

Nuevas señales en pubertad: sistema KiSS-1/GPR54

VÍCTOR MANUEL NAVARRO, JUAN MANUEL CASTELLANO Y MANUEL TENA-SEMPERE

Sección de Fisiología. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

NEW SIGNALS IN PUBERTY: THE KISS-1/GPR54 SYSTEM

The *KiSS-1* gene was originally identified as a metastasis suppressor gene encoding a number of structurally related peptides, called kisspeptins, that inhibit tumor progression through the G protein-coupled receptor, GPR54. The neuroendocrine facet of the KiSS-1/GPR54 system was discovered at the end of 2003, when two publications reported that loss-of-function mutations of the *GPR54* gene were associated with the absence of puberty and hypogonadotropic hypogonadism, both in humans and in rodents.

These seminal findings underscored the pivotal—and previously unsuspected—role of the KiSS-1 system in control of reproduction in general, and in puberty in particular, and have prompted intense research efforts to characterize distinct aspects (effects, regulation, mechanism of action, interactions) of the neuroendocrine physiology of kisspeptins.

Indeed, in the last months, KiSS-1 has been proven to be a major physiological gatekeeper of gonadoliberein (Gn-RH) neurons and, hence, of the reproductive axis. The present review comprehensively describes the major features of the KiSS-1 system, with special emphasis on its putative role as a major regulator of mammalian puberty.

Key words: KiSS-1. GPR54. Gn-RH. LH. FSH. Puberty. Hypogonadism.

El gen *KiSS-1*, identificado inicialmente como un gen supresor de metástasis, codifica una serie de péptidos estructuralmente relacionados, denominados kisspeptinas, capaces de inhibir la progresión de ciertos tumores mediante la activación del receptor acoplado a proteínas G, GPR54. La faceta neuroendocrina del sistema KiSS-1/GPR54 fue descubierta a finales de 2003, cuando sendas publicaciones evidenciaron que las mutaciones inactivadoras del gen *GPR54* se asocian a ausencia de pubertad e hipogonadismo hipogonadotropo, tanto en humanos como en roedores. Estas observaciones pusieron de manifiesto el papel clave, previamente insospechado, del sistema KiSS-1 en el control del eje reproductor en general y de los mecanismos de activación de la pubertad en particular, y desencadenaron una intensísima actividad investigadora dirigida a elucidar distintos aspectos (efectos, regulación, mecanismos de acción, interacciones) del papel fisiológico de este sistema en el control neuroendocrino de la reproducción. De hecho, las evidencias experimentales acumuladas en los últimos meses permiten afirmar que el sistema KiSS-1 es un elemento esencial en la regulación del sistema neuronal de la gonadoliberein, y por extensión, del eje reproductor. En el presente trabajo revisaremos algunas de estas observaciones, con especial atención a las que implican al sistema KiSS-1 en el control del desarrollo puberal.

Palabras clave: KiSS-1. GPR54. Gn-RH. LH. FSH. Pubertad. Hipogonadismo.

INTRODUCCIÓN

La diferenciación sexual es un proceso madurativo continuo, que tiene lugar en etapas sucesivas desde la determinación del sexo cromosómico hasta la adquisición del fenotipo sexual (masculino o femenino) adulto. En este continuo, la pubertad se define como el período de transición entre la etapa infantil y la etapa adulta durante el cual se adquiere la capacidad reproductora y tienen lugar la maduración de los órganos genitales y el desarrollo completo de los caracteres sexuales secundarios, así como impor-

Este trabajo se financió con fondos de los proyectos de investigación BFI 2000-0419-CO3-03 y BFI 2002-00176 de la DGEIC (Ministerio de Educación y Ciencia) y del Instituto de Salud Carlos III (Red de Centros RCMN C03/08 y proyecto PI042082; Ministerio de Sanidad).

Correspondencia: Dr. M. Tena-Sempere.
 Sección de Fisiología. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.
 Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba.
 Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba. España.
 Correo electrónico: filtesem@uco.es

Manuscrito recibido el 21-9-2005 y aceptado para su publicación el 30-8-2006.

tantes cambios somáticos y de conducta¹. Este conjunto orquestado de cambios endocrinos y físicos está determinado por una plétora de factores, desde genéticos a ambientales, que definen la cronología de la pubertad en ambos sexos.

Desde el punto de vista neuroendocrino, la pubertad implica la activación completa del eje endocrino de la reproducción o gonadotrópico. El elemento jerárquico clave en este sistema es la gonadoliberina (Gn-RH), un decapeptido sintetizado por un número reducido y relativamente disperso de neuronas hipotalámicas que estimula potentemente la síntesis y la liberación hipofisaria de las gonadotropinas, lutropina (LH) y folitropina (FSH). Éstas, a su vez, actúan sobre receptores gonadales específicos y son esenciales tanto para la correcta producción de gametos maduros a partir de la pubertad (gametogénesis) como para la secreción de esteroides y otras hormonas gonadales (hormonogénesis)^{2,3}. Las hormonas gonadales, por su parte, participan en la regulación funcional del eje gonadotrópico mediante circuitos de *feedback* negativos y positivos. Adicionalmente, un número elevado de señales, tanto centrales como periféricas, participa en el control de este eje, actuando principalmente sobre el generador hipotalámico de pulsos de Gn-RH³.

