

# Kisspeptina en becerras prepúberes: I. Influencia de la edad en la respuesta de LH, FSH y GH a kisspeptina-10 y su asociación con IGF-I, leptina y estradiol

## Kisspeptin in prepubertal heifers. I Effects of age on the response of LH, FSH and GH to kisspeptin-10 and its association with IGF-I, leptin and estradiol

Mónica Alamilla Rodríguez<sup>a</sup>, René Carlos Calderón Robles<sup>b</sup>, Jorge Víctor Rosete Fernández<sup>b</sup>, Karla Rodríguez Hernández<sup>c</sup>, Héctor Raymundo Vera Ávila<sup>d</sup>, Jesús Alejandro Arreguín Arévalo<sup>e</sup>, Terry M. Nett<sup>e</sup>, Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar<sup>f</sup>, Everardo González Padilla<sup>f</sup>, Margarita Gómez-Chavarín<sup>g</sup>, Alejandro Villa Godoy<sup>a\*</sup>

### RESUMEN

El objetivo fue evaluar la respuesta de LH, FSH y GH a kisspeptina-10 (KISS) en becerras prepúberes de distintas edades, y su asociación con IGF-I, E2 y leptina circulantes. A 21 becerras de 4, 7 y 11 meses de edad se les aplicó una inyección i.v. de 5 µg de KISS/kg de peso. En suero obtenido de la yugular (cada 15 min, 4 h pre hasta 4 h post-KISS) se cuantificó LH, FSH y GH. En nueve muestras (tres pre y seis post-KISS) se determinó IGF-I, leptina y estradiol (E2). En todas las becerras aumentó la LH post-KISS, con un valor máximo (6.1±1.3<sup>a</sup>, 7.2±1.3<sup>a</sup>, 11.6±1.3<sup>b</sup> ng/ml) y duración de respuesta (64.3±20<sup>a</sup>, 92±20<sup>b</sup>, 132.9±20<sup>c</sup> min) que aumentó ( $P<0.05$ ) con la edad. Para FSH, 71.4, 100 y 100 % de las becerras de 4, 7 y 11 meses respondieron a KISS-10; situación que para GH fue 71.4, 85.7 y 100 %, respectivamente. La magnitud de la respuesta de FSH y GH a KISS fue similar entre edades. Las becerras de 11 meses tuvieron las máximas concentraciones de IGF-I y E2 y las menores de leptina. Se concluye que KISS-10 evoca un aumento de LH en becerras de 4 a 11 meses, cuya magnitud de respuesta se asocia con la edad, con el incremento en sangre periférica de IGF-I y E2 y con la disminución de leptina sérica; en contraste, la respuesta de GH y FSH a KISS-10 no es afectada por la edad ni por las variaciones en IGF-I, E2 y leptina.

**PALABRAS CLAVE:** Kisspeptina, Becerras prepúberes, LH, FSH, GH.

### ABSTRACT

To evaluate effects of age on the response of LH, FSH and GH to kisspeptin-10 (KISS) in prepubertal heifers and its association with circulating levels of IGF-I, estradiol (E2) and leptin, 21 heifer calves that were 4, 7 or 11 mo old, received an iv injection of KISS (5 µg/kg). LH, FSH and GH were quantified in blood serum taken every 15 min (4 h pre- and 4 h post-KISS-10). In three pre- and six post-KISS samples, IGF-I, leptin and E2 were determined. All heifers responded to KISS with an LH increment but the response magnitude differed among groups since maximum value was higher ( $P<0.05$ ) in 11 mo (11.6±1.3 ng/ml) than in 7 mo (7.2±1.3 ng/ml) and 4 mo (6.1±1.3 ng/ml) old calves. Duration of response differed ( $P<0.05$ ) among ages (11 mo=132.9±20 min<sup>a</sup>; 7 mo=92±20 min<sup>a,b</sup>; 4 mo=64.3±20 min<sup>b</sup>). For FSH, all and 11 mo calves responded to KISS but only 71.4 % of 4 mo did. In GH, 71.4 % of 4 mo and 85.7 % of 7 mo calves responded to KISS whereas 100 % of 11 mo animals responded. FSH and GH did not differ among age groups. The 11 mo heifers had the highest IGF-I and E2 but the lowest leptin levels. In conclusion, KISS evokes LH increments in all calves 4 to 11 mo old, but the response increases with age in association with high circulating IGF-I and E2 and low leptin. The response of FSH and GH to KISS is not influenced by age or variations in circulating IGF-I, E2 or leptin.

**KEY WORDS:** Kisspeptin, Prepubertal heifers, LH, FSH, GH.

Recibido el 16 de febrero de 2016. Aceptado el 21 de junio de 2016.

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Circuito Exterior S/N, Edificio 2, Cubículo 2314, Tel. 52 55 56 22 59 80. Ciudad Universitaria, 04510, Coyoacán, Ciudad de México, México. <sup>b</sup> Sitio Experimental Las Margaritas, INIFAP, Hueytamalco, Puebla, México. <sup>c</sup> Campo Experimental La Laguna, INIFAP, Matamoros, Coahuila, México. <sup>d</sup> CENID Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP. Querétaro, México. <sup>e</sup> Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA. <sup>f</sup> Departamento de Reproducción, FMVZ, UNAM. Coyoacán, Ciudad de México, México. <sup>g</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, México.

\*Autor de correspondencia: [aavillagodoy@gmail.com](mailto:aavillagodoy@gmail.com)

## INTRODUCCIÓN

En las hembras bovinas, la presentación temprana de la pubertad tiene especial importancia en la fertilidad<sup>(1,2)</sup> y productividad de por vida<sup>(3)</sup>. En los sistemas de producción de carne y leche de bovino en el trópico, las vaquillas presentan la pubertad tardíamente y por ello tienen su primer parto entre los tres y cuatro años de edad<sup>(4)</sup>, cuando el ideal zootécnico desde el punto de vista de productividad es de aproximadamente dos años<sup>(5)</sup>. La tardía edad y bajo peso al primer parto de las vaquillas de trópico, determinan una baja producción de becerros y de leche durante su vida<sup>(6)</sup>. Consecuentemente es importante conocer los mecanismos fisiológicos reguladores de la pubertad y los factores que los afectan, lo cual potencialmente conducirá al desarrollo de nuevas estrategias de manejo para reducir la edad a la pubertad de las vaquillas, mejorar la eficiencia reproductiva y la rentabilidad de las unidades de producción ganadera.

