

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Mecanismos celulares y
moleculares de acción
del sistema kiss1/kiss1r
en la hipófisis.**

**M^a ESTER GUTIÉRREZ PASCUAL
CÓRDOBA, 2009**

TITULO: *MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DE ACCIÓN DEL SISTEMA KISS1/KISS1R EN LA HIPOFISIS*

AUTOR: *MARIA ESTER GUTIERREZ PASCUAL*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2009
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-7801-936-6
D.L.: CO-509-2009

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA.**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Mecanismos celulares y moleculares de acción del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **M^a Ester Gutiérrez Pascual**,
Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctora en Ciencias.

Los Directores

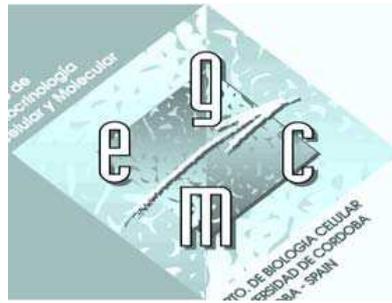
Dr. Justo Pastor Castaño Fuentes
Profesor Titular de Biología Celular de
la Universidad de Córdoba

Dr. Antonio Jesús Martínez Fuentes
Profesor Contratado Doctor de Biología
Celular de la Universidad de Córdoba

Dr. Hubert Vaudry
Profesor de la Universidad de Rouen
Francia



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CELULAR, FISIOLÓGICA E
INMUNOLOGÍA



GRUPO DE ENDOCRINOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR

D^o Justo Pastor Castaño Fuentes, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, **D^o Antonio Jesús Martínez Fuentes Profesores** Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba y **D^o Hubert Vaudry**, Profesor de la Universidad de Rouen, Francia

INFORMAN

Que **D^a M^a Ester Gutiérrez Pascual**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “Mecanismos celulares y moleculares de acción del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis.” y que bajo nuestro juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Ciencias.

Y para que conste, firman la presente en Córdoba, a 18 de Diciembre de 2008

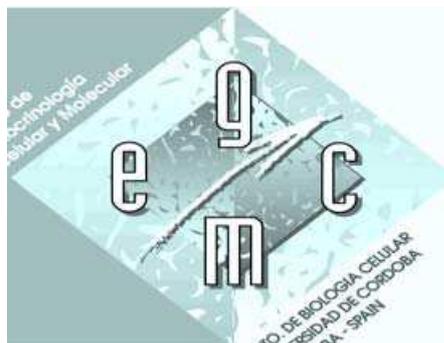
Fdo.: Prof. Dr. Justo P. Castaño
Fuentes

Fdo.: Prof. Dr. Antonio J. Martínez
Fuentes

Fdo: Prof. Dr. Hubert Vaudry



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CELULAR, FISIOLÓGICA E
INMUNOLOGÍA



GRUPO DE ENDOCRINOLOGÍA
CELULAR Y MOLECULAR

PURIFICACIÓN TOVAR BUSTOS, SECRETARIA DEL DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLÓGICA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE
CÓRDOBA

INFORMA

Que reunido el Consejo de Departamento el día 18 de Diciembre de 2008 acordó aprobar la presentación y posterior lectura de la Tesis Doctoral titulada “Mecanismos celulares y moleculares de acción del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis.”, presentada por D^a M^a Ester Gutiérrez Pascual y dirigida por D. Justo P. Castaño Fuentes, D. Antonio Jesús Martínez Fuentes y D. Hubert Vaudry.

Córdoba, a 18 de Diciembre de 2008.

VºBº

D. Francisco Gracia Navarro
Director del Departamento

D^a Purificación Tovar Bustos
Secretaria del Departamento

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. Justo Pastor Castaño Fuentes y Antonio Jesús Martínez Fuentes, en un proyecto subvencionado mediante una beca BFU2005-09 (Ministerio de Ciencia y Tecnología). Esta Tesis ha sido cotutelada por el Dr. Hubert Vaudry en el Laboratorio de Neuroendocrinología Celular y Molecular de la Universidad de Rouen, Francia, en estancias subvencionadas mediante becas concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

Llega el momento de mirar atrás y hacer memoria, y es cuando me doy cuenta de todas las experiencias vividas, de la madurez y los conocimientos adquiridos, y de las personas que he conocido y que de una manera u otra me han ayudado durante todos estos años.

De entre todas estas personas quisiera agradecer en primer lugar a mis Directores Justo Castaño, Antonio Jesús Martínez y Hubert Vaudry por la confianza que depositaron en mí desde el principio, por su apoyo y por todo lo que me han enseñado durante todos estos años. Justo, tu me transmitiste esa ilusión por la ciencia que te engancha y te hace seguir adelante, de ti he aprendido mucho, tanto a nivel científico como a nivel personal. Muchas gracias por tu paciencia, tu constancia, todos tus esfuerzos y todas las horas sin dormir que has dedicado a mi trabajo y a que el grupo siga adelante. Antonio, tu has estado desde el primer día apoyándome tanto en el laboratorio como en el despacho, siempre he valorado mucho tener tan cerca a alguien con tanta experiencia y conocimientos, y con tantas anécdotas que contar. Y por supuesto quisiera agradecer a Hubert por haber formado parte de este trabajo, por ofrecerme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su hospitalidad durante mis estancias en Rouen y por su siempre disponibilidad para ayudarnos.

Además de mis directores, son muchas las personas que han hecho posible este trabajo, y que por tanto quiero dar las gracias. Por supuesto agradecer a Paco Gracia, el responsable de que este grupo exista, se mantenga en pie y siga adelante. Muchas gracias también a María de Mar, que desde el principio de la tesis me ha apoyado y ayudado, y que siempre ha representado para mí un modelo a seguir en mi trabajo.

Por supuesto no puedo olvidarme de todos mis compañeros de laboratorio, siempre dispuestos a ayudar, a escuchar, a reír y a hacer el día a día mucho más fácil. Empezando por los mayores, Raúl tu vuelta al departamento ha sido como una inyección de energía, aprecio mucho tus ganas de trabajar y de ayudar a los demás, sin olvidarnos de lo mucho que me han ayudado tus kits. Mario, gracias por compartir conmigo tus conocimientos, siempre que he tenido alguna duda metodológica tu has sabido resolvérmela, y si no te la has inventado, pero siempre funcionaba. Ana, con tu llegada trajiste una nueva forma de trabajar y de ver la ciencia, muchas gracias por escucharme y por todos tus consejos. Luego están David, Manuel David, Marina, Alberto y Jose, con los que he compartido tantas horas de trabajo y sufrimiento en el laboratorio, pero a los que sobre todo quiero agradecer los buenos momentos que hemos vivido juntos. Davichin, de ti admiro tu integridad como persona, tu seriedad y constancia en el trabajo, y siempre recordaré con mucho cariño todas las horas de viaje que compartimos hasta que te compraste la bici. Manuel David, siempre de buen humor, con una sonrisa y dispuesto a ayudar, a animar y a hacer reír a tus compañeros. Marinilla, que “apañá” eres, siempre pendiente de que todos estemos bien, dispuesta a escuchar y a ayudar. Alberto,

aunque no acabo de entender que hace aquí un veterinario de Madrid, y que estás más tiempo en EE.UU que aquí, muchas gracias por tu forma de ser. Y por último Jose, tu eres nuestra wikipedia, eres auténtico no cambies nunca. A todos os deseo mucha suerte, y os doy las gracias por todo. María y a Anabel, no sé qué hacíamos antes de que trabajarais en el laboratorio, pero si se que ahora sin vosotras no seriamos capaces de terminar los experimentos, muchas gracias a las dos.

No quiero olvidarme de Soco, Rafa, Juanrra y Yolanda, que aunque no hayamos tenido mucho contacto por nuestras diferentes líneas de investigación, siempre habéis estado ahí para resolver mis dudas y para escuchar. Tampoco quiero olvidarme de Paqui y Marcelo, gracias por vuestro apoyo cuando empezaba a dar mis primeros paso en esto de la ciencia y mucha suerte, ni de todos los estudiantes extranjeros que han ido pasando todos estos años por el laboratorio, Ruben, Emilie, Cristin, Anouk, Marta, todos han ido dejando su huella.

Realmente cuando te das cuenta de cómo pasa el tiempo es cuando ves a los becarios que están empezando, Belen, Yoana, Farid, espero que tengáis mucha suerte, pero sobre todo mucho ánimo y paciencia, al final todo tiene recompensa.

Muchísimas gracias a Rosa y a Mercedes, que nos hacéis mucho más fácil el día a día en el trabajo, siempre de buen humor y dispuestas a solucionar nuestros problemas, estoy segura que sin vosotras no funcionaría nada en este departamento.

De mis estancias en Rouen quisiera dar las gracias a Jérôme Leprince y Marie Christine Tonon, que desde el principio se volcaron en ayudarme y hacerme sentir como en casa, y a toda la gente del laboratorio que me ofreció su apoyo en todo momento. Para mi Rouen ha sido una experiencia inolvidable tanto científica como personalmente, allí hice grandes amigos, Naia, Ben y Mick, que estuvieron a mi lado en los mejores y en los peores momentos. Merci beaucoup a tous!

Una parte muy importante de mi trabajo la he realizado en el laboratorio de Manolo Tena, a quien también quisiera dar mi agradecimiento, para mi ha sido muy importante contar con la ayuda de un experto en el área de las kisspeptinas. Y por supuesto muchas gracias a Leonor Pinilla, a Victor, Patxi, Toñi, Ana y toda la gente del laboratorio que me ha ayudado en los RIAs.

La madurez y los conocimientos que he acumulado en estos últimos años a nivel científico no habrían sido posibles sin el apoyo de mi familia y mis amigos, por eso quisiera agradecer a todos desde aquí vuestro apoyo en los momentos más difíciles. Hay una persona que es realmente responsable de que haya llegado hasta aquí y a quién mas tengo que agradecer, Javi tu has sabido escucharme y darme fuerzas para seguir adelante, has compartido conmigo los peores y los mejores momentos de la tesis, y sin ti no lo habría

conseguido. Muchísimas gracias por tu paciencia y comprensión, por estar siempre a mi lado y por querer compartir tu vida conmigo. Y por supuesto a mi madre, gracias a ti estoy aquí, tu me has enseñado a luchar, a levantar la cabeza y seguir adelante, muchas gracias.

A mis amigos, que me ayudaron a desconectar del trabajo, aunque eso para los que trabajamos en ciencia es muy difícil. Muchas gracias por vuestras palabras de ánimo, por vuestros consejos, por escucharme y por aguantarme.

Todos vosotros formáis parte de esta tesis.

Muchas gracias.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACTH	Adenocorticotropina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
ARC	Núcleo arcuato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AVPV	Núcleo anteroventral periventricular
BSA	Seroalbúmina bovina
[Ca ²⁺] _i	Concentración intracelular de calcio libre citosólico
CHO-K1	Línea celular procedente de ovario de hámster chino
CRF	Factor liberador de corticotropina
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DEPC	Dietil-etil-pirocarbonato
dNTPs	Desoxiribonucleótidos trifosfato
E2	Estradiol
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FRET	Transferencia de Energía de Resonancia por Fluorescencia (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
FSH	Hormona estimulante del folículo (Follicle Stimulating Hormone)
GH	Hormona del crecimiento (Growth Hormone)
GHRH	Hormona estimuladora de la secreción de GH
GHRH-R	Receptor de GHRH
GHS-R	Receptor de ghrelina
GIP	Péptido inhibidor gástrico (Gastric Inhibitory Polypeptide)
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1 (Glucagon-like peptide-1)
GnRH	Hormona estimuladora de la liberación de gonadotropinas (Gonadotropin Releasing Hormone)
GnRH-R	Receptor de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone Receptor)
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G (G Protein Coupled Receptor)
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico

H ₂ O	Agua bidestilada
HPG	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal
i.c.v.	Inyección intracerebroventricular
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (Insulin-like Growth Factor-1)
IgG	Inmunoglobulina G
LH	Hormona luteinizante (Luteinizing Hormone)
MEM	Medio esencial mínimo
DMEM	Medio esencial mínimo Dulbecco's
ORX	Orquidectomía
OVX	Ovariectomía
PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisario (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRL	Prolactina
PVN	Núcleo paraventricular
RIA	Radioinmunoensayo
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción o transcripción inversa
rt-PCR	PCR en tiempo real
SEM	Error estándar de la media
SNC	Sistema nervioso central
SRIF	Somatostatina (Somatotropin Release-Inhibiting Factor)
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina (Thyrotropin Releasing Hormone)
TSH	Hormona estimuladora del tiroides o tirotrópina (Thyroid Stimulating Hormone)
VIP	Péptido intestinal vasoactivo (Vasoactive Intestinal Peptide)

RESUMEN

Las kisspeptinas (kps) son una familia de péptidos derivados de un precursor común codificado por el gen *kiss1*, caracterizado inicialmente por su capacidad para inhibir la metástasis tumoral a través de su receptor *kiss1r*. Más recientemente, numerosos estudios han demostrado que el sistema *kiss1/kiss1r* juega un papel esencial en el control neuroendocrino del eje reproductor, donde actúa estimulando la liberación de GnRH a nivel hipotalámico. Sin embargo, la expresión de *kiss1* y *kiss1r* en tejidos distintos pero relacionados con el hipotálamo nos llevó a postular que estas moléculas podrían ejercer funciones reguladoras en lugares adicionales del sistema neuroendocrino, como la hipófisis y dos de sus dianas fisiológicas, el testículo y el tejido adiposo. Los resultados de la presente Tesis demuestran que, en efecto, *kiss1* y *kiss1r* se expresan funcionalmente en células de hipófisis de ratas peripuberales en cultivo, de modo que el tratamiento con kisspeptina 10 (kp-10) induce un incremento del nivel de calcio libre citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) de una subpoblación de gonadotropas y somatotropas y estimula consecuentemente la liberación de LH y GH. Además, observamos que la presencia de E2 en el medio de cultivo provoca una sensibilización diferencial de la respuesta de las células adenohipofisarias a la kp-10, que se refleja en aumentos de la proporción de células que muestran incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la expresión de los receptores para GHRH y ghrelina, claves en la función de las somatotropas, y que en ciertos casos, facilita la secreción hormonal en respuesta a kp-10. Igualmente, observamos que en la hipófisis se produce una regulación sutil, homóloga y heteróloga, del sistema *kiss1/kiss1r*, de modo que sus niveles de expresión sufren modificaciones durante el desarrollo postnatal, así como tras el tratamiento *in vitro* con GnRH, GHRH y/o kp-10 y bajo diferentes condiciones metabólicas, siendo tales modificaciones dependientes del género del animal y de la presencia de esteroides sexuales. Por último, observamos que el sistema *kiss1/kiss1r* se expresa en órganos distales al eje hipotálamo-hipofisario como son el testículo y el tejido adiposo de rata y ratón, y que su expresión está regulada durante el desarrollo postnatal, así como por factores metabólicos y por los niveles energéticos. El conjunto de nuestros resultados apoya la hipótesis de que el sistema *kiss1/kiss1r* puede actuar como un integrador entre los ejes metabólico, somatotrópico y reproductor actuando a múltiples niveles, desde el hipotálamo a la hipófisis y sus dianas.

Las importantes funciones reguladoras del sistema *kiss1/kiss1r* hacen interesante el desarrollo análogos con actividad agonista/antagonista más potentes y eficaces. Hemos generado una serie de análogos de la kp-10 de rata mediante sustituciones puntuales de cada uno de sus aa por Alanina, y analizamos sus propiedades funcionales mediante estudios *in vivo* e *in vitro*. Nuestros resultados indican que las posiciones 6 y 10 de la kp-10 son críticos para la activación de *kiss1r*, y sugieren que las modificaciones en estas posiciones, especialmente la 6, podrían permitir la generación de nuevos análogos de la kp-10 con valiosas aplicaciones terapéuticas.

SUMMARY

Kisspeptins (kps) are a family of peptides derived from a common precursor encoded by *kiss1* gene, which were initially characterized by their capacity to inhibit tumor metastasis through their receptor *kiss1r*. More recently, a number of studies have demonstrated that the *kiss1/kiss1r* system plays an essential role in the neuroendocrine control of the reproductive axis, where it acts stimulating GnRH secretion at the hypothalamic level. However, *kiss1* and *kiss1r* expression in tissues distinct from but related to the hypothalamus, prompted us to propose that these molecules may exert regulatory functions in additional places of the neuroendocrine system, such as the pituitary and two of its physiological targets: testis and adipose tissue. Results from this Thesis show that, indeed, *kiss1* and *kiss1r* are functionally expressed in cultured pituitary cells from peripubertal rats, where kp-10 treatment elicits an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in a subset of gonadotropes and somatotropes and consequently stimulates LH and GH release, respectively. Moreover, we observe that presence of E2 in culture medium evokes a differential sensitization in pituitary cells to kp-10, by increasing both the proportion of kp10-responsive cells in terms of $[Ca^{2+}]_i$ and the expression of GHRH and Ghrelin receptors, which are essential for somatotrope function, and also in some cases, by facilitating hormone secretion in response to kp-10. Similarly, we observe that the *kiss1/kiss1r* system is under a fine regulation, both homologous and heterologous, in pituitary, since their expression levels undergo modifications throughout postnatal development, as well as after *in vitro* treatment with GnRH, GHRH and/or kp-10, and under different metabolic conditions. Moreover, these modifications are dependent on animal gender and on the presence of sex steroids. Finally, we observe that the *kiss1/kiss1r* system is expressed in peripheral tissues, like testis and adipose tissue, in rat and mouse, and that this expression is regulated during postnatal development, and by metabolic factors and energy status. Taken as a whole, our results support the hypothesis that the *kiss1/kiss1r* system may operate as an integrator between metabolic, somatotropic and reproductive axes, by acting at multiple levels, from the hypothalamus to the pituitary and their targets.

The important regulatory functions of *kiss1/kiss1r* system make it interesting to develop analogs with agonist/antagonist activity, and more potency and efficiency. We have generated a series of rat kp-10 analogs by means of substitutions of each aa by Alanine, and we have analyzed their functional properties using *in vivo* and *in vitro* studies. Our results indicate that positions 6 and 10 of kp-10 are critical for *kiss1r* activation, and suggest that new modifications in these positions, especially in the position 6, may enable the generation of new analogs of kp-10 with valuable therapeutic applications.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Sistema kiss1/kiss1r.....	1
1.1. KISS1 y KISS1R.....	1
1.2. Papel del sistema KISS1/KISS1R en la metástasis tumoral.....	4
1.3. Papel del sistema KISS1/KISS1R en el control neuroendocrino de la reproducción.....	5
1.4. Otras funciones del sistema KISS1/KISS1R.....	11
2. El Eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal (HPG).....	21
2.1. Hipotálamo.....	21
2.2. Hipófisis.....	27
2.3. Gónadas.....	35
3. Tejido Adiposo.....	37
II. HIPÓTESIS.....	43
III. OBJETIVOS.....	45
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
1. Material biológico.....	47
2. Material y reactivos.....	47
3. Técnicas básicas de Biología Celular.....	49
3.1. Dispersión celular.....	49
3.2. Cultivo de células hipofisarias de rata.....	49
3.3. Obtención y mantenimiento de la línea monoclonal estable CHO-K1rkiss1r.....	50
3.4. Estudios de microfluorimetría.....	51
-Medida de la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre células individuales.....	51
-Medida de la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre poblaciones celulares mediante el sistema FlexStation II.....	52
3.5. Cuantificación hormonal mediante radioinmunoensayo.....	53
4. Técnicas básicas de Biología Molecular.....	54
4.1. Aislamiento de ARN.....	54
4.2. Retrotranscripción de ARN.....	54
4.3. Diseño de oligonucleótidos.....	54
4.4. Estudios de expresión génica.....	55
- PCR convencional.....	55
- PCR cuantitativa a tiempo real.....	56
- Síntesis de curvas estándar.....	57
4.5. Clonación del receptor kiss1r de rata.....	58

5. Tratamientos experimentales.....	60
5.1. Análisis de la acción <i>in vitro</i> de la kp-10 sobre la hipófisis de rata.....	60
5.2. Efecto de los esteroides sexuales en el sistema kiss1/kiss1r.....	61
5.3. Análisis de la expresión del sistema kiss1/kiss1r durante el desarrollo postnatal de la rata.....	63
5.4. Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r bajo diferentes condiciones metabólicas en ratón.....	64
6. Análisis estadístico.....	65
7. Protocolos.....	66
V. RESULTADOS.....	69
1. Sistema kiss1/kiss1r en la adenohipófisis.....	69
1.1. Funcionalidad del sistema kiss1/kiss1r en la adenohipófisis de rata.....	69
1.1.1. Efecto de la kp-10 en la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en células de adenohipófisis de ratas peripuberales.....	70
1.1.2. Regulación de la secreción hormonal por la kp-10 en cultivos de células adenohipofisarias de ratas peripuberales.....	73
1.2. Regulación del sistema kiss1/kiss1r por esteroides sexuales en la adenohipófisis de la rata.....	78
1.2.1. Efecto de la presencia de E2 sobre la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al tratamiento con kp-10.....	78
1.2.2. Efecto de la presencia de E2 sobre la secreción hormonal en respuesta a kp-10.....	80
1.3. Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r en la adenohipófisis...83	
1.3.1. Regulación del sistema kiss1/kiss1r durante el desarrollo postnatal de la adenohipófisis de la rata.....	84
1.3.2. Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r por factores hipotalámicos en la adenohipófisis de la rata.....	86
1.3.3. Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r por esteroides sexuales en la adenohipófisis de la rata.....	91
1.3.4. Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis del ratón bajo distintas condiciones metabólicas.....	93
2. Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r en dianas externas al sistema hipotálamo-hipofisario en rata y ratón.....	95
2.1. Expresión del sistema kiss1/kiss1r en el testículo.....	96
- Expresión del sistema kiss1/kiss1r en el testículo de rata durante el desarrollo postnatal	96

-Expresión del sistema kiss1/kiss1r en el testículo de ratón bajo distintas condiciones metabólicas	97
2.2. Expresión del sistema kiss1/kiss1r en el tejido adiposo.....	99
- Expresión del sistema kiss1/kiss1r en el tejido adiposo de la rata durante el desarrollo postnatal	99
-Expresión del sistema kiss1/kiss1r en el tejido adiposo del ratón bajo distintas condiciones metabólicas	103
3. Diseño y análisis funcional de nuevos análogos de la kp-10 de rata.....	105
VI. DISCUSIÓN.....	113
1. Sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis de la rata.....	113
1.1. Funcionalidad del sistema kiss1/kiss1r en la adenohipófisis.....	113
1.2. Regulación de la acción del sistema kiss1/kiss1r por esteroides sexuales en la adenohipófisis.....	117
1.3. Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r en la adenohipófisis.....	119
2. Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r en dianas externas al eje hipotálamo-hipofisario en la rata y el ratón.....	128
2.1. Expresión del sistema kiss1/kiss1r en el testículo.....	128
2.2. Expresión del sistema kiss1/kiss1r en el tejido adiposo.....	130
3. Diseño y análisis funcional de nuevos análogos de la kp-10 de la rata.....	132
VII. CONCLUSIONES.....	137
VII. CONCLUSIONS.....	139
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	141

I.INTRODUCCIÓN

1. Sistema kiss1/kiss1r.

1.1 KISS1 y KISS1R

El gen *KISS1* se identificó por primera vez en 1996 como un gen sobreexpresado en líneas celulares de melanoma con baja capacidad metastática ^{1, 2}. En 1998 se llevó a cabo la clonación y localización cromosómica del gen *KISS1* en humanos, y se observó el carácter antimetastático de este gen ³. Los productos peptídicos del gen *KISS1* se caracterizaron en el año 2001 y se denominaron kisspeptinas (kps). Se trata de una familia de proteínas originadas por el procesamiento proteolítico diferencial de un precursor común o pre-proteína de 145 aa (Fig. 1), que da lugar como producto mayoritario a la kisspeptina-54 (kp-54) o metastina en virtud de su capacidad para inhibir la metástasis tumoral. En roedores, el gen *Kiss1* presenta una homología de entre un 46% y un 52% con su ortólogo humano, y codifica un precursor proteico de 130 aa, cuyo procesamiento da lugar a la kp-52. Tanto en humano como en roedores, además de la kp-54 y la kp-52 respectivamente, también se originan una serie de fragmentos más cortos y de secuencia más conservada, como la kp-14 y kp-13, que junto con la kp-10, comparten los 10 aa de la región C-terminal. Esta región presenta el motivo terminal Arg-Phe-NH₂ característico de la superfamilia de péptidos RF-amida, con funciones de neurotransmisión y neuromodulación (Fig. 1), y es la región biológicamente activa responsable de la unión de las kps al receptor y de su activación ⁴⁻⁶.

