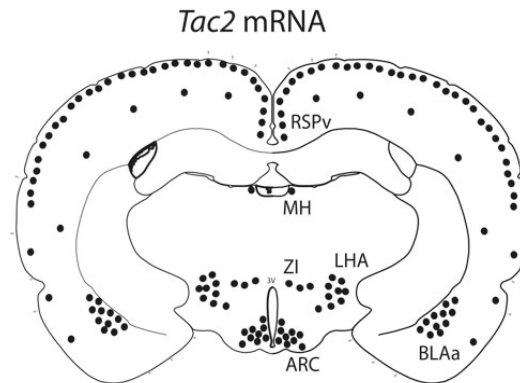
### 1.7.2 Distribución de la NKB en el SNC.

Los estudios neuroanatómicos de expresión, tanto de ARNm como de proteína, a nivel cerebral han demostrado que la NKB posee una distribución bastante ubicua en todas las especies analizadas. En humanos, se han identificado varias poblaciones neuronales que expresan *TAC3* localizadas en el ARC y el hipotálamo anterior, así como en el área septal, banda diagonal de Broca, estría terminal, amígdala y neurocortex <sup>302,411</sup>. En ratas, las neuronas que expresan *Tac2* se han localizado a nivel hipotalámico en POA y LHA, y en los núcleos VMN, DMN y ARC <sup>75,412,413</sup>, así como en otras regiones cerebrales, como el córtex, el hipocampo, la amígdala, la estría terminal, el bulbo olfativo y los cuerpos mamilares (*Figura 17*). En ratones, la distribución del ARNm de *Tac2* es similar a la encontrada en la de rata, excepto en el hipocampo y el bulbo olfatorio donde su expresión no ha sido descrita <sup>414</sup>.

Adicionalmente, el empleo de técnicas de IHC ha reforzado la distribución neuroanatómica descrita para los transcritos de NKB. De esta forma, en diferentes



especies se ha observado la existencia de esta señal peptídica de NKB en la eminencia media y ARC, así como su colocalización con otros neurotransmisores en neuronas del ARC, en concreto, con Kp y Dyn<sup>76,223,415-418</sup> en las neuronas KNDy. Además, en rata se ha demostrado que las neuronas NKB del ARC proyectan sus axones hacia diferentes áreas hipotálamicas como el AVPV y la región anterior del POA<sup>419,420</sup> y hacia áreas dorsales y laterales como el DMN, el VMN, el PeVN y el LHA e incluso hacia los núcleos premamilares<sup>419</sup>.



**Figura 17:** Representación esquemática de una sección coronal del cerebro de rata en la que se observa la expresión de *Tac2* en el ARC y otras regiones del SNC. Tomado de<sup>410</sup>.

### 1.7.3 Receptor de NKB, caracterización y distribución en el SNC

El receptor NK3 (NK3R), considerado la isoforma con afinidad preferente por la NKB, se encuentra codificado por el gen *TACR3* en humanos y por el gen *Tacr3* en roedores. Es el receptor de mayor tamaño de las tres isoformas y su longitud varía en función de la especie (465 en humanos y 462 en rata)<sup>254</sup>.

En lo que respecta a la distribución de NK3R, los primeros análisis de expresión por IHC, realizados en rata y ratón, pusieron de manifiesto su presencia en los axones de las neuronas GnRH, apoyando la hipótesis de un posible efecto directo de NKB sobre estas neuronas<sup>418</sup>. Más recientemente, en ovejas, los análisis realizados han demostrado la existencia de numerosas neuronas y fibras inmunoreactivas a NK3R (NK3R-IR) en POA y otras regiones hipotálamicas como el núcleo arcuato ARC<sup>71</sup>.

#### 1.7.4 Regulación del sistema NKB/NK3R por esteroides sexuales

Como hemos comentado a lo largo de esta Introducción, está bien establecido que los esteroides gonadales ejercen un papel clave en el control central del eje reproductor regulando, a través de ER $\alpha$  y AR, tanto la liberación tónica de GnRH (retroalimentación negativa) como la generación del pico preovulatorio de GnRH (retroalimentación positiva)<sup>421,422</sup>. Sin embargo, cabe destacar que las neuronas GnRH solo expresan el ER $\beta$ <sup>423,424</sup>. Esta circunstancia sugiere que las acciones de retroalimentación que llevan a cabo los esteroides gonadales deberían desarrollarse a través de neuronas interpuestas que expresaran dichos receptores, como ocurre en el caso de las neuronas NKB del ARC en las que si ha sido documentada la existencia de ER $\alpha$  y AR<sup>72,75,425-430</sup>.

Entre las evidencias experimentales que avalan la regulación de la expresión de NKB por esteroides gonadales podemos destacar que, en presencia de E2 y T, se produce una inhibición tanto del ARNm de *TAC3/Tac2* como de la proteína que codifican y que hay un incremento de su expresión en situaciones en las que los niveles de E2/T son mínimos (como ocurre en el periodo postmenopáusico o en animales gonadectomizados). Asimismo, se ha comprobado que NK3R está sometido a estos mismos mecanismos de regulación, ya que los niveles de *Tacr3* disminuyen drásticamente en ratas macho y hembra en presencia de E2<sup>75,425</sup>.

En conjunto, aunque los mecanismos moleculares subyacentes no están completamente descritos, la semejanza en la regulación de la expresión de NKB y su receptor con la descrita para el caso del ARNm de *Kiss1* en el ARC<sup>129,219</sup>, sugiere fuertemente que tanto la NKB como las Kp participan en los fenómenos de retroalimentación negativa de los esteroides gonadales actuando en ambos casos de forma similar.

Los estudios realizados en ratones demuestran que, durante el periodo prepuberal, existe un claro dimorfismo sexual respecto a la expresión de *Tac2* en función de los niveles circulantes de esteroides gonadales<sup>431</sup>. En este sentido, la OVX en ratonas prepuberales desencadena un incremento en la expresión de *Tac2* que se acompaña del aumento de los niveles de *Kiss1* en el ARC y de LH circulante, mientras que en ratas macho prepuberales la ORX no va seguida de modificaciones en la expresión de *Tac2*<sup>431</sup>.

Finalmente, es importante destacar que la expresión del sistema NKB/NK3R puede depender de los efectos organizativos de los esteroides sexuales durante las etapas críticas de la diferenciación sexual cerebral. En este sentido, se ha demostrado que, con niveles fisiológicos de esteroides sexuales circulantes, la población de neuronas NKB en el ARC es mayor en el sexo femenino que en el masculino<sup>417,428,432</sup>, mientras que dosis suprafisiológicas de E2 o T en ambos sexos durante estas etapas conducen a una reducción significativa en el número de neuronas NKB en el ARC que persiste a lo largo de toda la vida del animal<sup>428</sup>.

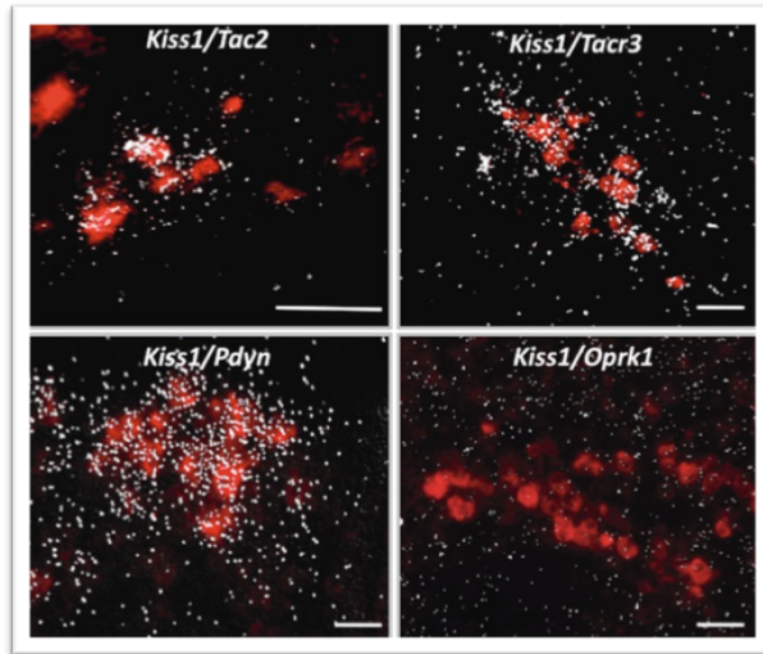
### 1.7.5 Caracterización del sistema hipotalámico de neuronas KNDy

En la actualidad la NKB está considerada como una parte imprescindible de la red de factores neuroendocrinos que gobiernan la adquisición y mantenimiento de la función reproductora en mamíferos. Sin embargo, a pesar de que la caracterización génica y proteica de este neuropéptido y de su receptor fue realizada hace décadas, la manera en la que interactúa con otros factores hipotalámicos ha comenzado a ser descifrada sólo en los últimos años.

Estudios iniciales mediante IHC, realizados en oveja y rata, demostraron un alto grado de colocalización de la NKB con Dyn en el ARC<sup>415,416</sup>. Posteriormente, un trabajo realizado en ovejas por Goodman y cols en 2007, demostró que las neuronas productoras de NKB/Dyn del ARC también coexpresan Kp<sup>223</sup> (*Figura 18*) y, más recientemente, también se ha documentado esta coexpresión en ratones, cabras y monos<sup>72,76,221</sup>. La evidencia de este fenómeno en diferentes especies ha propiciado el consenso de la comunidad científica para cambiar el nombre de esta población de neuronas y pasar a ser denominado como neuronas KNDy, dada la co-expresión de **Kiss1**, **NKB** y **Dyn**<sup>224</sup>.

Un aspecto adicional que demuestra la importancia de la NKB en el campo de la neuroendocrinología de la reproducción es el hecho de que prácticamente todas las neuronas KNDy del ARC coexpresan el receptor NK3R<sup>71,72,415,418,433</sup>, siendo dicha coexpresión exclusiva de este núcleo hipotalámico, ya que no ha sido demostrada la presencia de dicho receptor en las neuronas kisspeptidérgicas del AVPV y el POA<sup>71,72,433</sup>. En consecuencia, es razonable deducir que el papel de la NKB en el control

nervioso de la función reproductora debe estar relacionado con la modulación de la actividad de las neuronas KNDy del ARC.



**Figura 18:** Fotomicrografías representativas de ARC de ratón en las que se ilustra la coexpresión de *Kiss1* (en rojo), NKB (*Tac2*), NK3R (*Tacr3*), dinorfina A (*PDyn*), y KOR (*Oprk1*) representados por la granos de plata (en blanco). Tomado de <sup>72</sup>.

Existe un aspecto adicional que merece especial atención dentro de la caracterización fisiológica de las neuronas NKB del ARC que es la identificación del linaje neuronal de dicha población. Así, un estudio reciente en ratones macho ha demostrado que sólo aproximadamente la mitad de las neuronas que expresan *Tac2* en el ARC coexpresan *Kiss1* <sup>434</sup>, apuntando a una posible subdivisión de esta población de neuronas NKB, que podría estar relacionada con posibles diferencias funcionales aún por descubrir. Estos estudios están en consonancia con datos previos obtenidos en dos poblaciones de neuronas NKB (con y sin coexpresión de Kp) que proyectan sus axones hacia la eminencia media <sup>435</sup>.

### 1.7.6 Efectos de la NKB sobre la secreción de gonadotropinas

A pesar de que inicialmente se publicaron resultados contradictorios sobre el papel de la NKB como modulador de la secreción de gonadotropinas <sup>72,73,436</sup> y de que

los ratones mutantes para el receptor de NKB (*Tacr3*<sup>-/-</sup>) resultaban ser aparentemente fértiles, los datos más recientes obtenidos en diferentes especies, como oveja, primates y roedores, señalan de manera inequívoca un efecto estimulador de la NKB sobre la secreción de GnRH/LH<sup>75-77,433</sup>. Estos resultados ratifican datos clínicos de HH observados en pacientes con mutaciones inactivantes en *TAC3/TACR3*<sup>74</sup> y en ratones<sup>437</sup>.

Curiosamente, la deficiencia secretora de gonadotropinas en humanos y ratones que se observa en presencia de mutaciones inactivantes de *TAC3/TACR3* y *Tac2/Tacr3*, respectivamente, parece afectar exclusivamente a la liberación de LH, ya que la FSH presenta unos niveles circulantes relativamente normales<sup>438</sup>. Esta característica, también observada en pacientes que carecen de la señalización vía NKB, sugiere una liberación pulsátil residual de GnRH (NKB-independiente) producida como consecuencia de la generación de pulsos de baja frecuencia de GnRH, que podría explicar en parte la secreción diferencial de LH y FSH<sup>439,440</sup>.

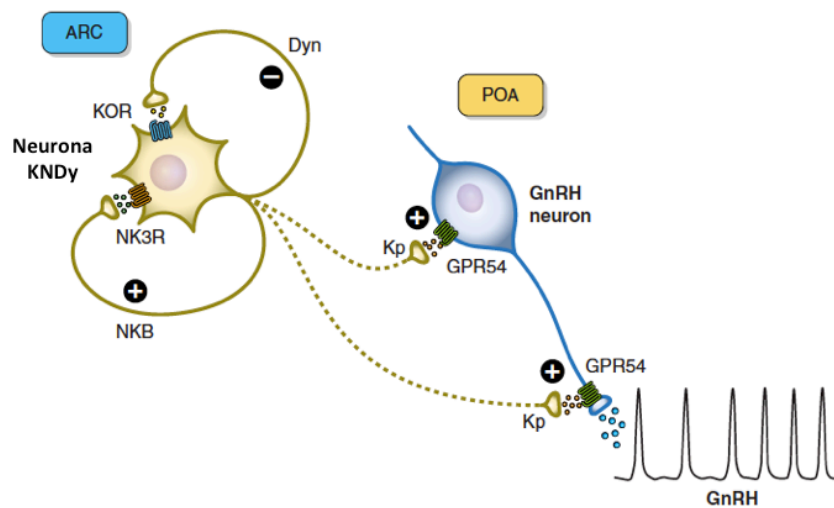
En lo que a los estudios funcionales se refiere, trabajos realizados por varios grupos de investigación en diferentes condiciones fisiológicas evidencian una discrepancia notable en la respuesta secretora de gonadotropinas tras la administración exógena de NKB o senktide, un agonista de dicha señal. Sin embargo, un elevado número de ensayos han demostrado de manera irrefutable la existencia de una potente acción estimuladora de la secreción de gonadotropinas tras la administración de NKB o senktide en diferentes especies<sup>75,76,221,433,434,441,442</sup>. En este sentido, los estudios realizados en animales gonadectomizados frente a estos mismos animales una vez reemplazados con E2, sugieren que deben existir niveles fisiológicos de esteroides sexuales circulantes para que se produzca un incremento de la liberación de LH en respuesta a la administración exógena de NKB. Esto también está en consonancia con la acción estimulante de senktide sobre la secreción de LH descrita en ovejas durante la fase folicular<sup>433</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado en animales gonadectomizados que la estimulación continua de NK3R con senktide conduce a la desensibilización de dicho receptor, probablemente debido a la elevación en el tono endógeno de Kp y NKB. Un estudio reciente propone como posible explicación a este fenómeno, que la

administración crónica de senktide produciría una hipersecreción mantenida de Dyn que conduciría a la inhibición de la secreción de LH<sup>443</sup>.

### 1.7.7 Regulación de la secreción pulsátil de GnRH

Hoy en día se ha demostrado de forma convincente que la liberación Kp se produce de forma pulsátil y que estos pulsos se correlacionan con los pulsos de liberación de GnRH/LH<sup>221,444,445</sup>. Estos datos, reforzados con aquellos que describen el mecanismo de acción de las neuronas KNDy sobre la liberación de GnRH/LH, ha provocado que la comunidad científica haya planteado la posibilidad de la implicación conjunta de Kp, NKB y Dyn en el control de la secreción pulsátil de GnRH (Figura 19).



**Figura 19:** Modelo de implicación de las neuronas KNDy que intenta explicar el mecanismo de generación de pulsos de liberación de GnRH a la eminencia media. KOR, receptor- $\kappa$  opioide de Dyn; NK3, receptor de NKB. Tomado con modificaciones de<sup>6</sup>.

La hipótesis más comúnmente aceptada propone que la NKB operaría sobre las neuronas KNDy de un modo autosináptico, uniéndose a su receptor en la misma neurona y sobre otras neuronas KNDy adyacentes estimulando la liberación de Kp desde el ARC. Al mismo tiempo, a través de neuronas adyacentes, la Dyn actuaría de modo inverso, contrarrestando la acción estimuladora que ejerce la NKB sobre la liberación de Kp. La acción combinada de estos efectos activadores (NKB) e inhibidores (Dyn) desencadenaría la liberación pulsátil de Kp por las neuronas KNDy<sup>72,221</sup>. Cabe

destacar que este modelo se encuentra en consonancia con los estudios que demuestran la existencia de una densa red de fibras NKB-IR rodeando a las neuronas KNDy<sup>415,419,420</sup>. En cualquier caso, aunque los perfiles de expresión y los datos funcionales avalan este modelo, aún no son del todo conocidas las características anatómicas de esta red; es decir, si las proyecciones de las neuronas KNDy actuarían de forma directa sobre las neuronas GnRH y si esta acción se llevaría a cabo sobre el soma o los terminales nerviosos de estas neuronas<sup>72,446</sup>.

## 1.8 DISRUPCIÓN ENDOCRINA

A lo largo de esta Introducción se ha descrito la gran complejidad organizativa y funcional de la unidad hipotálamo-hipofisaria durante el desarrollo del individuo, así como su elevada sensibilidad a las acciones organizativas que sobre ella ejercen los esteroides sexuales y otros factores hormonales.

En las últimas décadas, un número creciente de evidencias experimentales y epidemiológicas han demostrado la existencia en el medio ambiente de un gran número de compuestos con capacidad de mimetizar o antagonizar las acciones biológicas de factores hormonales endógenos, principalmente E2. Estas sustancias, de origen natural o sintético, han sido globalmente denominadas Disruptores Endocrinos (DE)<sup>447</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como DE a toda sustancia química con capacidad de alterar la homeostasis de un determinado sistema endocrino y que, consecuentemente, puede desencadenar efectos adversos sobre la salud de un organismo o de su progenie. La disrupción endocrina no es por tanto un fenómeno tóxico; resulta de la interacción de un sistema hormonal con factores que interfieren con su correcto funcionamiento. Por ello, la completa caracterización de estos fenómenos requiere de un profundo conocimiento de las bases fisiológicas de los procesos objeto de disrupción<sup>448,449</sup>.

### 1.8.1 Mecanismos de acción de los DE

Los mecanismos por los que los DE alteran el mensaje endocrino son muy diversos, pero no implican *per se* toxicidad sobre el sistema en el que actúan.

Convencionalmente, se ha considerado que los DE operan como agonistas o antagonistas parciales de receptores hormonales pudiendo, de esa forma, mimetizar los efectos de una hormona, bloquear de modo competitivo sus acciones o, eventualmente, modificar la síntesis del correspondiente receptor hormonal <sup>450</sup>. Más recientemente, se han descrito nuevos mecanismos de acción de diferentes DE que incluyen:

- El aumento o disminución del metabolismo de las hormonas esteroideas endógenas o de otros compuestos xenobióticos, lo que disminuiría o incrementaría la disponibilidad de los mismos para interacciones con sus receptores y ejercer sus acciones <sup>451</sup>.
- La modificación de la actividad transcripcional de los receptores por incrementar su degradación o la de los factores de transcripción que interaccionan con ellos <sup>451</sup>.
- La activación de la síntesis de hormonas por inhibir la actividad de la histona-deacetilasa y por estimular la actividad de proteínas kinasa que fosforilan coactivadores <sup>451</sup>.
- La modificación de los sistemas transportadores de esteroides endógenos. En este sentido, es conocido que tanto la dehidroepiandrosterona (DHEA), una prohormona precursora de la síntesis de andrógenos y estrógenos, como los estrógenos son transportados como ésteres sulfatados, sintetizados por sulfotransferasas citosólicas (SULT2A1 para la DHEA y SULT1E1 para los estrógenos). Una vez en el tejido diana, sulfatasas específicas vuelven a transformar a los estrógenos en su forma libre y biológicamente activa. Ciertos DE pueden alterar este balance de sulfotransferasas/sulfatasas con la consecuente variación en el porcentaje de estrógenos libres <sup>25,450,451</sup>.
- La inducción de cambios en la metilación del ADN, produciendo alteraciones epigenéticas, o en el metabolismo de los lípidos y la adipogénesis, dando lugar a alteraciones del balance energético y el peso corporal <sup>450-453</sup>.

Por definición, los diferentes sistemas hormonales son susceptibles de ser dianas de los mecanismos de disrupción endocrina. Por otra parte, es destacable que las consecuencias de la exposición a DE no son necesariamente inmediatas (pueden



manifestarse con carácter diferido a lo largo del desarrollo o de forma transgeneracional), ni similares en todos los individuos afectados. Finalmente, según la OMS, los efectos de los DE son más deletéreos y persistentes cuando la exposición tiene lugar en periodos tempranos del desarrollo, en los que tiene lugar la organización funcional de numerosos elementos del sistema endocrino.

### **1.8.2 Disrupción endocrina de la función reproductora**

Aunque los fenómenos de disrupción endocrina pueden afectar a los diferentes mecanismos de regulación hormonal que actúan sobre el organismo, una gran mayoría de estudios se han centrado en el análisis de los efectos indeseables de la exposición a DE sobre la función reproductora. Las causas de esta elevada susceptibilidad del sistema reproductor son varias e incluyen el hecho de que un gran número de compuestos ambientales posean actividad estrogénica o anti-androgénica y que los propios mecanismos fisiológicos de diferenciación y regulación funcional de este sistema son modulados por las acciones de los esteroides endógenos.

A continuación se enumerarán algunas de las alteraciones que la exposición a DE causan en humanos:

- Estudios clínicos realizados en países como Dinamarca, Francia, Bélgica, Gran Bretaña, Holanda y Canadá han indicado una disminución del número de espermatozoides en el semen de sus habitantes <sup>454</sup>.
- Alteraciones en el desarrollo del aparato genitourinario, enfermedades como la ausencia de descenso testicular (criptorquidia) e hipospadias han incrementado su frecuencia en las últimas décadas <sup>455</sup>.
- Diversos estudios han documentado incrementos en las tasas de aparición de alteraciones funcionales del desarrollo sexual, como el desarrollo puberal en edades tempranas (menarquia precoz), que han sido descritas en poblaciones industrializadas <sup>456,457</sup>.
- Se ha reportado un aumento notable de la frecuencia de tumores hormono-dependientes (mama, próstata, testículo u ovario), especialmente en países occidentales <sup>458</sup>.

No obstante, es necesario enfatizar que las evidencias sobre la relación causal entre la exposición a DE y la aparición de enfermedades en humanos son esencialmente indirectas o circunstanciales. Esto se debe, en parte, a un conocimiento incompleto de los mecanismos de acción de los compuestos disruptores y a la ausencia de biomarcadores fiables de exposición y efecto. Igualmente, los efectos de dosis bajas y mezclas complejas de los DE no han sido suficientemente estudiados hasta la fecha.

### **1.8.3 DE con actividad estrogénica (Xeno-estrógenos)**

A pesar de la diversidad de compuestos con potencial actividad disruptora endocrina, sin lugar a dudas los DE más numerosos y mejor caracterizados son aquellos definidos por su capacidad de actuar como agonistas estrogénicos. Éstos reciben la denominación general de xeno-estrógenos y su identificación ha sido clave en la definición misma de los fenómenos de disrupción endocrina. A modo orientativo, se indican algunos de los grupos y fuentes de xeno-estrógenos:

- Pesticidas con actividad estrogénica, como el DDT y sus derivados (metoxicloro, clordecona, endosulfán, toxafeno y dieldrín), bifenilos policlorados (PCBs), vinclozolina, etc. Tienen como característica principal que sus efectos perduran por el carácter organizativo de los mismos.
- Polímeros sintéticos y plásticos: el más conocido y relevante es el bisfenol-A (BPA), presente en envases de alimentos, fármacos, empastes y selladores usados en correctores dentales infantiles, etc.
- Alquilfenoles como el p-nonilfenol (tubos de poliestireno) y el octilfenol.
- Ftalatos, empleados abundantemente en la industria del plástico.
- Parabenos presentes, fundamentalmente, en cosméticos.
- Fitoestrógenos, compuestos naturales procedentes de plantas y hongos (micoestrógenos), son los xeno-estrógenos que existen de manera natural en nuestro entorno.

En términos generales, los xeno-estrógenos sintéticos son compuestos con actividad estrogénica débil pero, debido a sus propiedades químicas, son persistentes

en el medio y altamente bioacumulables. Los fitoestrógenos, sin embargo, al tratarse de compuestos de origen natural presentes constitutivamente en el medio, presentan una menor tasa de bioacumulación.

#### **1.8.4 BPA y función reproductora**

El BPA (4,4'-isopropilidenedifenol) es un compuesto orgánico que se usó inicialmente como un estrógeno sintético en la industria farmacéutica y que actualmente se emplea en la producción de plásticos policarbonados y resinas epóxicas<sup>459</sup>.

Entre los diferentes DE que conocemos actualmente, el BPA es uno de los más relevantes. Esto se debe, en gran medida, a su presencia en productos de uso cotidiano, tales como envases de bebida y comida, juguetes y material de oficina (entre otros)<sup>460</sup>, su elevada producción, con más de 350 millones de kilogramos al año<sup>461</sup>, y su posible implicación en problemas de salud, incluyendo diferentes trastornos de la función reproductora<sup>462</sup>.

Aunque la actividad estrogénica del BPA se conoce desde 1936<sup>463</sup>, su impacto sobre el eje reproductor no se ha descrito hasta principios del año 2000<sup>464</sup>. Durante este tiempo han surgido un gran número de estudios que sugieren el impacto negativo de la exposición temprana a BPA sobre diferentes aspectos de la función reproductora, tales como el ciclo sexual, la senescencia reproductiva y la edad de llegada de la pubertad<sup>462,465,466</sup>. Además, se ha demostrado que el BPA es capaz de alterar la diferenciación sexual del cerebro en animales de laboratorio, modificando la expresión de los genes responsables de la síntesis de receptores sexuales en el hipotálamo y la hipófisis y afectando a la secreción de gonadotropinas<sup>459</sup>.

En roedores hembra, se ha descrito que la exposición perinatal a BPA causa un adelanto en la edad de llegada de la pubertad<sup>467-470</sup>. Sin embargo, otros estudios no han podido detectar este fenotipo alterado<sup>471,472</sup>. Del mismo modo, estudios llevados a cabo en humanos también muestran discrepancias sobre el posible impacto del BPA en el desarrollo puberal. En concreto, algunos trabajos han sugerido la existencia de una asociación entre niveles elevados de BPA en orina y la aparición de trastornos puberales<sup>473,474</sup>, mientras que otros estudios no han podido detectar esta asociación

<sup>475,476</sup>. La razón de estas discrepancias aún sigue siendo desconocida, aunque en el caso de los estudios en roedores se ha propuesto que la dosis empleada, la vía de administración y tipo de cepa animal podrían explicar, al menos en parte, estas diferencias. En concreto, se ha visto que inyecciones subcutáneas de dosis bajas de BPA (200 µg/kg – 5 mg total) inducen un adelanto en la edad de apertura vaginal en ratas hembra <sup>471,472</sup>, mientras que dosis más elevadas (200 mg/kg total) no causan este efecto <sup>459</sup>. Además, también se ha documentado que la exposición de hembras gestantes a un amplio rango de dosis de BPA a través de sondas no produce alteraciones puberales en sus crías hembra <sup>471,472</sup>. En cuanto a la cepa animal empleada, se ha descrito que la cepa de rata Long-Evans es menos sensible a estrógenos, en términos de impacto sobre el eje reproductor, que otras cepas <sup>472</sup>.

Los mecanismos por los que el BPA podría alterar la llegada de la pubertad aún siguen siendo desconocidos. Si bien los primeros estudios en este contexto sugerían la posible implicación de mecanismos periféricos <sup>467,469,477</sup>, trabajos posteriores destacan la relevancia de rutas neuroendocrinas centrales <sup>478-480</sup>. De hecho, evidencias muy recientes, pero aún incompletas, sugieren que el sistema hipotalámico Kiss1 podría ser un posible candidato en la mediación del impacto neuroendocrino del BPA sobre el desarrollo puberal <sup>466,481</sup>. Sin embargo, esta posibilidad aún no se ha estudiado en profundidad.



# OBJETIVOS



## 2. OBJETIVOS

El auge de las patologías asociadas a la función reproductora, entre las que se incluyen alteraciones en la edad de llegada a la pubertad y diversas formas de infertilidad, constituye un grave problema de salud con una elevada prevalencia poblacional. Sin embargo, su base etiopatogénica aún sigue siendo, en gran medida, desconocida. En este contexto, hay que resaltar que el descubrimiento de la faceta reproductiva de los neuropéptidos hipotalámicos Kps y NKB ha supuesto un gran avance en el entendimiento de los mecanismos que controlan el eje HHG.

Si bien el papel de las Kps en numerosos aspectos de la función reproductora, tales como la diferenciación sexual del cerebro, la pubertad, el control de la secreción de gonadotropinas y la regulación metabólica de la fertilidad, ha sido ampliamente analizado en los últimos años, la posible participación de NKB en algunos de estos aspectos aún no ha sido suficientemente caracterizada.

En este contexto, el **OBJETIVO GENERAL** de esta Tesis Doctoral fue caracterizar el papel fisiológico del sistema NKB/NK3R en la puesta en marcha de la función reproductora y su posterior mantenimiento durante la edad adulta, haciendo especial hincapié en (i) su modulación por el estado metabólico, (ii) su papel en el control de la secreción de gonadotropinas, así como su interacción con otros neuropéptidos en dicho contexto, y (ii) su sensibilidad al ambiente esteroideo, incluyendo a compuestos estrogénicos con actividad disruptora endocrina, como el BPA.

Para la consecución de este objetivo general se concretaron los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

1. Definir, a nivel del SNC, el patrón de expresión y la localización neuroanatómica de NKB y su receptor NK3R en diferentes etapas del desarrollo postnatal de la rata hembra, centrándonos fundamentalmente en la etapa peripuberal.
2. Analizar el impacto de la manipulación farmacológica (activación o inhibición) del sistema NKB/NK3R sobre la puesta en marcha de la función reproductora, en condiciones de normonutrición y/o situaciones de balance energético negativo en la rata hembra.



3. Analizar la interacción potencial de NKB y Dyn en el control de la secreción de gonadotropinas, así como la posible contribución de otras taquiquininas, tales como SP y NKA, en dicho contexto, en ratas macho y hembra adultas.
4. Caracterizar el papel del sistema NKB/NK3R en el control de la secreción de gonadotropinas a lo largo del desarrollo postnatal y su regulación por el ambiente esteroideo en ratas macho y hembra.
5. Evaluar el impacto de la exposición temprana a un disruptor endocrino abundantemente presente en el entorno y de conocida actividad estrogénica, el Bisfenol A (BPA), sobre el desarrollo postnatal del sistema hipotalámico NKB/NK3R, y su posible influencia sobre la edad de llegada de la pubertad en ratones hembra.



# **TRABAJOS PUBLICADOS**



### 3. TRABAJOS PUBLICADOS

#### 3.1 Role of Role of Neurokinin B in the Control of Female Puberty and Its Modulation by Metabolic Status (Artículo 1).

2388 • The Journal of Neuroscience, February 15, 2012 • 32(7):2388–2397

Behavioral/Systems/Cognitive

## Role of Neurokinin B in the Control of Female Puberty and Its Modulation by Metabolic Status

Víctor M. Navarro,<sup>1,2,3,5\*</sup> Francisco Ruiz-Pino,<sup>1,2,3\*</sup> Miguel A. Sánchez-Garrido,<sup>1,2,3</sup> David García-Galiano,<sup>1,2,3</sup> Samuel J. Hobbs,<sup>3</sup> María Manfredi-Lozano,<sup>1,2,3</sup> Silvia León,<sup>1,2,3</sup> Susana Sangiao-Alvarellos,<sup>1,4</sup> Juan M. Castellano,<sup>1,2,3</sup> Donald K. Clifton,<sup>6</sup> Leonor Pinilla,<sup>1,2,3</sup> Robert A. Steiner,<sup>5,6</sup> and Manuel Tena-Sempere<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology, University of Córdoba, <sup>2</sup>CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, and <sup>3</sup>Instituto Maimonides de Investigaciones Biomédicas de Córdoba, 14004 Córdoba, Spain, <sup>4</sup>Department of Medicine, School of Health Science, University of A Coruña, 15006 A Coruña, Spain, and Departments of <sup>5</sup>Physiology and Biophysics, and <sup>6</sup>Obstetrics and Gynecology, University of Washington, Seattle, Washington 98185

Human genetic studies have revealed that neurokinin B (NKB) and its receptor, neurokinin-3 receptor (NK3R), are essential elements for normal reproduction; however, the precise role of NKB–NK3R signaling in the initiation of puberty remains unknown. We investigated here the regulation of *Tac2* and *Tacr3* mRNAs (encoding NKB and NK3R, respectively) in female rats and demonstrated that their hypothalamic expression is increased along postnatal maturation. At puberty, both genes were widely expressed throughout the brain, including the lateral hypothalamic area and the arcuate nucleus (ARC)/medial basal hypothalamus, where the expression of *Tacr3* increased across pubertal transition. We showed that central administration of senktide (NK3R agonist) induced luteinizing hormone (LH) secretion in prepubertal and peripubertal females. Conversely, chronic infusion of an NK3R antagonist during puberty moderately delayed the timing of vaginal opening (VO) and tended to decrease LH levels. The expression of NKB and its receptor was sensitive to changes in metabolic status during puberty, as reflected by a reduction in *Tacr3* (and, to a lesser extent, *Tac2*) expression in the ARC after a 48 h fast. Yet, acute LH responses to senktide in pubertal females were preserved, if not augmented, under fasting conditions, suggesting sensitization of the NKB–NK3R–gonadotropin-releasing hormone signaling pathway under metabolic distress. Moreover, repeated administration of senktide to female rats with pubertal arrest due to chronic undernutrition rescued VO (in ~50% of animals) and potently elicited LH release. Altogether, our observations suggest that NKB–NK3R signaling plays a role in pubertal maturation and that its alterations may contribute to pubertal disorders linked to metabolic stress and negative energy balance.

### Introduction

Neurokinin B (NKB), a member of the tachykinin-peptide family, has emerged as an important modulator of reproductive function. Recent studies demonstrated hypogonadotropic hypogonadism in patients bearing inactivating mutations in *TAC3* or *TACR3* genes, encoding NKB and its receptor [neurokinin-3 receptor (NK3R)], respectively (Topaloglu et al., 2009). Subsequent animal studies have documented potent stimulatory effects

of NK3R agonists on luteinizing hormone (LH) secretion (Amstalden et al., 2010; Billings et al., 2010; Ramaswamy et al., 2010; Wakabayashi et al., 2010; Navarro et al., 2011a). Mounting evidence suggests that this action occurs within the arcuate nucleus (ARC), through the regulation of the release of kisspeptins, encoded by *Kiss1* (Ramaswamy et al., 2010; Navarro et al., 2011a). Indeed, NKB (and dynorphin) are expressed in *Kiss1* neurons in the ARC, where they may act through recurrent collaterals to shape the pulsatile activity of those neurons (Navarro and Tena-Sempere, 2011).

Puberty is a key developmental period when reproductive capacity is achieved and sexual maturation is completed (Parent et al., 2003; Ojeda and Skinner, 2006; Ojeda et al., 2010). These events are centrally driven by the heightening of the neurosecretory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons (Ojeda and Skinner, 2006). Compelling evidence suggests that kisspeptin signaling plays a crucial role in this process (Roa et al., 2008; Oakley et al., 2009). In support of this concept, we can observe the following: (1) absence of kisspeptin signaling prevents puberty and leads to infertility in humans and mice (Oakley et al., 2009); (2) hypothalamic *Kiss1* expression and the ability of kisspeptin to induce gonadotropin secretion increases over puberty in rodents (Navarro and Tena-Sempere, 2011); and (3) transient antagonism of kisspeptin signaling delays puberty onset

Received Aug. 20, 2011; revised Dec. 9, 2011; accepted Dec. 21, 2011.

Author contributions: V.M.N., D.K.C., R.A.S., and M.T.-S. designed research; V.M.N., F.R.-P., M.A.S.-G., D.G.-G., S.J.H., M.M.-L., S.L., S.S.-A., J.M.C., and L.P. performed research; V.M.N., D.K.C., R.A.S., and M.T.-S. analyzed data; V.M.N., D.K.C., R.A.S., and M.T.-S. wrote the paper.

This research was supported by NIH Grant R01 HD 049651 and the Eunice Kennedy Shriver NICHD/NIH through cooperative agreement U54 HD 12629; the Marie Curie Outgoing International Fellowship within the 7th Framework Programme of the European Union; Mary Gates Endowment for undergraduate students (to S.J.H.; University of Washington); and Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, Research Grants BFU 2008-00984 and BFU 2011-25021, Junta de Andalucía, Spain, Grant P08-CVI-00603, and EU Research Contract DEER FP7-ENV-2007-1. CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

\*V.M.N. and F.R.-P. contributed equally to this study and should be considered as joint first authors.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to either Víctor M. Navarro or Manuel Tena-Sempere, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, 14004 Córdoba, Spain. E-mail: nalovic@gmail.com or fitesem@uco.es.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4288-11.2012

Copyright © 2012 the authors 0270-6474/12/322388-10\$15.00/0

in rats (Pineda et al., 2010), while chronic administration of kisspeptin advances puberty onset (Navarro et al., 2004b). However, despite the proposed interplay between kisspeptins and NKB in the control of GnRH secretion in adulthood, the potential roles of NKB signaling in the timing of puberty remains virtually unexplored.

Reproduction, as an energy-demanding process, is sensitive to metabolic signals (Fernandez-Fernandez et al., 2006). Hence, sensing the metabolic status and transmitting this information to the hypothalamic reproductive centers are tightly regulated phenomena. Indeed, peripheral and central signals closely interplay to shut down the reproductive axis during energy-deficient periods. The hypothalamic Kiss1 system has been proposed to convey these inputs onto GnRH neurons (Castellano et al., 2010). Thus, a negative energy balance decreases *Kiss1*/kisspeptin expression at the hypothalamus, whereas exogenous administration of kisspeptin rescues puberty and reproductive function in undernourished animals (Castellano et al., 2010). However, the role of NKB signaling in the metabolic control of puberty is yet to be characterized. Of note, a recent study documented inhibition of ARC NKB expression following caloric restriction in adult rats (True et al., 2011).

In this context, we hypothesized that NKB and NK3R are involved in the timing of puberty in the female rat. We present herein the first evidence of the stimulatory role of NKB signaling in female puberty and document its modulation by conditions of metabolic stress, such as undernutrition, which are known to perturb normal pubertal maturation.

## Materials and Methods

### Animals and drugs

Female Wistar rats were bred in the vivarium at the University of Córdoba, in Córdoba, Spain. The animals were maintained under constant conditions of light (14 h of light, from 7:00 A.M.) and temperature (22°C). They were weaned at 21 d postpartum, when they were housed in groups of five rats per cage with free access to standard rat chow and tap water, until used in specific experiments. For hormonal tests involving intracerebroventricular cannulation, the rats were caged individually from the day before cannulae implantation until termination of experiments. Correct positioning of the cannulae was checked by visual inspection (to exclude animals showing obvious displacement or detachment) and confirmed at necropsy. Experimental procedures were approved by the University of Córdoba Ethical Committee for Animal Experimentation and were conducted in accordance with the European Union norms for the care and use of experimental animals. The NK3R agonist (senktide) and antagonist (SB222200) were purchased from Sigma Chemical and Tocris Bioscience, respectively. Doses of senktide and SB222200 were selected/adapted on the basis of previous studies (Sandoval-Guzmán and Rance, 2004; Ramaswamy et al., 2010; Navarro et al., 2011a).

### Experimental Design

**Developmental regulation of hypothalamic *Tac2* and *Tacr3* expression (Experiments 1–3).** In Experiment 1, analysis of hypothalamic expression of *Tac2* (rodent ortholog of *TAC3*) and *Tacr3* (ortholog of *TACR3*) mRNAs was conducted at different stages of postnatal development. Hypothalamic samples ( $n = 4$ /group) were obtained from female rats at postnatal day 1 (P1), P7, P10, P15, P20, P24, P30, P36, and P60, corresponding to the neonatal (P1), infantile (P7, P10, and P15), juvenile/prepubertal (P20 and P24), pubertal (P30 and P36), and adult (P60) stages of postnatal development; the latter (i.e., adult female rats) were checked for regular estrous cyclicity by monitoring vaginal smears and were sampled in the morning of the diestrous phase of the cycle. In Experiment 2, the neuro-anatomical distribution of *Tac2* and *Tacr3* expression was compared between late-infantile/prepubertal and pubertal female rats. First, we mapped the distribution of *Tac2* and *Tacr3* mRNAs in the brain of intact

female rats at the transition between the late-infantile and prepubertal stages of maturation (P20 rats) [i.e., at the middle of the transitional phase between low (P15) and high (P24) expression in both genes observed in Experiment 1]. Second, we mapped the expression of *Tac2* and *Tacr3* in pubertal (P36) female rats. Brains were immediately removed, gradually frozen on dry ice, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until they were sectioned on a cryostat, thaw mounted, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used for *in situ* hybridization (ISH). Trunk blood samples for hormone measurements were also collected at the time of decapitation. In Experiment 3, the hypothalamic nuclei comprising the majority of the expression of *Kiss1* [ARC and anteroventral periventricular nucleus (AVPV)], *Tac2* [ARC and lateral hypothalamic area (LHA)], and *Tacr3* [ARC, paraventricular nucleus (PVN), and LHA] were selectively targeted, and the expression of *Tac2* and *Tacr3* genes were quantitatively assayed and compared between 20- and 36-d-old female rats.

**Responses to NKB agonist and antagonist in prepubertal female rats (Experiments 4 and 5).** In Experiment 4, we assessed the ability of the NK3R agonist, senktide, to influence LH secretion in prepubertal rats. To this end, central (intracerebroventricular) administration of senktide into the lateral cerebral ventricle was conducted at two developmental stages: infantile (P10) and juvenile (P25) female rats ( $n = 10$ /group). For comparative purposes, adult (P60) females in diestrus-1 ( $n = 10$  rats/group) were also tested, as senktide has been previously described to elicit a potent secretory response of LH (Navarro et al., 2011a). A dose of 600 pmol/10  $\mu\text{l}$  per rat was injected on the basis of previous studies (Navarro et al., 2011a). Briefly, animals were implanted with intracerebroventricular cannulae; to allow delivery of senktide into the lateral ventricle, the cannulae were lowered to a depth of 3 mm beneath the surface of the skull; the insert point was 1 mm posterior and 1.2 mm lateral to bregma, as described in detail previously (Navarro et al., 2004b). Animals were bled through jugular venipuncture before senktide injection (0 min), and 20 and 60 min after injection. Animals injected with vehicle (physiological saline, 0.9% NaCl) served as controls. To note, 10-d-old rats were only bled 20 min after senktide injection, due to a reduced body size that prevented us from also sampling at 60 min. Blood was collected, and serum samples were separated by centrifugation at  $1600 \times g$  for 20 min and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use for hormone determinations.

As a complement to the above acute study, in Experiment 5 the effects of chronic central administration of the NK3R antagonist, SB222200, on puberty onset in immature female rats were assessed. The treatment protocol was set following our previous studies of the pubertal effects of kisspeptin antagonism (Pineda et al., 2010). The ability of SB222200 to antagonize NKB action has been recently tested in the monkey (Ramaswamy et al., 2010) and confirmed by the blockade of the NKB-dependent activation of *Kiss1* neurons in the mouse (Navarro et al., 2011b). Central administration of the antagonist in the lateral cerebral ventricle was conducted as described previously (Navarro et al., 2004b), following protocols of cannulation similar to those of Experiment 4. Injection of SB222200 (3 nmol) was initiated at P28 and repeated every 12 h until P36 ( $n = 11$ ). An additional group of females injected with vehicle ( $n = 12$ ) was carried in parallel. In all animals, body weight and vaginal opening (VO) were monitored daily. At the end of treatment, all the animals were killed by decapitation 15 min after the last injection of SB222200. Trunk blood was collected, and the uteri were dissected out of the surrounding fat and their dry weights recorded.

**Metabolic control of NKB system at puberty (Experiments 6–8).** As continuation of the previous studies, this set of experiments was conducted to evaluate whether expression and function of NKB signaling is influenced by metabolic signals at puberty. In Experiment 6, pubertal female rats ( $n = 10$ ) were subjected to 48 h of fasting. A pair-aged group of animals fed *ad libitum* was used as control. At the end of the experiment (P36), the animals were killed by decapitation, and brains and blood were collected as described above. The brains were processed by ISH for *Kiss1*, *Tac2*, and *Tacr3* genes in the same hypothalamic nuclei as in Experiment 2. In Experiment 7, the ability of senktide to acutely induce/modulate LH secretion under conditions of negative energy balance was assessed in pubertal (P36) female rats ( $n = 10$ ) subjected to the same protocol of 48 h fasting used in Experiment 6. As described in Experiment 4, animals were bled before senktide injection (0 min), and 20 and 60 min after central

(intracerebroventricular) injection of a 600 pmol bolus of senktide; animals injected with vehicle served as controls. For comparative purposes, similar protocols of intracerebroventricular injection and blood sampling following administration of vehicle or 600 pmol of senktide were implemented in additional groups of pubertal (P36) female rats ( $n = 10$ ) fed *ad libitum*. Finally, in Experiment 8, we monitored the effects of repeated central administration of NKB agonist, senktide, on puberty onset in rats subjected to persistent caloric restriction. A protocol of 30% restriction in daily food intake was applied to immature female rats, starting on P23 postpartum, as this has been shown to prevent normal occurrence of VO and pubertal progression in female rats (Castellano et al., 2005). Daily repeated intracerebroventricular injection of senktide was implemented between P30 and P37 in food-restricted females ( $n = 11$ ), following previously published protocols (Castellano et al., 2005). The treatment regimen was set at a dose of 600 pmol of senktide per animal in 10  $\mu$ l, every 12 h. Pair-aged females ( $n = 12$ ), at 30% food restriction, injected with vehicle served as controls. Body weight and VO were monitored daily as described in Experiment 5. At the end of treatment (P37), the animals were killed by decapitation, 20 min after the last injection of senktide (or vehicle), and trunk blood was collected. To determine the normal date of vaginal opening in animals fed *ad libitum*, an additional group of females ( $n = 20$ ) without food restriction were maintained on daily inspection of canalization of the vagina up to P37.

#### Tissue preparation

Blood was centrifuged to isolate the serum, which was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until hormone measurements. Uteri were removed and weighed to provide an indirect marker of plasma  $\text{E}_2$  levels (and their biological effect). Brains were removed for ISH, frozen on dry ice, and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until sectioned. Five sets of 20  $\mu\text{m}$  sections in the coronal plane were cut on a cryostat (from the diagonal band of Broca to the mammillary bodies), thaw mounted onto SuperFrost Plus slides (VWR Scientific), and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . A single set was used for each *in situ* hybridization assay (adjacent sections 100  $\mu\text{m}$  apart).

#### Radioimmunoassay for LH

Serum LH levels were measured in 50  $\mu\text{l}$  samples with double-antibody RIA kits supplied by the National Institutes of Health (Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA). Rat LH-1-10 was labeled with  $^{125}\text{I}$  using IODO-GEN tubes, following the instructions of the manufacturer (Pierce). Hormone concentrations were expressed with the reference preparation LH-RP-3 as a standard. Intraassay and interassay coefficients of variation were  $<8$  and 10%, respectively. The sensitivity of the assay was 5 pg/tube.

#### Semiquantitative RT-PCR of Tac2 and Tacr3 mRNAs

Real-time RT-PCR was performed in whole hypothalamic samples with the iCycler iQ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories). In detail, *Tac2* and *Tacr3* mRNA levels were assayed in samples from different stages of postnatal development in females (1-, 7-, 10-, 15-, 20-, 24-, 30-, 36-, and 60-d-old rats; the latter were monitored for regular estrous cyclicity and sampled in the diestrous phase of the ovarian cycle). For each target, RT-PCR amplification was routinely conducted with two different sets of primers, which were generated on the basis of the published sequences of the rat *Tac2* gene (NM\_019162.1), sequences: 153–171 (sense) and 299–319 (antisense); and the *Tacr3* gene (NM\_017053.1) sequences: 862–881 (sense) and 985–1008 (antisense). The synthesized cDNAs were further amplified (1:10) in triplicate by PCR with SYBR Green I as fluorescent dye and 1  $\times$  iQ Supermix containing 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 0.2 mM deoxy-NTPs, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 2.5 U iTaq DNA polymerase (Bio-Rad Laboratories) in a final volume of 25  $\mu\text{l}$ . The PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation and enzyme activation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min; followed by 40 cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s; annealing at  $57^{\circ}\text{C}$  (*Tac2*),  $53^{\circ}\text{C}$  (*Tacr3*), or  $58^{\circ}\text{C}$  (*RP-S11*) for 30 s; and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 s. Product purity was confirmed by dissociation curves and random agarose gel electrophoresis. No template controls were included in all assays, yielding no consistent amplification. Calculation of the relative expression levels of the target mRNAs was conducted based on the cycle threshold ( $C_t$ ) method (Navarro et al., 2004a). The  $C_t$  for each sample was calculated using

iCycler iQ real-time PCR detection system software with an automatic fluorescence threshold setting. Accordingly, the fold expression of target mRNAs over reference values was calculated by the equation  $1 + e^{-\Delta\Delta C_t}$ , where  $\Delta C_t$  is determined by subtracting the corresponding RP-S11  $C_t$  value (internal control) from the specific  $C_t$  of the target (*Tac2* or *Tacr3*), and  $\Delta\Delta C_t$  is obtained by subtracting the  $\Delta C_t$  of each experimental sample from that of the reference sample (taken as reference value 100). No significant differences in  $C_t$  values were observed for RP-S11 between the treatment groups.

#### Detection of Kiss1, Tac2, and Tacr3 mRNAs probe generation

The probes used for detection of *Kiss1*, *Tac2*, and *Tacr3* mRNAs have been described previously (Navarro et al., 2009). Sense probes for every transcript were used as controls for the specificity of the ISH procedures, which are outlined below.

#### Single-label in situ hybridization of Kiss1, Tac2, and Tacr3 mRNAs

*Kiss1*, *Tac2*, and *Tacr3* mRNA sense and antisense probes were transcribed with T7 or T3 polymerase (Fermentas), as described previously (Navarro et al., 2009). Briefly, radiolabeled probes were synthesized *in vitro* by inclusion of the following ingredients in a volume of 20  $\mu\text{l}$ : 250 Ci [ $^{33}\text{P}$ ]UTP (PerkinElmer Life and Analytical Sciences); 1  $\mu\text{g}$  of PCR product; 0.5 mM each ATP, CTP, and GTP; and 40 U of polymerase. Residual DNA was digested with 4 U of DNase (Ambion), and the DNase reaction was terminated by addition of 2  $\mu\text{l}$  of 0.5 M EDTA, pH 8.0. The riboprobes were separated from unincorporated nucleotides with NucAway Spin Columns (Ambion). Slides with mouse hypothalamic sections from the different experimental groups were processed as reported previously (Cunningham et al., 2002; Gottsch et al., 2004).

