

## **CONTROL NEUROENDOCRÍ DE L'INICI DE LA MADURESA SEXUAL EN ELS VERTEBRATS MITJANÇANT LA KISSPEPTINA I EL SEU RECEPTOR, AMB ESPECIAL ÈMFASI PEL QUE FA A LA SITUACIÓ EN ELS PEIXOS TELEOSTIS**

ALEJANDRO S. MECHALY, JORDI VIÑAS I FRANCESC PIFERRER

*Institut de Ciències del Mar, Consell Superior d'Investigacions Científiques.*

Adreça per a la correspondència: Francesc Piferrer. Institut de Ciències del Mar, Consell Superior d'Investigacions Científiques. Passeig Marítim, 37-49. 08003 Barcelona. Adreça electrònica: [piferrer@icm.csic.es](mailto:piferrer@icm.csic.es).

### **RESUM**

El recent descobriment de la kisspeptina (producte del gen *KISS1*), conjuntament amb el seu receptor (producte del gen *KISS1R*), i de la seva relació amb el control de l'inici de la maduresa sexual en tots els vertebrats, ha estat descrit com una de les troballes més rellevants de la biologia reproductiva en els últims anys. La kisspeptina té un efecte directe sobre l'hormona alliberadora de gonadotrofines, la qual desencadena una cascada hormonal que finalment acaba a les gònades amb la secreció dels esteroides sexuals, els quals provoquen la consegüent maduració de l'individu. En aquest treball s'explica el descobriment dels gens *KISS1* i *KISS1R*, l'estructura d'aquests gens i dels seus productes proteics, i es fa referència als mecanismes endocrins responsables tant de la regulació endògena com dels possibles factors externs que afecten el sistema kisspeptina-KISS1R. També, i amb especial èmfasi en els peixos teleostis, es discuteixen les possibles causes de les diferències i similituds trobades en l'expressió cerebral del sistema kisspeptina-KISS1R. Finalment, s'avaluen les perspectives futures en el camp del control de la reproducció mitjançant la manipulació del sistema kisspeptina-KISS1R.

**Paraules clau:** maduresa sexual, kisspeptina, KISS1R, GPR54, GnRH, teleostis.

## INVOLVEMENT OF KISSPEPTIN AND ITS RECEPTOR ON THE NEUROENDOCRINE CONTROL OF THE ONSET OF PUBERTY IN VERTEBRATES, WITH SPECIAL EMPHASIS ON THE SITUATION IN TELEOSTS

### SUMMARY

The discovery of kisspeptin (the product of the *KISS1* gene) together with its receptor (product of the *KISS1R* gene), and the relationship with the control of the onset of puberty in all vertebrates has been described as one of the most important findings in reproductive biology in the last years. Kisspeptin stimulates gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), initiating the hormonal cascade which ends in the gonads with the secretion of the sex steroids which, in turn, drive sexual maturation. This paper describes the origin and discovery of the *KISS1* and *KISS1R* genes, the structure of these genes as well as their protein products. The endocrine mechanisms and the exogenous factors affecting the kisspeptin-KISS1R complex are also discussed. Finally, we describe the multiple functions in relationship with this system in all vertebrates and discuss the differences and similarities regarding the neural expression of kisspeptin-KISS1R complex in several teleost fishes. Finally, the future perspectives in the field of the control reproduction by the manipulation of the kisspeptin-KISS1R complex are discussed.

**Key words:** puberty, kisspeptin, KISS1R, GPR54, GnRH, teleosts.

### LA KISSPEPTINA I EL SEU RECEPTOR (KISS1R). DESCOBRIMENT I IMPORTÀNCIA EN EL CONTROL DE LA MADURESA SEXUAL

L'inici de la maduresa sexual i les seves conseqüències fisiològiques representa una de les transformacions més importants que ocorren al llarg de la vida dels vertebrats i que, a més, comporta una gran complexitat pel que fa a la regulació endocrina. Durant aquest període se succeeixen una sèrie d'interaccions dinàmiques entre factors genètics i ambientals, que conclouen amb la transició d'un sistema reproductor immadur a un de madur. Aquest procés està controlat mitjançant l'acció seqüencial d'hormones que s'originen a l'hipotàlem i que tenen el seu efecte final a les gònades. En

els mamífers, en què el procés és més conegut, el control endocrí s'inicia amb la producció de l'hormona alliberadora de les gonadotrofines (GnRH). A continuació, la GnRH estimula la hipòfisi o glàndula pituitària, i provoca la secreció de les dues gonadotrofines: l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) i l'hormona luteïnitzant (LH). Aquestes gonadotrofines circulen pel sistema vascular fins a arribar a les gònades, les quals comencen a madurar un cop han rebut el senyal de les gonadotrofines a través de receptors de membrana específics. És en aquest darrer procés quan els esteroides sexuals tenen un paper molt important, ja que són els responsables de la maduració final de la gònada. Malgrat que tota aquesta cascada d'esdeveniments és relativament ben coneguda, encara existeixen molts aspectes desconeguts o que es coneixen parcialment.

Per exemple, un dels punts que ha centrat l'atenció els darrers anys ha estat el control neuroendocrí de la secreció de GnRH.

L'any 1996 es va aïllar en mamífers el gen anomenat *KISS1*. Inicialment es va considerar un gen tumoral a causa de la seva capacitat d'inhibir la metastasi en els melanomes. Per aquest motiu, en els estudis inicials la proteïna producte d'aquest gen es va anomenar *metastina* (Lee *et al.*, 1999). Paral·lelament, l'any 1999, en estudis duts a

terme en rates es va descobrir un nou receptor de membrana, orfe, associat a la proteïna G, que inicialment es va anomenar GPR54 (Lee *et al.*, 1999). No va ser sinó dos anys més tard que es va establir que el producte proteic del gen *KISS* era el lligand natural del receptor GPR54 (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001).