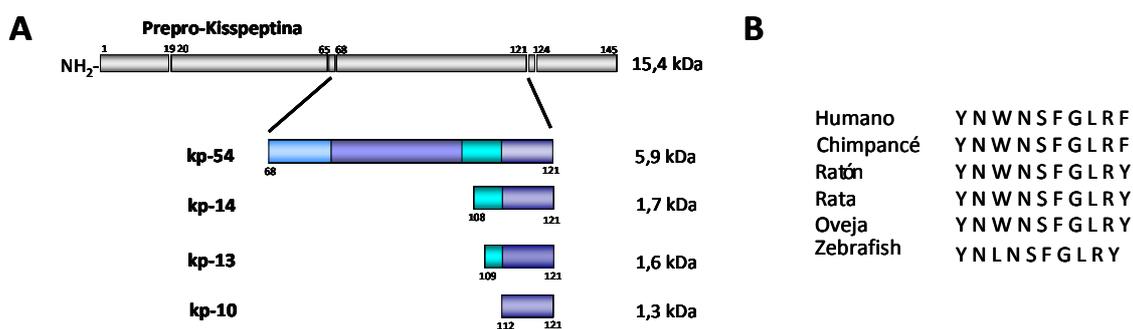


Fig.1. (A). Procesamiento proteolítico del precursor del gen *KISS1* para generar la familia de las kisspeptinas. **(B)** Comparación de la secuencia de kisspeptina-10 (kp-10) de distintas especies.

En el año 1999, en un contexto sin conexión con los estudios sobre *kiss1*, se clonó a partir de tejido de rata un receptor acoplado a proteína G inicialmente huérfano, denominado por ello GPR54, y actualmente conocido como *kiss1r*. Posteriormente, se identificó su ortólogo humano, llamado inicialmente AXOR12 o hOT7T175, y conocido actualmente como *KISS1R*^{5, 6}. Aunque su descubrimiento tuvo origen en la elevada homología de su secuencia (>40%) con la de los receptores de galanina⁷, poco después se demostró que no hay interacción funcional entre la galanina y el receptor de *kiss1*⁶.

Dos años más tarde se estableció por primera vez la conexión entre *KISS1R* y sus ligandos, los productos del gen *KISS1*, gracias a la observación de que la kp-54 inhibía la metástasis pulmonar de células de melanoma *in vivo*, a través de su interacción con *KISS1R*⁶. Esta observación se confirmó por dos estudios adicionales^{4, 5}, en los que se reveló que las kps son capaces de unirse y activar al receptor *KISS1R*, siendo la kisspeptina-10 (kp-10) la que lo hace con mayor actividad.

En humanos, el ARNm de *KISS1* se expresa mayoritariamente en placenta, y también se detecta su expresión en testículo, páncreas, hígado e intestino delgado (Fig 2.1 y 2.2)^{4, 6}, mientras en rata, el ARNm de *kiss1* se expresa de forma mayoritaria en colon, ovario, útero, intestino delgado, hígado, bazo y riñón, aunque también se detecta su expresión en otros tejidos (Fig 2.3)⁸. El ADNc de *KISS1* se ha clonado en humano, chimpancé, macaco, toro, rata, ratón, oveja y cerdo, pero su secuencia todavía no se ha clonado en especies de no mamíferos, aunque recientemente se han aportado evidencias sobre la presencia del sistema *kiss1/kiss1r* en el pez cebra y la rana toro^{9, 10}.

El ARNm de *KISS1R* en humano se expresa en cerebro, incluyendo el hipotálamo, y en otros órganos como la hipófisis, la placenta y el páncreas (Fig 2.1 y 2.2)^{4, 6}. Mientras que en rata, el ARNm de *kiss1r* se detecta principalmente en cerebelo, ovario, colon y placenta, y en menor medida en otros tejidos (Fig 2.3)⁸. La secuencia de *KISS1R* se ha clonado no sólo en especies de mamíferos como humano, macaco, rata, ratón y cerdo, sino que también se ha clonado en algunas especies de no mamíferos como la rana toro, el erizo de mar, el pez cebra, la tilapia, la lisa y la corvina⁹⁻¹⁴.

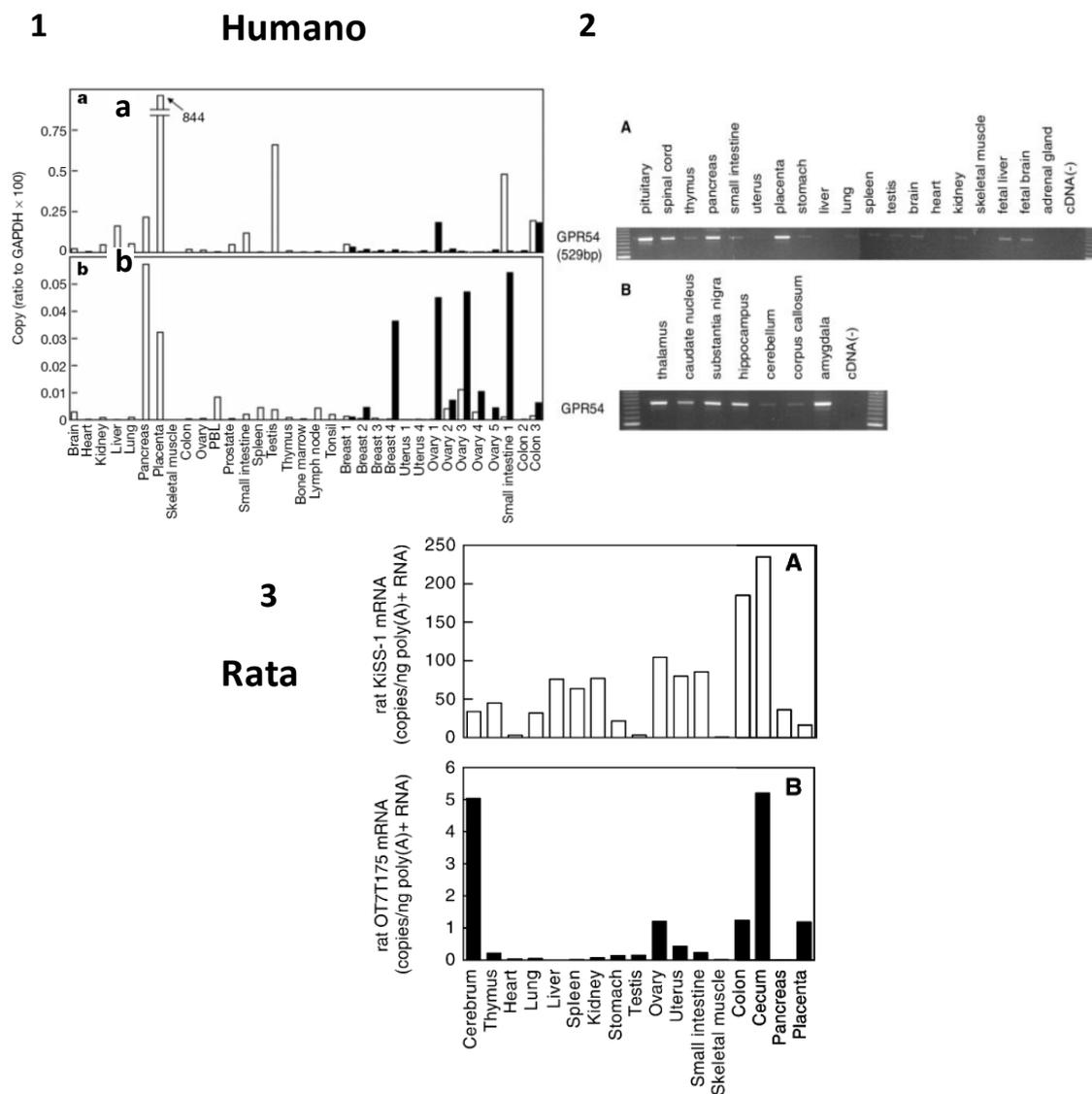


Fig. 2. Expresión del sistema KISS1/KISS1R en diferentes tejidos humano y rata. **(1)** Análisis mediante rt-PCR de KISS1 (a) y KISS1R (b) en tejidos humanos normales (blanco) y en tejidos tumorales (negro) (tomado de Ohtaki *et al.*⁶). **(2)** Determinación mediante rt-PCR de la distribución de KISS1R en diversos tejidos (A) y regiones del cerebro (B) humanos (tomado de Kotani *et al.*⁴) **(3)** Análisis mediante PCR de la distribución de kiss1 (A) y kiss1r (B) en varios tejidos de rata (tomado de Terao *et al.*⁸).

En los últimos cinco años se han usado distintos términos para referirse a kiss1 y a su receptor, lo que en ocasiones generaba cierta confusión ya que no permitían distinguir si se hablaba del gen o de la proteína, ni tampoco permitían diferenciar entre especies. Un artículo de revisión publicado recientemente propone emplear una nueva nomenclatura unificada para los componentes del sistema kiss1/kiss1r, que es la que seguiremos en este trabajo (Tabla 1)¹⁵.

ESPECIE	Kisspeptina		Receptor de la kisspeptina	
	Gen/ARNm	Péptido	Gen/ARNm	Péptido
Humano	<i>KISS1/</i> <i>KISS1 ARNm</i>	KISS1	<i>KISS1R/</i> <i>KISS1R ARNm</i>	KISS1R
Especies no humanas	<i>kiss1/</i> <i>kiss1 ARNm</i>	kiss1	<i>kiss1r/</i> <i>kiss1r ARNm</i>	kiss1r

Tabla 1. Nomenclatura recomendada para el gen y la proteína de la kisspeptina y su receptor en humano y en no humanos¹⁵.

1.2. Papel del sistema KISS1/KISS1R en la metástasis tumoral.

Diferentes análisis funcionales demostraron que tanto la kisspeptina como las demás kps son capaces de inhibir la metástasis en diferentes tumores como melanoma, cáncer de mama, cáncer de páncreas, carcinoma de tiroides, carcinoma de ovario y carcinoma de vesícula biliar, hepatocarcinomas y feocromocitomas malignos^{2, 6, 16-21}. La regulación a la baja de la expresión del gen *KISS1* se ha considerado como un índice de mala prognosis en la metástasis de tumores como melanomas, tumores gástricos, tumores de vejiga y células de carcinoma esofágico^{16, 19, 22, 23}. En este sentido, se han obtenido numerosas pruebas moleculares y clínicas que sugieren que el sistema KISS1/KISS1R juega un importante papel en la inhibición de la metástasis y progresión tumoral²⁴, un fenómeno con obvias implicaciones terapéuticas. Sin embargo, la posibilidad de que KISS1 sea un supresor universal de la metástasis está aún sometida a debate, ya que algunos estudios recientes en cáncer de mama y en carcinoma hepatocelular han puesto de manifiesto que, al menos en estos tipos de tumores, la sobre-expresión de KISS1 resulta en fenotipos más agresivos y con peor prognosis^{25, 26}.

1.3. Papel del sistema KISS1/KISS1R en el control neuroendocrino de la reproducción.

-Mutaciones de KISS1R e hipogonadismo hipogonadotrópico.

En el año 2003, la investigación en el campo de las kps sufrió un cambio espectacular cuando los grupos liderados por de Roux²⁷ y Seminara²⁸ descubrieron, de forma independiente, la presencia de deleciones y mutaciones inactivantes del receptor KISS1R en pacientes afectados de hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (Fig 3). Clínicamente este síndrome se caracteriza por la ausencia o el retraso del inicio de la pubertad e infertilidad como consecuencia de los bajos niveles plasmáticos de gonadotropinas y esteroides sexuales²⁹.

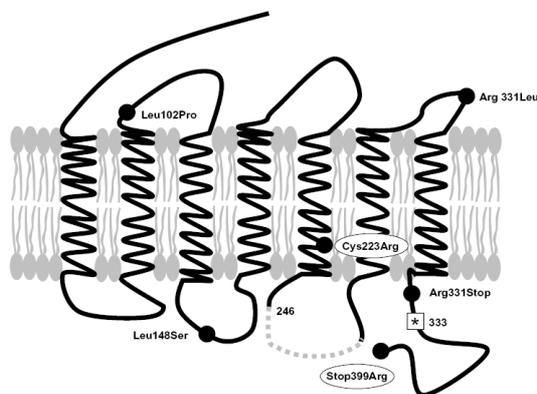


Fig. 3. Representación esquemática de las deleciones y mutaciones inactivantes del gen KISS1R observadas en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico. Los puntos negros indican las mutaciones, con la referencia de la sustitución aminoacídica. Los puntos grises indican la deleción predicha por de Roux *et al.*²⁷. El asterisco indica la posición predicha por Lanfranco *et al.*³⁰ para la inserción que provoca un cambio en la fase de lectura (tomado de Roa *et al.*³¹).

El indispensable papel de KISS1R en la fertilidad de los mamíferos se corroboró mediante la generación de ratones carentes del gen *kiss1r*, que presentaban un fenotipo similar a los humanos que sufrían inactivación de *KISS1R*^{28, 32-35}. En concreto, los ratones knock-out (KO) macho presentan los caracteres sexuales secundarios poco desarrollados, con testículos de pequeño tamaño y bajos niveles de testosterona (Fig. 4), mientras que las hembras presentan defectos en la apertura vaginal, ovarios y útero de pequeño tamaño y fallos en la concepción (Fig. 4). Posteriormente, se demostró que ratones KO para *kiss1* presentan un fenotipo similar a los ratones carentes de *kiss1r*^{34, 36}. En ambos tipos de ratones, la falta de desarrollo completo del

sistema reproductor no parece ir acompañada de otros defectos de similar magnitud en el resto de sistemas orgánicos, si bien no se descarta que pueda existir otro tipo de alteraciones más sutiles que aún estén por descubrir.

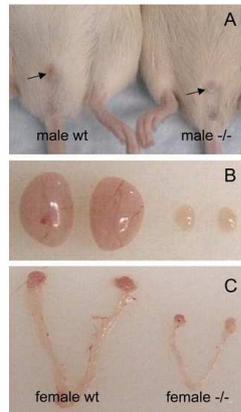


Fig. 4. Anatomía de los órganos reproductores de ratones macho y hembra silvestres (wt) y mutantes para *kiss1r* (-/-). **(A)** Reducción del tamaño del pene de los ratones silvestres en comparación con los ratones mutantes. **(B)** Los testículos de los ratones mutantes se reducen en tamaño comparados los ratones silvestres. **(C)** El tamaños de los ovarios y el útero de ratones mutantes es menor que en los de ratones silvestres (tomado de Funes *et al.* ³²).

El conjunto de estas observaciones llevó a proponer en un tiempo realmente reducido que el sistema *kiss1/kiss1r* desempeña un papel esencial en el control del inicio y el correcto desarrollo de la pubertad, lo cual provocó un giro inesperado en las líneas de investigación que se estaban llevando a cabo en ese momento sobre las kps y su receptor, pues estaban centradas fundamentalmente en su papel en la regulación de la metástasis. A partir de dichos descubrimientos, comenzaron a aparecer numerosos estudios enfocados al estudio de su papel en el control del eje reproductor. Por ello, la función más y mejor estudiada hasta la fecha del tándem KISS1/KISS1R es la relacionada con el control neuroendocrino de la reproducción a nivel hipotalámico.

- Kiss1 estimula la secreción de gonadotropinas actuando sobre las neuronas GnRH.

En la regulación neuroendocrina de la reproducción, un considerable número de estudios ha confirmado que las kps representan uno de los más potentes estímulos de la secreción de gonadotropinas. Así, la función de las kps sobre la liberación de gonadotropinas se ha estudiado mediante inyección sistémica (intravenosa, intraperitoneal o subcutánea) o i.c.v. del péptido en distintas especies como rata ³⁷⁻⁴³,

ratón^{44, 45}, oveja⁴⁵, primates^{46, 47}, y humano⁴⁸, en todas las cuales se ha observado que las kps estimulan notablemente la liberación de gonadotropinas. El primer estudio de administración crónica de kp se llevó a cabo en macacos macho castrados, a los que se les inyectó por vía intravenosa kp-10 (100 µg/h) durante 4 días⁴⁹. En estas condiciones, la secreción de LH se vio estimulada en un periodo inicial de 3 h seguido de una disminución. Además, estos animales conservan la liberación de LH en respuesta a NMDA y GnRH durante el periodo de infusión, demostrando así la integridad funcional de las neuronas GnRH y de las células gonadotropas. Así pues, la infusión continua de kp parece desensibilizar al receptor kiss1r más que a otros componentes del eje hipotalámico-hipofisario en monos juveniles⁵⁰. Este estudio se completó usando monos adultos macho no castrados, en los que se observó un incremento similar de la secreción de LH tras infusión de kp-10, seguido de un descenso en tiempos más largos de infusión⁵⁰. En contra de lo observado en monos juveniles, la secreción de LH en respuesta a la inyección de NMDA y GnRH fue de menor entidad, lo que sugiere que en monos adultos, la administración continua de kp desensibiliza tanto a kiss1r en hipotálamo, como a GnRH-R en hipófisis⁵⁰. En ratas, la administración crónica de kp-54 vía subcutánea incrementa inicialmente la liberación de LH y testosterona tras 1 día de administración para seguidamente disminuir en el segundo día. Además, la administración prolongada de kp-54 durante 13 días reduce el peso de los testículos y ocasiona en última instancia la degeneración de los túbulos seminíferos⁵¹.

Por otro lado, se observó que la mayoría de las neuronas GnRH en mamíferos (más del 90%) expresan *kiss1r*^{37, 45, 52}, haciéndose extensible esta expresión hasta peces cíclidos, lo que es indicativo de un alto grado de conservación evolutiva de su función desde vertebrados poiquiloterms hasta mamíferos¹³. Las kps activan las neuronas GnRH como, demuestra el hecho de que tras su administración aumenta la inmunoreactividad de c-fos^{37, 39}, y en ratones mutantes para *kiss1r* las respuestas de estas neuronas a las kps están ausentes. El conjunto de todos los resultados obtenidos permite afirmar que la principal función *in vivo* de las kps es actuar vía kiss1r para estimular de forma directa a nivel hipotalámico la secreción de GnRH, la cual actúa sobre la hipófisis para estimular la liberación de las gonadotropinas. A su vez, la

estimulación de *kiss1r* por las kps en neuronas GnRH puede estar modulada por un mecanismo de retroalimentación negativo por la propia GnRH. Mediante técnicas de FRET, que permiten determinar la interacción de proteínas, se ha observado que *kiss1r* y GnRH-R heterodimerizan en células HEK-293⁵³, y además, el aumento de la liberación de GnRH inducida por la kp-10 en la línea neuronal GT1-7 puede inhibirse por la propia GnRH⁵³. Esto sugiere que la reconocida capacidad de GnRH para suprimir su propia secreción podría implicar una acción del receptor GnRH-R, modificando la señalización *kiss1/kiss1r*.

El conjunto de datos disponibles ha permitido la elaboración de un modelo (Fig. 5), en el que la kp es secretada a nivel hipotalámico por neuronas de los núcleos AVPV y ARC, en los que estimula la secreción de GnRH, la cual a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario alcanza la hipófisis e induce la secreción de LH y FSH. Estas hormonas son liberadas al torrente sanguíneo y alcanzan las gónadas, en las que inducen la liberación de esteroides sexuales, los cuales a través de un mecanismo de retroalimentación regulan la actividad de las neuronas *kiss1* a nivel hipotalámico, inhibiendo la expresión de *kiss1* en el núcleo ARC, e induciéndola en el núcleo AVPV⁵⁴. Este efecto contribuye a la oleada preovulatoria de LH en hembras, y muy posiblemente el desarrollo sexual mediado por la testosterona en machos.

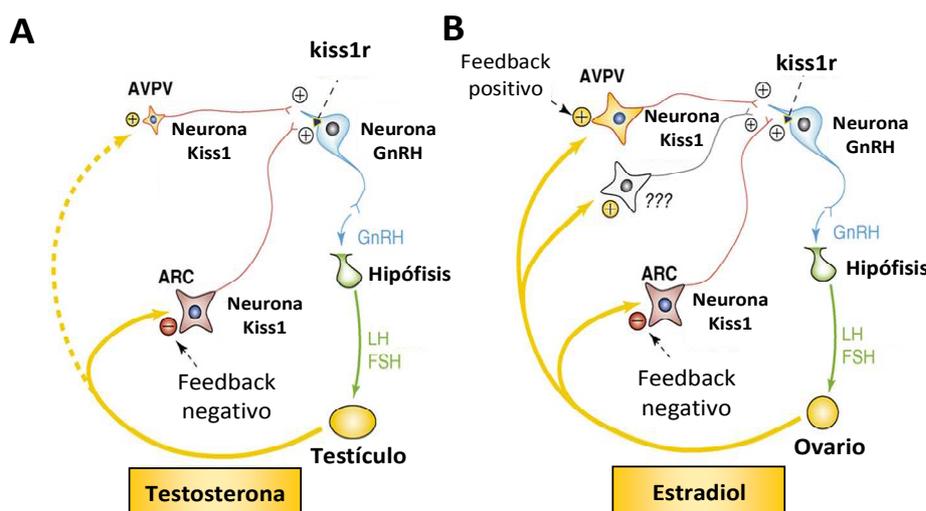


Fig. 5. Modelo sobre el mecanismo de acción del sistema *kiss1/kiss1r* en roedores macho **(A)** y hembra **(B)**. Las neuronas *kiss1* del núcleo ARC están reguladas negativamente por los esteroides sexuales, y en el núcleo AVPV, la expresión de *kiss1* está estimulada por la presencia de esteroides sexuales (modificado de Kauffman⁵⁵).

- Kiss1 es esencial para el inicio de la pubertad.

La ausencia o retraso de la pubertad en humanos y en ratones portadores de mutaciones en el receptor *kiss1r* indica que las kps son necesarias para el correcto desarrollo de la pubertad, pero no prueba que el receptor sea un regulador clave en este proceso. Sin embargo, distintos argumentos experimentales indican que *kiss1* y *kiss1r* son algo más que meros mediadores de la pubertad, sugiriendo que son moléculas clave que actúan como interruptores en el funcionamiento del eje HPG. Así, varios estudios muestran que la expresión de *kiss1* y *kiss1r* aumenta con el inicio de la pubertad en diferentes especies. En rata, *kiss1* y *kiss1r* aumentan a nivel hipotalámico con la pubertad⁴⁰, concretamente, estudios realizados mediante hibridación *in situ* muestran que este incremento en *kiss1* se produce en la región AVPV, mientras que en ratones macho se observan pocos cambios en el núcleo ARC⁵². De acuerdo con esto, el número de neuronas inmunoreactivas para kp aumenta en los núcleos AVPV y PVN de ratón durante la pubertad, mientras que en el ARC solo se observan pequeños cambios⁵⁶. En primates, los niveles de ARNm de *kiss1* y *kiss1r* en hipotálamo aumentan durante la transición del estado juvenil a la pubertad en hembras intactas⁴⁷, mientras que en machos castrados, la expresión de *kiss1* es tres veces mayor en animales en pubertad que en animales juveniles. Así, en distintas especies se observa un incremento de la expresión de *kiss1* en torno a la pubertad, y en consonancia con esto, la inyección de kp puede adelantar el desarrollo de la pubertad. En concreto, la administración crónica de kp-10 en ratas hembra inmaduras adelanta la apertura vaginal, signo de pubertad⁴⁰, y la inyección repetida de kp-10 en primates juveniles induce una precoz cadena de pulsos de GnRH similar a los que ocurren durante la pubertad⁴⁶. No obstante, aunque el sistema *kiss1/kiss1r* es un elemento imprescindible que contribuye de forma relevante en el correcto desarrollo de la pubertad, es improbable que sea el único controlador, por tanto, y con seguridad, requiere la interacción con numerosos factores para el inicio de la pubertad⁵⁷.

En muchas especies, la reproducción es estacional y depende del fotoperiodo, lo que convierte al sistema *kiss1/kiss1r* en un modulador del control del mismo⁵⁸. Estudios realizados con hámster Sirio, en las que la reproducción se induce por los días largos y se inhibe por los días cortos, han demostrado que el nivel de expresión de *kiss1* es menor en animales en días cortos, lo cual depende de la señalización de la

melatonina, ya que la ablación de la glándula pineal previene esta regulación a la baja⁵⁸. En la oveja, la expresión de ARNm de *kiss1* en el núcleo ARC es menor durante el anestro, que se debe a un efecto estacional no dependiente de esteroides, lo que apoya el papel de *kiss1* en el control de los cambios estacionales en la función reproductiva⁵⁹.

-Regulación del sistema *kiss1/kiss1r* por esteroides sexuales.

La secreción de GnRH y de gonadotropinas está regulada por los esteroides sexuales, si bien el mecanismo a través del cual se lleva a cabo dicha regulación no se conoce con exactitud. Parece que las neuronas *kiss1* integran señales de retroalimentación de los esteroides sexuales hacia las neuronas GnRH. En este sentido, se ha observado que las neuronas *kiss1* contactan de forma directa con las neuronas GnRH^{56, 60}, y que la expresión de *kiss1* está regulada por los esteroides sexuales (Fig. 5). La gonadectomía en ratas incrementa la expresión hipotalámica de *kiss1*, mientras que el reemplazamiento con esteroides sexuales elimina este incremento⁴⁰. Esta regulación por esteroides sexuales observada en roedores se extiende a primates, en los que se ha descrito que el tratamiento con testosterona a monos adultos ORX reduce la expresión de *kiss1* en el hipotálamo mediobasal⁶¹, y la ovariectomía de monas jóvenes aumenta la expresión de *kiss1* en el núcleo infundibular, lo cual puede prevenirse por el reemplazamiento con estrógenos⁶².

En mujeres post-menopáusicas con una producción insignificante de estrógenos, la expresión de *kiss1* es mayor que en mujeres pre-menopáusicas⁶². Este incremento en la expresión de *kiss1* podría contribuir a explicar la elevada secreción de gonadotropinas que tiene lugar tras la menopausia.