#### Quantification and analysis of Kiss1, Tac2, and Tacr3 mRNAs

Brain sections were analyzed unilaterally. Slides from all of the animals were assigned a random three-letter code, alphabetized, and read under dark-field illumination with custom-designed software designed to count the total number of cells and the number of silver grains (corresponding to radio-labeled *Kiss1*, *Tac2*, and *Tacr3* mRNA) over each cell (Chowen et al., 1990). Data are presented as total mRNA content, depicting the number of cells  $\times$  grains per cell within the coronal sections containing the hypothalamic nucleus studied for each set, not the total mRNA in this specific nucleus. The starting and ending points of quantification were determined according to the atlas of Paxinos and Watson (2001).

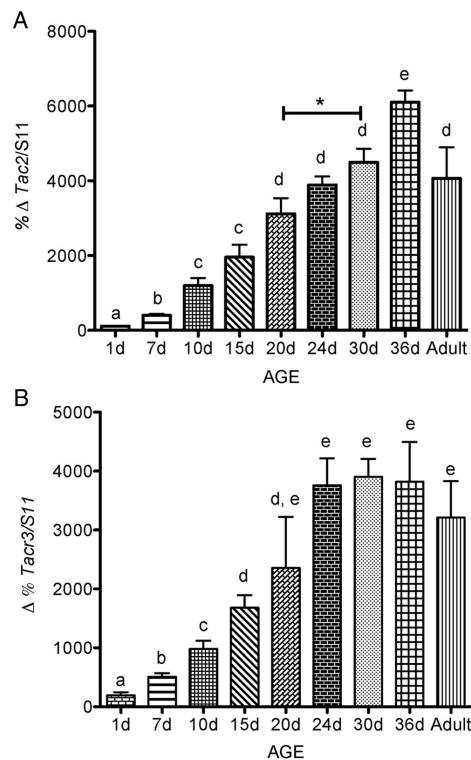
#### Statistical analysis

All data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for each group. In addition, when appropriate, integrated LH secretory responses were expressed as the area under the curve (AUC), calculated following the trapezoidal rule (Protter and Morrey, 1964), over a 60 min period after the administration of senktide. One-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test and Student's *t* test were used to assess variation among experimental groups. Significance level was set at  $p \leq 0.05$ . All analyses were performed with GraphPad Prism.

## Results

### Tac2 and Tacr3 mRNA levels in rat hypothalamus during development

The profiles of hypothalamic expression of *Tac2* and *Tacr3* mRNAs, rat orthologs of human *TAC2* and *TACR3*, were evaluated in hypothalamic samples from female rats at different stages of postnatal development, from the neonatal period to adulthood. Stages of postnatal maturation were defined on the basis of previous references (Ojeda and Skinner, 2006), and timing of puberty onset in the female rat was assessed following consensus criteria and recording of external signs of reproductive maturation, such as vaginal opening (Ojeda and Skinner, 2006). Persistent expression of *Tac2* and *Tacr3* mRNAs was detected in the hypothalamus by means of real-time RT-PCR along postnatal maturation. Expression of *Tac2* and *Tacr3* was virtually undetect-



**Figure 1.** *A, B*, Developmental profiles in the expression of *Tac2* (*A*) and *Tac3* (*B*) in the hypothalamus of the female rat. Values represent the percentage of the lowest value (100%) measured by real-time RT-PCR and normalized to the *S11* ribosomal protein mRNA. Groups with different superscript letters and asterisks are statistically different from one another ( $p < 0.05$ , by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple range test and unpaired Student's *t* test).

able in neonatal females but increased progressively over the infantile (P7, P10, and P15) and juvenile/prepubertal periods (P20, P24, and P30) of postnatal maturation. Maximal expression was reached at the time of puberty onset (P36) for *Tac2*, whereas peak *Tac3* levels plateaued during the peripubertal transition (Fig. 1). This was followed by a decreasing trend in the expression of both genes in adult (diestrus-1) animals, which was statistically significant for *Tac2*. Nonetheless, hypothalamic mRNA levels of *Tac2* and *Tac3* in adult females remained higher than in infantile rats.

**Neuronal mapping of *Tac2* and *Tac3* expression in prepubertal versus peripubertal rats**

The neuroanatomical distribution of *Tac2* and *Tac3* mRNA was assessed in medial coronal sections of the female rat brain at two representative stages of postnatal maturation by ISH. P20 was chosen on the basis of results obtained in Experiment 1 as a period of transition between low (infantile) and high (late juvenile/prepubertal) expression of both genes. Likewise, P36 was selected as the representative pubertal stage with maximal levels of *Tac2* and *Tac3* mRNAs. *Tac2* expression was broadly detected across brain sections with similar distribution in both ages. *Tac2*

transcripts were predominantly present in cortical and hippocampal areas [somatosensory area 1 (SS1), parietal region 4 (PTL4), and Ammon's horn (CA)], supraoptic area, and lateral and medial basal hypothalamic nuclei (LHA and ARC). Of note, P36 animals showed wider expression in the basal hypothalamus with detectable expression at the ventromedial nucleus, which was absent in P20 animals (Fig. 2). *Tac3* mRNA showed a scattered and differential distribution with more abundant expression at the amygdala (basolateral amygdalar nucleus and basomedial amygdalar nucleus) and LHA in prepubertal animals. Additionally, similar to *Tac2* expression, *Tac3* mRNA was equally detected in both groups within cortical and hippocampal areas (SS4, PTL4, and CA) and medial basal hypothalamus (periventricular hypothalamic nucleus and ARC) (Fig. 2).

**Quantitative changes of expression of *Kiss1*, *Tac2*, and *Tac3* over pubertal maturation**

The expression levels of *Kiss1*, *Tac2*, and *Tac3* genes were quantified in representative hypothalamic nuclei, selected on the basis of the prominent presence of these targets (see neuronal mapping results), comparing late-infantile (P20) and peripubertal (P36) animals. *Kiss1* expression remained unchanged in the ARC during this transition; however, it increased significantly in the AVPV (Fig. 3*A*,  $*p < 0.01$ ). *Tac2* mRNA levels did not show any significant change in any of the nuclei assessed (ARC and LHA) during the pubertal transition (Fig. 3*B*). In contrast, *Tac3* expression significantly augmented on P36 in the ARC, but not in the PVN or LHA (Fig. 3*C*,  $*p < 0.05$ ).

**Effects of NKB agonist, senktide, on LH secretion in prepubertal and adult female rats**

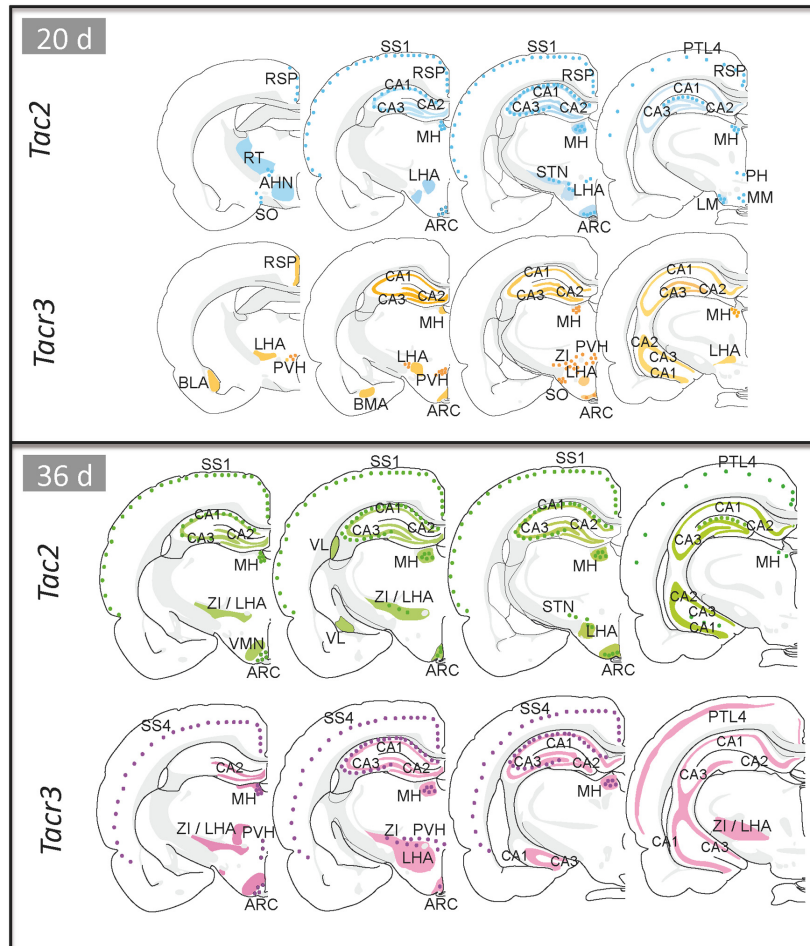
The NKB agonist, senktide, induced a robust increase in serum LH levels 20 min after central (intracerebroventricular) injection, in both prepubertal (P25) ( $p < 0.01$ ; Fig. 4*A*) and adult female rats on diestrus-1 ( $p < 0.01$ ; Fig. 4*B*); the latter is in keeping with recent reports (Navarro et al., 2011a). At both ages, LH levels remained elevated at 60 min after intracerebroventricular administration of senktide. Accordingly, the overall integrated secretory response (calculated as the AUC over a 60 min study period) showed a significant elevation in both age groups (prepubertal: vehicle =  $31.0 \pm 6.2$  ng/ml per 60 min vs senktide =  $113.7 \pm 21.7$ ,  $p < 0.01$ ; adult/diestrus-1: vehicle =  $52.2 \pm 10.1$  ng/ml per 60 min vs senktide =  $145.2 \pm 21.1$ ,  $p < 0.01$ ).

In addition, the stimulatory effects of senktide on LH secretion were also detected at an earlier age point (i.e., during the early infantile period). Thus, 10-d-old female rats displayed a robust fivefold increase of the circulating LH levels at 20 min after intracerebroventricular injection of senktide (vehicle alone:  $0.32 \pm 0.03$  ng/ml; vs senktide:  $1.69 \pm 0.13$ ,  $p < 0.01$ ). Of note, because of low body size, no sampling was conducted at this age 60 min after senktide administration.

**Effects of central infusion of an NK3R antagonist on puberty onset**

On the basis of the stimulatory effects of senktide on LH secretion in prepubertal female rats, we next sought to determine whether chronic blockage of NK3R signaling would delay the normal onset of puberty. To this end, we tested the effect of a chronic (but intermittent) infusion of the antagonist of the NK3R, SB222200, on several markers of pubertal maturation. A model of repeated intracerebral (lateral ventricle) injection of the antagonist was selected to limit its effects to the brain. Following analogous protocols of kisspeptin antagonism (Pineda et al., 2010), pharmaco-





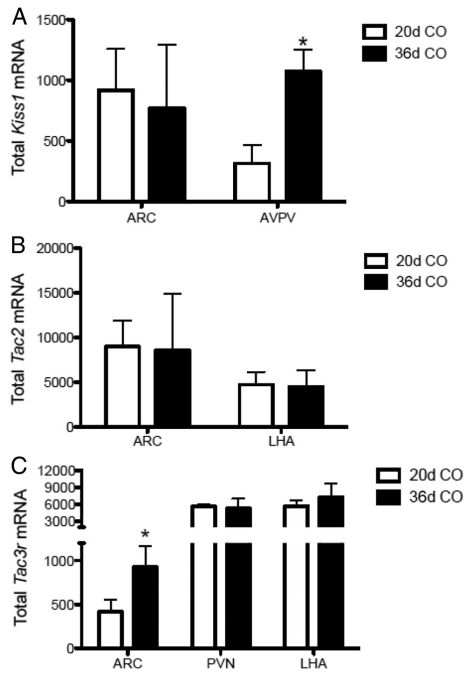
**Figure 2.** Schematic representation of the distribution of *Tac2* and *Tacr3* mRNAs in the brain of late-infantile (P20) and pubertal (P36) female rats. AHN, Anterior hypothalamic nucleus; BLA, basolateral amygdalar nucleus; BMA, basomedial amygdalar nucleus; LM, lateral mammillary nucleus; LV, lateral ventricle; MH, medial habenula; PH, posterior hypothalamic nucleus; PVH, periventricular hypothalamic nucleus; RSP, retrosplenial area; RT, reticular nucleus thalamus; SO, supraoptic nucleus; STN, subthalamic nucleus; ZI, zona incerta.

logical treatments were administered between P28 and P36, and the progression of puberty was monitored. As an external index of puberty onset, VO (defined as complete canalization of the vagina) was monitored daily. Such a marker was selected as it has been conventionally considered a reliable external sign of puberty (Navarro et al., 2004b). Infusion of NK3R antagonist did not alter body weight, food intake (data not shown), or uterine weight over the study period (Fig. 5). Nevertheless, repeated central administration of SB222200 to peripubertal female rats evoked a moderate delay in the overall timing of puberty onset. Thus, the percentage of VO was persistently lower in the SB222200-injected group starting at day 32, and by day 35, when nearly 80% of vehicle-treated females displayed VO, only 50% of the

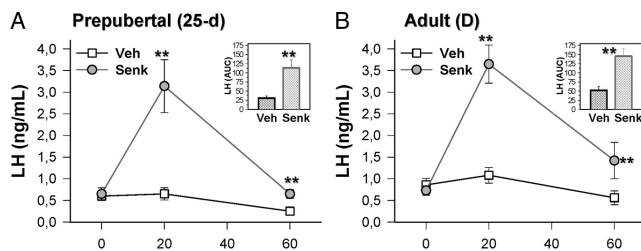
antagonist-injected animals did (Fig. 5). Yet, the antagonist group tended to catch up, and by day 36 no differences in terms of the percentage of VO were detected between groups. In addition, a decreasing trend in LH levels in the animals treated with the antagonist was observed at the end of the treatment (45% reduction in mean values), although it did not reach statistical significance.

**Effects of 48 h fasting on hypothalamic expression of *Kiss1*, *Tac2*, and *Tacr3***

To determine the effects of metabolic stress associated with negative energy balance on the hypothalamic expression of *Kiss1*, *Tac2*, and *Tacr3* genes, single-label ISH was performed brain sec-



**Figure 3.** A–C, Profile of expression of *Kiss1* (A), *Tac2* (B), and *Tac3r* (C) expression in specific hypothalamic nuclei of late-infantile (20-d-old) vs pubertal (36-d-old) female rats. Data are presented as total mRNA (number of cells × grains/cell) assessed by *in situ* hybridization. \* $p < 0.05$ , by unpaired Student's *t* test within each nucleus.



**Figure 4.** A, B, Serum LH levels in prepubertal 25-d-old (A) and adult female rats in diestrus-1 (B), at 0, 20, and 60 min after central intracerebroventricular administration of vehicle or 600 pmol/rat senktide. In addition to the profiles of mean LH levels in the experimental groups, the integrated secretory responses, as the AUC over the study period (60 min), are shown (in the inset as a bar graph). \*\* $p < 0.01$  versus corresponding vehicle-injected controls (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple range test or unpaired Student's *t* test; the latter for AUC data). Veh, Vehicle; Senk, senktide.

tions from pubertal (P36) female rats after 48 h of fasting. Our protocol of food deprivation induced a significant (>25%) decrease of body weight (data not shown), which was associated with a dampening of hypothalamic *Kiss1* mRNA levels in both the ARC ( $p < 0.05$ ) and AVPV ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6A). Likewise, a decreasing trend in *Tac2* mRNA levels was observed in the ARC and LHA of fasted animals (Fig. 6B), but neither of these changes

was statistically significant. *Tacr3* expression was significantly inhibited in the ARC after 48 h of fasting ( $p < 0.05$ ), but remained constant in the PVN and LHA (Fig. 6C).

**LH responses to the NKB agonist, senktide, under severe caloric restriction**

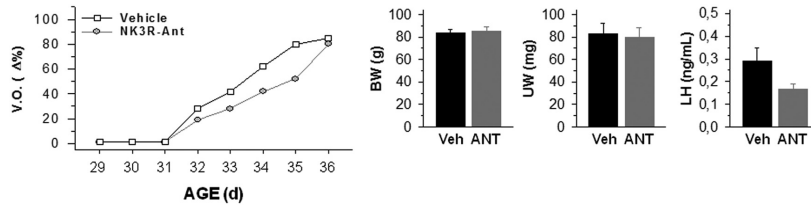
The role of NKB in the regulation of gonadotropin secretion under conditions of metabolic stress associated with negative energy balance was explored by assessing the LH-releasing effects of senktide in pubertal female rats after 48 h of fasting. In age-matched (P36) rats fed *ad libitum*, intracerebral injection of 600 pmol of senktide induced significant LH responses (>2.2-fold increase over vehicle-injected controls), at 20 min after injection ( $p < 0.01$ ) (Fig. 7A), with > 65% elevation of LH AUC in response to senktide. In fasted animals, the ability of similar doses (600 pmol/rat, i.c.v.) of senktide to elicit LH secretion *in vivo* was not only preserved, but notably enhanced, as evidenced by the following observations: (1) absolute LH levels at 20 min after senktide administration were twofold higher in fasted animals; (2) LH levels remained significantly elevated in fasted animals at 60 min after senktide injection in fasted, but not fed, females; and (3) integral LH response to senktide over a 60 min period (AUC) was twice as high in pubertal females submitted to prior 48 h fasting (Fig. 7B).

**Effects of senktide on puberty onset under conditions of severe caloric restriction**

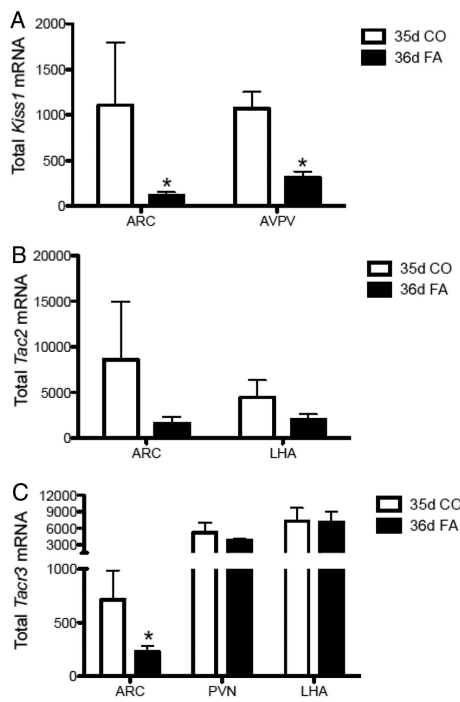
The effects of senktide upon the pubertal activation of the reproductive axis were monitored in immature female rats in a model of puberty arrest due to 30% restriction in daily food intake, initiated on P23 (Castellano et al., 2005). Repeated injections of senktide, starting at P30, were administered into the lateral ventricle. Control females fed *ad libitum* were also daily monitored. This group displayed normal progression of puberty, as evidenced by >85% of the animals having complete VO at P36, when mean the body weight was  $87.45 \pm 1.59$  g. Chronic food restriction induced a significant reduction in body weight of ~30% from controls (mean body weight on P37,  $67.75 \pm 0.59$  g;  $n = 12$ ). This regimen totally prevented normal puberty onset, as none of the vehicle-injected females submitted to undernutrition displayed VO by P37. In contrast, chronic intracerebroventricular administration of senktide (600 pmol/12 h) between P30 and P37 to food-restricted females induced complete VO in 5 of 11 treated animals (~45%), without a significant change in terminal mean body weight compared with vehicle-injected, food-restricted females. Moreover, mean body weight in the subset of senktide-treated females displaying VO ( $65.4 \pm 2.48$  g;  $n = 5$ ) was similar to that in animals from the same group without VO ( $67.33 \pm 1.25$  g;  $n = 6$ ). Additionally, regardless of the presentation of VO, serum LH levels at the end of the chronic treatments were significantly elevated in senktide-injected females, which displayed a >4.5-fold increase over vehicle-injected animals at 20 min after the last intracerebroventricular injection (Fig. 8).

**Discussion**

Studies in humans and other mammalian species suggest that NKB–NK3R signaling plays a critical role in the control of repro-

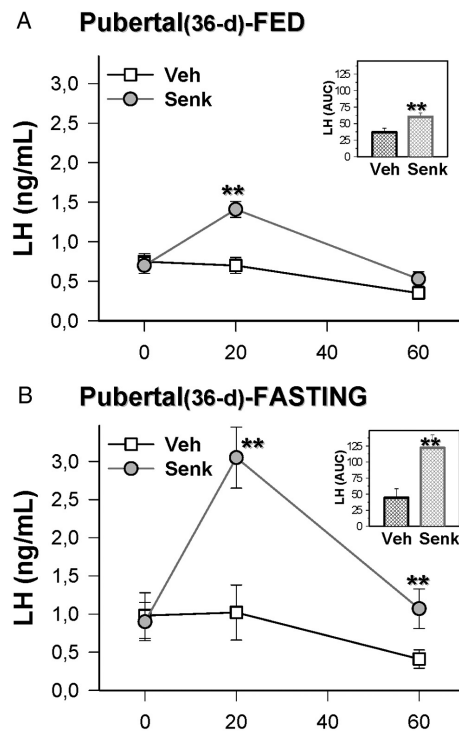


**Figure 5.** Compilation of indices of pubertal maturation recorded in immature female rats chronically intracerebroventricularly injected 3 nmol of SB222200 (NK3R antagonist) or vehicle. SB222200 was injected every 12 h between P28 and P36. Dates of vaginal opening (expressed as a percentage of the total number of animals per experimental group) are shown in the left panels. Data on body and uterus weights, as well as serum LH levels, in vehicle- and SB222200-injected animals are shown in the right panels. Values are the mean  $\pm$  SEM. Veh, Vehicle; ANT, antagonist; BW, body weight; UW, uterus weight.



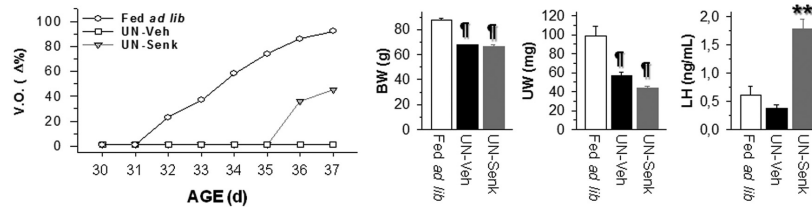
**Figure 6.** A–C, Effect of 48 h fasting on the total mRNA levels of *Kiss1* (A), *Tac2* (B), and *Tac3* (C) in specific hypothalamic nuclei of pubertal (36-d-old) female rats. \* $p < 0.05$ , by unpaired Student's *t* test within each nucleus.

ductive function in adulthood, a function that appears to be mediated, at least partially, by its ability to autoregulate the activity of *Kiss1* neurons in the ARC (Lehman et al., 2010; Wakabayashi et al., 2010; Navarro et al., 2011a) and is dependent on preserved kisspeptin signaling (Ramawamy et al., 2011; García-Galiano et al., 2012). Yet, the precise role of NKB and its receptor in sexual maturation, and their possible interaction with metabolic status, remain largely unexplored. To address the putative contribution of NKB signaling to the onset of puberty, we evaluated here the developmental regulation of the hypothalamic NKB/NK3R system, with special attention to the pubertal transition. Studies in



**Figure 7.** A, B, Serum LH levels in pubertal 36-d-old female rats fed *ad libitum* (A) or subjected to 48 h of fasting (B) at 0, 20, and 60 min after central intracerebroventricular administration of vehicle or 600 pmol/rat senktide in a 10  $\mu$ l volume. In addition to the profiles of mean LH levels in the experimental groups, the integrated secretory responses, reported as the AUC over the study period (60 min), are shown. \*\* $p < 0.01$  versus corresponding vehicle-injected controls (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple range test or unpaired Student's *t* test; the latter for AUC data). Veh, Vehicle; Senk, senktide.

whole hypothalamic fragments, obtained serially along postnatal maturation, documented a striking profile of expression of *Tac2* and *Tac3*, with a progressive increase of both mRNAs from the neonatal/infantile to the peripubertal period, a profile that, compared with previously published data, appears to precede the elevation of hypothalamic *Kiss1* mRNA that takes place between



**Figure 8.** Compilation of indices of pubertal maturation recorded in peripubertal female rats subjected to a protocol of 30% restriction in daily food intake (UN; 70% food intake of controls), and chronically intracerebroventricularly injected with senktide (600 pmol/12 h) or vehicle between P30 and P37. For reference purposes, data from control females fed *ad libitum* and injected with vehicle are also shown. Dates of VO, expressed as the percentage over the total number of animals per each experimental group, are shown in the left panel. To note, although undernutrition prevented VO in all vehicle-injected animals, senktide administration was able to restore canalization of the vagina in ~50% of cases. Body and uterus weight records in the different experimental groups at the end of the treatment are presented in the right panels. In addition, senktide treatment significantly elevated serum LH levels. \* $p < 0.01$  vs controls fed *ad libitum*; \*\* $p < 0.01$  versus UN rats injected with vehicle (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple range test). Veh, Vehicle; Senk, senktide; BW, body weight; UW, uterus weight.

P20 and P30 in the female rat (Navarro et al., 2004a). Furthermore, the rise of *Tac2/Tacr3* expression described herein also seems to anticipate the sharp increase of kisspeptin immunoreactivity reported in the rostral periventricular area of the female mouse hypothalamus that occurs between P25 and P30 (Clarkson et al., 2009). Altogether, these observations are compatible with an eventual stimulatory role of NKB upon Kiss1/kisspeptin expression during (early) pubertal maturation. This possibility, which is yet to be experimentally tested, is in keeping with recent clinical observations suggesting that the NKB system may play a more prominent stimulatory role on the gonadotropic axis during early stages of sexual maturation (Gianetti et al., 2010).

To gain anatomical resolution, ISH studies for mapping the expression of *Tac2* and *Tacr3* genes were performed in prepubertal (P20) and pubertal (P36) animals, and detected moderate regional differences in the expression patterns of both genes between these two ages and also with the previously reported distribution in adults (Navarro et al., 2011a). Nonetheless, prominent expression of *Tac2* and *Tacr3* was observed in the ARC and LHA nuclei (and also the PVN, selectively for *Tacr3*) in both prepubertal and pubertal females. At the time of puberty, a notable increase in *Tacr3* expression was detected by ISH exclusively in the ARC. Given the prominent expression of *Tac2* in the ARC in 20- and 36-d-old females, it was anticipated that the increase in its expression between the infantile and juvenile periods (Fig. 1) would happen (mainly) in ARC neurons. However, our ISH analyses failed to detect an overt elevation of *Tac2* levels between P20 and P36 in this nucleus. As possible explanation, *Tac2* expression in the ARC might have reached rather high levels already on P20, which may obscure detection of further increases in this area. In addition, the potential contribution of increased expression of *Tac2* in other hypothalamic regions cannot be excluded. On the other hand, *Kiss1* expression did not increase significantly in the ARC during the pubertal transition, whereas it did in the AVPV, in good agreement with previous studies (Han et al., 2005; Takase et al., 2009; Bentsen et al., 2010; Gill et al., 2010). This would suggest that in the female rat most of the pubertal increase of *Kiss1* expression occurs mainly in AVPV, as recently proposed in the mouse (Gill et al., 2010). Nonetheless, it has been suggested that Kiss1 neurons in the ARC play an important role in puberty onset (Roa et al., 2011)—a contention indirectly supported also by the observations of increased *Tacr3* expression in the ARC across the pubertal transition.

In agreement with a role for NKB in the timing of puberty, its agonist, senktide, robustly induced the release of LH in prepuber-

tal females, consistent with the recently reported effects of this NKB agonist in juvenile monkeys (Ramaswamy et al., 2010) and our previous data in adult female rats (Navarro et al., 2011a). Of note, despite unambiguous hormonal responses at both ages, comparison of the magnitude of LH secretory peaks after senktide injection between P25 (juvenile) and P36 (peripubertal) females suggests a higher responsiveness to NKB stimulation during the prepubertal period, a phenomenon that may be indicative of the actual role of NKB signaling in the timing of puberty and whose physiological relevance is presently under investigation in our laboratory. Moreover, despite obvious reproductive immaturity, infantile females were also able to unambiguously respond to senktide in terms of LH secretion. This finding strongly suggests that the gonadotropic system becomes responsive to NKB stimulation well before the onset of puberty, so that low expression levels of *Tac2* during the infantile period, as reported here, may play a role in preventing the precocious activation of the gonadotropic axis. Of note, a similar phenomenon (i.e., robust LH secretory responses during the infantile stage) has been described for kisspeptin stimulation in female rats (Castellano et al., 2006), an observation that is in line with the proposed mode of action of NKB as a modulator of kisspeptin secretion and, hence, actions in GnRH neurons (Navarro et al., 2009).

In turn, persistent blockade of NKB signaling during the pubertal transition did induce a modest but detectable delay in the timing of puberty. Noteworthy, the NK3R antagonist SB222200 used in our study has been shown to block direct NKB actions on mouse Kiss1 neuron (Navarro et al., 2011b) and to blunt *in vivo* LH responses to senktide in the monkey (Ramaswamy et al., 2010), thus confirming its efficacy and selectivity. However, its effect on puberty onset was not as effective in terms of pubertal perturbation as the chronic infusion of a kisspeptin antagonist, which resulted in a marked suppression of VO and sex organ weights at the expected age of puberty (Pineda et al., 2010). Altogether, the above observations suggest a discernible stimulatory role of NKB in the timing of puberty, which is less important than—and possibly subordinated to—that of kisspeptin signaling. Yet, it remains possible that more effective protocols of NKB antagonism (e.g., starting at earlier developmental stages) may have brought about more robust suppression of different indices of puberty.

Puberty is exquisitely sensitive to body energy status and metabolic cues that impinge on different central pathways to modulate GnRH secretory activity (Hill et al., 2008; Castellano et al.,

2010). Kiss1 neurons have been proposed as nodal elements for conveying metabolic information to reproductive centers at puberty, as evidenced by the impact of metabolic stress (e.g., acute fasting) on the hypothalamic expression of Kiss1/kisspeptins in pubertal animals, and the ability of exogenous kisspeptin to rescue puberty arrest due to metabolic distress (Castellano et al., 2005). Our present findings indicate that the NKkB system is also subjected to metabolic regulation during puberty. First, the expression of *Tacr3*, and to a lesser extent *Tac2*, in the ARC was markedly suppressed in pubertal female rats by metabolic stress associated with 48 h fasting, as was *Kiss1* expression in the ARC and AVPV (see Fig. 6). Second, the LH responses to NKkB agonist administration in pubertal (P36) rats were not only preserved but even augmented in fasting conditions, suggesting a possible sensitization of its stimulatory effects under conditions of negative energy balance; again, this is similar to previous findings on the gonadotropin-releasing actions of kisspeptins (Castellano et al., 2005; Tovar et al., 2006). Finally, as previously reported for kisspeptin (Castellano et al., 2005), repeated administration of NKkB agonist was sufficient to at least partially rescue some of the indicators of puberty progression, such as VO and LH secretion, even against persistent conditions of energy deficit due to chronic subnutrition during the pubertal transition. Together, our studies suggest a role of metabolic cues in the modulation of NKkB signaling at puberty, which is likely involved in transmitting information pertaining to body energy status to the Kiss1/GnRH pathway governing puberty onset. Given our current data and the similarities with Kiss1/kisspeptin responses, it is highly plausible that such an effect is mediated, at least partially, via modulation of kisspeptin output in the ARC. However, we cannot rule out the contribution of additional, kisspeptin-independent pathways for the stimulatory effects of NKkB on the gonadotropin axis at puberty.

Puberty is a key developmental event that is under the control of an intricate network of interacting peripheral signals and central transmitters that cooperate to ensure proper pubertal maturation. Our current data are the first to thoroughly document the roles of NKkB signaling in this phenomenon, a physiological function that is seemingly linked (and possibly subordinated) to that of kisspeptins and sensitive to metabolic cues, which are likely to conduct (part of) their modulatory effects on puberty onset via regulation of the hypothalamic NKkB system.

## References

- Amstalden M, Coolen LM, Hemmerle AM, Billings HJ, Connors JM, Goodman RL, Lehman MN (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 gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 22:1–12.
- Bentsen AH, Ansel L, Simonneaux V, Tena-Sempere M, Juul A, Mikkelsen JD (2010) Maturation of kisspeptinergic neurons coincides with puberty onset in male rats. *Peptides* 31:275–283.
- Billings HJ, Connors JM, Altman SN, Hileman SM, Holaskova I, Lehman MN, McManus CJ, Nestor CC, Jacobs BH, Goodman RL (2010) Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retromammillary area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 151:3836–3846.
- Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M (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 JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castano JP, Malagon MM, Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M (2006) Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 257–258:75–83.
- Castellano JM, Bentsen AH, Mikkelsen JD, Tena-Sempere M (2010) Kisspeptins: bridging energy homeostasis and reproduction. *Brain Res* 1364:129–138.
- Chowen JA, Argente J, Vician L, Clifton DK, Steiner RA (1990) Pro-opiomelanocortin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology* 52:581–588.
- Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE (2009) Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 150:3214–3220.
- Cunningham MJ, Scarlett JM, Steiner RA (2002) Cloning and distribution of galanin-like peptide mRNA in the hypothalamus and pituitary of the macaque. *Endocrinology* 143:755–763.
- Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M (2006) Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 254–255:127–132.
- García-Galiano D, van Ingen Schenau D, Leon S, Krajnc-Franken MA, Manfredi-Lozano M, Romero-Ruiz A, Navarro VM, Gaytan F, van Noort PI, Pinilla L, Blomenröhr M, Tena-Sempere M (2012) Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. *Endocrinology* 153:316–328.
- Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, Hughes VA, Abreu AP, Carroll J, Trarbach E, Silveira LF, Costa EM, de Mendonça BB, de Castro M, Lofrano A, Hall JE, Bolu E, Ozata M, Quinton R, Amory JK, Stewart SE, et al (2010) TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 95:2857–2867.
- Gill JC, Wang O, Kakar S, Martinelli E, Carroll RS, Kaiser UB (2010) Reproductive hormone-dependent and -independent contributions to developmental changes in kisspeptin in GnRH-deficient hypogonadal mice. *PLoS One* 5:e11911.
- Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Pupa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145:4073–4077.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Pupa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE (2005) Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25:11349–11356.
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF (2008) Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E827–832.
- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL (2010) Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151:3479–3489.
- Navarro VM, Tena-Sempere M (2011) Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol* 8:40–53.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, 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 VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, 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 Physiol* 561:379–386.
- Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA (2009) Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29:11859–11866.
- Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F, Pinilla L, Clifton DK, Tena-Sempere M, Steiner RA (2011a) Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E202–E210.
- Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, García-Galiano D, Hobbs SJ, Bosch MA,

- Pinilla L, Clifton DK, Dearth A, Ronnekleiv OK, Braun RE, Palmiter RD, Tena-Sempere M, Alreja M, Steiner RA (2011b) Regulation of NKB Pathways and Their Roles in the Control of Kiss1 Neurons in the Arcuate Nucleus of the Male Mouse. *Endocrinology* 152:4265–4275.
- Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA (2009) Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 30:713–743.
- Ojeda SR, Skinner MK (2006) Puberty in the rat. In: *The physiology of reproduction* (Neill JD, ed), pp 2061–2126. San Diego: Academic/Elsevier.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau U, Matagne V (2010) New concepts on the control of the onset of puberty. *Endocr Dev* 17:44–51.
- Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkeback NE, Toppari J, Bourguignon JP (2003) The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* 24:668–693.
- Paxinos G, Watson C (2009) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th edition. New York: Academic.
- Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Morgan K, Pinilla L, Millar RP, Tena-Sempere M (2010) Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 151:722–730.
- Protter M, Morrey C (1964) *College calculus with analytical geometry*. Boston: Addison-Wesley.
- Ramaswamy S, Seminara SB, Ali B, Ciofi P, Amin NA, Plant TM (2010) Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 151:4494–4503.
- Ramaswamy S, Seminara SB, Plant TM (2011) Evidence from the agonal juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) for the view that the action of neurokinin B to trigger gonadotropin-releasing hormone release is upstream from the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology* 94:237–245.
- Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M (2008) New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 29:48–69.
- Roa J, Navarro VM, Tena-Sempere M (2011) Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments. *Biol Reprod* 85:650–660.
- Sandoval-Guzmán T, Rance NE (2004) Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1026:307–312.
- Takase K, Uenoyama Y, Inoue N, Matsui H, Yamada S, Shimizu M, Homma T, Tomikawa J, Kanda S, Matsumoto H, Oka Y, Tsukamura H, Maeda KI (2009) Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. *J Neuroendocrinol* 21:527–537.
- Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK (2009) TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 41:354–358.
- Tovar S, Vázquez MJ, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Vigo E, Roa J, Casanueva FF, 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* 147:2696–2704.
- True C, Kirigiti MA, Kievit P, Grove KL, Smith MS (2011) Leptin is not the critical signal for kisspeptin or luteinizing hormone restoration during exit from negative energy balance. *J Neuroendocrinol* 23:1099–1112.
- Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Steiner RA, Okamura H (2010) Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30:3124–3132.

## 3.2 Neurokinin B and the Control of the Gonadotropic Axis in the Rat: Developmental Changes, Sexual Dimorphism, and Regulation by Gonadal Steroids (Artículo 2).

NEUROENDOCRINOLOGY

### Neurokinin B and the Control of the Gonadotropic Axis in the Rat: Developmental Changes, Sexual Dimorphism, and Regulation by Gonadal Steroids

F. Ruiz-Pino, V. M. Navarro, A. H. Bentsen, D. Garcia-Galiano, M. A. Sanchez-Garrido, P. Ciofi, R. A. Steiner, J. D. Mikkelsen, L. Pinilla, and M. Tena-Sempere

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology (F.R.-P., V.M.N., D.G.-G., M.A. S.-G., L.P., M.T.-S.), University of Córdoba; CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (F.R.-P., D.G.-G., M.A. S.-G., L.P., M.T.-S.), Instituto de Salud Carlos III; and Instituto Maimónides de Investigaciones Biomédicas (F.R.-P., V.M.N., D.G.-G., M.A.S.-G., L.P., M.T.-S.), 14004 Córdoba, Spain; Neurobiology Research Unit (A.H.B., J.D.M.), Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, DK-2100 Copenhagen, Denmark; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Neurocentre Magendie-u862 (P.C.), Institut François Magendie, 33077 Bordeaux, France; and Departments of Obstetrics and Gynecology (R.A.S.), and Physiology and Biophysics (R.A.S.), University of Washington, Seattle, Washington 98195

Neurokinin B (NKB), encoded by *Tac2* in rodents, and its receptor, NK3R, have recently emerged as important regulators of reproduction; NKB has been proposed to stimulate kisspeptin output onto GnRH neurons. Accordingly, NKB has been shown to induce gonadotropin release in several species; yet, null or even inhibitory effects of NKB have been also reported. The basis for these discrepant findings, as well as other key aspects of NKB function, remains unknown. We report here that in the rat, LH responses to the NK3R agonist, senktide, display a salient sexual dimorphism, with persistent stimulation in females, regardless of the stage of postnatal development, and lack of LH responses in males from puberty onward. Such dimorphism was independent of the predominant sex steroid after puberty, because testosterone administration to adult females failed to prevent LH responses to senktide, and LH responsiveness was not restored in adult males treated with estradiol or the nonaromatizable androgen, dihydrotestosterone. Yet, removal of sex steroids by gonadectomy switched senktide effects to inhibitory, both in adult male and female rats. Sexual dimorphism was also evident in the numbers of NKB-positive neurons in the arcuate nucleus (ARC), which were higher in adult female rats. This is likely the result of differences in sex steroid milieu during early periods of brain differentiation, because neonatal exposures to high doses of estrogen decreased ARC NKB neurons at later developmental stages. Likewise, neonatal estrogenization resulted in lower serum LH levels that were normalized by senktide administration. Finally, we document that the ability of estrogen to inhibit hypothalamic *Tac2* expression seems region specific, because estrogen administration decreased *Tac2* levels in the ARC but increased them in the lateral hypothalamus. Altogether, our data provide a deeper insight into relevant aspects of NKB function as major regulator of the gonadotropic axis in the rat, including maturational changes, sexual dimorphism, and differential regulation by sex steroids. (*Endocrinology* 153: 4818–4829, 2012)

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170  
Printed in U.S.A.  
Copyright © 2012 by The Endocrine Society  
doi: 10.1210/en.2012-1287 Received March 13, 2012. Accepted July 5, 2012.  
First Published Online July 20, 2012

Abbreviations: ARC, Arcuate nucleus; AUC, area under the curve; DHT, dihydrotestosterone; E2, 17 $\beta$ -estradiol; EB, estradiol benzoate; GNX, gonadectomized/gonadectomy; icv, intracerebroventricular; IHC, immunohistochemistry/immunohistochemical; ISH, *in situ* hybridization; KNDy, kisspeptin/neurokinin B/dynorphin; LHA, lateral hypothalamus; MCH, melanin-concentrating hormone; NKB, neurokinin B; NK3R, NKB receptor; NKB-ir, NKB immunoreactive; ORX, castrated/castration; OVX, ovariectomized/ovariectomy; T, testosterone.

4818 endo.endojournals.org Endocrinology, October 2012, 153(10):4818–4829

The secretion of GnRH is driven by the dynamic interplay of numerous central and peripheral factors (1). Among the central regulators, neurokinin B (NKB) has drawn special attention recently. This is mainly because of findings of human genetic studies, linking loss-of-function mutations in *TAC3* and *TACR3* genes (encoding NKB and its receptor, NK3R, respectively) with hypogonadotropic hypogonadism and infertility (2, 3). These observations prompted the reassessment of the physiological roles of the NKB/NK3R system in the control of the gonadotropic axis in mammals. Thus, initial studies in gonadectomized (GNX) female rodents documented inhibitory actions of NKB on gonadotropin secretion (4), which seemed contradictory to the predicted stimulatory actions of NKB suggested by human genetic studies (2, 3). However, compelling evidence has recently demonstrated a predominant stimulatory role of NKB on GnRH/gonadotropin release in different mammalian species (5–13). Admittedly, however, null responses and even inhibitory actions of the agonist of NK3R, senktide, on LH secretion have been also reported lately in rodents (7, 14, 15); the latter mainly in GNX female models without sufficient 17 $\beta$ -estradiol (E2) replacement. In fact, differences in the sex steroid milieu, and eventually in the prevailing gonadotropin levels, have been proposed to play a role in such a paradoxical switch between the stimulatory and inhibitory effects of NKB, with inhibitory actions being detected in conditions of null/low sex steroid replacement and enhanced gonadotropin levels (16).

Anatomically, NKB is coexpressed in the arcuate nucleus (ARC) with kisspeptin and dynorphin A (5, 6, 13, 17) in a population of neurons, also termed KNDy (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin), which is subjected to regulation by sex steroids through estrogen receptor- $\alpha$  (18, 19) and androgen receptor (8, 20). Recent experimental evidence suggests that NKB from this neuronal population participates in the (auto)regulation of kisspeptin output from KNDy neurons and thereby critically contributes to two key physiological events: the timing of puberty onset and the shaping of kisspeptin (and hence GnRH) pulsatile release (16). This hypothetical model for NKB-regulatory actions was initially developed based on neuroanatomical and hormonal data from different mammalian species (7) and has been recently supported by findings showing that 1) ARC Kiss1 neurons are activated by senktide in rats and mice, as demonstrated by *c-fos* induction and electrophysiological recordings, respectively (7, 8); and 2) the stimulatory actions of senktide are severely attenuated, if not totally lost, in the absence of proper kisspeptin signaling in mice and monkeys (10, 12).

Despite the recent progress in the field, some aspects of NKB function as up-stream regulator of kisspeptin signal-

ing in the reproductive brain remain partially unknown. These include not only the elucidation of the mechanisms underlying the switch between stimulatory and inhibitory actions of NKB, but also the physiological relevance of such NKB-dependent gonadotropin regulation during the lifespan and its modulation by sex steroids. Notably, NKB expression in the ARC is suppressed by sex steroids (5, 7, 21); hence, ARC NKB has been suggested to participate in the negative feedback regulation of gonadotropins. In addition, previous studies had documented a marked sexual dimorphism of ARC NKB neuronal population in the sheep, with higher number of NKB neurons in females that was reverted by prenatal androgenization (22, 23). Likewise, a sexual dimorphism in the pattern of axonal distribution of NKB neurons has been described in the rat (24, 25). This dimorphism, however, was shown to emerge progressively during puberty and seemed to be dependent on pubertal exposure to the rising levels of testosterone (T) (24, 25). To our knowledge, the functional relevance of such dimorphism has not been experimentally addressed in rodents.

In the present work, we aimed to shed further light on the role of NKB signaling in the control of the gonadotropic axis in the rat, with special attention to its interplay with developmental cues and sex steroids. To this end, LH responses to senktide were monitored in male and female rats at different stages of postnatal maturation and after manipulation of sex steroid milieu in the early (neonatal) period and adulthood. Hormonal studies were coupled with expression analyses, addressing changes in either numbers of NKB neurons or *Tac2* (gene encoding NKB in rodents) mRNA expression after the above sex steroid manipulations.

## Materials and Methods

### Animals and drugs

Wistar rats bred in the vivarium of the University of Córdoba, Spain, were used. The day the litters were born was considered as d 1 of age. The animals were maintained under constant conditions of light (14 h of light, from 0700 h) and temperature (22 C) and were weaned at 21 d postpartum, when they were housed in groups of five rats per cage and with free access to standard rat chow and water *ad libitum*. For hormonal tests involving intracerebroventricular (icv) cannulation, rats were caged individually from the day before cannulae implantation until termination of experiments. Correct positioning of the cannulae was checked by visual inspection, to exclude animals showing obvious displacement or deattachment, and was confirmed at necropsy by serial coronal sectioning of randomly selected animals, a procedure that confirms that (virtually) all animals displayed proper location of the cannulae as to allow delivery into the lateral ventricle. Experimental procedures were approved by the Uni-



versity of Córdoba Ethical Committee for animal experimentation and were conducted in accordance with the European Union normative for care and use of experimental animals.

The NK3R agonist, senktide, and the sex steroids, testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT), E2, and estradiol benzoate (EB), were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The dose of senktide, 600 pmol of senktide in 10  $\mu$ l of physiological saline, 0.9% NaCl, was selected on the basis of previous references because it is maximally effective in inducing gonadotropin responses in the rat (4, 7). For experiments involving adult female rats, adult virgin animals were daily monitored by vaginal cytology to confirm the occurrence of regular estrous cycles; only rats with at least two consecutive regular 4-d estrous cycles were subsequently used for hormonal and molecular analyses, as previously described (26). In addition, for experiments involving ovariectomy (OVX) and steroid replacement, groups of adult female rats were subjected to bilateral gonadectomy (GNX) via abdominal incision under light ether anesthesia 2 wk before hormonal tests or tissue sampling. Likewise, groups of adult male rats were castrated (ORX) through a single abdominal incision. Immediately after GNX, capsules filled with E2, T, or DHT were implanted sc via a small midscapular incision at the base of the neck; wound clips were used to close the incision. Sham-operated animals served as GNX controls. SILASTIC tubing (Dow Corning Corp., Midland, MI; 20 mm long, 0.62 mm inner diameter, 1.25 mm outer diameter) was used for capsule preparation. Dilutions of crystalline E2 at a low dose (100  $\mu$ g/ml, in olive oil) were used for capsule filling; this dose was selected to achieve moderate levels of circulating E2, as previously described (7). Similarly, in animals with androgen replacement, capsules filled with crystalline T or DHT were used, as described previously (8).

#### Experimental design

##### **LH responses to the NKB agonist, senktide, at different developmental stages in male and female rats (experiment 1)**

The ability of the NKB agonist, senktide, to acutely modify LH secretion in male and female rats ( $n = 10$ – $12$  rats per group), at different stages of postnatal development, was first explored. To this end, central administration of senktide into the lateral cerebral ventricle was conducted in both male and females during infantile (10 d), juvenile/prepubertal (25 d and 30 d), pubertal (36 d in female and 45 d in male), and adult (60 d) stages; the latter (adult female rats) were confirmed to display regular estrous cyclicity by monitoring of vaginal smears and were sampled in the morning of diestrus 1. To allow delivery of senktide or vehicle into the lateral cerebral ventricle, animals were implanted with icv cannulae lowered to a depth of 3 (prepubertal) or 4 (adult) mm beneath the surface of the skull; the insert point was placed 1 mm posterior and 1.2 mm lateral to bregma. Hormonal tests were conducted at least 1–2 d after implantation of cannulae, a time point when animals were fully recovered. Blood samples were collected 20 min after senktide injection. Animals injected with vehicle (physiological saline, 0.9% NaCl) served as controls. To note, because attenuated to null responses to the standard dose of 600 pmol were consistently detected in males, testing of the effects of a single bolus of 3 nmol senktide icv was also conducted selectively in prepubertal (25-d-old) males, following a similar experimental procedure.

##### **LH responses to senktide in adult GNX rats, with or without sex steroid replacement (experiments 2 and 3)**

Experiment 1 documented a clear-cut sexual dimorphism in LH responses to senktide from puberty onward, with no secretory responses being detected in adult males. Therefore, we aimed to analyze whether this phenomenon is a consequence of the different postpubertal steroid milieu in males *vs.* females. To this end, in experiment 2, the effect of icv injection of a bolus of senktide on LH secretion was assessed in intact adult male and female rats, as well as in OVX or ORX rats supplemented with T or E2, respectively (*i.e.* sex steroid switched). In addition, to complement this initial experiment, in experiment 3, similar tests were implemented either in GNX male and female rats without sex steroid replacement, or in OVX and ORX rats subjected to hormonal replacement with effective doses of DHT. Thus, a total of eight groups ( $n = 10$ – $12$  rats per group) were studied: 1) Cyclic adult female rats at diestrus-1; only females displaying at least two consecutive regular cycles and cytological features of diestrus-1 in the morning of the hormonal test were used. 2) Adult OVX rats, without sex steroid replacement (sham). 3) OVX rats supplemented with T (OVX + T); T-containing capsules were implanted sc into adult OVX rats, as described above. 4) OVX rats supplemented with DHT (OVX + DHT); DHT-containing capsules were implanted to OVX rats, as described above. 5) Adult male rats; age paired to females. 6) Adult ORX rats, without sex steroid replacement (sham). 7) ORX rats supplemented with E2 (ORX + E2); E2-containing capsules were implanted sc into adult ORX rats, as described above. 8) ORX rats supplemented with DHT (ORX + DHT); DHT-containing capsules were implanted in adult ORX rats, as described above. In each group, the animals were icv injected with senktide, and blood samples were serially obtained by jugular venipuncture before (0 min), and at 20, 60, and 120 min after icv injection. Animals injected with physiological saline served as controls.