En estudis posteriors centrats en el receptor, es va descobrir que certes mutacions i delecions del gen eren responsables de la

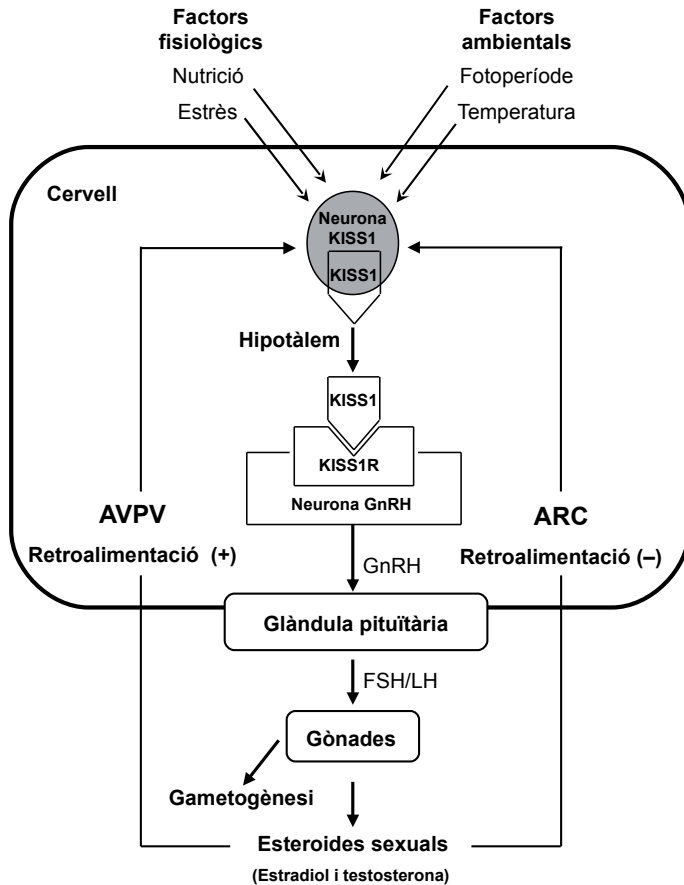


FIGURA 1. Esquema del mecanisme de regulació neuroendocrí del sistema kisspeptina (KISS1) a través del seu receptor (KISS1R) dins l'eix hipotàlem-pituitària-gonada (HPG). AVPV: nucli anteroventral periventricular; ARC: nucli arcuat de l'hipotàlem; GnRH: hormona alliberadora de les gonadotrofines; FSH: hormona foliculoestimulant; LH: hormona luteïnitzant.

condició anomenada *hipogonadisme hipogonadotrófic* (HH) en humans. Aquesta malaltia es caracteritza per la incapacitat de maduració sexual i, en conseqüència, provoca la infertilitat dels individus (Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). Un fenotip similar, d'insuficiència reproductora, també es va observar en ratolins després d'un experiment de desactivació del gen del receptor mitjançant la tècnica de genoanul·lació (*knockout*) (Funes *et al.*, 2003). A partir de les primeres proves que mostraven que aquest sistema no solament estava relacionat en metàstasi, la proteïna inicialment coneguda com a *metastina* va passar a anomenar-se, més genèricament, *kisspeptina*, i el nom del receptor es va canviar de GPR54 a KISS1R. Com s'ha vist, el nom *KISS1* es va establir amb anterioritat al fet que es conegués la relació d'aquest gen i el control de la pubertat (Roux *et al.*, 2003; Funes *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). Quant a l'etimologia del nom *KISS1*, el prefix *KI* fa referència a una coneguda marca de xocolata, Hershey Chocolate Kiss, originària del mateix lloc on treballaven els investigadors que van descobrir el gen. Les lletres *SS* fan referència a la *suppressor sequence*, en relació amb la primera funció coneguda del gen, i finalment el nombre 1 no és res més que una convenció en la nomenclatura (Smith *et al.*, 2006). A partir de la relació de *KISS1* amb l'inici de la pubertat, alguns el començaren a anomenar «el gen del primer petó», nom interpretable a partir de la traducció de l'anglès de l'acrònim *KISS1* (Smith *et al.*, 2006; Tena-Sempere, 2006).

L'efecte de mutacions del gen del receptor s'elimina amb l'administració exògena de GnRH (Seminara *et al.*, 2003). En les rates, injeccions intracerebrals de GnRH induïxen la secreció de LH (Matsui *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004a) i FSH (Navarro *et al.*, 2005). Estudis addicionals han confirmat l'importància del sistema kisspeptina-KISS1R

en la regulació de la GnRH, les gonadotrofines i el control endocrí de la pubertat (Seminara i Kaiser, 2005). Per exemple, l'efecte estimulador de la kisspeptina sobre la secreció de LH s'ha observat amb independència de la dosi, la ruta d'administració i l'estadi de desenvolupament de l'individu (Gottsch *et al.*, 2004; Irwig *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005). Fins i tot estudis recents han demostrat una resposta heteròloga. En amfibis, i concretament en la granota d'ungles (*Xenopus laevis*), l'administració de kisspeptina humana també provoca un augment en la secreció de gonadotrofines (Moon *et al.*, 2008). Un efecte similar s'ha observat en els peixos, en què l'administració de kisspeptina de mamífer induïx la producció de RNA missatger (mRNA) del gen de la GnRH (Filby *et al.*, 2008). Tots aquests estudis posen de manifest el paper clau de la kisspeptina i el seu receptor en la regulació de la pubertat (Elizur *et al.*, 2008). A més, aquesta funció de regulació de la reproducció no solament es dona en mamífers, sinó que està conservada al llarg de l'evolució dels vertebrats. Així, s'ha afirmat que el descobriment de la kisspeptina i del seu receptor és un dels avenços més rellevants en el camp de la biologia de la reproducció des de la caracterització de la GnRH en la dècada dels anys setanta (Messenger, 2005).