En ratones, la expresión de *kiss1* disminuye en los núcleos AVPV y PVN y aumenta en el núcleo ARC tras la gonadectomía^{63, 64}, cambios que se eliminan por el tratamiento con testosterona en machos o estrógenos en hembras. En ovejas, la ovariectomía aumenta la expresión de *kiss1* principalmente en el núcleo ARC y en menor grado en el área preóptica (POA)⁵⁹, si bien la inmunoreactividad para *kp* solo aumenta significativamente en el núcleo ARC⁶⁵. La expresión de *kiss1* en el núcleo ARC recupera los niveles observados en ovejas intactas tras el tratamiento con estrógeno y de forma parcial por el tratamiento con progesterona⁵⁹. Se ha propuesto que el efecto de los esteroides gonadales en la expresión de *kiss1* a nivel hipotalámico debería estar

mediado por los receptores de hormonas esteroideas. Así, en ratones macho, alrededor del 65% de las neuronas *kiss1* en el núcleo ARC también expresan el receptor androgénico, y en torno al 90% expresan el receptor alfa de estrógeno (ER α)⁶⁴. En ratones hembras, la mayoría de las neuronas *kiss1* de los núcleos ARC, AVPV y PVN expresan ER α , y entre un 25-40% expresan ER β ⁶³. En ratas, alrededor del 60-70% de las neuronas *kiss1* de los núcleos ARN y AVPV expresan ER α , y entre 10-20% expresan ER β ⁶⁶. En oveja, el 90% de las neuronas *kiss1* expresan ER α , y el 50% en POA⁶⁷, y el 86% de las neuronas *kiss1* expresan el receptor de progesterona⁵⁹. Las neuronas *kiss1* en el ARC de ovejas también expresan los neuropéptidos dinorfina A y neuroquinina B⁶⁸, ambos implicados en la regulación de la secreción de GnRH, por lo que su co-expresión en las neuronas *kiss1* puede tener un importante papel en la modulación del control de la secreción de GnRH por la kp.

1.4. Otras funciones del sistema KISS1/KISS1R.

La mayoría de las pruebas experimentales y clínicas recogidas en los últimos años demuestran de forma indiscutible un papel indispensable del sistema *kiss1/kiss1r* en el control neuroendocrino de la reproducción a nivel hipotalámico, sin embargo no debe excluirse la posibilidad de que este sistema ejerza acciones moduladoras a otros niveles, como a nivel hipofisario, a nivel pancreático, en las gónadas y en la regulación del metabolismo, etc. (Fig. 6), tal como puede deducirse del patrón de distribución tisular de expresión de *kiss1r* en éstos órganos (Fig. 2).

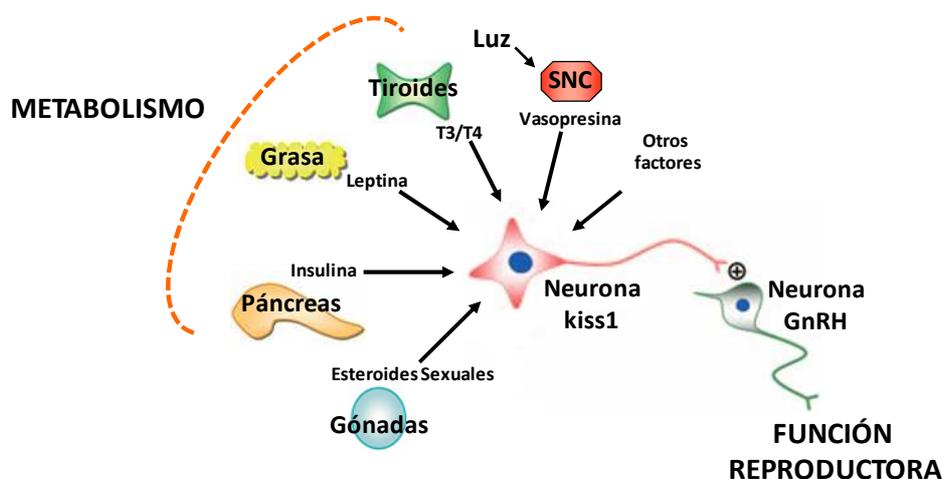


Fig. 6. Modelo propuesto según el cual las neuronas *kiss1* pueden actuar como procesadores centrales en la transmisión de señales desde la periferia y así regular la reproducción, a través de las neuronas GnRH.

- Papel del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis.

Los datos disponibles sobre el papel del sistema kiss1/kiss1r en la regulación de la secreción de hormonas hipofisarias son muy contradictorios. En la especie humana, la hipófisis presenta uno de los niveles de expresión de *KISS1R* más elevados entre los tejidos analizados^{4,5}, si bien los tipos celulares específicos que lo expresan aún no han sido identificados. Inicialmente, Navarro *et al.* describieron que la kp-10 estimula la liberación de LH en explantes de hipófisis de ratas de forma dependiente de dosis, siendo este efecto cuatro veces menos potente que el inducido por GnRH⁴². Más recientemente, también se ha observado un efecto secretor de LH de la kp-10 en células hipofisarias dispersas de cerdo, vaca y oveja^{69, 70}. Por el contrario, existen varios estudios que no han encontrado efecto de la administración de kp sobre la liberación hormonal, como por ejemplo el llevado a cabo por Thompson *et al.* en el que fragmentos de adenohipófisis de ratas macho adultas no respondieron a kp-10⁴³. Por otro lado, se ha demostrado que la OVX provoca una drástica disminución de los niveles de ARNm de *kiss1* en gonadotropas⁷¹, sugiriendo un efecto directo del E2 sobre la hipófisis que podría controlar positivamente la expresión de *kiss1*. Desafortunadamente, los estudios disponibles actualmente son aún fragmentarios y resulta muy difícil realizar una comparación de sus resultados por las diferencias entre los diseños experimentales empleados.

- Papel del sistema kiss1/kiss1r en el metabolismo.

El ayuno ejerce un conocido efecto inhibitor de la secreción de gonadotropinas y la ovulación, aunque paradójicamente la expresión de *GnRH* en el hipotálamo no se reduce durante el ayuno⁷². Esto sugiere que las modificaciones en el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal durante el ayuno se producen en un nivel superior al de la ruta de síntesis de GnRH. Debido a la gran cantidad de datos que apoyan el crucial papel de las kps como reguladores de la función neuronal de GnRH, distintos estudios han explorado la relación entre los depósitos de energía, la expresión de *kiss1* y la activación de la cascada reproductiva; a continuación se resumen algunos de estos estudios.

En mujeres es común el síndrome de ovario poliquístico (PCOS), que está asociado con infertilidad, niveles elevados de LH y aumento de la resistencia a insulina.

Por este motivo, el grupo de Panidis *et al.* investigó la posible correlación entre el sistema KISS1/KISS1R y PCOS, comparando los niveles plasmáticos de KP de mujeres con PCOS con un peso normal con los niveles de KP de mujeres con PCOS obesas y con los niveles de KP de mujeres obesas sanas. En este estudio, las mujeres con PCOS y peso normal presentaron niveles elevados de kp-54, y eran menos resistentes a insulina que las mujeres con PCOS y obesas, revelando que los niveles de KISS1 están relacionados negativamente con el índice de masa corporal y con la resistencia a insulina ⁷³.

Las kps pueden actuar también en la integración de las señales periféricas del estatus metabólico hacia el control de la función reproductiva. Se ha descrito que la edad de la menarquía está directamente relacionada con la adquisición de una composición de grasa corporal mínima. En este sentido, se ha propuesto que la leptina, hormona producida por el tejido adiposo, actúa como facilitador de la pubertad (Fig 7).

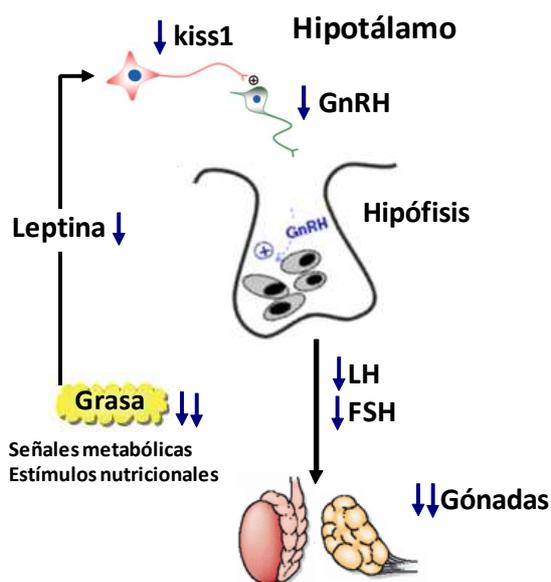


Fig. 7. Modelo en el que las neuronas kiss1 actúan como integradores centrales del balance energético y la reproducción. La leptina, producida por el tejido adiposo, juega un papel crucial en la transmisión de la información del estado metabólico del organismo a las neuronas kiss1, y por tanto, al eje reproductor (modificado de Roa et al. ³¹).

En roedores, la leptina puede influir en el paso a la pubertad, en cambio, en primates su papel aún está por esclarecer. La administración de leptina adelanta la edad en la que aparece la pubertad en ratonas normales ⁷⁴⁻⁷⁶, y en ratonas obesas (*ob/ob*) ⁷⁷. La administración de leptina en ratonas *ob/ob* puede restaurar la fertilidad ⁷⁸ y de la misma manera, ratones con mutaciones en el receptor de leptina (*db/db*) son

estériles y deficientes en la secreción de GnRH^{79, 80}. Recientemente se ha observado en ratas que la manipulación experimental del estatus energético corporal puede alterar la señalización de la kp en el hipotálamo. Concretamente, el ayuno en ratas prepuberales durante 72 h, que está asociado con una reducción en los niveles periféricos de gonadotropinas, causa también una disminución de la expresión de *kiss1*, y un aumento de *kiss1r* a nivel hipotalámico⁸¹. Los animales en ayuno mantienen la capacidad secretora de LH en respuesta a la administración central de kp-10, y esta respuesta es mayor que en animales no sometidos a ayuno, posiblemente debido al aumento de expresión de *kiss1r* observado a nivel hipotalámico. En un modelo de desnutrición que previene el inicio de la pubertad en ratas peripuberales, la inyección central de kp-10 es capaz de restaurar el correcto desarrollo de la pubertad en el 60% de los animales estudiados⁸¹. Los ratones *ob/ob* presentan una disminución de la expresión de *kiss1* en hipotálamo, que aumenta tras la inyección intraperitoneal de leptina durante un periodo de cuatro días⁸². Datos similares se observaron en estudios realizados por Luque *et al.* en los que los niveles de *kiss1* y *kiss1r* aumentan en el hipotálamo de ratones *ob/ob* cuando se tiene en cuenta las respuestas de reducción de ingesta⁸³. Estos datos reflejan una acción directa de la leptina en neuronas *kiss1*, ya que se ha descrito que alrededor del 40% de neuronas *kiss1* expresan el receptor de leptina⁸⁴. Estos experimentos demuestran que existe una interacción entre el estatus energético y el sistema *kiss1/kiss1r* hipotalámico.

- Acciones del sistema *kiss1/kiss1r* a nivel gonadal.

Tanto *kiss1* como *kiss1r* se expresan en testículo y ovario, pero sin embargo no se conoce aún si el sistema *kiss1/kiss1r* ejerce un papel fisiológico en la espermatogénesis y/o en la función ovárica. En distintos estudios se ha sugerido un efecto directo de la kp en el testículo, pues la administración sistémica y subcutánea de kp produce un incremento de LH, y un significativo aumento de los niveles de testosterona. Concretamente, en estudios realizados en ratas la administración subcutánea de kp-54 aumenta los niveles plasmáticos de LH y testosterona a los 60 min de la inyección. En este estudio, la administración crónica subcutánea de kp-54 provoca degeneración testicular⁵¹. En macacos adultos también se ha observado que la administración intravenosa de forma continuada de kp-10 da lugar a un aumento de

la secreción de testosterona, así como a una desensibilización de kiss1r⁵⁰. De esta manera, las kps podrían potenciar el efecto de la hormona LH en la estimulación de la producción de testosterona por el testículo.

En el caso de ovario de rata, se ha descrito que la expresión de *kiss1* varía durante el ciclo estral, con un aumento de cinco veces en el momento que precede a la ovulación, el proestro⁸⁵. Este aumento de *kiss1* podría ser importante en la generación del pico preovulatorio de LH, ya que se ha observado que el bloqueo del mismo por un antagonista de GnRH, impide el aumento de la expresión de *kiss1*, que puede ser restaurado por una inyección de LH. Curiosamente, en ratas inmaduras, en las que los niveles de ARNm de *kiss1* en ovario son insignificantes, su expresión se potencia notablemente mediante un protocolo estándar de sensibilización con gonadotropinas. Además, se ha detectado inmunoreactividad para *kiss1* en la teca de los folículos en crecimiento y del cuerpo lúteo, particularmente en las áreas derivadas de las células invasoras de la teca. En estos niveles también se observó una moderada inmunoreactividad para *kiss1r*⁸⁵. Por todo lo anterior, es posible que la presencia de *kiss1* en el ovario pueda contribuir en la ovulación como un regulador local, si bien no es un factor determinante en esta función pues tanto en ratones carentes de *kiss1r*, como en una paciente homocigótica para la mutación L148S en *KISS1R*, mantienen la capacidad para ovular^{28, 86}. En conjunto, estas observaciones indican que el gen *kiss1* se expresa en ovario de rata, y que su expresión está regulada durante el desarrollo y por diferentes hormonas. La capacidad del pico preovulatorio de LH para inducir la expresión de *kiss1* sugiere un importante papel de la producción local de kp en el control de la ovulación. La relevancia funcional del sistema *kiss1/kiss1r* en ovario se refuerza al observar que su presencia está conservada, ya que se ha descrito su expresión en ovario de primates y en las gónadas de peces teleósteos¹¹.

- Mecanismos de señalización intracelular activados por las kisspeptinas a través de kiss1r.

Las kps activan a su receptor en distintos tejidos diana para ejercer diferentes funciones, incluyendo la inhibición de la metástasis tumoral y el control de la función reproductora. En contraste con la gran cantidad de estudios que han analizado las

funciones reguladoras del sistema kiss1/kiss1r a diferentes niveles, el número de ensayos dedicados a descubrir las rutas de señalización intracelular implicadas en estas funciones es reducido. Los estudios iniciales llevados a cabo sobre líneas celulares indican que las kps pueden activar una gran variedad de señales mediante su unión a kiss1r. Esto incluye las cascadas típicas acopladas a proteínas G α q/11, como la activación de la fosfolipasa C y la subsiguiente acumulación de inositol-(1,4,5)-trifosfato, movilización de Ca²⁺ intracelular y la activación de proteína quinasa C (Fig. 8). No obstante, las kps también activan rutas relacionadas con las proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK), especialmente ERK1/2, p38 y fosfatidil inositol-3-quinasa (PIP3)/Akt. Además, el sistema kiss1/kiss1r puede influir en la señalización celular mediante la interacción con otros receptores, como el receptor de quimioquina CXCR4 y el GnRH-R. Las kps pueden afectar a otros procesos de señalización como el de la expresión de metaloproteinasas de matriz 9 (vía NF κ B) y el de la calcineurina (Fig. 8)⁸⁷. Esta información indica claramente que la activación de una serie de señales específicas interconectadas se inicia de forma selectiva por la unión las kps a kiss1r, de forma dependiente del tipo celular, para regular de forma precisa funciones tan distintas como la secreción hormonal y la migración celular. La relevancia funcional de la mayor parte de estas rutas en la transmisión de la acción biológica de la kp-10 se ha confirmado recientemente a nivel hipotalámico³⁸.

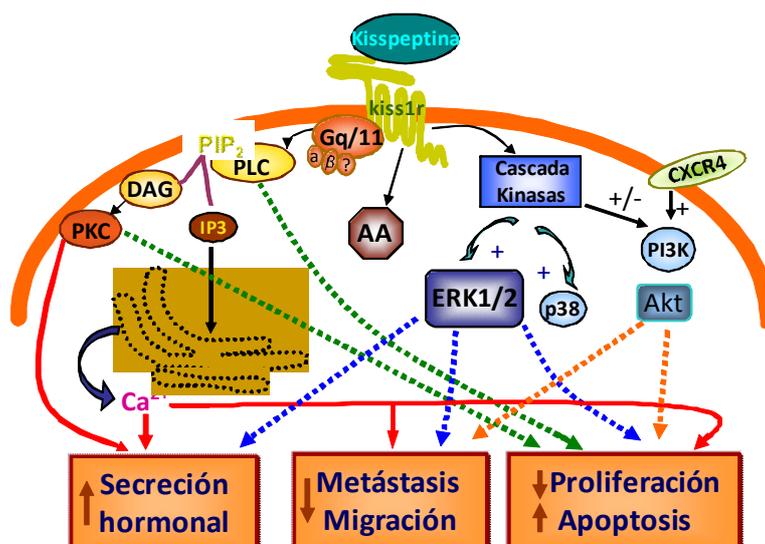


Fig. 8. Esquema ilustrativo de las diferentes rutas de señalización intracelular descritas y/o propuestas por su implicación en la transducción de las acciones de las kps tras la activación de kiss1r (tomado de Castaño *et al.*⁸⁷).

- Desarrollo y análisis de análogos sintéticos de las kisspeptinas.

El hecho de que el sistema kiss1/kiss1r ejerza diferentes e importantes acciones, como el control neuroendocrino de la reproducción ⁸⁸, el control de la metástasis tumoral ²⁴, el control en la invasión del trofoblasto ⁸⁹, el control en la reproducción estacional ⁵⁸, o su acción vasoconstrictora ⁹⁰, hace especialmente interesante el diseño y síntesis de péptidos con capacidad agonista y/o antagonista de kiss1r por sus posibles aplicaciones clínicas y farmacológicas. Así, los agonistas de kiss1r podrían utilizarse en el tratamiento de trastornos del inicio de la pubertad, en la inducción de la ovulación, en la detección y tratamiento de determinados tipos de cáncer, mientras que los posibles antagonistas podrían ser útiles en el tratamiento de la pubertad precoz dependiente de gonadotropinas y como anticonceptivos femeninos. En este sentido, los estudios sobre la relación entre la estructura y la actividad peptídica constituyen una valiosa herramienta que puede permitir la obtención de información crítica para el desarrollo de nuevos análogos con potenciales aplicaciones clínicas.

Mediante el reemplazamiento de los diferentes aa de la kp-10 por D-aa y Alanina, se ha demostrado que los últimos 5 aa son esenciales en la activación del receptor. Los diferentes pentaderivados sintéticos generados sobre la base de la estructura de la kp-10, presentan una alta afinidad por kiss1r y una potencia comparable a la ejercida por la kp-10 en la activación del receptor. Los análisis que relacionan estructura-actividad de estos compuestos identificó al pentapéptido H-Amb-Nal(2)-Glicina-Leucina-Arginina-Triptofano-NH₂ como el agonista más potente de kiss1r. Posteriormente, modificaciones en este pentapéptido sintético revelaron que es necesaria la unión fenilalanina-glicina para la actividad biológica de la kp ⁹¹. El análisis de la relación estructura-actividad de un derivado de la kp-13 muestra que Phe⁹, Arg¹² y Phe¹³ son aa clave para la función de la kp. Usando este modelo, se descubrió una pequeña molécula con actividad agonista de kiss1r, que presenta una potencia y afinidad significativamente menor que el péptido nativo ⁹². Recientemente se ha descrito el diseño y síntesis de un nuevo péptido agonista de kiss1r resistente a la degradación por metaloproteinasas de matriz ⁹³. Los estudios de desarrollo y análisis de análogos de las kps se han centrado en la obtención de agonistas de kiss1r,

y por tanto no se ha descrito hasta la fecha ningún péptido con capacidad antagonista del receptor kiss1r.

- Otras acciones del sistema kiss1/kiss1r.

Las kps pueden actuar también en sitios alejados del sistema neuroendocrino central, ya que se ha detectado la expresión de *KISS1* y *KISS1R* en placenta, páncreas y vasos sanguíneos^{5, 6}. A continuación describimos brevemente el posible significado funcional del sistema kiss1/kiss1r a dichos niveles.

La expresión de *KISS1* y *KISS1R* en placenta humana es especialmente elevada durante el primer trimestre de la gestación, y disminuye a lo largo del embarazo^{89, 94}. La expresión de ambos genes aumenta en el mismo periodo de la gestación, cuando la regulación y la limitación de la invasión del trofoblasto son especialmente importantes. El ARNm de *KISS1* se expresa en el sincitiotrofoblasto^{22, 89, 95}, que representa la interfase entre la placenta y la sangre materna, y tiene un papel central en el transporte de nutrientes de la madre al feto. El ARNm de *KISS1R* se expresa en sincitiotrofoblasto y en trofoblasto vellosos y extravellosos invasivos⁸⁹.

La expresión de *KISS1* y *KISS1R* en las células del citotrofoblasto invasivo, y la actividad antimetastásica de las kps en coriocarcinomas⁹⁴, sugieren que las kps tienen un papel muy importante en el control de la invasión de la placenta, si bien se ha observado que una paciente con la mutación L148S en *KISS1R* ha concebido con ayuda de un tratamiento hormonal, lo que indica que la placentación también puede tener lugar en ausencia de *KISS1R* materno funcional⁸⁶. También se ha detectado la presencia de kiss1 y kiss1r en células del trofoblasto de rata⁸.

El nivel de kp aumenta en la octava semana de embarazo desde valores en torno a 1 fmol/ml hasta más de 2000 fmol/ml durante el resto de la gestación⁹⁵. El significado de este drástico incremento no está claro, pero se propone que estos niveles circulantes de kp podrían causar una supresión de la secreción hipotalámica de GnRH y cerrar el eje HPG como se ha observado en ratas⁵¹ y en mono⁴⁹.

Los niveles de ARNm de *KISS1* y *KISS1R* también son muy elevados en páncreas humano⁴⁻⁶, que es un regulador esencial de la homeostasis corporal, y también se ha detectado la expresión de *kiss1r* y *kiss1* en líneas celulares pancreáticas tanto alfa

como beta, y en islotes pancreático de ratón ⁹⁶, mientras que no se ha detectado en células del páncreas exocrino.

En este sentido se ha observado que en islotes de humano y ratón, la kp exógena no afecta a la secreción basal de insulina, pero potencia la secreción de insulina inducida por glucosa, sin afectar a la secreción de glucagón. También se ha detectado *Kiss1r* en líneas celulares de islotes beta secretores de insulina de ratón, pero en contraste con el tejido primario, la exposición a kp inhibe la secreción de insulina en niveles basales o estimulados por glucosa ⁹⁶. La co-expresión de *kiss1* y *kiss1r* en islotes podría permitir interacciones paracrinas o autocrinas ausentes en la línea celular. Sin embargo, recientemente se ha observado que la kp-13 administrada mediante perfusión en páncreas de rata, es capaz de reducir la secreción de insulina inducida por glucosa, pero no los niveles basales de insulina, de una manera dosis dependiente, posiblemente mediante un efecto directo sobre las células beta pancreáticas ⁹⁷. Así pues, aunque parece evidente que el sistema *kiss1/kiss1r* interviene en la regulación de las células β pancreáticas, su papel exacto es aún desconocido, debido en parte a la escasez de estudios.

La posible función de las kps como puente entre los ejes metabólico (insulina) y reproductor (LH) se ha demostrado en estudios recientes, en los que estas moléculas parecen estar implicadas en desórdenes metabólicos que afectan a la función reproductiva. En este sentido, en un estudio realizado por Castellano *et al.* se ha descrito la alteración del sistema *kiss1/kiss1r* hipotalámico en un modelo de ratas con diabetes. Esta observación, junto con la capacidad de la kp exógena para rescatar la respuesta secretora de LH defectuosa en ratas diabéticas, aclara la implicación fisiopatológica y la potencial intervención terapéutica del sistema *kiss1/kiss1r* en la secreción alterada de gonadotropinas en la diabetes tipo 1 ⁹⁸.

El hecho de que la diabetes y la obesidad están asociadas con desórdenes cardiovasculares, junto con el hecho de que las kps están implicadas en los procesos de metástasis y placentación, que conllevan fenómenos de angiogénesis, dio lugar a la hipótesis de que *kiss1* puede funcionar como un transmisor cardiovascular. En este sentido, en la especie humana se ha descrito la localización de KISS1R en el músculo liso de la vena umbilical, la aorta y la arteria coronaria ⁹⁰. Mediante microscopia confocal se ha detectado la colocalización de *kiss1* y *kiss1r* en células del endotelio

vascular y de la placa aterosclerótica de la arteria coronaria ⁹⁰. En estudios realizados con anillos aislados de la arteria coronaria y la vena umbilical, se ha observado que kp-10, kp-13 y kp-54 actúan como vasoconstrictores con una potencia y una respuesta máxima similar ⁹⁰. La detección local y la acción vasoconstrictora de KISS1 en humanos sugieren que éste puede actuar como un nuevo transmisor vascular paracrino. La localización discreta del receptor en vasos propensos a aterosclerosis también implica a KISS1R en la patofisiología de los desórdenes cardiovasculares.