Se ha establecido<sup>(7)</sup> que la pubertad es precedida por un incremento progresivo en la secreción pulsátil de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), siendo este cambio el componente clave de control para iniciar la pubertad<sup>(8)</sup>. Varios grupos de investigadores señalan a la kisspeptina como el elemento estimulador preponderante que gobierna la actividad de las neuronas productoras de GnRH<sup>(9)</sup>. A su vez, la kisspeptina es el principal intermediario entre las sustancias señaladoras de origen somático y ambiental que modulan la función reproductiva y las neuronas productoras de GnRH, determinando tanto la liberación tónica como la secreción fásica de las gonadotropinas hipofisarias<sup>(10)</sup>.

La kisspeptina (KISS) o kisspeptinas es una familia de péptidos que, según el número de aminoácidos, son denominados como: KISS-54, -14, -13 y -10<sup>(11)</sup>. Algunos autores<sup>(11,12)</sup> consideran a las neuronas productoras de KISS como integradoras de señales que actúan modulando el tono de operación de los ejes somatotrópico y gonadal. En ratas<sup>(12)</sup> y cerdas prepúberes<sup>(13)</sup>, la concentración sérica de la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) aumentan de seis a ocho veces, simulando una oleada preovulatoria de dichas

gonadotropinas, en respuesta a una aplicación de KISS-10. En ratas prepúberes<sup>(14)</sup>, la inyección del péptido provoca un aumento en la LH sérica que varía con la edad. En becerras de siete meses de edad, una aplicación de KISS-10 (5 µg/kg) evoca un aumento en la LH y hormona del crecimiento (GH) circulantes<sup>(15)</sup>. En contraste, en becerras de cinco meses<sup>(16)</sup> de edad la misma dosis de KISS-10 no altera la liberación de GH pero induce la liberación de LH y de FSH, esta última no estudiada en las becerras de 7 meses<sup>(15)</sup>; por tanto se desconoce si la KISS puede o no estimular la liberación de LH en becerras prepúberes mayores de 7 o menores de 5 meses de edad. Asimismo, se ignora si la liberación de FSH y GH posterior a la administración de KISS puede ser diferente en becerras prepúberes de edad variable dentro de este rango, de menor o de mayor edad. La edad a la pubertad está estrechamente asociada con el peso<sup>(17,18)</sup> y la composición corporal<sup>(19)</sup>; sin embargo, las concentraciones sanguíneas de metabolitos y hormonas relacionados con estas variables presentan interacciones complejas<sup>(17,19,20)</sup>, por lo que las señales de origen metabólico que conducen hacia el inicio de la pubertad no se conocen con exactitud. El factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I)<sup>(19,20)</sup> y la leptina<sup>(21)</sup> aumentan en sangre periférica antes de la pubertad, pero su perfil de liberación con relación al inicio de la misma difiere<sup>(22,23)</sup>. El IGF-I circulante<sup>(19)</sup> aumenta antes que la leptina<sup>(23)</sup> durante las etapas de crecimiento acelerado de los animales y la deposición de grasa en el tejido adiposo<sup>(19,21,22)</sup> que anteceden el inicio de la pubertad. Tanto el IGF-I<sup>(23)</sup> como la leptina<sup>(24)</sup>, señalan el estado nutricional y el grado de madurez de los individuos y ejercen varias funciones en la actividad reproductiva. Los ovarios también participan en el proceso de la pubertad, ya que se observa un incremento prepuberal simultáneo en la frecuencia de pulsos de LH, el diámetro del folículo ovárico dominante y las concentraciones circulantes de E2<sup>(25,26)</sup>. Por lo anterior, el tema central del presente trabajo fue evaluar el efecto de la edad en becerras prepúberes sobre el patrón de liberación de LH, FSH y GH en respuesta a la KISS-10 exógena. La hipótesis de trabajo fue que una aplicación intravenosa de KISS-10 a becerras prepúberes induce un aumento de LH, FSH y GH cuyas características varían con la edad de

los animales y sus concentraciones circulantes de E2, IGF-I y leptina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Animales y manejo general*

Los procedimientos aplicados fueron aprobados por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (Programa de Posgrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM). Se utilizaron 21 becerras de raza Holstein y Suizo Pardo, las cuales se alojaron individualmente en corrales de 2.5 x 4.5 m, con piso de cemento, área techada (2.5 x 2.7 m), comederos y bebederos. Para la adaptación al manejo, las becerras se introdujeron a los corrales un mes antes del experimento. La alimentación consistió en forraje picado a libertad (heno de avena; 95 % MS, 6.5 % PC y 2.42 Mcal de EM/kg), 4 kg de concentrado proteínico (93.8 % MS, 16.53 % PC y 2.43 Mcal de EM/kg) y sales minerales y agua a libertad. Los animales se asignaron de acuerdo con su edad a tres grupos homogéneos desde el punto de vista de la raza: 4 meses ( $4.8 \pm 0.15$  meses; media $\pm$ ee); 7 meses ( $7.5 \pm 0.15$  meses) y 11 meses ( $11.4 \pm 0.15$  meses). Un día antes del experimento, el peso corporal promedio de los animales en los grupos de 4, 7 y 11 meses de edad fue  $106.3 \pm 6.7$ ,  $114.3 \pm 6.7$  y  $139.4 \pm 6.7$  kg respectivamente; mientras que la condición corporal fue, en el mismo orden de  $2.2 \pm 0.2$ ,  $2.3 \pm 0.20$  y  $2.3 \pm 0.20$ , en una escala del 1 al 5<sup>(27)</sup>.

El día del experimento, a cada becerro se le aplicó un bolo i.v. de 5  $\mu$ g de KISS-10 (3.75 nmol) por kilo de peso corporal. En el presente estudio se usó KISS-10 bovina (YNWNSFGLRY-NH2; Proimmune, Oxford, UK) diluida en solución salina fisiológica (1:125) y administrada i.v. a través de un catéter insertado en una de las venas yugulares. Antes de cateterizar, la zona peri-yugular fue rasurada y se aplicó analgesia en un área de 5x5 cm (lidocaína al 2%, 2 mg/cm<sup>2</sup>). El catéter fue utilizado para el muestreo sanguíneo que se describe posteriormente.

### *Muestras y mediciones*

Durante el mes previo a la aplicación de KISS-10, se tomaron muestras de sangre cada tercer día por punción de la vena coccígea para comprobar la

condición anovulatoria de las becerras (progesterona sérica <1 ng/ml). El día de la administración de KISS-10, a través de la cánula se tomaron muestras de sangre cada 15 min durante 8 h, cuatro previas y cuatro posteriores a la aplicación de KISS-10. En el suero de las muestras obtenidas cada 15 min se determinaron las concentraciones de LH, FSH y GH, y en el suero obtenido de muestras de sangre tomadas antes (muestras 1, 2 y 3) y después de la aplicación de KISS-10 (muestras 18 a 20 y 26 a 28), se cuantificaron E2, leptina e IGF-I.