Com a característiques generals, l'expressió del gen *KISS1R* es localitza en el cervell anterior en les neurones hipotalàmiques responsables de la secreció de GnRH. Aquest fet indica que la kisspeptina, el gen del qual també s'expressa en el cervell, i principalment en l'hipotàlem i els ganglis de la base (Muir *et al.*, 2001), pot actuar directament sobre aquestes neurones. A més, el control neuroendocrí del sistema està lligat a l'expressió diferencial de la kisspeptina entre el nucli anteroventral periventricular (AVPV) i el nucli arcuat (ARC). En aquesta zona del cervell la kisspeptina esti-

mula l'alliberació de GnRH, que desencadena la cascada hormonal fins a les gònades, on es produeixen els esteroides sexuals i, finalment, la gametogènesi. Tot aquest cicle es completa amb una regulació per retroalimentació dels esteroides sexuals cap al cervell, amb una inhibició del gen *KISS1* en l'ARC o, també, amb una inducció del mateix gen en l'AVPV (vegeu la figura 1). També s'han destacat diversos factors externs o ambientals que sembla que influeixen en l'alliberació de kisspeptina en l'hipotàlem. Entre aquests es troben la temperatura, el fotoperíode, la nutrició i l'estrès (vegeu la figura 1). Cal destacar que tots aquests factors tenen un cert grau de relació amb l'aparició de la maduresa sexual.

## ESTRUCTURA DELS GENS I DE LES PROTEÏNES

En l'espècie humana, el gen *KISS1* s'estructura en quatre exons i tres introns, amb un total de 438 parells de bases (bp) en la regió codificadora (West *et al.*, 1998). El primer producte d'aquest gen és un precursor de neuropèptid de 145 aminoàcids anomenat KP-145. Aquesta preproteïna conté una seqüència senyal (aminoàcids 1 a 19), dos possibles llocs de clivatge (aminoàcids 57 i 67) i un lloc de clivatge terminal o aminació (aminoàcids 121 a 124) (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001) (vegeu la figura 2). Segons el lloc on es realitza la modificació proteolítica d'aquesta preproteïna, s'obtenen diferents pèptids, tots anomenats *kisspeptina*. El de major grandària conté cinquanta-quatre aminoàcids i s'anomena *kisspeptina-54* (KP-54). Aquest és el pèptid que originàriament es coneixia com a

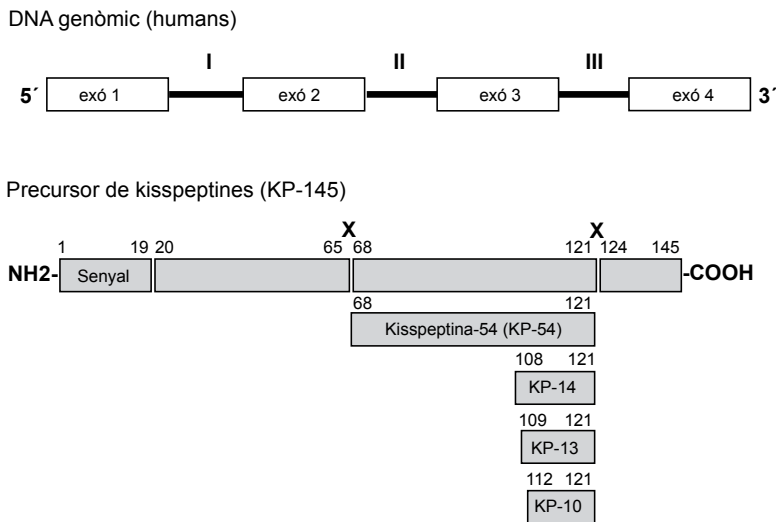


FIGURA 2. Organització de l'estructura gènica del gen de la kisspeptina (*KISS1*) en humans. Estructura del pèptid precursor (KP-145) i dels seus productes peptídics (KP-54, KP-14, KP-13 i KP-10). En gris es mostra la regió codificadora. Els aminoàcids de l'1 al 19 corresponen a la seqüència senyal i les X marquen els llocs de clivatge que originen les diferents kisspeptines (modificat de Tena-Sempere, 2006).

*metastina*. Altres pèptids producte d'aquestes modificacions del mateix precursor són la kisspeptina-14 (KP-14), la kisspeptina-13 (KP-13) i la kisspeptina-10 (KP-10) (Kotani *et al.*, 2001). La KP-10 correspon als últims deu aminoàcids de la KP-54, i sembla que són els més importants en l'activació del receptor KISS1R. Aquests deu aminoàcids estan altament conservats (Stafford *et al.*, 2002).

Per la seva importància en la regulació de la maduresa sexual, aquest gen és l'objectiu de molts estudis i s'està trobant cada dia en més espècies. Actualment, la seqüència de *KISS1* es coneix en algunes espècies de mamífers, com ara la rata (*Rattus norvegicus*) (NP\_859043), el ratolí (*Mus musculus*) (NP\_839991), els humans (*Homo sapiens*) (NP\_002247), el ximpanzé (*Pan troglodytes*) (XP\_514123), l'orangutan (*Pongo pygmaeus*) (AY706214), el macaco (*Macaca mulatta*) (XP\_001098284), el hamster siberià (*Phodopus sungorus*) (EU365872), l'ovella (*Ovis aries*) (DQ059506), la vaca (*Bos taurus*) (XP\_872566) i l'opòssum de cua grisa (*Monodelphis domestica*) (BK006296). La quantitat creixent de seqüències disponibles ha facilitat que darrerament s'hagi pogut clonar el gen *KISS1* en un amfibi, la granota d'ungles (*Xenopus tropicalis*) (BK006297). D'altra banda, mitjançant l'anàlisi bioinformàtica i de sintènia, també s'ha pogut clonar i localitzar en dues espècies de peixos teleostis que són espècies model: el *medaka*, un petit peix habitual als camps d'arròs de l'Orient (*Oryzias latipes*) (NM\_001122921) i el peix zebra (*Danio rerio*) (NP\_001106961) (Kanda *et al.*, 2008; Aerle *et al.*, 2008). Curiosament, en el peix zebra, i a diferència del que s'observa en humans, el gen *KISS1* només presenta dos exons i un intró. Aquests dos exons correspondrien als exons 3 i 4 d'aquest gen en els humans (Biran *et al.*, 2008). La major homologia de seqüència es troba en el segment que codifica la KP-10, i aquest és l'únic pèptid descrit fins ara en peixos (Biran *et*