2. El eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal.

El correcto funcionamiento del organismo depende de la acción coordinada de todos los sistemas que lo componen. Dicha integración es posible gracias a la acción de dos grandes sistemas de control: el sistema nervioso y el sistema endocrino. En este sentido, el eje hipotálamo-hipofisario juega un papel central en la regulación del sistema endocrino organizando las respuestas hormonales apropiadas a estímulos procedentes de centros neurológicos superiores. El control de la secreción hormonal se realiza a través de sistemas o circuitos cerrados de retroalimentación, estando cada circuito estrechamente relacionado con otros de manera que los cambios en uno de ellos determinan modificaciones en él y/o en los demás (Fig. 9).

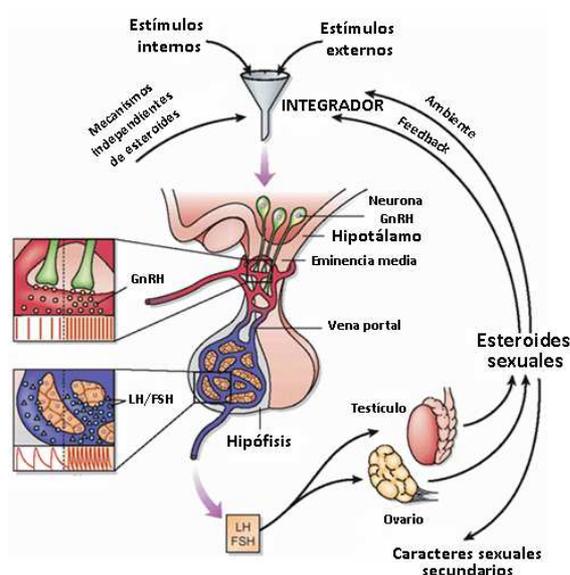


Fig. 9. Esquema representativo del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. El hipotálamo actúa como un centro integrador de señales, en respuesta a las cuales libera una serie de hormonas a la hipófisis, regulando la secreción de hormonas hipofisarias.

2.1. Hipotálamo.

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, entre el tálamo y el tercer ventrículo cerebral, por encima e íntimamente conectado con la hipófisis a través de la eminencia media. El hipotálamo es el centro integrador de los sistemas endocrino y nervioso, de manera que recibe información del SNC y de diferentes órganos endocrinos, y en respuesta a estos estímulos actúa como un núcleo regulador

mediante síntesis y liberación de hormonas que actúan fundamentalmente a nivel hipofisario al que llegan a través de su liberación al sistema portal (Tabla 2). De esta forma, queda regulada la actividad del tiroides, de las glándulas suprarrenales y de las gónadas, así como funciones esenciales como el crecimiento, la producción de leche, el equilibrio hídrico, etc. El hipotálamo interviene además en funciones de naturaleza no endocrina, como la regulación de la temperatura, en la actividad del sistema nervioso autónomo y en el control del apetito.

Hormona hipotalámica	Función
TRH	Estimula la liberación de TSH y PRL
CRF	Estimula la liberación de ACTH
SRIF	Inhibe la liberación de GH, TSH y PRL
GnRH	Estimula la liberación de LH y FSH
GHRH	Estimula la liberación de GH

Tabla 2. Las hormonas hipotalámicas actúan sobre tipos celulares específicos en la hipófisis estimulando la liberación de hormonas hipofisarias que a su vez actúan sobre órganos diana para regular diferentes procesos fisiológicos.

-Hormonas hipotalámicas:

-Factor liberador de corticotropina (CRF). Es un polipéptido de 41 aa, secretado fundamentalmente por neuronas hipotalámicas del núcleo PVN, cuya función principal es la estimulación de la secreción hipofisaria de adrenocorticotropina (ACTH).

-Hormona liberadora de tirotrina (TRH). Se sintetiza en el núcleo PVN y se almacena en terminaciones nerviosas en la eminencia media. La TRH estimula la secreción hipofisaria de la hormona estimuladora del tiroides o tirotrina (TSH), y actúa como un neurotransmisor en la mediación de otras respuestas.

-Somatostatina (SRIF). El gen de la somatostatina codifica para una prohormona de 118 aa, que mediante procesamiento proteolítico da lugar a dos formas de somatostatina con actividad similar: SRIF de 14 aa y de 28 aa. La somatostatina se ha considerado como el factor inhibidor clásico de la secreción de un gran número de hormonas, en especial de GH, pero también de TSH y prolactina.

- Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).

El control de la secreción de las gonadotropinas, FSH y LH, se lleva a cabo por el decapeptido GnRH. Esta hormona se aisló inicialmente en la década de los 70 en hipotálamo ⁹⁹, y al igual que otros neuropéptidos se sintetiza como una larga preprohormona de 92 aa que se procesa enzimáticamente y es modificada en los gránulos de secreción en neuronas especializadas del hipotálamo, donde se empaqueta y almacena. Esta preproGnRH consiste en una secuencia señal N-terminal de 23 aa, una secuencia de 10 aa que constituye la GnRH, una secuencia de 3 aa usada para el procesamiento molecular y una secuencia C-terminal de 56 aa conocida como péptido asociado a GnRH (GAP) (Fig. 10).

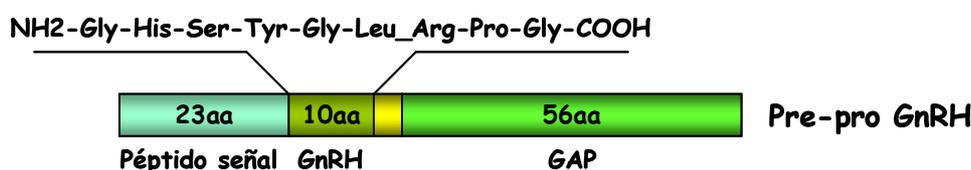


Fig.10. Esquema de la preproGnRH a partir de la cual, mediante un procesamiento postranscripcional, se sintetiza y libera el decapeptido GnRH, así como el péptido GAP.

La hormona GnRH es un factor hipotalámico esencial en el control del eje HPG, siendo el efector último del control de los reguladores centrales de la función endocrina de la reproducción. La secreción pulsátil de GnRH es esencial para la correcta liberación de LH y FSH y consecuentemente de la función reproductora. La hormona GnRH es sintetizada por un reducido número de neuronas (entre 1000 y 3000) situadas en el núcleo ARC y otros núcleos hipotalámicos. La mayoría de estas neuronas extienden sus prolongaciones axónicas a los plexos capilares de la eminencia media, donde liberan el péptido en forma de picos altamente sincronizados cada 30-120 min según la especie ¹⁰⁰. Esta hormona también se sintetiza, aunque en menores cantidades, en la placenta, en las gónadas, en la mama, en los linfocitos, en la hipófisis y en el corazón. En mamíferos se han descrito dos isoformas, GnRH I que regula las gonadotropinas y GnRH II que actúa como neuromodulador y estimula en comportamiento sexual. En la actualidad, hay disponibles diferentes agonistas y

antagonistas de GnRH que son ampliamente usados como tratamiento de desórdenes dependientes de hormonas¹⁰¹.

La hormona GnRH estimula la producción y liberación de gonadotropinas, FSH y LH, actuando sobre los receptores hipofisarios de alta afinidad GnRH-R¹⁰². El receptor GnRH-R pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) de tipo rodopsina. El dominio extracelular amino terminal y los bucles superficiales de los dominios transmembrana están implicados en la unión de hormonas peptídicas como GnRH, mientras que los dominios transmembrana están implicados en los cambios conformacionales asociados con la activación del receptor. El dominio intracelular está implicado en las interacciones con las proteínas G y otras proteínas de transducción de señal. En mamíferos la cola citosólica del receptor es muy corta a diferencia de otras especies. El hecho de que la internalización y otras funciones sean distintas en el receptor de mamíferos sugiere que esta cola desempeña importantes funciones en la fisiología de GnRH-R¹⁰¹.

La secuencia del GnRH-R murino fue descrita por primera vez en 1992 por Tsutsumi *et al.*, y posteriormente se clonó la secuencia en otras especies de mamíferos, incluyendo humano (Fig. 11), oveja, vaca, cerdo, rata, cobaya y caballo, presentando un alto grado de conservación, mayor del 83%, en estas especies¹⁰³. Estudios recientes muestran que el receptor GnRH-R activa distintas rutas de señalización mediante su interacción con proteínas G_i y $G_{\alpha q/11}$ ¹⁰⁴.

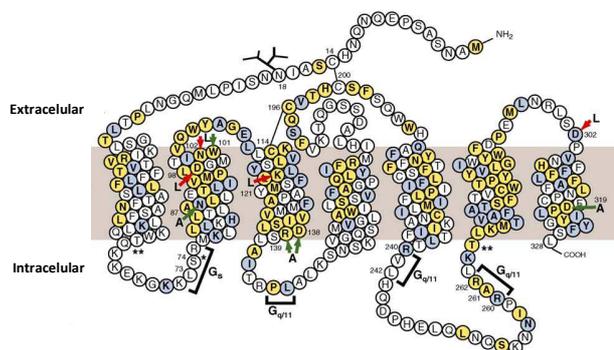


Fig.11. Representación bidimensional de la topología propuesta para el receptor GnRH-R humano. En amarillo se muestran los aa conservados entre los receptores clonados en especies de vertebrados. También se indican los posibles sitios de unión del ligando (L), así como los residuos importantes para la configuración y activación del receptor (A), y para el acoplamiento de las proteínas G (modificado de Millar *et al*¹⁰¹).

La expresión del gen GnRH-R está regulada por múltiples factores incluyendo la propia GnRH, las hormonas esteroideas gonadales, la inhibina y la activina. En cuanto a la regulación de la sensibilidad hipofisaria a GnRH, el factor regulador que se ha estudiado más detalladamente es el E2¹⁰³. En los años 70 aparecieron estudios que mostraban un incremento en la respuesta hipofisaria a GnRH causado por el E2, y posteriormente también se observaron incrementos tanto en los niveles de ARNm, como en el número de receptores GnRH-R en especies como oveja, vaca y distintas especies de animales de laboratorio¹⁰³. La respuesta secretora de LH y FSH a pulsos de GnRH está gobernada por dos factores; el mecanismo de retroalimentación de esteroides gonadales sobre las células gonadotropas a nivel hipofisario y la regulación de GnRH-R en estas células. De manera que en ausencia de pulsos de GnRH, las células gonadotropas pierden receptores GnRH-R y por tanto se hacen menos sensibles¹⁰³.

En el año 2004, el grupo de Neill *et al.* describió la identificación del gen que codifica el receptor GnRH-R II en humanos, y la clonación y secuenciación en tejidos de cerdo y mono¹⁰⁵. Además se demostró que la expresión de este receptor es ubicua en humanos, al igual que lo observado para GnRH-R I, lo que sugiere la existencia de extenso sistema regulador autocrino y/o paracrino¹⁰⁶.

-Hormona liberadora de GH (GHRH).

La GHRH se genera mediante el procesamiento proteolítico de un precursor proteico de mayor tamaño codificado por el gen GHRH localizado en el cromosoma 20 humano y el cromosoma 2 en ratón. Este precursor ha sido identificado en humano, ratón y rata, y tiene un tamaño que oscila entre 103 y 108 aa, y sus secuencias son bastante homologas en la región amino-terminal del péptido, que es crucial para su actividad biológica¹⁰⁷. La GHRH se aisló y secuenció inicialmente en humanos a partir de tumores pancreáticos que causaban hipersecreción de GH y acromegalia. Concretamente se aislaron dos formas moleculares de GHRH con la misma actividad biológica, una de 40 y otra de 44 aa, que posteriormente también se identificaron en hipotálamo humano¹⁰⁷. La GHRH pertenece a una extensa familia de péptidos cerebrogástricos que incluye el glucagón, el VIP, la secretina, el GIP y el PACAP¹⁰⁸. La actividad biológica de GHRH reside en la secuencia de 29 aa amino-terminal, que son críticos para la unión del péptido a su receptor. A diferencia de otros neuropéptidos, la

hormona GHRH tiene una distribución cerebral bastante localizada ^{107, 109}, de manera que la mayoría de las neuronas productoras de GHRH se encuentran en el hipotálamo mediobasal, particularmente en los núcleos ARC y ventromedial. Además, al igual que otros neuropéptidos, la GHRH se ha localizado en tejidos periféricos como el tracto gastrointestinal, concretamente en el intestino superior, en el epitelio de la mucosa y en leucocitos. También se ha encontrado en testículo, ovario y placenta ¹⁰⁷.

El estado hormonal y metabólico del animal determina los cambios en la expresión de GHRH. Así, la testosterona incrementa los niveles de ARNm de GHRH en machos y previene la disminución producida por la orquidectomía, y la deficiencia de hormona tiroidea también aumenta la expresión de GHRH. La GHRH producido a nivel hipotalámico se libera al sistema porta hipotálamo-hipofisario a través del cual alcanza la adenohipófisis, donde actúa fundamentalmente sobre células somatotropas mediante la unión a su receptor GHRH-R para regular la síntesis y secreción de GH así como la diferenciación y proliferación de este tipo celular (Fig. 12) ¹¹⁰. La unión de GHRH a su receptor activa diversas rutas de segundos mensajeros intracelulares, incluyendo la ruta de la adenilato cíclica, AMPc y proteína quinasa A ¹¹¹.

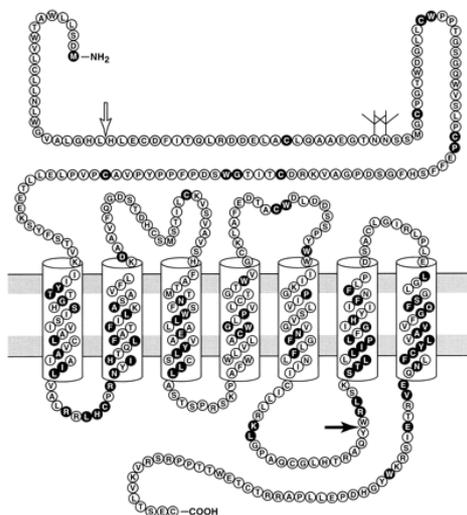


Fig. 12. Esquema de la estructura del receptor de GHRH-R de rata. Los siete dominios transmembrana característicos de los GPCRS, representados por los cilindros, atraviesan la doble capa lipídica. Los círculos en negro representan los aa conservados entre los receptores de la familia B de GPCRS. La flecha blanca indica la secuencia señal de corte, y la flecha negra indica un sitio de inserción generado por un procesamiento alternativo del ARN en una forma variante del receptor (tomado de Mayo *et al.* ¹¹¹).

El GHRH-R ha sido clonado en varias especies de vertebrados ¹¹² y pertenece a la familia B de la superfamilia de receptores GPCRs ¹¹³. El GHRH-R de rata sufre un procesamiento alternativo en su ARN que genera dos isoformas del receptor que se diferencian en 41 aa. Se ha demostrado que este procesamiento se produce de forma regulada, siendo la isoforma corta del receptor la predominante en células hipofisarias ¹¹⁴.

Los antagonistas de GHRH suprimen el crecimiento de varios tipos de cáncer, y este efecto antitumoral se ejerce en parte de forma indirecta a través de la inhibición de la secreción de GH y la consecuente reducción de los niveles de IGF-1. Sin embargo, los antagonistas de GHRH ejercen sus efectos directamente en los tumores ¹¹⁵.

2.2. Hipófisis.

La hipófisis es una glándula endocrina ovoide de pequeño tamaño situada en la base del cráneo, justo debajo del hipotálamo, en una depresión ósea del hueso esfenoideos llamada silla turca (Fig. 13).

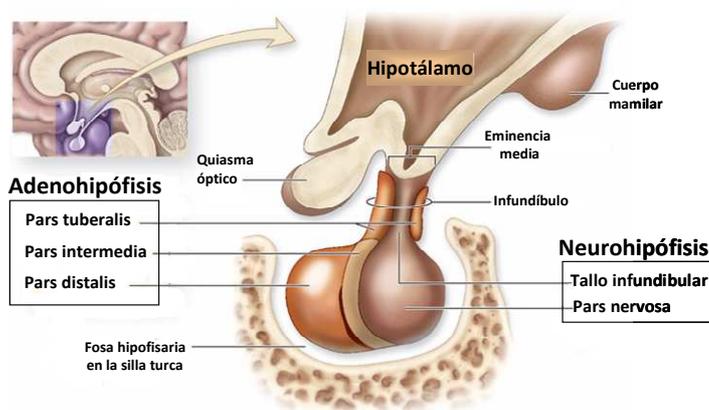


Fig 13. La hipófisis es una glándula compleja que se aloja en un espacio óseo llamado silla turca del hueso esfenoideos, situada en la base del cerebro, y que conecta con el hipotálamo a través del tallo infundibular. Consta de la adenohipófisis o lóbulo anterior y de la neurohipófisis o lóbulo posterior.

Desde un punto de vista anatómico y funcional, la hipófisis se divide en dos porciones, una neural o neurohipófisis y otra glandular o adenohipófisis, con diferente origen embrionario, anatomía y estructura. La neurohipófisis está constituida por la *pars nervosa* o lóbulo posterior y el infundíbulo, que consta a su vez del tallo

infundibular y la eminencia media. El infundíbulo está irrigado por las arterias hipofisarias superiores, cuyas ramificaciones forman el sistema portal hipotálamo-hipofisario, que se recogen y dirigen a través del tallo infundibular hacia la adenohipófisis, donde dan lugar al plexo capilar secundario que irriga fundamentalmente la *pars distalis* (Fig 14). La adenohipófisis, que constituye aproximadamente el 80% de la hipófisis, está formada por tres partes; la *pars distalis* o lóbulo anterior, la *pars intermedia* y la *pars tuberalis*.

La hipófisis está conectada con el hipotálamo a través del tallo hipofisario, que mantiene a estos dos órganos en estrecha relación anatómica y funcional mediante numerosas fibras nerviosas y vasos sanguíneos que constituyen el sistema portal hipotálamo-hipofisario, que es de importancia fundamental en la fisiología de la hipófisis. De esta manera, las neurohormonas producidos por los núcleos hipotalámicos, alcanzan las células adenohipofisarias estimulando o inhibiendo la síntesis y liberación hormonal (Fig 14).

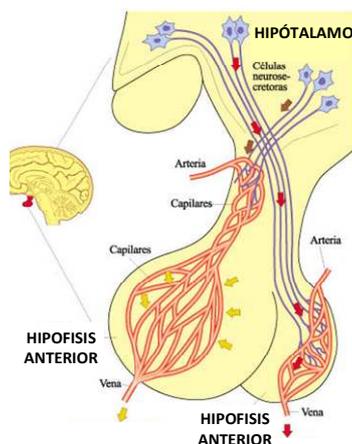


Fig. 14. Relación entre hipotálamo y la hipófisis. El hipotálamo se comunica con el lóbulo anterior de la hipófisis a través de un pequeño sistema porta, secretando hormonas liberadoras o inhibitoras (flechas marrones) directamente en capilares que están unidos por venas porta a una segunda red capilar de la hipófisis anterior, donde las hormonas hipotalámicas afectan la producción de las hormonas hipofisarias (flechas amarillas). Otras células neurosecretoras hipotalámicas producen oxitocina y hormona antidiurética (ADH)(flechas rojas), que son transmitidas al lóbulo posterior de la hipófisis a través de las fibras nerviosas. (tomado de Biología Curtis versión on-line).

Como se apuntó anteriormente, la hipófisis es crucial para el mantenimiento y regulación de procesos fisiológicos esenciales como el crecimiento, la reproducción y el metabolismo, tanto de forma directa como mediante el control del funcionamiento de otras glándulas endocrinas (tiroides, glándula adrenal, gónadas, etc.) (Fig. 15).

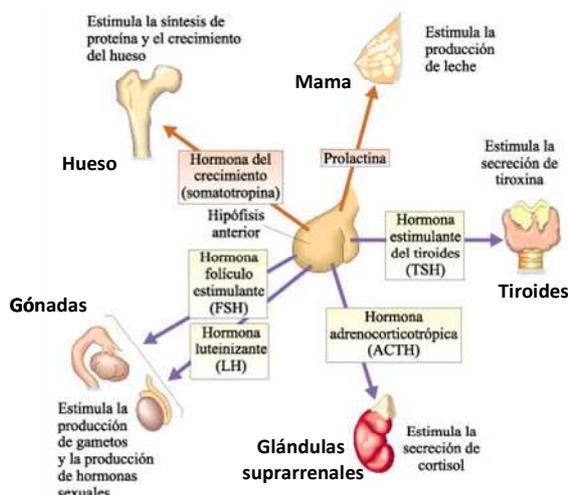


Fig. 15. Hormonas producidas y liberadas por las distintas células especializadas de la adenohipófisis, y sus respectivos órganos diana. La capacidad de respuesta de un tejido depende de la presencia de receptores específicos de membrana para cada hormona (modificado de Biología Curtis versión on-line).

La secreción de las hormonas de la adenohipófisis está regulada por el sistema nervioso central y por las hormonas producidas en sus glándulas diana en la periferia mediante un sistema de retroalimentación. La secreción de cada una de las hormonas hipofisarias sigue patrones diurnos más o menos regulares, generalmente sincronizados por la actividad, el sueño, o los ciclos de luz-oscuridad. Las hormonas hipofisarias se secretan de forma pulsátil o episódica, y esta pulsatilidad está controlada a su vez por los patrones de secreción sincronizada de las hormonas hipotalámicas. El eje hipotálamo hipofisario integra las señales inhibitoras y estimuladoras, tanto centrales como periféricas para sintetizar y secretar las hormonas hipofisarias por el tipo celular específico¹¹⁶. Cada uno de estos tipos celulares expresa receptores específicos para el factor hipotalámico estimulador o inhibidor de la secreción de hormona hipofisaria, de manera que la producción de hormona por estas células está regulado directamente por hormonas hipotalámicas que llegan a la hipófisis anterior a través del sistema portal. Las hormonas hipotalámicas estimulan secreción de hormonas en los respectivos tipos celulares hipofisarios, que se clasifican en cinco tipos diferentes, en función de la hormona que producen y liberan (Tabla 3).

Tipo celular	Hormona	% población celular	Hormona hipotalámica	Predominante núcleo hipotalámico de síntesis
Tirotropas	TSH	10%	TRH (+) SRIF (-)	Paraventricular, AVPV
Gonadotropas	LH-FSH	10-15%	GnRH (+)	Arcuato
Corticotropas	ACTH	15-20%	CRF (+)	Paraventricular, supraóptico
Lactotropas	Prolactina	10-25%	Dopamina (-) TRH (+)	Arcuato, paraventricular
Somatotropas	GH	50%	GHRH (+)	Arcuato, AVPV

Tabla 3. Secreción hormonal del lóbulo anterior de la hipófisis y su control por hormonas hipotalámicas. Cada tipo celular hipofisario produce y libera hormonas en respuesta a factores hipotalámicos específicos.

Tipos celulares hipofisarios:

- Células tirotropas. Estas células constituyen aproximadamente entre el 3 y el 5 % de las células adenohipofisarias, y secretan la hormona estimulante del tiroides o tirotropina (TSH) en respuesta fundamentalmente al tripéptido hipotalámico TRH ¹¹⁷. La TSH es una glicoproteína que actúa sobre el tiroides estimulando la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas tiroxina y triyodotironina ¹¹⁸⁻¹²⁰.

- Células gonadotropas. Estas células constituyen entre un 10 y un 20 % de las células adenohipofisarias y producen las gonadotropinas: hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH). Aunque se nombran por su función en hembras, ambas hormonas son cruciales para la función tanto del ovario como del testículo. En hembras, la FSH promueve el crecimiento de los folículos ováricos, y en machos promueve la formación de espermatozoides en el epitelio germinal del testículo ¹²¹⁻¹²³. Además, actúa sobre las gónadas estimulando la producción de inhibina, que suprime la síntesis y secreción de FSH ^{123, 124}. Aunque la expresión del gen FSH también está regulada por GnRH, los factores determinantes de la síntesis de FSH son la activina y la inhibina ¹²⁵⁻¹²⁷. Por otro lado, la expresión de LH está principalmente determinada por GnRH ^{123, 124}. En hembras, la LH induce la ovulación del folículo maduro y la formación del cuerpo lúteo, y además, estimula la síntesis y secreción de estrógenos y progesterona ¹²³. En machos, la LH estimula la secreción de testosterona por las células de Leydig en el testículo.

Las gonadotropinas, junto con la TSH, son hormonas glucoproteicas sintetizadas y almacenadas en células hipofisarias, y contienen residuos de azúcar unidos de forma covalente a residuos de asparagina de la cadena polipeptídica. Estas tres glicoproteínas están compuestas por dos subunidades, denominadas alfa y beta. La secuencia aminoacídica de la subunidad alfa es idéntica para LH, FSH y TSH, y es el producto de un gen localizado en el cromosoma 6 humano¹²⁸. La subunidad beta confiere la especificidad fisiológica a cada hormona, y está codificada por genes localizados en distintos cromosomas, manteniendo no obstante una gran homología en su secuencia aminoacídica. Ambas cadenas contribuyen a la unión de la hormona a su receptor.

Existen evidencias que demuestran el control autocrino de la función de las células gonadotropas, especialmente respecto a la regulación diferencial de la secreción de LH y FSH. Varias moléculas interactúan para formar una compleja red de regulación, que incluye la interacción entre distintas sustancias autocrinas, como el sistema activina-inhibina, la leptina, el PACAP, el óxido nítrico, etc. (Fig. 16).