##### **Analyses of NKB-ir and LH responses to senktide in neonatally estrogenized male and female rats (experiments 4 and 5)**

To address other aspects of the functional organization of the NKB system, in the next set of experiments we analyzed the influence of the steroid environment during the neonatal period, as critical window for brain differentiation, on key structural and functional features of this system in later (pubertal/adult) developmental stages. To this end, in experiment 4, groups ( $n = 5$ – $7$ ) of 1-d-old male and female rats were injected with a single bolus of a high dose of EB (500  $\mu$ g/rat for males; 100  $\mu$ g/rat for females), following standard procedures of neonatal estrogenization. Of note, EB was dissolved in olive oil and injected sc, thus allowing a depot release over several days after neonatal injection, a period that actually covers most of the postnatal window of brain sex differentiation in rats (27). Vehicle-injected animals (olive oil; 100  $\mu$ l sc) served as controls. This protocol was selected on the basis of our previous studies, because it was found to be the most effective in inducing complete estrogenization. In adulthood, NKB-positive cells were counted in the ARC of adult male and female rats, subjected or not to neonatal estrogenization, using standard immunohistochemical (IHC) procedures. Demonstration of the impact of neonatal treatments with EB on the NKB content in the ARC prompted us to conduct experiment

5, where the ability of senktide to elicit LH secretion was assessed in young (>45-d-old) adult male and female rats subjected to neonatal estrogenization. Estrogenized male and female rats (n = 10–12/group) were icv injected with a single dose of senktide, and blood samples were collected after 20 min for LH determinations. Animals injected with saline served as controls.

#### **Effect of E2 replacement on Tac2 expression in the hypothalamus of female rats (experiment 6)**

The ability of sex steroids to decrease *Tac2* mRNA expression in the ARC has been previously reported for both sexes in a number of species (5, 7, 18, 28–30). To note, *Tac2* mRNA presents a widespread distribution in the brain (7, 31). Moreover, within the hypothalamus, it is expressed in a number of different areas, including not only the ARC but also the lateral hypothalamus (LHA), which is relevant in the control of reproductive and related functions; nevertheless, analysis of sex steroid regulation of *Tac2* has been mostly restricted to the ARC. In this experiment, we aimed to compare the effects of E2 on the expression of *Tac2* mRNA in the LHA, as a potentially relevant nucleus in the control of gonadotropin release, and the ARC of OVX female rats, replaced or not with effective doses of E2. To this end, animals were OVX and implanted sc with E2-containing capsules (n = 5/group), as described above. OVX animals implanted with empty capsules served as controls. Animals were euthanized 1 wk after surgery by decapitation in the morning (1000 h), and trunk blood and brains were collected, frozen on dry ice, and stored at –80 C for *in situ* hybridization (ISH). Plasma levels of LH and uterine weight were measured to determine the efficacy of the hormone replacement.

#### **Tissue preparation**

Blood was centrifuged to isolate the serum, which was stored at –20 C until hormone measurements. Uteri were removed and weighed to provide an indirect marker of plasma E2 levels and of their biological effect. In selected experiments (see experiment 5), brains were removed for ISH, frozen on dry ice, and then stored at –80 C until sectioned. Five sets of 20- $\mu$ m sections in the coronal plane were cut on a cryostat, from the diagonal band of Broca to the mammillary bodies, thaw mounted onto SuperFrost Plus slides (VWR Scientific), and stored at –80 C. A single set was used for ISH (adjacent sections 100  $\mu$ m apart).

#### **NKB immunohistochemistry (IHC)**

IHC assays were conducted in hypothalamic sections of brain samples from adult male and female rats, subjected to standard protocols of neonatal estrogenization, as described earlier in this section. The animals were perfused through the ascending aorta, under ketamine-xylazine anesthesia, with 250 ml fixative solution (4% paraformaldehyde) (32, 33). Brains were collected, immersed in fixative overnight, and cryoprotected in 30% sucrose for 2–4 d. Coronal sections (40  $\mu$ m thick) were cut in parallel series of four on a freezing microtome, and one series of sections covering the entire rostro-caudal extension of the ARC was processed for detection of NKB-immunoreactivity (ir).

The sections were incubated in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS to block endogenous peroxidase activity and in 0.01 M PBS with 0.3% Triton X-100, 5% swine serum, and 1% BSA to block nonspecific binding sites. The sections were then incubated at 4 C for 24 h with a purified rabbit antiserum against NKB (IS-39; dilution

1:5000), as described in detail elsewhere (24, 25). This antiserum has been previously used to successfully label NKB neurons and fibers in rats (24, 25). NKB-ir was detected by the avidin-biotin method using diaminobenzidine as chromagen. The sections were incubated for 60 min in biotinylated secondary antirabbit IgG (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) diluted 1:1000, and washed and transferred to the avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluted 1:250. Thereafter, the sections were incubated in 0.1% diaminobenzidine (Sigma). The sections were mounted on gelatinized glass slides, dried, and coverslipped in Pertex. Positive cell bodies were counted bilaterally throughout the extent of the ARC by an observer blinded to the identity of each section. The total counts were multiplied by 4 as to represent the total number of NKB-ir neurons in the ARC of each animal.

#### **RIA for LH**

Serum LH levels were measured in 50- $\mu$ l samples using a double-antibody method and RIA kits supplied by the National Institutes of Health (Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA). Rat LH-I-10 was labeled with <sup>125</sup>I with the use of Iodo-gen tubes, following the instructions of the manufacturer (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Hormone concentrations were expressed with the reference preparation LH-RP-3 as a standard. Intraassay and interassay coefficients of variation were less than 8% and 10%, respectively. The sensitivity of the assay was 5 pg/tube.

#### **Detection of Tac2 mRNA-probe generation**

The probe used for the detection of *Tac2* mRNA was as described previously (5). A sense probe for *Tac2* was used as control for the specificity of the ISH procedures, which are outlined below.

#### **Single-label ISH of Tac2 mRNA**

*Tac2* mRNA sense and antisense probes were transcribed with T7 or T3 polymerase (Fermentas, Inc., Glen Burnie, MD), as described previously (5). Briefly, radiolabeled probes were synthesized *in vitro* by inclusion of the following ingredients in a volume of 20  $\mu$ l: 250 Ci [<sup>33</sup>P]UTP (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences), 1  $\mu$ g of PCR product, 0.5 mM each ATP, CTP, and GTP, and 40 U of polymerase. Residual DNA was digested with 4 U of deoxyribonuclease (Ambion, Austin, TX), and the deoxyribonuclease reaction was terminated by addition of 2  $\mu$ l of 0.5 M EDTA, pH 8.0. The riboprobes were separated from unincorporated nucleotides with NucAway Spin Columns (Ambion). Slides with rat hypothalamic sections from the different experimental groups, covering the key nuclei/areas under analysis (namely, ARC and LHA), were processed as reported previously (7).

#### **Quantification and analysis of Tac2 mRNA**

Brain sections were divided in five sets every 20  $\mu$ m (thickness of slice); thus, within each set, sections were 100  $\mu$ m apart. Brain sections were analyzed unilaterally. Slides from all of the animals were assigned a random three-letter code, alphabetized, and read under dark-field illumination with custom-designed software designed to count the total number of cells and the number of silver grains (corresponding to radio-labeled *Tac2* mRNA) over each cell. Data are presented as total mRNA content, depicting the

number of cells within the coronal sections containing the hypothalamic nucleus studied for each set (one section every 100  $\mu\text{m}$ ), not the total mRNA in this specific nucleus. The starting and ending point of quantification was determined according to the atlas of Paxinos and Franklin (48).

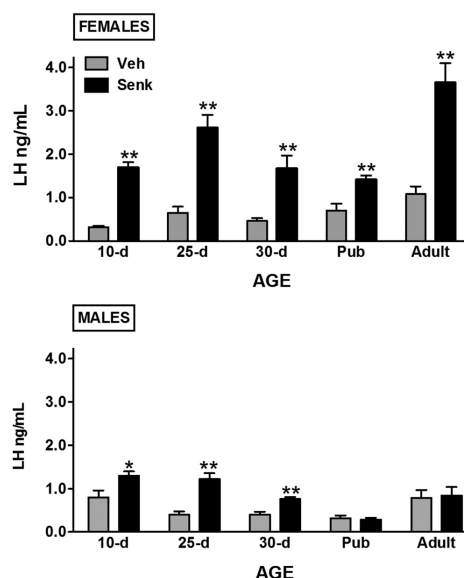
#### Statistical analysis

All data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for each group. In addition, when appropriate, integrated LH secretory responses expressed as the area under the curve (AUC) were calculated following the trapezoidal rule (34), over the 120-min period after the administration of senktide. ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test or Student's nonparametric *t* test were used to assess variation among experimental groups. Significance level was set at  $P \leq 0.05$ . All analyses were performed with GraphPad Prism Software, Inc. (San Diego, CA).

### Results

#### LH responses to the NKB agonist, senktide, in male and female rats during postnatal maturation

Senktide (600 pmol) was injected centrally to male and female rats at different stages of postnatal maturation; namely, at infantile (10 d), juvenile/prepubertal (25 d and 30 d), pubertal (36 d in female and 45 d in male), and adult (>60 d) ages. Of note, for adult cyclic females, hormonal tests were conducted in the morning of diestrus 1. This phase has been shown to be sensitive to the stimulatory effects of senktide on LH secretion (7) and is devoid of major changes in endogenous gonadotropin levels, as those seen in the proestrus-to-estrus transition. Nonetheless, results obtained at this phase are likely representative of other stages, because our previous work has documented clear-cut LH responses to the NKB agonist at other phases of the cycle and in E2-supplemented OVX rats (7). Conspicuous LH responses were detected 20 min after icv injection of senktide in female rats, at all ages tested (see Fig. 1, upper panels; \*\*,  $P \leq 0.01$ ), with a relative magnitude of 2- to 4-fold increase over vehicle-injected values depending on the developmental stage. In contrast, male rats displayed markedly attenuated LH responses to senktide during postnatal maturation. Indeed, modest, albeit significant (\*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ), LH responses were detected in infantile and juvenile/prepubertal males but the magnitude of such responses was lower than in corresponding pair-aged females (see Fig. 1, lower panels). Moreover, from puberty onward, male rats became unresponsive to senktide, with null LH responses to the NKB agonist in pubertal (45-d-old) and adult male rats. Of note, the attenuated LH responses to senktide in prepubertal males cannot be attributed to the submaximal dose used in our experiments, because icv injection of 3 nmol senktide evoked LH secretory bursts similar in magnitude

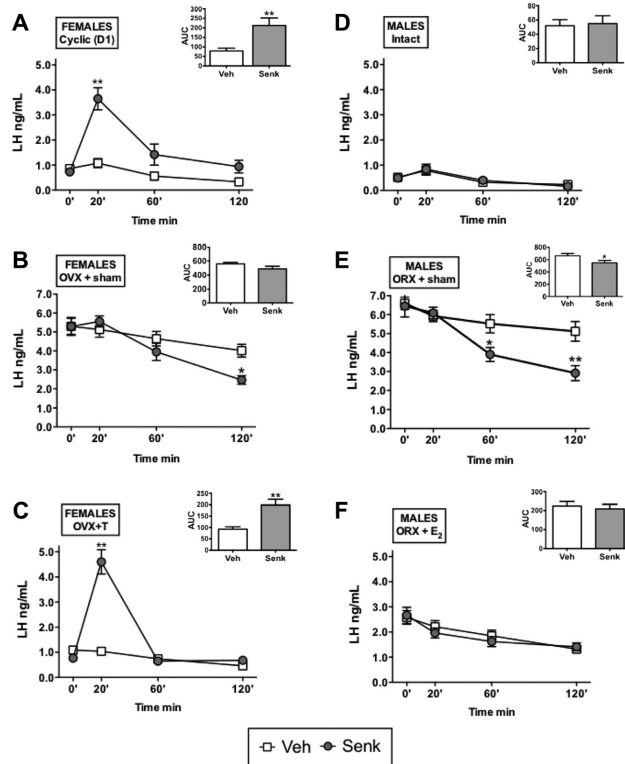


**FIG. 1.** LH responses to NKB agonist, senktide, in male and female rats during postnatal maturation. Male and female rats, at different postnatal ages (indicated on x-axis), were icv injected with an effective dose (600 pmol) of senktide or vehicle, and blood samples were obtained after 20 min for LH determinations. Pubertal animals were 36 d old for females and 45 d old for males. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  vs. corresponding vehicle-injected groups (Student's *t* test). Pub, Pubertal; Senk, senktide; Veh, vehicle.

to those elicited by the 600-pmol dose of the agonist (LH levels at 20 min after icv senktide or vehicle injection: vehicle =  $0.39 \pm 0.08$  ng/ml; senktide 600 pmol =  $1.22 \pm 0.14$  ng/ml; senktide 3 nmol =  $1.18 \pm 0.18$  ng/ml).

#### Influence of actual sex steroids levels on sexually dimorphic LH responses to senktide in adult rats

Our hormonal tests in male and female rats demonstrated a marked sexual dimorphism in LH responses to central administration of senktide. To assess whether such dimorphism may be due to differences in the circulating levels of the main sex steroid (T in males; E2 in females), the effects of senktide in intact adult male and female rats were compared with those of sex steroid-switched animals (OVX+T females and ORX+E2-replaced males); LH responses were monitored at 20, 60, and 120 min after icv injection of senktide. In addition, the above studies were complemented by similar analyses in GNX animals without sex steroid replacement and in OVX and ORX rats supplemented with DHT, as a means to discriminate between androgen- vs. estrogen-specific effects.



**FIG. 2.** LH responses to senktide in adult male and female rats after manipulation of the sex steroid milieu. LH secretory responses to the NKB agonist, senktide, were studied in the following groups: adult cyclic female rats (at diestrus 1; panel A), adult male rats (panel D), OVX female rats implanted with empty capsules (OVX+sham; panel B), ORX male rats implanted with empty capsules (ORX+sham; panel E), OVX rats supplemented with T (OVX+T; panel C), and ORX rats and supplemented with E2 (ORX+E2; panel F). The animals were icv injected with an effective dose (600 pmol/rat) of senktide or vehicle, and blood samples were obtained before (0 min) or at 20, 60, and 120 min after injection. In addition to time course profiles, integral LH secretory responses (AUC) during the 120 min after icv injection of senktide or vehicle are also shown for each experimental group in the insets. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  vs. corresponding values in vehicle-injected animals (for time course data: ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple range test; for AUC data: Student's  $t$  test). Senk, Senktide; Veh, vehicle.

Detailed time-course analyses confirmed the patterns of LH response to central senktide injection in gonadal-intact, adult female, and male rats. Thus, in cyclic female rats in diestrus 1, activation of NK3R induced a significant increase in serum LH levels at 20 min, which was followed by a progressive decline at 60 and 120 min after senktide administration; overall, senktide injection evoked a 3-fold increase in LH secretory mass, estimated as the AUC during the 120 min after icv injection (Fig. 2-A). In contrast, in adult male rats, no LH response was detected at any time

point after central administration of senktide (Fig. 2D). In clear contrast, in GNX rats (without sex steroid replacement), LH secretion was actually inhibited by central injection of senktide in both sexes. In these groups, the expected rise of basal, preinjection levels of LH due to GNX was clearly detectable. In both male and female GNX animals, icv administration of senktide lowered circulating LH levels *vs.* corresponding values in vehicle-injected groups. This inhibitory effect became significant at 60 min (only males) and 120 min (both males and females) after senktide injection (Fig. 2, B and E).

Effectiveness of sex steroid replacement in our models was demonstrated by the lowering (to a different extent) of basal preinjection LH levels in GNX animals, compared with the circulating LH concentrations in OVX and ORX rats without sex steroid replacement. As per sex steroid-switched groups, T administration to OVX rats returned basal LH levels to the physiological range (*i.e.* to levels similar to those seen in adult males), whereas our protocol of E2 administration, despite being effective in inducing a marked and significant suppression of basal LH concentrations, did not bring those values to the physiological range, therefore suggesting a submaximal replacement. In this context, T supplementation of OVX female rats failed to prevent the induction of LH release by senktide in females, which displayed a significant 3- to 4-fold increase at 20 min and in the integral LH secretory (AUC) mass during 120 min after senktide injection, which was roughly similar to the profile

of cyclic female rats (Fig. 2C). In turn, despite the fact that E2 treatment significantly lowered basal LH levels in ORX male rats, such replacement did not rescue LH responsiveness to senktide, so that ORX+E2 rats behaved as intact males (not as females) in terms of LH responses to the NKB agonist (Fig. 2F).

The above trends were confirmed by our DHT-replacement experiments in GNX female and male rats. Of note, despite the use of doses similar to those of T supplementation, DHT evoked a marked suppression of basal LH

levels, which dropped to nearly 20% of basal values in gonadal intact female and male rats. Nonetheless, OVX rats treated with such a supraphysiological doses of DHT retained their ability to respond to senktide, which induced an approximately 2.5-fold increase in LH levels at 20 min over the corresponding values in vehicle-injected controls. In contrast, DHT-supplemented male rats did not display any detectable LH response to senktide, at any time point studied over the 120 min after its icv administration (Supplemental Fig. 1 published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>).

**NKB-ir and LH responses to senktide in neonatally estrogenized male and female rats**

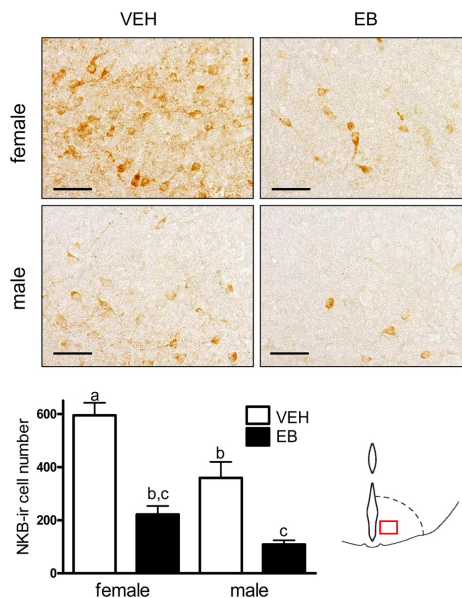
Because the above results suggested that the predominant adult sex steroid milieu (androgens in males; estrogens in females) is not the major determinant for the sexual dimorphism of LH responses to senktide, we sought to determine whether these differences might be wired from early stages of brain sexual differentiation. Two complementary approaches were undertaken to address this issue. First, we assessed in adulthood the numbers of NKB immunoreactive (NKB-ir) neurons in the ARC of neonatally estrogenized male and female rats, by means of IHC. Second, we evaluated potential changes in basal LH levels and responses to senktide in young male and female rats subjected to similar protocols of neonatal estrogenization.

A single bolus of EB on postnatal d 1 led to a persistent, and significant, reduction of the number of NKB-ir neurons in the ARC of adult animals of both sexes, compared with vehicle-treated animals (Fig. 3). Of note, control females exhibited significantly higher amounts of NKB-ir cells than control males ( $P \leq 0.5$ ); this sexual dimorphism was obliterated by neonatal EB treatments, which markedly decrease NKB cell numbers in both sexes.

In addition to the above changes in NKB-ir neurons in the ARC, neonatal estrogenization evoked a dramatic decrease in circulating LH levels in young male and female rats, compared with their controls (\*\*,  $P \leq 0.01$ ), suggesting a functional coupling between lower NKB expression and reduced LH secretion in these animals with perturbed hypothalamic brain differentiation. Such association was further backed up by the finding that senktide administration to neonatally estrogenized rats was able to normalize LH levels in both male and female animals (see Fig. 4).

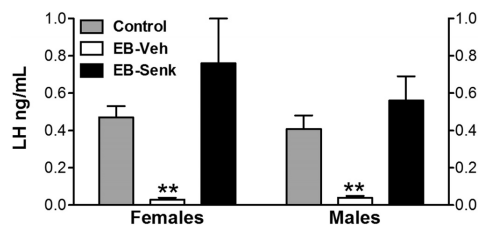
**Regulation of *Tac2* expression by E2 in the ARC and LHA of adult female rats**

In addition to the early organizing effects of estrogen on NKB neuronal populations in the ARC, we evaluated the



**FIG. 3.** Number of NKB-ir neurons in the ARC of male and female rats after neonatal estrogenization. NKB-ir cells were counted in the ARC of adult male and female rats, treated neonatally with vehicle (controls) or an effective dose of EB. Representative photomicrographs of IHC assays are shown for the four groups, at  $\times 40$  magnification. Quantitative values of NKB-ir neurons within the ARC in the corresponding experimental groups are provided in the histogram. In addition, a schematic drawing depicting the area of counting of NKB-ir cells has been included. Groups with different superscript letters are statistically different (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple range test). Bar, 50  $\mu$ m. VEH, Vehicle.

impact of acute E2 exposures on NKB expression in different hypothalamic areas, by ISH analyses of *Tac2* mRNA levels. Of note, whereas the organizing effects of



**FIG. 4.** LH levels in neonatally estrogenized rats, in basal conditions, and after senktide injection. LH levels are shown for young female and male rats, from three different experimental conditions: Controls (neonatally injected with vehicle); EB-Veh (neonatally estrogenized rats, 20 min after injection of vehicle); and EB-Senk (neonatally estrogenized rats, 20 min after injection of 600 pmol senktide). \*\*,  $P < 0.01$  vs. corresponding values in control animals (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple-range test). Senk, Senktide; Veh, vehicle.

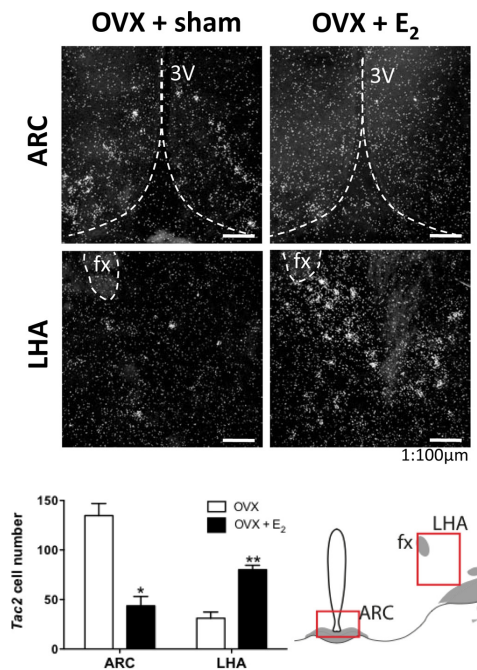
early sex steroid exposures were explored using IHC (see above), because this technique may eventually allow a better appreciation of plastic changes of the population of NKB neurons at later ages, the transient regulatory effects of E2 in adulthood were assessed by ISH, because this approach is better suited for the appreciation of (eventually, subtle) quantitative changes in expression, as extensively documented in previous literature. Our studies confirmed that E2 replacement for 1 wk to adult OVX female rats induced a significant decrease in *Tac2* mRNA levels in the ARC (\*,  $P \leq 0.05$ ), in keeping with previous references (5, 7, 8, 18, 28, 30) (Fig. 5). However, our studies also documented that estrogen regulation of *Tac2* expression in the hypothalamus is region specific because *Tac2* re-

sponses to E2 supplementation were diametrically opposite in the LHA in the same animals, in which a significant increase in *Tac2* mRNA levels was detected in OVX + E2 rats (\*\*,  $P \leq 0.01$ ; Fig. 5).

### Discussion

Recent reports have documented robust stimulatory actions of NKB (or its agonist, senktide) on gonadotropin secretion in a number of mammalian species (5–13). These findings are in keeping with the reported phenotype of hypogonadotropic hypogonadotropism in humans (2, 3), and subfertility in mice (35), with inactivating mutations of the NKB/NK3R system. However, conflicting results on the ability of NKB/senkide to regulate LH secretion can be found in the literature, with negligible or even inhibitory responses being reported in specific experimental conditions (14, 15). In fact, rodent GNX models without physiological replacement of sex steroids appear to display conspicuous inhibitory LH responses to NKB (4, 7, 15), therefore suggesting that the presence of sex steroids and/or the prevailing gonadotropin levels may be major contributing factors for the repertoire of regulatory effects (from stimulatory to null or inhibitory) of NKB of gonadotropin release. Admittedly, however, our understanding of the gonadotropic effects of NKB remains incomplete, mainly because most of the analyses on this issue have been carried out so far in adult females. Our present data provide a comparative view of the profiles of LH responses to NKB stimulation during the postnatal maturation in male and female rats. As most salient findings, our hormonal analyses disclose that, in the rat, 1) LH responsiveness to NKB is consistently higher in females than in males, with females being responsive to senktide regardless of the stage of postnatal maturation; and 2) male rats become unresponsive to NKB activation from puberty onward, therefore unveiling a marked sexual dimorphism in the actual roles of the NKB system in adulthood in this species.

In keeping with previous reports on the stimulatory effects of kisspeptins during early postnatal maturation (36), our present data demonstrate that NKB can evoke unambiguous LH secretory responses in immature male and female rats, well before puberty onset. However, although LH responses to kisspeptin-10 were equally robust in infantile and prepubertal male and female rats (36), our current results disclose that the magnitude of NKB effects is much higher in immature females, whereas pubertal and adult male rats become unresponsive to the NKB agonist in terms of LH secretion. The above observations, together with our recent findings on the up-surge of *Tac2* and *Tacr3* expression in the hypothalamus during prepubertal mat-



**FIG. 5.** *Tac2* mRNA levels in the ARC and LHA after estrogen administration to adult OVX female rats. *Tac2* mRNA levels in the ARC and LHA were assessed by ISH in adult female rats, subjected to OVX and hormonal replacement with E2. For further details see *Materials and Methods*. In addition to representative photomicrographs, quantitative values of numbers of *Tac2*-expressing neurons in the indicated hypothalamic areas of the different experimental groups are provided in the *histogram* (lower panel). The most relevant landmarks (third ventricle, 3V; fornix, Fx), as well as the neuroanatomical areas selected for quantitative analyses, are also displayed in the representative *photomicrographs* and the associated *cartoon*, respectively. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  vs. corresponding OVX values (Student's *t* test).

uration (9), suggest a potential role of NKB signaling in the central activational events leading to puberty onset, especially in the female. Considering the hypothetical model for NKB modulation of kisspeptin output of KNDy neurons (16), and the fact that in the female rat the increase in hypothalamic *Tac2* expression seems to slightly precede that of *Kiss1* (9), our present data are compatible with a putative role of NKB as (one of) the driving signals for the increase in the kisspeptin tone that takes place during puberty. This might explain why the LH-secretory effects of senktide are of higher magnitude in prepubertal rats, when the endogenous kisspeptin release is still low but could be considerably enhanced by NKB, than in peripubertal animals, in which kisspeptin release is already high and further stimulation by NKB might only be of moderate amplitude. In addition, our present results suggest differences in the physiological role and relative importance of NKB (auto)-regulatory actions between male and female rats. Likewise, considering our recent demonstration of very potent stimulatory actions of senktide on *Kiss1* neurons and LH release in adult male mice (8, 10), our current findings reveal also striking divergences regarding the ability of NKB to stimulate LH secretion between two, otherwise closely related species (rat and mouse). Admittedly, the basis for the above phenomena is yet to be elucidated and warrants further investigation.

Given the marked differences in LH responses to the NKB agonist between adult male and female rats, we sought to determine whether such divergent responses might stem from the differences in the circulating levels of the predominant sex steroids in adulthood. Our studies in sex steroid-switched animals strongly suggest that this is not the case. Thus, adult female rats exposed to T levels supposedly comparable to those of adult males (as reflected by basal LH levels) retained a feminine pattern of LH response to senktide, whereas E2-treated adult males did not acquire the capacity to respond to the NKB agonist. Moreover, supramaximal doses of the nonaromatizable androgen, DHT, failed to alter those qualitative responses: OVX+DHT females displayed detectable responses to senktide, whereas ORX-DHT males did not show such responses. These observations strongly suggest that the sexual dimorphism in LH responsiveness to NKB in the rat is not merely the result of the differences in the predominant sex steroid milieu, which maximally diverges from puberty onward, and point out to earlier maturational events as major contributing factors. Nonetheless, our studies confirm previous observations on the inhibitory effects of NKB signaling on LH release in conditions of derepressed gonadotropin secretion, as those seen in GNX animals. Although this action had been consistently demonstrated in females, to our knowledge, our

findings are the first to document the same phenomenon also in GNX male rats. The mechanisms for the switch between stimulatory (in adult female rats) or null (in adult male rats) responses to the inhibitory effects of senktide (in GNX adult rats) on LH secretion might involve changes in the endogenous NKB tone among the different conditions and of its interaction with the agonist, but the ultimate basis of this phenomenon is yet to be elucidated.

Several pieces of evidence strongly suggest the relevance of early organizing events in the configuration of sexual dimorphisms affecting the NKB/NK3R system in the rat. First, as previously reported in the sheep (22, 23), the numbers of NKB-ir neurons in the ARC were moderately, but significantly, higher in female rats, and this sex difference was obliterated by neonatal estrogen treatments known to perturb the normal process of brain differentiation (27, 37). Of note, previous studies have suggested the existence of a sexual dimorphism in the patterns of axonal projection of NKB neurons in the rat that appeared to be dependent on the divergent sex steroid milieu detected from puberty onward between males and females (24, 25). Although our study did not address the time course for the observed sexual dimorphism in the NKB neuronal population, it cannot exclude the contribution of factors other than the organizing effects of sex steroids; to our knowledge, this is the first report to document the impact of early manipulations of the sex steroid levels during critical periods of brain sex differentiation in the rat on the organization of NKB neuronal networks in adulthood. This is in keeping with previous data in the sheep demonstrating that neonatal exposure to T reduced the number of NKB-ir neurons in the ARC of female sheep (22, 23). These findings strongly suggest that NKB neurons in the ARC are sensitive to the organizing effects of sex steroids during critical windows of brain maturation. Similarly, previous observations from our group have documented that neonatal estrogenization results in a significant suppression of hypothalamic *Kiss1* mRNA levels in the rat hypothalamus, both at puberty and adulthood (27, 37). Taken as a whole, these findings suggest that KNDy neurons in the rat undergo a maturational program that is highly sensitive to the organizing effects of sex steroids during critical developmental windows.

Further support for the functional relevance of the above expression (ir) changes in hypothalamic NKB came from our hormonal studies in neonatally estrogenized rats. Thus, the reported suppression of NKB-ir detected in models of neonatal estrogenization was coupled to a dramatic decrease in circulating LH levels in young animals. In turn, exogenous activation of NKB signaling, by administration of senktide, was able to normalize serum LH levels in estrogenized male and female rats. The fact that

young adult male rats subjected to neonatal estrogenization did respond to senktide might be indicative of their immature state, because estrogenized rats fail to undergo puberty, and prepubertal males show LH responses to NKB activation. Again, there are considerable similarities with previous findings on the effects of kisspeptin-10 on gonadotropin secretion in neonatally estrogenized rats. Admittedly, however, the magnitude of LH responses to kisspeptin-10 was higher than those elicited by senktide in our current study. Assuming the indirect mode of action of NKB, via regulation of kisspeptin output onto GnRH neurons (5, 10, 12, 38), it is tenable that such reduced LH responses (compared with kisspeptin-10) may stem from the prevailing suppression of endogenous kisspeptin tone in models of neonatal estrogenization (Ref. 27 and A.H. Bentsen, Tena-Sempere, M., and Mikkelsen, J.D., unpublished data). Nonetheless, our present findings strongly suggest that the rescue of NKB signaling in such conditions, by means of senktide administration, would be sufficient to ameliorate the defective kisspeptin and, hence, GnRH secretion, thus reinforcing the idea that NKB is an important central regulator of the gonadotropic axis.

Finally, our study addresses also the intriguing issue of potential differences in the sex steroid regulation of NKB expression in various hypothalamic nuclei. In this sense, although there is compelling evidence for the scattered expression of NKB in different hypothalamic areas (7, 31), and for the regulation of the hypothalamic NKB/NK3R system by sex steroids in a number of species (5, 7, 8, 18, 23, 25, 28–30), most of the studies on NKB regulation have been restricted to the ARC/infundibular nucleus, whereas other hypothalamic areas with prominent NKB expression, such as the LHA, remain virtually unexplored. The LHA is the source of an array of neuroendocrine factors known to participate in the central control of energy balance and reproductive function, such as orexins or melanin-concentrating hormone (MCH) (39, 40). Of note, MCH-positive neurons in the LHA have been described to express NK3R (41–45), and MCH has been shown to modulate the action of kisspeptins on GnRH neurons (46). These data indirectly support the potential interplay between NKB/MCH/kisspeptin/GnRH through networks involving the LHA. To our knowledge, our data are the first to document a striking site-specific dimorphism in the action of E2 on *Tac2* expression, with consistent inhibitory effects in the ARC but unambiguous stimulatory actions in the LHA; in fact, E2 also stimulated *Tacr3* mRNA levels at this hypothalamic area (our unpublished data). This phenomenon resembles the dual, opposite regulation of *Kiss1* gene expression by estrogen between the ARC (inhibition) *vs.* the anteroventral periventricular nucleus (stimulation) (19, 47). Although the molecular mecha-

nisms (via nonclassical and classical estrogen receptor- $\alpha$  pathways) and physiological relevance (*e.g.* for negative and positive feedback) of such differential regulation of *Kiss1* expression have been characterized in recent years, the basis and putative roles of this dual regulation of *Tac2* expression by E2 in the ARC and LHA remain to be determined. In any event, our present findings broaden the number (and pave the way for specific analyses) of possible modes of action of NKB in the control of the gonadotropic and, potentially, other related axes. As call of caution, however, it must be stressed that our initial attempts have failed to provide conclusive evidence for the presence of NKB-ir in the LHA in adult male and female rats, an observation that might suggest either the lack of significant translation, or the rapid turnover or release, of NKB in this hypothalamic area in normal conditions. Considering the fact that basal *Tac2* mRNA levels in the LHA were low but increased with acute E2 treatment (see Fig. 5), it also remains possible that NKB-ir may become detectable only under E2-stimulated conditions. The above possibilities are currently being investigated in our laboratory.

In sum, we present herein an extensive series of experiments addressing as yet unsolved aspects of the physiology of the NKB/NK3R system regarding reproductive control in male and female rats. Our current data unveil intriguing species differences, postnatal maturational changes, sexual dimorphisms, and differential regulatory actions of sex steroids on NKB expression/actions in the context of gonadotropin regulation in the rat. These findings will help to refine our current understanding of the nature and functional relevance of NKB as master central modulator of the reproductive axis in this relevant preclinical species.

## Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Manuel Tena-Sempere, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, Faculty of Medicine, Córdoba 14004, Spain. E-mail: fi1tesem@uco.es.

This research was supported by: Spanish research grants BFU 2008-00984 and BFU2011-25021 (Ministerio de Economía y Competitividad; cofunded by European Union FEDER Program) and P08-CVI-00603 (Junta de Andalucía); European Union research contract Developmental Effects of Environment on Reproductive Health FP7-ENV-2007-1; training grants awarded by the FP7 Marie Curie Outgoing International Fellowship of the European Union; the NOVO Nordisk Foundation; and National Institutes of Health (NIH) Grant R01 HD 049651 and the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development/NIH through cooperative agreement U54HD12629 (to R.A.S.).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.



## References

- Herbison A 2006 Physiology of the GnRH neuronal network. In: Neil J, Knobil E, eds. Physiology of reproduction. San Diego, CA: Academic Press; 1415–1482
- Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK 2009 TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 41:354–358
- Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, Jeanpierre M, Grynberg M, Kamenicky P, Chanson P, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A 2010 TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 95:2287–2295
- Sandoval-Guzmán T, Rance NE 2004 Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1026:307–312
- Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA 2009 Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29:11859–11866
- Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Steiner RA, Okamura H 2010 Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30:3124–3132
- Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F, Pinilla L, Clifton DK, Tena-Sempere M, Steiner RA 2011 Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E202–E210
- Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, García-Galiano D, Hobbs SJ, Bosch MA, Pinilla L, Clifton DK, Dearth A, Ronnekleiv OK, Braun RE, Palmeter RD, Tena-Sempere M, Alreja M, Steiner RA 2011 Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* 152:4265–4275
- Navarro VM, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, García-Galiano D, Hobbs SJ, Manfredi-Lozano M, León S, Sangiao-Alvarellos S, Castellano JM, Clifton DK, Pinilla L, Steiner RA, Tena-Sempere M 2012 Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *J Neurosci* 32:2388–2397
- García-Galiano D, van Ingen Schenau D, Leon S, Krajnc-Franken MA, Manfredi-Lozano M, Romero-Ruiz A, Navarro VM, Gaytan F, van Noort PI, Pinilla L, Blumenrohr M, Tena-Sempere M 2012 Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. *Endocrinology* 153:316–328
- Billings HJ, Connors JM, Altman SN, Hileman SM, Holaskova I, Lehman MN, McManus CJ, Nestor CC, Jacobs BH, Goodman RL 2010 Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 151:3836–3846
- Ramaswamy S, Seminara SB, Plant TM 2011 Evidence from the agonadal juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) for the view that the action of Neurokinin B to trigger gonadotropin-releasing hormone release is upstream from the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology* 94:237–245
- Ramaswamy S, Seminara SB, Ali B, Ciofi P, Amin NA, Plant TM 2010 Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 151:4494–4503
- Corander MP, Challis BG, Thompson EL, Jovanovic Z, Loraine Tung YC, Rimmington D, Huhtaniemi IT, Murphy KG, Topaloglu AK, Yeo GS, O'Rahilly S, Dhillon WS, Semple RK, Coll AP 2010 The effects of neurokinin B upon gonadotropin release in male rodents. *J Neuroendocrinol* 22:181–187
- Kinsey-Jones JS, Grachev P, Li XF, Lin YS, Milligan SR, Lightman SL, O'Byrne KT 2012 The inhibitory effects of neurokinin B on GnRH pulse generator frequency in the female rat. *Endocrinology* 153:307–315
- Navarro VM, Tena-Sempere M 2012 Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol* 8:40–53
- Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ 2007 Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148:5752–5760
- Dellovade TL, Merchenthaler I 2004 Estrogen regulation of neurokinin B gene expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor  $\alpha$ . *Endocrinology* 145:736–742
- Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA 2005 Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146:3686–3692
- Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA 2005 Differential regulation of Kiss-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146:2976–2984
- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL 2010 Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151:3479–3489
- Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN 2010 The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology* 151:301–311
- Goubillon ML, Forsdike RA, Robinson JE, Ciofi P, Caraty A, Herbison AE 2000 Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology* 141:4218–4225
- Ciofi P, Lapirot OC, Tramu G 2007 An androgen-dependent sexual dimorphism visible at puberty in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 146:630–642
- Ciofi P, Leroy D, Tramu G 2006 Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* 141:1731–1745
- Roa J, Vigo E, Castellano JM, Gaytan F, García-Galiano D, Navarro VM, Aguilar E, Dijcks FA, Ederveen AG, Pinilla L, van Noort PI, Tena-Sempere M 2008 Follicle-stimulating hormone responses to kisspeptin in the female rat at the preovulatory period: modulation by estrogen and progesterone receptors. *Endocrinology* 149:5783–5790
- Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, García-Galiano D, Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M 2009 Persistent impairment of hypothalamic Kiss-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 150:2359–2367
- Danzer SC, Price RO, McMullen NT, Rance NE 1999 Sex steroid modulation of neurokinin B gene expression in the arcuate nucleus of adult male rats. *Brain Res Mol Brain Res* 66:200–204
- Pillon D, Caraty A, Fabre-Nys C, Bruneau G 2003 Short-term effect of oestradiol on neurokinin B mRNA expression in the infundibular nucleus of ewes. *J Neuroendocrinol* 15:749–753
- Rance NE, Bruce TR 1994 Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 60:337–345
- Warden MK, Young III WS 1988 Distribution of cells containing mRNAs encoding substance P and neurokinin B in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 272:90–113

32. Ciriza I, Carrero P, Azcoitia I, Lundeen SG, Garcia-Segura LM 2004 Selective estrogen receptor modulators protect hippocampal neurons from kainic acid excitotoxicity: differences with the effect of estradiol. *J Neurobiol* 61:209–221
33. Hansen HH, Timmermann DB, Peters D, Walters C, Damaj MI, Mikkelsen JD 2007  $\alpha$ -7 Nicotinic acetylcholine receptor agonists selectively activate limbic regions of the rat forebrain: an effect similar to antipsychotics. *J Neurosci Res* 85:1810–1818
34. Protter M, Morrey C 1964 *College calculus with analytical geometry*. Reading, MA: Addison-Wesley Publishing Co
35. Yang JJ, Caligioni CS, Chan YM, Seminara SB 2012 Uncovering novel reproductive defects in neurokinin B receptor null mice: closing the gap between mice and men. *Endocrinology* 153:1498–1508
36. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castano JP, Malagon MM, Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M 2006 Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 257–258:75–83
37. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, 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
38. Young J, George JT, Tello JA, Francou B, Bouligand J, Guiochon-Mantel A, Brailly-Tabard S, Anderson RA, Millar RP 24 February 2012 Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications. *Neuroendocrinology* 10.1159/000336376
39. Nurmio M, Tena-Sempere M, Toppari J 2010 Orexins and the regulation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Acta Physiol (Oxf)* 198:349–354
40. Williamson-Hughes PS, Grove KL, Smith MS 2005 Melanin concentrating hormone (MCH): a novel neural pathway for regulation of GnRH neurons. *Brain Res* 1041:117–124
41. Griffond B, Ciofi P, Bayer L, Jacquemard C, Fellmann D 1997 Immunocytochemical detection of the neurokinin B receptor (NK3) on melanin-concentrating hormone (MCH) neurons in rat brain. *J Chem Neuroanat* 12:183–189
42. Brischoux F, Fellmann D, Risold PY 2001 Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis. *Eur J Neurosci* 13:1733–1744
43. Brischoux F, Cvetkovic V, Griffond B, Fellmann D, Risold PY 2002 Time of genesis determines projection and neurokinin-3 expression patterns of diencephalic neurons containing melanin-concentrating hormone. *Eur J Neurosci* 16:1672–1680
44. Cvetkovic V, Poncet F, Fellmann D, Griffond B, Risold PY 2003 Diencephalic neurons producing melanin-concentrating hormone are influenced by local and multiple extra-hypothalamic tachykininergic projections through the neurokinin 3 receptor. *Neuroscience* 119:1113–1145
45. Croizier S, Franchi-Bernard G, Colard C, Poncet F, La Roche A, Risold PY 2010 A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse melanin-concentrating hormone systems. *PLoS One* 5:e15471
46. Wu M, Dumalska I, Morozova E, van den Pol A, Alreja M 2009 Melanin-concentrating hormone directly inhibits GnRH neurons and blocks kisspeptin activation, linking energy balance to reproduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17217–17222
47. Gottsch ML, Navarro VM, Zhao Z, Glidewell-Kenney C, Weiss J, Jameson JL, Clifton DK, Levine JE, Steiner RA 2009 Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J Neurosci* 29:9390–9395
48. Paxinos G, Watson C 2009 *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. New York: Academic



The External Grant Opportunities Database features  
**funding opportunities** of interest to the endocrine community,  
 saving you time and effort.

[www.endo-society.org/grants](http://www.endo-society.org/grants)

### 3.3 Effects and Interactions of Tachykinins and Dynorphin on FSH and LH Secretion in Developing and Adult Rats (Artículo 3).

NEUROENDOCRINOLOGY

#### Effects and Interactions of Tachykinins and Dynorphin on FSH and LH Secretion in Developing and Adult Rats

F. Ruiz-Pino, D. García-Galiano, M. Manfredi-Lozano, S. Leon, M. A. Sánchez-Garrido, J. Roa, L. Pinilla, V. M. Navarro,\* and M. Tena-Sempere\*

Department of Cell Biology, Physiology, and Immunology (F.R.-P., D.G.-G., M.M.-L., S.L., M.A.S.-G., J.R., L.P., M.T.-S.), University of Córdoba, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (F.R.-P., D.G.-G., J.R., L.P., M.T.-S.), and Instituto Maimonides de Investigación Biomédica de Córdoba/Hospital Universitario Reina Sofía (F.R.-P., D.G.-G., J.R., L.P., M.T.-S.), 14004 Córdoba, Spain; and Division of Endocrinology, Diabetes, and Hypertension (V.M.N.), Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons, which coexpress kisspeptins (Kps), neurokinin B (NKB), and dynorphin (Dyn), regulate gonadotropin secretion. The KNDy model proposes that NKB (a stimulator, through NK3R) and Dyn (an inhibitor, through  $\kappa$ -opioid receptor) shape Kp secretion onto GnRH neurons. However, some aspects of this paradigm remain ill defined. Here we aimed to characterize the following: 1) the effects of NKB signaling on FSH secretion and 2) the role of Dyn in gonadotropin secretion after NK3R activation; 3) additionally, we explored the roles of other tachykinin receptors, NK1R and NK2R, on gonadotropin release. Thus, the effects of the NK3R agonist, senktide, on FSH release were explored across postnatal development in male and female rats; gonadotropin responses to agonists of NK1R substance P and NK2R [neurokinin A (NKA)] were also monitored. Moreover, the effects of senktide on gonadotropin secretion were assessed after antagonizing Dyn actions by nor-binaltorphimine didydrochloride. Before puberty, rats of both sexes showed increased FSH secretion to senktide (and Kp-10). Conversely, adult female rats were irresponsive to senktide in terms of FSH, despite proven LH responses, whereas the adult males did not display FSH or LH responses to senktide, even at high doses. In turn, substance P and NKA stimulated gonadotropin secretion in prepubertal rats, whereas in adults modest gonadotropin responses to NKA were detected. By pretreatment with a Dyn antagonist, adult males became responsive to senktide in terms of LH secretion and displayed elevated basal LH and FSH levels; nor-binaltorphimine didydrochloride treatment uncovered FSH responses to senktide in adult females. Furthermore, the expression of *Pdyn* and *Opkr1* (encoding Dyn and  $\kappa$ -opioid receptor, respectively) in the mediobasal hypothalamus was greater in males than in females at prepubertal ages. Overall, our data contribute to refining our understanding on how the elements of the KNDy node and related factors (ie, other tachykinins) differentially participate in the control of gonadotropins at different stages of rat postnatal maturation. (*Endocrinology* 156: 576–588, 2015)

Our understanding of the neuroendocrine events underlying the control of GnRH release has significantly evolved since the identification of kisspeptins as the main elicitor of GnRH release. Indeed, hypothalamic neu-

rons that produce kisspeptins (*Kiss1* neurons) have been recognized as pivotal elements for the stimulatory control of GnRH neurons and a key relay in the transmission of the effects of numerous regulators of the reproductive axis

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2015 by the Endocrine Society

Received January 10, 2014. Accepted November 13, 2014.

First Published Online December 9, 2014

\* V.M.N. and M.T.-S. contributed equally to this work.

Abbreviations: ARC, arcuate nucleus; C<sub>1</sub>, cycle threshold; D1, diestrus 1; Dyn, dynorphin; E<sub>2</sub>, 17 $\beta$ -estradiol; ED, effective dose; GNX, gonadectomized; icv, intracerebroventricular; KNDy, kisspeptin/neurokinin B/dynorphin; KOR,  $\kappa$ -opioid receptor; Kp, kisspeptin; MBH, mediobasal hypothalamus; NKA, neurokinin A; NKB, neurokinin B; nor-BNI, nor-binaltorphimine didydrochloride; ORX, orchidectomized; OVX, ovariectomy; PND, postnatal day; POA, preoptic area; SP, substance P; TK, tachykinin.

(1). However, our knowledge of the overall mechanisms governing GnRH release remains incomplete. In fact, the pattern of GnRH release responds to a precise swing between stimulatory and inhibitory episodes that translates into GnRH pulses, which are mandatory for reproductive viability. This process also unveils the need for inhibitory signals on GnRH release (2), which are not yet fully defined.

Recently neurokinin B (NKB; encoded by the *Tac2* gene in rodents and *TAC3* in humans) and dynorphin-A (Dyn; encoded by the *Pdyn* gene) have been identified as cotransmitters of kisspeptins in a subpopulation of neurons in the arcuate nucleus (ARC), so-called KNDy (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin) neurons (3–6). Pharmacological and genetic data have recently highlighted the relevance of this KNDy signaling in the control of the reproductive axis. On the one hand, NKB has been proposed as a predominant stimulatory signal (5–12). Importantly, KNDy neurons also express NKB receptors (NK3R, encoded by *Tacr3*) and are profusely interconnected, which suggests potential (auto-)regulatory loops of stimulatory nature (4, 13). Indeed, through this network of collateral projections and contacts, NKB signaling from KNDy neurons has been suggested to stimulate and synchronize kisspeptin secretion (14–16). In fact, NKB-dependent stimulation of gonadotropin release seems to be primarily mediated by the activation of *Kiss1* neurons in the ARC, although additional, subtler, regulation of GnRH release at a different level, ie, kisspeptin-independent action, cannot be excluded (8, 9, 17–19).

Of note, NKB belongs to a family of related peptides, globally termed tachykinins (TKs), which includes also substance P (SP) and neurokinin A (NKA), among others (20). However, the action of these other TKs in the control of GnRH and gonadotropin release remains ill defined, as is their potential interplay with NKB and kisspeptins. Yet a recent electrophysiological study has demonstrated the ability of SP and NKA to increase the firing of ARC *Kiss1* neurons in mice (21). Moreover, it was demonstrated cross-reactivity between NK3R and the receptors for SP (NK1R) and NKA (NK2R), which seems to be critical for the full action of NKB (21). Yet to our knowledge the roles of these TKs and their receptors in the control of gonadotropin secretion *in vivo*, at different developmental periods, remain largely unexplored.

On the other hand, Dyn has been demonstrated to inhibit gonadotropin release after binding the  $\kappa$ -opioid receptor (KOR) (22); however, contrary to NK3R, KOR is expressed at low levels in KNDy neurons (5, 19). Of note, as is the case for *Kiss1*, NKB and Dyn are subjected to the inhibitory negative feedback of sex steroids in the ARC (5, 6, 19, 23).

Altogether the above findings led relatively recently to the proposition of a new model for the precise control of GnRH pulsatility based on the dynamic interplay between KNDy peptides, in which the coordinated interaction of NKB and Dyn within ARC *Kiss1* neurons would account for the alternation of stimulatory and inhibitory events that ultimately lead to the generation of kisspeptin (and hence GnRH) pulses in a process that is dependent on the sex steroid milieu (5, 6, 24). Nonetheless, the mode of action of NKB and Dyn to regulate kisspeptin release remains poorly defined. To note, despite the predominantly kisspeptin-mediated action of NKB on the reproductive axis, the stimulatory effect of NKB on LH release is less robust than that of kisspeptin, and null or even inhibitory actions have also been documented, depending on the species and the sex steroid levels (9, 12, 25). For instance, predominant inhibitory effects of the selective NK3R agonist, senktide, have been reported in rodents with null or low sex steroids levels, even though kisspeptins are known to stimulate gonadotropin secretion in these conditions. On the contrary, NKB induced significantly stimulatory LH responses in adult female rats and mice under physiological levels of sex steroids, whereas only adult male mice (but not rats) displayed LH responses to the same challenge (12, 19). These observations illustrate the complexity and the yet-incomplete characterization of the effects of NKB on the gonadotropic axis. In this context, the characterization of the effects of NKB stimulation on FSH release has consistently lagged behind, and only a modest stimulatory effect has been reported in adult male mice (19).