### *Análisis de laboratorio*

La progesterona se determinó mediante estuches de radioinmunoanálisis (RIA; Coat a Count, Diagnostic Product Corporation, DPC, Los Ángeles, CA, EUA); la sensibilidad fue de 0.02 ng/ml, con un coeficiente de variación (CV) intraensayo de 6.15 %. La leptina se cuantificó mediante estuches multiespecies (RIA, Linco Research Inc. Sigma, St. Louis, MO, EUA); en dos ensayos, la sensibilidad fue de 1.0 ng/ml y el CV interensayo e intraensayo fue de 6.93 % y 2.63 % respectivamente. El IGF-I se determinó mediante estuches comerciales (ELISA, Alpco Immunoassays, Salem, NH, EUA); en dos ensayos la sensibilidad fue de 0.9 ng/ml, mientras que el CV intraensayo fue de 3.66 % e interensayo de 3.79 %. Las concentraciones de E2 se determinaron mediante RIA con un antisuero altamente específico para E2-17 $\beta$ , marcado con <sup>125</sup>I, previamente descrito<sup>(28)</sup>; su sensibilidad fue de 0.21 pg/ml y el CV intraensayo de 9.18 %. LH, FSH y GH se cuantificaron por RIA; los procedimientos fueron validados y descritos anteriormente<sup>(29,30,31)</sup>. En tres ensayos de LH, el límite mínimo y máximo fue de 0.27 ng/ml y 57.91 ng/ml; los valores medios de los controles bajo, medio y alto fueron respectivamente de 2.3, 14.55 y 33.88 ng/ml; mientras que los correspondientes CV fueron: intraensayo de 5.31, 1.07 y 8.10 %, e interensayo de 9.64, 6.56 y 8.70 %. En el caso de FSH la sensibilidad fue de 0.0479 ng/ml, el CV intraensayo fue de 6.34 % y el CV interensayo de 10.12 %. En dos ensayos de GH el límite mínimo y máximo fue de 1.6 y 87.42 ng/ml respectivamente, mientras que los valores medios de los controles bajo y alto fueron respectivamente de 2.22 y 4.63 ng/ml; por su parte, los CV intraensayo fueron en el primer ensayo de 4.56 y 5.21 %, y en el segundo de 4.56 y 5.21 %.

mientras que en el segundo fueron de 3.67 y 4.38 %. Los CV interensayo fueron 10.31 y 9.45 %.

### **Variables de respuesta**

Para cada animal, se consideró como respuesta de LH, FSH y GH inducida por la administración de KISS-10, cuando al menos en dos muestras consecutivas la concentración hormonal posterior a KISS-10 fue mayor al promedio más dos desviaciones estándar (DE) de la concentración basal de la hormona, y que posteriormente, en al menos una muestra, la concentración de la hormona descendiera a valores similares a la media de la concentración basal más dos DE. La concentración basal para cada animal, fue la media de los tres valores hormonales más bajos del periodo de muestreo previo a la aplicación de KISS-10. Con relación al incremento de LH, FSH y GH inducido por KISS-10 se generaron dos variables: Duración de la respuesta (DUR) y valor máximo (VMAX). La DUR fue el periodo comprendido entre la primera muestra que excedió al promedio más dos DE de la concentración basal, y la primera muestra cuya concentración descendió a un valor menor o igual a la concentración basal. VMAX fue la concentración máxima de cada hormona durante el periodo posterior a la aplicación de KISS-10, dentro del segmento considerado como respuesta. Con respecto a IGF-I, leptina y E2, la variable de respuesta de cada una de ellas fue la media de la concentración obtenida en las nueve muestras analizadas.

### **Diseño y análisis estadísticos**

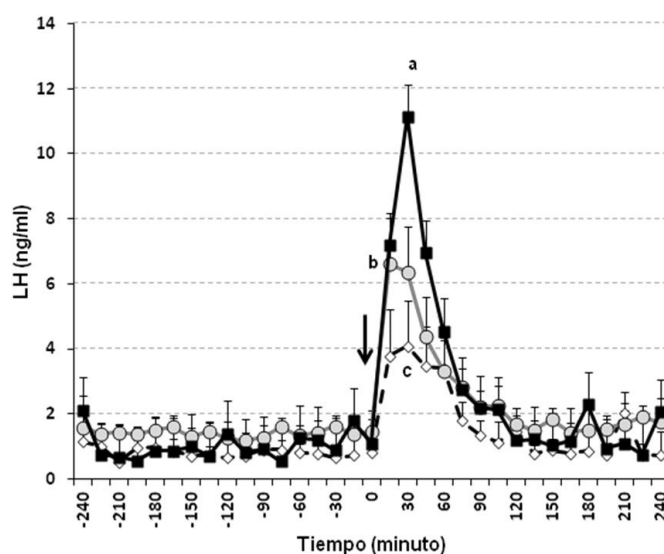
El diseño base fue un completamente al azar para modelos unifactoriales de efectos fijos (edad de las becerras). Para ello, de un total de 67 becerras bloqueadas por edad, se tomaron al azar siete de cada grupo (4, 7 y 11 meses), mismas que constituyeron la muestra experimental. Para el análisis del perfil de los datos provenientes de las muestras sanguíneas colectadas a intervalos de 15 min (LH, FSH y GH), se utilizó un ANDEVA para diseños de medidas repetidas en tiempo<sup>(32)</sup>; en este caso, el modelo estadístico incluyó los efectos de edad, muestra, periodo (pre y post KISS-10), sus

interacciones y el error experimental. La proporción de animales que mostró respuesta de LH, FSH y GH a KISS-10 se analizó mediante pruebas de tablas de contingencias ( $\chi^2$ ). Para los datos relacionados con la concentración media de IGF-I, leptina y E2, así como para VMAX y DUR del incremento de LH, FSH y GH, se utilizó un ANDEVA de una vía para modelos de efectos fijos<sup>(32)</sup>, en el cual se incluyó únicamente el efecto de edad de las becerras. La separación de medias se realizó por el procedimiento de medias de cuadrados mínimos (LSMEANS). Además, mediante el procedimiento CORR<sup>(32)</sup> se examinaron las correlaciones del VMAX de LH, FSH y GH determinados en los animales que respondieron a KISS-10, entre ellas y con el valor medio de las concentraciones de IGF-I, E2 y leptina, así como con la edad, peso corporal y CC de las becerras. También se determinó la correlación de IGF-I, E2 y leptina, entre ellas y con las variables de tipo zoométrico.