*al.*, 2008). Un dels resultats recents més sorprenents ha estat el descobriment amb cercadors bioinformàtics d'un gen paràleg de la kisspeptina, el *KISS-2*, en el peix zebra i el *medaka*. Aquest fet ha permès que mitjançant una cerca en les seqüències genòmiques també s'identifiquessin *in silico* els dos gens paràlegs de les kisspeptines, el *KISS-1* i el *KISS-2*, en l'ornitorinc (*Ornithorhynchus anatinus*) i, curiosament, fins a tres gens en una única espècie com la granota d'ungles (*Xenopus tropicalis*) (Kitahashi *et al.*, 2008). Felip *et al.* (2008) han trobat recentment la duplicació gènica de la kisspeptina en una altra espècie de gran importància comercial com és el llobarro (*Dicentrarchus labrax*). Felip *et al.* (2008) han clonat els dos gens paràlegs de *KISS*, *KISS-1* i *KISS-2*, d'aquesta espècie, i també han demostrat que en assaigs amb administració de les dues kisspeptines en el llobarro, la *KISS-2* té molta més eficàcia que la *KISS-1* en provocar la secreció de FSH i LH, contràriament al que succeeix en rata, en què la *KISS-1* és la que presenta més eficàcia.

Pel que fa al gen del receptor, el *KISS1R*, la seva organització genòmica comprèn cinc exons i quatre introns (Clements *et al.*, 2001) (vegeu la figura 3). A diferència del gen de la kisspeptina, l'homologia de la seqüència codificadora és molt més elevada i en totes les espècies està al voltant d'uns 1.200 bp. Gràcies a aquesta gran homologia s'ha pogut identificar aquest gen en moltes espècies. Des del primer clonatge en rates (NP\_076482) l'any 1999 (Lee *et al.*, 1999), s'ha anat trobant successivament en l'espècie humana (*Homo sapiens*) (AAK83235), el ratolí (*Mus musculus*) (AAK83236), el porc (*Sus scrofa*) (ABE73453), el gos (*Canis lupus familiaris*) (XM\_850105) i el macaco (*Macaca mulatta*) (XP\_001117198). També s'ha caracteritzat en amfibis, com en la granota bramadora (*Rana catesbeiana*) (EU681171) i en diverses espècies de peixos teleostis,

com ara la tilàpia del Nil (*Oreochromis niloticus*) (BAD34454), la llissa (*Mugil cephalus*) (ABG76790), la còbia (*Rachycentron canadum*) (ABC75101), el reig del Brasil (*Micropogonias undulatus*) (DQ347412), el carpí de cap gros (*Pimephales promelas*) (EF672266), el llenguado senegalès (*Solea senegalensis*) (EU136710) i el peix zebra (*Danio rerio*) (ABV44612).

Fins ara, l'únic treball que ha confirmat la mateixa estructura gènica que la descrita en humans de cinc exons i quatre introns en un vertebrat no mamífer s'ha realitzat en el llenguado senegalès, en el nostre laboratori (Mechaly *et al.*, 2008). Aquesta mateixa estructura també s'ha pogut deduir en altres espècies de teleostis, però ha estat a partir de la seqüència codificadora i inferint els possibles límits entre introns i exons en els teleostis (Biran *et al.*, 2008; Filby *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2007; Nocillado *et al.*, 2007; Parhar *et al.*, 2004).

Així, doncs, l'anàlisi de l'estructura gènica en el llenguado senegalès i en altres espècies de teleostis ha permès confirmar que l'estructura general d'aquest gen és similar a la que ja s'havia observat en humans, i a més s'han afegit noves característiques de l'organització genòmica que prèviament no havien estat descrites en cap altra espècie. D'altra banda, en el nostre estudi amb el llenguado senegalès es va poder observar la presència de dues variants (v) de transcrits de mRNA diferenciats aproximadament en uns 80 bp de grandària. El transcrit curt, Ss *KISS1R\_v1*, va resultar ser de 1.137 bp; en canvi, el transcrit llarg, Ss *KISS1R\_v2*, era de 1.218 bp de grandària. A partir de l'anàlisi de la seqüència nucleotídica d'aquests dos transcrits es va observar que Ss *KISS1R\_v2* presentava tot l'intró 3, que justament té una longitud de 81 bp. A més, aquest intró presentava seqüències

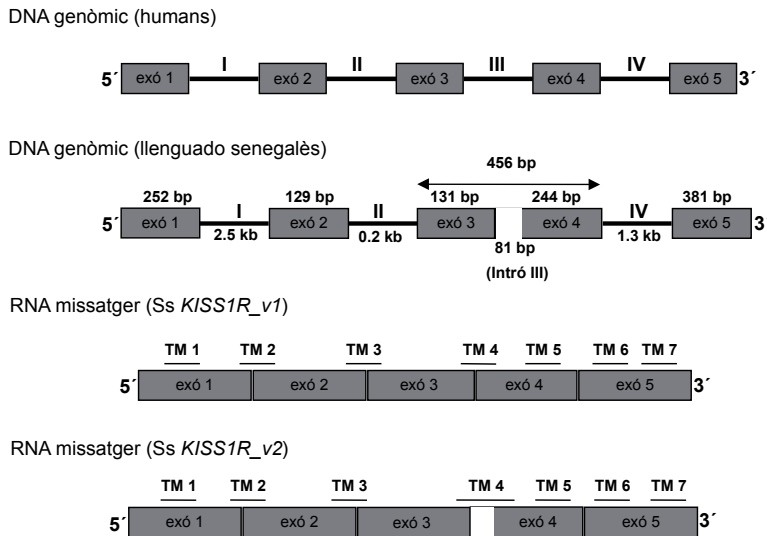


FIGURA 3. Estructura gènica del receptor de la kisspeptina (KISS1R) en mamífers (humans) i en un peix teleostí, el llenguado senegalès. En el llenguado senegalès hi ha dues isoformes del receptor *KISS1*: una de curta, Ss *KISS1R\_v1*, i una de llarga, originada per la retenció total de l'intró 3 (Ss *KISS1R\_v2*). També s'indiquen els set dominis transmembranosos (TM).