Additionally, the role of Dyn in the above-mentioned model of the KNDy control of GnRH pulses has received little attention recently; in fact, although its general inhibitory action on gonadotropin release has been described, the particular role of Dyn in the fine-tuning of KNDy neuronal function requires more in-depth characterization. In this context, we report here a series of functional studies to assess the specific role of NKB signaling in the control of FSH secretion in males and females at different developmental stages, as compared with its effects on LH release and the roles of kisspeptins and the other TKs, SP and NKA, on gonadotropin secretion. In addition, we explored the contribution of Dyn signaling in modulating the outcome of NKB-kisspeptin interactions in the control of gonadotropin release.

## Materials and Methods

### Animals and drugs

Wistar rats bred in the vivarium of the University of Córdoba, Spain, were used. The day the litters were born was considered

as day 1 of age. The animals were maintained under constant conditions of light (14 h of lights, lights on at 7:00 AM) and temperature (22°C). They were weaned at 21 days postpartum, when they were housed in groups of five rats per cage and with free access to standard rat chow and water ad libitum. For hormonal tests involving intracerebroventricular (icv) administration of drugs, the rats were caged individually from the day before cannulae implantation until termination of experiments. Correct positioning of the cannulae was checked by visual inspection (to exclude animals showing obvious displacement or detachment) and confirmed at necropsy. Experimental procedures were approved by the University of Córdoba Ethical Committee for Animal Experimentation and were conducted in accordance with the European Union norms for the care and use of experimental animals.

The NK3R agonist, senktide, was purchased from Sigma Chemical Co.. The agonists for NK1R (GR73632) and NK2R (GR64349) were purchased from Tocris Biosciences. The dose of each agonist, 600 pmol, was selected on the basis of previous references as fully effective in inducing gonadotropin responses by senktide in the rat (12, 25, 26). Additionally, in specific experiments, the effects of a dose of 3 nmol of senktide were also explored as a means to test the effect of a high dose of the NK3R agonist on FSH (and LH) release in both prepubertal and adult males. Rat/mouse kisspeptin-10 (Kp-10) was obtained from Phoenix Pharmaceuticals. An effective dose (ED) of Kp-10, 1 nmol, was selected based on previously published data showing its efficacy to elicit LH and FSH secretion in adult male and female rats (27–29). The antagonist of  $\kappa$ -opioid receptor, nor-binaltorphimine didydrochloride (nor-BNI), was purchased from Tocris Bioscience. The dose of 2 nmol icv was selected on the basis of previous references (30). All drugs were reconstituted with physiological saline, 0.9% NaCl. The compounds were diluted to their working concentrations immediately before the experiment and injected icv in a final volume of 5  $\mu$ L per rat. As a general procedure, blood samples (250  $\mu$ L) were obtained by jugular venipuncture, in keeping with standard procedures routinely running in our laboratory (8, 10, 12, 27–29), before and at different time points after administration of the various drugs. Animals injected with vehicle (0.9% NaCl) served as controls. Blood was centrifuged to isolate the serum, which was stored at –20°C until hormone measurements.

For experiments involving adult female rats, adult virgin animals were daily monitored by vaginal cytology to confirm the occurrence of regular estrous cycles; only animals showing at least two consecutive 4-day estrous cycles were used. In addition, experiments in gonadectomized (GNX) animals were conducted. For studies involving ovariectomy (OVX), regularly cycling, adult virgin female rats were subjected to bilateral OVX, via abdominal incision; hormonal tests or sampling was performed 2 weeks after surgery. Likewise, groups of adult male rats were orchidectomized (ORX), through a single midline abdominal incision, as previously reported (12).

### Experimental design

#### **Effects of senktide on FSH release along postnatal development**

In experiment 1, functional tests were conducted to evaluate the effects of central administration of the NK3R agonist, senktide, on FSH secretion across postnatal development in male

and female rats. To this end, male and female rats were icv injected with senktide, at the ED of 600 pmol, during the infantile (10 d), juvenile (25 d), pubertal (36 d in females and 45 d in males), and adult (>60 d) stages (n = 8–13/group); in adult female rats, injections were applied in the morning of diestrus 1 (D1) and proestrus. To allow delivery of senktide or vehicle into the lateral cerebral ventricle, animals were implanted with icv cannulae lowered to a depth of 2 (infantile), 3 (prepubertal) or 4 mm (adult) beneath the surface of the skull; the insert point was placed 1 mm posterior and 1.2 mm lateral to bregma. Hormonal tests were conducted at least 1–2 days after implantation of cannulae, a time point when animals were fully recovered. Blood samples were obtained by jugular venipuncture 20 minutes after senktide/vehicle injection, as described in detail elsewhere (12). In additional groups of juvenile (25 d) and adult (>60 d) male rats, the gonadotropin-releasing effects of a higher dose of senktide were also monitored. To this end, 3 nmol of senktide was icv injected, and blood samples were obtained by jugular puncture after 20 and 60 minutes.

#### **FSH responses to senktide in adult intact and GNX rats**

Based on the results from experiment 1, showing lack of FSH responses to senktide in pubertal and adult rats of both sexes, despite the proven ability of the NK3 agonist to elicit LH release in adult female rats (12), in the next series of experiments, we aimed to assess the FSH-releasing effects of senktide in adult animals with different sex steroid backgrounds. Thus, in experiment 2, we evaluated the effects of bolus icv injection of senktide (600 pmol) or Kp-10 (1 nmol) on FSH release in adult intact, cyclic female (at D1) or sex steroid-depleted (OVX) rats (n = 10–12 rats/group). Additionally, a group of OVX animals (n = 10/group) was supplemented with 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) immediately after OVX. Capsules filled with E<sub>2</sub> were implanted sc via a small midscapular incision at the base of the neck; wound clips were used to close the incision. Sham-operated animals served as OVX controls. SILASTIC brand tubing (Dow Corning Corp; 20 mm long, 0.62 mm inner diameter, 1.25 mm outer diameter) was used for capsule preparation. Dilutions of crystalline E<sub>2</sub> at a low dose (100  $\mu$ g/mL, in olive oil) were used for capsule filling; this dose was selected to achieve moderate levels of circulating E<sub>2</sub>, as previously described (9). Blood samples were obtained by jugular venipuncture before (0 min) and at 15, 60, and 120 minutes after icv injection, following procedures as per experiment 1. Alike, in experiment 3, adult ORX or sham ORX male rats were subjected to a similar protocol of senktide (600 pmol) or Kp-10 (1 nmol) icv administration, and serial blood sampling was conducted at the time points indicated above.

#### **Effects of NK1R and NK2R agonists on LH and FSH release in prepubertal and adult rats**

Given recent evidence suggesting a cooperative role of other TKs in the central control of GnRH, and thereby gonadotropin secretion (21), in experiment 4, functional tests were conducted to evaluate *in vivo* the LH- and FSH-releasing effects of the central (icv) administration of the NK1R (GR73632) or NK2R (GR64349) agonists, in prepubertal (25 d) and intact adult (>60 d) male and female rats; adult female rats were tested on D1. To allow the delivery of each agonist or vehicle into the lateral cerebral ventricle, animals were implanted with icv cannulae as

described above. Blood samples were obtained by jugular venipuncture 20 and 60 minutes after the agonist/vehicle injection in prepubertal rats and after 20, 60, and 120 minutes in adult rats (n = 8–10/group).

**Effect of chronic Dyn blockade on gonadotropin responses to senktide**

In an additional series of experiments, we intended to assess the role of Dyn in the control of adult gonadotropin secretion and in the modulation of responses to NKB. To this end, LH and FSH responses to senktide were evaluated after blockade of the effects of endogenous Dyn in female (experiment 5) and male (experiment 6) rats. For this purpose, adult male and female rats (females at D1) pretreated with the KOR antagonist, nor-BNI, or vehicle 90 minutes prior to the icv injection of senktide (600 pmol). Blood samples were collected before nor-BNI injection (–90 min) and at 0, 20, and 60 minutes after senktide injection. Animals treated with vehicle and nor-BNI alone (ie, not injected with senktide) served as control to monitor long-term responses to the Dyn antagonist.

**Analysis of *Pdyn* and *Opkr1* expression in rat hypothalamus along postnatal maturation**

To gain further insight into the inhibitory actions of Dyn in the control of gonadotropin responses to NKB in male and female rats at different developmental stages, in experiment 7, we assessed the expression levels of the genes encoding Dyn (*Pdyn*) and its receptor, KOR (*Opkr1*), in hypothalamic samples (n = 5/group) from infantile (postnatal d 15), prepubertal (males: d 30; females: d 25), and pubertal (males: d 45; females: d 36) rats; ages were selected to match the maturational stage because female puberty occurs earlier than male puberty. The different groups of animals were euthanized, and the hypothalami were excised according to the coordinates indicated in the Paxinos and Watson Rat Brain Atlas (31). In keeping with our previous studies (32), each hypothalamic sample was dissected and divided into two fragments, containing the preoptic area (POA) or the mediobasal hypothalamus (MBH); the latter contains the ARC in which the KNDy population is located (1).

**Real-time PCR**

Hypothalamic samples were processed for total RNA isolation using TRIsure reagent (BIOLINE), following the instructions of the manufacturer. Two micrograms of each RNA sample were used for retrotranscriptase reaction (Bio-Rad Laboratories), following previously published protocols. Real-time RT-PCR was performed using the iCycler iQ real-time PCR detection

system (Bio-Rad Laboratories). Hypothalamic *Pdyn* and *Opkr1* expression was measured using specific primers-pairs and annealing conditions (see Table 1). As internal control for reverse transcription and reaction efficiency, amplification of a 240-bp fragment of S11 ribosomal protein, *Rps11*, mRNA was carried out in parallel in each sample. Calculation of relative expression levels of the targets was conducted based on the cycle threshold ( $C_T$ ) method. The  $C_T$  for each sample was calculated using the iCycler iQ real-time PCR detection system software with an automatic fluorescence threshold setting. Fold expression of target mRNA over reference values was calculated by the equation  $1 + e^{-\Delta\Delta C_T}$ , where  $\Delta C_T$  is determined by subtracting the corresponding RP-S11  $C_T$  value from the specific  $C_T$  of the target (*Pdyn* or *Opkr1*), and  $\delta\delta C_T$  was obtained by subtracting the  $\delta C_T$  of each experimental sample from that of the reference sample. No significant differences in  $C_T$  values were observed for *Rps11* within each study groups.

**Hormone measurements**

Serum LH and FSH levels were measured using RIA kits supplied by the National Institutes of Health (Dr A. F. Parlow, National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA). Rat LH-L-10 and FSH-L-9 were labeled with 125I using iodo-gen tubes, following the instructions of the manufacturer (Pierce Chemical Co). Hormone concentrations were expressed using reference preparations LH-RP-3 and FSH-RP-2 as standards. Intra- and interassay coefficients of variation were less than 8% and 10% for LH and 6% and 9% for FSH, respectively. The sensitivity of the assay was 5 pg/tube for LH and 20 pg/tube for FSH. Accuracy of hormone determinations was confirmed by assessment of rat serum samples of known concentrations (used as external controls).

**Presentation of data and statistical analysis**

Hormonal determinations were conducted in duplicate, with a minimal total number of 10 samples/group. All data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for each group. Results were analyzed for statistically significant differences using Student *t* tests or one-way or two-way ANOVA followed by the corresponding post hoc tests, when appropriate.  $P \leq .05$  was considered significant. All analyses were performed with Graph-Pad Prism version 5.0 (GraphPad Software, Inc).

**Results**

**FSH responses to NKB agonist, senktide, in male and female rats along postnatal maturation**

Senktide (600 pmol) was injected centrally (icv) to male and female rats at different stages of postnatal maturation.

**Table 1.** Primer Pairs and Conditions Used for Quantitative PCR Amplification of the Indicated Targets

| Target (NCBI Reference)    | Oligo Primers                               | Expected Size, bp | Annealing Temperature, °C |
|----------------------------|---|-------------------|---------------------------|
| <i>Pdyn</i> (NM_019374.3)  | Sense (5'-GAT CCG CCA TCC TAT CAC CTG-3')   | 146               | 59                        |
|                            | AS (5'-GGA CCA CGC CAT TCT GTATCA C-3')     |                   |                           |
| <i>Opkr1</i> (NM_017167.2) | Sense (5'-ATC ACC GCT GTC TACTCT GTG-3')    | 166               | 59                        |
|                            | AS (5'-CACTCT GGA AGG GCATAGTGG-3')         |                   |                           |
| <i>Rps11</i> (NM_031110.1) | Sense (5'-CAT TCA GAC GGA GCG TGC TTA C-3') | 240               | 58                        |
|                            | AS (5'-TGC ATC TTC ATC TTC GTC AC-3')       |                   |                           |

Abbreviations: AS, antisense; NCBI, National Center for Biotechnology Information.

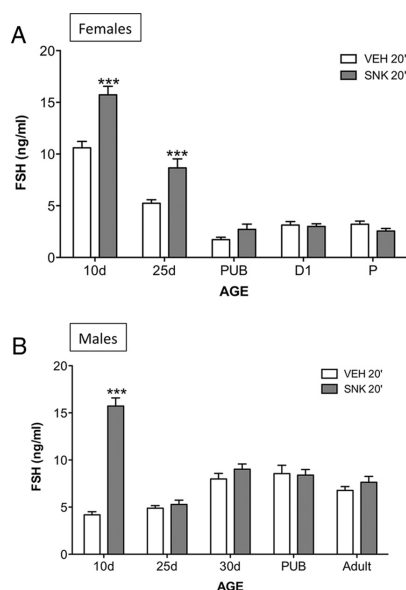
Of note, for adult cyclic females, hormonal tests were conducted in the morning (10:00 AM) of D1 or proestrus, as representative phases of low and high circulating levels of estradiol, respectively. Serum was collected 20 minutes after icv injection of senktide as described above. This time was selected based on previous reports as the point at which maximal effects on LH release are achieved after central administration of senktide (12, 25, 26). Unambiguous FSH responses were detected in female rats only at postnatal days (PND) –10 and –25 (see Figure 1A; \*\*\*,  $P \leq .0001$ ); in contrast, no FSH responses to senktide were detected from PND25 onward. In males, FSH responses to the NKB agonist were detected only at PND10 (see Figure 1B; \*\*\*,  $P \leq .0001$ ), yet because male rats at this age had lower basal LH level than females, relative responses to senktide in PND10 males were higher (>3-fold increase) than in females of the same age. Of note, FSH responses were not detected in PND25 males injected with a higher, 3-nmol dose of senktide (Supplemental Figure 1A). Likewise, FSH (or LH) responses were not observed in adult

males injected with 3 nmol senktide (Supplemental Figure 1B), indicating that the lack of FSH responses to NK3R activation in males at both ages is genuine and not due to low/insufficient stimulation.

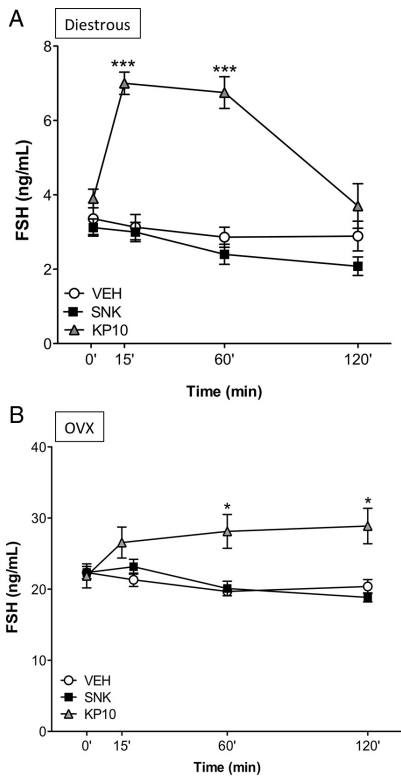
#### Comparison of FSH responses after kisspeptin vs senktide treatment in adult rats

Our initial experiments documented the lack of FSH responses 20 minutes after central senktide treatment in adult rats. Reportedly, FSH may require a longer time to rise compared with LH (27). Therefore, to test whether FSH responses may take place at later time points after exposure to senktide, the effect of central injection of the NKB agonist on FSH release was monitored at 20, 60, and 120 minutes after the administration in intact adult male and female rats. Additionally, for comparative purposes, the FSH responses to the icv injection of Kp-10 were assessed at 15, 60, and 120 minutes; the earlier time point (15 min) was selected because this is reported to coincide with the peak release of LH after central Kp-10 administration (27–29). In both sexes, central administration of a single bolus of 600 pmol senktide was unable to stimulate FSH secretion over a period of 120 minutes. In contrast, prominent FSH increases were detected after an icv injection of 1 nmol Kp-10, which, in the case of females, peaked at 15 minutes in keeping with previous reports (27). The dynamics of FSH responses, though, were sexually dimorphic so that in females FSH levels had decreased to basal levels at 120 minutes (Figure 2A), whereas in males it steadily increased during the first hour after injection and remained at maximum levels at 120 minutes continued to increase in males (Figure 3A). Notably, our previous study using a similar experimental setting had documented that icv injection of 600 pmol senktide induces robust LH responses in adult cyclic female rats, whereas adult males were nonresponsive (12).

Because of the different FSH responses to Kp-10 and the NKB agonist between males and females, we aimed to assess whether the actual circulating levels of gonadal steroids in both sexes would affect such dimorphism. Experiments in females involved testing of the effects of senktide and Kp-10 in OVX animals, subjected or not to replacement with (physiological) doses of  $E_2$ . Central injection of senktide was unable to modify FSH levels, neither in OVX animals (see Figure 2B) nor in OVX+ $E_2$  rats (0 min =  $18.45 \pm 1.00$ ; 20 min =  $20.09 \pm 0.75$ ; 60 min =  $19.22 \pm 1.37$ ; 120 min =  $18.18 \pm 0.79$  ng/mL) at any time point studied. In contrast, FSH release was significantly augmented at 60 and 120 minutes after Kp-10 administration in OVX rats (Figure 2B). Similarly, OVX+ $E_2$  rats displayed significantly elevated FSH levels at 120 minutes after Kp-10 injection (0 min =  $16.32 \pm 0.76$ ; 120 min =



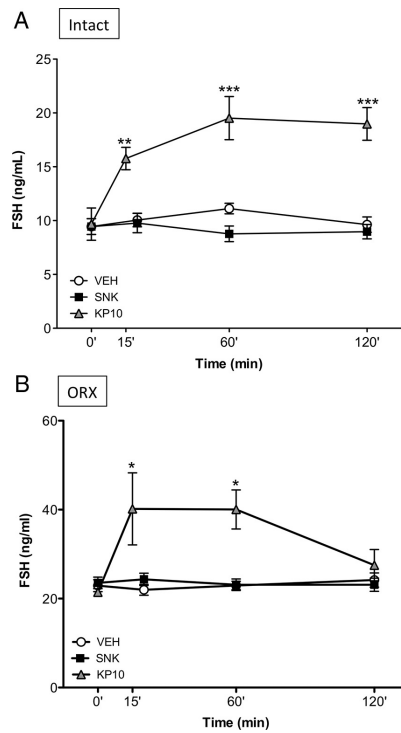
**Figure 1.** FSH responses to the NK3R agonist, senktide, in male and female rats at different stages of postnatal maturation. Female (A) and male (B) rats, at different postnatal ages (indicated on x-axis), were icv injected with an ED (600 pmol) of senktide or vehicle, and blood samples were obtained 20 minutes later for FSH determinations. Pubertal animals were 36 days old for females and 45 days old for males. Hormone values are means  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $P \leq .0001$  vs corresponding vehicle-injected groups; differences were analyzed for each age and sex using unpaired Student's *t* tests. P, proestrus; PUB, pubertal; SNK, senktide; VEH, vehicle.



**Figure 2.** FSH responses to senktide or Kp-10 in adult, gonadal-intact, and OVX female rats. Effects of acute icv administration of senktide (SNK) or Kp-10 upon serum FSH release in cyclic female rats at diestrus (A) or OVX (B) female rats. Senktide (600 pmol) or Kp-10 (1 nmol) were acutely icv injected and blood samples for hormone determinations were obtained before (0 min) and 15/20 minutes (for Kp-10 or SNK, respectively), 60 and 120 minutes after injection of the compounds. \*,  $P \leq .05$ , \*\*\*,  $P \leq .001$  vs corresponding basal levels (0 min), as estimated by a two-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test.

$22.44 \pm 1.02$ ;  $P \leq .05$ ). Effectiveness of sex steroid replacement in our models was demonstrated by the lowering of basal preinjection LH levels in OVX animals, compared with the circulating LH concentrations in OVX rats without  $E_2$  replacement (data not shown).

Experiments in male rats involved testing of the effects of senktide and Kp-10 in ORX animals. Similar to OVX females, adult castrated males failed to show any response of FSH to central senktide administration at any time point studied. In clear contrast, icv injection of Kp-10 induced robust increases in circulating FSH levels, at 15 and 60 minutes after the Kp-10 bolus (Figure 3B).



**Figure 3.** FSH responses to senktide or Kp-10 in adult, gonadal-intact, and ORX male rats. Effects of acute icv administration of senktide (SNK) or Kp-10 on FSH release in intact (A) or ORX (B) male rats. Senktide (600 pmol) or Kp-10 (1 nmol) were acutely icv injected and blood samples for hormone determination were obtained before (0 min) and 15/20 (for Kp-10 or SNK, respectively), 60 and 120 minutes after injection of the compounds. \*,  $P \leq .05$ , \*\*,  $P \leq .01$ , and \*\*\*,  $P \leq .001$  vs the corresponding basal levels (0 min), as estimated by a two-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test.

#### Responses to NK1R and NK2R agonists in male and female rats at prepubertal and adult stages

Considering the results of experiments 1–3 and the recently proposed role of TKs other than NKB in the control of GnRH secretion (21), hormonal analyses were applied to evaluate LH and FSH responses to central activation of other two well-known TK systems, SP/NK1R and NKA/NK2R, in both male and female rats at two representative developmental ages: prepubertal (25 d) and adult (>60 d). Of note, although electrophysiological recordings had documented the ability of SP and NKA to activate GnRH neurons in brain slices from adult mice *ex vivo* (21), the *in vivo* effects of these compounds remained scarcely evaluated.

Our neuroendocrine tests revealed that the agonists of NK1R and NK2R were able to significantly increase LH



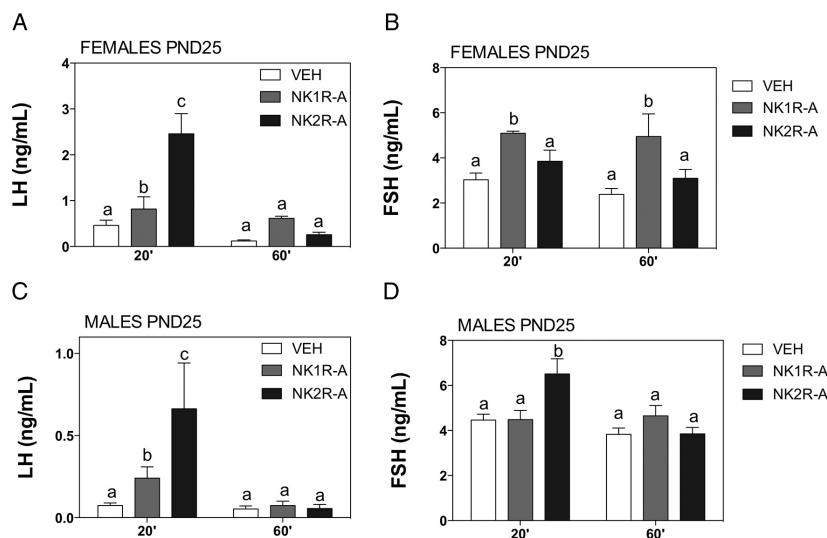
release at 20 minutes after administration in prepubertal animals of both sexes (Figure 4, A and C), yet the stimulation induced by the NK2R agonist in immature animals was significantly greater than that evoked by NK1R agonist in both males and females. Interestingly, this effect was no longer present at 60 minutes after the injection (Figure 4, A and C). In terms of FSH release, a sex difference was noted in prepubertal rats: whereas the NK1R agonist induced a slight, but significant, elevation on FSH release at 20 minutes and 60 minutes only in females (Figure 4B), NK2R agonist stimulated FSH 20 minute after injection specifically in males (Figure 4D). Concerning adult rats, the specific NK1R agonist was devoid of any stimulatory effects on LH or FSH secretion in either males or females, at all the time points studied (Figure 5). In contrast, the specific agonist of NK2R induced a significant but transient (at 20 min) increase in LH levels in both sexes. In addition, persistently elevated FSH levels were detected in adult female rats at 60 and 120 minutes after NK2R-A injection (Figure 5).

**Effect of Dyn antagonism on LH responses to senktide in adult rats**

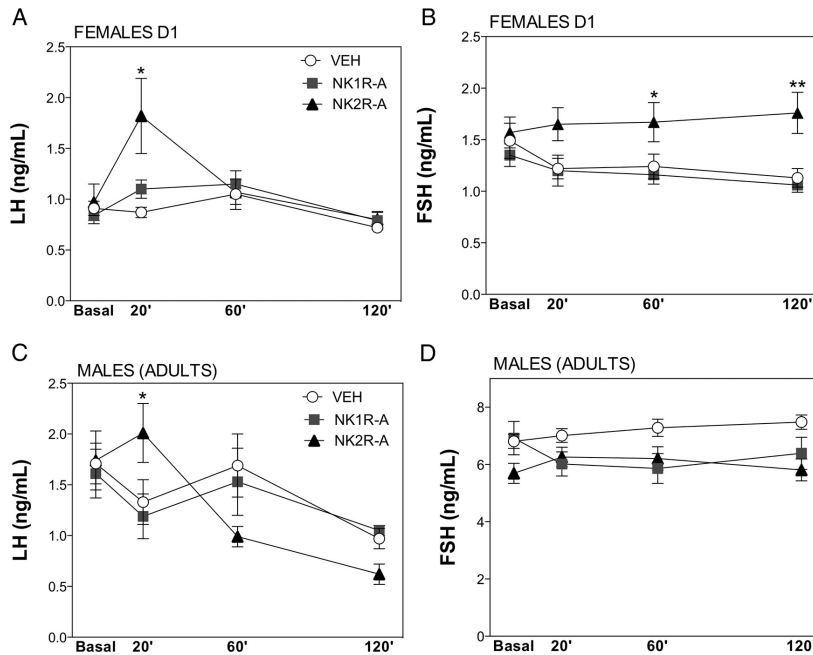
As indicated above, we documented previously a marked sexual dimorphism in LH secretion after central administration of senktide in adult rats so that only fe-

males displayed clear-cut LH responses (12); FSH responses remained unexplored. For this reason, we investigated whether the endogenous tone of Dyn may play a role in such a divergent pattern and, by extension, in basal gonadotropin levels in adulthood. Adult rats were treated with vehicle or the Dyn receptor (KOR) antagonist, nor-BNI, 90 minutes prior to a central injection of senktide (600 pmol). Time-course analyses confirmed the patterns of LH response to central senktide injection in gonadally-intact, adult female and male rats (12). In animals with preserved Dyn signaling (ie, treated with vehicle), females, but not males, showed a robust increase of LH secretory mass, which was detectable at 20 minutes after senktide treatment and remained significantly elevated at 60 minutes after the injection (Figure 6, A and B).

Strikingly, despite the inability of intact adult males to respond to senktide, pretreatment with nor-BNI was able to reinstate LH responsiveness to senktide so that LH levels at 20 minutes after the injection were similar to those in females (Figure 6B). Of note also, pretreatment with nor-BNI was sufficient to cause a rise in basal LH levels selectively in adult male rats. Importantly, however, the possibility that the observed rescue of LH responsiveness to senktide in adult male rats after Dyn blockade might be due to a sustained and progressive elevation of LH levels



**Figure 4.** LH and FSH responses to agonists of NK1R (GR73632) and NK2R (GR64349) in prepubertal rats. Effects of acute icv administration of the agonists of tachykinin receptors, NK1R (NK1R-A, GR73632) and NK2R (NK2R-A, GR64349) on LH and FSH release in prepubertal (25 day old) female (A and B) and male (C and D) rats. NK1R-A (600 pmol) or NK2R-A (600 pmol) were acutely icv injected and blood samples for hormone determination were taken at 20 and 60 minutes after injection of the compounds; animals injected with vehicle (VEH) served as controls. Groups with different superscript letters are statistically different ( $P \leq .05$ ), as estimated by a two-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test.



**Figure 5.** LH and FSH responses to agonists of NK1R (GR73632) and NK2R (GR64349) in adult rats. Effects of acute icv administration of the agonists of tachykinin receptors, NK1R (NK1R-A, GR73632) and NK2R (NK2R-A, GR64349), on LH and FSH release in adult female (in D1; A and B) and male (C and D) rats. NK1R-A (600 pmol) or NK2R-A (600 pmol) were acutely icv injected and blood samples for hormone determination were taken before (0 minute) and at 20, 60, and 120 minutes after injection of the compounds; animals injected with vehicle (VEH) served as controls. Groups with different superscript letters are statistically different ( $P \leq .05$ ), as estimated by a two-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test.

after nor-BNI administration can be ruled out by the results of our complementary study, in which adult rats were treated with nor-BNI at  $-90$  minutes and subsequently injected with vehicle and serial blood sampling conducted at 0, 20, and 60 minutes after vehicle injection. As shown in Supplemental Figure 2, nor-BNI alone caused an elevation of basal LH levels 90 minutes after administration in males but failed to induce a further rise in circulating LH thereafter. This confirms that the effect of senktide in males pretreated with nor-BNI (as displayed in Figure 6B) is genuinely due to the effects of NK3R activation in the absence of Dyn actions and not because of Dyn blockade per se.

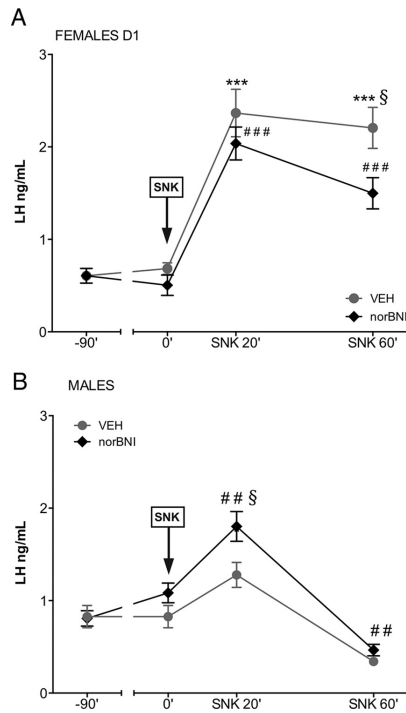
#### Effect of Dyn antagonism on FSH responses to senktide in adult rats

Basal FSH levels and responses to senktide were also explored after a blockade of endogenous Dyn actions. Of note, pretreatment of female rats with nor-BNI unmasked a significant stimulatory action of central senktide administration on FSH release, 20 minutes after icv injection

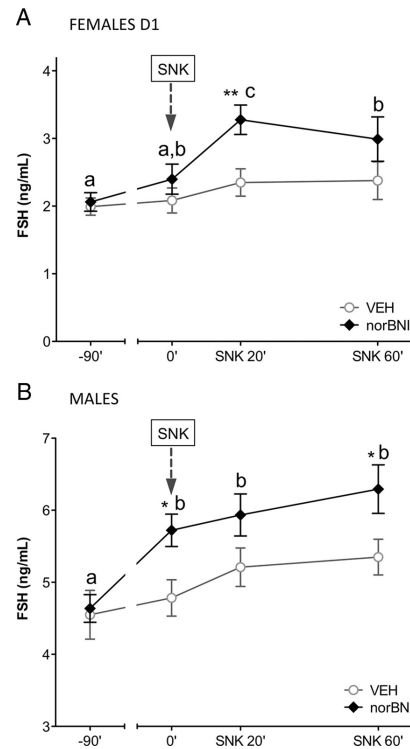
(Figure 7A). Furthermore, in male rats, basal FSH levels were elevated by nor-BNI administration, and FSH concentrations were higher after senktide injection in males with blockade of endogenous Dyn actions by pretreatment with nor-BNI (Figure 7B). Again, experiments involving pretreatment with nor-BNI without subsequent administration of senktide ruled out the possibility that the above FSH responses to senktide in male and female rats preinjected with the Dyn antagonist might be due to the effect of nor-BNI alone (data not shown).

#### Expression of *Pdyn* and *Opkr1* in the hypothalamus of male and female rats

To shed light into the potential basis for the reported effects of nor-BNI treatment of the patterns of gonadotropin responses to senktide, expression analyses of the genes encoding Dyn (*Pdyn*) and KOR (*Opkr1*) were applied by quantitative RT-PCR in hypothalamic fragments of adult male and female rats dissected into POA or MBH areas; for comparative purposes, relative expression levels of these targets were assayed in infantile, prepubertal, and



**Figure 6.** Effect of Dyn blockade on LH responses to senktide in male and female rats. Serum LH levels are shown from adult female (A) and male (B) rats, pretreated with a single dose of vehicle or the KOR antagonist, nor-BNI, 90 minutes before central senktide (SNK) injection. Blood samples for LH determinations were obtained prior to vehicle or nor-BNI administration (–90 min) and before (at 0 min) and 20 and 60 minutes after senktide administration. Panel A: \*\*\*,  $P \leq .001$ , ###,  $P \leq .001$  vs corresponding basal values (ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls multiple range test); §,  $P \leq .05$  vs corresponding values in the treated group at the same time point (Student's  $t$  test). Panel B: ##,  $P \leq .01$  vs corresponding basal values (ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls multiple range test.); §,  $P \leq .05$  vs corresponding values in the treated group at the same time point (Student's  $t$  test).

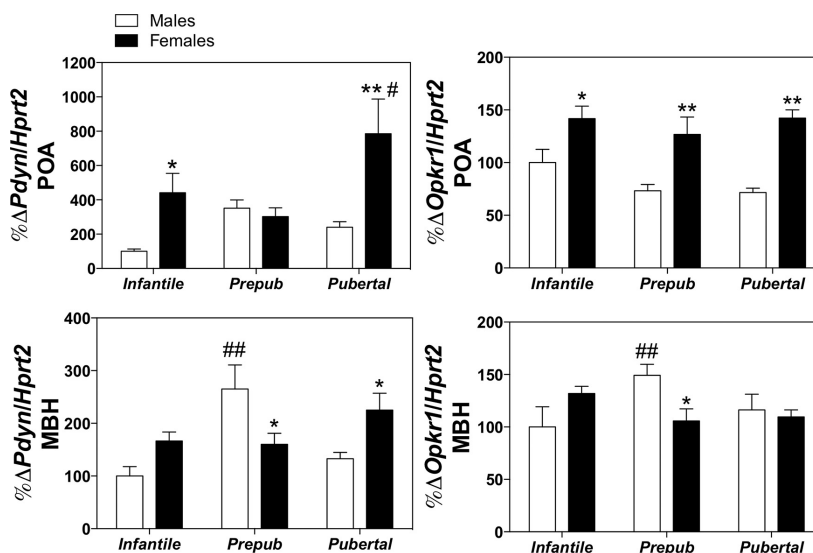


**Figure 7.** Effect of Dyn blockade on FSH responses to senktide in male and female rats. Serum FSH levels are shown from adult female (A) and male (B) rats, pretreated with a single dose of vehicle (VEH) or the KOR antagonist, nor-BNI, 90 minutes before central senktide (SNK) injection (denoted by an arrow). Blood samples for FSH determinations were obtained prior to vehicle or nor-BNI administration (–90 min) and before (at 0 min) and 20 and 60 minutes after senktide administration. \*,  $P \leq .05$ , \*\*,  $P \leq .01$  vs corresponding vehicle-injected groups (Student  $t$  tests). For time-course analysis within VEH or nor-BNI groups, values with different letters are significantly different (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple range test).

pubertal rats. Our expression analyses documented a marked sexual and anatomical differentiation in the expression pattern of *Pdyn* and *Opkr1* in the POA and MBH (see Figure 8). Interestingly, the expression of both genes was significantly higher in the POA of females compared with males at almost all age points assessed; only *Pdyn* expression in the prepubertal period was similar in both sexes. In contrast, however, the expression of both *Pdyn* and *Opkr1* in the MBH, which increased before puberty in both male and female rats, was significantly greater in the male during the prepubertal period (Figure 8).

### Discussion

The recent identification of inactivating mutations in *TAC3* and *TACR3* genes in humans (encoding NKB and NK3R, respectively) associated with hypogonadotropic hypogonadism (33, 34) unveiled a critical role of the NKB system in the neuroendocrine control of reproductive function. Although this severe phenotype observed in humans has not been fully recapitulated in *Tacr3* null mice (35), perhaps due to compensatory effects in rodents, mice with defective NKB signaling do exhibit a significant impairment of their reproductive axis, therefore supporting



**Figure 8.** Hypothalamic expression patterns of Pdyn and Opkr1 in the MBH and POA in male and female rats. Relative expression levels of the mRNAs encoding Dyn (*Pdyn*) and its canonical receptor, KOR (*Opkr1*), were assayed in male and female rats at different stages of postnatal maturation: infantile, (pre-)pubertal, and pubertal ages. To allow regional resolution, hypothalamic fragments were dissected and divided into two fragments, containing the POA or the MBH. Values of the specific targets were measured by quantitative PCR, normalized to the expression levels S11 ribosomal protein mRNA, and expressed as percentage change over the expression values in the MBH in infantile (15 d old) male rats. \*,  $P \leq .05$ , \*\*,  $P \leq .01$  in females vs corresponding levels in males (Student *t* tests). For age-related changes, #,  $P \leq .05$ , ##,  $P \leq .01$  vs expression values in corresponding infantile (15 d old) groups (two way ANOVA followed by Tukey post hoc test).

a relevant, conserved role of NKB across species. Studies by our group and others have documented the coexpression of NKB with Dyn and kisspeptin in a distinct population of arcuate neurons, ie, KNDy neurons, in a number of species (3–6, 14, 15, 19), and offered compelling evidence for a predominantly stimulatory effect of NKB upon LH release in a process seemingly mediated by kisspeptin release (1, 4, 8, 13). These data, together with the inhibitory action of Dyn on gonadotropin release (1, 4, 8, 13), led to the proposal of a reciprocal role of NKB and Dyn in the dynamic (auto-)regulation of kisspeptin pulses by KNDy neurons and thereby, the control of GnRH secretion, thus, defining the so-called KNDy paradigm (4, 5, 13).

However, several aspects of the underlying mechanism governing NKB, and Dyn, action on kisspeptin/GnRH release remain elusive. Remarkably, important differences between NKB and kisspeptins in terms of stimulation of gonadotropin release have been documented. Thus, the LH-secreting potency of NKB (or its agonist, senktide) is significantly lower than that of kisspeptins (9, 11, 12, 28, 36). Furthermore, the stimulatory effect of NKB depends on the sex steroid milieu, with the inhibitory actions being

detected in conditions of low or absent gonadal steroid levels (7, 9, 17, 37) and a clear sexual dimorphism in adults, with null stimulatory responses in males (12), at least in the rat. Unlike NKB, kisspeptins retain the full stimulatory action on LH release in both sexes, at all physiological stages and ages assessed to date (1). These discrepancies argue against a role of NKB as a mere switch-on signal for the release of kisspeptin pulses and highlight the tenable interplay of NKB with other regulatory signals produced or received by KNDy neurons.

In this context, it is notable that, despite the recent characterization of LH responses to NKB in various species (1, 4, 13) and the proven effects of kisspeptin on FSH release (27), the actions of NKB on FSH secretion have received less attention to date, with only subtle stimulatory responses being observed in male mice (19). Our current data are the first to document the ability of the NKB agonist, senktide, to stimulate FSH secretion in rats in a strikingly developmental-dependent manner. Thus, senktide induced clear FSH responses in infantile/juvenile rats but not in pubertal or adult rats, despite the robust FSH responses to kisspeptins documented throughout postnatal development (27). Of note, in adult rats, FSH secretion

remained unresponsive to senktide, regardless of the steroid milieu. This is in contrast to the sex-dependent effects of the NKB agonist on LH secretion in adult rats: although adult male rats did not respond to senktide in terms of LH secretion (12), in adult females, senktide stimulated LH secretion in gonadal-intact but inhibited it in OVX rats (9, 17, 37). It is unlikely that the lack of FSH responses to senktide in adult rats could be due to the 600-pmol dose used because similar doses elicited clear-cut responses in immature animals, and this dose was sufficient to elicit already maximal LH responses, which could not be further enhanced by doses 5-fold higher than the one tested here (12). All in all, the above observations are difficult to reconcile under the prism of the classical KNDy paradigm and pose the question on why are gonadotropin responses to central NKB vs kisspeptin stimulation so different in several conditions in the rat.

Reasonably, part of the above divergence observed between NKB and kisspeptin action may be due to the mode of action of these molecules in the control of GnRH/gonadotropin secretion. Kisspeptins can trigger the activation of GnRH neurons directly (38) and hence would consistently elicit GnRH release and thereby LH and FSH secretion. In contrast, NKB would operate upstream of KNDy neurons, modifying the kisspeptin output to GnRH neurons. It is therefore tenable that, depending on different variables, such as sex, developmental age, and gonadal hormone milieu, the effect of NKB may result in variable patterns/levels of kisspeptin release, thus explaining the variable responses summarized above. The fact that, at least in the rat, NKB seems able to preferentially, if not exclusively, induce the secretion of LH vs FSH might be explained by the induction of kisspeptin/GnRH secretory patterns prone to preferentially activate pituitary LH secretion. Likewise, the sexual dimorphism in terms of the capacity of NKB to induce LH or FSH responses in females vs males may involve a preferential action/expression of NKB/NK3R in one sex over the other at certain developmental stages.

Another contributing factor for the differential responses between kisspeptins and NKB is that other tachykinins, as SP and NKA, acting via other receptors (such as NK1R and NK2R), might also play a role in controlling gonadotropin release so that it would not be NKB alone but rather NKB in conjunction with these other TKs what critically modulates kisspeptin release. This possibility has been recently put forward on the basis of electrophysiological analyses in mice (21). Yet despite some initial studies in the area (39, 40), the effects of TKs on gonadotropin secretion in vivo, at different developmental periods, remains largely unexplored. To our knowledge, our present data are the first to document that during the prepubertal

period, just as is the case for senktide, activation of SP and NKA receptors can evoke significant gonadotropin responses, which in the case of LH are of greater amplitude for NKA/NK2R. In fact, transient but detectable LH responses to NKA were detected in adult male and females, whereas adult females appear to be responsive to NKA also in terms of FSH secretion. Although in general such effects were of modest magnitude, they illustrate interesting differences vs the profiles of LH and FSH responses to NK3R activation in males and females at different stages of maturation, as documented also here and in our previous study (12). Admittedly, however, how other TKs integrate in the KNDy paradigm is yet to be solved by additional functional and neuroanatomical studies.

Another element putatively involved in the generation of divergent responses to NKB vs kisspeptins for both gonadotropins is that related to the presumable action of NKB to modulate not only kisspeptin output but also the secretion of other KNDy products, including Dyn. In fact, studies in models of null or low sex steroid levels recently revealed that the inhibitory effects of senktide on LH secretion in female rats would require intact Dyn signaling (37), and Dyn decreases the ability of KNDy neurons to respond to senktide (41). Therefore, it is possible that the variable ability of the NKB agonist to stimulate LH and FSH secretion as function of sex and developmental stage in the rat may derive from a differential capacity of senktide to modulate Dyn secretion or actions, and/or fluctuations in the endogenous Dyn tone, defined by the expression of Dyn itself or its canonical receptor, KOR. Indeed, our functional data strongly suggest that the latter is a tenable possibility. Thus, in adult female rats, which display clear LH responses to senktide, blockade of Dyn signaling failed to alter basal gonadotropin levels as well as LH responses to the NKB agonist. In contrast, in male rats, which are unresponsive to senktide in terms of LH or FSH, pretreatment with the Dyn antagonist, nor-BNI, elevated the circulating levels of both gonadotropins and surfaced LH and FSH responses to senktide. Admittedly, nor-BNI pretreatment permitted also the manifestation of FSH responses to the NKB agonist in females. Altogether, these findings would suggest a higher Dyn-inhibitory tone in males so that its pharmacological blockade would result in the emergence of clear stimulatory effects in terms of basal gonadotropin concentrations and responses to senktide.

In line with the above argumentation, our expression studies have documented a significantly higher expression of both *Pdyn* and *Okpr1* genes in the MBH of males vs females. Of note, this area is comprised mainly by the ARC, where KNDy neurons are located and therefore likely holds the component of the Dyn/KOR system,

which is involved in KNDy regulation and the control of puberty onset and the reproductive axis (10, 13, 42). In fact, Dyn/KOR signaling in the brain has been proposed to play a role in the timing of puberty onset in rats (43). Of note, however, the higher expression levels in males reported here were detected selectively prepubertally but not during the pubertal transition to adulthood. Hence, although this phenomenon might be mechanistically relevant for the actual timing of puberty (delayed in males vs females) and in the sex differences in gonadotropin responsiveness to NK3R activation, ie, only males lose their capacity to mount LH responses to senktide during puberty, other mechanisms or sources of Dyn outside the MBH are likely to contribute also to the above sex divergence in the gonadotropic responses to senktide during and after puberty. In this context, it is interesting to note that *Pdyn* and *Okpr1* gene expression was consistently higher in the POA of females during postnatal maturation. Although the POA is an area in which most of the GnRH neurons are situated (44), the functional relevance of such sex-dependent difference in the expression of the genes encoding Dyn and KOR awaits further investigation.

In summary, we present herein a series of functional and expression studies that expand on the characterization of key elements of the KNDy paradigm, namely NKB and Dyn, as well as of the putative roles of other TKs, such as SP and NKA, in the central regulation of GnRH/gonadotropin secretion in rats. Specifically our data unveil differences in FSH vs LH secretory responses to NKB (and kisspeptin) stimulation as a function of sex, stage of development, and prevailing gonadal hormone levels. In addition, we provide compelling evidence for the roles of Dyn in the dynamic control of basal gonadotropin secretion and responses to NKB stimulation in male and female rats. Altogether our results support and refine the predicted roles of KNDy neuropeptides as potential pacemakers of kisspeptin/GnRH pulses; rather than mere switch-on and -off signals of Kiss1 neurons in all conditions, NKB and Dyn seem to operate as reciprocal interplayers, subjected to the precise regulation of sex and developmental signals, to finely and differentially modulate the generation of kisspeptin pulses and thereby GnRH/gonadotropin secretion. All in all, these findings, together with recent developments on the putative gonadotropic roles of other tachykinins (21), as also documented here using our *in vivo* setting, will help to reshape our understanding of the KNDy paradigm and how the neuropeptide products of KNDy neurons variably participate in the precise control of gonadotropin secretion in both sexes at different developmental and functional stages of the reproductive axis.

## Acknowledgments

We are indebted to Dr Enrique Aguilar for helpful comments and suggestions during the preparation of this manuscript. The superb technical assistance of Ana Belén Rodríguez and Antonia Sánchez-Arroyo is cordially appreciated.

Address all correspondence and requests for reprints to: Victor M. Navarro, PhD, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, 221 Longwood Avenue, Room 219, Boston, MA 02115. E-mail: [vnavarro@partners.org](mailto:vnavarro@partners.org); or Manuel Tena-Sempere, Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, University of Córdoba, 14004 Córdoba, Spain. E-mail: [fi1tesem@uco.es](mailto:fi1tesem@uco.es).

This work was supported by Grants BFU2011-025021 from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain; cofunded with European Union funds from the Fondo Social Europeo of the European Community Program; Project Award P08-CVI-03788 from the Junta de Andalucía, Spain; European Union Research Contract DEER FP7-ENV-2007-1; and the *Eunice Kennedy Shriver* National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health Grant K99 HD071970; and the Charles H. Hood Foundation Child Health Research Award (to V.M.N.). Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, Spain.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

1. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 2012;92:1235-1316.
2. Knobil E, Plant TM, Wildt L, Belchetz PE, Marshall G. Control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 1980;207:1371-1373.
3. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, et al. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*. 2007;148:5752-5760.
4. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2010;151:3479-3489.
5. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci*. 2009;29:11859-11866.
6. Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, et al. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 2010;30:3124-3132.
7. Billings HJ, Connors JM, Altman SN, et al. Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 2010;151:3836-3846.
8. Garcia-Galiano D, van Ingen Schenau D, Leon S, et al. Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stim-

- ulation of gonadotropin secretion in mice. *Endocrinology* 2012; 153:316–328.
9. Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, et al. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:E202–E210.
  10. Navarro VM, Ruiz-Pino F, Sanchez-Garrido MA, et al. Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *J Neurosci* 2012;32:2388–2397.
  11. Ramaswamy S, Seminara SB, Ali B, Ciofi P, Amin NA, Plant TM. Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 2010;151:4494–4503.
  12. Ruiz-Pino F, Navarro VM, Bentsen AH, et al. Neurokinin B and the control of the gonadotropin axis in the rat: developmental changes, sexual dimorphism, and regulation by gonadal steroids. *Endocrinology* 2012;153:4818–4929.
  13. Navarro VM, Tena-Sempere M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8:40–53.
  14. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol*. 2006;498:712–726.
  15. Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol*. 2005;489:372–386.
  16. Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE. Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience*. 2010;166:680–697.
  17. Kinsey-Jones JS, Grachev P, Li XF, et al. The inhibitory effects of neurokinin B on GnRH pulse generator frequency in the female rat. *Endocrinology*. 2012;153:307–315.
  18. Grachev P, Li XF, Lin YS, et al. GPR54-dependent stimulation of luteinizing hormone secretion by neurokinin B in prepubertal rats. *PLoS One*. 2012;7:e44344.
  19. Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, et al. Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* 2011;152:4265–4275.
  20. Lasaga M, Debeljuk L. Tachykinins and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis: an update. *Peptides*. 2011;32:1972–1978.
  21. de Croft S, Boehm U, Herbison AE. Neurokinin B activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse. *Endocrinology* 2013;154:2750–2760.
  22. Grachev P, Millar RP, O'Byrne KT. The role of neurokinin B signaling in reproductive neuroendocrinology. *Neuroendocrinology*. 2014;99:7–17.
  23. Rance NE, Bruce TR. Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 1994;60:337–345.
  24. Navarro VM. New insights into the control of pulsatile GnRH release: the role of Kiss1/neurokinin B neurons. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:48.
  25. Sandoval-Guzman T, Rance NE. Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res*. 2004;1026:307–312.
  26. Navarro VM, Ruiz-Pino F, Sanchez-Garrido MA, et al. Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *J Neurosci* 2012;153(1):316–328.
  27. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2005;146:1689–1697.
  28. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, et al. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology*. 2005; 146:156–163.
  29. Roa J, Vigo E, Castellano JM, et al. Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female rat. *Endocrinology*. 2006; 147:2864–2878.
  30. Garcia-Galiano D, Pineda R, Roa J, et al. Differential modulation of gonadotropin responses to kisspeptin by aminocidergic, peptidergic, and nitric oxide neurotransmission. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303:E1252–E1263.
  31. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: The New Coronal Set*. San Diego, CA: Elsevier Science; 2004.
  32. Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, Ruiz-Pino F, et al. Changes in hypothalamic expression of the Lin28/let-7 system and related microRNAs during postnatal maturation and after experimental manipulations of puberty. *Endocrinology*. 2013;154:942–955.
  33. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009;41:354–358.
  34. Young J, Bouligand J, Francou B, et al. TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2287–2295.
  35. Yang JJ, Caligioni CS, Chan YM, Seminara SB. Uncovering novel reproductive defects in neurokinin B receptor null mice: closing the gap between mice and men. *Endocrinology* 2012;153(3):1498–508.
  36. Ramaswamy S, Seminara SB, Plant TM. Evidence from the agonadal juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) for the view that the action of neurokinin B to trigger gonadotropin-releasing hormone release is upstream from the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology*. 2011;94:237–245.
  37. Grachev P, Li XF, Kinsey-Jones JS, et al. Suppression of the GnRH pulse generator by neurokinin B involves a  $\kappa$ -opioid receptor-dependent mechanism. *Endocrinology*. 2012;153:4894–4904.
  38. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, 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.
  39. Kalra PS, Sahu A, Bonavera JJ, Kalra SP. Diverse effects of tachykinins on luteinizing hormone release in male rats: mechanism of action. *Endocrinology*. 1992;131:1195–1201.
  40. Sahu A, Kalra SP. Effects of tachykinins on luteinizing hormone release in female rats: potent inhibitory action of neuropeptide K. *Endocrinology*. 1992;130:1571–1577.
  41. Ruka KA, Burger LL, Moenter SM. Regulation of arcuate neurons coexpressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin by modulators of neurokinin 3 and  $\kappa$ -opioid receptors in adult male mice. *Endocrinology*. 2013;154:2761–2771.
  42. Gill JC, Navarro VM, Kwong C, et al. Increased neurokinin B (Tac2) expression in the mouse arcuate nucleus is an early marker of pubertal onset with differential sensitivity to sex steroid-negative feedback than Kiss1. *Endocrinology* 2012;153:4883–4893.
  43. Nakahara T, Uenoyama Y, Iwase A, et al. Chronic peripheral administration of  $\kappa$ -opioid receptor antagonist advances puberty onset associated with acceleration of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *J Reprod Dev*. 2013;59:479–484.
  44. Herbison AE. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Neill JD, ed. *The Physiology of Reproduction*. San Diego: Academic Press/Elsevier; 2006:1415–1482.