## **RESULTADOS**

Los niveles séricos de progesterona en todas las muestras colectadas durante el mes de adaptación fueron <1 ng/ml, indicando la condición prepuberal

Figura 1. Respuesta de LH (media  $\pm$  ee) en becerras de 4 (rombo blanco), 7 (círculo gris) y 11 (cuadro negro) meses de edad, a una aplicación intravenosa de KISS-10 (flecha; 5  $\mu$ g/kg)



a,b,c Distintas literales indican diferencia entre medias ( $P < 0.01$ ).

Cuadro 1. Valor máximo y duración de la respuesta de LH, FSH y GH (media ± ee) y proporción de becerras que respondieron a kisspeptina-10

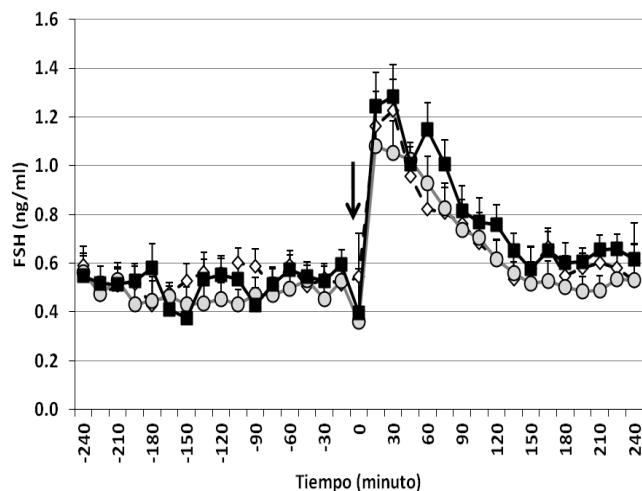
Hormona / Variable de Respuesta	Edad de las becerras (meses)		
	4	7	11
<b>LH</b>			
Animales con respuesta, %	100 (7/7)*	100 (7/7)	100 (7/7)
Valor máximo, ng/ml	6.10 ± 1.3 <sup>a</sup>	7.23 ± 1.3 <sup>b</sup>	11.62 ± 1.3 <sup>b</sup>
Duración, min	64.29 ± 20.05 <sup>c</sup>	92.14 ± 20.05 <sup>cd</sup>	132.86 ± 20.05 <sup>d</sup>
<b>FSH</b>			
Animales con respuesta, %	71.4 (5/7)	100 (7/7)	100 (7/7)
Valor máximo, ng/ml	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.3	2.0 ± 0.3
Duración, min	81.0 ± 23.4	85.7 ± 19.8	147.9 ± 19.8
<b>GH</b>			
Animales con respuesta, %	71.4 (5/7)	85.7 (6/7)	100 (7/7)
Valor máximo, ng/ml	28.6 ± 7.7	36.7 ± 7.0	36.83 ± 6.5
Duración, min	105.0 ± 29.7	87.5 ± 27.1	143.6 ± 25.1

\*En paréntesis (animales que respondieron/animales expuestos).

Distintas literales dentro de variable de respuesta indican diferencias entre grupos de edad (<sup>a,b</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>c,d</sup>  $P < 0.05$ ).

de todas las becerras del experimento. Así mismo, durante el periodo previo a la aplicación de KISS-10 las concentraciones séricas de las hormonas

Figura 2. Respuesta de FSH (media ± ee) en becerras de 4 (rombo blanco), 7 (círculo gris) y 11 (cuadro negro) meses de edad a una inyección intravenosa de KISS-10 (flecha; 5 µg/kg)

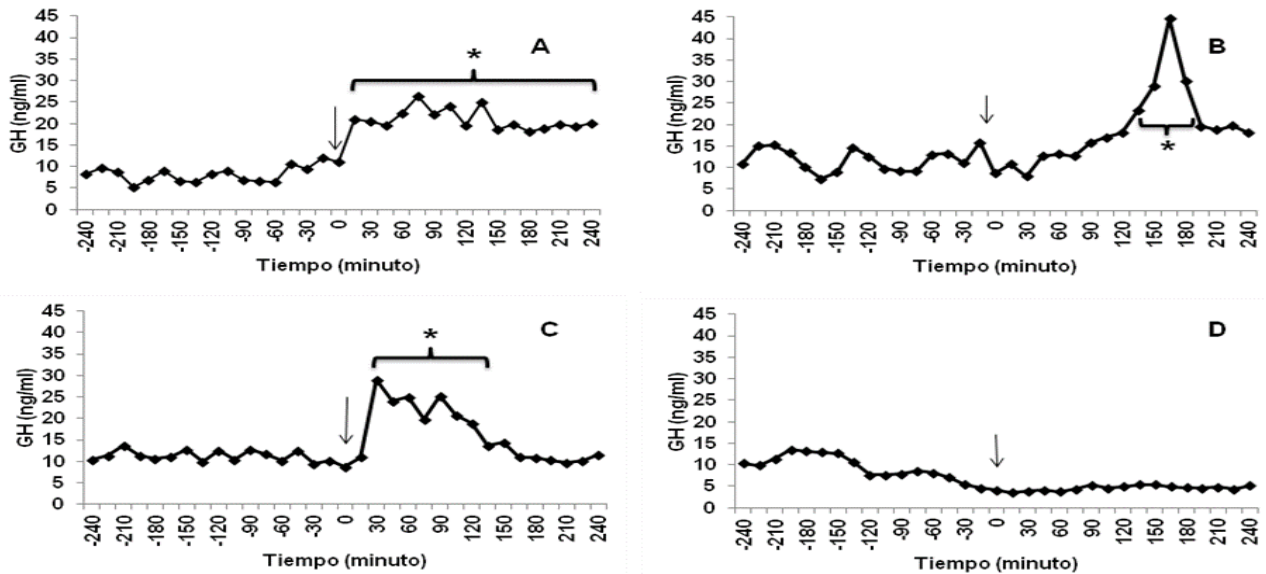


( $P > 0.05$ ).

estudiadas no difirieron entre los grupos de becerras de 4, 7 y 11 meses de edad ( $P > 0.05$ ). Todas las becerras respondieron a KISS-10 con un incremento de LH. Las concentraciones séricas promedio de LH (Figura 1) aumentaron ( $P < 0.01$ ) por efecto del tratamiento de KISS-10, independientemente de la edad de las becerras. Sin embargo, VMAX de LH fue mayor ( $P < 0.01$ ) en las becerras de 11 meses de edad (Figura 1; Cuadro 1); por su parte, la DUR de LH solo fue mayor ( $P < 0.05$ ) en los animales de 11 meses con respecto a los de 4 meses.