Si bien está claramente establecido que el mecanismo último que desencadena la pubertad en mamíferos es el incremento progresivo en la secreción hipotalámica de pulsos de Gn-RH, un aspecto interesante de este sistema es que el desarrollo de las neuronas de Gn-RH y la adquisición de su capacidad secretora son muy anteriores a su activación puberal. De hecho, la estimulación eléctrica o neuroquímica puede inducir la activación precoz de este sistema^{3,4}, lo que indica que son los cambios en los sistemas reguladores (centrales y/o periféricos) lo que determina el estado de quiescencia o activación de generador de pulsos de Gn-RH y, por extensión, del eje reproductor³. En este sentido, se ha postulado que, junto con posibles alteraciones en la sensibilidad al *feedback* negativo de los esteroides gonadales, la activación puberal del sistema Gn-RH se produce por modificaciones en el equilibrio entre señales centrales excitatorias e inhibitorias. Así, la quiescencia funcional del eje reproductor durante el período infantil se produce por una inhibición central del sistema Gn-RH que daría paso a un predominio progresivo de los circuitos excitatorios durante el período peripuberal³.

Numerosos estudios experimentales han permitido esclarecer la contribución de diversos neurotransmisores y neuropéptidos en el sistema regulador implicado en el control de la pubertad arriba descrito. Así, entre las señales inhibitorias, destaca el ácido gammabutírico (GABA) como factor supresor de la secreción de Gn-RH previa a la activación puberal^{3,5}. Por el contrario, tanto la neurotransmisión noradrenérgica como los aminoácidos excitatorios (EAA), fundamentalmente el glutamato, estimulan la liberación de Gn-RH/LH en animales inmaduros^{3,5-7} y pueden tener un

papel clave en la activación del eje reproductor entorno a la pubertad. Finalmente, también se ha implicado al neuropéptido Y (NPY) en el control de la pubertad y el sistema Gn-RH/LH³, aunque se ha descrito efectos tanto estimuladores como inhibidores del NPY en el eje gonadotrópico, dependiendo de la especie y el modelo experimental empleados.

Finalmente, además de numerosas señales centrales, un número considerable de factores periféricos participa, junto con las hormonas gonadales, en el control funcional del eje reproductor y específicamente del desarrollo puberal. De entre éstos, es destacable el papel de la leptina como hormona de origen adiposo que informa a los centros de control de la reproducción del estado de los depósitos grasos del organismo⁸⁻¹⁰. En relación con la pubertad, es necesaria una cantidad mínima de leptina circulante (función permisiva), como índice de una masa grasa crítica, para que se produzca un desarrollo puberal adecuado⁸. Es muy probable que otras hormonas primariamente implicadas en el control del balance energético, tales como la ghrelina, cooperen con la leptina en la integración funcional de los ejes reproductor, del crecimiento y metabólico durante el período puberal^{11,12}.

IDENTIFICACIÓN DEL SISTEMA KISS-1/GPR54

El sistema KiSS-1/GPR54 es un sistema ligando-receptor, inicialmente identificado en un contexto no relacionado con el eje reproductor. El gen *GPR54* se clonó originalmente en 1999 en cerebro de rata, y su producto se caracterizó como un receptor huérfano acoplado a proteínas G con 7 dominios transmembrana y cierto grado de similitud con los receptores de galanina (GalR1 45%, GalR2 44% y GalR3 45%)¹³. El ortólogo humano, designado como AXOR12 o hOT7T175, exhibe un 81% de homología con *GPR54*, está formado por 5 exones y presenta, al igual que aquél, similitud con los GalR^{14,15}. En términos funcionales, estudios en sistemas celulares heterólogos (células CHO transfectadas con el ADNc de *GPR54*) demostraron que éste utiliza la ruta de los inosítoles fosfato y calcio intracelular y que su activación resulta en la acumulación de ácido araquidónico y la fosforilación de cinasas intracelulares, tales como ERK 1/2 y p38 cinasa¹⁶.

Por su parte, el gen *KiSS-1* fue identificado inicialmente en 1996 como un gen supresor de metástasis mediante técnicas de hibridación sustractiva en líneas celulares de melanoma con distinta capacidad invasiva¹⁷. Los datos publicados sobre su organización genómica aparentemente no coinciden en humanos y roedores¹⁸, aunque un análisis detallado de las bases de datos (véase ENSG00000170498, disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/seq/genbank/ensg00000170498) señala que el gen *KiSS-1* posee muy probablemente 3 exones tanto en el ratón como en la rata y el ser humano, de los que el exón I es no codificante.