**3.4 Environmentally relevant perinatal exposures to bisphenol-A disrupt postnatal Kiss1/NKB neuronal maturation and puberty onset in female mice (Versión enviada del Artículo 4; estado: Aceptado; in press).**

**Environmental Health Perspectives**

**Environmentally relevant perinatal exposures to bisphenol-A disrupt postnatal Kiss1/NKB neuronal maturation and puberty onset in female mice**

--Manuscript Draft--

|  |  |
|--|--|
| <b>Manuscript Number:</b>                          | EHP5570  |
| <b>Full Title:</b>                                 | Environmentally relevant perinatal exposures to bisphenol-A disrupt postnatal Kiss1/NKB neuronal maturation and puberty onset in female mice   |
| <b>Article Type:</b>                               | Research Article   |
| <b>Section/Category:</b>                           | Other  |
| <b>Corresponding Author:</b>                       | Manuel Tena-Sempere<br>University of Cordoba<br>CORDOBA, SPAIN   |
| <b>Corresponding Author Secondary Information:</b> |  |
| <b>Corresponding Author's Institution:</b>         | University of Cordoba  |
| <b>First Author:</b>                               | Francisco Ruiz-Pino  |
| <b>First Author Secondary Information:</b>         |  |
| <b>Order of Authors:</b>                           | Francisco Ruiz-Pino<br>Desiree Miceli<br>Delphine Franssen<br>Maria J. Vazquez<br>Alice Farinetti<br>Juan M. Castellano<br>Giancarlo Panzica<br>Manuel Tena-Sempere  |
| <b>Order of Authors Secondary Information:</b>     |  |
| <b>Manuscript Region of Origin:</b>                | SPAIN  |
| <b>Abstract:</b>                                   | <p>Pubertal timing is highly sensitive to environmental factors, including endocrine disruptors. Among them, bisphenol-A (BPA) has been previously analyzed as potential modifier of puberty. Yet, disparate results have been reported, with BPA advancing, delaying or being neutral on puberty onset. Likewise, mechanistic analyses addressing the actions/targets of BPA at puberty remain incomplete and conflictive.</p> <p>Objective: To provide a comprehensive characterization of the impact of early BPA exposures, at low (real-life) doses, on the postnatal development of hypothalamic Kiss1/NKB neurons, and its functional consequences on pubertal maturation.</p> <p>Pregnant CD1 female mice were orally administered with BPA at 5, 10 or 40 µg/kg BW/day from gestational-day-11 to postnatal-day-8 (PND8). Vaginal opening, as external marker of puberty onset, was monitored, and circulating gonadotropin levels and hypothalamic expression of Kiss1/kisspeptin and NKB were assayed at PND12, 15, 18, 21 and 30 in the female offspring.</p> <p>BPA exposure, at doses largely below the no-observed-adverse-effect level (NOAEL; 5 mg/kg BW/day), caused pubertal changes in the female progeny, with advancement of the age vaginal opening but consistent suppression of circulating LH. BPA induced also a persistent, but divergent impairment of Kiss1 neuronal maturation, with an increase in kisspeptin cells in the rostral (RP3V) hypothalamus, but a decline in kisspeptin neurons in the arcuate nucleus (ARC). Detailed quantitative analysis of the ARC population, revealed that BPA caused a persistent suppression of Kiss1</p> |

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation



|   |   |                           |
|---|---|---------------------------|
|   | <p>expression during (pre)pubertal maturation, associated with a drop of Tac2 (encoding NKB) levels, even at low doses (5µg/kg BW/day), in the range of the tolerable daily intake (TDI).</p> <p>Our data attest the consistent, but divergent effects of gestational exposures to low concentrations of BPA, via oral route, on phenotypic and neuroendocrine markers of puberty, with an unambiguous impact on the developmental maturation not only of Kiss1, but also of NKB, both essential regulators of puberty onset.</p> |                           |
| <b>Additional Information:</b>  |   |                           |
| <b>Question</b>   | <b>Response</b>   |                           |
| Have all authors confirmed the CFI information included on your CFI form and declaration? | Yes   |                           |
| <b>Funding Information:</b>   | University of Torino (Ricerca Locale ex-60%)  | Prof. Giancarlo Panzica   |
|   | Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (BFU2014-57581-P)  | Prof. Manuel Tena-Sempere |
|   | Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (BFU2017-83934-P)  | Prof. Manuel Tena-Sempere |
|   | Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (SAF2014-56995-JIN)  | Dr. Juan M. Castellano    |
| <b>Manuscript Classifications:</b>  | 20.020: Children's health; 20.060: Organ systems/disease processes; 20.060.006: Endocrine; 20.070: Reproduction, birth outcomes   |                           |



1 **Environmentally relevant perinatal exposures to bisphenol-A disrupt postnatal**  
2 **Kiss1/NKB neuronal maturation and puberty onset in female mice**

3 F. Ruiz-Pino\*, D. Miceli<sup>1</sup>\*, D. Franssen, M.J. Vazquez, A. Farinetti<sup>1</sup>, J.M. Castellano, G.C. Panzica<sup>1¶</sup>,  
4 M. Tena-Sempere<sup>¶</sup>

5 Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Department of Cell Biology,  
6 Physiology and Immunology, University of Córdoba; Hospital Universitario Reina Sofía & CIBER  
7 Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, 14004 Córdoba, Spain; and  
8 <sup>1</sup>Department Neuroscience "Rita Levi Montalcini", University of Torino, Torino, Italy & Neuroscience  
9 Institute Cavalieri-Ottolenghi (NICO), Orbassano, Italy.

10 \* *Equally contributed and should be considered as joint first authors*

11 <sup>¶</sup> *Equal senior authors*

12 **Short Title:** BPA, Puberty and the KNDy system

13 **Key Words:** Kiss1, NKB, BPA, puberty, endocrine disruptors

14

15 **Corresponding authors:** GianCarlo Panzica ([giancarlo.panzica@unito.it](mailto:giancarlo.panzica@unito.it))

16 Department Neuroscience "Rita Levi Montalcini", University of Torino  
17 Neuroscience Institute Cavalieri-Ottolenghi (NICO), Orbassano, Italy.

18 Juan M. Castellano ([b82caroi@uco.es](mailto:b82caroi@uco.es)) /

19 Manuel Tena-Sempere ([fi1tesem@uco.es](mailto:fi1tesem@uco.es))

20 Department of Cell Biology, Physiology & Immunology

21 Faculty of Medicine, University of Córdoba

22 Avda. Menéndez Pidal s/n. 14004 Córdoba, SPAIN

23 **Number of Pages:** 32 pages **Number of Figures/Supplemental:** 7/3

24 **Word count:** 6251 (Abstract, References & Legends excluded)

25 **Competing financial interests declaration:** The authors declare they have no actual or potential  
26 competing financial interest in relation with the contents of this work.

27 **Abstract**

28 **Background:** The timing of puberty is highly sensitive to environmental factors, including endocrine  
29 disruptors. Among them, bisphenol-A (BPA) has been previously analyzed as potential modifier of  
30 puberty. Yet, disparate results have been reported, with BPA advancing, delaying or being neutral on  
31 puberty onset. Likewise, mechanistic analyses addressing the central and peripheral actions/targets  
32 of BPA at puberty remain incomplete and conflictive.

33 **Objective:** To provide a comprehensive characterization of the impact of early BPA exposures,  
34 specially at low (real-life) doses, on the postnatal development of hypothalamic Kiss1/NKB neurons,  
35 and its functional consequences on pubertal maturation.

36 **Methods:** Pregnant CD1 female mice were orally administered with BPA at 5, 10 or 40 µg/kg BW/day  
37 from gestational day 11 to postnatal day 8 (PND8). Vaginal opening, as external marker of puberty  
38 onset, was daily monitored from PND20 to PND30 in the female offspring. Blood and brain samples  
39 were collected at PND12, 15, 18, 21 and 30 for measuring circulating levels of gonadotropins and  
40 analyzing the hypothalamic expression of Kiss1/kisspeptin and NKB.

41 **Results:** Perinatal exposure to BPA, in a range of doses largely below the no-observed-adverse-effect  
42 level (NOAEL; 5 mg/kg BW/day according to FDA), caused pubertal changes in the female progeny,  
43 with advancement of the age vaginal opening but consistent suppression of circulating LH levels. BPA  
44 induced also a persistent, but divergent impairment of Kiss1 neuronal maturation, with an increase in  
45 kisspeptin cells in the rostral (RP3V) hypothalamus, but a consistent decline in kisspeptin neurons in  
46 the arcuate nucleus (ARC). Detailed quantitative analysis of the ARC population, essential for pubertal  
47 development, revealed that BPA caused a persistent suppression of *Kiss1* expression during  
48 (pre)pubertal maturation, which was associated with a drop of *Tac2* (encoding NKB) levels, even at  
49 low doses (5µg/kg BW/day), in the range of the tolerable daily intake (TDI), recently updated by the  
50 European-Food-Safety-Authority.

51 **Conclusions:** Our data attest the consistent, but divergent effects of gestational exposures to low  
52 concentrations of BPA, via oral route, on phenotypic and neuroendocrine markers of puberty, with an  
53 unambiguous impact on the developmental maturation not only of Kiss1, but also of NKB, both essential  
54 regulators of puberty onset.

55 **Introduction**

56 The onset puberty is a robust developmental trait that is critically dependent on the proper  
57 functional organization of the reproductive neuroendocrine system, also termed hypothalamic-pituitary-  
58 gonadal (HPG) axis, at earlier stages of maturation. This intricate process starts in utero and  
59 progresses throughout postnatal development, it being highly influenced by the dynamic interplay  
60 between genes and environment (Tena-Sempere 2010). When this delicate interplay is disrupted, the  
61 maturation of the HPG axis is altered and, as a result, perturbation of the timing of puberty occurs,  
62 often as first phenotypic sign of later reproductive disorders. Interestingly, recent epidemiological  
63 studies have identified a downward trend for the age of puberty onset, especially in girls, with younger  
64 cohorts starting puberty earlier (Aksglaede et al. 2009a; Aksglaede et al. 2009b). For instance, the  
65 Copenhagen puberty study reported an advancement of approx. 1-year in the mean age of thelarche  
66 in two cohorts of girls born and studied ~15 years apart (between early 1990's and 2006). Given the  
67 similar genetic background and the short time elapsed, these observations claim for a key role of  
68 environmental factors in this phenomenon. Indeed, the escalating prevalence of child obesity has been  
69 blamed for this trend; however, BMI alone does not likely account for all the environmental contribution  
70 to the advancement of the age of puberty, which seemingly include also the effects of different  
71 endocrine-disrupting compounds (EDCs) (Castellano and Tena-Sempere 2016; Ozen and Darcan  
72 2011; Parent et al. 2015).

73 Among EDCs, BPA is one of the most widely studied. BPA is an organic compound with estrogenic  
74 activity used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins (Vandenberg et al. 2007).  
75 BPA is present in many common products, such as food and beverage containers, plastic eating  
76 utensils, toys and office products (Vinas et al. 2012). BPA is currently considered among the most  
77 important chemicals to be managed in terms of environmental health (Kot-Wasic A 2007; Petrović M  
78 2003). This is mainly due to its increasing production -over 8 billion pounds/year (Rubin 2011)-, and its  
79 potential involvement in a wide array of health problems, including reproductive disorders related to  
80 altered maturation and/or function of the HPG axis (Gore 2012; Patisaul et al. 2009; Rubin et al. 2001;  
81 Welshons et al. 2006). Nonetheless, the impact of BPA on puberty onset remains contentious. In  
82 female rodents, pre- and postnatal BPA exposure has been associated with either normal or  
83 precocious age of vaginal opening, considered as an external index of puberty onset, depending on  
84 the timing, dose and route of administration (Adewale et al. 2009; Fernandez et al. 2009; Honma et al.  
85 2002; Nikaido et al. 2004; Parent et al. 2015). Moreover, a recent study suggested that postnatal

86 exposure to very low doses of BPA delayed puberty onset in rats (Franssen et al. 2016). In the same  
87 vein, contradictory findings have also been reported in girls, where some studies suggest an  
88 association between increased urinary levels of BPA and altered puberty (Durmaz et al. 2014; Durmaz  
89 et al. 2018; Kasper-Sonnenberg et al. 2017; McGuinn et al. 2015), while other studies failed to detect  
90 changes in pubertal timing linked to BPA excretion (Bulus et al. 2016; Lee et al. 2014).

91 Despite numerous phenomenological studies, the mechanisms whereby BPA exposure might  
92 impact on the timing of puberty in females remain poorly understood. While initial studies suggested  
93 the involvement of peripheral mechanisms (Adewale et al. 2009; Nah et al. 2011; Nikaido et al. 2004),  
94 recent reports, involving the use of rodent models exposed to different (including low) doses of BPA,  
95 have highlighted the relevance of central neuroendocrine mechanisms (Franssen et al. 2016; Losa et  
96 al. 2011; Naule et al. 2014; Oliveira et al. 2017; Roepke et al. 2016). In this context, compelling, as yet  
97 incomplete evidence has suggested a pathogenic role for the hypothalamic kisspeptin system, as a  
98 potential target and mediator for the disrupting neuroendocrine actions of BPA on female pubertal  
99 development (Castellano and Tena-Sempere 2016; Patisaul 2013).

100 Kisspeptins, a family of structurally related peptides encoded by the *Kiss1* gene, are considered  
101 essential regulators of key aspects of reproductive function (Navarro and Tena-Sempere 2012; Pinilla  
102 et al. 2012). In particular, kisspeptins play an essential role in the activation of the HPG axis at puberty  
103 (Tena-Sempere 2013; Terasawa et al. 2013). This is based on different studies showing that: (i)  
104 inactivating mutations of either KISS1 or KISS1R (its putative receptor) cause lack of pubertal  
105 maturation; (ii) kisspeptin tone and sensitivity increase along pubertal development; and (iii) the  
106 number of kisspeptin neurons and their projections to GnRH neurons, considered to be ultimately  
107 responsible for triggering puberty, increase during the juvenile-pubertal transition (Pinilla et al. 2012).  
108 Importantly, neuroanatomical studies have demonstrated the existence of two major populations of  
109 kisspeptin neurons that are differently regulated by sex steroids (Clarkson et al. 2009b; Pinilla et al.  
110 2012). One of these populations is located in the rostral preoptic area of the third ventricle (RP3V) and  
111 responds to estrogen with increased synthesis of kisspeptin. In contrast, the other population is located  
112 in the arcuate nucleus (ARC) and responds to estrogen with inhibition of kisspeptin production  
113 (Marraudino et al. 2018; Smith et al. 2005a; Smith et al. 2005b). ARC kisspeptin neurons have shown  
114 to co-express Neurokinin B (NKB), a tachykinin peptide encoded by *TAC3/Tac2* gene (Lehman et al.  
115 2010; Navarro et al. 2011). Apparently, the release of NKB from these neurons, termed KNDy neurons  
116 as they also express Dynorphin (hence they produce Kisspeptins, NKB and Dynorphin), can activate

117 kisspeptin output from KNDy neurons –which are profusely interconnected, and in this way modulates  
118 GnRH neurosecretory activity (Navarro et al. 2011; Ramaswamy et al. 2010; Wakabayashi et al. 2013).  
119 In good agreement, it has been reported that the expression of *Tac2* increases earlier than *Kiss1* during  
120 postnatal development (Gill et al. 2012) and NKB stimulates kisspeptin during the prepubertal period  
121 (Navarro et al. 2011), thus suggesting the potential role of NKB in the pubertal activation of kisspeptin-  
122 GnRH secretion.

123 The possibility that BPA might alter the maturation of the HPG axis in females by disrupting the  
124 hypothalamic kisspeptin system has been suggested by a limited number of studies, which have  
125 documented that neonatal injections of high doses of BPA significantly decreases (i) *Kiss1* mRNA  
126 expression at the RP3V in infantile female rats (Cao et al. 2012); (ii) the hypothalamic levels of *Kiss1*  
127 mRNA in peripubertal female rats (Navarro et al. 2009b); and (iii) the number of kisspeptin fibers in the  
128 ARC of adult female rats (Patisaul et al. 2009). However, a comprehensive characterization of the  
129 impact of early BPA exposure, especially at low (real-life) doses, on the postnatal development of  
130 hypothalamic *Kiss1*/NKB neurons, and its functional consequences in terms of pubertal maturation of  
131 the female HPG axis is totally missing. Here, we explore the consequences of perinatal exposure to a  
132 wide range of doses of BPA, relevant in terms of environmental exposure and route of administration,  
133 on the infantile, juvenile and pubertal development of hypothalamic *Kiss1*/NKB neurons in female mice,  
134 and correlate such changes with relevant functional markers of pubertal onset, such as the age of  
135 vaginal opening and the developmental pattern of gonadotropin secretion.

## 136 **Methods**

### 137 **Animals and Experimental Design**

138 All experimental procedures involving the use of laboratory rodents were carried out according to the  
139 regulations of EU (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22  
140 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes) and the institutional  
141 guidelines on animals' welfare (DL 116/92) of the University of Turin. Experiments were approved by  
142 the Ethical committee of the University of Turin and were designed to minimize the number of animals  
143 used.

144 Forty adult CD1 female mice (12-wk-old) mice bred in the vivarium of the University of Turin were used  
145 as dams for BPA administration; a graphical presentation of the experimental design is shown in  
146 **Supplemental Fig. S1**. Animals were maintained under constant conditions of light (12 h light/dark

147 cycle) and temperature (22-23°C), and housed in groups of 3-4 mice per cage with free access to food  
148 and water. During a pre-experimental phase of ten days, animals with adequate weight gain and  
149 without clinical abnormalities were trained to drink spontaneously drink tocopherol-stripped Corn Oil  
150 (Sigma-Aldrich, Europe) through a non-stressful procedure (Palanza et al. 2002). Briefly, animals were  
151 picked up by the skin between the shoulders and held upright. A micropipette tip was placed into the  
152 mice's mouth with the pipette tip gently touching the roof of the mouth, and the oil was ejected from  
153 the pipette. Mice readily consume oil. After this period, female mice were housed between cages of  
154 males to induce ovulation and then paired with CD1 male mice for up to a week. Mating was verified  
155 by the presence of vaginal plug (considered day 0 of gestation). After mating, pregnant females were  
156 housed singularly and randomly divided into four experimental groups of treatment (10 pregnant mice  
157 per group): OIL, receiving only the vehicle (Corn oil); BPA 5, BPA 10, and BPA 40, receiving 5, 10 and  
158 40 µg/kg BW/day of BPA (BPA purity 99%, SIGMA-Aldrich, Europe), respectively. The dosing solutions  
159 were freshly prepared and adjusted to the current weight of mice (final volume: 30 µL).

160 Treatments were orally administered daily from gestational day 11 (G11) to postnatal day 8 (PND8).  
161 Within 12h from birth, litters were weighted, sexed and culled to 10 pups (5±1 males and 5±1 females)  
162 and returned to their mother. Upon weaning (PND21), pups of the same gender and group of treatment  
163 were housed in single mouse cages with free access to food and water. All experiments were  
164 performed with female mice (n=5±1 each group). Vaginal opening (VO), considered as an external  
165 sign of puberty onset, was monitored daily from PND19 to PND30, in OIL and BPA-treated groups.  
166 Subsets of mice were euthanized at different time points of early postnatal development: PND12, 15,  
167 18 (infantile period), 21 (juvenile period) and 30 (pubertal period) for hormonal and expression analyses  
168 (*see details below*). All the analyses were conducted with at least 5-6 independent determinations per  
169 experimental group. According to *a priori* statistical power calculations, the selected group sizes (n)  
170 were proven sufficient to provide reliable and consistent results.

#### 171 **Tissue preparation**

172 Female mice exposed to OIL or a wide range of BPA doses (BPA 5, 10 or 40) were anesthetized by  
173 an intraperitoneal (ip) injection of chloral hydrate (400mg/kg) and euthanized by decapitation in the  
174 morning (10:00 h), at the age points indicated above (PND12, 15, 18, 21 and 30). Trunk blood samples  
175 were collected, centrifuged for serum isolation and stored at -20°C for hormonal determinations. Brain  
176 samples were collected on dry ice and stored at -80°C until be processed for analysis of the expression

177 patterns of kisspeptin-IR or *Kiss1* and *Tac2* mRNA, using immunohistochemistry (IHC) and in situ  
178 hybridization (ISH), respectively. Five sets of 20µm sections in the coronal plane were cut on a cryostat,  
179 from the diagonal band of *Broca* to the mammillary bodies, thaw-mounted onto SuperFrost Plus slides  
180 (VWR Scientific), and stored at -80°C.

181 **Kisspeptin immunohistochemistry (IHC) and quantitative analysis**

182 For IHC analyses, female mice (OIL/BPA5-40 groups at PND12-21) were deeply anesthetized with  
183 2,2,2-Tribromoethanol (250 mg/kg i.p.; SIGMA-Aldrich, Europe), perfused at first with 0.9% saline  
184 solution until blood was flushed, followed by fixative solution (4% formaldehyde in 0.1M phosphate  
185 buffer, pH 7.4). Brains were dissected, post-fixed overnight in the same fixative, and stored in 30%  
186 sucrose-PBS solution for 2-4 days at 4°C. Brains were frozen in a dry ice/isopentane bath at -35 °C  
187 and 4 sets of coronal sections 25-µm-thick were cut containing the AvPV/PeN and the ARC nuclei,  
188 respectively, and kept as free-floating sections in antifreeze solution at -20 °C. The plain of sectioning  
189 matched the drawings corresponding to the coronal sections of the mouse brain atlas (Paxinos and  
190 Franklin 2001). All sections were processed simultaneously, and the individual slides were coded to  
191 blind the treatment for the evaluator.

192 Brain sections were processed for the avidin-biotin immunohistochemical method, according to  
193 previous references (Franceschini et al. 2006). Briefly, after overnight rinsing in 0.01 M PBS, sections  
194 were exposed to Triton X-100 (0.2% in PBS), treated in 1% methanol/hydrogen peroxide solution for  
195 20 min to block endogenous peroxidase activity, and incubated for 30 min with normal goat serum  
196 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were then incubated at 4 °C for 24 h in a  
197 polyclonal rabbit antiserum AC#566 against rodent kisspeptin-10 (generous gift of Dr. I. Franceschini,  
198 Nouzilly, France), diluted 1:10.000, as previously defined (Clarkson and Herbison 2006; Franceschini  
199 et al. 2006). After washing in PBS, the sections were incubated for 60 min in biotinylated secondary  
200 goat anti-rabbit G1g (Vinci, Biochem, Italy), washed, incubated for 60 min with the biotin-avidin complex  
201 (BAS, Vectastain Elite kit, Labtek), and washed again. Finally, they were incubated in 0.15 mg/ml  
202 diaminobenzidine (DAB, SIGMA-Aldrich, Europe) and 0.025% hydrogen peroxide in 0.05 M Tris-HCl  
203 buffer (pH 7.6) for 5 min and then washed twice in distilled water and PBS. The free-floating brain  
204 sections were mounted on chrom-alum coated slides, air-dried, washed in xylene, and cover-slipped  
205 in Entellan Mounting Medium (Merck, Milan, Italy).



206 For quantitative analysis of kisspeptin-immunoreactive (Kp-IR) cells bodies and fibers, we selected two  
207 hypothalamic areas: RP3V (Bregma 0.50 - 0.02) and ARC (Bregma -1.46 - 1.70). A variable number  
208 of standardized sections of comparable levels were chosen for each nucleus, 4 for ARC, and 6 for  
209 RP3V. Selected levels were digitized with a NIKON Digital Sight system connected to a NIKON Eclipse  
210 80i microscope (Nikon Italia S.p.S., Firenze, Italy), by using a 10x (RP3V) or a 20x (ARC) objective.  
211 Digital images were processed and analyzed by means of a freeware (ImageJ 1.42q written by Wayne  
212 Rasband NIH, USA). Total measurements were performed within predetermined areas (area of  
213 interest, AOI). The AOI selected for each nucleus was a box of fixed size and shape, selected to cover  
214 positive material only within the boundaries of each nucleus (about 600.000  $\mu\text{m}^2$  for RP3V, and  
215 280.000 for ARC). Kp-IR structures (cell bodies and processes) were measured by calculating in binary  
216 transformations of the images (threshold function of the software) the fractional area (percentage of  
217 pixels) covered by immunoreactive elements. Due to differences in the immunostaining, the range of  
218 the threshold was individually adjusted for each section. In line with our previous studies (Marraudino  
219 et al. 2018; Panzica et al. 2011), the Kp-IR cell bodies were clearly visible only in the RP3V, whereas  
220 they were not clearly discernible within the ARC due to dense fiber accumulation. Therefore, the  
221 number of Kp-IR cell bodies was measured only in the RP3V, by the Cell Counter plugin of ImageJ,  
222 and expressed as total number of cells in the reference area. The analyses were performed blinded  
223 with regard to treatment group.

#### 224 **Detection of *Kiss1* and *Tac2* mRNA expression by in situ hybridization (ISH)**

225 To quantitatively assess the levels of *Kiss1* and *Tac2* mRNA, ISH procedures were performed in  
226 hypothalamic tissues obtained from the above experimental groups, with special attention to the  
227 analysis of the hypothalamic regions comprising most of the expression of *Kiss1* (ARC and RP3V) and  
228 *Tac2* (ARC). For detection mouse *Kiss1* mRNA, a specific antisense riboprobe (5'-  
229 ACCTGCCTCCTGCCGTAGCG-3') located between 352-371 nucleotides of the cDNA sequence  
230 (GenBank accession no. AF472576) was used. In the case of *Tac2* mRNA, the specific antisense  
231 riboprobe (5'-ATTTGAGGATGCCAAAGCTG-3') is located between 444-463 nucleotides of cDNA  
232 sequence (GenBank accession no. NM\_009312).

#### 233 **Single-label ISH of *Kiss1* and *Tac2* mRNA**

234 Radiolabeled *Kiss1* and *Tac2* mRNA probes were transcribed using T7 polymerase (Bio-Rad  
235 Laboratories, Hercules, CA) and *Kiss1* or *Tac2* cDNA templates containing T7 polymerase region as  
236 described previously (Ruiz-Pino et al. 2012; Sanchez-Garrido et al. 2014; Sanchez-Garrido et al.

237 2015). Briefly, radiolabeled RNA probes were synthesized by adding the following reagents in a final  
238 volume of 25  $\mu$ L: 250 Ci [33P]-UTP (Perkin Elmer; Madrid, Spain), 1 $\mu$ g of template for *Kiss1* or *Tac2*,  
239 0.5mM rATP, rCTP and rGTP, and 40 U T7 RNA polymerase. Residual DNA was digested with 4 U  
240 DNase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA); reaction was terminated by addition of 2  $\mu$ L of 0.5 M  
241 EDTA, pH 8.0. The riboprobes were separated from unincorporated nucleotides using Illustra™  
242 ProbeQuant™ G-50 MicroColumns (GE Healthcare, UK).

243 Slides with mouse hypothalamic sections from the different treatment group and ages were processed  
244 before hybridization, as described previously (Manfredi-Lozano et al. 2016). Briefly, slides were: i) fixed  
245 in paraformaldehyde at 4% for 15 min; ii) stabilized with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at room  
246 temperature for 20 min; iii) acetylated for 10 min in 0,25% acetic anhydride in 0,1 M triethanolamine to  
247 prevent non-specific binding of probes; iv) dehydrated in increasing concentrations of ethanol; v)  
248 delipidated with chloroform and vi) air dried at room temperature for 1 h. After these steps, hybridization  
249 with *Kiss1* and *Tac2* riboprobes was performed during 16 h at 55 °C. Hybridization solution contained:  
250 deionized formamide (SIGMA), 50% dextran sulfate (SIGMA), 5M NaCl, 1M Tris base (pH 8.0), 0,5 M  
251 EDTA (pH 8.0), 50X Denhardt's solution (SIGMA) and 0,03 pmol/ml of radiolabeled riboprobe along  
252 with 10 mg/ml yeast tRNA (SIGMA).

253 The following day, slides were washed with 4X SSC for 30 min, treated with RNase A (10g/ml; Sigma,  
254 St. Louis, MO) during 30 min and washed under conditions of increasing stringency including two 30-  
255 min washes in 0.1X SSC (sodium saline citrate; 1X SSC is 150 mm NaCl, 15 mm sodium citrate) at 65  
256 °C, dehydrated in increasing ethanol series and air dried at room temperature for 1 h. Finally, slides  
257 were dipped in Kodak Autoradiography emulsion type NTB (Eastman Kodak), air dried and stored at  
258 4 °C for 1 week in a dark room. After this period, the sections were developed and fixed following the  
259 manufacturer instructions (Kodak; Rochester, NY): 3-min in Kodak Dektol developer and 5 min in  
260 Kodak Fixer. Slides were previously dehydrated and rinsed with Sub-X™ clearing medium and Sub-X  
261 mounting medium (SIGMA).

#### 262 **Quantification and analysis of *Kiss1* and *Tac2* mRNA**

263 Similar anatomical regions were analyzed using the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin 2001),  
264 and specific hybridization signals were quantified by densitometry using a digital imaging system  
265 (Image-Pro Plus 4.5; Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD). For analysis, brain sections were divided

266 in five sets every 20  $\mu\text{m}$  (thickness of slice); a single set was analyzed unilaterally (adjacent sections  
267 100  $\mu\text{m}$  apart).

268 **Hormone measurements.**

269 Serum LH and FSH levels were measured using radioimmunoassay (RIA) kits supplied by the National  
270 Institutes of Health (Dr. A.F. Parlow, National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA). Rat LH-  
271 I-10 and FSH-I-9 were labeled with  $^{125}\text{I}$  using Iodo-gen tubes, following the instructions of the  
272 manufacturer (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Hormone concentrations were expressed using  
273 reference preparations LH-RP-3 and FSH-RP-2 as standards. Intra- and inter-assay coefficients of  
274 variation (CV) were less than 8 and 10% for LH and 6 and 9 % for FSH. The sensitivity of the assay  
275 was 5 pg/tube for LH and 20 pg/tube for FSH. Hormonal determinations were conducted in duplicate,  
276 with group sizes  $\geq$  seven samples per group. Accuracy of hormone determinations was confirmed by  
277 assessment of mouse serum samples of known concentrations (used as external controls)

278 **Presentation of data and statistical analysis**

279 Data are presented as the means  $\pm$  S.E.M. Results were analyzed for statistically significant  
280 differences, using unpaired one-way ANOVA followed by Fisher Least Signification Difference (LSD)  
281 post hoc test (SPSS16 statistic software, Chicago, USA) or by Student-Newman-Keuls multiple range  
282 test (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, USA). In addition, Student's nonparametric *t* test was  
283 used to assess variation among experimental groups (GraphPad Prism Software Inc., San Diego,  
284 USA). Values of  $P \leq 0.05$  were considered significant.

285 **Results**

286 ***Perinatal exposure to BPA advances the timing of puberty onset***

287 The impact of BPA exposure on the age of VO, as consensus index of the onset of puberty, was  
288 evaluated in female mice perinatally exposed to increased doses of BPA: 5, 10 or 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW/day.  
289 All BPA doses induced a significant advance in the age of VO (BPA 5:  $23 \pm 0.292$ ,  $n=6$ ,  $p \leq 0.001$ ; BPA  
290 10:  $24 \pm 0.368$ ,  $n=6$ ,  $p \leq 0.01$ ; and BPA 40:  $23 \pm 0.167$ ,  $n=6$ ,  $p \leq 0.001$ ; values expressed as PND),  
291 compared to the control group (OIL:  $\text{PND}26 \pm 0.425$ ,  $n=6$ ; **Fig. 1a**). This phenomenon was especially  
292 evident at PND23, where all BPA 40-exposed animals already displayed VO while no VO was observed  
293 in the OIL-exposed group (**Fig. 1a**). No dose-response effect was observed for BPA impact on pubertal

294 timing, as illustrated by the fact that the age of VO was statistically similar between the groups exposed  
295 to the lowest and the highest dose of BPA (**Fig. 1a**).

296 ***Perinatal exposure to BPA alters postnatal secretion patterns of LH and, to a lesser extent, FSH***

297 Serum LH and FSH levels were assessed in female mice perinatally exposed to increasing doses  
298 of BPA: 5, 10 or 40 µg/kg BW/day at different time points of postnatal development: PND12, 15, 18,  
299 21 and 30, representative of the infantile, juvenile and pubertal stages of postnatal maturation.  
300 Perinatal exposure to BPA resulted in a significant reduction in serum LH levels at all ages and doses  
301 tested, compared to the age-matched control animals, except for PND18, where no significant changes  
302 were detected. In OIL-exposed animals, circulating levels of LH fluctuated during the study period; they  
303 were high at PND12, declined at PND15 and 18, and sharply increased before the onset of puberty, at  
304 PND 21. However, serum levels of LH were relatively constant and persistently low in all BPA-exposed  
305 animals and ages tested (**Fig. 1b**). Regarding FSH secretion, variable but significant responses to BPA  
306 exposure were only detected at PND15 and 18. While increased FSH secretion was observed between  
307 OIL and BPA 5 and 10 groups at PND15 (OIL PND15:  $12.921 \pm 0.333$  ng/mL vs. BPA10 PND15:  
308  $17.215 \pm 0.536$  ng/mL, n=5-6), a significant decrease was detected with those doses at PND18 (OIL  
309 PND18:  $4.467 \pm 0.884$ ; BPA5 PND18:  $1.966 \pm 0.299$ ; BPA10:  $2.477 \pm 0.417$ ; n= 6-7) (**Fig. 1b**). In  
310 contrast to developmental LH responses to BPA exposure, fluctuations in circulating levels of FSH  
311 were similar between OIL and BPA-exposed groups, with a drastic decline along postnatal  
312 development, especially from early infantile (PND12 and 15) to late infantile period (PND18) (**Fig. 1b**).  
313 In addition, although significant LH and FSH responses were observed with different BPA doses and  
314 at different time-points, no dose-response effect was detected at any age. Of note, early exposure to  
315 BPA 5, the lowest dose of BPA tested, was sufficient to alter the pattern of gonadotropin secretion  
316 along the postnatal development.

317 ***Postnatal development of RP3V and ARC Kisspeptin neurons is differentially affected by peri-***  
318 ***natal exposure to BPA.***

319 Immunohistochemical analyses were conducted at different stages of postnatal development  
320 (PND 12, 15, 18, 21 and 30), in female mice, perinatally exposed to 5, 10 or 40 µg/kg BW/day of BPA,  
321 in order to evaluate changes in kisspeptin-immunoreactivity (Kp-IR) in the hypothalamic RP3V and

322 ARC areas. Consistent with previous studies, kisspeptin positive fibers and neurons were detected at  
323 the RP3V and ARC in all control animals along the study period (Clarkson and Herbison 2006). In the  
324 RP3V, Kp-IR in control (OIL) animals, both in terms of fiber density and number of neurons, increased  
325 from early infantile period (PND12 and 15) to PND18 and remained high from PND18 to PND30 (**Fig.**  
326 **2 & Supplemental Fig. S2**). A similar pattern of Kp-IR was also observed in BPA-exposed animals;  
327 yet, at PND30, the number of both Kp-positive fibers and neuronal cell bodies was significantly higher  
328 in BPA-treated groups, while the number of Kp-IR cells was already significantly increased by perinatal  
329 BPA (at all doses) on PND12 and PND21 (**Fig. 2 & Supplemental Fig. S2**).

330 In the ARC, an increase in Kp-IR fiber density was detected along postnatal development in both  
331 control and BPA-exposed mice. However, animals exposed to BPA showed a significant lower density  
332 of kisspeptin immuno-positive structures at all ages, as compared to controls, with a variable interaction  
333 between the dose and age (**Fig. 3 & Supplemental Fig. S3**). Interestingly, the lowest dose of BPA  
334 tested (BPA 5) consistently caused a reduction in the total Kp immunoreactivity density at all ages  
335 studied, except for PND18; this dose was also consistent in causing changes in Kp-IR, in terms of  
336 fibers and cells, in the RP3V described above. Note that quantification of kisspeptin positive neurons  
337 in the ARC was unviable in due to the large amount of fibers detected and the difficulty to discern  
338 between kisspeptin positive fibers and cell bodies at this nucleus.

339 ***Perinatal exposure to BPA 5 impacts differentially on postnatal expression of Kiss1 mRNA in***  
340 ***the RP3V and ARC.***

341 Considering the impact of the lowest dose of BPA on neuroanatomical distribution of Kp-IR along  
342 postnatal development, we selected this experimental group for further, truly quantitative ISH analyses  
343 of *Kiss1* mRNA expression at the R3PV and ARC of infantile (PND12, 15 and 18), juvenile (PND21)  
344 and pubertal (PND30) female mice. An increase in *Kiss1* mRNA expression during the juvenile-  
345 pubertal transition was observed at the R3PV and the ARC in all experimental groups (**Fig. 4 and Fig.**  
346 **5**). However, perinatal BPA-5 exposure divergently impacted the profile of *Kiss1* expression at these  
347 two hypothalamic sites during postnatal maturation. Thus, while a BPA-5 females displayed  
348 significantly elevated *Kiss1* mRNA levels over the control group in the RP3V at PND12, 18 and 21

349 (Fig. 4), a significant drop in *Kiss1* mRNA levels over the control group was observed at the ARC at  
350 all ages (except for PND15) in BPA-treated animals (Fig. 5).

351 **Developmental expression of *Tac2* in the ARC is downregulated by perinatal exposure to BPA.**

352 Considering the proven co-expression of *Kiss1* and *Tac2* in the ARC (Navarro et al. 2009a), and  
353 our findings on the *Kiss1* mRNA expression profile in the ARC of BPA-exposed animals, we selected  
354 two representative ages, PND15 (late infantile) and 30 (pubertal), to assess the impact of the range of  
355 doses of BPA on the expression of *Tac2* mRNA at the ARC. An increase in *Tac2* levels was detected  
356 in control females between the infantile and pubertal ages, in line with previous references (Navarro et  
357 al. 2012). Interestingly, perinatal exposure to a range of doses of BPA consistently suppressed ARC  
358 *Tac2* levels, at both ages tested, except for the BPA-10 dose at PND15. In fact, at puberty (PND30),  
359 *Tac2* expression levels in the ARC were significantly lower in all BPA groups; perinatal BPA exposure  
360 was able to substantially attenuate (BPA-5 and BPA-40) or fully prevent (BPA-10) the developmental  
361 rise of *Tac2* expression in the ARC detected in control animals (Fig. 6).

362 Because the lowest dose of BPA, 5µg/kg BW/day, was sufficient to induce significant alterations  
363 in the expression of *Tac2* mRNA at the ARC during the juvenile-pubertal transition, we used female  
364 mice perinatally exposed to BPA-5 to conduct a detailed analysis of the expression pattern of *Tac2*  
365 mRNA at the ARC of infantile (PND12, 15 and 18), juvenile (PND21) and pubertal (PND30) animals.  
366 In good agreement with *Kiss1* mRNA profiles (see Fig. 5) and our initial results (see Fig. 6), *Tac2*  
367 mRNA levels increased along pubertal development in the ARC of control and BPA-exposed mice; yet.  
368 However, perinatal BPA-5 exposure caused a consistent, significant suppression of *Tac2* mRNA  
369 expression that was fully detectable at the mid infantile (PND15), juvenile (PND21) and pubertal  
370 (PND30) stage of postnatal maturation (Fig. 7).

371 **Discussion**

372 Compelling clinical and preclinical evidence has documented that puberty onset is sensitive to  
373 environmental promptings, ranging from nutritional cues to hormone-mimics (Castellano and Tena-  
374 Sempere 2016). Interest in pubertal alterations has been boosted by recent worrying epidemiological  
375 reports of disturbed (mostly earlier) puberty onset in humans (Aksghlaede et al. 2009a; De Leonibus et

376 al. 2013; Herman-Giddens et al. 2012). Of note, such perturbations might, in one hand, serve as  
377 sentinel for deterioration of environmental inputs onto reproductive health, and may, on the other, have  
378 adverse long-term consequences, including higher risk of different cancers as well as musculoskeletal,  
379 gynecological, neurocognitive and metabolic disorders (Day et al. 2015), together with reduced life  
380 expectancy (Lakshman et al. 2009). In this context, the potential pubertal impact of BPA, as  
381 environmentally relevant EDC, has been addressed by numerous clinical and preclinical studies. Yet,  
382 conflictive results have been reported, with BPA advancing, delaying or being neutral on puberty onset,  
383 possibly due to differences in time-windows, doses and routes of exposure. Of note, most of these  
384 studies (i) did not provide a tenable substrate, or even the neurohormonal or gonadal basis for the  
385 observed phenotypes and (ii) did not consider the pubertal impact of real-life BPA exposure, as they  
386 involved the use of very high doses and more invasive routes of administration (e.g. injections) that do  
387 not match with the expected patterns of environmental exposure.

388 In line with some previous studies (Adewale et al. 2009; Fernandez et al. 2009; Losa-Ward et al.  
389 2012; Nikaido et al. 2004), our data show that early exposures to BPA can advance vaginal opening,  
390 as consensus phenotypic sign of puberty onset. It must be noted, however, that most of previous  
391 studies consisted of either exposures to high doses, in the range of >10-200 fold higher than the  
392 present study (Nikaido et al. 2004), or parenteral administration of the compound to the pups  
393 postnatally (Adewale et al. 2009; Fernandez et al. 2009; Losa-Ward et al. 2012); windows of exposure  
394 and doses are critically determinant for the net impact of BPA on pubertal timing (Franssen et al. 2016).  
395 Our analyses document an intergenerational influence of BPA, given orally to the mother over a range  
396 of doses, on pubertal timing of the female offspring, with a consistent advancement of the age of  
397 vaginal opening in all BPA-treated groups. Notably, no dose-response was detected, and even a trend  
398 for a non-monotonic effect was observed, as the lowest and the highest BPA dose seemed to affect  
399 the age of vaginal opening more than the intermediate dose. This non-monotonic relationship, which  
400 is regularly associated with BPA dose-response studies, used to be related to the induction of different  
401 ligand-receptor interactions (Villar-Pazos et al. 2017). Importantly, the lowest dose tested (5µg/kg  
402 BW/day, between G11-PND8) is 10-fold below the TDI proposed by EFSA in 2006, and 1000-fold lower  
403 than the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) in humans (Picot et al. 2014). Even assuming the

404 new recommendations of EFSA for a temporary TDI of 4 µg/kg BW/day (Authority 2015), the low dose  
405 tested in our study is fully aligned with this tentative precautionary value, which is nonetheless provisional  
406 and pending confirmation by a long-term BPA exposure study in rats, undertaken by the FDA. All these  
407 features, together with the oral dosage, as conventional route of exposure to BPA, attest for the  
408 potential environmental relevance of our findings.

409 Despite phenotypic signs for earlier pubertal maturation, perinatal BPA exposure resulted in a  
410 consistent suppression of circulating LH levels, with a flattened pattern of secretion in all BPA groups,  
411 which was in clear contrast with the dynamic fluctuation of endogenous LH levels seen in vehicle-  
412 treated prepubertal and pubertal females. Assumedly, changes in LH levels likely reflect changes in  
413 GnRH neurosecretory activity, therefore suggesting a suppression of pulsatile of GnRH production  
414 after perinatal exposure to BPA, even at low doses. This hypothesis is further supported by the reduced  
415 *Kiss1* mRNA levels and kisspeptin content detected in the ARC of BPA exposed mice; a *Kiss1* neuronal  
416 population that is regarded as a key element of the GnRH pulse generator (Herbison 2016).  
417 Considering the more constitutive and less-kisspeptin responsive pattern of secretion of FSH, the fact  
418 that the secretory profiles of this gonadotropin were not equally affected by BPA exposures is not  
419 surprising, and may help to reconcile the differential central (clearly inhibitory) vs. peripheral impact of  
420 BPA exposures. In any event, it is very likely that perinatal BPA may also operate as estrogenic  
421 compound directly at the vaginal level, thereby contributing to its precocious canalization, which is  
422 known to be an estrogen-dependent phenomenon (Rodriguez et al. 1997).

423 Previous studies had evaluated the potential impact of BPA on *Kiss1*/kisspeptin expression in the  
424 hypothalamus, although to our knowledge no study addressing the effects of environmentally relevant  
425 doses and routes of administration, and their impact on puberty, had been reported so far. Moreover,  
426 some of these initial studies lacked neuroanatomical resolution, which might explain divergent results  
427 showing that early BPA exposure, at high doses, caused either a decrease (Navarro et al. 2009b), or  
428 an increase (Xi et al. 2011), in whole hypothalamic *Kiss1* expression. Interestingly, a protocol of  
429 perinatal exposure to BPA grossly similar to ours was previously applied to evaluate the capacity of  
430 this EDC to induce feminization of adult male rats, in terms of generation of the preovulatory surge of  
431 gonadotropins. In that study, which did not address puberty, an expansion of the RP3V population of



432 Kiss1 neurons was documented in adult male rats after perinatal dosage of BPA (Bai et al. 2011). In  
433 addition, oral administration of BPA either perinatally (to mouse dams between G15 and PND21) or to  
434 adult female mice, at doses in the range of those of this study, caused an increase in the number of  
435 kisspeptin neurons in the rostral hypothalamic area at adulthood (Naule et al. 2014; Wang et al. 2014).  
436 Our study nicely complement those previous observations, by showing for the first time an expansion  
437 of the RP3V Kiss1 neuronal population during the pubertal transition following developmental  
438 exposures to low doses of BPA. The mechanism behind this consistent stimulatory effect may be  
439 related with the proven ability of BPA to directly activate *Kiss1* expression in vitro (Mueller and Heger  
440 2014), although it is equally tenable that BPA may mimic the ability of endogenous estrogens to induce  
441 plastic changes in the RP3V Kiss1 neuron population, causing its enlargement, as occurs during  
442 normal puberty (Clarkson et al. 2009a).

443 Surprisingly, in contrast to the attention devoted to the impact of BPA on the rostral population of  
444 Kiss1 neurons, little experimental evidence has been produced regarding the potential impact of this  
445 EDC on the ARC Kiss1 neuronal population, and no information is available on its potential disruption  
446 at puberty. Thus, one study reported that neonatal exposure to very high doses of BPA (50 mg/kg BW;  
447 i.e., 10.000-fold higher than the lowest dose used in our study) caused a reduction in kisspeptin-IR  
448 fibers in adult female rats (Patisaul et al. 2009). Our study, using a combination of analytical techniques  
449 for measurement, with anatomical resolution, of kisspeptin content (fibers) and *Kiss1* expressing  
450 neurons conclusively documents that, contrary to the observed changes at the RP3V, there is a  
451 consistent suppression of the ARC Kiss1 neuronal population, which becomes detectable already for  
452 the lowest dose of BPA tested. In fact, quantitative analyses by ISH revealed that such a suppression  
453 of *Kiss1* is persistently detectable from the infantile period to the pubertal stage. It is well set that ARC  
454 Kiss1 neurons are sensitive to the inhibitory of sex steroids, including estrogens, on *Kiss1* expression,  
455 as plausible mechanism for the negative feedback control of GnRH secretion. While the effects of  
456 perinatal BPA are compatible with this action, it must be stressed that such effect is intergenerational,  
457 as BPA was administered to the mothers (not to the pups) during a restricted time-window, therefore  
458 suggesting potential developmental or *organizing* actions of this EDC on the maturation of the  
459 population of ARC Kiss1 neurons. Alternatively, early exposures to BPA may impact Kiss1 neurons, at

460 least partially, via changes in GABA neurotransmission, as postnatal administration of very low doses  
461 of BPA was recently shown to enhance the GABAergic tone (Franssen et al. 2016), and GABA  
462 transmission to Kiss1 neurons has been reported in mice (DeFazio et al. 2014). This possibility,  
463 however, seems less feasible, as GABA effects on Kiss1 neurons seem to be transient and/or of  
464 excitatory nature (DeFazio et al. 2014).

465 In good agreement with the observed changes in *Kiss1* levels, perinatal exposure to low doses of  
466 BPA caused a persistent suppression of *Tac2* expression in the ARC. Despite the relevance of NKB  
467 (encoded by *Tac2* in rodents) in the control of kisspeptin output and, thereby, GnRH pulsatility, and the  
468 reported role of NKB signaling in the control of puberty, the putative effect of BPA on this tachykinin  
469 remained totally unexplored. Our data unambiguously demonstrate that, at all doses tested, BPA was  
470 able to blunt the increased levels of *Tac2* detected in the ARC during the pubertal transition; an  
471 inhibitory effect that was consistently observed even for the lowest dose of BPA, at the infantile  
472 (PND15), juvenile and pubertal stages of postnatal maturation. Considering that NKB has been  
473 proposed to operate as stimulator of the kisspeptin output, whose increase in expression actually  
474 precedes that of Kiss1 during pubertal maturation, our data open up the possibility that changes in  
475 *Tac2* levels in the ARC might mechanistically contribute, at least partially, to the dampen of  
476 Kiss1/kisspeptin expression caused by perinatal BPA exposures in (pre)pubertal female mice.