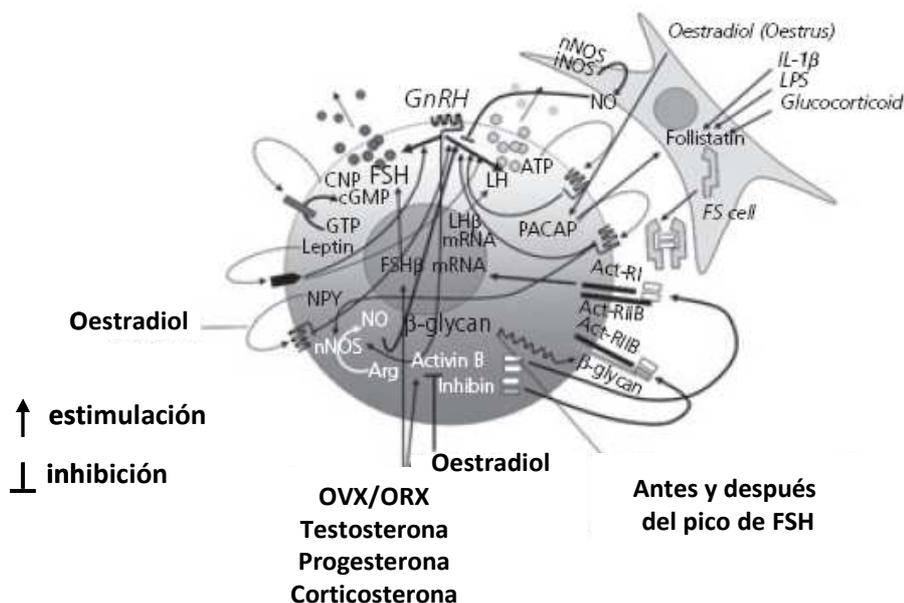


Fig. 16. Esquema representativo de la compleja red de señales autocrinas que actúan en las células gonadotropas. Las líneas sólidas indican las rutas demostradas experimentalmente. Las líneas discontinuas indican interacciones hipotéticas propuestas sobre la base de la presencia de los factores indicados y sus efectos farmacológicos (tomado de Deneff *et al.*¹²⁹).

La activina y la inhibina son factores de crecimiento y diferenciación que ejercen importantes acciones a todos los niveles del eje HPG. En mamíferos, la activina estimula la síntesis y liberación de FSH, y no se detecta efecto en la secreción de LH,

excepto en determinadas condiciones ¹³⁰. La inhibina disminuye la producción de FSH destruyendo la acción de la activina endógena. Cuando ambos factores se administran conjuntamente en cultivos de células hipofisarias, los niveles de ARNm de FSH resultan indetectables, lo que sugiere que la acción reguladora de la expresión FSH de la inhibina es dominante sobre la ejercida por la activina ¹²⁹.

Además, algunos de los péptidos producidos por las células gonadotropas también pueden mediar en las acciones que ejercen estas células sobre las células somatotropas (Fig. 17). Así, el PACAP estimula la expresión y secreción de GH, el péptido natriurético tipo C (CNP) estimula la secreción de GH en células somatotropas, y el péptido natriurético atrial (ANP) inhibe la secreción de GH estimulada por GHRH en rata. Además, la angiotensina, las endotelinas, el NPY, el TRH y la leptina también se producen en células gonadotropas y actúan sobre células somatotropas regulando la secreción de GH (Fig. 17) ¹²⁹.

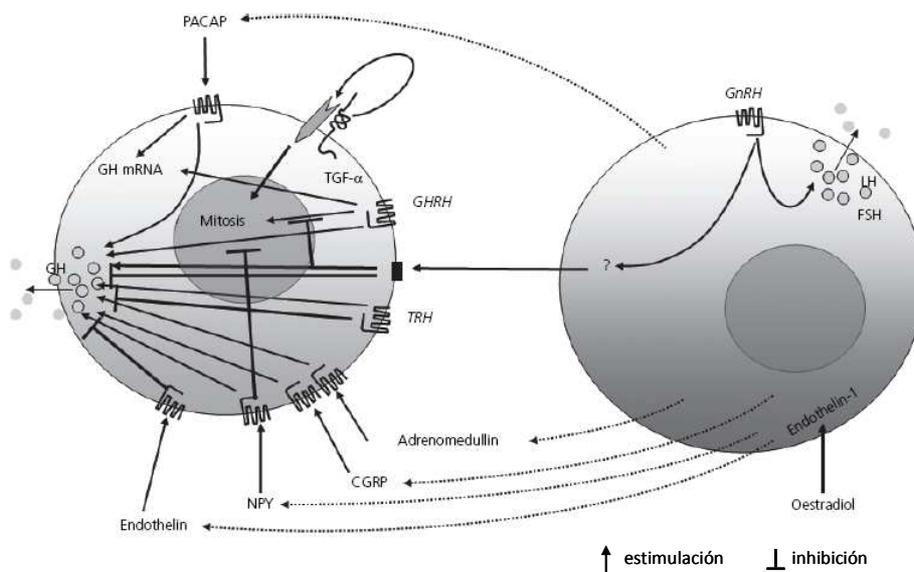


Fig. 17. Esquema representativo de los sistemas paracrinos que actúan entre las células gonadotropas y somatotropas. Las líneas en negro indican las rutas demostradas experimentalmente. Las líneas grises discontinuas indican interacciones hipotéticas propuestas en base a la presencia de los factores indicados y sus efectos farmacológicos (tomado de Deneff *et al.* ¹²⁹).

-Células corticotropas. Este tipo celular constituye aproximadamente un 10-20% de las células adenohipofisarias, y secreta la hormona adrenocorticotropina (ACTH) que controla fisiológicamente la porción del córtex de las glándulas adrenales, regulando la secreción de glucocorticoides (cortisol y corticosterona). La ACTH es un

polipéptido de 39 aa que se origina a partir del procesamiento proteolítico del precursor proopiomelanocortina (POMC), del que también se derivan la hormona estimulante de los melanocitos α (MSH) y la α y β endorfinas, que se generan también de forma selectiva para el tipo celular, en las melanotropas del lóbulo intermedio.

-Células lactotropas. Las células lactotropas, producen y liberan prolactina (PRL) y constituyen el 10-25% de las células adenohipofisarias. La PRL es una proteína de cadena simple de 199 aa que comparte una gran homología con la GH. El receptor de ambas hormonas también es muy similar, aunque el dominio intracelular del receptor de la prolactina es más corto. La principal función de la PRL en hembras es la regulación del desarrollo de la glándula mamaria y la estimulación de la producción de leche durante la lactancia. En machos o en hembras no lactantes, la PRL puede estimular células del sistema inmune, y puede afectar a la función adrenal y al equilibrio electrolítico ^{119, 120, 131-133}. La secreción de PRL está regulada fundamentalmente por el fuerte tono inhibitorio ejercido por la dopamina y en menor medida por la somatostatina. En cuanto a su estimulación, la secreción de PRL está regulada por diversos factores hipotalámicos, entre los que destaca la TRH, así como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la oxitocina.

-Células somatotropas. Estas células son las más grandes en tamaño y abundantes de la adenohipófisis, ya que constituyen alrededor del 40% de la población total hipofisaria. Las células somatotropas son las responsables de la síntesis y liberación de GH. Esta hormona es responsable del crecimiento somático durante el desarrollo postnatal y de hecho, su función es imprescindible para lograr la estatura normal del adulto. Pero además, la GH desempeña importantes funciones metabólicas, como la movilización de ácidos grasos en tejido adiposo y la inhibición del metabolismo de la glucosa en el músculo y en el tejido adiposo.

La regulación primaria de la producción de GH la ejerce el hipotálamo mediante dos factores peptídicos, GHRH y SRIF. Además, se ha demostrado que la propia GH regula su secreción a través de un mecanismo de retroalimentación a nivel hipotalámico, inhibiendo la liberación de GHRH y estimulando la secreción de SRIF ^{134, 135}. La GH juega un papel esencial en el gasto energético, por lo que es de esperar que

la regulación autocrina de las células somatotropas esté relacionada con la homeostasis energética. Asimismo, en los últimos años se han caracterizado complejos sistemas adicionales de regulación de la secreción de GH, entre los que destacan las acciones del PACAP, así como de otras moléculas que se expresan en células somatotropas y que regulan la ingesta de alimento a nivel hipotalámico como la ghrelina, leptina, NPY, TRH, sustancia P y encefalinas. Sin embargo, hasta la fecha solo existen evidencias indirectas de la regulación autocrina ejercida por estos péptidos ¹²⁹.

La ghrelina ¹³⁶, un péptido de origen gastrointestinal y también presente en hipotálamo e hipófisis, tiene actividad orexigénica y es el ligando endógeno del receptor de la familia de secretagogos sintéticos de GH (GHS-R). En la hipófisis de rata se expresa en células somatotropas, lactotropas y tirotropas ^{129, 137}. La ghrelina es un regulador local de las células somatotropas ya que las sensibiliza a la acción de GHRH, y los niveles de ARNm de ghrelina y la cantidad de péptido cambian de forma similar a como lo hace el contenido hipotalámico de GHRH en distintas condiciones, como en situaciones de hiper- o hipotiroidismo, exceso o deficiencia de glucocorticoides, etc. ¹²⁹ (Fig. 18).

Por su parte, se han identificado factores endógenos con similitud estructural con la SRIF, como el péptido denominado cortistatina, que es producido en diversas regiones del SNC y que se une con gran afinidad a los receptores de SRIF ^{138, 139}.

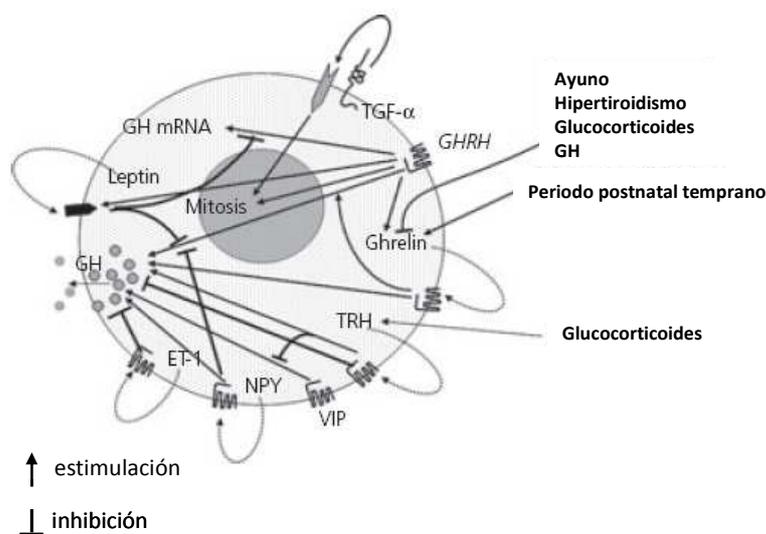


Fig. 18. Esquema representativo de los bucles autocrinos que actúan en células somatotropas. Las líneas en negro indican las rutas demostradas experimentalmente. Las líneas grises discontinuas indican interacciones hipotéticas propuestas sobre la base de la presencia de los factores indicados y sus efectos farmacológicos (tomado de Deneff *et al.* ¹²⁹).

2.3. Gónadas.

- Testículo.

En mamíferos, el sistema reproductor del macho incluye los órganos sexuales primarios (testículos) y las estructuras sexuales secundarias (conductos genitales y excretorios, glándulas anexas y pene). Cada testículo está constituido por compartimientos que albergan los túbulos seminíferos, en los que se alojan las células germinales, que originan los espermatozoides, y las células de Sertoli, cuya función es la de sostén y nutrición de las células germinales. Entre los túbulos seminíferos, también se encuentran las células de Leydig cuya función es la producción de las hormonas sexuales masculinas o andrógenos. La testosterona, el andrógeno más potente y producido en mayor cantidad, se libera a los túbulos seminíferos en los que es esencial para la espermatogénesis, y pasa a la circulación alcanzando así sus tejidos diana. La testosterona es la responsable del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos tanto durante el desarrollo fetal como, especialmente, durante la pubertad.

La producción de hormonas que controlan el funcionamiento de los testículos está regulada por un sistema de retroalimentación negativa (Fig. 19). Así, la GnRH producida en el hipotálamo actúa sobre la hipófisis anterior estimulando la producción de LH y FSH. La LH estimula la producción y liberación de testosterona por las células de Leydig. A medida que la testosterona en circulación sanguínea aumenta, la producción de GnRH por parte del hipotálamo se inhibe. La testosterona también influye sobre la hipófisis mediante la supresión de la producción de LH. Como consecuencia de estos efectos inhibidores combinados, la secreción de LH por la hipófisis se reduce. Por otro lado, la FSH actúa sobre las células de Sertoli, las cuales producen la inhibina, que inhibe la producción de FSH en la hipófisis. La acción combinada de la inhibina y la testosterona es esencial en la espermatogénesis (Fig. 19).

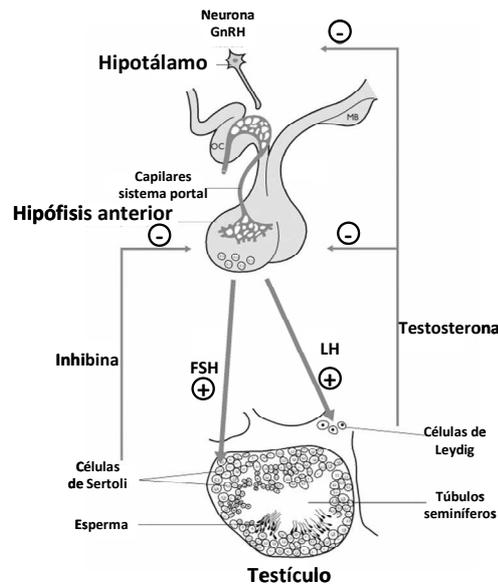


Fig. 19. Esquema simplificado de los circuitos de retroalimentación que controlan la producción de esperma. El hipotálamo secreta GnRH que estimula a las células hipofisarias para producir LH y FSH. En el testículo, la LH estimula a las células de Leydig para producir testosterona, y la FSH actúa sobre las células de Sertoli que producen inhibina y promueven la producción de esperma. La testosterona y la inhibina ayudan a regular la producción de GnRH.

- Ovario.

En mamíferos, el sistema reproductor de la hembra está formado por dos ovarios, órganos productores de gametos, y ubicados en la cavidad abdominal y suspendidos por los ligamentos ováricos. En los ovarios se produce la ovulación, que es un evento cíclico regulado por hormonas, que conlleva cambios en las células foliculares y en la pared uterina (Fig. 20).

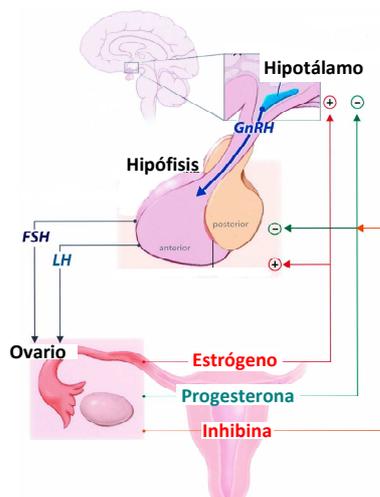


Fig. 20. Esquema simplificado de los circuitos de retroalimentación que controlan la ovulación. El hipotálamo secreta GnRH que estimula a las células hipofisarias para producir LH y FSH. En respuesta a las gonadotropinas, el ovario produce esteroides sexuales e inhibina que mediante mecanismos de retroalimentación actúan sobre la hipófisis y el hipotálamo para regular la ovulación.

En cuanto a la ovulación, existen dos tipos de ciclos: el menstrual y el estral. El ciclo menstrual se produce en primates, conlleva la salida espontánea de flujo sanguinolento como consecuencia de la necrosis del endometrio uterino, y ocurre en ciclos mensuales. La ovulación se produce a la mitad del ciclo, siendo el primer día el que coincide con la aparición de la menstruación.

El ciclo estral se da en el resto de mamíferos, y es el periodo comprendido entre la aparición del estro y el comienzo del siguiente ciclo, dependiendo su duración de la especie. La ovulación es un proceso espontáneo y predecible, porque el estro conductual coincide con la descarga preovulatoria del pico de LH inductora de la ovulación. La hembra acepta al macho exclusivamente en este periodo, pues está relacionado con las variaciones en la concentración sanguínea de los estrógenos y la progesterona.

3. Tejido Adiposo.

En mamíferos, el tejido adiposo está formado por dos tejidos de apariencia distinta, el tejido adiposo blanco y el pardo ¹⁴⁰. Este último está relacionado funcionalmente con la termogénesis y posee una importancia cuantitativa menor, restringiéndose su presencia fundamentalmente a neonatos y animales hibernantes ¹⁴¹. El tejido adiposo blanco es clásicamente considerado el órgano central de almacenamiento de energía metabólica en mamíferos, y es el tejido donde se produce y regula la lipólisis y lipogénesis. El tejido adiposo se distribuye ampliamente por el organismo en forma de depósitos tanto subcutáneos como viscerales de distinto tamaño ¹⁴². Recientemente se ha documentado que el tejido adiposo, además de su función clásica de almacén energético, también actúa desempeñando acciones endocrinas mediante la síntesis y liberación de diferentes factores que reciben el nombre genérico de adipoquinas. Éstas participan en funciones tan importantes como la homeostasis energética, el metabolismo lipídico, la respuesta inmune y la reproducción. En este sentido, el hallazgo más relevante, por su novedad e importancia funcional, se produjo en 1994 con el descubrimiento de una hormona producida y secretada por los adipocitos, la leptina. Esta hormona se identificó durante

la caracterización del gen *ob*, cuya delección es responsable de la obesidad en los ratones *ob/ob*, uno de los modelos animales más utilizados en estudios de obesidad¹⁴³. Posteriormente al descubrimiento de la leptina, se identificó una amplia gama de factores secretados por los adipocitos, contabilizándose actualmente más de 50 moléculas denominadas genéricamente adipoquinas. La mayoría de las adipoquinas están relacionadas con el sistema inmune, como el factor de necrosis tumoral α , las interleuquinas, los factores de crecimiento, etc. También existen proteínas relacionadas con la regulación de la presión sanguínea como la angiotensina; relacionadas con la homeostasis de la glucosa como la adiponectina, o con la angiogénesis como el factor de crecimiento del endotelio vascular¹⁴⁴⁻¹⁴⁹, por lo que el adipocito se considera actualmente como una célula secretora compleja.

La leptina es una hormona anorexigénica producida de forma mayoritaria, aunque no exclusiva, en el tejido adiposo¹⁴³. Esta hormona actúa en la regulación central del control del apetito y del balance energético, reduciendo la ingesta de alimento e incrementado el gasto energético¹⁵⁰. Además, la leptina también interviene en la regulación de la reproducción y el sistema inmune^{146, 151}. En adultos, el ARNm de leptina se detecta principalmente en tejido adiposo blanco¹⁵², en tejido adiposo pardo¹⁵³, y tejidos no adiposos como mucosa gástrica¹⁵⁴, células epiteliales mamarias¹⁵⁵, miocitos¹⁵⁶, placenta¹⁵⁷, testículo, ovario y folículos pilosos¹⁵⁸. La leptina proporciona al cerebro la información sobre el estado de los reservorios de energía corporal, y forma parte del mecanismo de retroalimentación que actúa como lipostato. Se ha sugerido que cuando las células de grasa aumentan en número y tamaño, o de forma opuesta, en situaciones de ayuno, la activación de la expresión del gen *ob* provoca un aumento de la producción de leptina, que se libera a la circulación¹⁵⁹, alcanzando el cerebro, donde provoca disminución del apetito y aumenta el gasto metabólico. El núcleo ventromedial del hipotálamo juega un papel central en la regulación de la conducta alimenticia, y constituye por tanto un importante órgano diana para esta proteína¹⁴³.

Los datos disponibles indican que la pérdida de grasa corporal disminuye los niveles de leptina, que induce un estado positivo del balance energético y otros cambios adaptativos. Por el contrario, un incremento de los depósitos de grasa

conduce a incrementar los niveles de leptina y a un balance energético negativo (Fig. 21).

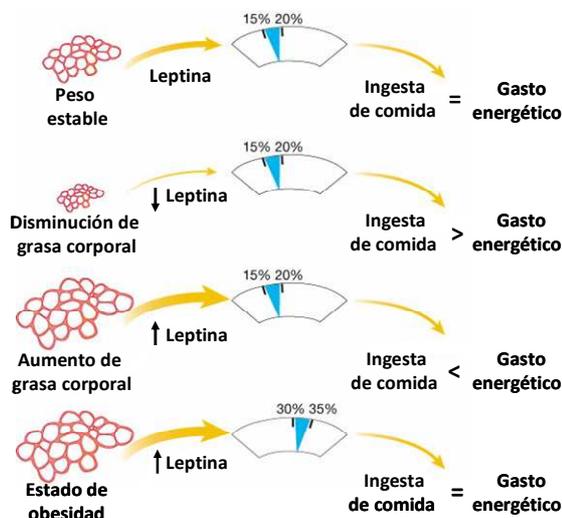


Fig. 21. El contenido de grasa corporal está bajo control homeostático. La disponibilidad de leptina es la señal aferente del circuito de regulación de la masa de tejido adiposo. En un individuo de peso estable (15-20% de grasa corporal en sujetos no obesos) la cantidad de leptina circulante provoca un estado donde la ingesta de comida es igual al gasto energético. El incremento en los niveles de leptina da lugar a un balance energético negativo, mientras que una disminución de estos niveles conduce a un balance energético positivo. La sensibilidad a leptina se reduce en situaciones de obesidad, donde el índice de grasa corporal aumenta (30-35%) (modificado de Friedman *et al.* ¹⁶⁰).

El descubrimiento de la leptina permitió confirmar la estrecha relación entre la regulación de la homeostasis energética del organismo y el control de la reproducción. Así, numerosos estudios experimentales sobre el efecto de la leptina en la reproducción, los cambios en su concentración y expresión indican que esta hormona podría estar asociada con el inicio de la pubertad en diferentes especies animales, proponiendo así que la leptina puede actuar como un facilitador de la pubertad. En este sentido, se ha observado que la administración de leptina adelanta el inicio de la pubertad en ratas y ratones ⁷⁴⁻⁷⁶, y además se ha observado que los ratones hembra *ob/ob* son estériles ⁷⁷, mientras que la administración de leptina a ratones macho *ob/ob* puede restaurar la pubertad ⁷⁸. Por su parte, la acción de la leptina sobre la liberación de GnRH puede explicar la infertilidad de las mujeres con peso inferior al normal (Fig. 22).

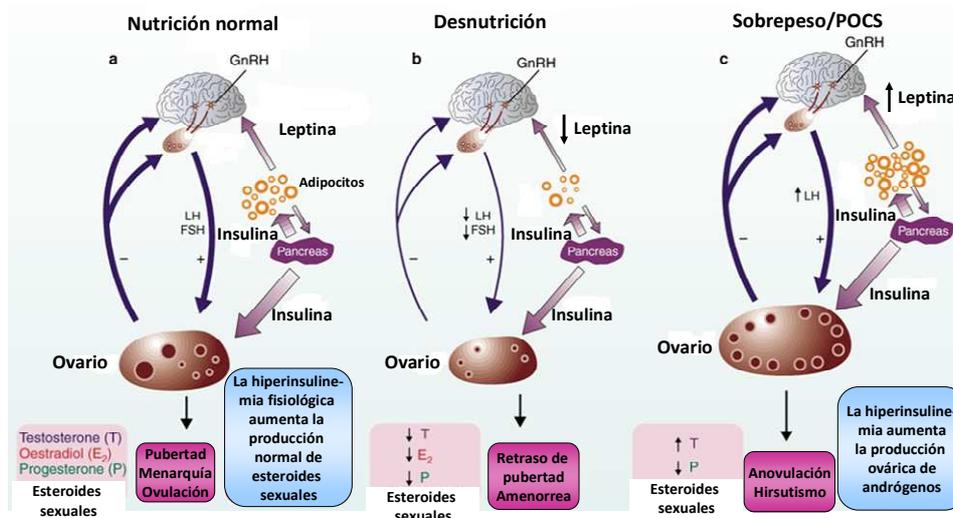


Fig. 22. (a) La función ovárica normal está regulada por LH y FSH, cuya secreción está controlada por GnRH. La nutrición está conectada con el sistema reproductivo femenino a través de la leptina y la insulina, que alteran la disponibilidad de esteroides. (b) En situaciones de desnutrición, la producción de leptina disminuye, se reduce la producción de GnRH y por tanto de LH y FSH, como consecuencia el sistema reproductivo se apaga. (c) En situaciones de sobrepeso y/o PCOS (síndrome de ovario poliquístico), el aumento de adipocitos da lugar a una cascada de cambios, que incluye el aumento de los niveles de leptina e insulina y el aumento periférico de LH. El resultado es un desarrollo parcial de los folículos que secretan testosterona de forma supranormal (modificado de Sharpe *et al.* ¹⁶¹).

El papel de la leptina en la reproducción de los machos se ha estudiado especialmente en ratas y ratones, pero también se han realizado investigaciones en humanos y otras especies animales. En las células de Leydig, en los túbulos seminíferos, las espermatogonias y los espermatozoides, entre otros tipos celulares, se ha detectado la expresión de los receptores de leptina, lo que indica que puede haber una función importante de esta hormona a nivel testicular ¹⁶²⁻¹⁶⁵. Los ratones macho *ob/ob* padecen hiperfagia, obesidad mórbida e infertilidad. La administración de leptina exógena disminuye el apetito y el peso corporal y aumenta el peso del testículo, de las vesículas seminales, y del número de espermatozoides ¹⁶⁶.