TAULA 1. Resum dels nivells d'expressió del gen *KISS1R* en el cervell en diferents espècies de peixos teleostis en els diferents estadis de desenvolupament

	Immadur	Maduració			Madur
		Inicial	Mitjana	Tardana	
Tilàpia del Nil ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	++				+++
Còbia ( <i>Rachycentron canadum</i> )	++	+++			
Llissa ( <i>Mugil cephalus</i> )		+++	++	+	
Carpí de cap gros ( <i>Pimephales promelas</i> )	+	+++	++	+	+
Peix zebra ( <i>Danio rerio</i> )					
<i>kiss1ra</i>	+	+	+	+++	+
<i>kiss1rb</i>	+	+	+++	+++	+++
Llenguado senegalès ( <i>Solea senegalensis</i> )					
Ss <i>KISS1R_v1</i>			++		+
Ss <i>KISS1R_v2</i>			++		+

+++ indica una elevada expressió del gen, ++ una expressió moderada i + una baixa expressió. La manca de símbol significa que no hi ha resultat per a l'espècie i en l'estadi corresponent

característiques d'un mecanisme d'empalmament alternatiu (*alternative splicing*); per tant, es pot deduir que les dues isoformes es generen pel mecanisme d'un empalmament alternatiu, amb una retenció de l'intró 3 en la isoforma Ss *KISS1R\_v2*. Una altra prova a favor d'un empalmament alternatiu és la presència de dos codons terminadors en la seqüència aminoacídica de l'insert-intró 3. La generació de mRNA amb codons terminadors s'ha relacionat amb l'empalmament alternatiu, i és un dels mecanismes més importants del control de l'expressió gènica. Per tant, es pot deduir que possiblement la variant llarga, Ss *KISS1R\_v2*, es tradueix a una proteïna truncada i no funcional. En canvi, la variant curta, Ss *KISS1R\_v1*, produeix la proteïna funcional. Aquest resultat és destacable si es considera que aquesta és la primera vegada que es descriu un mecanisme d'empalmament alternatiu en el gen de la *KISS1R*. Com s'ha esmentat en l'apartat anterior, aquesta proteïna pertany a la

família de receptors associats a una proteïna G. Gairebé totes els gens que codifiquen aquests receptors presenten més d'una isoforma producte d'un empalmament alternatiu (Gottsch *et al.*, 2006).

Un altre resultat no esperat, i per ara només observat en peixos, és la presència de dos paràlegs dins d'una espècie. Així, recentment, en el peix zebra s'han trobat dos paràlegs del receptor: el *KISS1Ra* i el *KISS1Rb* de peix zebra, que, a més, tenen un comportament d'expressió diferenciat durant la maduresa sexual (vegeu l'apartat següent) i un mecanisme d'acció també diferent. Mentre que *KISS1ra* té la seva activitat únicament per via d'una proteïna cinasa C (PKC), amb un sistema similar al dels humans, *KISS1Rb* actua mitjançant la PKC i la proteïna cinasa A (PKA) (Biran *et al.*, 2008).



## **FUNCIONS ASSOCIADES AL SISTEMA KISSPEPTINA-KISS1R EN VERTEBRATS. DIFERÈNCIES D'EXPRESSIÓ DEL RECEPTOR *KISS1* EN EL CERVELL DE PEIXOS TELEOSTIS**

Com s'ha esmentat anteriorment, molts estudis han relacionat el sistema kisspeptina-KISS1R amb el control neuroendocrí de la reproducció dins l'eix gonadotròfic (Roux *et al.*, 2003; Funes *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). També s'ha vist que en un principi el gen *KISS1* es va relacionar amb metastasis. Concretament, s'ha relacionat amb el càncer de mama, d'ovari, d'esòfag, de tiroides i gàstric.

D'altra banda, estudis recents han posat de manifest que aquest sistema no solament té un efecte metastàtic i de control de maduresa sexual. Per exemple, en el gen *KISS1* els nivells de mRNA es troben en la placenta (Bilban *et al.*, 2004), però la seva possible relació amb l'embaràs encara és desconeguda (Gottsch *et al.*, 2006). Altres efectes pleotrópics inclouen la regulació de l'ovulació en rates (Navarro *et al.*, 2004b) i la regulació en la secreció d'insulina (Hauge-Evans *et al.*, 2006). De les altres funcions en les quals aparentment el sistema kisspeptina-KISS1R també està relacionat cal destacar que s'han observat importants efectes fisiològics sobre el sistema cardiovascular associat amb la presència d'arteriosclerosi, segurament vinculats a la potent acció vasoconstrictora de la KP-10, -13 i -54 (Mead *et al.*, 2007).