477 While much emphasis has been made recently on the trends for earliness in the timing of female  
478 (and possibly male) puberty, detailed analyses have suggested that the observed changes are likely  
479 towards precocity for initial pubertal stages, but towards lateness concerning the final stages of  
480 pubertal maturation in both sexes (Parent et al. 2016). Such a dichotomy, which has been considered  
481 to illustrate the complex nature of the environmental influences on the timing of puberty, is epitomized  
482 by our present findings, showing the divergent intergenerational impact of low doses of BPA, which  
483 advanced the age of the initial sign of puberty onset in rodents, namely vaginal opening, but  
484 consistently suppressed the ARC Kiss1/NKB system and LH secretion (as surrogate marker of GnRH  
485 neurosecretion) in pubertal female mice. These observations attest for the translational relevance of  
486 our current data, and call for the application of precautionary measures concerning the prevention of

487 gestational/perinatal exposures even to low doses of BPA, as they may disrupt key maturational events  
488 of the reproductive axis, such as puberty onset.

489

490 **Acknowledgments**

491 This work was supported by grants from the University of Torino (Ricerca Locale ex-60%) to G.C.P.,  
492 the Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR project "Dipartimenti di Eccellenza  
493 2018-2022") to Dept. of Neuroscience Rita Levi Montalcini, University of Torino, and the Cavalieri-  
494 Ottolenghi Foundation (Orbassano, Italy) to G.C.P.; grants BFU2014-57581-P and BFU2017-83934-P  
495 to M.T.-S. and SAF2014-56995-JIN to J.M.C. (Ministerio de Economía y Competitividad, Spain; co-  
496 funded with EU funds from FEDER Program); project PIE-00005 (Flexi-Met, Instituto de Salud Carlos  
497 III, Ministerio de Sanidad, Spain) to M.T.-S.; Project P12-FQM-01943 (Junta de Andalucía, Spain) to  
498 M.T.-S.; and EU research contracts DEER FP7-ENV-2007-1 and GAP-2014-655232 to M.T.-S. CIBER  
499 Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of Instituto de Salud Carlos III.

500

501

502 **References**

- 503
- 504 Adewale HB, Jefferson WN, Newbold RR, Patisaul HB. 2009. Neonatal bisphenol-a exposure alters rat  
505 reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-  
506 releasing hormone neurons. *Biol Reprod* 81(4): 690-699.
- 507 Aksglaede L, Juul A, Olsen LW, Sorensen TI. 2009a. Age at puberty and the emerging obesity epidemic.  
508 *PLoS One* 4(12): e8450.
- 509 Aksglaede L, Sorensen K, Petersen JH, Skakkebaek NE, Juul A. 2009b. Recent decline in age at breast  
510 development: the Copenhagen Puberty Study. *Pediatrics* 123(5): e932-939.
- 511 Authority EFS. 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A  
512 (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal* 13: 3978.
- 513 Bai Y, Chang F, Zhou R, Jin PP, Matsumoto H, Sokabe M, et al. 2011. Increase of anteroventral  
514 periventricular kisspeptin neurons and generation of E2-induced LH-surge system in male rats exposed  
515 perinatally to environmental dose of bisphenol-A. *Endocrinology* 152(4): 1562-1571.
- 516 Bulus AD, Asci A, Erkekoglu P, Balci A, Andiran N, Kocer-Gumusel B. 2016. The evaluation of possible role  
517 of endocrine disruptors in central and peripheral precocious puberty. *Toxicol Mech Methods* 26(7): 493-  
518 500.
- 519 Cao J, Mickens JA, McCaffrey KA, Leyrer SM, Patisaul HB. 2012. Neonatal Bisphenol A exposure alters  
520 sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus. *Neurotoxicology* 33(1): 23-36.
- 521 Castellano JM, Tena-Sempere M. 2016. Animal Modeling of Early Programming and Disruption of Pubertal  
522 Maturation. *Endocr Dev* 29: 87-121.
- 523 Clarkson J, Herbison AE. 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus;  
524 sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*  
525 147(12): 5817-5825.
- 526 Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. 2009a. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin  
527 positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 150(7): 3214-3220.
- 528 Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH, Caraty A, Herbison AE. 2009b. Distribution of  
529 kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* 21(8): 673-682.
- 530 Day FR, Elks CE, Murray A, Ong KK, Perry JR. 2015. Puberty timing associated with diabetes,  
531 cardiovascular disease and also diverse health outcomes in men and women: the UK Biobank study.  
532 *Sci Rep* 5: 11208.
- 533 De Leonibus C, Marcovecchio ML, Chiavaroli V, de Giorgis T, Chiarelli F, Mohn A. 2013. Timing of puberty  
534 and physical growth in obese children: a longitudinal study in boys and girls. *Pediatr Obes* doi:  
535 10.1111/j.2047-6310.2013.00176.x.
- 536 DeFazio RA, Elias CF, Moenter SM. 2014. GABAergic transmission to kisspeptin neurons is differentially  
537 regulated by time of day and estradiol in female mice. *J Neurosci* 34(49): 16296-16308.
- 538 Durmaz E, Asci A, Erkekoglu P, Akcurin S, Gumusel BK, Bircan I. 2014. Urinary bisphenol a levels in girls  
539 with idiopathic central precocious puberty. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology* 6(1):  
540 16-21.
- 541 Durmaz E, Asci A, Erkekoglu P, Balci A, Bircan I, Kocer-Gumusel B. 2018. Urinary bisphenol A levels in  
542 Turkish girls with premature thelarche. *Hum Exp Toxicol* 37(10): 1007-1016.
- 543 Fernandez M, Bianchi M, Lux-Lantos V, Libertun C. 2009. Neonatal exposure to bisphenol a alters  
544 reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environ Health*  
545 *Perspect* 117(5): 757-762.
- 546 Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of  
547 the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 401(3):  
548 225-230.
- 549 Franssen D, Gerard A, Hennuy B, Donneau AF, Bourguignon JP, Parent AS. 2016. Delayed  
550 Neuroendocrine Sexual Maturation in Female Rats After a Very Low Dose of Bisphenol A Through  
551 Altered GABAergic Neurotransmission and Opposing Effects of a High Dose. *Endocrinology* 157(5):  
552 1740-1750.
- 553 Gill JC, Navarro VM, Kwong C, Noel SD, Martin C, Xu S, et al. 2012. Increased neurokinin B (Tac2)  
554 expression in the mouse arcuate nucleus is an early marker of pubertal onset with differential sensitivity  
555 to sex steroid-negative feedback than Kiss1. *Endocrinology* 153(10): 4883-4893.

- 556 Gore AC. 2012. Reproductive neuroendocrine targets of developmental exposure to endocrine disruptors.  
 557 In: *Endocrine Disruptors and Puberty*, edited by Humana Press, c/o Springer Science+Business Media,  
 558 New York, USA.: 49-117.
- 559 Herbison AE. 2016. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat*  
 560 *Rev Endocrinol* 12(8): 452-466.
- 561 Herman-Giddens ME, Steffes J, Harris D, Slora E, Hussey M, Dowshen SA, et al. 2012. Secondary sexual  
 562 characteristics in boys: data from the Pediatric Research in Office Settings Network. *Pediatrics* 130(5):  
 563 e1058-1068.
- 564 Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T. 2002. Low dose effect of in utero  
 565 exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive toxicology*  
 566 16(2): 117-122.
- 567 Kasper-Sonnenberg M, Wittsiepe J, Wald K, Koch HM, Wilhelm M. 2017. Pre-pubertal exposure with  
 568 phthalates and bisphenol A and pubertal development. *PLoS One* 12(11): e0187922.
- 569 Kot-Wasic A, DbJ, Namieśnik J. 2007. Analytical techniques in studies of the environmental fate of  
 570 pharmaceuticals and personal-care products. *Trends Analyt Chem* 26: 557-568.
- 571 Lakshman R, Forouhi NG, Sharp SJ, Luben R, Bingham SA, Khaw KT, et al. 2009. Early age at menarche  
 572 associated with cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 94(12): 4953-4960.
- 573 Lee SH, Kang SM, Choi MH, Lee J, Park MJ, Kim SH, et al. 2014. Changes in steroid metabolism among  
 574 girls with precocious puberty may not be associated with urinary levels of bisphenol A. *Reproductive*  
 575 *toxicology* 44: 1-6.
- 576 Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. 2010. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells  
 577 of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion.  
 578 *Endocrinology* 151(8): 3479-3489.
- 579 Losa SM, Todd KL, Sullivan AW, Cao J, Mickens JA, Patisaul HB. 2011. Neonatal exposure to genistein  
 580 adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian  
 581 development in the peripubertal female rat. *Reprod Toxicol* 31(3): 280-289.
- 582 Losa-Ward SM, Todd KL, McCaffrey KA, Tsutsui K, Patisaul HB. 2012. Disrupted organization of RFamide  
 583 pathways in the hypothalamus is associated with advanced puberty in female rats neonatally exposed  
 584 to bisphenol A. *Biol Reprod* 87(2): 28.
- 585 Manfredi-Lozano M, Roa J, Ruiz-Pino F, Piet R, Garcia-Galiano D, Pineda R, et al. 2016. Defining a novel  
 586 leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty. *Mol Metab* 5(10):  
 587 844-857.
- 588 Marraudino M, Martini M, Trova S, Farinetti A, Ponti G, Gotti S, et al. 2018. Kisspeptin system in  
 589 ovariectomized mice: Estradiol and progesterone regulation. *Brain Res* 1688: 8-14.
- 590 McGuinn LA, Ghazarian AA, Joseph Su L, Ellison GL. 2015. Urinary bisphenol A and age at menarche  
 591 among adolescent girls: evidence from NHANES 2003-2010. *Environmental research* 136: 381-386.
- 592 Mueller JK, Heger S. 2014. Endocrine disrupting chemicals affect the gonadotropin releasing hormone  
 593 neuronal network. *Reprod Toxicol* 44: 73-84.
- 594 Nah WH, Park MJ, Gye MC. 2011. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of  
 595 puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clin Exp Reprod Med* 38(2): 75-81.
- 596 Naule L, Picot M, Martini M, Parmentier C, Hardin-Pouzet H, Keller M, et al. 2014. Neuroendocrine and  
 597 behavioral effects of maternal exposure to oral bisphenol A in female mice. *J Endocrinol* 220(3): 375-  
 598 388.
- 599 Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. 2009a. Regulation of  
 600 gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the  
 601 arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29(38): 11859-11866.
- 602 Navarro VM, Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, Garcia-Galiano D, Pineda R, et al. 2009b.  
 603 Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at  
 604 critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 150(5): 2359-2367.
- 605 Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, Garcia-Galiano D, Hobbs SJ, Bosch MA, et al. 2011. Regulation of NKB  
 606 pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse.  
 607 *Endocrinology* 152(11): 4265-4275.
- 608 Navarro VM, Ruiz-Pino F, Sanchez-Garrido MA, Garcia-Galiano D, Hobbs SJ, Manfredi-Lozano M, et al.  
 609 2012. Role of Neurokinin B in the Control of Female Puberty and Its Modulation by Metabolic Status. *J*  
 610 *Neurosci* 32: 2388-2397.

- 611 Navarro VM, Tena-Sempere M. 2012. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation  
612 of fertility. *Nat Rev Endocrinol* 8(1): 40-53.
- 613 Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N, et al. 2004. Effects of maternal  
614 xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1  
615 mouse offspring. *Reprod Toxicol* 18(6): 803-811.
- 616 Oliveira IM, Romano RM, de Campos P, Cavallin MD, Oliveira CA, Romano MA. 2017. Delayed onset of  
617 puberty in male offspring from bisphenol A-treated dams is followed by the modulation of gene  
618 expression in the hypothalamic-pituitary-testis axis in adulthood. *Reprod Fert Dev* 29(12): 2496-2505.
- 619 Ozen S, Darcan S. 2011. Effects of environmental endocrine disruptors on pubertal development. *Journal*  
620 *of clinical research in pediatric endocrinology* 3(1): 1-6.
- 621 Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS. 2002. Exposure to a low dose of bisphenol A  
622 during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3:  
623 415-422.
- 624 Panzica GC, Bo E, Martini MA, Miceli D, Mura E, Viglietti-Panzica C, et al. 2011. Neuropeptides and  
625 enzymes are targets for the action of endocrine disrupting chemicals in the vertebrate brain. *J Toxicol*  
626 *Environ Health B Crit Rev* 14(5-7): 449-472.
- 627 Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, Gerard A, Bourguignon JP. 2015. Developmental variations in  
628 environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control:  
629 Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Frontiers in*  
630 *neuroendocrinology*.
- 631 Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, Pinson A, Bourguignon JP. 2016. Current Changes in Pubertal Timing:  
632 Revised Vision in Relation with Environmental Factors Including Endocrine Disruptors. *Endocr Dev* 29:  
633 174-184.
- 634 Patisaul HB, Todd KL, Mickens JA, Adewale HB. 2009. Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist  
635 PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats.  
636 *Neurotoxicology* 30(3): 350-357.
- 637 Patisaul HB. 2013. Effects of environmental endocrine disruptors and phytoestrogens on the kisspeptin  
638 system. *Adv Exp Med Biol* 784: 455-479.
- 639 Paxinos G, Franklin KBJ. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- 640 Petrović M GS, Barceló D. 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and  
641 drinking water. *Trends Analyt Chem* 22: 685-696.
- 642 Picot M, Naule L, Marie-Luce C, Martini M, Raskin K, Grange-Messent V, et al. 2014. Vulnerability of the  
643 neural circuitry underlying sexual behavior to chronic adult exposure to oral bisphenol a in male mice.  
644 *Endocrinology* 155(2): 502-512.
- 645 Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. 2012. Kisspeptins and reproduction:  
646 physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 92(3): 1235-1316.
- 647 Ramaswamy S, Seminara SB, Ali B, Ciofi P, Amin NA, Plant TM. 2010. Neurokinin B stimulates GnRH  
648 release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus.  
649 *Endocrinology* 151(9): 4494-4503.
- 650 Rodriguez I, Araki K, Khatib K, Martinou JC, Vassalli P. 1997. Mouse vaginal opening is an apoptosis-  
651 dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. *Dev Biol* 184(1): 115-121.
- 652 Roepke TA, Yang JA, Yasrebi A, Mamounis KJ, Oruc E, Zama AM, et al. 2016. Regulation of arcuate genes  
653 by developmental exposures to endocrine-disrupting compounds in female rats. *Reprod Toxicol* 62:  
654 18-26.
- 655 Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol  
656 A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environmental health*  
657 *perspectives* 109(7): 675-680.
- 658 Rubin BS. 2011. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J*  
659 *Steroid Biochem Mol Biol* 127(1-2): 27-34.
- 660 Ruiz-Pino F, Navarro VM, Bentsen AH, Garcia-Galiano D, Sanchez-Garrido MA, Ciofi P, et al. 2012.  
661 Neurokinin B and the control of the gonadotropic axis in the rat: developmental changes, sexual  
662 dimorphism, and regulation by gonadal steroids. *Endocrinology* 153(10): 4818-4829.
- 663 Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Manfredi-Lozano M, Leon S, Garcia-Galiano D, Castano JP, et al. 2014.  
664 Obesity-induced hypogonadism in the male: premature reproductive neuroendocrine senescence and  
665 contribution of Kiss1-mediated mechanisms. *Endocrinology* 155(3): 1067-1079.

- 666 Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Manfredi-Lozano M, Leon S, Heras V, Castellano JM, et al. 2015.  
667 Metabolic and Gonadotropic Impact of Sequential Obesogenic Insults in the Female: Influence of the  
668 Loss of Ovarian Secretion. *Endocrinology* 156(8): 2984-2998.
- 669 Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. 2005a. Regulation of Kiss1 gene  
670 expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146(9): 3686-3692.
- 671 Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, et al. 2005b. Differential regulation of  
672 KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146(7): 2976-  
673 2984.
- 674 Tena-Sempere M. 2010. Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of  
675 reproductive development and function. *Int J Androl* 33(2): 360-368.
- 676 Tena-Sempere M. 2013. Keeping puberty on time: novel signals and mechanisms involved. *Curr Top Dev*  
677 *Biol* 105: 299-329.
- 678 Terasawa E, Guerriero KA, Plant TM. 2013. Kisspeptin and puberty in mammals. *Adv Exp Med Biol* 784:  
679 253-273.
- 680 Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA).  
681 *Reproductive toxicology* 24(2): 139-177.
- 682 Villar-Pazos S, Martinez-Pinna J, Castellano-Munoz M, Alonso-Magdalena P, Marroqui L, Quesada I, et al.  
683 2017. Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on ca2+ entry in  
684 mouse pancreatic beta-cells. *Sci Rep* 7(1): 11770.
- 685 Vinas P, Lopez-Garcia I, Campillo N, Rivas RE, Hernandez-Cordoba M. 2012. Ultrasound-assisted  
686 emulsification microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry using the Taguchi  
687 design method for bisphenol migration studies from thermal printer paper, toys and baby utensils. *Anal*  
688 *Bioanal Chem* 404(3): 671-678.
- 689 Wakabayashi Y, Yamamura T, Sakamoto K, Mori Y, Okamura H. 2013. Electrophysiological and  
690 morphological evidence for synchronized GnRH pulse generator activity among Kisspeptin/neurokinin  
691 B/dynorphin A (KNDy) neurons in goats. *J Reprod Dev* 59(1): 40-48.
- 692 Wang X, Chang F, Bai Y, Chen F, Zhang J, Chen L. 2014. Bisphenol A enhances kisspeptin neurons in  
693 anteroventral periventricular nucleus of female mice. *J Endocrinol* 221(2): 201-213.
- 694 Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine  
695 mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147(6  
696 Suppl): S56-69.
- 697 Xi W, Lee CK, Yeung WS, Giesy JP, Wong MH, Zhang X, et al. 2011. Effect of perinatal and postnatal  
698 bisphenol A exposure to the regulatory circuits at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis of CD-1  
699 mice. *Reprod Toxicol* 31(4): 409-417.
- 700  
701

702 **Legend to Figures**

703 **Figure 1.** *Impact of perinatal exposure to a range of doses of BPA on the age of VO and the pattern*  
704 *of gonadotropin secretion.* Female mice exposed to increasing doses of BPA: 5, 10 or 40 µg/kg BW/day  
705 (BPA 5, 10 or 40 groups) from G11 to PND8 were monitored between days 19 and 30 for canalization  
706 of the vagina; the day of complete canalization being considered as VO. OIL-exposed group was used  
707 as a control. Average age at VO and percentage curves of VO are shown for each experimental group  
708 **(a)**. In addition, gonadotropin levels were assayed for each experimental group at different time points  
709 of postnatal development: PND12, 15, 18, 21 and 30 **(b)**. LH and FSH values are represented as the  
710 mean ± S.E.M. of six independent determinations. For vaginal opening data, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001  
711 vs. corresponding OIL-exposed (control) group (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls  
712 multiple range test). For hormonal data, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs. corresponding OIL-  
713 exposed group for each age (one-way ANOVA followed by Fisher Least Signification Difference –LSD-  
714 test).

715 **Figure 2.** *Impact of perinatal exposure to a range of doses of BPA on postnatal development of RP3V*  
716 *Kisspeptin neurons.* Immunohistochemical analyses of Kp-IR structures **(a)**, and the number of Kp-  
717 positive neurons **(b)** were assayed in the RP3V of female mice perinatally exposed to BPA 5, 10 or 40  
718 µg/kg BW/day (BPA 5, 10 or 40 groups). OIL-exposed group was used as a control. Quantitative data  
719 were collected for each experimental group at different time points of postnatal development: PND12,  
720 15, 18, 21 and 30, representative of the infantile, juvenile and pubertal stages of postnatal maturation.  
721 In addition, representative photomicrographs of RP3V Kp-positive neurons for OIL and BPA5 groups  
722 at PND12, 15, 18, 21, and 30 are shown **(c)**. The density of Kp-IR fibers, expressed as fractional area  
723 (FA), and the number of Kp-positive neurons are represented as the mean ± S.E.M. of six serial  
724 sections of RP3V per animal. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs. corresponding OIL-exposed group for each age  
725 (one-way ANOVA followed by Fisher Least Signification Difference –LSD- test). RP3V = rostral  
726 periventricular area of the third ventricle; 3V = third ventricle.

727 **Figure 3.** *Impact of perinatal exposure to a range of doses of BPA on postnatal development of ARC*  
728 *Kisspeptin immunoreactivity.* Immunohistochemical analyses of Kp-IR positive structures (fibers and



729 cell bodies) **(a)**, expressed as fractional area (FA), were assayed in the ARC of female mice perinatally  
 730 exposed to BPA 5, 10 or 40 µg/kg BW/day (BPA 5, 10 or 40 groups). OIL-exposed group was used as  
 731 a control. Quantitative data were collected for each experimental group at different time points of  
 732 postnatal development: PND12, 15, 18, 21 and 30, representative of the infantile, juvenile and pubertal  
 733 stages of postnatal maturation. In addition, representative photomicrographs of Kp-IR structures in  
 734 ARC from OIL and BPA5 groups at PND12, PND15, PND21 and PND30 are shown **(b)**. The density  
 735 of Kp-IR structures is represented as the mean ± S.E.M. of four serial sections of ARC per animal. \**P*<  
 736 0.05, \*\**P*< 0.01, \*\*\**P*< 0.001 vs. corresponding OIL-exposed group for each age (one-way ANOVA  
 737 followed by Fisher Least Signification Difference –LSD- test). ARC = arcuate nucleus.

738 **Figure 4.** *Impact of perinatal exposure to BPA 5 on postnatal expression of Kiss1 in the RP3V.* *Kiss1*  
 739 mRNA levels in the RP3V were assessed by ISH in female mice perinatally exposed to a low dose of  
 740 BPA: 5 µg/kg BW/day (BPA 5 group). OIL-exposed group was used as a control. Quantitative *Kiss1*  
 741 mRNA expression data is presented at infantile (PND12, 15, 18), juvenile (PND21) and pubertal ages  
 742 (PND30) for each experimental group (OIL and BPA5) **(a)**. The neuroanatomical area selected for  
 743 quantitative analyses is displayed in the representative cartoon **(b)**. In addition, representative  
 744 photomicrographs of RP3V *Kiss1* mRNA expression for each experimental group at PND12, 15, 18,  
 745 21, and 30 are shown **(c)**. \**P*< 0.05, \*\**P*< 0.01 vs. corresponding OIL-exposed group for each age  
 746 (Student's nonparametric *t* test). Aca = anterior commissure, anterior part; AVPe = anteroventral  
 747 periventricular nucleus; Pe = periventricular hypothalamic nucleus; RP3V = rostral periventricular area  
 748 of the third ventricle; 3V = third ventricle.

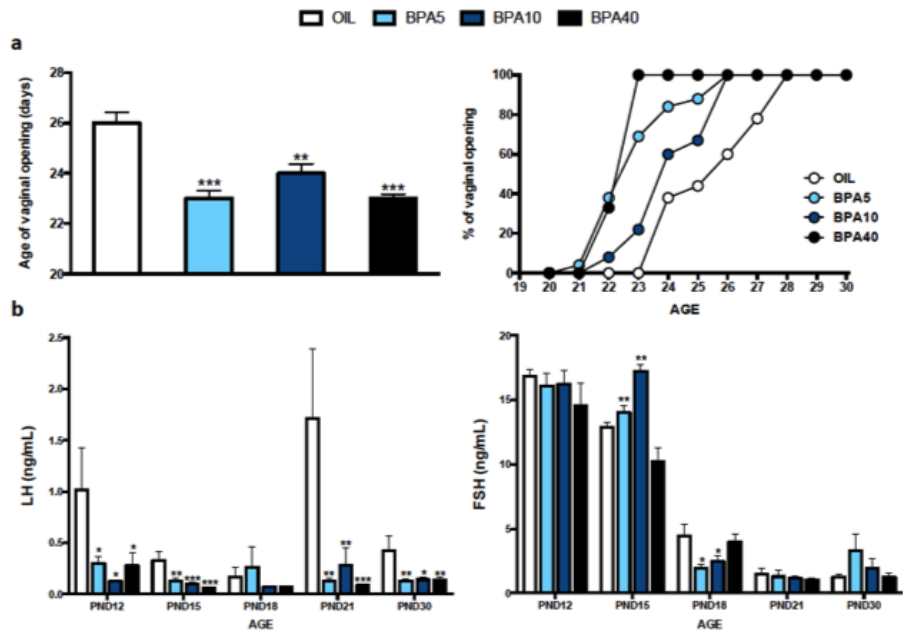
749 **Figure 5.** *Impact of perinatal exposure to BPA 5 on postnatal expression of Kiss1 in the ARC.* *Kiss1*  
 750 mRNA levels in the ARC were assessed by ISH in female mice perinatally exposed to a low dose of  
 751 BPA: 5 µg/kg BW/day (BPA 5 group). OIL-exposed group was used as a control. Quantitative *Kiss1*  
 752 mRNA expression data is presented at infantile (PND12, 15, 18), juvenile (PND21) and pubertal ages  
 753 (PND30) for each experimental group (OIL and BPA5) **(a)**. The neuroanatomical area selected for  
 754 quantitative analyses is displayed in the representative cartoon **(b)**. In addition, representative  
 755 photomicrographs of ARC *Kiss1* mRNA expression for each experimental group at PND12, 15, 18, 21,  
 756 and 30 are shown **(c)**. \**P*< 0.05, \*\**P*< 0.01 vs. corresponding OIL-exposed group for each age

757 (Student's nonparametric *t* test). ARC = arcuate nucleus; DM = dorsomedial nucleus; VMH =  
758 ventromedial nucleus; 3V = third ventricle.

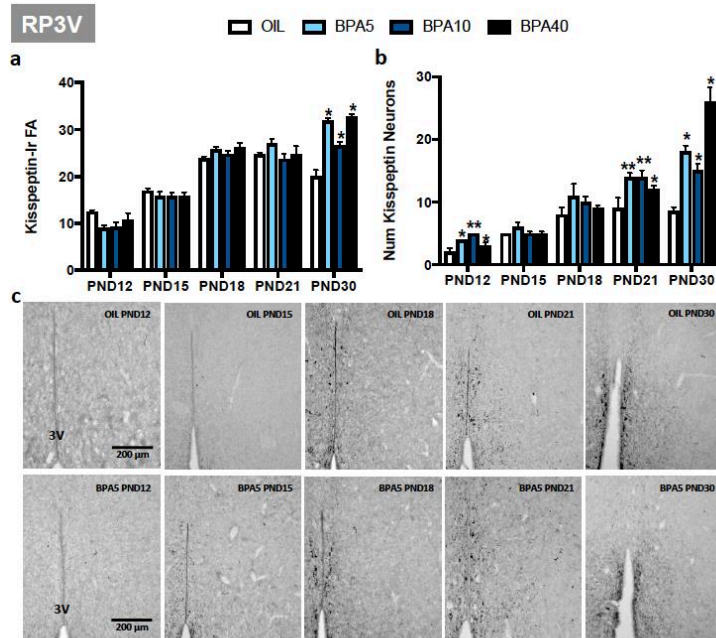
759 **Figure 6.** *Impact of perinatal exposure to a range of doses of BPA on developmental expression of*  
760 *Tac2 in the ARC.* *Tac2* mRNA levels in the ARC were assessed by ISH in female mice perinatally  
761 exposed to BPA 5, 10 or 40 µg/kg BW/day (BPA 5, 10 or 40 groups). OIL-exposed group was used as  
762 a control. Quantitative *Tac2* mRNA expression data is presented at PND15 and 30) for each  
763 experimental group (a). The neuroanatomical area selected for quantitative analyses is displayed in  
764 the representative cartoon (b). In addition, representative photomicrographs of ARC *Tac2* mRNA  
765 expression at PND15 and 30 for each experimental group are shown (c). \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs.  
766 corresponding OIL-exposed group for each age (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls  
767 multiple range test). ARC = arcuate nucleus; DM = dorsomedial nucleus; VMH = ventromedial nucleus;  
768 3V = third ventricle.

769 **Figure 7.** *Impact of perinatal exposure to BPA 5 on postnatal expression of Tac2 in the ARC.* *Tac2*  
770 mRNA levels in the ARC were assessed by ISH in female mice perinatally exposed to a low dose of  
771 BPA: 5 µg/kg BW/day (BPA 5 group). OIL-exposed group was used as a control. Quantitative *Tac2*  
772 mRNA expression data is presented at infantile (PND12, 15, 18), juvenile (PND21) and pubertal ages  
773 (PND30) for each experimental group (OIL and BPA5) (a). The neuroanatomical area selected for  
774 quantitative analyses is displayed in the representative cartoon (b). In addition, representative  
775 photomicrographs of ARC *Tac2* mRNA expression for each experimental group at PND12, 15, 18, 21,  
776 and 30 are shown (c). \*\**P* < 0.01 vs. corresponding OIL-exposed group for each age (Student's  
777 nonparametric *t* test). ARC = arcuate nucleus; DM = dorsomedial nucleus; VMH = ventromedial  
778 nucleus; 3V = third ventricle.

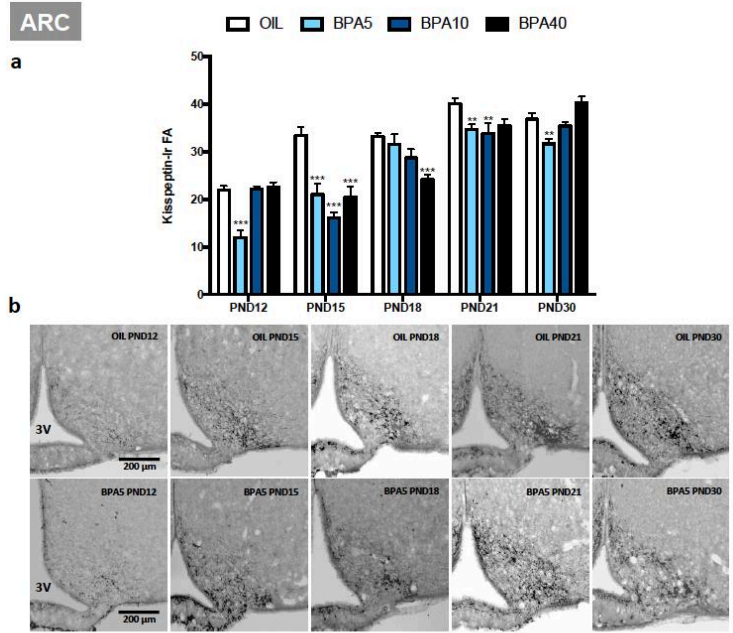
779



Ruiz-Pino et al.  
Figure 1

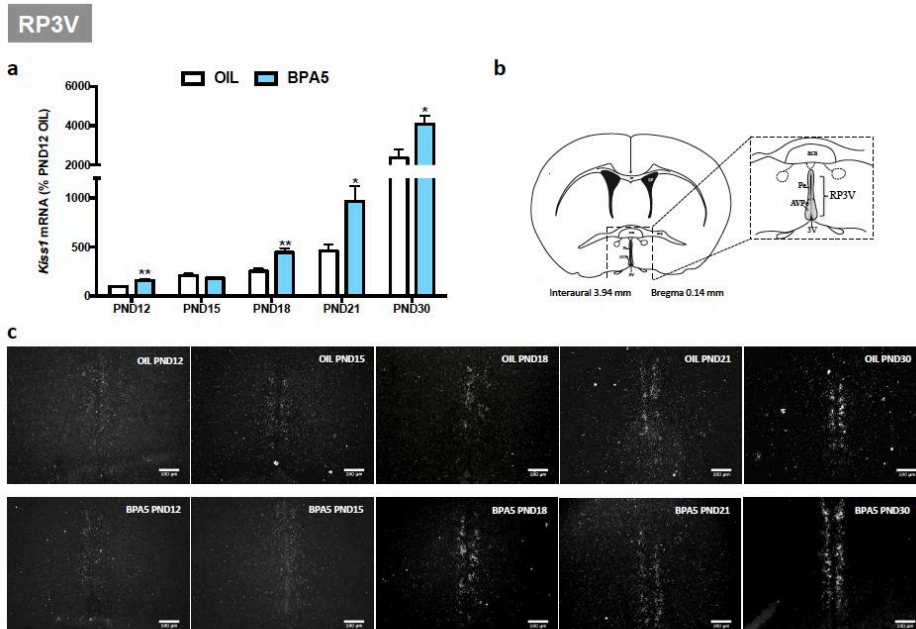


Ruiz-Pino et al.  
Figure 2



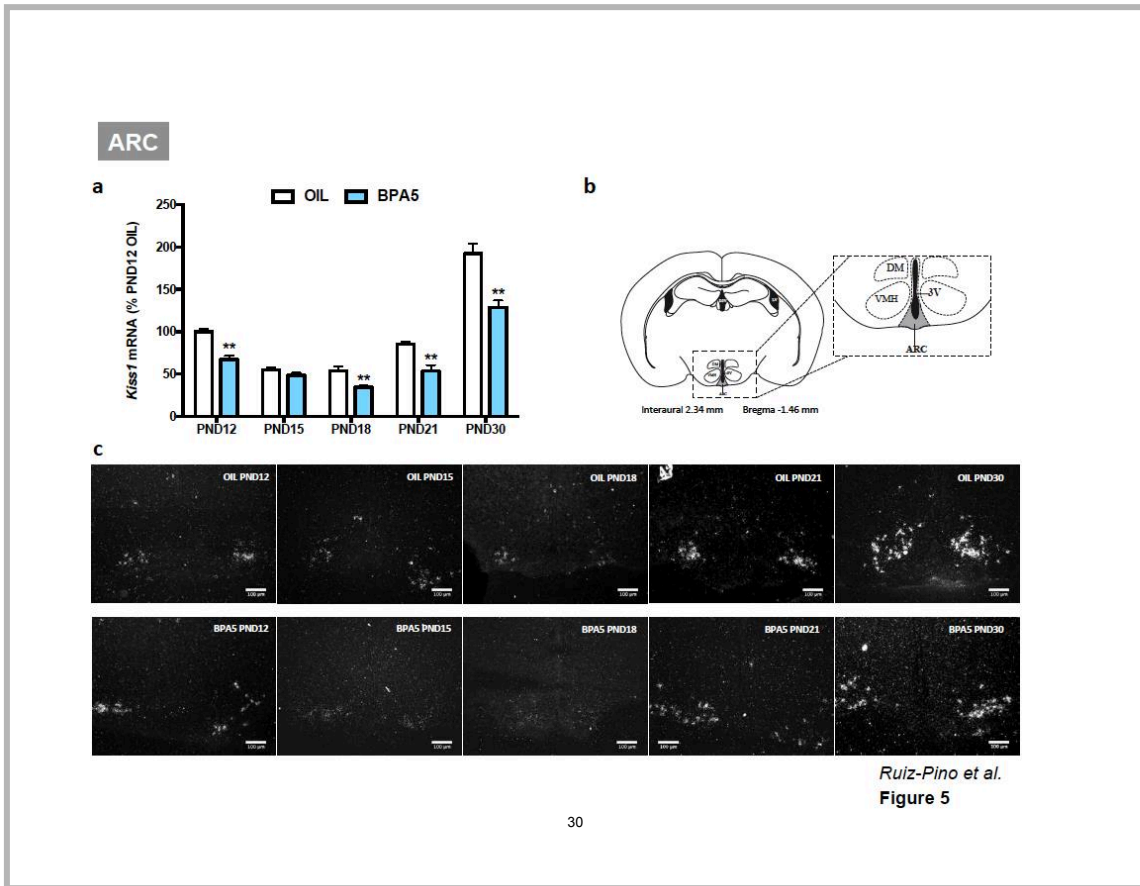
Ruiz-Pino et al.  
Figure 3

28

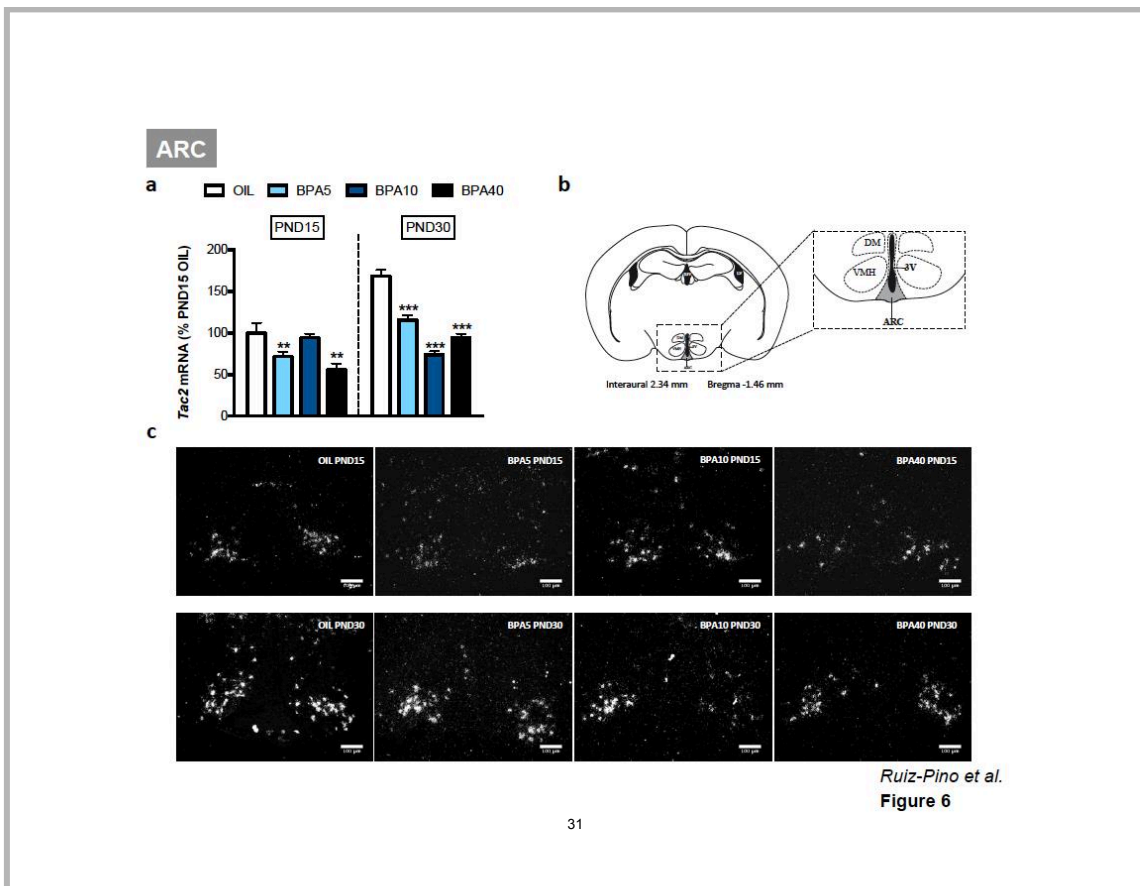


Ruiz-Pino et al.  
Figure 4

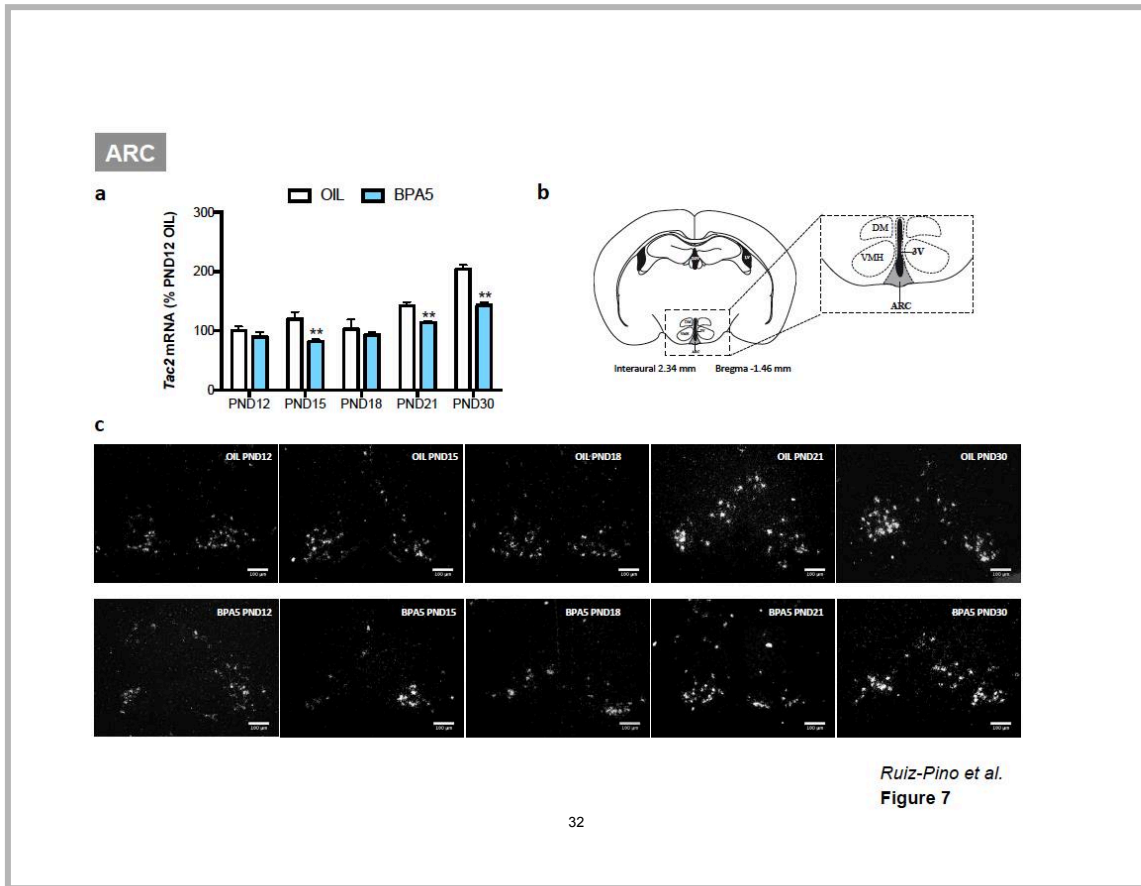
29



30



31





# DISCUSIÓN GENERAL





## 4. DISCUSIÓN GENERAL

La reproducción es una función indispensable para la perpetuación de las especies que se encuentra regulada por una red sofisticada de señales reguladoras. Estas señales se integran en el eje HHG, modulando su desarrollo y actividad. Numerosos estudios desarrollados en las últimas cuatro décadas han permitido identificar algunos de los reguladores neuroendocrinos implicados en el control del eje HHG, destacando especialmente el papel de las kisspeptinas (Kps). De hecho, las Kps se consideran actualmente los estimuladores más potentes del sistema GnRH/gonadotropinas. Además, se ha demostrado que tienen un papel clave en la mediación de fenómenos relevantes en el desarrollo y función del eje HHG, tales como la diferenciación sexual del cerebro, la pubertad, el control feedback positivo y negativo de la secreción de gonadotropinas, la regulación metabólica de la fertilidad y el control de la capacidad reproductora por señales ambientales (p. ej. fotoperiodo) <sup>6</sup>.

Estudios recientes llevados a cabo en diferentes especies demuestran que una población importante de neuronas kisspeptidérgicas localizadas en el núcleo ARC del hipotálamo co-expresan otros dos neuropéptidos, NKB y Dyn. Este hallazgo, junto con los obtenidos en otros estudios que documentan la presencia de mutaciones inactivantes de los genes *TAC3* y *TACR3* (codificantes de NKB y NK3R, respectivamente) en pacientes con hipogonadismo hipogonadotropo y la capacidad de NKB para estimular la secreción de GnRH/LH en diferentes especies, sugieren un papel relevante del sistema NKB/NK3R en el control del eje HHG. Sin embargo, a diferencia de las Kps, aún no se ha llevado a cabo una caracterización exhaustiva de su posible papel en aspectos clave de la función reproductora.

En base a estas consideraciones, el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha centrado en analizar el posible papel del sistema NKB/NK3R en la puesta en marcha de la función reproductora y su posterior mantenimiento durante la edad adulta, haciendo especial hincapié en (i) su modulación por el estado metabólico, (ii) su papel en el control de la secreción de gonadotropinas, así como su interacción con otros neuropéptidos en dicho contexto, y (iii) su sensibilidad al ambiente esteroideo, incluyendo a compuestos estrogénicos con actividad disruptora endocrina, como el Bisfenol A.

Con objeto de facilitar la discusión de los resultados obtenidos, esta sección ha sido desglosada en los apartados que se describen a continuación.

## **4.1 PAPEL DEL SISTEMA NKB/NK3R EN EL CONTROL PUBERAL**

### **4.1.1 Estudios de expresión**

Con el objetivo de analizar la posible contribución de la señalización de NKB en la llegada de la pubertad, inicialmente analizamos los perfiles de expresión hipotalámica de los ARNm de *Tac2* y *Tacr3* en muestras hipotalámicas de ratas hembra en diferentes etapas del desarrollo postnatal. Nuestros resultados muestran un incremento progresivo de la expresión de ambos ARNms desde el periodo neonatal/infantil hasta el periodo peripuberal. Este perfil de expresión parece preceder al aumento en la expresión hipotalámica del ARNm de *Kiss1* previamente documentado en ratas hembra entre los días 20 y 30 de vida postnatal<sup>65</sup> y al incremento en la inmunoreactividad a Kp (Kp-ir) detectado en el núcleo hipotalámico R3PV en ratones hembra entre los días 25 y 30 de vida postnatal<sup>482</sup>. En su conjunto, estas observaciones sugieren un posible papel estimulador de NKB sobre la expresión de *Kiss1/Kp* durante la maduración puberal; un fenómeno que, si bien requiere de validación experimental, se encuentra en la línea de observaciones clínicas recientes que sugieren que NKB podría jugar un papel estimulador importante sobre el eje HHG en etapas tempranas de la maduración sexual<sup>483</sup>.

Posteriormente estudiamos con un mayor grado de profundidad neuroanatómica los cambios de expresión de *Tac2* y *Tacr3* detectados en hipotálamo completo durante la transición puberal. Para ello analizamos mediante hibridación in situ (ISH) la expresión de ambos genes en el cerebro de ratas hembra prepuberales (día 20) y peripuberales (día 36). Nuestros resultados demuestran diferencias regionales moderadas en los patrones de expresión de ambos genes a las dos edades propuestas y también en relación a la distribución previamente documentada en adultos<sup>75</sup>. Resulta destacable la abundante expresión de *Tac2* y *Tacr3* detectada en los núcleos ARC y LHA (así como en el núcleo PVN, específicamente para *Tacr3*) tanto en hembras prepuberales como puberales. Del mismo modo, también destaca el

incremento significativo en la expresión de *Tacr3* observado exclusivamente en el núcleo ARC de hembras puberales; un fenómeno que podría sugerir su participación en la regulación de las neuronas Kiss1 localizadas en dicho núcleo, las cuales son especialmente relevantes en la activación puberal<sup>6,484</sup>. El hecho de que se detecte una abundante expresión de *Tac2* en el núcleo ARC de hembras de 20 y 36 días, podría sugerir que el incremento de su expresión en hipotálamo completo entre los periodos infantil y juvenil, tuviera lugar realmente en las neuronas del núcleo ARC. Sin embargo, nuestros análisis de ISH no detectaron dicho incremento. Este fenómeno podría deberse a que los niveles de expresión de *Tac2* en el ARC ya habrían alcanzado valores máximos a los 20 días de vida postnatal, enmascarando de este modo un posible incremento adicional en esta área. Por otra parte, tampoco se puede descartar la contribución de posibles aumentos en la expresión de *Tac2* en otras regiones hipotalámicas.

#### 4.1.2 Estudios funcionales

Una vez demostradas las alteraciones en la expresión hipotalámica de *Tac2* y *Tacr3* durante la transición puberal, llevamos a cabo una serie de estudios farmacológicos con el fin de evaluar el papel funcional de este sistema en el control de la pubertad. Para ello, analizamos en primer lugar el impacto de la administración intracerebroventricular (icv) de un agonista de NKB, senktide, sobre la secreción de LH en ratas hembras prepuberales (25 días). Nuestros resultados demuestran un incremento significativo de la secreción de LH en los animales inyectados i.c.v con senktide; un fenómeno que se encuentra en concordancia con otros estudios que documentan el mismo efecto en monos juveniles<sup>76</sup> y en ratas hembra adultas<sup>75</sup>. Además, el hecho de que la magnitud de los picos de secreción de LH obtenidos en estos animales fuese superior a la encontrada en ratas hembra peripuberales (36 días) tras la administración icv de senktide (también evaluada en esta Tesis Doctoral), no solo sugiere una mayor sensibilidad a los efectos estimuladores de NKB durante el periodo prepuberal sino también su posible relevancia como estimulador del eje HHG en esta etapa del desarrollo.

Posteriormente, con el fin de aportar una prueba adicional acerca del papel relevante de NKB en el control puberal, decidimos evaluar el impacto del bloqueo persistente de la señalización central de NKB sobre la llegada de la pubertad. Para ello, administramos centralmente un antagonista de NK3R, SB222200, a ratas hembra inmaduras durante la transición puberal. Nuestros resultados ponen de manifiesto un modesto, pero detectable, retraso en la edad de apertura vaginal, considerada un marcador externo de llegada de la pubertad, y una tendencia a la disminución en la secreción de LH en los animales tratados con el antagonista de NK3R. Sin embargo, a pesar de la eficiencia y especificidad demostrada por este antagonista en estudios previos <sup>76,434</sup>, su impacto sobre la llegada de la pubertad no fue tan efectivo como el documentado tras la infusión crónica de un antagonista de Kp, que resultó en una marcada supresión de la apertura vaginal y una reducción significativa del peso de los órganos sexuales a la edad esperada de la pubertad <sup>485</sup>. En su conjunto, estas observaciones sugieren un claro papel estimulador de NKB en la llegada de la pubertad; si bien, éste podría ser menos importante que el de Kp y, probablemente, encontrarse subordinado a la señalización de este neuropéptido. Por otra parte, tampoco se puede descartar la posibilidad de que protocolos más efectivos de antagonización de las acciones de NKB (p.ej. llevando a cabo una administración más temprana de su antagonista) pudieran causar una supresión más robusta en diferentes parámetros puberales.

## **4.2 MODULACIÓN DEL SISTEMA NKB/NK3R POR EL ESTADO METABÓLICO DEL ORGANISMO E IMPACTO SOBRE LA LLEGADA DE LA PUBERTAD**

Como es bien sabido, la pubertad es una etapa del desarrollo altamente sensible al estado energético del organismo y a factores metabólicos, los cuales inciden sobre rutas de señalización centrales para modular la secreción de GnRH <sup>486,487</sup>. Las neuronas Kiss1 han sido propuestas como elementos clave en la transmisión de la información metabólica del organismo a las neuronas GnRH durante la transición puberal, pero la posible contribución de NKB en este contexto aún sigue siendo desconocida. Para evaluar dicho papel inicialmente nos propusimos analizar la expresión hipotalámica de *Tac2* y *Tacr3* en ratas hembra puberales sometidas a un protocolo de ayuno de 48

horas. Nuestros resultados demuestran que, al igual que sucedía con *Kiss1* y *Gpr54*, el sistema NKB/NK3R se encuentra sujeto a regulación metabólica durante la pubertad, ya que tanto la expresión de *Tacr3* como de *Tac2* (si bien, esta última en menor grado) están significativamente disminuidas en el núcleo ARC de los animales sometidos a ayuno.