En niños con pubertad precoz, la reducción de los niveles de testosterona como resultado del tratamiento con análogos de la GnRH, eleva las concentraciones de leptina. Por otro lado en hombres con hipogonadismo se ha logrado una reducción de los niveles séricos de la leptina, tras la administración del tratamiento sustitutivo con testosterona ¹⁶⁷. Este efecto inhibitorio de la testosterona sobre la secreción de leptina y viceversa indica que la leptina puede regular la esteroidogénesis en el testículo,

además también puede actuar en células no diferenciadas del testículo para permitir su diferenciación en espermatozoides y puede ayudar a las células a través de su diferenciación y maduración hacia espermátidas (Fig. 23).

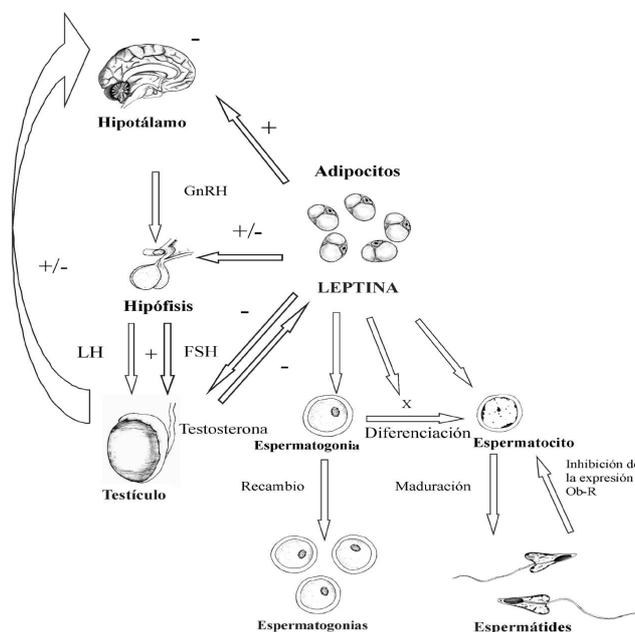


Fig. 23. Mecanismo de acción de la leptina en el eje hipotálamo hipófisis testículo. La leptina actúa sobre el hipotálamo estimulando la liberación de GnRH, que regula la secreción de LH y FSH. En animales obesos, los niveles de leptina aumentan significativamente y se produce una inhibición de la secreción de testosterona testicular, que a su vez es capaz de inhibir la secreción de leptina por el tejido adiposo. En la espermatogonia, la leptina previene la diferenciación, y en los espermatocitos la maduración. Las espermátidas pueden inhibir la expresión de Ob-R en el espermatocito mediante retroalimentación negativa. (tomado de Quintero *et al.*¹⁶⁸).

Cuando el balance energético es positivo, la masa de tejido adiposo aumenta, los adipocitos sufren hipertrofia e hiperplasia, y se expanden hasta alcanzar un volumen máximo, momento en el que se produce un aumento en el número de adipocitos¹⁴⁰. Durante este proceso, las células en expansión producen una serie de factores proliferativos paracrinos que funcionan como controladores internos de la proliferación del preadipocito, de manera que sus respuestas proliferativas están moduladas por señales neurales^{169, 170}. La obesidad es un desorden heterogéneo que reduce la esperanza de vida y predispone al individuo a padecer distintas enfermedades como diabetes tipo 2, enfermedades coronarias y algunos tipos de cáncer^{171, 172}. La organización mundial de la salud considera situación de obesidad cuando el índice de masa corporal es igual o superior a 30 kg/m², y actualmente es uno

de los trastornos más comunes en los países desarrollados, aumentando su incidencia de forma alarmante. La obesidad, más que como un mero y antropométrico aumento de grasa corporal, se considerada como un trastorno endocrino e inflamatorio ligado íntimamente con la resistencia a insulina. Inicialmente se propuso que la administración exógena de leptina podría inhibir la ingesta de alimento y así usarse como tratamiento terapéutico para la obesidad. Sin embargo, se obtuvo muy poco éxito en este sentido, como consecuencia de la resistencia a leptina observada en los individuos portadores de mutaciones en el receptor de la leptina¹⁷³.

En resumen, está ampliamente documentado que los distintos componentes del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal ejercen muy diversas acciones íntimamente reguladas y coordinadas por factores que actúan a distintos niveles. En este sentido, en los últimos años se han descrito una serie de señales que actúan a diferentes niveles del eje neuroendocrino, gobernando la ingesta de comida, la homeostasis energética, el metabolismo y la fertilidad, actuando como integradores y estableciendo una estrecha conexión entre el balance energético y la función reproductora. Como ejemplos de este tipo de señales cabe destacar las acciones de la leptina, la ghrelina y la adiponectina, relacionadas inicialmente con el control del balance energético y del metabolismo, y de las que actualmente se ha reconocido su participación en el control de la reproducción.

En este sentido, son muchas las evidencias que sugieren que el sistema kiss1/kiss1r podría actuar también como un integrador de los ejes reproductor y metabólico modulando sus acciones a distintos niveles. Por ello, en el presente trabajo nos hemos propuesto profundizar en el estudio del sistema kiss1/kiss1r fuera del hipotálamo, concretamente analizamos su presencia y regulación a nivel hipofisario, testicular y en el tejido adiposo.

II.HIPÓTESIS

HIPÓTESIS.

La expresión de kiss1 y/o su receptor en órganos y tejidos relacionados funcionalmente con el hipotálamo, pero distales al mismo, permiten postular que el sistema kiss1/kiss1r desempeña funciones reguladoras endocrinas adicionales a las que ejerce en el hipotálamo.

Concretamente, proponemos que el sistema kiss1/kiss1r puede actuar a nivel hipofisario regulando algunos de sus tipos celulares, y que su presencia en esta glándula, así como en testículo y tejido adiposo, está controlada por factores de relevancia fisiológica, como son la edad, las hormonas hipotalámicas, los esteroides sexuales y las condiciones metabólicas.

Una acción del sistema kiss1/kiss1r a múltiples niveles podría contribuir a la mejor integración fisiológica coordinada de los ejes reproductor y somatotrópico con la homeostasis metabólica.

III.OBJETIVOS

OBJETIVOS.

- 1.- Determinar la acción directa y los mecanismos de acción del sistema kiss1/kiss1r sobre células hipofisarias, sus posibles interacciones con los factores hipotalámicos GnRH y GHRH, y su regulación por los esteroides sexuales.

- 2.- Estudiar la regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r en hipófisis por factores de relevancia fisiológica. En concreto se analizarán la:
 - 2a.- Regulación de la expresión de kiss1/kiss1 durante el desarrollo postnatal.
 - 2b.- Regulación heteróloga por factores hipotalámicos, y homóloga por kp-10, de la expresión del sistema kiss1/kiss1r.
 - 2c.- Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r por esteroides sexuales.
 - 2d.- Expresión del sistema kiss1/kiss1r bajo diferentes condiciones metabólicas.

- 3.- Analizar la presencia y regulación del sistema kiss1/kiss1r en testículo.
 - 3a.- Regulación durante el desarrollo postnatal.
 - 3b.- Regulación en distintas condiciones metabólicas.

- 4.- Analizar la presencia y regulación del sistema kiss1/kiss1r en tejido adiposo.
 - 4a.- Regulación durante el desarrollo postnatal.
 - 4b.- Regulación en distintas condiciones metabólicas.

- 5.- Determinar las Características estructurales y farmacológicas de análogos modificados de kp-10 de rata, y búsqueda de posibles antagonistas/agonistas.

IV.MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico.

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas Wistar procedentes de los animalarios de las Universidades de Córdoba, Cádiz y Granada, y diferentes tejidos proporcionados por la Dra. R. D. Kineman de la Universidad de Illinois en Chicago (EE.UU.), obtenidos de ratones macho adultos de la cepa C57Bl/6J y suministrados por Laboratorios Jackson.

Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (22°C), con un periodo luz-oscuridad de 12 h (de 7:00 a 19:00 h), y con libre acceso a comida y agua. Para la realización de los experimentos, los animales se sacrificaron por decapitación, entre las 9 y las 12 h de la mañana, siguiendo la normativa recogida en la legislación nacional y europea, y aprobada por el comité de Bioética de la Universidad de Córdoba sobre manipulación y uso de animales de experimentación. Tras la decapitación, las hipófisis destinadas a un proceso de dispersión y cultivo celular se transfirieron a DMEM (medio esencial mínimo de Dulbecco) a 4°C, y se procedió tal como se detalla en el apartado **3.1**. El resto de los tejidos objeto de estudio se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento para el aislamiento de ARN, retrotranscripción y análisis de la expresión de los genes de interés.

2. Material y reactivos.

Los materiales y reactivos necesarios para la realización de los experimentos así como los programas informáticos utilizados se adquirieron a diversas compañías, tal y como se detalla a continuación:

Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, EE.UU.): estradiol, GnRH, GHRH, HEPES, antibiótico-antimicótico, BSA, gentamicina sulfato, Tripsina-EDTA, DMEM sin rojo fenol, probenecide, DEPC, β -mercaptoetanol, L-Glutamina, tripsina, colagenasa, inhibidor de la tripsina, ADNasa, solución de Hanks, EDTA, Triton X-100.

Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, EE.UU.): kp-10 de ratón.

Cambrex (Verviers, Bélgica): DMEM.

R&D Systems (Minneapolis, MN, EE.UU.): leptina.

Bellco Biotechnology (Vineland, NJ, EE.UU.): cubreobjetos reticulados de 25 mm de diámetro.

Sera-Lab LTD (Crawley Down, R.U.): Suero fetal bovino (FBS).

Gibco (Barcelona): medio F-12, geneticina y HBSS.

Invitrogen (Barcelona): Lipofectamina 2000TM, Opti-MEM, Trizol y el vector de clonación pCDNA3.1+.

Roche (Madrid): glucógeno.

Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.): FURA-2 AM, Fluo4 AM, y pluronic F-127.

Imaging Corporation (West Chester, PA, EE.UU.): **software** MetaFluor.

NIDDK (National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, MD, EE.UU.) nos proporcionó los anticuerpos.

GraphPad Software Inc (San Diego, CA, EE.UU.): software GraphPad Prism V 4.0.

Pierce (Rockford, IL, EE.UU.): el kit de tubos de Iodogen.

Quiagen (Madrid): “RNeasy Lipid Tissue Mini Kit” y “RNase-Free DNase Set”.

Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.): “Absolutely RNA rt-PCR Miniprep Kit”.

Fermentas (Hanover, MD, EE.UU.): “cDNA First Strand Synthesis kit”, T4 ADN ligasa y “2X Master Mix PCR reagent”.

Labotaq (Sevilla): kits de Bioneer “AccuPrepR Plasmid Extraction Kit” y “AccuPrepR Gel Purification Kit”.

BioRad (Barcelona): “IQ SYBR Green supermix”.

EcoGen (Barcelona): Taq polimerasa Ecozyme o EcoTaq.

Molecular Biology Ins.(Cascade, CO, EE.UU.): software Oligo 6.0.

Research Diets (Brunswick, NJ, EE.UU.): pienso granulado con alto y bajo contenido en grasa.

3. Técnicas básicas de Biología Celular.

3.1. Dispersión celular.

La extracción de la hipófisis se realizó inmediatamente después del sacrificio de los animales, siendo ésta rápidamente sumergida en medio de cultivo estéril DMEM a pH 7,4, suplementado con 0,3% de BSA, 0,58% de HEPES, 0,22% de NaHCO₃ y 1% de mezcla de antibiótico antimicótico. Con objeto de obtener una suspensión de células monodispersas, las hipófisis se sometieron a un proceso de dispersión enzimático-mecánica que se detalla en el **protocolo 1**^{174, 175}. Una vez terminado el proceso de dispersión, se determinó el número de células utilizando una cámara de Neubauer, y su viabilidad utilizando el test de exclusión del azul tripán¹⁷⁶.

3.2. Cultivos de células hipofisarias de rata.

Con objeto de determinar la concentración de hormonas hipofisarias presentes en el medio tras los distintos tratamientos farmacológicos, las células de la suspensión obtenida mediante el proceso de dispersión se cultivaron en placas de poliestireno de 24 pocillos a una densidad de 300.000 células/pocillo. Por otro lado, para la determinación de la cinética de la concentración de Ca²⁺ libre citosólico ([Ca²⁺]_i), mediante microfluorimetría, las células se cultivaron sobre cubreobjetos reticulados de 25 mm de diámetro colocados en el interior de una placa de petri de 35 mm de diámetro, a una densidad de 100.000 células/cubreobjeto.

Tras permitir la adhesión de las células al sustrato durante un periodo de 45 min, cada pocillo o placa recibió 800 µl ó 1800 µl respectivamente de DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y un 1% de la mezcla antibiótico antimicótico (DMEM-FBS). A continuación, las células se incubaron a 37°C en cámara de cultivo (Galaxy CO₂ incubator, Cultek, Madrid), con 95% de aire y 5% de CO₂, durante un periodo total de tres días hasta el día del tratamiento. Tras las primeras

48h de cultivo, el medio fue reemplazado por nuevo DMEM-FBS, y el día del experimento, y como paso previo a la realización de los tratamientos, este medio fue sustituido por DMEM sin FBS, que se mantuvo durante un periodo de al menos 2 h para eliminar los restos de suero, y permitir la estabilización de la secreción basal de hormonas.

3.3. Obtención y mantenimiento de la línea celular monoclonal estable CHO-K1*kiss1r*.

Las células tanto de la línea celular CHO-K1 como de la línea monoclonal estable CHO-K1*kiss1r*, se cultivaron en botellas de 75 mm² de superficie, a una densidad inicial de 100.000 células/ml, y se mantuvieron en cultivo en medio F-12 suplementado con 10% de FBS y un 1% de mezcla de antibiótico antimicótico (F-12-FBS) hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. En este momento, las células se despegaron mediante incubación con la solución Tripsina-EDTA durante 5 min a 37°C, y a continuación se centrifugaron (5 min/1500 rpm), para finalmente determinar el número y viabilidad celular, de la misma forma que se ha detallado en el apartado **3.1**.

Para la obtención de la línea monoclonal que expresa de forma estable el receptor *kiss1r*, CHO-K1*kiss1r*, las células de la línea CHO-K1 se cultivaron en placas de 12 pocillos hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. En ese momento, las células se transfectaron con una concentración de entre 3 y 5 µg de ADN plasmídico recombinante que contenía la secuencia codificante para el *kiss1r* de rata (obtenido tal como se describe en el apartado **4.5**). La transformación se llevó a cabo con la ayuda de 3 µl de Lipofectamina 2000TM por cada reacción de transfección, en 100 µl de medio de cultivo Opti-MEM libre de suero y antibiótico, y que también contenía el ADN plasmídico. Tras 24 h de cultivo, el medio de cultivo se reemplazó por F-12 suplementado con 1 mg/ml del antibiótico de selección, en nuestro caso el gen de resistencia a geneticina, que fue renovado cada 48 h. Una semana más tarde, las células supervivientes, y que por tanto expresaban el gen de resistencia a geneticina y el gen *kiss1r*, se recolectaron y se diluyeron a razón de 70 células/ml para ser cultivadas en placas de 96 pocillos (15 µl/pocillo), con objeto de obtener como máximo una célula en cada pocillo. Sobre este cultivo se hizo un seguimiento diario del crecimiento de las células monoclonales mediante microscopía. La línea monoclonal se

obtuvo aproximadamente en un periodo de 3 semanas, tras el cual se extrajo el ARN y se verificó mediante PCR la expresión de *kiss1r*, así como su número de copias/células.

3.4. Estudios de microfluorimetría.

Para estudiar la capacidad de las kps de unirse y activar a su receptor, se llevaron a cabo estudios de la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ tanto sobre células individuales como a nivel de poblaciones celulares (FlexStation II).

-Medida de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre células individuales.

Con objeto de estudiar las características funcionales de la kp-10 así como de una serie de análogos modificados y derivados de este decapeptido, se realizó un estudio de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre la línea monoclonal estable CHO-K1-*rkiss1r*. Además, para determinar la capacidad de la kp-10 para actuar de forma directa a nivel hipofisario, se analizó la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos de células adenohipofisarias de rata.

En ambos casos, las células se incubaron a 37°C durante 30 min con 2,5 μ M del fluoróforo Fura-2 acetoximetil ester (Fura-2AM), con un 0.02% de pluronic F-127, en 2 ml de DMEM sin rojo fenol pH 7,4 suplementado con 20 mM de $NaHCO_3$ y 1 mM de HEPES. A continuación, se retiró el medio y las células se incubaron durante 15 min con DMEM nuevo sin la sonda fluorescente, para permitir la ruptura del enlace acetoximetil ester mediante hidrólisis catalizada por esterasas celulares. Finalmente, los cubreobjetos con las células adheridas y cargadas con la sonda fluorescente se colocaron en una cámara porta-cubreobjetos que a su vez se colocó en la plataforma de un microscopio invertido Nikon (Eclipse TE2000-E), acoplado a una cámara Hamamatsu ORCA II BT (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón).

Las medidas de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ se realizaron utilizando un objetivo de inmersión de 40X y con la ayuda del programa MetaFluor (Imaging Corporation, West Chester, PA, EE.UU.). Este sistema, permite evaluar cada 5 seg la fluorescencia emitida por la sonda (505 nm), y de forma alternante las longitudes de onda de excitación a 340 nm cuando la sonda está unida a Ca^{2+} y a 380 nm cuando la sonda está libre, de manera que las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ se monitorizaron como cambios en el cociente F340/F380. Mediante este tipo de ensayos pudimos determinar el porcentaje de

células que responden al tratamiento con kp-10 y sus análogos, así como el incremento máximo de la $[Ca^{2+}]_i$ y el tiempo necesario para alcanzar este incremento máximo. Todos estos valores aportan información sobre la capacidad funcional de los compuestos analizados.

-Medida de la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre poblaciones celulares mediante el sistema FlexStation II.

Para determinar la capacidad de la kp-54, de la kp-10 humana y de rata, así como de sus análogos para unirse y activar a su receptor, se realizaron estudios de microfluorimetría sobre poblaciones celulares, utilizando el sistema FlexStation II (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Para ello, se analizó una serie de análogos derivados de la kp-10 de rata, diseñados y sintetizados por el Dr. J. Leprince en la Unidad de Neuroendocrinología Celular y Molecular de la Universidad de Rouen, Francia, y dirigida por el Dr. H. Vaudry. Concretamente, estos análogos se obtuvieron mediante sustituciones puntuales de cada residuo aminoacídico del decapeptido por el aa Alanina, y fueron denominados Ala^x[kp-10], donde x corresponde a la posición del decapeptido que ha sido sustituida.

Para estos ensayos, las células de la línea celular CHO-K1-*rkiss1r* se cultivaron en placas de 96 pocillos negras con fondo claro a razón de 40.000 células/pocillo en medio F-12-FBS durante 24 h. El día del ensayo, este medio se sustituyó por una solución estándar HBSS (Hank's balanced salt solution), suplementado con 5 mM de HEPES, 2,5 mM de probenecide, 4 mM del marcador fluorescente Fluo4-AM y un 0,02% de pluronic F-127, y las células se incubaron durante 1 h a 37°C. A continuación, las células se lavaron con la solución HBSS, y los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la administración de los diferentes compuestos se midieron durante 135 seg mediante el sistema FlexStation II. Las respuestas se analizaron como el pico de intensidad máxima de fluorescencia menos la intensidad de fluorescencia basal para cada una de las concentraciones de cada uno de los compuestos estudiados. La respuesta de los valores obtenidos generó curvas sigmoidales dosis-respuesta con pendientes de Hill variables, a partir de las cuales se asignaron valores de EC₅₀ para cada compuesto mediante el programa GraphPad Prism (version 4.0).

Los ensayos para determinar las propiedades agonistas y/o antagonistas de la kp-10 humana y de rata, así como de los análogos modificados de esta última, mediante el sistema FlexStation II, se dividieron en tres bloques. En primer lugar, se analizó la capacidad de cada uno de los péptidos para unirse y activar al receptor kiss1r. Para ello, se administraron dosis comprendidas entre 10^{-12} M y 10^{-5} M de cada uno de los péptidos, lo que permitió determinar sus valores EC_{50} .

En segundo lugar, para determinar la posible capacidad antagonista de aquellos análogos que presentaron valores de EC_{50} claramente superiores al resto de péptidos analizados, se realizó una preincubación de 30 min del cultivo celular con cada uno de los posibles antagonistas a dosis comprendidas entre 10^{-12} M y 10^{-5} M y, a continuación, se llevó a cabo la administración de una única dosis de kp-10 a 10^{-7} M. A partir de los datos obtenidos se generaron curvas que nos permitieron obtener valores IC_{50} para cada uno de los péptidos ensayados.

Por último, y para detallar las características antagonistas de estos análogos se utilizó el protocolo de Schild, un protocolo típico en estudios farmacológicos que permite determinar si el péptido analizado se comporta como un antagonista competitivo reversible, y que consiste en la preincubación durante 30 min con un posible antagonista a dosis 10^{-5} , $10^{-5.5}$ y 10^{-6} M, seguida de la administración de la kp-10 a dosis comprendidas entre 10^{-12} M y 10^{-5} M. A partir de los valores obtenidos se realizaron curvas cuyos perfiles permitieron determinar el tipo de antagonismo que presentaban los péptidos analizados.

3.5. Cuantificación hormonal mediante radioinmunoensayo (RIA).

Los niveles hormonales de GH y LH de las muestras obtenidas tras los distintos tratamientos de los cultivos de células hipofisarias, se midieron por duplicado en un volumen de 10-50 μ l mediante un método de RIA, usando anticuerpos proporcionados por el Dr. Parlow del NIH. Las hormonas GH-I-7 y LH-I-9 se marcaron con Iodo¹²⁵ (¹²⁵I) usando un kit de tubos de Iodogen, y siguiendo las instrucciones del suministrador. Las concentraciones de hormona se expresaron usando las preparaciones de referencia GH-RP-2 o LH-RP-3 como estándar, y la sensibilidad del ensayo fue de 20 pg/tubo para GH, y de 5 pg/tubo para LH. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo en las hormonas estudiadas fueron menores del 8% y del 10% respectivamente. La eficiencia

de la determinación de hormonas fue confirmada mediante la medida de muestras de suero de rata cuyas concentraciones de las distintas hormonas eran conocidas y por tanto sirvieron como controles.

4. Técnicas básicas de Biología Molecular.

4.1. Aislamiento de ARN.

El aislamiento del ARN de las muestras procedentes de testículo, hipófisis, cultivos primarios adenohipofisarios y líneas celulares, se llevó a cabo usando el reactivo Trizol y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El método seguido se detalla en el **protocolo 3**. Posteriormente, las muestras resultantes se sometieron a un tratamiento con ADNasa para eliminar la posible presencia de ADN genómico.

En la extracción de ARN de muestras de pequeño tamaño, como las hipófisis obtenidas en los experimentos de desarrollo postnatal, se utilizó el kit comercial “Absolutely RNA rt-PCR Miniprep Kit”, el cual incluye un paso final de tratamiento con ADNasa.

Para el aislamiento del ARN de las muestras de tejido adiposo de ratón y de rata, se utilizó el kit comercial “RNeasy Lipid Tissue Mini Kit”. A continuación, las muestras resultantes se sometieron a un tratamiento con el kit “RNase-Free DNase Set” para eliminar una posible contaminación con ADN genómico.

En todos los casos, la concentración de ARN total obtenido se determinó por espectrofotometría, y su calidad se comprobó mediante la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm.

4.2. Retrotranscripción del ARN.

Una vez obtenido el ARN total libre de ADN, se sometió a un proceso de retrotranscripción para la obtención de ADNc. Para ello, se utilizó el kit “cDNA First Strand Synthesis kit”, y 2 µg de ARN total de partida.

4.3. Diseño de oligonucleótidos.

Para el diseño de los oligonucleótidos utilizados para PCR convencional o para PCR cuantitativa (ver a continuación), se utilizaron los programas Oligo 6.0 y “primer 3”

(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Steve Rozen, Whitehead Institute for Biomedical Research). La elección de oligonucleótidos altamente específicos y eficientes se realizó de manera que los oligos de cada pareja se encontraran localizados en exones diferentes del gen de interés, no dieran lugar a la formación de estructuras secundarias y tuvieran una temperatura de fusión o “melting” cercana a 61°C. Las secuencias de los oligonucleótidos seleccionados de esta manera se comprobaron en el buscador BLAST (NCBI) para así descartar homologías con otras secuencias.

4.4. Análisis de la expresión génica.

- PCR convencional.

Con objeto de determinar si *kiss1* y su receptor *kiss1r* estaban presentes en cultivos de células adenohipofisarias de ratas peripuberales, se realizó un estudio de expresión mediante PCR convencional en muestras de ADNc de estos cultivos. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, que contenía 2,5 unidades de Taq polimerasa EcoTaq, 200 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) y 100 ng de ADNc. La amplificación de los transcritos se realizó en un termociclador iCycler IQ™ (BioRad, Barcelona), siguiendo el siguiente perfil de temperaturas.