Es de destacar que el producto del gen *KiSS-1* es una proteína precursora de 145 aminoácidos, que por procesamiento proteolítico resulta en la generación de la metastina (54 aminoácidos) y otros péptidos de menor tamaño, tales como kisspeptina-14 y kisspeptina-13, que forman la familia de las kisspeptinas^{14,16}. Estos péptidos comparten su región C-terminal, que presenta un motivo característico Arg-Phe-amida, propio de un numeroso grupo de péptidos funcionalmente diversos (la superfamilia de péptidos RFamida; especialmente abundantes en invertebrados). Estudios de estructura-función establecieron que la región de 10 aminoácidos del extremo C-terminal de las kisspeptinas (kisspeptina-10) es suficiente para producir una máxima activación de *GPR54* en sistemas *in vitro*¹⁶. Como consecuencia de la identificación "independiente" de ligando (kisspeptinas) y receptor (*GPR54*), la vinculación funcional de ambos elementos del sistema sólo quedó establecida a partir del año 2001¹⁴⁻¹⁶.

Las primeras funciones biológicas asignadas al sistema KiSS-1/GPR54 se enmarcaron en el contexto de la biología del cáncer. Así, desde la clonación inicial del gen *KiSS-1* (y la caracterización de la metastina) hasta la fecha, un número de publicaciones han demostrado la posible función antimetastásica de *KiSS-1* en diversos tumores, como el melanoma, el cáncer de mama, el cáncer de tiroides y el cáncer de páncreas, entre otros¹⁹. Más aún, la pérdida de la expresión del gen *KiSS-1* se ha identificado como índice de mal pronóstico de progresión tumoral y metástasis en distintos tumores (cáncer de esófago, vejiga y gástrico). Por otra parte, se ha demostrado que los péptidos KiSS-1 inhiben la motilidad/migración de diversas líneas tumorales²⁰ y pueden inducir igualmente apoptosis y supresión del ciclo celular en determinados sistemas celulares²¹. No obstante, la relevancia fisiológica y/o el potencial uso terapéutico de las acciones antimetastásicas de KiSS-1 no se han esclarecido hasta la fecha.

Junto con sus posibles efectos antitumorales, los análisis de expresión de los genes *KiSS-1* y *GPR54* en tejidos humanos permitieron identificar posibles sitios de localización de éstos, tales como la placenta y diversas áreas del sistema nervioso central (*KiSS-1* y *GPR54*), así como la hipófisis, la médula espinal y el páncreas (*GPR54*)^{15,16}. Estas observaciones, unidas a las características estructurales de la proteína KiSS-1 (con un péptido señal y diversos sitios de corte y amidación; todo ello indicio de la generación de factores secretados), hicieron prever la posible implicación de este sistema en funciones biológicas adicionales. Así, estudios de expresión y farmacológicos han señalado recientemente un papel de las kisspeptinas en el control de la invasión del trofoblasto placentario durante la nidación²²; un proceso que se asemeja parcialmente a la invasión tumoral durante la metástasis. De hecho, durante la gestación en humanos se produce una espectacular elevación de la metastina circulante, que puede alcanzar concentraciones hasta 7.000 veces superiores a las del período no gestacional²³. La signifi-

cación funcional de este fenómeno aún no ha sido esclarecida.

Finalmente, cabe indicar que la expresión prominente del gen *KiSS-1* en el hipotálamo (identificada en 2001), así como de *GPR54* en el hipotálamo y la hipófisis, indicaron ya un posible papel de este sistema en el control de ciertas funciones neuroendocrinas. No obstante, antes de finales de 2003, la única evidencia experimental aportada sobre una posible acción neuroendocrina de *KiSS-1* fue la demostración de la capacidad de kisspeptina-10 de estimular moderadamente la secreción de oxitocina tras su administración intracerebroventricular¹⁶.

SISTEMA KISS-1 Y CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN: EFECTOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Los primeros datos experimentales que apuntaron a una estrecha asociación entre el sistema KiSS-1/GPR54 y el control de la pubertad y la función reproductora fueron publicados a finales de 2003, de modo independiente, por de Roux et al²⁴ y Seminara et al²⁵. Así, los análisis genéticos en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (IHH) revelaron una asociación de esta afección con diversas deleciones y mutaciones inactivadoras del gen *GPR54*; observaciones que han sido ampliadas recientemente²⁶. Este fenotipo en humanos (IHH) fue plenamente reproducido en ratones genéticamente manipulados en los que el gen *GPR54* había sido inactivado (*GPR54-KO*)²⁵, y se demostró un alto grado de conservación del sistema KiSS-1/GPR54 en el control del eje reproductor en mamíferos superiores.