Con relación a FSH, 71.4, 100 y 100 % de las becerras de 4, 7 y 11 meses respectivamente, respondieron a KISS-10; situación que para GH fue 71.4, 85.7 y 100 %, respectivamente (Cuadro 1). No hubieron diferencias ( $P > 0.05$ ) adjudicables a la edad de los animales en ninguna de las características de la respuesta de FSH (Figura 2; Cuadro 1) y GH (Cuadro 1) a KISS-10. El patrón de FSH post KISS-10 fue similar al de LH, en el sentido de que en los animales donde se registró respuesta, ésta se inició dentro de la primera hora, y finalizó durante el transcurso de la segunda o tercer hora posterior a la aplicación del péptido. En cuanto a la respuesta de GH a KISS-10 (Figura 3), no se observó un patrón

Figura 3. Perfil de GH en becerras representativas de cuatro tipos de respuesta a una aplicación intravenosa de KISS-10 (flecha). A: respuesta durante la mayor parte del periodo posterior a KISS-10. B: respuesta tardía, registrada durante las últimas horas (2 a 4) del periodo post KISS-10. C: respuesta temprana, durante las primeras 2 horas post KISS-10. D: sin respuesta

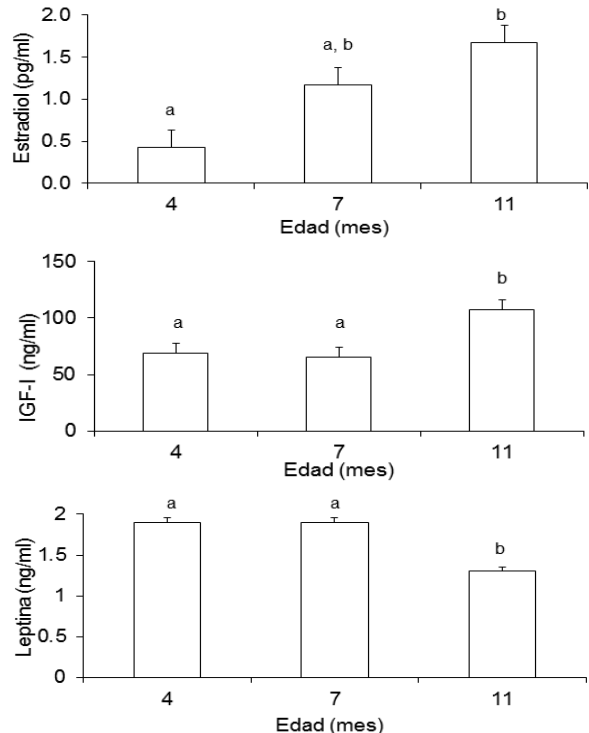


\* Difiere de la media de las muestras colectadas antes de la aplicación de KISS-10 ( $P < 0.05$ ).

definido de liberación como en el caso de las gonadotropinas. Al respecto, se observó que algunas becerras no respondieron (14.3 %), otras mostraron un incremento de GH durante todo el periodo de muestreo posterior a KISS-10 (9.5 %), unas más respondieron durante las primeras dos horas (23.8 %), mientras que otras becerras mostraron la respuesta durante las últimas dos horas de muestreo post KISS-10 (52.4 %).

Las concentraciones séricas de IGF-I (Figura 4) fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en las becerras de 11 meses; en cambio, los niveles de E2 fueron mayores ( $P < 0.05$ ) únicamente en las becerras de 11 con respecto a las de 4, pero no difirieron de las de 7 meses. Por su parte, los niveles séricos de leptina fueron menores en las becerras de 11 meses. Dentro de cada grupo de edad, las muestras de suero previas a KISS-10 no difirieron ( $P > 0.05$ ) de las colectadas después de la aplicación del péptido en cuanto a IGF-I, leptina y E2 se refiere. Los coeficientes de correlación (Cuadro 2) indicaron una asociación entre la edad y el peso ( $P < 0.05$ ), sin embargo la CC presentó una correlación positiva únicamente con el peso de las becerras ( $P < 0.01$ ) mas no con la edad. La VMAX de LH estuvo

Figura 4. Concentraciones de estradiol, IGF-I y leptina en suero (media  $\pm$  ee) de becerras prepúberes de diferentes edades. Para cada hormona, distintas literales indican diferencia entre medias ( $a, b P < 0.05$ )



Cuadro 2. Coeficientes de correlación entre los valores máximos de LH, FSH y GH registrados durante el periodo de respuesta a KISS-10, la edad de las becerras, las variables zoométricas y las concentraciones séricas de IGF-I, leptina y estradiol

Variable	Edad	Peso	Condición corporal	LH	FSH	GH	IGF-I	Leptina	Estradiol
Edad	1	0.454*	0.066	0.447*	0.236	0.105	0.006	-0.148	0.389*
Peso		1	0.707**	0.521*	0.131	0.137	0.614**	-0.327	0.655**
Condición corporal			1	0.147	-0.047	0.455*	0.556**	-0.014	0.307
LH				1	0.667**	0.211	-0.085	-0.116	0.399*
FSH					1	0.091	0.411*	-0.095	-0.185
GH						1	-0.001	0.322	-0.002
IGF-I							1	-0.323	0.533*
Leptina								1	-0.238
Estradiol									1

\* ( $P < 0.05$ ); \*\* ( $P < 0.01$ ).

correlacionada significativamente ( $P < 0.05$ ) con edad, peso, E2 y con VMAX de FSH ( $P < 0.01$ ). Por su parte, VMAX de FSH no se correlacionó ( $P > 0.05$ ) con ninguna de las variables analizadas, con excepción de la citada VMX de LH y con IGF-I ( $P < 0.05$ ), mientras que VMAX de GH solamente lo hizo con CC ( $P < 0.05$ ). Leptina no estuvo asociada ( $P > 0.05$ ) con ninguna de la variables examinadas. Por el contrario, IGF-I mostró una correlación con peso, CC ( $P < 0.01$ ) y VMAX de FSH ( $P < 0.05$ ), mientras que E2 se asoció con peso ( $P < 0.01$ ), edad, CC, VMAX de LH e IGF-I ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