Estudios funcionales posteriores reforzaron esta hipótesis. Así, la administración central y aguda de senktide en ratas hembra puberales sometidas a ayuno de 48 horas, demuestra que las respuestas secretoras de LH en estos animales no solo se encuentran preservadas, sino incluso aumentadas, sugiriendo de este modo una posible sensibilización a los efectos estimuladores de NKB en condiciones de balance energético negativo. Estos hallazgos son similares a los obtenidos en estudios previos que demuestran el aumento de los efectos estimuladores de la administración central de Kps sobre la secreción de gonadotropinas en situaciones de balance energético negativo<sup>488,489</sup>. En la misma línea, nuestros experimentos de administración central repetida de senktide en ratas hembra inmaduras sometidas a un protocolo de restricción calórica del 30% muestran la capacidad de este sistema de rescatar, al menos parcialmente, algunos parámetros relevantes de progresión puberal, tales como la apertura vaginal y la secreción de LH; un fenómeno similar al descrito previamente tras el tratamiento crónico con Kp en el mismo contexto<sup>488</sup>. En su conjunto, nuestros resultados sugieren un papel relevante de los factores metabólicos en la modulación de la señalización de NKB en pubertad y su posible implicación en la transmisión de la información del estado energético a través de la ruta hipotalámica Kiss1/GnRH, la cual es crucial en el desencadenamiento de la pubertad. En base a estos datos y a las similitudes en las respuestas a Kiss1/Kp documentadas en otros estudios, es plausible que dicho efecto sea mediado, al menos parcialmente, a través de la modulación de la secreción de Kp en el núcleo ARC. Sin embargo, no podemos descartar que los efectos estimuladores de NKB sobre el eje HHG en pubertad puedan venir mediados, al menos en parte, por rutas adicionales independientes de Kp.

### **4.3 PAPEL DEL SISTEMA NKB/NK3R EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS**

Diferentes trabajos han documentado de forma consistente el papel estimulador de NKB (o su agonista, senktide) sobre la secreción de gonadotropinas en diferentes especies <sup>72,75,76,221,433,434,441,442,490</sup>. Sin embargo, también hay que destacar que algunos estudios han obtenido resultados discrepantes, en los que la estimulación del sistema NKB/NK3R no inducía ninguna respuesta o incluso provocaba una disminución en la secreción de LH bajo determinadas condiciones experimentales <sup>436,443</sup>. De hecho, en modelos roedores de gonadectomía sin reemplazamiento fisiológico de los niveles de esteroides sexuales, se han detectado respuestas inhibitorias a la estimulación con NKB <sup>73,75,443</sup>, sugiriendo de este modo que la presencia de esteroides sexuales y/o la existencia de niveles elevados de gonadotropinas podrían contribuir al repertorio de acciones reguladoras (estimuladoras, nulas o inhibitorias) de NKB sobre la liberación de gonadotropinas. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estas discrepancias, así como las acciones del sistema NKB/NK3R en el control de la secreción de FSH, aún siguen siendo desconocidas. En base a estas premisas decidimos caracterizar el papel del sistema NKB/NK3R en el control de la secreción de gonadotropinas en los siguientes contextos fisiológicos y/o experimentales que se describen a continuación.

#### **4.3.1 Estudios a lo largo del desarrollo postnatal**

En primer lugar, decidimos evaluar el papel del sistema NKB/NK3R en el control de la secreción de gonadotropinas en diferentes etapas del desarrollo de la rata. Para ello, administramos centralmente el agonista de NKB, senktide, en ratas macho y hembra durante las etapas infantil, juvenil, puberal y adulta. En términos de secreción de LH, nuestros análisis demuestran que la activación central del sistema NKB/NK3R induce respuestas estimuladoras en todas las edades testadas en ratas hembra, mientras que en ratas macho dicha respuesta únicamente tiene lugar en los periodos infantil y juvenil/puberal. Además, nuestros datos ponen de manifiesto que la respuesta de LH a la estimulación de NKB en ratas hembra es consistentemente superior a la observada en ratas macho, independientemente de la etapa de maduración postnatal, y que las ratas macho no responden a la activación de NKB a

partir de la pubertad, desvelando de este modo la existencia de un claro dimorfismo sexual en las acciones del sistema NKB/NK3R en la edad adulta.

En términos de secreción de FSH, nuestros datos documentan la capacidad de NKB de inducir claras respuestas estimuladoras en ratas infantiles/juveniles. Sin embargo, estas respuestas desaparecen en los periodos puberal y adulto; un fenómeno que contrasta con los resultados obtenidos tras la administración de Kp en dicho contexto (capaz de estimular FSH en todas las etapas del desarrollo)<sup>231</sup>, y con el dimorfismo sexual encontrado en la edad adulta en términos de respuesta secretora de LH a la estimulación de NKB. En su conjunto, estas observaciones son difíciles de encajar en el modelo clásico de las neuronas KNDy y dejan abierta la cuestión de por qué las respuestas gonadotrópicas a la estimulación central con NKB o Kp son diferentes en determinadas condiciones. Parece razonable pensar que estas diferencias pudieran deberse al modo de acción de NKB y Kp sobre el control de la secreción de GnRH/gonadotropinas. Como ya se ha descrito, las Kps pueden desencadenar la activación de las neuronas GnRH directamente<sup>230</sup> y, por lo tanto, podrían estimular de forma consistente la liberación de GnRH y, en última instancia, la secreción de LH y FSH. NKB, sin embargo, actuaría a un nivel superior, modificando la salida de Kp hacia las neuronas GnRH desde las neuronas KNDy. Por lo tanto, dependiendo de factores tales como la edad, el sexo o incluso el ambiente esteroideo, NKB podría impactar de forma variable sobre la liberación de Kp, explicando de este modo el repertorio de respuestas variadas que hemos descrito anteriormente. Por otra parte, el hecho de que NKB sea capaz de estimular preferentemente la secreción de LH frente a la de FSH (al menos en la rata) podría deberse a la inducción de unos patrones secretores de Kp/GnRH que condujeran a la activación preferencial de la secreción de LH por parte de la hipófisis. Del mismo modo, el dimorfismo sexual que encontramos en la respuesta secretora de LH y FSH a NKB en machos y hembras podría implicar una acción/expresión preferencial de NKB/NK3R de un sexo sobre otro en ciertas etapas del desarrollo.



### 4.3.2 Estudios sobre la interacción y/o participación de otros neuropéptidos

Los resultados que hemos descrito hasta ahora en el contexto del papel de NKB en el control de la secreción de gonadotropinas, ponen de manifiesto que la potencia secretora de gonadotropinas tras la estimulación central de NKB es significativamente menor que la obtenida con Kp<sup>75,76,232,442,491</sup> y que, a diferencia de lo que sucede con Kp, existe un claro dimorfismo sexual en respuesta a la estimulación central del sistema NKB/NK3R<sup>6,491</sup>. En su conjunto, todas estas observaciones hacen pensar que NKB no solo actuaría como una señal estimuladora de la liberación pulsátil de Kp, sino que también podría interaccionar con otras señales reguladoras producidas o recibidas por las neuronas KNDy, controlando de este modo el repertorio de respuestas secretoras de Kp y, en última instancia, dando lugar a las diferentes respuestas de GnRH/gonadotropinas que encontramos en las condiciones descritas anteriormente. En este sentido, conviene destacar que varios estudios han sugerido el posible papel cooperativo que presentan otros miembros de la familia de las taquiquininas (TKs), tales como la sustancia P (SP) y su receptor NK1R, y la neuroquinina A (NKA) y su receptor NK2R, en el control central de la secreción de GnRH/gonadotropinas<sup>492,493</sup>. Además, un reciente estudio electrofisiológico ha demostrado la capacidad de SP y NKA de activar a las neuronas Kiss1 del núcleo ARC en ratones y la existencia de una reactividad cruzada entre NK3R y los receptores de SP y NKA, los cuales parecen ser cruciales para las acciones de NKB<sup>494</sup>. Sin embargo, los papeles de estas TKs y sus respectivos receptores en el control de la secreción de gonadotropinas in vivo, en diferentes etapas del desarrollo, siguen siendo aún en gran medida desconocidos. En este contexto, nos propusimos analizar las respuestas gonadotrópicas a la activación central de los sistemas SP/NK1R y NKA/NK2R en ratas macho y hembra prepuberales y adultas. Nuestros datos muestran que durante el periodo prepuberal, al igual que sucede con senktide, la activación de los receptores de SP y NKA induce respuestas estimuladoras significativas de la secreción de gonadotropinas; si bien, en el caso de LH las respuestas son de mayor amplitud tras la activación de NKA/NK2R. De hecho, se detectan respuestas transitorias, pero detectables, de LH a NKA en machos y hembras adultas y también de FSH a NKA únicamente en el caso de las hembras. Aunque, en

general, tales efectos son modestos en magnitud, ilustran interesantes diferencias en los perfiles de respuesta de LH y FSH frente a los obtenidos tras la estimulación de NK3R en machos y hembras en diferentes etapas del desarrollo. En cualquier caso, hay que reconocer que aún desconocemos cómo otras TKs podrían integrarse en el modelo de las neuronas KNDy; una interesante cuestión que aún requiere de sólidas evidencias neuroanatómicas y funcionales adicionales para ser completamente clarificada.

Otro elemento que podría estar implicado en la generación de respuestas divergentes, en términos de secreción de gonadotropinas, a la estimulación con NKB y Kp es el relacionado con la posible acción moduladora de NKB sobre otros productos sintetizados en las neuronas KNDy, tales como Dyn. De hecho, estudios en modelos animales en los que los niveles de esteroides sexuales eran nulos o muy bajos revelaron que los efectos inhibidores de senktide sobre la secreción de LH en ratas hembra requerían de una señalización intacta de Dyn<sup>495</sup> y de su papel supresor sobre la capacidad respondedora de las neuronas KNDy a senktide<sup>496</sup>. Por lo tanto, es posible que la variable capacidad que posee senktide para estimular la secreción de LH y FSH en función del sexo y la etapa del desarrollo en ratas pudiera derivar de la capacidad diferencial de dicho agonista para modular la secreción o las acciones de Dyn, y/o las fluctuaciones endógenas del tono de Dyn, definidas por la propia expresión de Dyn o de su receptor canónico, KOR. Para validar esta hipótesis, decidimos evaluar inicialmente las respuestas de LH y FSH a la estimulación central con senktide tras el bloqueo de las acciones endógenas de Dyn con nor-BNI, un antagonista específico de KOR. Nuestros resultados demuestran que el bloqueo de la señalización de Dyn en ratas hembra adultas, las cuales responden en términos de secreción de LH a senktide, no logra alterar ni los niveles de LH basales ni la respuesta de LH a senktide. Por el contrario, el pretratamiento con el antagonista de Dyn en ratas macho, las cuales, como hemos comentado anteriormente, no responden a senktide, no solo aumenta los niveles basales de LH y FSH sino que incluso induce respuestas estimuladoras tras la administración de senktide. En la misma línea, también hay que indicar que en ratas hembra el pretratamiento con nor-BNI es capaz de inducir respuestas estimuladoras de la secreción de FSH tras la administración de senktide. En su conjunto, estos hallazgos sugerirían la existencia de un mayor tono inhibitor de Dyn en las ratas macho, de manera que su bloqueo farmacológico resultaría en la aparición

de claros efectos estimuladores tanto en términos de secreción basal de gonadotropinas como de respuesta estimuladora a senktide.

Con el objetivo de identificar la base potencial de los efectos causados por el tratamiento con nor-BNI sobre la secreción de gonadotropinas en respuesta a senktide, decidimos analizar la expresión de los genes que codifican Dyn (*Pdyn*) y KOR (*Opkr1*) en el hipotálamo mediobasal (MBH) y el área preóptica (POA) de ratas macho y hembra infantiles, prepuberales y puberales. Nuestros estudios documentan una mayor expresión de *Pdyn* y *Opkr1* en el MBH de machos que en el de hembras. Hay que destacar que este área abarca fundamentalmente al núcleo ARC, donde se localizan las neuronas KNDy y, por lo tanto, es probable que comprendan el sistema Dyn/KOR encargado de la regulación de estas neuronas y, en última instancia, del control de la pubertad y el eje reproductor<sup>490,497,498</sup>. De hecho, la posible relevancia de la señalización central Dyn/KOR en la llegada de la pubertad ha sido sugerida por estudios farmacológicos en ratas<sup>499</sup>. Por otra parte, también hay que indicar que los mayores niveles de expresión detectados en las ratas macho tienen lugar en la etapa prepuberal, pero no durante la transición puberal-adulta. Por lo tanto, aunque este fenómeno podría ser relevante desde el punto de vista mecanístico para el control de la llegada de la pubertad (retrasada en los machos en relación a las hembras), y podría explicar las diferencias sexuales en la respuesta gonadotrópica a la activación de NK3R (los machos pierden su capacidad para estimular la secreción de LH en respuesta a senktide durante la pubertad), es probable que otros mecanismos o lugares de síntesis de Dyn localizados fuera del MBH también contribuyan a las diferencias sexuales en las respuestas gonadotrópicas a la administración de senktide durante y después de la pubertad. En este contexto, es interesante destacar que la expresión de los genes *Pdyn* y *Okpr1* es consistentemente mayor en el POA de las ratas hembra durante la maduración postnatal. Aunque el POA, como ya hemos comentado con anterioridad, es el área donde se localizan la mayoría de las neuronas GnRH<sup>500</sup>, la relevancia funcional de las diferencias en la expresión de estos genes en función del sexo, aún sigue siendo desconocida y merece de una investigación más exhaustiva.

En general, nuestros datos abarcan una serie de estudios funcionales y de expresión que expanden la caracterización de elementos clave del paradigma de las neuronas KNDy, tales como NKB y Dyn, así como también de los papeles putativos de

otras TKs, tales como SP y NKA, en la regulación central de la secreción de GnRH/gonadotropinas en ratas. Además, nuestros resultados proporcionan evidencias convincentes del papel de Dyn en el control dinámico de la secreción basal de gonadotropinas y en respuesta a la estimulación con NKB en ratas macho y hembra. En conjunto, nuestras observaciones sugieren que más que señales activadoras o inhibitoras de las neuronas Kiss1, NKB y Dyn parecen operar como moduladores recíprocos, sometidos a una regulación precisa dependiente de la etapa del desarrollo y del sexo. De este modo, controlan de forma sofisticada y diferencial la generación de pulsos de Kp y, en última instancia, la secreción de GnRH/gonadotropinas. Estos hallazgos, junto con los datos obtenidos en los últimos años que documentan el papel de otras TKs en el control del eje HHG<sup>494</sup> y los resultados descritos en esta Tesis Doctoral, ayudarán a reconfigurar nuestro entendimiento del paradigma de las neuronas KNDy y a definir la contribución variable de sus productos neuropeptídicos en el control preciso de la secreción de gonadotropinas en ambos sexos y en diferentes periodos del desarrollo y etapas funcionales del eje reproductor.

#### **4.4 SENSIBILIDAD DEL SISTEMA NKB/NK3R AL AMBIENTE ESTEROIDEO Y A DISRUPTORES ENDOCRINOS (BPA)**

En base al marcado dimorfismo sexual que encontramos en las respuestas secretoras de LH a la estimulación central de NKB, decidimos analizar si tales diferencias pudieran deberse a variaciones en los niveles circulantes de los esteroides sexuales predominantes en cada sexo: testosterona, en el caso de los machos, y estradiol, en el caso de las hembras. Para ello, analizamos la respuesta secretora de LH a la administración central de senktide en ratas macho adultas orquidectomizadas y reemplazadas con estradiol y ratas hembra adultas ovariectomizadas y reemplazadas con testosterona; es decir, tras el cambio en el esteroide sexual predominante en cada sexo. Nuestros resultados sugieren que el cambio en el ambiente esteroideo en la etapa adulta no parece ser el responsable de las diferencias en las respuestas secretoras de LH a la estimulación de NKB que encontramos entre machos y hembras. Así, las hembras adultas ovariectomizadas y reemplazadas con niveles de testosterona comparables a los presentes en machos adultos (como lo reflejan sus niveles basales de LH) retienen el perfil femenino de secreción de LH en respuesta a senktide,

mientras que los machos adultos orquidectomizados y reemplazados con estradiol son incapaces de inducir una respuesta secretora de LH tras la administración de senktide, en la línea de lo que sucede en ratas macho adultas intactas. En su conjunto, estas observaciones sugieren que el establecimiento de respuestas secretoras de LH sexualmente dimórficas podría tener lugar en etapas más tempranas del desarrollo. De hecho, diversas evidencias apoyan la relevancia de los efectos organizativos tempranos en la configuración del dimorfismo sexual del sistema NKB/NK3R. Así, la administración neonatal de estrógenos, una manipulación que altera el proceso normal de diferenciación sexual del sistema nervioso central, es capaz de reducir el mayor número de neuronas NKB presentes en el núcleo ARC de ratas hembra y eliminar de este modo el dimorfismo sexual existente en esta población neuronal<sup>65,501</sup>. Del mismo modo, otros estudios también sugirieron la existencia de un dimorfismo sexual en los patrones de proyección axonal de las neuronas NKB en la rata, los cuales parecen ser dependientes de las diferencias en el ambiente esteroideo detectadas a partir de la pubertad en ratas macho y hembra<sup>429,430</sup>. Además, parece que este fenómeno no es exclusivo de la rata, ya que estudios desarrollados en ovejas también demostraron que la exposición neonatal a testosterona reducía el número de neuronas NKB en el núcleo ARC de la oveja hembra<sup>428,502</sup>.

Conviene destacar que, si bien los estudios descritos previamente sugieren la importancia del ambiente esteroideo temprano en el desarrollo adecuado del sistema hipotalámico NKB/NK3R, ninguno de ellos contempló la posible relevancia funcional de las alteraciones de este sistema en términos de respuesta secretora de LH. En base a esta consideración, nos propusimos analizar el impacto de la administración neonatal de benzoato de estradiol (estrogenización neonatal) sobre el contenido de neuronas NKB presentes en el núcleo ARC de ratas macho y hembra adultas y sus respectivas respuestas secretoras de LH a la estimulación central de NKB. En la línea de los resultados descritos anteriormente, nuestros estudios demuestran que las neuronas NKB del núcleo ARC son sensibles a los efectos organizativos de los esteroides sexuales durante ventanas críticas del desarrollo del sistema nervioso central, ya que la estrogenización neonatal induce una reducción significativa en el número de neuronas NKB del núcleo ARC, en términos de inmunoreactividad a NKB (NKB-ir), en ambos sexos. Estos hallazgos se encuentran en consonancia con la reducción significativa de la

expresión hipotalámica del ARNm de *Kiss1* observada tanto en ratas puberales como en ratas adultas estrogenizadas neonatalmente<sup>65,501</sup>. En su conjunto, estos resultados sugieren que las neuronas KNDy presentan un programa madurativo que es altamente sensible a los efectos organizativos de los esteroides sexuales durante ventanas críticas del desarrollo.

De hecho, esta observación se vio reforzada por estudios adicionales desarrollados en el contexto de la presente Tesis Doctoral, en los que evaluamos el impacto de la exposición perinatal a diferentes dosis de bisfenol A (BPA), un conocido disruptor endocrino con actividad estrogénica (xenoestógeno), sobre la expresión del ARNm de *Tac2* en el núcleo ARC de ratones hembra infantiles (15 días) y puberales (30 días). En la línea de los datos obtenidos en el modelo de estrogenización neonatal, nuestros resultados demuestran que todas las dosis de BPA testadas evitan el incremento en los niveles de ARNm de *Tac2* observado en el núcleo ARC durante la transición puberal. Además, este efecto inhibitorio es detectado incluso con la dosis más baja de BPA, en las etapas infantil y puberal del desarrollo postnatal; un fenómeno que sugiere la elevada sensibilidad del sistema NKB/NK3R a los efectos organizativos de los compuestos con actividad estrogénica. Considerando el papel estimulador propuesto para NKB en la secreción de Kp, y que el incremento en su expresión antecede al de *Kiss1* durante la maduración puberal, nuestros datos abren la posibilidad de que los cambios en los niveles de ARNm de *Tac2* detectados en el ARC puedan contribuir, al menos parcialmente, a la caída en la expresión de *Kiss1*/Kp que también detectamos en ratones hembra prepuberales sometidas a la exposición perinatal con BPA.

Adicionalmente, nuestros resultados en el modelo de estrogenización neonatal también muestran que la reducción en el número de neuronas NKB detectada en el núcleo ARC de los animales estrogenizados se asocia a un dramático descenso en los niveles circulantes de LH; un fenómeno que también se observa en ratones hembra infantiles y puberales expuestos a diferentes dosis de BPA durante el periodo perinatal. Sin embargo, el descenso en los niveles de LH detectado en los animales estrogenizados neonatalmente es posteriormente normalizado tras la estimulación central de NKB mediante la administración de senktide. En este sentido, hay que resaltar que el hecho de que las ratas macho adultas estrogenizadas neonatalmente, a diferencia de lo que sucede en las ratas macho adultas intactas, sí responden a

senktide, lo que podría ser indicativo de su estado inmaduro, ya que estas ratas estrogenizadas no llegan a entrar en pubertad y, como hemos comentado anteriormente, las ratas macho prepuberales sí responden a la estimulación central de NKB. Por otra parte, también hay que destacar que las respuestas de LH a senktide obtenidas en los animales estrogenizados se encuentran en consonancia con las respuestas gonadotrópicas obtenidas tras la estimulación de Kp en el mismo contexto<sup>501</sup>. Sin embargo, la magnitud de la respuesta de LH es menor en los animales tratados con senktide que en los animales tratados con Kp. En este sentido, si asumimos que NKB regula indirectamente la secreción de LH mediante el control de la secreción de Kp<sup>72,441,442,503</sup>, se podría argumentar que la respuesta reducida de LH obtenida tras la administración de senktide (en comparación con la obtenida para Kp), podría deberse a que aún prevalece la supresión del tono endógeno de Kp que se detecta en los animales estrogenizados neonatalmente<sup>501</sup>. En cualquier caso, nuestros resultados sugieren que el rescate de la señalización de NKB en los animales estrogenizados neonatalmente podría ser suficiente para mejorar el tono disminuido de Kp y, por lo tanto, la secreción de GnRH de estos animales, reforzando de este modo el relevante papel regulador de NKB en el control central del eje HHG.

Posteriormente, decidimos evaluar la influencia del ambiente esteroideo sobre la expresión hipotalámica del ARNm de *Tac2* en ratas hembra adultas ovariectomizadas sometidas o no a reemplazamiento con estradiol. En este sentido, conviene destacar que, si bien se han descrito distintas evidencias que documentan la regulación de NKB/NK3R por esteroides sexuales en diferentes especies<sup>72,407,410,425,426,428,430,434,504</sup>, la mayoría de ellos se han centrado exclusivamente en el núcleo ARC/infundibular, y no han tenido en cuenta otras áreas hipotalámicas, tales como el LHA, donde la expresión de NKB es abundante. Nuestros datos ponen de manifiesto un claro dimorfismo núcleo-específico de la acción del estradiol sobre la expresión de *Tac2*, con un consistente efecto inhibitor en el ARC y un inequívoco efecto estimulador en el LHA. Este fenómeno recuerda a la regulación dual y opuesta de la expresión génica de *Kiss1* por estradiol entre los núcleos ARC (inhibición) y AVPV (estimulación)<sup>219,505</sup>. Si bien los mecanismos moleculares y la relevancia fisiológica de la regulación diferencial de *Kiss1* se ha caracterizado en profundidad en los últimos años, la base científica y el papel putativo de la regulación dual de la expresión de *Tac2* por estradiol en los núcleos ARC

y LHA aún sigue pendiente de caracterización. En cualquier caso, nuestros hallazgos podrían sugerir la existencia de otros posibles modos de acción de NKB no sólo en el control del eje HHG sino también en el de otros ejes relacionados. Por otra parte, también hay que destacar que nuestros análisis inmunohistoquímicos iniciales no detectaron inmunoreactividad a NKB (NKB-ir) en el LHA de ratas adultas; una observación que podría sugerir la ausencia de una traducción significativa de este neuropéptido, o su rápido recambio o liberación en esta área hipotalámica bajo condiciones normales. Considerando que los niveles basales del ARNm de *Tac2* en el LHA son reducidos en animales ovariectomizados y aumentan tras la administración de estradiol, podría darse el caso de que NKB-ir pudiera detectarse únicamente bajo condiciones de estimulación con estradiol. En su conjunto, nuestros datos desvelan la existencia un claro dimorfismo sexual del sistema NKB/NK3R y documentan las acciones reguladoras diferenciales de los esteroides sexuales sobre la expresión/ acciones de NKB en el contexto de la regulación de la secreción de gonadotropinas en la rata.





# CONCLUSIONES



## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo en este trabajo de Tesis Doctoral nos permiten concluir que:

6. El sistema hipotalámico NKB/NK3R tiene un prominente papel estimulador en el control puberal en la rata hembra, como lo demuestra su incrementada expresión hipotalámica durante el periodo prepuberal, el aumento en la respuesta secretora de LH a la estimulación de NKB durante el periodo prepuberal/puberal y el impacto negativo del bloqueo central de la señalización NKB/NK3R sobre la llegada de la pubertad.
7. El sistema hipotalámico NKB/NK3R está sujeto a regulación metabólica durante la transición puberal en la rata hembra. Mientras su expresión disminuye en el núcleo ARC en condiciones de ayuno, su estimulación farmacológica a nivel central rescata la llegada de la pubertad en condiciones de restricción calórica crónica.
8. Las respuestas secretoras de LH y FSH a la estimulación con NKB varían en función del sexo y el estado del desarrollo. En la rata hembra, la respuesta secretora de LH aumenta independientemente del estado de maduración postnatal, mientras que en la rata macho adulta no se detecta dicho efecto estimulador. En cambio, la respuesta secretora de FSH a la estimulación central de NKB únicamente aumenta en ambos sexos antes de la pubertad, no detectándose ninguna respuesta en la edad adulta.
9. Los sistemas TKs SP/NK1R y NKA/NK2R estimulan la secreción de gonadotropinas en ratas prepuberales, mientras que los animales adultos únicamente presentan respuestas moderadas a la activación de NKA/NK2R. El bloqueo de la señalización de Dyn, en cambio, no altera ni los niveles de LH basales ni la respuesta de LH a la estimulación central de NKB en ratas hembra adultas, mientras que en ratas macho sí que induce respuestas estimuladoras tras la administración de senktide; un fenómeno que sugiere la existencia de un mayor tono inhibitor de Dyn en este sexo. Este comportamiento sexualmente dimórfico se encuentra en consonancia con los datos de expresión de hipotalámica de los genes *Pdyn* and *Opkr1*,

codificantes de Dyn y su receptor (KOR), cuyos niveles son más abundantes en el MBH de ratas macho en el periodo prepuberal.

10. La expresión hipotalámica del ARNm de Tac2 se encuentra regulada por los niveles estradiol en la rata hembra, presentando un claro dimorfismo núcleo-específico, con un consistente efecto inhibitor en el ARC y un inequívoco efecto estimulador en el LHA. Además, el sistema hipotalámico NKB/NK3R es altamente sensible durante ventanas críticas del desarrollo a los efectos organizativos o disruptivos de los esteroides sexuales o xenoestrógenos (BPA), respectivamente, en roedores. La exposición neonatal a elevadas dosis de estrógenos o xenoestrógenos disminuye la expresión de Tac2 en neuronas NKB del núcleo ARC de ratas de ambos sexos y ratones hembra, respectivamente; un fenómeno que se asocia a una disminución significativa en los niveles de LH circulantes. Por el contrario, el rescate de la señalización de NKB/NK3R en ratas estrogenizadas neonatalmente recupera la respuesta secretora de LH de estos animales.

# REFERENCIAS



## 6. REFERENCIAS

1. Moore, C.R. & Price, D. The question of sex hormone antagonism. *Proceedings of the Society For Experimental Biology and Medicine* **28**, 38-40 (1930).
2. Moore, C.R. & Price, D. Gonad hormone functions, and the reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex hormone antagonism. *American Journal of Anatomy* **50**, 13-71 (1932).
3. Hohlweg, W. & Junkmann, K. The hormonal and neurogenic regulation of the function of the anterior pituitary. *Klinische Wochenschrift* **11**, 321-323 (1932).
4. Grumbach, M.M. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res* **57 Suppl 2**, 2-14 (2002).
5. Tena-Sempere, M. & Huhtaniemi, I. Gonadotropins and gonadotropin receptors. *reproductive medicine. Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals. Fauser. BCJM (Ed). Parthenon Publishing, NY, USA*, 225-244 (2003).
6. Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P. & Tena-Sempere, M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* **92**, 1235-316 (2012).
7. Carr, B.R. & Bradshaw, K. Disorders of the ovary and female reproductive tract. *Harrisons Principles of Internal Medicine* **2**, 2154-2167 (2001).
8. Reichlin, S. Chapter 8: Neuroendocrinology. *WB Saunders* (1998).
9. Everitt, B.J. & Hökfelt, T. Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. in *Neuroendocrinological Aspects of Neurosurgery* 1-15 (Springer, 1990).
10. Hoffman, G., Phelps, C., Khachaturian, H. & Sladek Jr, J. Neuroendocrine projections to the median eminence. in *Morphology of hypothalamus and its connections* 161-196 (Springer, 1986).
11. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. *Principles of neural science*, (McGraw-Hill New York, 2000).
12. Carpenter, M.B. & Kaufman, A. *Neuroanatomía: fundamentos*, (Williams & Wilkins, 1994).
13. Witkin, J.W., Paden, C.M. & Silverman, A.J. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* **35**, 429-38 (1982).
14. Burgus, R. *et al.* Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 278-82 (1972).
15. Schally, A.V. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* **173**, 1036-8 (1971).
16. Miyamoto, K. *et al.* Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3874-8 (1984).
17. Sherwood, N. *et al.* Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2794-8 (1983).
18. Whitlock, K.E. Origin and development of GnRH neurons. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 145-51 (2005).
19. Dudas, B. & Merchenthaler, I. Topography and associations of leu-enkephalin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the human diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 1842-8 (2003).
20. Song, T., Nikolics, K., Seeburg, P.H. & Goldsmith, P.C. GnRH-prohormone-containing neurons in the primate brain: immunostaining for the GnRH-associated peptide. *Peptides* **8**, 335-46 (1987).
21. Witkin, J.W. Access of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the vasculature in the rat. *Neuroscience* **37**, 501-6 (1990).
22. Millar, R.P. & Newton, C.L. Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nat Rev Endocrinol* **9**, 451-66 (2013).
23. Karten, M.J. & Rivier, J.E. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev* **7**, 44-66 (1986).
24. Millar, R.P., Flanagan, C.A., Milton, R.C. & King, J.A. Chimeric analogues of vertebrate gonadotropin-releasing hormones comprising substitutions of the variant amino acids in



- positions 5, 7, and 8. Characterization of requirements for receptor binding and gonadotropin release in mammalian and avian pituitary gonadotropes. *J Biol Chem* **264**, 21007-13 (1989).
25. Dutlow, C.M., Rachman, J., Jacobs, T.W. & Millar, R.P. Prepubertal increases in gonadotropin-releasing hormone mRNA, gonadotropin-releasing hormone precursor, and subsequent maturation of precursor processing in male rats. *J Clin Invest* **90**, 2496-501 (1992).
  26. Plant, T.M., Gay, V.L., Marshall, G.R. & Arslan, M. Puberty in monkeys is triggered by chemical stimulation of the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2506-10 (1989).
  27. Millar, R.P. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* **25**, 235-75 (2004).
  28. Millar, R.P. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci* **88**, 5-28 (2005).
  29. Page, R.B. 27 Anatomy of the Hypothalamo–Hypophysial Complex. in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition* edited by Jimmy D. Neill, Elsevier 2006 1-105 (2006).
  30. Everett, J.W. 26 Pituitary and Hypothalamus: Perspectives and Overview. in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition* edited by Jimmy D. Neill, Elsevier 2006 1-19 (2006).
  31. Hill, R.W. & Wyse, G.A. *Fisiología animal*, (Ed. Médica Panamericana, 2006).
  32. Childs, G.V. Functional Ultrastructure of Gonadotropes: a Review. in *Morphology of Hypothalamus and Its Connections*, Vol. 7 (eds. Ganten, D. & Pfaff, D.) 49-97 (Springer Berlin Heidelberg, 1986).
  33. Themmen, A.P.N. & Huhtaniemi, I.T. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* **21**, 551-83 (2000).
  34. Fiddes, J.C. & Talmadge, K. Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Prog Horm Res* **40**, 43-78 (1984).
  35. Pierce, J.G. & Parsons, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* **50**, 465-95 (1981).
  36. Bittar, E. *Reproductive endocrinology and biology*, (Elsevier, 1998).
  37. Axelrod, L., Neer, R.M. & Kliman, B. Hypogonadism in a male with immunologically active, biologically inactive luteinizing hormone: an exception to a venerable rule. *J Clin Endocrinol Metab* **48**, 279-87 (1979).
  38. Raivio, T. *et al.* The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 3278-82 (1996).
  39. Weiss, J. *et al.* Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* **326**, 179-83 (1992).
  40. Layman, L.C. *et al.* Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med* **337**, 607-11 (1997).
  41. Matthews, C. & Chatterjee, V.K. Isolated deficiency of follicle-stimulating hormone re-revisited. *N Engl J Med* **337**, 642 (1997).
  42. Lindstedt, G. *et al.* Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSHbeta gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal serum testosterone concentrations. *Clin Chem Lab Med* **36**, 663-5 (1998).
  43. Phillip, M., Arbelle, J.E., Segev, Y. & Parvari, R. Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *N Engl J Med* **338**, 1729-32 (1998).
  44. Gudermann, T., Birnbaumer, M. & Birnbaumer, L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem* **267**, 4479-88 (1992).
  45. Gudermann, T., Nichols, C., Levy, F.O., Birnbaumer, M. & Birnbaumer, L. Ca<sup>2+</sup> mobilization by the LH receptor expressed in *Xenopus* oocytes independent of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate formation: evidence for parallel activation of two signaling pathways. *Mol Endocrinol* **6**, 272-8 (1992).
  46. Herrlich, A. *et al.* Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J Biol Chem* **271**, 16764-72 (1996).
  47. Hsueh, A.J., Dufau, M.L. & Catt, K.J. Gonadotropin-induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3':5'-cyclic AMP and testosterone responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 592-5 (1977).
  48. Dufau, M.L. The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol* **60**, 461-96 (1998).

49. Simoni, M., Gromoll, J. & Nieschlag, E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* **18**, 739-73 (1997).
50. Asatiani, K. *et al.* Distribution and function of FSH receptor genetic variants in normal men. *Andrologia* **34**, 172-6 (2002).
51. Zapatero-Caballero, H. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of female rats. *Biol Reprod* **70**, 348-55 (2004).
52. Zapatero-Caballero, H., Sanchez-Franco, F., Guerra-Perez, N., Fernandez-Mendez, C. & Fernandez-Vazquez, G. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of male rats. *Biol Reprod* **68**, 1764-70 (2003).
53. Kerr, J.B., Loveland, K.L., O'Bryan, M.K. & de Kretser, D.M. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (ed. Neill, T.E.e.b.J.D.) 1-121 (Elsevier, 2006).
54. Hafez, E. & Hafez, B. Anatomía funcional de la reproducción: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. (Mc Graw-Hill Interamericana Editores, 2002).
55. Molist, P. & Pombal, M.A. ATLAS de HISTOLOGÍA VEGETAL y ANIMAL. ÓRGANOS ANIMALES. SISTEMA REPRODUCTOR. in *ATLAS de HISTOLOGÍA VEGETAL y ANIMAL* (ed. Salud, D.d.B.F.y.C.d.l.) 1-24 (<http://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/o-a-reproductor.pdf>, 2013).
56. Griswold, M.D. & McLean, D.J. The Sertoli Cell. in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (ed. Neill, T.E.e.b.J.D.) 1-27 (Elsevier, 2006).
57. Channing, C.P., Hillensjo, T. & Schaerf, F.W. Hormonal control of oocyte meiosis, ovulation and luteinization in mammals. *Clin Endocrinol Metab* **7**, 601-24 (1978).
58. McKinley, M.P. & O'loughlin, V.D. *Human anatomy*, (McGraw-Hill Higher Education, 2006).
59. Tena-Sempere, M., Aguilar, E. & Pinilla, L. Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. *Gónadas. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España*, 21-42 (2001).
60. Everett, J.W. Central Neural Control of Reproductive Functions of the Adenohypophysis. *Physiol Rev* **44**, 373-431 (1964).
61. Everett, J.W., Sawyer, C.H. & Markee, J.E. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* **44**, 234-50 (1949).
62. Curtis, H. & Barnes, S. *Biología*, sexta edic. española. *Med. Panamericana* (2000).
63. Gottsch, M.L. *et al.* A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* **145**, 4073-7 (2004).
64. Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H. & Ohtaki, T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 383-8 (2004).
65. Navarro, V.M. *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* **145**, 4565-74 (2004).
66. Thompson, E.L. *et al.* Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* **16**, 850-8 (2004).
67. Dhillon, W.S. *et al.* Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 6609-15 (2005).
68. Messenger, S. *et al.* Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1761-6 (2005).
69. Shahab, M. *et al.* Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2129-34 (2005).
70. Castellano, J.M. & Tena-Sempere, M. Metabolic control of female puberty: potential therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* **20**, 1181-93 (2016).
71. Amstalden, M. *et al.* 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 gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* **22**, 1-12 (2010).
72. Navarro, V.M. *et al.* Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* **29**, 11859-66 (2009).
73. Sandoval-Guzman, T. & Rance, N.E. Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* **1026**, 307-12 (2004).

74. Topaloglu, A.K. *et al.* TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* **41**, 354-8 (2009).
75. Navarro, V.M. *et al.* Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**, E202-10 (2011).
76. Ramaswamy, S. *et al.* Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* **151**, 4494-503 (2010).
77. Topaloglu, A.K. Neurokinin B signaling in puberty: human and animal studies. *Mol Cell Endocrinol* **324**, 64-9 (2010).
78. van den Pol, A.N., Wuarin, J.P. & Dudek, F.E. Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science* **250**, 1276-8 (1990).
79. Bourguignon, J.P., Gerard, A., Alvarez Gonzalez, M.L., Purnelle, G. & Franchimont, P. Endogenous glutamate involvement in pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone: evidence from effect of glutamine and developmental changes. *Endocrinology* **136**, 911-6 (1995).
80. Flugge, G., Wuttke, W. & Fuchs, E. Postnatal development of transmitter systems: sexual differentiation of the GABAergic system and effects of muscimol. *Int J Dev Neurosci* **4**, 319-26 (1986).
81. Goroll, D., Arias, P. & Wuttke, W. Ontogenic changes in the hypothalamic levels of amino acid neurotransmitters in the female rat. *Brain Res Dev Brain Res* **77**, 183-8 (1994).
82. Barnes, G.N. & Slevin, J.T. Ionotropic glutamate receptor biology: effect on synaptic connectivity and function in neurological disease. *Curr Med Chem* **10**, 2059-72 (2003).
83. Oswald, R.E. Ionotropic glutamate receptor recognition and activation. *Adv Protein Chem* **68**, 313-49 (2004).
84. Brann, D.W. & Mahesh, V.B. Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* **15**, 3-49 (1994).
85. Spergel, D.J., Krsmanovic, L.Z., Stojilkovic, S.S. & Catt, K.J. Glutamate modulates [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and gonadotropin-releasing hormone secretion in immortalized hypothalamic GT1-7 neurons. *Neuroendocrinology* **59**, 309-17 (1994).
86. Smith, M.J. & Jennes, L. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* **122**, 1-10 (2001).
87. McCann, S.M. *et al.* Hypothalamic control of FSH and LH by FSH-RF, LHRH, cytokines, leptin and nitric oxide. *Neuroimmunomodulation* **5**, 193-202 (1998).
88. Dhandapani, K.M. & Brann, D.W. The role of glutamate and nitric oxide in the reproductive neuroendocrine system. *Biochem Cell Biol* **78**, 165-79 (2000).
89. Mahachoklertwattana, P., Black, S.M., Kaplan, S.L., Bristow, J.D. & Grumbach, M.M. Nitric oxide synthesized by gonadotropin-releasing hormone neurons is a mediator of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced GnRH secretion. *Endocrinology* **135**, 1709-12 (1994).
90. Moretto, M., Lopez, F.J. & Negro-Vilar, A. Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion. *Endocrinology* **133**, 2399-402 (1993).
91. Chachlaki, K., Garthwaite, J. & Prevot, V. The gentle art of saying NO: how nitric oxide gets things done in the hypothalamus. *Nat Rev Endocrinol* **13**, 521-535 (2017).
92. Akema, T. & Kimura, F. Modulation of pulsatile LH secretion by baclofen, a selective GABAB receptor agonist, in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* **56**, 141-7 (1992).
93. Han, S.K., Abraham, I.M. & Herbison, A.E. Effect of GABA on GnRH neurons switches from depolarization to hyperpolarization at puberty in the female mouse. *Endocrinology* **143**, 1459-66 (2002).
94. Herbison, A.E. & Moenter, S.M. Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: towards an emerging consensus. *J Neuroendocrinol* **23**, 557-69 (2011).
95. Martinez de la Escalera, G., Choi, A.L. & Weiner, R.I. Biphasic gabaergic regulation of GnRH secretion in GT1 cell lines. *Neuroendocrinology* **59**, 420-5 (1994).
96. Kalra, S.P. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* **14**, 507-38 (1993).

97. Leadem, C.A. & Yagenova, S.V. Effects of specific activation of mu-, delta- and kappa-opioid receptors on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* **45**, 109-17 (1987).
98. Gallo, R.V. Kappa-opioid receptor involvement in the regulation of pulsatile luteinizing hormone release during early pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol* **2**, 685-91 (1990).
99. Panerai, A.E., Petraglia, F., Sacerdote, P. & Genazzani, A.R. Mainly mu-opiate receptors are involved in luteinizing hormone and prolactin secretion. *Endocrinology* **117**, 1096-9 (1985).
100. Goodman, R.L. *et al.* Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology* **145**, 2959-67 (2004).
101. Mitchell, V. *et al.* Presence of mu and kappa opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat. *Neuroreport* **8**, 3167-72 (1997).
102. Sannella, M.I. & Petersen, S.L. Dual label in situ hybridization studies provide evidence that luteinizing hormone-releasing hormone neurons do not synthesize messenger ribonucleic acid for mu, kappa, or delta opiate receptors. *Endocrinology* **138**, 1667-72 (1997).
103. Weems, P.W. *et al.* kappa-Opioid Receptor Is Colocalized in GnRH and KNDy Cells in the Female Ovine and Rat Brain. *Endocrinology* **157**, 2367-79 (2016).
104. Allen, Y.S. *et al.* Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* **221**, 877-9 (1983).
105. Morris, B.J. Neuronal localisation of neuropeptide Y gene expression in rat brain. *J Comp Neurol* **290**, 358-68 (1989).
106. Larhammar, D. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept* **65**, 165-74 (1996).
107. Manfredi-Lozano, M., Roa, J. & Tena-Sempere, M. Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility. *Front Neuroendocrinol* **48**, 37-49 (2018).
108. Kaynard, A.H., Pau, K.Y., Hess, D.L. & Spies, H.G. Third-ventricular infusion of neuropeptide Y suppresses luteinizing hormone secretion in ovariectomized rhesus macaques. *Endocrinology* **127**, 2437-44 (1990).
109. Khorram, O., Pau, K.Y. & Spies, H.G. Bimodal effects of neuropeptide Y on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone in conscious rabbits. *Neuroendocrinology* **45**, 290-7 (1987).
110. Khorram, O., Pau, K.Y. & Spies, H.G. Release of hypothalamic neuropeptide Y and effects of exogenous NPY on the release of hypothalamic GnRH and pituitary gonadotropins in intact and ovariectomized does in vitro. *Peptides* **9**, 411-7 (1988).
111. McDonald, J.K., Lumpkin, M.D. & DePaolo, L.V. Neuropeptide-Y suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized rats: possible site of action. *Endocrinology* **125**, 186-91 (1989).
112. Pierroz, D.D., Catzeflis, C., Aebi, A.C., Rivier, J.E. & Aubert, M.L. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinology* **137**, 3-12 (1996).
113. Raposinho, P.D. *et al.* Evidence that the inhibition of luteinizing hormone secretion exerted by central administration of neuropeptide Y (NPY) in the rat is predominantly mediated by the NPY-Y5 receptor subtype. *Endocrinology* **140**, 4046-55 (1999).
114. Satake, H. *et al.* Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *Biochem J* **354**, 379-85 (2001).
115. Osugi, T. *et al.* Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments. *J Endocrinol* **182**, 33-42 (2004).
116. Leon, S. & Tena-Sempere, M. Dissecting the Roles of Gonadotropin-Inhibitory Hormone in Mammals: Studies Using Pharmacological Tools and Genetically Modified Mouse Models. *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**, 189 (2015).
117. Kriegsfeld, L.J. *et al.* Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2410-5 (2006).
118. Johnson, M.A., Tsutsui, K. & Fraley, G.S. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* **51**, 171-80 (2007).

119. Pineda, R. *et al.* Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E39-46 (2010).
120. Pineda, R. *et al.* Characterization of the potent gonadotropin-releasing activity of RF9, a selective antagonist of RF-amide-related peptides and neuropeptide FF receptors: physiological and pharmacological implications. *Endocrinology* **151**, 1902-13 (2010).
121. McEwen, B. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* **57**, 357-84 (2002).
122. Herbison, A.E. & Pape, J.R. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* **22**, 292-308 (2001).
123. Young, W.C., Goy, R.W. & Phoenix, C.H. Hormones and Sexual Behavior. *Science* **143**, 212-8 (1964).
124. Mitra, S.W. *et al.* Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* **144**, 2055-67 (2003).
125. Shughrue, P.J., Lane, M.V. & Merchenthaler, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **388**, 507-25 (1997).
126. Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M. & Swanson, L.W. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* **294**, 76-95 (1990).
127. Adachi, S. *et al.* Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* **53**, 367-78 (2007).
128. Petersen, S.L. & Barraclough, C.A. Suppression of spontaneous LH surges in estrogen-treated ovariectomized rats by microimplants of antiestrogens into the preoptic brain. *Brain Res* **484**, 279-89 (1989).
129. Smith, J.T. *et al.* Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* **146**, 2976-84 (2005).
130. Christian, C.A., Glidewell-Kenney, C., Jameson, J.L. & Moenter, S.M. Classical estrogen receptor alpha signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. *Endocrinology* **149**, 5328-34 (2008).
131. Kenealy, B.P., Keen, K.L., Kapoor, A. & Terasawa, E. Neuroestradiol in the Stalk Median Eminence of Female Rhesus Macaques Decreases in Association With Puberty Onset. *Endocrinology* **157**, 70-6 (2016).
132. Tilbrook, A.J., de Kretser, D.M. & Clarke, I.J. Influence of the degree of stimulation of the pituitary by gonadotropin-releasing hormone on the action of inhibin and testosterone to suppress the secretion of the gonadotropins in rams. *Biol Reprod* **64**, 473-81 (2001).
133. Hsueh, A.J. *et al.* Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5082-6 (1987).
134. Ling, N. *et al.* Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* **321**, 779-82 (1986).
135. Vale, W. *et al.* Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* **321**, 776-9 (1986).
136. Meunier, H., Rivier, C., Evans, R.M. & Vale, W. Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 247-51 (1988).
137. Corrigan, A.Z. *et al.* Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* **128**, 1682-4 (1991).
138. Krummen, L.A. *et al.* Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology* **132**, 431-43 (1993).
139. Mather, J.P., Roberts, P.E. & Krummen, L.A. Follistatin modulates activin activity in a cell- and tissue-specific manner. *Endocrinology* **132**, 2732-4 (1993).
140. Attardi, B. & Winters, S.J. Decay of follicle-stimulating hormone-beta messenger RNA in the presence of transcriptional inhibitors and/or inhibin, activin, or follistatin. *Mol Endocrinol* **7**, 668-80 (1993).
141. Kennedy, G.C. & Mitra, J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J Physiol* **166**, 408-18 (1963).

142. Frisch, R.E. & Revelle, R. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science* **169**, 397-9 (1970).
143. Fernandez-Fernandez, R. *et al.* Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* **254-255**, 127-32 (2006).
144. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-32 (1994).
145. Masuzaki, H. *et al.* Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* **3**, 1029-33 (1997).
146. Maffei, M. *et al.* Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* **1**, 1155-61 (1995).
147. Tartaglia, L.A. The leptin receptor. *J Biol Chem* **272**, 6093-6 (1997).
148. Ge, H., Huang, L., Pourbahrami, T. & Li, C. Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **277**, 45898-903 (2002).
149. Elmquist, J.K., Maratos-Flier, E., Saper, C.B. & Flier, J.S. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* **1**, 445-50 (1998).
150. Fei, H. *et al.* Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7001-5 (1997).
151. Hakansson, M.L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C. & Meister, B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* **18**, 559-72 (1998).
152. Mercer, J.G., Moar, K.M., Findlay, P.A., Hoggard, N. & Adam, C.L. Association of leptin receptor (OB-Rb), NPY and GLP-1 gene expression in the ovine and murine brainstem. *Regul Pept* **75-76**, 271-8 (1998).
153. Ahima, R.S., Saper, C.B., Flier, J.S. & Elmquist, J.K. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* **21**, 263-307 (2000).
154. Casanueva, F.F. & Dieguez, C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* **20**, 317-63 (1999).
155. Farooqi, S. & O'Rahilly, S. Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev* **27**, 710-18 (2006).
156. Welt, C.K. *et al.* Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* **351**, 987-97 (2004).
157. Chehab, F.F., Lim, M.E. & Lu, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* **12**, 318-20 (1996).
158. Mounzih, K., Lu, R. & Chehab, F.F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* **138**, 1190-3 (1997).
159. Zeinoaldini, S., Swarts, J.J. & Van de Heijning, B.J. Chronic leptin infusion advances, and immunoneutralization of leptin postpones puberty onset in normally fed and feed restricted female rats. *Peptides* **27**, 1652-8 (2006).
160. Stephens, T.W. *et al.* The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* **377**, 530-2 (1995).
161. Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P. & Baskin, D.G. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* **98**, 1101-6 (1996).
162. Sahu, A. Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Endocrinology* **139**, 4739-42 (1998).
163. Sahu, A. Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* **139**, 795-8 (1998).
164. Jureus, A., Cunningham, M.J., McClain, M.E., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology* **141**, 2703-6 (2000).
165. Smith, J.T., Acohido, B.V., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* **18**, 298-303 (2006).
166. Backholer, K. *et al.* Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* **151**, 2233-43 (2010).
167. Donato, J., Jr. *et al.* Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest* **121**, 355-68 (2011).