El análisis combinado de los modelos humano y murino de inactivación de *GPR54* reveló una profunda hipoplasia de los genitales internos y externos, así como niveles reducidos de esteroides sexuales y gonadotropinas circulantes^{25,27}. Por el contrario, la respuesta hipofisaria a Gn-RH estaba conservada, como también el contenido hipotalámico de este neuropéptido. Desde el punto de vista mecanístico, esta última observación es relevante ya que, dado el papel de las kisspeptinas en el control de la migración celular, permite descartar la posibilidad de que la ausencia funcional de *GPR54* altere el proceso normal de migración de las neuronas de Gn-RH desde la placoda olfatoria al hipotálamo en etapas tempranas del desarrollo. En su conjunto, estas observaciones señalan un fallo primario en los sistemas controladores de la secreción de Gn-RH hipotalámica y apuntan a un papel crucial, previamente insospechado, del sistema KiSS-1 en la regulación central del eje reproductor. De hecho, desde la identificación de la propia Gn-RH, ningún otro factor individual se ha demostrado tan indispensable para la función reproductora como el sistema KiSS-1/GPR54²⁸.

Las observaciones iniciales indicadas hicieron necesaria una exhaustiva caracterización de los efectos y

los mecanismos de acción de *KiSS-1* en el sistema neuroendocrino de la reproducción. Uno de los aspectos analizados en primer lugar fue el de las acciones de kisspeptinas sobre la secreción de gonadotropinas. Así, en el plazo de menos de un año desde la publicación de los trabajos de De Roux et al²⁴ y Seminara et al²⁵, al menos 4 grupos, incluido el nuestro, demostraron de modo independiente la capacidad de la kisspeptina-10 y/o la metastina-54 de estimular muy potentemente la secreción de gonadotropinas²⁹⁻³²; estudios recientemente completados con análisis detallados de las acciones de kisspeptina sobre la secreción de LH y/o FSH en diversas especies, incluida la humana³³⁻³⁷. La evaluación comparativa de estos y otros resultados previos (sobre la capacidad de diversos reguladores de estimular la secreción de gonadotropinas) permite afirmar que la kisspeptina es el más potente estimulador del sistema Gn-RH/LH conocido hasta la fecha^{33,34} (fig. 1).

Desde el punto de vista de mecanismos de acción, está bien establecido que las kisspeptinas actúan primariamente a nivel central estimulando la liberación hipotalámica de Gn-RH, como han demostrado estudios en distintas especies^{32,36,38}. Éste es muy probablemente un efecto directo en las neuronas de Gn-RH, como lo indica el hecho de que esta población neuronal expresa el gen *GPR54*³⁹. Estudios recientes de nuestro laboratorio han mostrado que el efecto de la kisspeptina estimulador de la secreción de Gn-RH requiere de la activación de fosfolipasa-C y la movilización de calcio intracelular, así como de la captación de ERK1/2 y p38 cinasas, en línea con datos previos obtenidos en sistemas celulares heterólogos⁴⁰.

Un aspecto muy interesante del sistema hipotalámico KiSS-1/GPR54 es que los principales moduladores del eje gonadotrópico regulan su expresión. Así, la eli-

minación de las hormonas gonadales mediante gonadectomía (que produce una drástica elevación de la LH y la FSH circulantes) se asocia a un aumento muy significativo en la expresión hipotalámica de *KiSS-1* (y en menor medida de *GPR54*) en ratas macho y hembra, que se evita con el remplazo con andrógenos o estrógenos, respectivamente³¹. Estas observaciones iniciales de nuestro grupo se han confirmado y ampliado recientemente mediante análisis de hibridación in situ que mostraron un incremento muy significativo de ARNm de *KiSS-1* en el núcleo arcuato de ratones macho y hembra tras la gonadectomía, fenómeno que se revirtió con la administración sustitutiva de testosterona y estradiol^{41,42}. Curiosamente, en otras áreas del hipotálamo como el área anteroventral del núcleo periventricular (AVPV), el cambio en los niveles ARNm es diametralmente opuesto^{41,42}. Este fenómeno ilustra la complejidad de la regulación hipotalámica del sistema KiSS-1 por señales gonadales. Por una parte, la estrecha correlación entre la cantidad de gonadotropinas circulantes y la expresión de *KiSS-1* en núcleo arcuato señala que éste es un elemento clave en la regulación por *feedback* negativa de la secreción de LH y FSH por esteroides gonadales⁴³. Por otra, el hecho de que el AVPV (donde la expresión de *KiSS-1* aumenta tras la administración de estrógenos) haya sido implicada en el control por *feedback* positiva de gonadotropinas por el estradiol hace plausible que esta subpoblación de neuronas de KiSS-1 pudiera participar en el desencadenamiento de la liberación preovulatoria de gonadotropinas, como parecen confirmar datos experimentales publicados muy recientemente⁴⁴.