El 100 % de las becerras respondió a la administración de KISS-10 con un incremento de LH, observación que no es posible comparar con datos derivados de investigaciones previas, ya que en los estudios efectuados en hembras prepúberes de ratas<sup>(33)</sup>, cerdas<sup>(13)</sup> y becerras<sup>(15,16)</sup>, no se indica la proporción de animales que respondió a KISS-10. En este trabajo, la magnitud de la respuesta de LH a KISS-10 difirió con la edad, lo que concuerda con datos generados en ratas<sup>(34)</sup>, ya que también en ellas la KISS induce una mayor liberación de LH cuando los animales están cercanos a la pubertad, sin un

aumento en la secreción de GnRH, observación que permite sugerir que el mecanismo mediante el cual las becerras de 11 meses son más sensibles a KISS que animales más jóvenes, podría deberse a un aumento en la expresión de los receptores de GnRH en los gonadotropos conforme se aproximan a la pubertad. Independientemente del mecanismo que determina el nivel de respuesta de LH a KISS-10, la información aquí producida indica que existen agentes señalizadores que cambian con la edad, modulando la respuesta a KISS-10; algunos de ellos podrían ser E2 e IGF-I, cuyas concentraciones circulantes fueron mayores en las becerras que mostraron la máxima respuesta de LH. Entre las evidencias que soportan la posible intervención de E2 se puede mencionar un trabajo realizado *in vivo*<sup>(35)</sup> en el que vacas ovariectomizadas, inyectadas con KISS-10 y E2, aumentaron las concentraciones plasmáticas de LH, en comparación con vacas en similar condición ovárica e inyectadas únicamente con el péptido. Otras evidencias a favor de esta idea fueron generadas en hembras de roedores y ovinos<sup>(36,37)</sup>, las cuales muestran que la acción de E2, es a través de sus receptores ER $\alpha$  presentes en las neuronas productoras de KISS encargadas de regular la liberación fásica de GnRH y consecuentemente de LH, lo que concuerda con los

datos presentados en este trabajo, que indican que la KISS-10 estimuló un incremento fásico de LH sin alterar su frecuencia de pulsos. Un mecanismo adicional del E2 podría ser a nivel de los gonadotropos, ya que en hembras adultas de ovinos, ratas y papiones, así como en becerros lactantes<sup>(9)</sup>, dichas células aumentan la liberación de LH en respuesta a KISS-10, al adicionar E2 al medio de cultivo. Lo anteriormente discutido permite sugerir la existencia de un mecanismo de interacción positiva entre E2 y KISS a tres niveles: en las neuronas productoras de KISS, en las neuronas productoras de GnRH y en los gonadotropos.

En cuanto a la posibilidad de que IGF-I funja como indicador de un ambiente metabólico favorable para el inicio de la pubertad en becerras, se ha documentado que en dichos animales aumenta el IGF-I circulante unos días antes o al momento de la primera ovulación<sup>(17,19)</sup>, mientras que en ratonas la administración de IGF-I adelanta la pubertad<sup>(38)</sup>. De manera similar a la propuesta para E2, la acción del IGF-I podría ser la de potenciar el efecto de la KISS-10 en la secreción fásica de LH, mas no en la secreción tónica, ya que existen evidencias de ello en primates no humanos<sup>(38)</sup>, en roedores<sup>(12)</sup> y en becerras prepúberes<sup>(39)</sup>. El IGF-I podría actuar en al menos dos niveles: directamente en las neuronas productoras de GnRH<sup>(40)</sup> y en los gonadotropos<sup>(41)</sup>. Los hallazgos de que el IGF-I circulante atraviesa la barrera hematoencefálica en ratas y que se acumula en el núcleo anteroventral-periventricular y la eminencia media<sup>(42)</sup>, le da significancia fisiológica a la acción del IGF-I en hipotálamo y adenohipófisis para modular la secreción fásica de LH inducida por KISS-10. Finalmente la mayor respuesta de LH a KISS-10 en becerras de 11 meses, pudo ser el resultado de una acción conjunta de IGF-I y E2, como fue demostrado en ratas prepúberes<sup>(43)</sup>.

Los datos aquí generados respecto a que los menores niveles de leptina se observaron en las becerras con la mayor respuesta de LH, así como la ausencia de correlación de leptina con las variables zoométricas y hormonales examinadas, resultaron sorprendentes en vista de reportes previos relacionados con los incrementos en leptina circulante observados al aproximarse la pubertad,

tanto en ratas<sup>(44)</sup> como en niñas<sup>(45)</sup> y becerras<sup>(46)</sup>. No obstante, concordando con nuestra observación, en un trabajo<sup>(47)</sup> se determinó que la leptina exógena no acelera la pubertad en becerras ni incrementa la secreción de LH espontánea o estimulada por GnRH exógena. En ése<sup>(47)</sup> y en otros estudios efectuados en bovinos y ovinos<sup>(48,49,50)</sup>, se propuso que la respuesta del eje gonadotrópico a leptina depende del estado metabólico de los animales, de su balance de energía o de la calidad y cantidad de alimentos que consumen. El presente trabajo se suma a aquéllos que ponen en duda la intervención de la leptina como modulador de los efectos de KISS en la pubertad. De hecho, en un estudio reciente, se informó que las becerras que presentaron una oleada preovulatoria de LH y la formación de un cuerpo lúteo en respuesta a KISS-10 fueron las que presentaron las menores concentraciones de leptina<sup>(39)</sup>.

No se registraron efectos de edad en la respuesta de FSH a KISS-10, quizá porque el patrón de liberación de esta hormona depende además de la GnRH, de la actividad de otros factores tales como la activina<sup>(51,52)</sup>, la inhibina y la folistatina<sup>(52,53)</sup>. Los datos aquí presentados permiten sugerir que el nivel de regulación de los factores antes citados sobre la pulsatilidad de FSH no varía entre los 4 y los 11 meses de edad, por lo que el efecto de KISS-10 en la secreción de FSH es similar en becerras prepúberes que se encuentran dentro de dicho rango. Lo anterior es apoyado por trabajos de análisis longitudinal en niñas, en las que se determinó la ausencia de variaciones consistentes o significativas en concentraciones séricas de inhibina, activina y folistatina<sup>(54)</sup>. Con respecto a la respuesta de GH a KISS-10, no se detectaron diferencias atribuibles a la edad. Al respecto, se ha documentado en niñas que las variaciones en cuanto a la tasa de crecimiento e inicio de la pubertad, se deben en parte a los efectos individuales de los estrógenos, la GH, el IGF-I y otros efectores no evaluados en el presente estudio, tales como el cortisol y las hormonas tiroideas<sup>(55)</sup>; así mismo se ha propuesto que además de las interacciones de IGF-I y E2, existe una acción permisiva<sup>(56)</sup> de la leptina para que la influencia de las demás hormonas involucradas en el inicio de la pubertad, ejerzan sus