- Desnaturalización inicial:	94°C	2 min	x 1
- Desnaturalización:	94°C	15 s	} x 37
- Alineamiento:	60°C	15 s	
- Extensión:	72°C	15 s	
- Extensión final:	72°C	7 min	} x 1
- Fin	4°C	∞	

Las parejas de oligonucleótidos empleadas en las distintas reacciones de amplificación mediante PCR convencional, así como sus características más relevantes se detallan en la Tabla 4.

GEN	# acceso GenBank	Secuencia Oligo	Tamaño esperado	Posición	Tª annealing
rkiss1	NM_181692	Sense ATGATCTCGCTGGCTTCTTG Antise AGGCTTGCTC TCTGCATACC	174 pb	Sn 33 As 174	60°C
rkiss1r	NM_023992	Sense TGTGCAAATTCGTCAACTACATCC AntiseAGCACCGGGGCGGAAACAGCTGC	225 pb	Sn 170 As 288	60°C
18 S	NM_008907	Sense CCCATTGACGCTGCCCTATC Antise TGCTGCCTCCTGGATGTGGTA	137 pb	Sn 187 As 303	60°C

Tabla 4. Secuencia, código de acceso, tamaño del producto de la amplificación y temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación específica de los genes *kiss1*, *kiss1r* y 18S de rata mediante PCR convencional.

Por último, para confirmar la amplificación de un único producto del tamaño esperado, los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. A continuación se purificaron las bandas de electroforesis siguiendo las indicaciones del kit “AccuPrepR Gel Purification Kit”, y por último para confirmar su identidad fueron secuenciadas en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba.

- PCR cuantitativa a tiempo real.

Para determinación cuantitativa de los niveles de expresión de *kiss1* y *kiss1r* en las distintas muestras experimentales generadas en el presente estudio, se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qrt-PCR) y el reactivo fluorescente “SYBR green”, que tiene la propiedad de emitir fluorescencia una vez acoplado a ADN de doble cadena. Las reacciones de qrt-PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl que contenía 100 ng de ADNc, 0,375 µM de cada oligonucleótido y 12,5 µl de “IQ SYBR Green supermix”. Las condiciones de amplificación fueron idénticas a las utilizadas para PCR convencional, pero al final de cada ciclo de extensión tiene lugar una lectura de la fluorescencia emitida por el SYBR green unido al ADN, de manera que la fluorescencia emitida por el fluoróforo es proporcional a la cantidad de producto amplificado, incluyendo al final de la reacción de amplificación una curva de fusión o melting. Las reacciones se optimizaron previamente en cuanto a temperatura y concentración de oligonucleótidos hasta conseguir una eficiencia de amplificación superior al 85%. Las parejas de oligonucleótidos empleadas en las distintas reacciones de rt-PCR cuantitativa, así como sus características se detallan en la Tabla 5.

GEN	# acceso GenBank	Secuencia Oligo	Tamaño esperado	Posición	Tª annealing
rkiss1	NM_181692	Sense TCTCCTCTGTGTGGCCTCTT Antise AGGCTTGCTCTCTGCATACC	393 pb	Sn 33 As 174	60°C
rkiss1r	NM_023992	Sense TAGTCGGGAACACTACTGGTCA AntiseTACGCAGCACAGAAGGAAAAGT	119 pb	Sn 170 As 288	60°C
rGHRH-R	NM_012850	Sense CACTGCCCCAGGAACTACAT Antise TAGGAGATGTGGAGGCCAAC	238 pb	Sn 499 As 716	60°C
rGHS-R 1A	NM_032075	Sense GGACCAGAACCACAAGCAGA Antise GGCTCGAAGGACTTTGGAAA	114 pb	Sn 756 As 849	60°C
rGnRH-R	NM_031038	Sense CGATCTTCTCGCAATGTGTGACC Antise GCACGGGTTTGAGAAAAGCAAA	380 pb	Sn 656 As 1015	60°C
rCyclophilinA	NM_017101	Sense TGGTCTTTGGGAAGGTGAAAG Antise AAATGCCCGCAAGTCAAAG	138 pb	Sn 422 As 559	60°C
18 S	NM_008907	Sense CCCATTGGAACGCTGCCCTATC Antise TGCTGCCCTCCTTGGATGTGGTA	137 pb	Sn 187 As 303	60°C
mkiss1	NM_053244	Sense AGCTGCTGCTTCTCTCTGT Antise GCATACCGCGATTCTTTT	127 pb	Sn 23 As 129	61°C
mkiss1r	NM_053244	Sense GCCACAGACGTCACTTTCTAC Antise CGGGAACACAGTCACATACCA	186 pb	Sn 1959 As 2124	61°C
mCiclophilin A	NM_008907	Sense TGGTCTTTGGGAAGGTGAAAG Antise TGTCCACAGTCGAAATGGT	109 pb	Sn 421 As 509	61°C

Tabla 5. Secuencia, código de acceso, tamaño del producto de amplificación y temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación específica de los genes *kiss1*, *kiss1r*, GHRH-R, GHS-R, GnRH-R, ciclofilina y 18S de rata, y *kiss1*, *kiss1r* y ciclofilina de ratón mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

La expresión relativa de cada transcrito se calculó usando los valores de Ct suministrados por el programa del termociclador y aplicándole la ecuación “ $x=e^{-\Delta\Delta Ct}$ ”, donde “e” es la eficiencia de la reacción, y ΔCt se determinó restándole el valor de Ct del ARN ribosómico 18S (control interno) al valor de Ct específico de cada gen de interés. Finalmente, el valor $\Delta\Delta Ct$ se calculó restándole el ΔCt de cada muestra problema al valor de la muestra utilizada como control (100%).

Para la cuantificación absoluta de cada uno de los transcritos objeto de estudio, se incluyó en cada reacción de amplificación una curva estándar con un número de copias conocido de ARNm del producto específico de interés, generada como se detalla a continuación. Así, la extrapolación de los resultados de la cuantificación de los genes de interés con los valores de la recta patrón, permite determinar el número de copias absoluto que hay en cada una de las muestras problema.

- Síntesis de las curvas estándar.

Para la síntesis de cada curva estándar, se preparó en primer lugar una solución altamente concentrada del producto específico de PCR. Para ello, se realizaron 6 reacciones de PCR convencional con los oligos específicos de qrt-PCR de cada gen objeto de estudio, utilizando el kit comercial “2X Master Mix PCR reagent”. El

contenido de los 6 tubos se vertió en uno sólo, y los productos de PCR se purificaron siguiendo las indicaciones del kit “AccuPrepR Gel Purification Kit”. Una alícuota del producto purificado se corrió en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio para confirmar que sólo se amplificaba una única banda del tamaño adecuado correspondiente al gen de interés, y que los oligos no daban lugar a la formación de dímeros. Una vez confirmado el tamaño del producto, éste fue secuenciado para confirmar su identidad.

Tras este proceso de validación previa, se determinó la concentración de los productos de PCR purificados mediante el kit comercial de cuantificación “Molecular Probes Picogreen DNA cuantificación kit”, y a continuación se sintetizó la curva estándar mediante diluciones seriadas de los productos de PCR hasta obtener una curva estándar que contenía 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 copias de cada gen de interés.

4.5. Clonación del receptor *kiss1r* de rata.

A partir de ADN extraído de hipófisis de rata se amplificó la secuencia completa de la región codificante del gen *kiss1r* de rata mediante dos rondas de PCR usando la Taq polimerasa de alta fidelidad Ecozyme. Para la primera ronda de PCR se diseñaron oligonucleótidos específicos en las regiones 5' y 3' de la región codificante (sentido 5'-ATGGATATGGCG-3'; antisentido 5'-AGATACTGGTCTGG-3'), de acuerdo con la secuencia conocida del gen *kiss1r* de rata (GenBank NM_023992). El producto mayoritario de la primera ronda de PCR fue usado como molde de una segunda ronda de amplificación usando los mismos oligonucleótidos en los que se habían incluido sitios de restricción HindIII en el extremo 5' (sentido; 5'-TACAAGCTTGCCATGGATATGGCG-3') y de EcoRI en el extremo 3' (antisentido, 5'-TCAGGGAATTCAGATACTGGTCTGG-3'). Tras la segunda ronda de PCR, el transcrito de la región codificante completa del gen *kiss1r* de rata se subclonó mediante un proceso de ligación en los correspondientes sitios de restricción del vector pCDNA3.1, que previamente había sido linearizado. Por último, la identidad de la secuencia clonada se confirmó mediante secuenciación en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba.

-Digestión enzimática y ligación.

La digestión del vector pCDNA3.1 se realizó con 2 unidades de la endonucleasa de restricción EcoRI por cada μg de ADN, durante un tiempo mínimo de 1 hora a 37°C . Con objeto de evitar la recircularización de los fragmentos de ADN digeridos, al final de la primera digestión se realizó un tratamiento con $1 \mu\text{l}$ de fosfatasa alcalina durante 15 min a temperatura ambiente, y a continuación se inactivó por choque térmico a 80°C durante 10 min. El ADN digerido se purificó utilizando "AccuPrepR Plasmid Extraction Kit" y se procedió entonces a la digestión con la endonucleasa HindIII, siguiendo las mismas pautas que con EcoRI.

Los fragmentos de ADN digeridos se fusionaron mediante ligación, utilizando la enzima T4 ADN ligasa e incubando entre $12\text{-}16^\circ\text{C}$ durante toda la noche, según la siguiente relación molar:

$$2 \times \frac{\text{Tamaño del inserto (pb)}}{\text{Tamaño del vector (pb)}} = \frac{\text{Cantidad de inserto } (\mu\text{g})}{\text{Cantidad de vector } (\mu\text{g})}$$

-Preparación de bacterias competentes y transformación.

Para la preparación de células competentes, se empleó la estirpe bacteriana *E. coli* DH5 α , utilizando un método aplicado previamente en nuestro laboratorio ¹⁷⁷. Brevemente, partiendo de una placa con medio PSI-a (5 g extracto de levaduras, 20 g Triptona, 5 g MgSO_4 , 14 g de agar, pH 7,6) se inocularon 5 ml de medio PSI-b (medio PSI-a sin agar) y se incubaron durante 12 horas a 37°C en agitación. A continuación, se inoculó 1 ml del cultivo en 100 ml de PSI-b, y se incubó hasta que la densidad óptica medida a 550 nm alcanzó un valor de 0,5. Una vez alcanzada esta densidad óptica, el cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó 5 min a $3.000 \times g$. La pella se resuspendió en 40 ml de tampón Tfb-1 (30 mM acetato potásico, 100 mM KCl, 10mM CaCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 15% glicerol a pH 5,8 con ácido acético) y se centrifugó nuevamente. La pella se volvió a resuspender, esta vez en 4 ml de Tfb-2 frío (10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 15% glicerol) y se incubó en hielo durante 15 min, tras lo cual se prepararon alícuotas individuales que se almacenaron a -80°C .

Para la transformación de las bacterias, éstas se descongelaron previamente a 4°C, y a continuación se permeabilizaron con una solución de β-mercaptoetanol durante 10 min en hielo. Tras este periodo de incubación, se hicieron alícuotas de 50 µl de bacterias tratadas y se mezclaron con la mezcla de ligación, y se incubaron en hielo durante un tiempo nunca superior a 30 min. Seguidamente, las bacterias se sometieron a un choque térmico de 3 min a 37 °C y a un rápido enfriamiento en hielo. Inmediatamente después y en condiciones de esterilidad, se añadieron 500 µl de LB sin antibiótico y se incubó durante 30 min a 37 °C, tras lo cual, entre 100 y 500 µl de la mezcla fueron estriados en placas de LB selectivas con el antibiótico ampicilina, que fueron incubadas a 37°C toda la noche. A la mañana siguiente, las colonias individuales crecidas en las placas, se inocularon en medio LB líquido con ampicilina y se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación. El ADN plasmídico recombinante se purificó utilizando el kit “AccuPrepR Plasmid Extraction Kit”, y se utilizó para la transfección de la línea celular CHO-K1.

5. Tratamientos experimentales.

5.1. Análisis de la acción *in vitro* de la kp-10 sobre la hipófisis de rata.

En primer lugar se estudió el efecto de la kp-10 sobre la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ mediante microfluorimetría. Para ello, las células adenohipofisarias de ratas macho peripuberales (41 días de edad) se sembraron en cubres reticulados. El día del experimento, se evaluó la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la administración de una dosis 10^{-6} M de kp-10, y a continuación las células se fijaron y procesaron para su localización en la retícula y posterior inmunoidentificación, y así determinar el número de células somatotropas y gonadotropas que respondieron al tratamiento.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la administración de kp-10 sobre la secreción hormonal en cultivos de células hipofisarias de ratas macho y hembra peripuberales (29d y 41d, respectivamente). El día del experimento, las células se trataron durante 30 min con dosis crecientes de kp-10 (10^{-10} , 10^{-8} y 10^{-6} M). Además, se evaluó el efecto de la administración de GnRH (10^{-8} M) y de GHRH (10^{-8} M) de forma individual o combinada con kp-10 (10^{-8} M), así como el efecto de la propia kp-10 (10^{-8} M) durante

30 min y 4 h. Los medios se recogieron y almacenaron para determinar la concentración de hormonas hipofisarias mediante RIA, y los cultivos celulares tratados durante 4 h se procesaron para el aislamiento del ARN y el análisis de la expresión de los genes de interés.

5.2. Efecto de los esteroides sexuales en el sistema kiss1/kiss1r.

Para estudiar el posible papel de los esteroides sexuales en el sistema kiss1/kiss1r a nivel hipofisario, se siguió una doble aproximación experimental.

1.- Con objeto de determinar el efecto *in vitro* de los esteroides sexuales sobre el sistema kiss1/kiss1r se utilizaron ratas hembra peripuberales (de 29 días de edad), en las que la producción endógena de esteroides sexuales es baja. Estos animales se sacrificaron y se les extrajo la hipófisis, a partir de la que se obtuvo una población de células monodispersas mediante un proceso de dispersión.

Para la determinación de la concentración de hormonas hipofisarias, las células se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 300.000 células/pocillo, en DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% de suero carente de esteroides y un 1% de mezcla de antibiótico antimicótico. Un número determinado de placas se mantuvieron en cultivo con medio en presencia de 10^{-8} M estradiol (E2), y el mismo número de placas se cultivaron con medio en ausencia de E2 (Fig. 24). Tras 48 h de cultivo, las células se trataron con 10^{-9} y 10^{-8} M de kp-10 durante 4 h, y a continuación se recogieron los medios y se almacenaron a -20°C hasta la determinación de la concentración de GH y LH mediante RIA. Las células del cultivo se homogeneizaron con Trizol y el homogenado resultante se almacenó a -80°C hasta su procesamiento para el aislamiento de ARN y posterior análisis de la expresión génica.

Para el análisis de la cinética de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, las células hipofisarias monodispersas se sembraron en cubreobjetos reticulados de 25 mm de diámetro, a una densidad de 100.000 células/cubre. La mitad de las placas a examen se mantuvieron en medio sin E2, y la otra mitad se mantuvo en medio con E2 (Fig. 24), en ambos casos las células se incubaron durante 48 h hasta el análisis de la dinámica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la administración de 10^{-6} M de kp-10 mediante ensayos de microfluorimetría. Finalmente, estas células se fijaron en solución de Bouin, se procesaron y se identificaron los tipos celulares mediante inmunofluorescencia. Finalmente, las células

que habían respondido a la administración de kp-10 se relocalizaron por su posición en la rejilla de los cubres reticulados (Fig. 24).

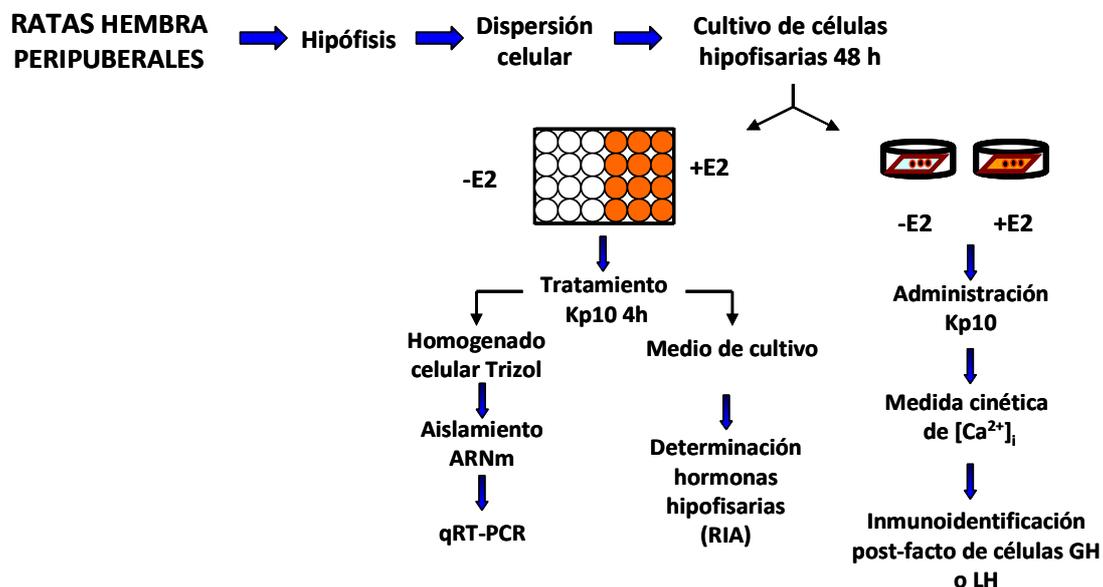


Fig.24. Diseño experimental seguido en la determinación del efecto del E2 en el sistema kiss1/kiss1r a nivel hipofisario.

2.- En una segunda aproximación experimental, y con objeto de analizar una situación extrema tanto de ausencia como de presencia de E2 *in vivo*, se utilizaron ratas adultas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) para así eliminar la producción endógena de estrógenos sexuales. Estas ratas se dividieron en dos grupos de 9 animales, de manera que a uno de los grupos se le proporcionó un tratamiento de reemplazamiento hormonal con E2 mediante la implantación subcutánea de cápsulas de silicona con E₂ (OVX E2), mientras que al otro grupo de animales se les implantaron cápsulas vacías (OVX VEH) (Fig. 25).

Dos semanas después de la ovariectomía los animales se sacrificaron, se les extrajo la hipófisis, que fue seguidamente procesada para la obtención de células monodispersas, las cuales se cultivaron para la determinación de la concentración de hormonas hipofisarias y para estudios de la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ procediéndose de la misma manera a la descrita para ratas peripuberales (Fig. 25).

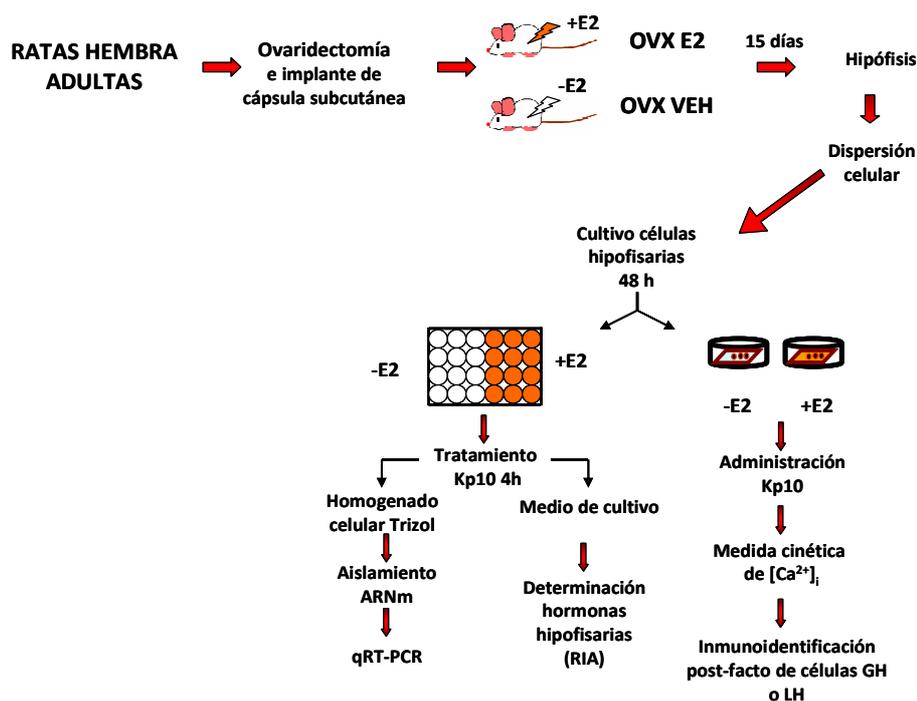


Fig.25. Diseño experimental seguido en la determinación del efecto del E2 en el sistema kiss1/kiss1r a nivel hipofisario en una situación extrema tanto de ausencia como de presencia de E2 *in vivo*.

5.3. Análisis de la expresión del sistema kiss1/kiss1r durante el desarrollo postnatal de la rata.

Para estudiar los posibles cambios en la expresión del sistema kiss1/kiss1r durante el desarrollo postnatal se analizó la expresión de ambos genes en diferentes tejidos como la hipófisis, el testículo y el tejido adiposo (visceral y subcutáneo) de ratas macho y hembra en diferentes etapas del desarrollo: etapa neonatal (1, 2 y 5 días), etapa infantil (10 y 15 días), etapa prepuberal (20 días para hembras, y 20 y 30 días para machos), etapa puberal (30 días para hembras y 45 días para machos) y etapa adulta para hembras (45 días). En todos los casos se utilizaron entre 5 y 7 animales por grupo de edad. Las muestras se extrajeron inmediatamente tras la decapitación, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

5.4. Regulación del sistema *kiss1/kiss1r* bajo diferentes condiciones metabólicas en ratón.

Con objeto de estudiar la regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en ratones sometidos a diferentes condiciones metabólicas, se analizaron muestras de hipófisis, de testículo y de tejido adiposo (visceral y subcutáneo).

- Ayuno:

Los ratones se dividieron en cuatro grupos de entre 5 y 8 animales. El primer grupo de animales fue alimentado de forma normal (Control), y los demás grupos se sometieron a ayuno durante 12, 24 y 48 h (ayuno ligero, medio y severo respectivamente)¹⁷⁸. Finalmente, estos animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción de tejidos para examinar la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en cada uno de ellos.

- Obesidad inducida por la dieta (DIO):

Para evaluar el posible efecto de la obesidad inducida por una dieta rica en grasa sobre la expresión de los genes *kiss1* y *kiss1r*, se utilizaron dos grupos de ratones obesos: uno de ellos fue alimentado con una dieta baja en grasa (LFD, 10% Kcal de grasa, similar a la alimentación normal de roedores) y otro grupo de ratones fue alimentado con una dieta con alto contenido de grasa (HFD, 60% Kcal de grasa), administrada en ambos casos durante 16 semanas¹⁷⁹. Finalizado este periodo, los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción de tejidos para examinar la expresión de los genes de interés.

- Obesidad por deficiencia en leptina, ratones *ob/ob*:

Los ratones portadores de mutaciones en el gen *ob* murino (ratones *ob/ob*) carecen de leptina sérica y presentan un fenotipo de obesidad severa asociada a otros problemas como hiperlipemia, resistencia a la insulina, menor temperatura corporal, menor actividad locomotora, menor actividad del sistema inmune e infertilidad. La administración de leptina exógena corrige estas alteraciones.

Para estudiar el efecto de la obesidad causado por la deficiencia en leptina, estudiamos la expresión de *kiss1* y *kiss1r* en ratones *ob/ob* y en ratones normales (WT).

Para estudiar el impacto del reemplazamiento con leptina en ratones *ob/ob* en la expresión de *Kiss1* y *kiss1r*, se hicieron tres grupos de animales *ob/ob*. A cada animal del primer grupo se le implantó una cápsula que contenía leptina (1,3 mg/ml salino) (Lep); a los animales del segundo grupo se les implantaron cápsulas con el vehículo (Veh); y a los animales del tercer grupo no se les implantó ninguna cápsula pero se les administró la misma cantidad de comida que consumían los ratones tratados con leptina (Pair fed, PF)¹⁸⁰. Este último grupo experimental se incluyó en el estudio con el objetivo de diferenciar entre el efecto directo causado por el tratamiento con leptina del causado como consecuencia de la reducción de la ingesta de comida y la consiguiente pérdida de peso que se produce tras el tratamiento con leptina, debido a su carácter anorexigénico¹⁸¹.

6. Análisis estadístico.

Los valores que se muestran en las figuras representan la media \pm SEM de los resultados obtenidos a partir de, al menos, 3 experimentos independientes, realizados de forma separada o, en su caso, de un mínimo de 3 animales. A su vez, dentro de cada experimento, los tratamientos se ensayaron al menos por triplicado y cada uno se evaluó por duplicado (e.g. RIA, PCR). El análisis estadístico para datos paramétricos se realizó mediante un análisis de varianza de una fuente de variación (“one way ANOVA”) y a continuación, se llevó a cabo el test de comparaciones múltiples de Duncan o de Newman, y para datos no paramétricos, se realizó el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparaciones múltiples de Dunn. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un nivel de confianza igual o superior al 95% ($p < 0,05$).