No obstante, las evidencias antes expuestas no descartan una posible acción complementaria de las kisspeptinas hipotalámicas en el control de la secreción de gonadotropinas directamente en la hipófisis. En este

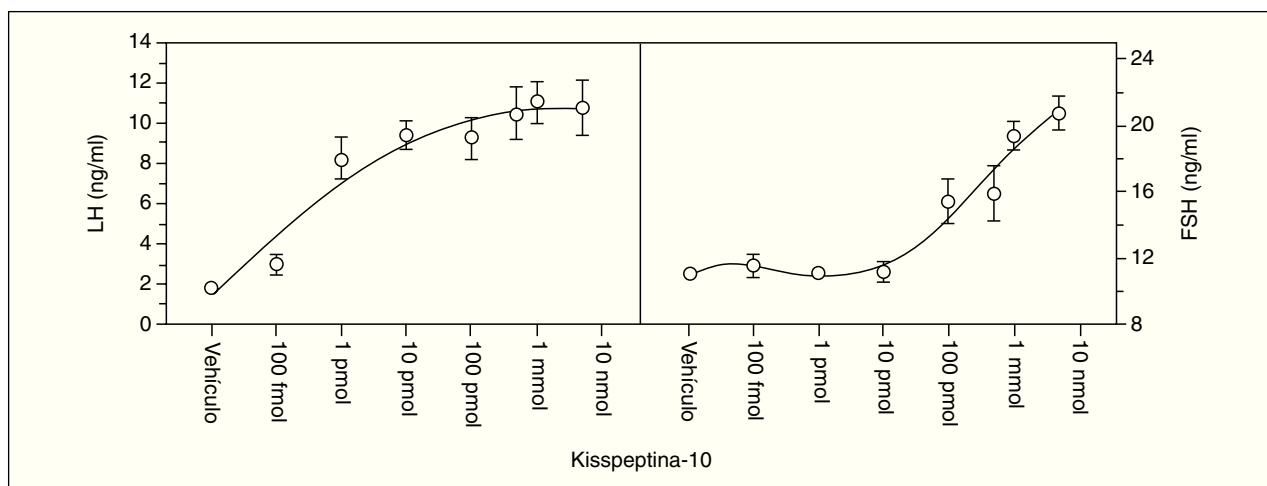


Fig. 1. Análisis de los efectos de las administraciones intracerebroventriculares de dosis crecientes de kisspeptina-10 en la secreción de lutropina (LH) y folitropina (FSH) en ratas peripuberales. Se muestra las pruebas de una gama de dosis de kisspeptina (5 nmol, 1 nmol, 500 pmol, 100 pmol, 10 pmol, 1 pmol y 100 fmol). Las respuestas hormonales se monitorizaron a los 15 min. El cálculo de la dosis efectiva 50 (ED50) permite establecer que la sensibilidad a kisspeptina en cuanto a la respuesta de LH es aproximadamente 100 veces la de FSH. Tomado de Navarro et al³⁴, con modificaciones.

sentido, es destacable que el gen *GPR54* se expresa en la hipófisis¹⁵, aunque la relevancia funcional de este fenómeno no se ha establecido hasta la fecha. Los resultados acerca de la posible acción de *KiSS-1* moduladora de la secreción hipofisaria de gonadotropinas son contradictorios, y se ha informado tanto de moderados efectos estimuladores^{33,34} como de ausencia de efecto^{29,32}. Aun asumiendo el probable papel modulador de las kisspeptinas en el control directo de la secreción de gonadotropinas, es evidente que las acciones hipofisarias de *KiSS-1* son, en términos comparativos, menos relevantes que las ejercidas en el hipotálamo en el control del eje reproductor. Queda por esclarecer si el sistema KiSS-1/GPR54 lleva a cabo otras funciones, distintas de la regulación de la secreción de gonadotropinas, directamente en la hipófisis.

SISTEMA KISS-1 Y PUBERTAD

Como ya se apuntó, las primeras evidencias que relacionaron el sistema KiSS-1 y la función reproductora indicaban ya un papel relevante de éste en el control de la pubertad²⁵. No obstante, estas observaciones derivadas de humanos y modelos animales con inactivación del gen de *GPR54* durante todo el desarrollo^{25,27} no permitían discriminar el papel específico del sistema KiSS-1 en la activación del eje reproductor durante la pubertad.