acciones tanto independientes como conjuntas. También se ha observado que los niveles séricos de GH, IGF-I e insulina varían entre individuos prepúberes por influencia de su genética, de la dieta que reciben y su estado nutricional<sup>(55,56)</sup>. Con relación a la respuesta de GH a KISS-10 en animales prepúberes, en la literatura únicamente se encontraron tres trabajos: dos en becerras y uno en cerdas; en estas últimas, la KISS-10 no indujo un aumento de las concentraciones séricas de GH<sup>(13)</sup>; en cuanto a las becerras, los resultados son contrastantes, ya que mientras unos autores<sup>(15)</sup> demostraron una marcada respuesta de GH a las KISS-10, otros<sup>(16)</sup> no la detectaron; por lo tanto los resultados aquí obtenidos se suman a los reportados en becerras que respondieron a KISS-10, sin aportar elemento alguno que aclare por qué algunos animales responden y otros no. Como fue el caso de LH y FSH, aparentemente este es el primer trabajo donde se registra la proporción de hembras prepúberes que responden a KISS-10 con una respuesta de GH.

### CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La primera conclusión es que una aplicación i.v. de KISS-10 en la dosis empleada es suficiente para evocar un aumento significativo de LH en todas las becerras de 4 a 11 meses de edad; sin embargo, la magnitud de la respuesta de LH parece depender de otros agentes señalizadores que varían con la edad de las hembras bovinas prepúberes. Debido a que se registró una mayor concentración sérica de IGF-I y E2 en las becerras con mayor respuesta de LH, también se concluye que dichos elementos pueden ser algunos de los efectores implicados en la magnitud de respuesta de LH a la KISS-10. Otra conclusión es que ni la edad ni la variación en las concentraciones séricas de IGF-I, E2 y leptina están asociadas con la magnitud de respuesta de GH y FSH a KISS-10. Una implicación de los resultados del presente estudio, es que el uso potencial de KISS ya sea con fines terapéuticos o de manejo para resolver problemas asociados con anovulación o pubertad tardía en becerras, puede ser acompañando el tratamiento de KISS-10 con IGF-I, E2 o ambos, para incrementar la respuesta del eje gonadotrópico.

### AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, por los apoyos otorgados a través de los proyectos PAPIIT-IN205510 "Participación de la KISS en la pubertad en vaquillas" y PAPIIT-IN218814 "Estudio de los núcleos hipotalámicos kisspeptidérgicos durante el inicio de la pubertad en hembras bovinas". Así mismo a la Dra. Clara Murcia Mejía por la realización de los radioinmunoanálisis, al Dr. José Gerardo Perera Marín por su asesoría en el laboratorio y la iodación de LH y FSH; a la Dra. Susana Rojas Maya por los ensayos de ELISA. El trabajo de campo fue arduo y expresamos nuestra gratitud al personal del SE Las Margaritas.

### LITERATURA CITADA

1. Byerley DJ, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Short RE. Pregnancy rates of beef heifers bred either on pubertal or third estrus. *J Anim Sci* 1997;65:645-650.
2. Lin CY, McAllister AJ, Batra TR, Lee AJ, Roy GL, Vesely JA, *et al.* Effects of early and late breeding of heifers on multiple lactation performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 1988;71:2735-2743.
3. Perry GA. Harnessing basic knowledge of factors controlling puberty to improve synchronization of estrus and fertility of heifers. *J Anim Sci* 2012;90:1172-1182.
4. Mukasa-Mugerwa E. A review of reproductive performance of female *Bos indicus* (Zebu) cattle. FAO-ILCA Monograph No. 6, Chapter 4 Measures of reproductive performance 1989. <http://www.fao.org/Wairdocs/ILRI/x5442E/x5442e06.htm#4.1%20Age%20at%20first%20calving>. Consultado 17 Mar, 2016.
5. Hoffman PC. Optimum body size of Holstein replacement heifers. *J Anim Sci* 1997;75:836-845.
6. Deresz F, Jaume CM, de Carvalho MR, González CA. The effect of body weight at calving on milk production and reproductive performance of FriesianxZebu heifers. *Animal Production* 1987;45:325-333.
7. Terasawa EI, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocrine Rev* 2001;22:111-151.
8. Ebling FJP. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 2005;129:675-683.
9. Abbara A, Radnasabapathy R, Jayasena CN, Dhillon W. The effects of kisspeptin on gonadotropin release in non-human mammals. Chapter 4. In: Kauffman AS, Smith JT. Kisspeptine signaling in reproductive biology. New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer; 2013:429-434.
10. Smith JT. The role of kisspeptine and gonadotrophin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 2012;43:75-84.
11. Mead E, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer

- and the cardiovascular system. *British J Pharmacol* 2007;151:1143-1153.
12. Navarro VM, Tena-Sempere M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:40-53.
  13. Lents CA, Heidorn NL, Barb CR, Ford JJ. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction* 2008;135:879-887.
  14. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castaño JP, Malagón MM, Aguilar E, *et al.* Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endo* 2006;257:75-83.
  15. Kadokawa H, Matsui M, Hayashi K, Matsunaga N, Kawashima C, Shimizu T, *et al.* Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *J Endocrinol* 2008;196:331-334.
  16. Ezzat AA, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Yamashita T, Hirata TI, *et al.* Characteristics of the stimulatory effect of Kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *J Reprod Dev* 2009;55:650-654.
  17. Jones EJ, Armstrong JD, Harvey RW. Changes in metabolites, metabolic hormones, and luteinizing hormone before puberty in Angus, Bradford, Charolais and Simmental heifers. *J Anim Sci* 1991;60:1607-1615.
  18. Archbold H, Shaloo L, Kennedy E, Pierce KM, Buckley F. Influence of age, body weight and body condition score before mating start date on the pubertal rate of maiden Holstein-Friesian heifers and implications for subsequent cow performance and profitability. *Animal* 2012;6(07):1143-1151.
  19. Yelich JV, Wettemann RP, Marston TT, Spicer LJ. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. *Domest Anim Endocrinol* 1996;13:325-338.
  20. Velazquez MA, Spicer LJ, Wathes DC. The role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. *Domest Anim Endocrinol* 2008;35:325-342.
  21. Garcia MR, Amstalden M, Williams SW, Stanko RL, Morrison CD, Keisler DH, *et al.* Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. *J Anim Sci* 2002;80:2158-2167.
  22. León HV, Hernández-Cerón J, DH, Gutierrez, CG. Plasma concentrations of leptin, insulin-like growth factor-I, and insulin in relation to changes in body condition score in heifers. *J Anim Sci* 2004;82:445-451.
  23. Zulu VCh, Nakao T, Sawamuka Y. Insulin-growth like factor I as a possible hormonal mediator nutritional regulation of reproduction in cattle. *J Vet Med Sci* 2002;64(8):657-665.
  24. Zieba DA, Amstalden M, Maciel MN, Keisler DH, Raver N, Gertler A, Williams GL. Divergent effects of leptin on luteinizing hormone and insulin secretion are dose dependent. *Experimental Biol Med* 2003;228:325-333.
  25. Gasser CL, Burke CL, Mussard ML, Behlke EJ, Grum DE, Kinder JE, Day ML. Induction of precocious puberty in heifers II: Advanced ovarian follicular development. *J Anim Sci* 2006;84:2042-2049.
  26. Gasser CL, Grum DE, Mussard ML, Fluharty FL, Kinder JE, Day ML. Induction of precocious puberty in heifers I: Enhanced secretion of luteinizing hormone. *J Anim Sci* 2006;84:2035-2041.
  27. Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 1989;72:68-78.
  28. England BG, Niswender GD, Midgley AR. Radioimmunoassay of estradiol-17 $\beta$  without chromatography. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;38(1):42-50.
  29. Nett TM, Akbar AM, Plemister RD, Holst PA, Reichert JR, Niswender GD. Levels of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the Beagle bitch. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975;148:134-139.
  30. L'Hermite M, Niswender GD, Reichert Jr, LE, Midgley Jr, AR. Serum follicle-stimulating hormone in sheep as measured by radioimmunoassay. *Biol Reprod* 1972;6:325-332.
  31. Powell M, Keisler DH. A potential strategy for decreasing milk production in the ewe at weaning using a growth hormone release blocker. *J Anim Sci* 1995;73:1901-1905.
  32. SAS. Statistical Analysis System Institute. 2002 Inc, Cary, NC, USA.
  33. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, *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.
  34. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sánchez-Criado JE, *et al.* Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of kiss-1 peptide. *Endocrinol* 2004;145:4565-4574.
  35. Whitlock BK, Daniel JA, Wilborn RR, Rodning SP, Maxwell HS, Steele BP, Sartin JL. Interaction of estrogen and progesterone on kisspeptin-10-stimulated luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Neuroendocrinology* 2008;88:212-215.
  36. Clarkson J, Boon WC, Simpson RE, Herbison AE. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinol* 2009;150:3214-3220.
  37. Smith JT, Rao A, Pereira A, Caraty A, Millar RP, Clarke IJ. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin *in vivo*. *Endocrinol* 2008;149:1951-1959.
  38. DiVall SA, Williams TR, Carver SE, Koch L, Brüning JC, Kahn CR, Wondisford F, Radovick S, Wolfe A. Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. *J Clin Invest* 2010;120:2900-2909.
  39. Santos ER, Calderón RRC, Vera ARH, Perera-Marín G, Arreguín AJA, Nett TM, *et al.* Hormona luteinizante y actividad ovárica en respuesta a kisspeptina-10 y su asociación con IGF-1 y leptina en becerras pre-púberes. *Rev Mex Cienc Pecu* 2014;5(2):181-200.
  40. Hiney J.K, Srivastava V, Nyberg CL, Ojeda SR, Dees WL. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinol* 1996;137:3717-3727.
  41. Adam CL, Gadd TS, Findlay PA, Wathes DC. IGF-I stimulation of luteinizing hormone secretion, IGF-binding proteins (IGFBPs) and

- expression of mRNAs for IGFs, IGF receptors and IGFBPs in the ovine pituitary gland. *J Endocrinol* 2000;166:247-254.
42. Reinhardt RR, Bondy CA. Insulin-like growth factors cross the blood brain barrier. *Endocrinol* 1994;135:1753-1761.
  43. Hiney JK, Srivastava V, Dearth RK, Dees WL. Influence of estradiol on insulin-like growth factor-1-induced luteinizing hormone secretion. *Brain Res* 2004;1013:91-97.
  44. Nagatani S, Guthikonda P, Foster DL. Appearance of a nocturnal peak of leptin secretion in the pubertal rat. *Hormones Behav* 2000;37:345-352.
  45. Martos-Moreno GA, Barrios V, Soriano-Guillén L, Argente J. Relationship between adiponectin levels, acylated ghrelin levels, and short-term body mass index changes in children with diabetes mellitus type 1 at diagnosis and after insulin therapy. *Eur J Endocrinol* 2006;155:757-761.
  46. Garcia MR, Amstalden M, Morrison CD, Keisler DH, Williams GL. Age at puberty, total fat and conjugated linoleic acid content of carcass, and circulating metabolic hormones in beef heifers fed a diet high in linoleic acid beginning at four months of age. *J Anim Sci* 2003;81:261-268.
  47. Maciel MN, Zieba DA, Amstalden M, Keisler DH, Neves JP, Williams GL. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: Effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. *J Anim Sci* 2004;82:2930-2936.
  48. Zieba DA, Amstalden M, Williams GL. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domest Anim Endocrinol* 2005;29:166-185.
  49. Iqbal J, Pompolo S, Considine RV, Clarke IJ. Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine pituitary gland. *Endocrinol* 2000;141:1515-1520.
  50. Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH. Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domest Anim Endocrinol* 1997;14:119-128.
  51. Coss D, Mellon PL, Thackray VG. A FoxL in the Smad house activin regulation of FSH. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:562-568.
  52. Phillips JD. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domest Anim Endocrinol* 2005;28:1-16.
  53. Thackray VG, Mellon PL, Coss D. Hormones in synergy: Regulation of the pituitary gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol* 2010;314:92-203.
  54. Foster CM, Phillips DJ, Wyman T, Evans LW, Groome NP, Padmanabhan V. Changes in serum inhibin, activin and follistatin concentrations during puberty in girls. *Human Reprod* 2000;15(5):1052-1057.
  55. Rogol AD, Roemmich JN, Clark PA. Growth at Puberty. *J Adolesc Health* 2002;31:192-200.
  56. Cheung CC, Thornton JE, Nurani SD, Clifton DK, Steiner RA. A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse. *Neuroendocrinol* 2001;74:12-21.