168. Cravo, R.M. *et al.* Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. *PLoS One* **8**, e58698 (2013).
169. Manfredi-Lozano, M. *et al.* Defining a novel leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty. *Mol Metab* **5**, 844-857 (2016).
170. Donato, J., Jr. *et al.* The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. *J Neurosci* **29**, 5240-50 (2009).
171. Ross, R.A. *et al.* PACAP neurons in the ventral premammillary nucleus regulate reproductive function in the female mouse. *Elife* **7**(2018).
172. Tena-Sempere, M. Balance energético, peso corporal y función reproductora. *Rev Esp Obes* **5**, 193-203 (2007).
173. Woods, S.C., Decke, E. & Vasselli, J.R. Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev* **81**, 26-43 (1974).
174. Bruning, J.C. *et al.* Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **289**, 2122-5 (2000).
175. Corp, E.S. *et al.* Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett* **70**, 17-22 (1986).
176. Olson, B.R. *et al.* Effects of insulin-like growth factors I and II and insulin on the immortalized hypothalamic GTI-7 cell line. *Neuroendocrinology* **62**, 155-65 (1995).
177. Crown, A., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology* **86**, 175-82 (2007).
178. Kojima, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-60 (1999).
179. Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H. & Kangawa, K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 118-22 (2001).
180. Fernandez-Fernandez, R. *et al.* Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology* **82**, 245-55 (2005).
181. Tena-Sempere, M. *et al.* Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* **143**, 717-25 (2002).
182. Tschop, M., Smiley, D.L. & Heiman, M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**, 908-13 (2000).
183. Shuto, Y. *et al.* Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest* **109**, 1429-36 (2002).
184. Barreiro, M.L. & Tena-Sempere, M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol* **226**, 1-9 (2004).
185. Mystkowski, P. & Schwartz, M.W. Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era. *Nutrition* **16**, 937-46 (2000).
186. Fernandez-Fernandez, R. *et al.* Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology* **146**, 3018-25 (2005).
187. Fernandez-Fernandez, R., Tena-Sempere, M., Aguilar, E. & Pinilla, L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Lett* **362**, 103-7 (2004).
188. Porkka-Heiskanen, T., Kalinchuk, A., Alanko, L., Huhtaniemi, I. & Stenberg, D. Orexin A and B levels in the hypothalamus of female rats: the effects of the estrous cycle and age. *Eur J Endocrinol* **150**, 737-42 (2004).
189. Gui, Y., Silha, J.V. & Murphy, L.J. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res* **12**, 1481-91 (2004).
190. Erickson, R.P. Does sex determination start at conception? *Bioessays* **19**, 1027-32 (1997).
191. Sinisi, A.A., Pasquali, D., Notaro, A. & Bellastella, A. Sexual differentiation. *J Endocrinol Invest* **26**, 23-8 (2003).
192. Josso, N. *et al.* Anti-mullerian hormone in early human development. *Early Hum Dev* **33**, 91-9 (1993).
193. Rey, R. *et al.* Anti-mullerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* **77**, 1220-6 (1993).
194. Tena-Sempere, M., Pinilla, L., Gonzalez, L.C. & Aguilar, E. Reproductive disruption by exposure to exogenous estrogenic compounds during sex differentiation: Lessons from the neonatally estrogenized male rat. *Curr Top Steroid Res* **3**, 23-37 (2000).

195. Brooks, A.N., McNeilly, A.S. & Thomas, G.B. Role of GnRH in the ontogeny and regulation of the fetal hypothalamo-pituitary-gonadal axis in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* **49**, 163-75 (1995).
196. Mann, D.R. & Fraser, H.M. The neonatal period: a critical interval in male primate development. *J Endocrinol* **149**, 191-7 (1996).
197. Plant, T.M. A study of the role of the postnatal testes in determining the ontogeny of gonadotropin secretion in the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* **116**, 1341-50 (1985).
198. Terasawa, E. & Fernandez, D.L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* **22**, 111-51 (2001).
199. Ojeda, N. & Terasawa, E. Neuroendocrine regulation of puberty. in *Hormones, Brain and Behavior* (ed. Pfaff DW, A.A., Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT). Academic Press, New York.) 589-659 (2002).
200. Plant, T.M. Puberty in primates. in *The physiology of Reproduction* (ed. (Knobil E & Neil J) Raven Press, N.Y.) 453-485 (1994).
201. Chiappa, S.A. & Fink, G. Releasing factor and hormonal changes in the hypothalamic-pituitary-gonadotrophin and -adrenocorticotrophin systems before and after birth and puberty in male, female and androgenized female rats. *J Endocrinol* **72**, 211-24 (1977).
202. Bourguignon, J.P., Gerard, A. & Franchimont, P. Age-related differences in the effect of castration upon hypothalamic LHRH content in male rats. *Neuroendocrinology* **38**, 376-81 (1984).
203. Bourguignon, J.P. & Franchimont, P. Puberty-related increase in episodic LHRH release from rat hypothalamus in vitro. *Endocrinology* **114**, 1941-3 (1984).
204. Plant, T.M. Neurophysiology of puberty. *J Adolesc Health* **31**, 185-91 (2002).
205. Ramirez, V.D. & McCann, S.M. Inhibitory Effect of Testosterone on Luteinizing Hormone Secretion in Immature and Adult Rats. *Endocrinology* **76**, 412-7 (1965).
206. Ojeda, S.R. *et al.* Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* **147**, 1166-74 (2006).
207. Lee, J.H. & Welch, D.R. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer* **71**, 1035-44 (1997).
208. Lee, J.H. *et al.* KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* **88**, 1731-7 (1996).
209. Lee, D.K. *et al.* Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* **446**, 103-7 (1999).
210. Ohtaki, T. *et al.* Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **411**, 613-7 (2001).
211. Muir, A.I. *et al.* AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* **276**, 28969-75 (2001).
212. Kotani, M. *et al.* The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* **276**, 34631-6 (2001).
213. de Roux, N. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10972-6 (2003).
214. Semple, R.K. *et al.* Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 1849-55 (2005).
215. Seminara, S.B. *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* **349**, 1614-27 (2003).
216. Funes, S. *et al.* The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1357-63 (2003).
217. Oakley, A.E., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* **30**, 713-43 (2009).
218. Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W.H., Caraty, A. & Herbison, A.E. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J Neuroendocrinol* **21**, 673-82 (2009).
219. Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* **146**, 3686-92 (2005).



220. Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L. & Rance, N.E. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 2744-50 (2007).
221. Wakabayashi, Y. *et al.* Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* **30**, 3124-32 (2010).
222. Kauffman, A.S. *et al.* Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* **148**, 1774-83 (2007).
223. Goodman, R.L. *et al.* Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* **148**, 5752-60 (2007).
224. Lehman, M.N., Coolen, L.M. & Goodman, R.L. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* **151**, 3479-89 (2010).
225. Pineda, R., Plaisier, F., Millar, R.P. & Ludwig, M. Amygdala Kisspeptin Neurons: Putative Mediators of Olfactory Control of the Gonadotropic Axis. *Neuroendocrinology* **104**, 223-238 (2017).
226. Aggarwal, S. *et al.* Medial Amygdala Kiss1 Neurons Mediate Female Pheromone Stimulation of Luteinizing Hormone in Male Mice. *Neuroendocrinology* **108**, 172-189 (2019).
227. Richard, N., Galmiche, G., Corvaisier, S., Caraty, A. & Kottler, M.L. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* **20**, 381-93 (2008).
228. Herbison, A.E., de Tassigny, X., Doran, J. & Colledge, W.H. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* **151**, 312-21 (2010).
229. Arai, A.C. *et al.* Cancer metastasis-suppressing peptide metastin upregulates excitatory synaptic transmission in hippocampal dentate granule cells. *J Neurophysiol* **94**, 3648-52 (2005).
230. Han, S.K. *et al.* Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* **25**, 11349-56 (2005).
231. Navarro, V.M. *et al.* Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **146**, 1689-97 (2005).
232. Navarro, V.M. *et al.* Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* **146**, 156-63 (2005).
233. Castellano, J.M. *et al.* Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* **257-258**, 75-83 (2006).
234. Dhillon, W.S. *et al.* Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 3958-66 (2007).
235. Plant, T.M., Ramaswamy, S. & Dipietro, M.J. Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* **147**, 1007-13 (2006).
236. Irwig, M.S. *et al.* Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* **80**, 264-72 (2004).
237. McCann, S.M. *et al.* Hypothalamic control of gonadotropin secretion. *Prog Brain Res* **141**, 151-64 (2002).
238. de Kretser, D.M., Hedger, M.P., Loveland, K.L. & Phillips, D.J. Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* **8**, 529-41 (2002).
239. Patterson, M. *et al.* Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinol* **18**, 349-54 (2006).
240. Seminara, S.B., Dipietro, M.J., Ramaswamy, S., Crowley, W.F., Jr. & Plant, T.M. 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**, 2122-6 (2006).

241. Roa, J. *et al.* 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**, E1088-96 (2008).
242. Thompson, E.L. *et al.* Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E1074-82 (2006).
243. Pielecka-Fortuna, J., Chu, Z. & Moenter, S.M. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology* **149**, 1979-86 (2008).
244. Novaira, H.J., Ng, Y., Wolfe, A. & Radovick, S. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines. *Mol Cell Endocrinol* **311**, 126-34 (2009).
245. Jacobi, J.S. *et al.* 17-Beta-estradiol directly regulates the expression of adrenergic receptors and kisspeptin/GPR54 system in GT1-7 GnRH neurons. *Neuroendocrinology* **86**, 260-9 (2007).
246. Herbison, A.E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol* **12**, 452-66 (2016).
247. d'Anglemont de Tassigny, X. & Colledge, W.H. The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology (Bethesda)* **25**, 207-17 (2010).
248. 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* **29**, 48-69 (2008).
249. US, V.E. & Gaddum, J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* **72**, 74-87 (1931).
250. Chang, M.M. & Leeman, S.E. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J Biol Chem* **245**, 4784-90 (1970).
251. Kimura, S., Goto, K., Ogawa, T., Sugita, Y. & Kanazawa, I. Pharmacological characterization of novel mammalian tachykinins, neurokinin alpha and neurokinin beta. *Neurosci Res* **2**, 97-104 (1984).
252. Kangawa, K., Minamino, N., Fukuda, A. & Matsuo, H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* **114**, 533-40 (1983).
253. Nawa, H., Doteuchi, M., Igano, K., Inouye, K. & Nakanishi, S. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci* **34**, 1153-60 (1984).
254. Almeida, T.A. *et al.* Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem* **11**, 2045-81 (2004).
255. Maggi, C.A. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol* **26**, 911-44 (1995).
256. Cascieri, M.A. *et al.* Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Mol Pharmacol* **41**, 1096-9 (1992).
257. Ingi, T., Kitajima, Y., Minamitake, Y. & Nakanishi, S. Characterization of ligand-binding properties and selectivities of three rat tachykinin receptors by transfection and functional expression of their cloned cDNAs in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther* **259**, 968-75 (1991).
258. Pennefather, J.N. *et al.* Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci* **74**, 1445-63 (2004).
259. Page, N.M. New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides* **26**, 1356-68 (2005).
260. Eipper, B.A., Stoffers, D.A. & Mains, R.E. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu Rev Neurosci* **15**, 57-85 (1992).
261. Page, N.M. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1652-63 (2004).
262. Seidah, N.G. & Prat, A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem* **38**, 79-94 (2002).
263. Joos, G.F., Germonpre, P.R. & Pauwels, R.A. Role of tachykinins in asthma. *Allergy* **55**, 321-37 (2000).
264. Marvizon, J.C., Wang, X., Lao, L.J. & Song, B. Effect of peptidases on the ability of exogenous and endogenous neurokinins to produce neurokinin 1 receptor internalization in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* **140**, 1389-98 (2003).
265. Carter, M.S. & Krause, J.E. Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J Neurosci* **10**, 2203-14 (1990).

266. Page, N.M., Morrish, D.W. & Weston-Bell, N.J. Differential mRNA splicing and precursor processing of neurokinin B in neuroendocrine tissues. *Peptides* **30**, 1508-13 (2009).
267. Murthy, R.G., Greco, S.J., Taborga, M., Patel, N. & Rameshwar, P. Tac1 regulation by RNA-binding protein and miRNA in bone marrow stroma: Implication for hematopoietic activity. *Brain Behav Immun* **22**, 442-50 (2008).
268. Kotani, H., Hoshimaru, M., Nawa, H. & Nakanishi, S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7074-8 (1986).
269. Kurtz, M.M. *et al.* Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene* **296**, 205-12 (2002).
270. Zhang, Y., Lu, L., Furlonger, C., Wu, G.E. & Paige, C.J. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol* **1**, 392-7 (2000).
271. Page, N.M. *et al.* Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6245-50 (2003).
272. Patak, E. *et al.* Functional characterisation of hemokinin-1 in mouse uterus. *Eur J Pharmacol* **601**, 148-53 (2008).
273. Regoli, D., Boudon, A. & Fauchere, J.L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* **46**, 551-99 (1994).
274. Baldwin, J.M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* **12**, 1693-703 (1993).
275. Nakanishi, S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci* **14**, 123-36 (1991).
276. Krause, J.E. *et al.* Structure, expression and second messenger-mediated regulation of the human and rat substance P receptors and their genes. *Regul Pept* **46**, 59-66 (1993).
277. Gerard, N.P., Eddy, R.L., Jr., Shows, T.B. & Gerard, C. The human neurokinin A (substance K) receptor. Molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues. *J Biol Chem* **265**, 20455-62 (1990).
278. Gerard, N.P. *et al.* Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry* **30**, 10640-6 (1991).
279. Takahashi, K., Tanaka, A., Hara, M. & Nakanishi, S. The primary structure and gene organization of human substance P and neuromedin K receptors. *Eur J Biochem* **204**, 1025-33 (1992).
280. Minneman, K.P. Splice variants of G protein-coupled receptors. *Mol Interv* **1**, 108-16 (2001).
281. Patel, H.J., Ramkissoon, S.H., Patel, P.S. & Rameshwar, P. Transformation of breast cells by truncated neurokinin-1 receptor is secondary to activation by preprotachykinin-A peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17436-41 (2005).
282. Tuluc, F., Lai, J.P., Kilpatrick, L.E., Evans, D.L. & Douglas, S.D. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. *Trends Immunol* **30**, 271-6 (2009).
283. Candenas, M.L. *et al.* Identification of a tachykinin NK(2) receptor splice variant and its expression in human and rat tissues. *Life Sci* **72**, 269-77 (2002).
284. Palanche, T. *et al.* The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *J Biol Chem* **276**, 34853-61 (2001).
285. Quartara, L. & Maggi, C.A. The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides* **31**, 537-63 (1997).
286. Valant, C. *et al.* Allosteric functional switch of neurokinin A-mediated signaling at the neurokinin NK2 receptor: structural exploration. *J Med Chem* **52**, 5999-6011 (2009).
287. Ramkissoon, S.H., Patel, H.J., Taborga, M. & Rameshwar, P. G protein-coupled receptors in haematopoietic disruption. *Expert Opin Biol Ther* **6**, 109-20 (2006).
288. Williams, R., Zou, X. & Hoyle, G.W. Tachykinin-1 receptor stimulates proinflammatory gene expression in lung epithelial cells through activation of NF-kappaB via a G(q)-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, L430-7 (2007).
289. Corcoran, K.E. & Rameshwar, P. Nuclear factor-kappaB accounts for the repressor effects of high stromal cell-derived factor-1alpha levels on Tac1 expression in nontumorigenic breast cells. *Mol Cancer Res* **5**, 373-81 (2007).
290. Janelsins, B.M. *et al.* Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood* **113**, 3017-26 (2009).
291. Klassert, T.E., Patel, S.A. & Rameshwar, P. Tachykinins and Neurokinin Receptors in Bone Marrow Functions: Neural-Hematopoietic Link. *J Receptor Ligand Channel Res* **2010**, 51-61 (2010).

292. Cocchiara, R. *et al.* Inhibitory effect of neuraminidase on SP-induced histamine release and TNF-alpha mRNA in rat mast cells: evidence of a receptor-independent mechanism. *J Neuroimmunol* **75**, 9-18 (1997).
293. Grant, A.D., Akhtar, R., Gerard, N.P. & Brain, S.D. Neurokinin B induces oedema formation in mouse lung via tachykinin receptor-independent mechanisms. *J Physiol* **543**, 1007-14 (2002).
294. Kroegel, C., Giembycz, M.A. & Barnes, P.J. Characterization of eosinophil cell activation by peptides. Differential effects of substance P, melittin, and FMET-Leu-Phe. *J Immunol* **145**, 2581-7 (1990).
295. Jeurissen, F. *et al.* Monocytes express a non-neurokinin substance P receptor that is functionally coupled to MAP kinase. *J Immunol* **152**, 2987-94 (1994).
296. Kavelaars, A. *et al.* Activation of human monocytes via a non-neurokinin substance P receptor that is coupled to Gi protein, calcium, phospholipase D, MAP kinase, and IL-6 production. *J Immunol* **153**, 3691-9 (1994).
297. Columbo, M., Horowitz, E.M., Kagey-Sobotka, A. & Lichtenstein, L.M. Substance P activates the release of histamine from human skin mast cells through a pertussis toxin-sensitive and protein kinase C-dependent mechanism. *Clin Immunol Immunopathol* **81**, 68-73 (1996).
298. Mousli, M., Bueb, J.L., Bronner, C., Rouot, B. & Landry, Y. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 358-62 (1990).
299. Holzer, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* **24**, 739-68 (1988).
300. Maggi, C.A. & Meli, A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol* **19**, 1-43 (1988).
301. Linnik, M.D. & Moskowitz, M.A. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides* **10**, 957-62 (1989).
302. Pinto, F.M. *et al.* mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol* **494**, 233-9 (2004).
303. Aliakbari, J., Sreedharan, S.P., Turck, C.W. & Goetzl, E.J. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* **148**, 1440-5 (1987).
304. Ho, W.Z., Lai, J.P., Zhu, X.H., Uvaydova, M. & Douglas, S.D. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* **159**, 5654-60 (1997).
305. Lai, J.P., Douglas, S.D., Rappaport, E., Wu, J.M. & Ho, W.Z. Identification of a delta isoform of preprotachykinin mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes. *J Neuroimmunol* **91**, 121-8 (1998).
306. Lambrecht, B.N. *et al.* Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. *Eur J Immunol* **29**, 3815-25 (1999).
307. Page, N.M. *et al.* Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* **405**, 797-800 (2000).
308. Griebel, G. Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacol Ther* **82**, 1-61 (1999).
309. Kramer, M.S. *et al.* Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* **281**, 1640-5 (1998).
310. Mantyh, P.W. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry* **63 Suppl 11**, 6-10 (2002).
311. Massi, M., Panocka, I. & de Caro, G. The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. *Peptides* **21**, 1597-609 (2000).
312. Liu, H., Sankar, R., Shin, D.H., Mazarati, A.M. & Wasterlain, C.G. Patterns of status epilepticus-induced substance P expression during development. *Neuroscience* **101**, 297-304 (2000).
313. Rioux, L. & Joyce, J.N. Substance P receptors are differentially affected in Parkinson's and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **6**, 199-210 (1993).
314. Stumm, R., Culmsee, C., Schafer, M.K., Kriegelstein, J. & Weihe, E. Adaptive plasticity in tachykinin and tachykinin receptor expression after focal cerebral ischemia is differentially linked to gabaergic and glutamatergic cerebrocortical circuits and cerebrovenular endothelium. *J Neurosci* **21**, 798-811 (2001).

315. Vink, R., Nimmo, A.J. & Cernak, I. An overview of new and novel pharmacotherapies for use in traumatic brain injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 919-21 (2001).
316. Greco, S.J., Corcoran, K.E., Cho, K.J. & Rameshwar, P. Tachykinins in the emerging immune system: relevance to bone marrow homeostasis and maintenance of hematopoietic stem cells. *Front Biosci* **9**, 1782-93 (2004).
317. Lecci, A., Altamura, M., Capriati, A. & Maggi, C.A. Tachykinin receptors and gastrointestinal motility: focus on humans. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **12 Suppl 1**, 69-80 (2008).
318. Rameshwar, P., Ganea, D. & Gascon, P. In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. *Blood* **81**, 391-8 (1993).
319. Rameshwar, P. & Gascon, P. Induction of negative hematopoietic regulators by neurokinin-A in bone marrow stroma. *Blood* **88**, 98-106 (1996).
320. Jancso, N., Jancso-Gabor, A. & Szolcsanyi, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* **31**, 138-51 (1967).
321. Lembeck, F. & Holzer, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **310**, 175-83 (1979).
322. Mantyh, P.W. *et al.* Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* **278**, 275-9 (1997).
323. O'Connor, T.M. *et al.* The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* **201**, 167-80 (2004).
324. Cao, Y.Q. *et al.* Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* **392**, 390-4 (1998).
325. De Felipe, C. *et al.* Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* **392**, 394-7 (1998).
326. Julia, V., Morteau, O. & Bueno, L. Involvement of neurokinin 1 and 2 receptors in viscerosensitive response to rectal distension in rats. *Gastroenterology* **107**, 94-102 (1994).
327. Kamp, E.H., Beck, D.R. & Gebhart, G.F. Combinations of neurokinin receptor antagonists reduce visceral hyperalgesia. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 105-13 (2001).
328. Margolis, K.G. & Gershon, M.D. Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* **25**, 503-11 (2009).
329. Shimizu, Y., Matsuyama, H., Shiina, T., Takewaki, T. & Furness, J.B. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci* **65**, 295-311 (2008).
330. Candenas, L. *et al.* Tachykinins and tachykinin receptors: effects in the genitourinary tract. *Life Sci* **76**, 835-62 (2005).
331. Patacchini, R. & Maggi, C.A. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Eur J Pharmacol* **429**, 13-21 (2001).
332. Debeljuk, L. & Lasaga, M. Modulation of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and the pineal gland by neurokinin A, neuropeptide K and neuropeptide gamma. *Peptides* **20**, 285-99 (1999).
333. Kerdelhue, B. *et al.* Variations in plasma levels of substance P and effects of a specific substance P antagonist of the NK(1) receptor on preovulatory LH and FSH surges and progesterone secretion in the cycling cynomolgus monkey. *Neuroendocrinology* **71**, 228-36 (2000).
334. Kerdelhue, B., Lenoir, V., Scholler, R. & Jones, H.W., Jr. Substance P plasma concentration during the LH preovulatory surge of the menstrual cycle in the human. *Neuro Endocrinol Lett* **27**, 359-64 (2006).
335. Hidalgo-Diaz, C. *et al.* Role of Ca<sup>2+</sup> in the secretory and biosynthetic response of porcine gonadotropes to substance P and gonadotropin-releasing hormone. *Regul Pept* **116**, 43-52 (2003).
336. Fernandez, C., Debeljuk, L., Diaz, E. & Diaz, B. Age differences in neurokinin A and substance P from the hypothalamus, pituitary, pineal gland, and striatum of the rat. Effect of exogenous melatonin. *Peptides* **23**, 941-5 (2002).
337. Debeljuk, L. Tachykinins in the normal and gonadotropin-stimulated ovary of the mouse. *Peptides* **24**, 1445-8 (2003).
338. Traurig, H., Saria, A. & Lembeck, F. Substance P in primary afferent neurons of the female rat reproductive system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **326**, 343-6 (1984).
339. Chiwakata, C. *et al.* Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology* **128**, 2441-8 (1991).

340. Lowry, P.J. Has the mechanism by which the endocrine placenta scavenges the mother whilst sparing the foetus been unmasked? *J Mol Endocrinol* **31**, 341-7 (2003).
341. Patak, E. *et al.* Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br J Pharmacol* **139**, 523-32 (2003).
342. Pintado, C.O. *et al.* A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol Reprod* **69**, 940-6 (2003).
343. Sastry, B.V., Janson, V.E. & Owens, L.K. Significance of substance P- and enkephalin-peptide systems in the male genital tract. *Ann N Y Acad Sci* **632**, 339-53 (1991).
344. Ravina, C.G. *et al.* A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Hum Reprod* **22**, 1617-25 (2007).
345. Pinto, F.M. *et al.* Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. *Reprod Biol Endocrinol* **8**, 104 (2010).
346. Ortega, H.H., Lorente, J.A., Mira, G.A., Baravalle, C. & Salvetti, N.R. Constant light exposure causes dissociation in gonadotrophin secretion and inhibits partially neuroendocrine differentiation of Leydig cells in adult rats. *Reprod Domest Anim* **39**, 417-23 (2004).
347. Ortega, H.H., Salvetti, N.R., Baravalle, C., Lorente, J.A. & Mira, G.A. Oestradiol induced inhibition of neuroendocrine marker expression in Leydig cells of adult rats. *Reprod Domest Anim* **41**, 204-9 (2006).
348. Vazquez Moreno, N., Debeljuk, L., Diaz Rodriguez, E., Fernandez Alvarez, C. & Diaz Lopez, B. Seasonal changes of SP and NKA in frontal cortex, striatum and testes in the rat. Role of maternal pineal gland. *Peptides* **25**, 997-1004 (2004).
349. Duval, P., Lenoir, V. & Kerdelhue, B. Ovarian steroid modulation of neurokinin contents in hypothalamus, pituitary, trigeminal nucleus, and cervical spinal cord of the ovariectomized female rat. *J Neuroendocrinol* **10**, 823-8 (1998).
350. Debeljuk, L., Rao, J.N. & Bartke, A. Tachykinins and their possible modulatory role on testicular function: a review. *Int J Androl* **26**, 202-10 (2003).
351. Alm, P. *et al.* Peptidergic (substance P) nerves in the genito-urinary tract. *Neuroscience* **3**, 419-25 (1978).
352. Angelova, P., Davidoff, M., Kanchev, L. & Baleva-Ivanova, K. Substance P: immunocytochemical localization and biological role in hamster gonads during ontogenesis. *Funct Dev Morphol* **1**, 3-8 (1991).
353. Barad, D.H., Ryan, K.J., Elkind-Hirsch, K. & Makris, A. Immunoreactive substance P in the human ovary. *Am J Obstet Gynecol* **159**, 242-6 (1988).
354. Ojeda, S.R., Costa, M.E., Katz, K.H. & Hersh, L.B. Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. I. Biochemical and physiologic studies. *Biol Reprod* **33**, 286-95 (1985).
355. Dees, W.L., Kozlowski, G.P., Dey, R. & Ojeda, S.R. Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. II. Immunocytochemical localization. *Biol Reprod* **33**, 471-6 (1985).
356. Debeljuk, L. Tachykinins and ovarian function in mammals. *Peptides* **27**, 736-42 (2006).
357. Patak, E. *et al.* Functional and molecular characterization of tachykinins and tachykinin receptors in the mouse uterus. *Biol Reprod* **72**, 1125-33 (2005).
358. Pinto, F.M., Pintado, C.O., Pennefather, J.N., Patak, E. & Candenias, L. Ovarian steroids regulate tachykinin and tachykinin receptor gene expression in the mouse uterus. *Reprod Biol Endocrinol* **7**, 77 (2009).
359. Marzioni, D. *et al.* Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 2378-83 (2005).
360. Brownbill, P. *et al.* Neurokinin B is a paracrine vasodilator in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 2164-70 (2003).
361. Shimada, S. *et al.* Coexistence of substance P- and enkephalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. *Brain Res* **425**, 256-62 (1987).
362. Shults, C.W., Quirion, R., Chronwall, B., Chase, T.N. & O'Donohue, T.L. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides* **5**, 1097-128 (1984).
363. Chigr, F. *et al.* Anatomical distribution of substance P-immunoreactive neurons in human brainstem during the first postnatal year. *Brain Res Bull* **26**, 515-23 (1991).
364. Emson, P.C., Cuello, A.C., Paxinos, G., Jessell, T. & Iversen, L.L. The origin of substance P and acetylcholine projections to the ventral tegmental area and interpeduncular nucleus in the rat. *Acta Physiol Scand Suppl* **452**, 43-6 (1977).

365. Emson, P.C., Jessell, T., Paxinos, G. & Cuello, A.C. Substance P in the amygdaloid complex, bed nucleus and stria terminalis of the rat brain. *Brain Res* **149**, 97-105 (1978).
366. Cuello, A.C. & Kanazawa, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **178**, 129-56 (1978).
367. Hokfelt, T., Fuxe, K. & Goldstein, M. Applications of immunohistochemistry to studies on monoamine cell systems with special reference to nervous tissues. *Ann N Y Acad Sci* **254**, 407-32 (1975).
368. Hokfelt, T., Ljungdahl, A., Terenius, L., Elde, R. & Nilsson, G. Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3081-5 (1977).
369. Ljungdahl, A., Hokfelt, T. & Nilsson, G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* **3**, 861-943 (1978).
370. Ljungdahl, A., Hokfelt, T., Nilsson, G. & Goldstein, M. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--II. Light microscopic localization in relation to catecholamine-containing neurons. *Neuroscience* **3**, 945-76 (1978).
371. Pernow, B. Substance P. *Pharmacol Rev* **35**, 85-141 (1983).
372. Hamid, Q. *et al.* Localization of beta pre-protachykinin mRNA in nodose ganglion. *Neuropeptides* **20**, 145-50 (1991).
373. Kiyama, H. *et al.* Demonstration of rat preprotachykinin A mRNA in the rat trigeminal ganglion by in situ hybridization histochemistry. *J Chem Neuroanat* **1**, 125-32 (1988).
374. Lee, Y. *et al.* Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. *Brain Res* **330**, 194-6 (1985).
375. Lee, Y. *et al.* Distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with reference to its coexistence with substance P. *Neuroscience* **15**, 1227-37 (1985).
376. Sternini, C., Su, D., Gamp, P.D. & Bunnett, N.W. Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* **358**, 531-40 (1995).
377. Cuello, A.C., Del Fiacco, M. & Paxinos, G. The central and peripheral ends of the substance P-containing sensory neurones in the rat trigeminal system. *Brain Res* **152**, 499-500 (1978).
378. Jessop, D.S., Chowdrey, H.S., Biswas, S. & Lightman, S.L. Substance P and substance K in the rat hypothalamus following monosodium glutamate lesions of the arcuate nucleus. *Neuropeptides* **18**, 165-70 (1991).
379. Villanua, M.A., Debeljuk, L., Ghosh, P.K. & Bartke, A. Effects of neonatal administration of monosodium glutamate and castration on neurokinin A levels in the hypothalamus and anterior pituitary of rats. *Peptides* **13**, 377-81 (1992).
380. Buck, S.H., Helke, C.J., Burcher, E., Shults, C.W. & O'Donohue, T.L. Pharmacologic characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. *Peptides* **7**, 1109-20 (1986).
381. Magoul, R., Onteniente, B., Benjelloun, W. & Tramu, G. Tachykinergic afferents to the rat arcuate nucleus. A combined immunohistochemical and retrograde tracing study. *Peptides* **14**, 275-86 (1993).
382. Magoul, R., Dubourg, P., Kah, O. & Tramu, G. Tachykinergic synaptic inputs to neurons of the medial preoptic region which project to the rat arcuate nucleus. *Neuroscience letters* **169**, 149-153 (1994).
383. Tsuruo, Y., Hisano, S., Nakanishi, J., Katoh, S. & Daikoku, S. Immunohistochemical studies on the roles of substance P in the rat hypothalamus: possible implication in the hypothalamic-hypophysial-gonadal axis. *Neuroendocrinology* **45**, 389-401 (1987).
384. Brown, E.R., Harlan, R.E. & Krause, J.E. Gonadal steroid regulation of substance P (SP) and SP-encoding messenger ribonucleic acids in the rat anterior pituitary and hypothalamus. *Endocrinology* **126**, 330-40 (1990).
385. Larsen, P.J. Distribution of substance P-immunoreactive elements in the preoptic area and the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* **316**, 287-313 (1992).
386. Elde, R., Schalling, M., Ceccatelli, S., Nakanishi, S. & Hokfelt, T. Localization of neuropeptide receptor mRNA in rat brain: initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci Lett* **120**, 134-8 (1990).

387. Gerfen, C.R. Substance P (neurokinin-1) receptor mRNA is selectively expressed in cholinergic neurons in the striatum and basal forebrain. *Brain Res* **556**, 165-70 (1991).
388. Maeno, H., Kiyama, H. & Tohyama, M. Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* **18**, 43-58 (1993).
389. Matute, C., Wahle, P., Gutierrez-Igarza, K. & Albus, K. Distribution of neurons expressing substance P receptor messenger RNA in immature and adult cat visual cortex. *Exp Brain Res* **97**, 295-300 (1993).
390. Mick, G., Maeno, H., Kiyama, H. & Tohyama, M. Marginal topography of neurons expressing the substance P receptor in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* **21**, 157-61 (1994).
391. Yao, R., Rameshwar, P., Donnelly, R.J. & Siegel, A. Neurokinin-1 expression and co-localization with glutamate and GABA in the hypothalamus of the cat. *Brain Res Mol Brain Res* **71**, 149-58 (1999).
392. Nakaya, Y., Kaneko, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S. & Mizuno, N. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* **347**, 249-74 (1994).
393. Burnet, P.W. & Harrison, P.J. Substance P (NK1) receptors in the cingulate cortex in unipolar and bipolar mood disorder and schizophrenia. *Biol Psychiatry* **47**, 80-3 (2000).
394. Kowall, N.W. *et al.* Substance P and substance P receptor histochemistry in human neurodegenerative diseases. *Regul Pept* **46**, 174-85 (1993).
395. Mounir, S. & Parent, A. The expression of neurokinin-1 receptor at striatal and pallidal levels in normal human brain. *Neurosci Res* **44**, 71-81 (2002).
396. Parent, A., Cicchetti, F. & Beach, T.G. Striatal neurones displaying substance P (NK1) receptor immunoreactivity in human and non-human primates. *Neuroreport* **6**, 721-4 (1995).
397. Piggins, H.D., Samuels, R.E., Coogan, A.N. & Cutler, D.J. Distribution of substance P and neurokinin-1 receptor immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflet of hamster, mouse, and rat. *J Comp Neurol* **438**, 50-65 (2001).
398. Yip, J. & Chahl, L.A. Localization of NK1 and NK3 receptors in guinea-pig brain. *Regul Pept* **98**, 55-62 (2001).
399. Tooney, P.A., Au, G.G. & Chahl, L.A. Localisation of tachykinin NK1 and NK3 receptors in the human prefrontal and visual cortex. *Neurosci Lett* **283**, 185-8 (2000).
400. Mantyh, P.W., Gates, T., Mantyh, C.R. & Maggio, J.E. Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J Neurosci* **9**, 258-79 (1989).
401. Tsuchida, K., Shigemoto, R., Yokota, Y. & Nakanishi, S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. *Eur J Biochem* **193**, 751-7 (1990).
402. Dam, T.V., Escher, E. & Quirion, R. Evidence for the existence of three classes of neurokinin receptors in brain. Differential ontogeny of neurokinin-1, neurokinin-2 and neurokinin-3 binding sites in rat cerebral cortex. *Brain Res* **453**, 372-6 (1988).
403. Hagan, R.M. *et al.* Characterisation, CNS distribution and function of NK2 receptors studied using potent NK2 receptor antagonists. *Regul Pept* **46**, 9-19 (1993).
404. Poesch, M.S., Goebel, D.J. & Bannon, M.J. Distribution of neurokinin receptor gene expression in the rat brain. Vol. 17 806 (1991).
405. Jessop, D.S., Chowdrey, H.S. & Lightman, S.L. Substance P and substance K in the median eminence and paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuropeptides* **17**, 135-40 (1990).
406. Rance, N.E. & Young, W.S., 3rd. Hypertrophy and increased gene expression of neurons containing neurokinin-B and substance-P messenger ribonucleic acids in the hypothalami of postmenopausal women. *Endocrinology* **128**, 2239-47 (1991).
407. Rance, N.E. & Bruce, T.R. Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* **60**, 337-45 (1994).
408. Guran, T. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 3633-9 (2009).
409. Bonner, T.I., Affolter, H.U., Young, A.C. & Young, W.S., 3rd. A cDNA encoding the precursor of the rat neuropeptide, neurokinin B. *Brain Res* **388**, 243-9 (1987).
410. Navarro, V.M. Interactions Between Kisspeptins and Neurokinin B. in *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology* (eds. Kauffman, A.S. & Smith, J.T.) 325-347 (2013).



411. Chawla, M.K., Gutierrez, G.M., Young, W.S., 3rd, McMullen, N.T. & Rance, N.E. Localization of neurons expressing substance P and neurokinin B gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. *J Comp Neurol* **384**, 429-42 (1997).
412. Marksteiner, J., Sperk, G. & Krause, J.E. Distribution of neurons expressing neurokinin B in the rat brain: immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Comp Neurol* **317**, 341-56 (1992).
413. Warden, M.K. & Young, W.S., 3rd. Distribution of cells containing mRNAs encoding substance P and neurokinin B in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **272**, 90-113 (1988).
414. Duarte, C.R., Schutz, B. & Zimmer, A. Incongruent pattern of neurokinin B expression in rat and mouse brains. *Cell Tissue Res* **323**, 43-51 (2006).
415. Burke, M.C., Letts, P.A., Krajewski, S.J. & Rance, N.E. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* **498**, 712-26 (2006).
416. Foradori, C.D., Amstalden, M., Goodman, R.L. & Lehman, M.N. Colocalisation of dynorphin a and neurokinin B immunoreactivity in the arcuate nucleus and median eminence of the sheep. *J Neuroendocrinol* **18**, 534-41 (2006).
417. Hrabovszky, E. *et al.* Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2**, 80 (2011).
418. Krajewski, S.J. *et al.* Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol* **489**, 372-86 (2005).
419. Krajewski, S.J., Burke, M.C., Anderson, M.J., McMullen, N.T. & Rance, N.E. Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience* **166**, 680-97 (2010).
420. Yeo, S.H. & Herbison, A.E. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology* **152**, 2387-99 (2011).
421. Herbison, A.E. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by Neil JD: Elsevier, p. 1415-1482. (2006).
422. Flück, G. Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. *Humana Press, Totowa, New Jersey*, 107-134.
423. Hrabovszky, E. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 2827-30 (2007).
424. Hrabovszky, E. *et al.* Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* **141**, 3506-9 (2000).
425. Danzer, S.C., Price, R.O., McMullen, N.T. & Rance, N.E. Sex steroid modulation of neurokinin B gene expression in the arcuate nucleus of adult male rats. *Brain Res Mol Brain Res* **66**, 200-4 (1999).
426. Dellovade, T.L. & Merchenthaler, I. Estrogen regulation of neurokinin B gene expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor alpha. *Endocrinology* **145**, 736-42 (2004).
427. Eghlidi, D.H., Haley, G.E., Noriega, N.C., Kohama, S.G. & Urbanski, H.F. Influence of age and 17beta-estradiol on kisspeptin, neurokinin B, and prodynorphin gene expression in the arcuate-median eminence of female rhesus macaques. *Endocrinology* **151**, 3783-94 (2010).
428. Goubillon, M.L. *et al.* Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology* **141**, 4218-25 (2000).
429. Ciofi, P., Lapirot, O.C. & Tramu, G. An androgen-dependent sexual dimorphism visible at puberty in the rat hypothalamus. *Neuroscience* **146**, 630-42 (2007).
430. Ciofi, P., Leroy, D. & Tramu, G. Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience* **141**, 1731-45 (2006).
431. Kauffman, A.S., Navarro, V.M., Kim, J., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Sex differences in the regulation of Kiss1/NKB neurons in juvenile mice: implications for the timing of puberty. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E1212-21 (2009).
432. Rance, N.E., Krajewski, S.J., Smith, M.A., Cholanian, M. & Dacks, P.A. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res* **1364**, 116-28 (2010).

433. Billings, H.J. *et al.* Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* **151**, 3836-46 (2010).
434. Navarro, V.M. *et al.* Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* **152**, 4265-75 (2011).
435. True, C., Kirigiti, M., Ciofi, P., Grove, K.L. & Smith, M.S. Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol* **23**, 52-64 (2011).
436. Corander, M.P. *et al.* The effects of neurokinin B upon gonadotrophin release in male rodents. *J Neuroendocrinol* **22**, 181-7 (2010).
437. Yang, J.J., Caligioni, C.S., Chan, Y.M. & Seminara, S.B. Uncovering novel reproductive defects in neurokinin B receptor null mice: closing the gap between mice and men. *Endocrinology* **153**, 1498-508 (2012).
438. Francou, B. *et al.* Normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism due to TAC3/TACR3 mutations: characterization of neuroendocrine phenotypes and novel mutations. *PLoS One* **6**, e25614 (2011).
439. Ciccone, N.A., Xu, S., Lacza, C.T., Carroll, R.S. & Kaiser, U.B. Frequency-dependent regulation of follicle-stimulating hormone beta by pulsatile gonadotropin-releasing hormone is mediated by functional antagonism of bZIP transcription factors. *Mol Cell Biol* **30**, 1028-40 (2010).
440. Marshall, J.C. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res* **47**, 155-87; discussion 188-9 (1991).
441. Garcia-Galiano, D. *et al.* Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. *Endocrinology* **153**, 316-28 (2012).
442. Ramaswamy, S., Seminara, S.B. & Plant, T.M. Evidence from the agonadal juvenile male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) for the view that the action of neurokinin B to trigger gonadotropin-releasing hormone release is upstream from the kisspeptin receptor. *Neuroendocrinology* **94**, 237-45 (2011).
443. Kinsey-Jones, J.S. *et al.* The inhibitory effects of neurokinin B on GnRH pulse generator frequency in the female rat. *Endocrinology* **153**, 307-15 (2012).
444. Guerriero, K.A., Keen, K.L. & Terasawa, E. Developmental increase in kisspeptin-54 release in vivo is independent of the pubertal increase in estradiol in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* **153**, 1887-97 (2012).
445. Keen, K.L., Wegner, F.H., Bloom, S.R., Ghatei, M.A. & Terasawa, E. 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**, 4151-7 (2008).
446. Takase, K. *et al.* Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats. *J Neuroendocrinol* **21**, 527-37 (2009).
447. Gore, A.C. *et al.* EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* **36**, E1-E150 (2015).
448. Nadal, A., Quesada, I., Tuduri, E., Nogueiras, R. & Alonso-Magdalena, P. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. *Nat Rev Endocrinol* **13**, 536-546 (2017).
449. Mimoto, M.S., Nadal, A. & Sargis, R.M. Polluted Pathways: Mechanisms of Metabolic Disruption by Endocrine Disrupting Chemicals. *Curr Environ Health Rep* **4**, 208-222 (2017).
450. Waring, R.H. & Harris, R.M. Endocrine disruptors: a human risk? *Mol Cell Endocrinol* **244**, 2-9 (2005).
451. Tabb, M.M. & Blumberg, B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol* **20**, 475-82 (2006).
452. Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M. & Skinner, M.K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* **308**, 1466-9 (2005).
453. Leffers, H. *et al.* Increased expression of alpha- and beta-globin mRNAs at the pituitary following exposure to estrogen during the critical period of neonatal sex differentiation in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* **99**, 33-43 (2006).
454. Toppari, J. *et al.* Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* **104 Suppl 4**, 741-803 (1996).
455. Ivell, R. & Hartung, S. The molecular basis of cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* **9**, 175-81 (2003).
456. Axmon, A. Menarche in women with high exposure to persistent organochlorine pollutants in utero and during childhood. *Environ Res* **102**, 77-82 (2006).

457. Denham, M. *et al.* Relationship of lead, mercury, mirex, dichlorodipenyldichloroethylene, hexachlorobenzene, and polychlorinated biphenyls to timing of menarche among Akwesasne Mohawk girls. *Pediatrics* **115**, e127-34 (2005).
458. Ibarluzea Jm, J. *et al.* Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes Control* **15**, 591-600 (2004).
459. Gore, A.C. Reproductive neuroendocrine targets of developmental exposure to endocrine disruptors. In: *Endocrine Disruptors and Puberty*, edited by Humana Press, c/o Springer Science+Business Media, New York, USA., 49-117 (2012).
460. Vinas, P., Lopez-Garcia, I., Campillo, N., Rivas, R.E. & Hernandez-Cordoba, M. Ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry using the Taguchi design method for bisphenol migration studies from thermal printer paper, toys and baby utensils. *Anal Bioanal Chem* **404**, 671-8 (2012).
461. Rubin, B.S. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* **127**, 27-34 (2011).
462. Welshons, W.V., Nagel, S.C. & vom Saal, F.S. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* **147**, S56-69 (2006).
463. Dodds, E.C., Lawson, W. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* **137 (3476):996**(1936).
464. Hunt, P.A. *et al.* Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* **13**, 546-53 (2003).
465. Rubin, B.S., Murray, M.K., Damassa, D.A., King, J.C. & Soto, A.M. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* **109**, 675-80 (2001).
466. Patisaul, H.B., Todd, K.L., Mickens, J.A. & Adewale, H.B. Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. *Neurotoxicology* **30**, 350-7 (2009).
467. Nikaido, Y. *et al.* Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol* **18**, 803-11 (2004).
468. Fernandez, M., Bianchi, M., Lux-Lantos, V. & Libertun, C. Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environ Health Perspect* **117**, 757-62 (2009).
469. Adewale, H.B., Jefferson, W.N., Newbold, R.R. & Patisaul, H.B. Neonatal bisphenol-a exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod* **81**, 690-9 (2009).
470. Honma, S. *et al.* Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol* **16**, 117-22 (2002).
471. Savabieasfahani, M., Kannan, K., Astapova, O., Evans, N.P. & Padmanabhan, V. Developmental programming: differential effects of prenatal exposure to bisphenol-A or methoxychlor on reproductive function. *Endocrinology* **147**, 5956-66 (2006).
472. Ryan, B.C., Hotchkiss, A.K., Crofton, K.M. & Gray, L.E., Jr. In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats. *Toxicol Sci* **114**, 133-48 (2010).
473. Durmaz, E. *et al.* Urinary bisphenol a levels in girls with idiopathic central precocious puberty. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* **6**, 16-21 (2014).
474. McGuinn, L.A., Ghazarian, A.A., Joseph Su, L. & Ellison, G.L. Urinary bisphenol A and age at menarche among adolescent girls: evidence from NHANES 2003-2010. *Environ Res* **136**, 381-6 (2015).
475. Bulus, A.D. *et al.* The evaluation of possible role of endocrine disruptors in central and peripheral precocious puberty. *Toxicol Mech Methods* **26**, 493-500 (2016).
476. Lee, S.H. *et al.* Changes in steroid metabolism among girls with precocious puberty may not be associated with urinary levels of bisphenol A. *Reprod Toxicol* **44**, 1-6 (2014).
477. Nah, W.H., Park, M.J. & Gye, M.C. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clin Exp Reprod Med* **38**, 75-81 (2011).

478. Franssen, D. *et al.* Delayed Neuroendocrine Sexual Maturation in Female Rats After a Very Low Dose of Bisphenol A Through Altered GABAergic Neurotransmission and Opposing Effects of a High Dose. *Endocrinology* **157**, 1740-50 (2016).
479. Losa, S.M. *et al.* Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reprod Toxicol* **31**, 280-9 (2011).
480. Naule, L. *et al.* Neuroendocrine and behavioral effects of maternal exposure to oral bisphenol A in female mice. *J Endocrinol* **220**, 375-88 (2014).
481. Castellano, J.M. & Tena-Sempere, M. Animal Modeling of Early Programming and Disruption of Pubertal Maturation. *Endocr Dev* **29**, 87-121 (2016).
482. Clarkson, J., Boon, W.C., Simpson, E.R. & Herbison, A.E. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* **150**, 3214-20 (2009).
483. Gianetti, E. *et al.* TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 2857-67 (2010).
484. Roa, J., Navarro, V.M. & Tena-Sempere, M. Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments. *Biol Reprod* **85**, 650-60 (2011).
485. Pineda, R. *et al.* Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* **151**, 722-30 (2010).
486. Castellano, J.M., Bentsen, A.H., Mikkelsen, J.D. & Tena-Sempere, M. Kisspeptins: bridging energy homeostasis and reproduction. *Brain Res* **1364**, 129-38 (2010).
487. Hill, J.W., Elmquist, J.K. & Elias, C.F. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E827-32 (2008).
488. Castellano, J.M. *et al.* Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* **146**, 3917-25 (2005).
489. Tovar, S. *et al.* Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology* **147**, 2696-704 (2006).
490. Navarro, V.M. *et al.* Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *J Neurosci* **32**, 2388-97 (2012).
491. Ruiz-Pino, F. *et al.* Neurokinin B and the control of the gonadotropic axis in the rat: developmental changes, sexual dimorphism, and regulation by gonadal steroids. *Endocrinology* **153**, 4818-29 (2012).
492. Kalra, P.S., Sahu, A., Bonavera, J.J. & Kalra, S.P. Diverse effects of tachykinins on luteinizing hormone release in male rats: mechanism of action. *Endocrinology* **131**, 1195-201 (1992).
493. Sahu, A. & Kalra, S.P. Effects of tachykinins on luteinizing hormone release in female rats: potent inhibitory action of neuropeptide K. *Endocrinology* **130**, 1571-7 (1992).
494. de Croft, S., Boehm, U. & Herbison, A.E. Neurokinin B activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse. *Endocrinology* **154**, 2750-60 (2013).
495. Grachev, P. *et al.* Suppression of the GnRH pulse generator by neurokinin B involves a kappa-opioid receptor-dependent mechanism. *Endocrinology* **153**, 4894-904 (2012).
496. Ruka, K.A., Burger, L.L. & Moenter, S.M. Regulation of arcuate neurons coexpressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin by modulators of neurokinin 3 and kappa-opioid receptors in adult male mice. *Endocrinology* **154**, 2761-71 (2013).
497. Gill, J.C. *et al.* Increased neurokinin B (Tac2) expression in the mouse arcuate nucleus is an early marker of pubertal onset with differential sensitivity to sex steroid-negative feedback than Kiss1. *Endocrinology* **153**, 4883-93 (2012).
498. Navarro, V.M. & Tena-Sempere, M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol* **8**, 40-53 (2011).
499. Nakahara, T. *et al.* Chronic peripheral administration of kappa-opioid receptor antagonist advances puberty onset associated with acceleration of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *J Reprod Dev* **59**, 479-84 (2013).
500. Herbison, A.E. Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. in *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (ed. Third Edition edited by Jimmy D. Neill, E.) (2006).

501. Navarro, V.M. *et al.* Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* **150**, 2359-67 (2009).
502. Cheng, G., Coolen, L.M., Padmanabhan, V., Goodman, R.L. & Lehman, M.N. The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology* **151**, 301-11 (2010).
503. Young, J. *et al.* Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications. *Neuroendocrinology* **97**, 193-202 (2013).
504. Pillon, D., Caraty, A., Fabre-Nys, C. & Bruneau, G. Short-term effect of oestradiol on neurokinin B mRNA expression in the infundibular nucleus of ewes. *J Neuroendocrinol* **15**, 749-53 (2003).
505. Gottsch, M.L. *et al.* Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J Neurosci* **29**, 9390-5 (2009).