La primera evidencia indirecta del posible papel del sistema KiSS-1 en la activación puberal del eje reproductor la aportaron estudios de expresión de los genes *KiSS-1* y *GPR54* en el hipotálamo de ratas macho y hembra durante el desarrollo posnatal³¹. Esos estudios pusieron de manifiesto que los grados de expresión de *KiSS-1* y su receptor *GPR54* hipotalámicos son relativamente bajos en el período prepuberal y aumentan coincidiendo con la llegada de la pubertad. Estas observaciones se han confirmado recientemente en primates, en los que se ha observado un incremento en la expresión hipotalámica de los genes *KiSS-1* y *GPR54*, y presumiblemente de la actividad del sistema de señalización de *KiSS-1*, entorno a la pubertad³⁵. Por otra parte, los análisis de expresión indicados se han complementado con estudios funcionales de administración de kisspeptina en animales inmaduros, que confirman plenamente el papel relevante del sistema KiSS-1 en la activación puberal del eje reproductor. Así, la administración sistémica de metastina indujo ovulación en ratas hembra inmaduras con imprinación hormonal²⁹. Más aún, la administración crónica de kisspeptina-10 en ratas prepuberales fue capaz de desencadenar una pubertad precoz, estimada por un avance significativo en la edad de apertura vaginal y una elevación muy significativa del peso de útero y los valores de LH, FSH y estradiol circulantes⁴⁵. Muy probablemente, a la activación puberal del eje gonadotrópico contribuye no sólo en aumento neto del tono hipotalámico de *KiSS-1*, sino también un incremento

en la sensibilidad a las acciones estimuladoras de las kisspeptinas, como indican datos recientes sobre rata y ratón^{40,46}. Este conjunto de datos indica que la activación peripuberal del sistema hipotalámico KiSS-1/GPR54 es un proceso altamente regulado, esencial en el inicio de la pubertad en mamíferos.

Como ya se ha apuntado, entre los factores que participan en la modulación de la pubertad destacan los relacionados con el estado energético del organismo, señalizado por hormonas tales como la leptina^{8,9}. Habiendo cuenta de la estrecha relación entre el balance energético, la masa grasa corporal y la pubertad, nuestro grupo de investigación ha estado particularmente interesado en evaluar los posibles cambios funcionales del sistema KiSS-1 en el hipotálamo en situaciones de balance energético negativo, caracterizadas por la supresión de la función reproductora y el retraso o bloqueo del desarrollo puberal. Nuestras observaciones evidencian que en el ayuno se produce una disminución de la expresión hipotalámica del gen *KiSS-1*, que se asocia a un incremento moderado de las cifras de *GPR54*, lo que indica un cierto estado de sensibilización por disminución del tono de KiSS-1 endógeno³⁸. Por su parte, experimentos de administración crónica de kisspeptina a ratas subnutridas han demostrado que este remplazo es capaz de revertir (hasta en un 60% de los casos) la ausencia de apertura vaginal y de inducir (en un 100% de los casos) potentes respuestas de secreción de gonadotropinas en ratas hembras peripuberales sometidas a una restricción calórica del 30%³⁸. Es destacable que la kisspeptina no parece tener un efecto regulador directo en la ingesta de alimentos a corto y largo plazo^{32,38}. Esto indica que, a diferencia de otras señales implicadas en el control del balance energético y la función reproductora, tales como la leptina y posiblemente la ghrelina, el sistema KiSS-1 es un regulador altamente selectivo del eje reproductor que parece participar en la integración funcional de éste con otros ejes neuroendocrinos y funciones corporales relevantes. Los mecanismos por los que esta función se lleva a cabo están siendo analizados en nuestro laboratorio.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

A pesar de este rápido avance de nuestro conocimiento sobre el papel fisiológico del sistema KiSS-1, son muchas aún las facetas de la función reproductora de este sistema que no han sido suficientemente aclaradas. Pronosticar cuáles serán las áreas de mayor interés y más actividad investigadora en este ámbito es especialmente complejo, dados su rápida evolución y el interés creciente concitado por esta molécula en muy diversos grupos de investigación. A modo tentativo, indicamos algunas de las líneas que previsiblemente concitarán una mayor atención en un futuro inmediato.

Es predecible que una parte significativa de los esfuerzos a corto plazo se dirijan a definir o confirmar la relevancia fisiológica del sistema KiSS-1 en el control de aspectos clave de la función reproductora, tales como la pubertad, la ovulación y el control por *feedback*. En este ámbito, serán especialmente útiles, desde un punto de vista metodológico, la generación de modelos *knock-out* condicionales e inducibles de los genes *GPR54* y *KiSS-1*, que permitan establecer las consecuencias de la inactivación puntual del sistema en diversos períodos madurativos y en distintos tejidos, así como el desarrollo de antagonistas específicos de *GPR54*. De hecho, aunque no se dispone aún de antagonistas comerciales de *GPR54*, experimentos de inmunoneutralización de metastina publicados recientemente confirman su importancia funcional en la liberación preovulatoria de gonadotropinas y la propia ovulación⁴⁷. Más aún, la generación de antagonistas y agonistas farmacológicos de *KiSS-1* posee un considerable interés terapéutico, dada la capacidad de las kisspeptinas de activar potentemente el eje reproductor a lo largo de la vida⁴⁰.