Quan ens centrem en peixos, l'anàlisi de la relació entre el sistema kisspeptina-receptor amb el desenvolupament de la maduresa sexual s'ha analitzat mesurant el grau d'expressió gènica del gen del receptor, *KISS1R*, en el cervell, mitjançant la tècnica de la PCR a temps real. A la taula 1 es resumeixen els nivells d'expressió gènica en els diferents estadis de desenvolupament

puberal (immadurs, en maduració i madurs) de tots els estudis publicats fins ara. Així, en la tilàpia del Nil s'observa un increment d'expressió gènica del receptor entre individus immadurs i individus madurs (Parhar, 2005). També en la còbia s'ha observat un increment dels nivells de mRNA a mesura que avança la maduració (Mohamed *et al.*, 2007). D'altra banda, en la llissa els nivells d'expressió són contraposats. En aquesta espècie l'expressió del receptor és major en els estadis inicials (Nocillado *et al.*, 2007). Un cas similar és el carpi de cap gros, en què també s'ha observat més expressió al començament de la maduresa que no pas en els individus madurs (Filby *et al.*, 2007). En aquests casos, el màxim d'expressió s'ha detectat en els individus al començament de la maduració, i amb un decreixement posterior de l'expressió a mesura que avança aquesta. Curiosament, s'observen discrepàncies en els nivells d'expressió entre els dos gens paràlegs del peix zebra. Mentre que en el gen *KISS1Ra* de peix zebra els nivells de mRNA baixen significativament entre la fase tardana de la maduresa i la dels individus madurs, el gen *KISS1Rb* de peix zebra manté els nivells relativament elevats a partir de la fase mitjana de maduració fins a l'estadi madur (Biran *et al.*, 2008). També, s'ha detectat expressió diferencial en les dues isoformes de llenguado senegalès. La isoforma Ss *KISS1R\_v1* s'expressa més en el cervell; en canvi, la isoforma Ss *KISS1R\_v2* principalment s'expressa en les gònades (Mechaly *et al.*, 2008).

Per tant, i recapitulant tots els resultats que s'han obtingut en diverses espècies de peixos, quan es vol determinar en quin moment del procés de maduració actua la kisspeptina mitjançant l'anàlisi de l'expressió del gen del receptor *KISS1R* no s'observa cap patró d'expressió que sigui compartit per totes les espècies. Això pot ser degut a la gran diversitat d'estratègies reproductores

en els peixos. Ara bé, també es pot suggerir que aquestes discrepàncies poden ser causades per la presència de diversos gens dins d'una mateixa espècie, com en el cas del peix zebra, o de diverses isoformes producte d'un empalmament alternatiu, com s'ha observat en el llenguado senegalès, i que encara no han estat detectats en la gran majoria d'espècies estudiades.

### PERSPECTIVES SOBRE L'ESTUDI DEL SISTEMA KISSPETINA-KISS1R I DE LES POSSIBLES APLICACIONS PRÀCTIQUES

Com s'ha comentat al principi, la primera funció relacionada amb el sistema kisspeptina-KISS1R tenia relació amb el càncer, i malgrat que posteriorment s'han anat trobat múltiples funcions, totes semblen se-

cundàries quan es comparen amb la gran importància que té la kisspeptina en la regulació de la maduració sexual. Tot i així, i precisament a causa del gran nombre de teixits que expressen el receptor de kisspeptina, és important investigar en quines altres funcions fisiològiques pot estar relacionada. Si ens centrem en el camp de la reproducció, encara queda molta feina per fer. Per exemple, ja es coneix relativament bé l'estructura dels gens de kisspeptina i del seu receptor en diverses espècies, però en canvi, el coneixement sobre la seva regulació encara és molt limitat. Com s'ha vist, sembla que fins i tot entre espècies relativament properes hi pot haver diferències d'expressió segons el moment en què s'examinen els principals teixits relacionats amb la reproducció (cervell i gònades). En aquest sentit, el recent descobriment de gens paral·lels de *KISS1R* en el peix zebra o diferents isofor-

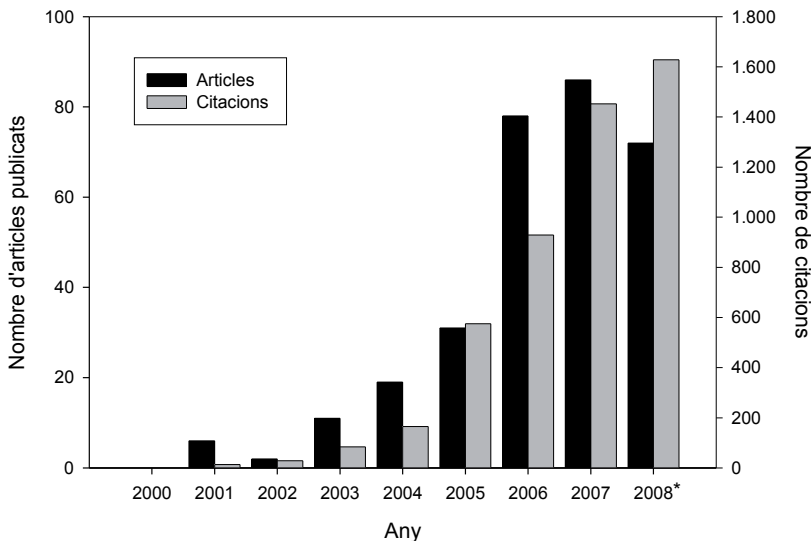


FIGURA 4. Evolució de l'esforç de recerca sobre el sistema kisspeptina-KISS1R des del seu descobriment com a tal el 2001. Es mostren el nombre d'articles publicats i les citacions relacionades, extrets amb una cerca de subjecte amb els mots clau *kisspeptin*, *metastin*, *gpr54* o *KISS1R*, fet a la Web of Science de Thomson Reuters. L'asterisc indica que les dades del 2008 són parcials, i inclouen fins al 30 d'octubre.

mes de *KISS1R* en el llenguado senegalès, que, a més, presenten nivells d'expressió diferents segons el sexe i l'estat de maduració, obre noves vies de recerca en el camp del control de la maduració sexual, i constitueixen dos exemples ben clars de com cada cop més sovint s'inverteix la situació: ara hi ha descobriments en peixos que poden obrir noves vies de recerca en mamífers. Un altre aspecte rellevant que queda per investigar són els canvis ontogenètics, i encara un altre més és la relació entre l'activació del receptor i els efectes fisiològics.

Des d'un punt de vista més aplicat, i encara que només es tingui en compte que el sistema kisspeptina-*KISS1R* controla l'inici de la pubertat i s'oblidin així altres possibles funcions, és fàcil apreciar l'interès de moltes companyies farmacèutiques en el desenvolupament d'agonistes i antagonistes de la kisspeptina per aplicar-los en casos d'endarreriment de l'aparició de la pubertat, o bé en la pubertat precoç. A més, com que el sistema kisspeptina-*KISS1R* sembla que és present en tots els vertebrats, i no solament és aplicable a l'espècie humana, pot tenir interès en el control de la reproducció d'animals domèstics o de producció ramadera. En el cas dels peixos d'interès en aqüicultura seria interessant poder disposar de mètodes per estimular l'alliberament de gonadotrofines endògenes mitjançant la manipulació del sistema kisspeptina-*KISS1R*. També en peixos s'ha pensat en la possibilitat d'actuar sobre aquest sistema per aconseguir l'efecte contrari, és a dir, el bloqueig del desenvolupament gonadal. Poder crear peixos estèrils amb aquest procediment podria ser molt interessant com a alternativa a la inducció de la triploidia, fet que podria, per exemple, contribuir a minimitzar l'impacte genètic de l'aqüicultura sobre les poblacions naturals.

En resum, el pèptid kisspeptina i el seu receptor, *KISS1R*, estan presents en tots els

vertebrats. Ambdós s'expressen en el cervell i constitueixen una peça fonamental en la integració d'estímuls, tant endògens com exògens, per al control de la reproducció. La comunitat científica es pregunta com un sistema tan important i central havia pogut passar desapercebut fins fa relativament ben poc. A més, el sistema kisspeptina-*KISS1R* s'expressa en molts altres llocs del cos, en alguns fins i tot de manera més prominent que en el cervell mateix, i se succeeixen contínuament nous descobriments sobre aquest tema. Des que aquest sistema fou caracteritzat com a tal per primer cop el 2001, hi ha hagut una autèntica explosió, tant en el nombre d'articles com de cites, actualment amb una mitjana de dos nous articles per setmana (vegeu la figura 4). Així, a causa de la seva importància fonamental en el control de la reproducció (però també en moltes altres funcions fisiològiques, en les quals el seu paper encara està pobrament caracteritzat) el sistema kisspeptina-*KISS1R* seguirà sent de ben segur objecte d'una intensa activitat de recerca arreu del món durant els propers anys.

## BIBLIOGRAFIA

- AERLE, R. VAN; KILLE, P.; LANGE, A.; TYLER C. R. (2008). «Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish». *Peptides*, 29: 57-64.
- BILBAN, M.; GHAFFARI-TABRIZI, N.; HINTERMANN, E.; BAUER, S.; MOLZER, S.; ZORATTI, C.; MALLI, R.; SHARABI, A.; HIDEN, U.; GRAIER, W.; KNOFLER, M.; ANDREAE, F.; WAGNER, O.; QUARANTA, V.; DESOYE, G. (2004). «Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts». *J. Cell Sci.*, 117: 1319-1328.
- BIRAN, J.; BEN-DOR, S.; LEVAVI-SIVAN, B. (2008). «Molecular identification and functional characterization of the Kisspeptin/Kisspeptin receptor system in lower vertebrates». *Biol. Reprod.*, 79: 776-786.
- CLEMENTS, M. K.; McDONALD, T. P.; WANG, R. P.; XIE, G. C.; O'DOWD, B. F.; GEORGE, S. R.; AUSTIN, C. P.; LIU, Q. Y. (2001). «FMRamide-related neuropeptides