Igualmente interesante será analizar en detalle la distribución del sistema neuronal KiSS-1 en el hipotálamo, sus aferencias y proyecciones, así como las interacciones entre kisspeptinas y otros reguladores centrales de las neuronas de Gn-RH. De hecho, estudios muy recientes han iniciado la caracterización del patrón de distribución de *KiSS-1* y *GPR54* en diversas áreas hipotálamicas y extrahipotálamicas del sistema nervioso central en roedores y primates^{35,39,41,42,48}. Estos análisis señalan la acción directa de las kisspeptinas en las neuronas de Gn-RH, pero también su implicación en funciones cerebrales distintas del control de la reproducción⁴⁸. En cuanto al estudio de las interacciones entre la kisspeptina y otros reguladores del eje reproductor, los datos publicados hasta la fecha indican que la kisspeptina mantiene su capacidad de activar potentemente la secreción de gonadotropinas aun tras el bloqueo de neurotransmisores relevantes en el control de Gn-RH, tales como glutamato y óxido nítrico^{33,34}. Igualmente, la kisspeptina es capaz de inducir respuestas secretoras de Gn-RH y gonadotropinas en condiciones de ayuno (concentración basal suprimida) y de ausencia de leptina^{37,43}. Más aún, muy recientemente se ha demostrado que las neuronas de KiSS-1 expresan receptores de leptina⁴⁹ y que la administración de esta adipocina puede normalizar expresión de *KiSS-1* suprimida en modelos de hipoleptinemia^{49,50}. Todo ello indica que la cascada de elementos reguladores del eje Gn-RH/gonadotropinas, las neuronas de KiSS-1 tienen una localización distal a los factores indicados, y pueden participar en la transmisión (y eventual integración) de un número diverso de señales implicadas en el control de la secreción de Gn-RH. Un modelo tentativo de integración del sistema KiSS-1 en los circuitos hipotalámicos de control de Gn-RH se presenta en la figura 2.

Otros aspectos de la fisiología del sistema KiSS-1 que requerirán atención en un futuro próximo son el análisis de la ontogenia y los cambios en la función de

este sistema a lo largo del desarrollo, así como la identificación de los mecanismos de señalización empleados por las kisspeptinas en su acción estimuladora de las neuronas de Gn-RH, caracterización que recientemente nuestro grupo ha iniciado⁴⁰. Igualmente interesante será evaluar el posible papel fisiológico de *KiSS-1* y *GPR54* en otros tejidos endocrinos relevantes (como la hipófisis y las gónadas), en los que la expresión de los elementos de este sistema ligando-receptor se ha descrito preliminarmente. En esta línea, nuestro grupo ha publicado recientemente el primer análisis exhaustivo de la expresión de *KiSS-1* y su regulación hormonal en el ovario⁵¹. Finalmente, considerando las implicaciones del sistema KiSS-1 en la progresión de ciertos tumores, es obligado analizar su posible papel (expresión y funciones) en diversos tumores neuroendocrinos.

En resumen, a pesar de su carácter muy reciente, podemos afirmar que la identificación del papel del sistema KiSS-1/GPR54 constituye uno de los mayores avances en nuestro conocimiento de la fisiología de la pubertad y la reproducción de las últimas décadas. De hecho, desde la identificación del Gn-RH en la década de los setenta, ningún factor individual se ha demostrado tan esencial (e indispensable) en el control de la función reproductora. Los datos experimentales gene-

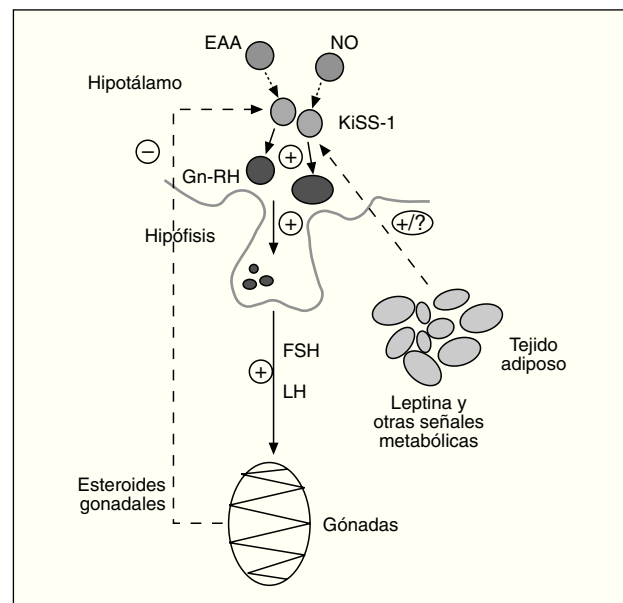


Fig. 2. Esquema tentativo de la localización de las neuronas de KiSS-1 en los complejos circuitos hipotalámicos de control de gonadoliberina (Gn-RH). La ubicación distal de las neuronas de KiSS-1, así como la demostración de acciones directas de kisspeptina sobre neuronas de Gn-RH, indica que el sistema KiSS-1 podría actuar como elemento de regulación final de la secreción de Gn-RH, que conduce y finalmente integra la información procedente de numerosas señales centrales (glutamato, óxido nítrico) y periféricas (hormonas gonadales, leptina y otros factores metabólicos) implicadas en el control del generador de pulsos de Gn-RH. Modelo hipotético generado a partir de los datos de diversos trabajos^{31,33,34,36,38,39,41-43,49,50}. EAA: aminoácidos excitotónicos; NO: óxido nítrico.