- are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 284: 1189-1193.
- ELIZUR, A. (2008). «The KiSS1/GPR54 system in fish». *Peptides*. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.08.018.
- FELIP, A.; ZANUY, S.; PINEDA, R.; PINILLA, L.; CARRILLO, M.; TENA-SEMPERE, M.; GÓMEZ, A. (2008). «Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals». *Mol. Cel. Endocrinol.* DOI: 10.1016/j.mce.2008.11.017.
- FILBY, A. L.; AERLE, R. VAN; DUITMAN, J.; TYLER, C. R. (2008). «The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish». *Biol. Reprod.*, 78: 278-289.
- FUNES, S.; HEDRICK, J. A.; VASSILEVA, G.; MARKOWITZ, L.; ABBONDANZO, S.; GOLOVKO, A.; YANG, S. J.; MONSMA, F. J.; GUSTAFSON, E. L. (2003). «The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 312: 1357-1363.
- GOTTSCH, M. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. (2006). «Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis». *Mol. Cel. Endocrinol.*, 254: 91-96.
- GOTTSCH, M. L.; CUNNINGHAM, M. J.; SMITH, J. T.; POPA, S. M.; ACOHIDO, B. V.; CROWLEY, W. F.; SEMINARA, S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. (2004). «A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse». *Endocrinology*, 145: 4073-4077.
- HAUGE-EVANS, A. C.; RICHARDSON, C. C.; MILNE, H. M.; CHRISTIE, M. R.; PERSAUD, S. J.; JONES P. M. (2006). «A role for kisspeptin in islet function». *Diabetologia*, 49: 2131-2135.
- IRWIG, M. S.; FRALEYB, G. S.; SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V.; POPA, S. M.; CUNNINGHAM, M. J.; GOTTSCH, M. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. (2004). «Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat». *Neuroendocrinology*, 80: 264-272.
- KANDA, S.; AKAZOME, Y.; MATSUNAGA, T.; YAMAMOTO, N.; YAMADA, S.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K. I.; OKA, Y. (2008). «Identification of KiSS-1 product Kisspeptin and steroid-sensitive sexually-dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*)». *Endocrinology*, 149: 2467-2476.
- KITAHASHI, T.; OGAWA, S.; PARHAR, I. S. (2008). «Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka». *Endocrinology*. DOI: 10.1210/en.2008-0940.
- KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.; VANDERWINDEN, J. M.; LE POUL, E.; BREZILLO, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-HUERTA, N.; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S. N.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. (2001). «The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54». *J. Biol. Chem.*, 276: 34631-34636.
- LEE, D. K.; NGUYEN, T.; O'NEILL, G. P.; CHENG, R.; LIU, Y.; HOWARD, A. D.; COULOMBE, N.; TAN, C. P.; TANG-NGUYEN, A. T.; GEORGE, S. R.; O'DOWD, B. F. (1999). «Discovery of a receptor related to the galanin receptors». *Febs Lett.*, 446: 103-107.
- MATSUI, H.; TAKATSU, Y.; KUMANO, S.; MATSUMOTO, H.; OHTAKI, T. (2004). «Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 320: 383-388.
- MEAD, E. J.; MAGUIRE, J. J.; KUC, R. E.; DAVENPORT, A. P. (2007). «Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels». *Endocrinology*, 148: 140-147.
- MECHALY, A. S.; VIÑAS, J.; PIFERRER, F. (2008). «Identification of two isoforms of the Kisspeptin-1 receptor (*kiss1r*) generated by alternative splicing in a modern teleost, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*)». *Biol. Reprod.*, 80. DOI: 10.1095/biolreprod.108.072173.
- MESSAGE, S. (2005). «Kisspeptin and its receptor: New gatekeepers of puberty». *J. Neuroendocrinol.*, 17: 687-688.
- MESSAGE, S.; CHATZIDAKI, E. E.; MA, D.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; THRESHER, R. R.; MALINGE, I.; LOMET, D.; CARLTON, M. B. L.; COLLEDGE, W. H.; CARATY, A.; APARICIO, S. A. J. R. (2005). «Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 1761-1766.
- MOHAMED, J. S.; BENNINGHOFF, A. D.; HOLT, G. J.; KHAN, I. A. (2007). «Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia». *J. Mol. Endocrinol.*, 38: 235-244.
- MOON, J. S.; LEE, Y. R.; OH, D. Y.; HWANG, J. I.; LEE, J. Y.; KIM, J.; VAUDRY, H.; KWON, H. B.; SEONG, Y. (2008). «Molecular cloning of the bullfrog kisspeptin receptor GPR54 with high sensitivity to *Xenopus* kisspeptin». *Peptides*. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.04.015
- MUIR, A. I.; CHAMBERLAIN, L.; ELSHOURBAGY, N. A.; MICHALOVICH, D.; MOORE, D. J.; CALAMARI, A.; SZEKERES, P. G.; SARAU, H. M.; CHAMBERS, J. K.; MURDOCK, P.; STEPLEWSKI, K.; SHABON, U.; MILLER, J. E.; MIDDLETON, S. E.; DARKER, J. G.; LARMINIE, C. G. C.; WILSON, S.; BERGSMAN, D. J.; EMSON, P.; FAULL, R.;

- PHILPOTT, K. L.; HARRISON, D. C. (2001). «AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1». *J. Biol. Chem.*, 276: 28969-28975.
- NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; BARREIRO, M. L.; ROA, J.; SANCHEZ-CRIBADO, J. E.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. (2004a). «Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide». *Endocrinology*, 145: 4565-4574.
- NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; MAYEN, A.; BARREIRO, M. L.; CASANUEVA, F. F.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. (2005). «Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat». *Endocrinology*, 146: 1689-1697.
- NAVARRO, V. M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; CASTELLANO, J. M.; ROA, J.; MAYEN, A.; BARREIRO, M. L.; GAYTAN, F.; AGUILAR, E.; PINILLA, L.; DIEGUEZ, C.; TENA-SEMPERE, M. (2004b). «Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54». *J. Physiol. (London)*, 561: 379-386.
- NOCILLADO, J. N.; LEVAVI-SIVAN, B.; CARRICK, F.; ELIZUR, A. (2007). «Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54) gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*». *Gen. Comp. Endocrinol.*, 150: 278-287.
- OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S.; MATSUMOTO, H.; HORI, A.; KANEHASHI, K.; TERAU, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; MASUDA, Y.; ISHIBASHI, Y.; WATANABE, T.; ASADA, M.; YAMADA, T.; SUENAGA, M.; KITADA, C.; USUKI, S.; KUROKAWA, T.; ONDA, H.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. (2001). «Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor». *Nature*, 411: 613-617.
- PARHAR, I. S.; OGAWA, S.; SAKUMA, Y. (2004). «Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish». *Endocrinology*, 145: 3613-3618.
- ROUX, N. DE; GENIN, E.; CAREL, J. C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J. L.; MILGROM, E. (2003). «Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 10972-10976.
- SEMINARA, S. B.; KAISER U. B. (2005). «New gatekeepers of reproduction: GPR54 and its cognate ligand, KiSS-1». *Endocrinology*, 146: 1686-1688.
- SEMINARA, S. B.; MESSENGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERNO, J. S.; SHAGOURY, J. K.; BO-ABBAS, Y.; KUOHUNG, W.; SCHWINOF, K. M.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; KAISER, U. B.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F.; O'RAHILLY, S.; CARLTON, M. B. L.; CROWLEY, W. F.; APARICIO, S. A. J. R.; COLLEDGE, W. H. (2003). «The GPR54 gene as a regulator of puberty». *New Engl. J. Med.*, 349: 1614-1627.
- SMITH, C. W. J.; VALCARCEL, J. (2000). «Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control». *Trends Biochem. Sci.*, 25: 381-388.
- SMITH, J. T.; CLIFTON, D. K.; STEINER R. A. (2006). «Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling». *Reproduction*, 131: 623-630.
- STAFFORD, L. J.; XIA, C. Z.; MA, W. B.; CAI, Y.; LIU, M. Y. (2002). «Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor». *Cancer Res.*, 62: 5399-5404.
- TENA-SEMPERE, M. (2006). «GPR54 and kisspeptin in reproduction». *Human Reprod. Update*, 12: 631-639.
- WEST, A.; VOJTA, P. J.; WELCH, D. R.; WEISSMAN, B. E. (1998). «Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1)». *Genomics*, 54: 145-148.