rados en los últimos 2 años permiten pronosticar que el estudio de las facetas reproductoras (y eventualmente no reproductoras) del sistema KiSS-1/GPR54 será una de las áreas más activas de la neuroendocrinología de la reproducción en los próximos años.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a los miembros de los grupos de investigación de la Universidad de Córdoba y la Universidad de Santiago de Compostela que han contribuido decisivamente a la realización de los trabajos propios descritos en esta revisión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res.* 2002;57:2-14.
2. Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. Gonadotropins and gonadotropin receptors. En: Fauser BCJM, editor. *Reproductive Medicine – Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals*. New York: Parthenon; 2003. p. 225-44.
3. Ojeda SR, Urbanski HF. Puberty in the rat. En: Knobil E, Neill JD, editores. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1995. p. 363-410.
4. Plant TM, Gay VL, Marshall GR, Arslan M. Puberty in monkeys is triggered by chemical stimulation of the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2506-10.
5. Richter TA, Terasawa E. Neural mechanisms underlying the pubertal increase in LHRH release in the rhesus monkey. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12:353-9.
6. Bourguignon JP, Gerard A, Franchimont P. Direct activation of gonadotropin-releasing hormone secretion through different receptors to neuroexcitatory amino acids. *Neuroendocrinology.* 1989;49:402-8.
7. Gearing M, Terasawa E. The α 1-adrenergic neuronal system is involved in pulsatile release of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in the ovariectomized female monkey. *Neuroendocrinology.* 1991;93:373-81.
8. Casanueva FF, Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20:317-63.
9. Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;188:9-13.
10. Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science.* 1997;275:88-90.
11. Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol.* 2004;226:1-9.
12. Fernández-Fernández R, Navarro VM, Barreiro ML, Vigo E, Tovar S, Sirotkin AV, et al. Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology.* 2005;146:3018-25.
13. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Chang R, Liu Y, Howard AD, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 1999;446:103-7.
14. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G protein-coupled receptor. *Nature.* 2001;411:613-7.
15. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 2001;276:28969-75.
16. Kotani M, Dethoux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* 2001;276:34631-6.
17. Lee JH, Welch DR. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer.* 1997;71:1035-44.
18. West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics.* 1998;54:145-8.
19. Colledge WH. GPR54 and puberty. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15:448-53.
20. Hori A, Honda S, Asada M, Ohtaki T, Oda K, Watanabe T, et al. Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:958-63.
21. Becker JA, Mirjolef JF, Bernard J, Burgeon E, Simons MJ, Vassart G, et al. Activation of GPR54 promotes cell cycle arrest and apoptosis of human tumor cells through a specific transcriptional program not shared by other Gq-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326:677-86.
22. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci.* 2004;117:1319-28.
23. Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki T, Kitada C, Usuki S, et al. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placental-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:914-9.
24. De Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10972-6.
25. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierino JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New Engl J Med.* 2003;349:1614-27.
26. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, et al. Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:1849-55.
27. Funes S, Hendrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:1357-63.
28. Messager S. Kisspeptin and its receptor: New gatekeepers of puberty. *J Neuroendocrinol.* 2005;17:687-8.
29. 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.* 2004;320:383-8.
30. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology.* 2004;145:4073-7.
31. 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 LH releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* 2004;145:4565-74.
32. Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillon WS, Todd JF, et al. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol.* 2004;16:850-8.
33. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, et al. Characterization of the potent LH releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology.* 2005;146:156-63.

34. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez 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;146:1689-97.
35. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:2129-34.
36. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:1761-6.
37. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:6609-15.
38. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, et al. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*. 2005;146:3917-25.
39. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*. 2004;80:264-72.
40. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castano JP, Malagon 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 Endocrinol*. 2006;257-258:75-83.
41. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 2005;146:2976-84.
42. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of KiSS1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005;146:3686-92.
43. Tena-Sempere M. Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology*. 2005;146:3683-5.
44. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. KiSS1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci*. 2006;26:6687-94.
45. Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol*. 2004;561:379-86.
46. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakowich SK, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*. 2005;25:11349-56.
47. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, et al. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*. 2005;146:4431-6.
48. Brailoiu GC, Dun SL, Ohsawa M, Yin D, Yang J, Chang JK, et al. KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2005;481:314-29.
49. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurons are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*. 2006;18:298-303.
50. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Roa J, Vigo E, Pineda R, et al. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes*. 2006;55:2602-10.
51. Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C, et al. Expression of KiSS-1 in rat ovary: Putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*. 2006; doi:10.1210/en.2006-0117.