7. PROTOCOLOS.

Protocolo 1: Dispersión celular

1. Lavar las hipófisis varias veces con DMEM, suplementado con 5 ml de Hepes 2,4 M, 5 ml L-Glutamina 200 mM y 1% de mezcla de antibiótico antimicótico (DMEM completo).
2. Trocear las hipófisis en DMEM completo + BSA 0,3% en una placa de Petri. Utilizando dos lancetas de bisturí, separar el lóbulo distal del neurointermedio y desechar este último. Trocear la adenohipófisis en fragmentos de 1 mm³.
3. Recoger los fragmentos usando una pipeta Pasteur y depositarlos en un tubo cónico de plástico. Dejar decantar y retirar el sobrenadante. Lavar con 5 ml de DMEM completo + BSA. Centrifugar a 1500 rpm y retirar el sobrenadante.
4. Añadir 5 ml de DMEM completo + BSA con tripsina (2 mg/ml). Transferir a un matraz de 25 ml. Incubar durante 60 min a 37°C en agitación suave.
5. Transcurridos 30 min de la incubación con tripsina, añadir al matraz 100 µl de colagenasa (1 mg/ml) y proseguir la incubación durante 30 min.
6. Transferir el contenido del matraz a un cónico. Centrifugar 5 min a 1500 rpm. Retirar el sobrenadante.
7. Añadir 5 ml de DMEM completo + BSA con inhibidor de la tripsina (1mg/ml) y ADNasa (2 µg/ml). Transferir a un matraz de 25 ml. Incubar durante 15 min a 37°C con agitación suave.
8. Repetir paso 6.
9. Añadir 5 ml de solución de Hanks con 2 mM EDTA. Transferir a un matraz de 25 ml. Incubar durante 5 min a 37° C con agitación suave.
10. Repetir paso 6.
11. Añadir 5 ml de solución de Hanks con 1 mM de EDTA y transferir a un matraz de 25 ml. Incubar durante 10 min a 37°C con agitación suave.
12. Repetir paso 6.
13. Añadir 5 ml de solución de Hanks. Lavar cuidadosamente con una pipeta Pasteur resuspendiendo las células y fragmentos y centrifugar de nuevo durante 5 min a 1500 rpm. Desechar sobrenadante.
14. Dispersión mecánica: Añadir 5 ml de solución de Hanks y hacer pasar repetidamente la suspensión celular a través de pipetas Pasteur con diámetro decreciente, durante un tiempo inferior a 5 min hasta conseguir una suspensión homogénea.

Todo el proceso de dispersión y manipulación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y empleando material estéril. El material de vidrio se siliconizó previamente para reducir la adherencia de las células e incrementar así el rendimiento de la

dispersión celular. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C en baño María con agitación suave, utilizando matraces de 25 ml que permiten una buena relación superficie/volumen de dicha suspensión.

Protocolo 2: Inmunofluorescencia

1. Lavar las células fijadas en solución de Bouin 3 baños de 5 min (3 x 5 min).
2. Lavar las células 3 x 5 min en Tampón fosfato salino (PBS; pH 7,4).
3. Incubar en PBS + 0,3% Triton X-100 + 1% BSA durante 1h a temperatura ambiente.
4. Incubar con el anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:
 - Anti-GH de rata desarrollado en mono.
 - Anti-βLH de rata desarrollada en conejo.

Ambos se diluyeron a una concentración 1:1000 en PBS + 0,3% Triton X-100 + 0,5% BSA y se incubaron al menos 16 h a 4°C en cámara húmeda.

5. Lavar las células 3 x 5 min en PBS.
6. Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente:
 - Para la detección de LH: Alexa 594 anti-IgG de conejo desarrollado en cabra a una concentración 1:1000.
 - Para la detección de GH: FITC anti-IgG de mono desarrollado en cabra a una concentración 1:1000.

Las diluciones se prepararon en PBS + 0,3% Triton X-100 + 0,5% BSA y las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.
7. Lavar las células 3 x 5 min en PBS.
8. Montar con PBS:Glicerol (1:1).

Protocolo 3: Extracción de ARN total con Trizol.

1. Descongelar las muestras en hielo.
2. Añadir a la muestra 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol añadido inicialmente.
3. Mezclar vigorosamente durante 5 seg e incubar a temperatura ambiente durante 2-3 min.
4. Centrifugar a 12000 g durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación, se observan 3 fases distintas: la fase inferior o fase orgánica que contiene las proteínas, la fase intermedia donde se localiza el ADN y la fase superior o fase acuosa que contiene el ARN.
5. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
6. Dejar precipitar el ARN con isopropanol a una proporción de 0,5 ml de isopropanol/ml de Trizol usado originalmente.

- 7.** Precipitar durante 10 min a temperatura ambiente.
- 8.** Centrifugar 10 min en las mismas condiciones que el apartado 4 y retirar el sobrenadante.
- 9.** Lavar la pella con 1 ml de etanol al 75%.
- 10.** Centrifugar a 7500 g durante 5 min a 4°C.
- 11.** Retirar el etanol y dejar secar el ARN a temperatura ambiente.
- 12.** Resuspender el ARN en 20 µl H₂O DEPC.
- 13.** Cuantificar la cantidad y calidad del ARN total obtenido en el espectrofotómetro diluyendo 2 µl de muestra en 98 µl de H₂O destilada.

Para la extracción de ARN, siempre se prestó especial atención a la limpieza y esterilidad del material de plástico utilizado, empleando tanto H₂O como materiales tratados previamente con dietilpirocarbonato (DEPC), un potente inhibidor de ARNasa.

V. RESULTADOS

1. Sistema kiss1/kiss1r en la adenohipófisis.

La relevancia del sistema kiss1/kiss1r en el control neuroendocrino de la reproducción a nivel hipotalámico ha sido ampliamente estudiada¹⁸². Sin embargo, los estudios a nivel hipofisario han sido escasos y han ofrecido resultados contradictorios; por ello nos propusimos estudiar de forma detallada su relevancia a este nivel. Con este fin, estudiamos la posible funcionalidad del sistema kiss1/kiss1r en la adenohipófisis de rata, y analizamos su regulación por esteroides sexuales, su posible interacción con factores hipotalámicos, así como la evolución de su expresión durante el desarrollo postnatal. Finalmente, evaluamos el efecto de diferentes condiciones metabólicas en la expresión del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis de ratón.

1.1. Funcionalidad del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis de rata.

Para estudiar la funcionalidad del sistema kiss1/kiss1r en adenohipófisis, realizamos un análisis de la acción directa de la kp-10 sobre células adenohipofisarias de rata mediante una doble estrategia metodológica. Por una parte, evaluamos el efecto del tratamiento con kp-10 sobre la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en células individuales en cultivo, con el fin de determinar los tipos celulares que responden al tratamiento con kp-10, que a continuación fueron inmunoidentificadas mediante el uso de anticuerpos específicos contra diversas hormonas hipofisarias. Por otra parte, para conocer el posible efecto del decapeptido sobre la secreción de hormonas hipofisarias, realizamos tratamientos con kp-10 a distintas dosis y tiempos de incubación, sobre cultivos de células hipofisarias de rata, y evaluamos la concentración de hormona liberada al medio de cultivo mediante RIA.

En primer lugar, y como paso previo a estos ensayos, nos propusimos comprobar la presencia del sistema kiss1/kiss1r en la adenohipófisis de rata. En particular, analizamos la expresión de los genes *kiss1* y *kiss1r* en cultivos de células procedentes de adenohipófisis de ratas macho y hembra peripuberales. Así, mediante el uso de oligonucleótidos específicos y PCR convencional comprobamos la expresión de ambos genes en la hipófisis de rata, obteniendo productos de amplificación del tamaño esperado: 225 pb para *kiss1r* y 174 pb para *kiss1* (Fig 26). La secuenciación de

los productos purificados resultantes de la amplificación confirmó la identidad de los transcritos amplificados.

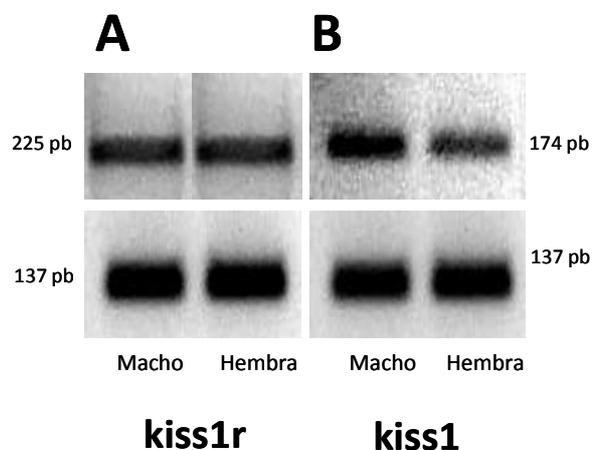


Fig. 26. Expresión de *kiss1r* y *kiss1* en cultivos de células adenohipofisarias procedentes de ratas macho y hembra peripuberales. **(A)** Presencia del producto específico de 225 pb de la reacción de amplificación para *kiss1r*. **(B)** Producto específico de 174 pb de *kiss1* amplificado en células de hipófisis de ratas macho y hembra. En ambos paneles, la amplificación del ARN ribosomal 18S (137 pb) se utiliza como control interno.

1.1.1. Efecto de la kp-10 sobre la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en células adenohipofisarias de ratas macho peripuberales.

Una vez demostrado que el sistema *kiss1/kiss1r* se expresa en las células adenohipofisarias en cultivo, estudiamos la funcionalidad del sistema *kiss1/kiss1r* en estas mismas células. Para ello, analizamos la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la administración de kp-10 mediante un sistema de microfluorimetría, y posteriormente se identificaron los tipos celulares que respondían mediante inmunofluorescencia. Esta aproximación metodológica nos permitió demostrar que la administración de kp-10 en cultivos de células adenohipofisarias de rata provocaba un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el 10% de las células estudiadas, de las que el 6,3% fueron identificadas como células gonadotropas o somatotropas (Fig. 27).

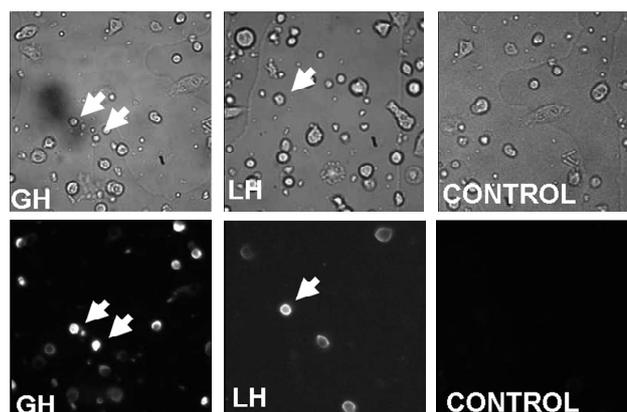


Fig.27. Imágenes representativas de campo claro e inmunofluorescencia de las células gonadotropas y somatotropas analizadas. En la parte superior se muestran imágenes de campo claro de células de hipófisis de rata en cultivo sobre cubreobjetos reticulados, que se tomaron como referencia en el momento de la medida de la $[Ca^{2+}]_i$. Las imágenes de la parte inferior muestran las inmunofluorescencias para GH (izquierda) y LH (centro), que permiten realizar una identificación post-facto de las células somatotropas y gonadotropas, que pueden atribuirse fácilmente con las correspondientes células en el campo claro (flechas), sobre las que se realizaron las medidas de la $[Ca^{2+}]_i$. Las imágenes de la derecha corresponden al control realizado durante la inmunotinción sin anticuerpo primario.

Para este estudio, por un lado se analizaron un total de 797 células hipofisarias procedentes de 5 experimentos independientes, de las cuales 68 células, el 8,5% de la población celular, se inmunoidentificaron como células gonadotropas. Por otro lado, se estudiaron un total de 830 células hipofisarias procedentes de 6 experimentos independientes, donde una tercera parte, 272 células, se identificaron como células somatotropas (Tabla 6).

Un análisis detallado de las respuestas de Ca^{2+} inducidas por la administración de kp-10, reveló que un 10,3% de las células gonadotropas identificadas respondían con un incremento del 62,8% en la $[Ca^{2+}]_i$ (Tabla 6). En el caso de células somatotropas, la kp-10 indujo un marcado incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, similar al observado en células gonadotropas, en el 16,5% de las células somatotropas estudiadas (Tabla 6). En conjunto, estos resultados demuestran el efecto directo de la kp-10 a nivel hipofisario y en particular sobre células somatotropas y gonadotropas.

	Gonadotropas (n= 830)	Somatotropas (n=797)
Células Inmunoreactivas	8,5% (68)	32,7% (272)
% células que responden a kp10	10,3% ± 1,6	16,5% ± 2,9
Incremento Máximo	62,8% ± 16 *	60,3% ± 5,5 *
% Respuestas tipo pico	57,2% (4)	33,3% (15)
% Respuestas tipo plateau	42,8% (3)	66,6% (30)

Tabla 6. Parámetros que caracterizan la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al tratamiento con kp-10 de las células somatotropas y gonadotropas identificadas de ratas macho peripuberales. $p < 0,05$ vs. $[Ca^{2+}]_i$ basal (*).

Un estudio más exhaustivo de los perfiles de la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la administración de kp-10 en ambos tipos celulares reveló la existencia de dos tipos de respuesta. Así, pudimos observar respuestas con perfil de tipo meseta o “plateau”, caracterizado por un incremento sostenido en el tiempo de la $[Ca^{2+}]_i$, y observado en un 42,8% de las células gonadotropas (Fig. 28A). Además, también observamos respuestas con perfil de tipo pico, caracterizado por un incremento rápido y transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ que gradualmente recupera los niveles basales o próximos al basal, y que se observó en un 57,2% de las células gonadotropas (Fig. 28B). Estos dos tipos de perfiles de respuesta, pico y plateau, también se observaron en las células somatotropas. Así, un 66,6% de las células somatotropas estudiadas respondieron a la administración de kp-10 siguiendo un perfil tipo plateau (Fig 28C), mientras que un 33,3% respondió mostrando un perfil tipo pico (Fig. 28D).

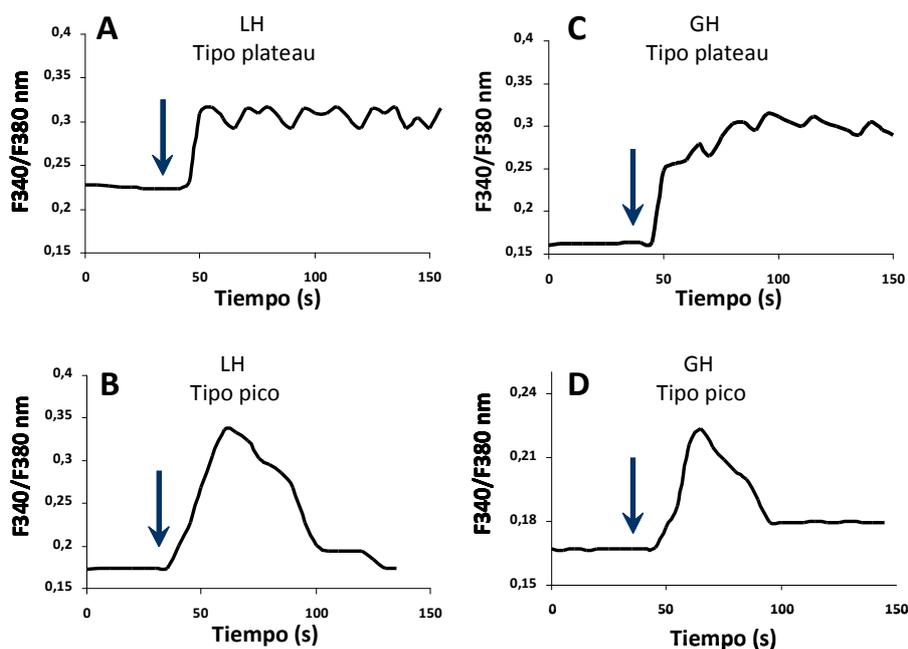


Fig.28. Perfiles representativos del efecto provocado por la administración de kp-10 en la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre células adenohipofisarias en cultivo de ratas macho peripuberales. **(A y C)** Perfil tipo plateau y **(B y D)** perfil tipo pico, en células gonadotropas y somatotropas producido por la administración de 10^{-6} M de kp-10.

1.1.2. Regulación de la secreción hormonal adenohipofisarias por la kp-10 en cultivos de células adenohipofisarias de ratas peripuberales.

Para el estudio del efecto de la administración de kp-10 sobre la regulación de la secreción de hormonas adenohipofisarias, determinamos la concentración de LH y GH en cultivos de células hipofisarias de ratas macho y hembra peripuberales mediante RIA.

- Efecto de la kp-10 sobre la secreción de LH.

Para el estudio del efecto de la kp-10 sobre la liberación de LH en cultivos de células adenohipofisarias de ratas macho peripuberales, se realizaron ensayos dosis-respuesta, con concentraciones de kp-10 comprendidas entre 10^{-10} y 10^{-6} M, e

incubaciones de 30 min. La determinación de la concentración de LH liberada al medio indicó que todas las dosis ensayadas provocaron un incremento significativo de la liberación de LH con respecto al grupo control, alcanzándose el incremento máximo para la dosis 10^{-8} M de kp-10 (Fig. 29A). Este incremento máximo fue similar al inducido por GnRH (10^{-8} M), y la administración combinada de una dosis equimolar de ambos péptidos durante 30 min causó una estimulación aditiva sobre la liberación de LH (Fig. 29B). Por otro lado, la administración de 10^{-8} M de kp-10 durante un período de incubación más prolongado, 4 h, también estimuló significativamente la liberación de LH pero en menor medida a la inducida por GnRH (10^{-8} M) bajo las mismas condiciones de cultivo, mientras que la administración conjunta de una dosis equimolar de ambos decapeptidos estimuló significativamente la liberación de LH, si bien no se observó un efecto aditivo (Fig. 29C).

De forma similar a la descrita en el párrafo anterior, se realizaron experimentos para analizar la respuesta secretora de cultivos de células adenohipofisarias de ratas hembra, en las que la incubación durante 30 min con dosis comprendidas entre 10^{-10} y 10^{-6} M de kp-10 estimuló la liberación de LH (Fig. 29D). En este caso, el efecto estimulador de la kp-10 (10^{-8} M) sobre la liberación de LH fue inferior a la estimulación inducida por GnRH (10^{-8} M), y la administración combinada de ambos decapeptidos no provocó un incremento adicional en la secreción de LH a los 30 min de cultivo (Fig. 29E). De la misma manera, tras una incubación más prolongada de 4 h, la kp-10 (10^{-8} M) estimuló significativamente la liberación de LH, y la administración de GnRH (10^{-8} M) produjo una estimulación de la secreción de LH significativamente mayor que la inducida por la kp-10, que no fue aumentada de forma adicional por la administración simultánea de ambos decapeptidos (Fig. 29F).

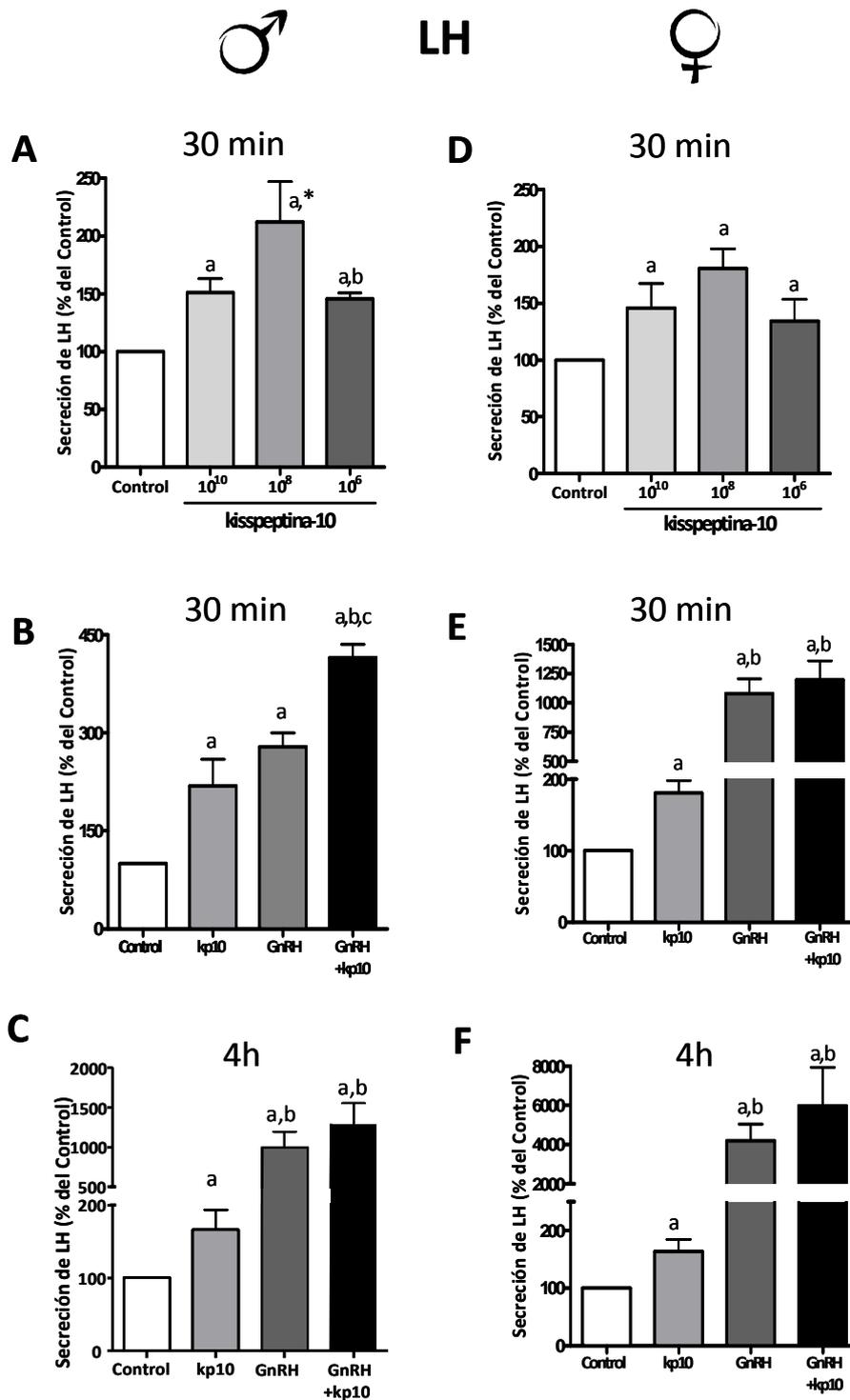


Fig.29. Efecto de la administración de distintas dosis de kp-10 y del tratamiento combinado de ésta con GnRH sobre la secreción de LH en cultivos de células adenohipofisarias de rata. **(A)** Efecto a corto plazo (30 min) de distintas dosis de kp-10, **(B, C)** y de la administración de 10^{-8} M kp-10 y 10^{-8} M GnRH, solos o combinados, durante 30 min **(B)** o 4 horas **(C)** sobre la liberación de LH en células hipofisarias de rata macho. **(D)** Respuesta secretora a la exposición durante 30 min con diversas dosis de kp-10 y **(E, F)** al tratamiento con kp10 y GnRH durante 30 min **(E)** o 4 horas **(F)** de células gonadotropas de rata hembra. Los datos se expresan como el porcentaje del valor basal en el control. (En machos; $8,42 \pm 1,37$ ng rLH/ml a 30 min; $12,3 \pm 2,01$ ng rLH/ml a 4 horas. En hembras; $9,40 \pm 2,97$ ng rLH/ml a 30 min; $31,35 \pm 9,21$ a 4 h). En todos los casos, los valores representan la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. $p < 0,05$ vs. control (a); vs. kp10 (10^{-8} M) (b); vs. GnRH (c), y vs. datos precedentes (*).

- Efecto de la kp-10 sobre la secreción de GH.

Sobre la base de los resultados obtenidos en los ensayos de microfluorimetría en los que se observó un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en células somatotropas tras la administración de kp-10, analizamos si este incremento se veía traducido en un aumento de la liberación de GH. Así, pudimos comprobar que en cultivos de células adenohipofisarias de ratas macho, la administración de diferentes dosis de kp-10 (10^{-10} – 10^{-6} M) durante 30 min aumentó la liberación de GH.

En particular, comprobamos que la dosis 10^{-8} M de kp-10 produjo un aumento significativo sobre la liberación de GH, que fue inferior al inducido por la misma concentración de GHRH (Fig. 30A). La administración combinada de dosis equimolares de ambos péptidos también aumentó la liberación de GH, si bien ésta no fue significativamente diferente a la inducida por 10^{-8} M de GHRH en ninguno de los tiempos estudiados (30 min Fig. 30B y 4 h Fig. 30C).

De forma similar a lo anterior, evaluamos el efecto de la kp-10 sobre la liberación de GH en células adenohipofisarias de ratas hembra peripuberales. Así, pudimos observar que el tratamiento tanto con 10^{-10} M como con 10^{-8} M de kp-10 durante 30 min incrementó significativamente la secreción de GH (Fig. 30D). El tratamiento a corto plazo con una dosis 10^{-8} M de GHRH produjo un aumento significativo en la secreción de GH, mayor que el inducido por la kp-10 (10^{-8} M), aunque no resultó ser significativamente diferente al inducido por la administración combinada de ambos péptidos (Fig. 30E). Por último, se analizó el efecto del tratamiento durante 4 horas con una dosis 10^{-8} M de kp-10, que confirmó su efecto estimulador sostenido sobre la liberación de GH (Fig. 30F).

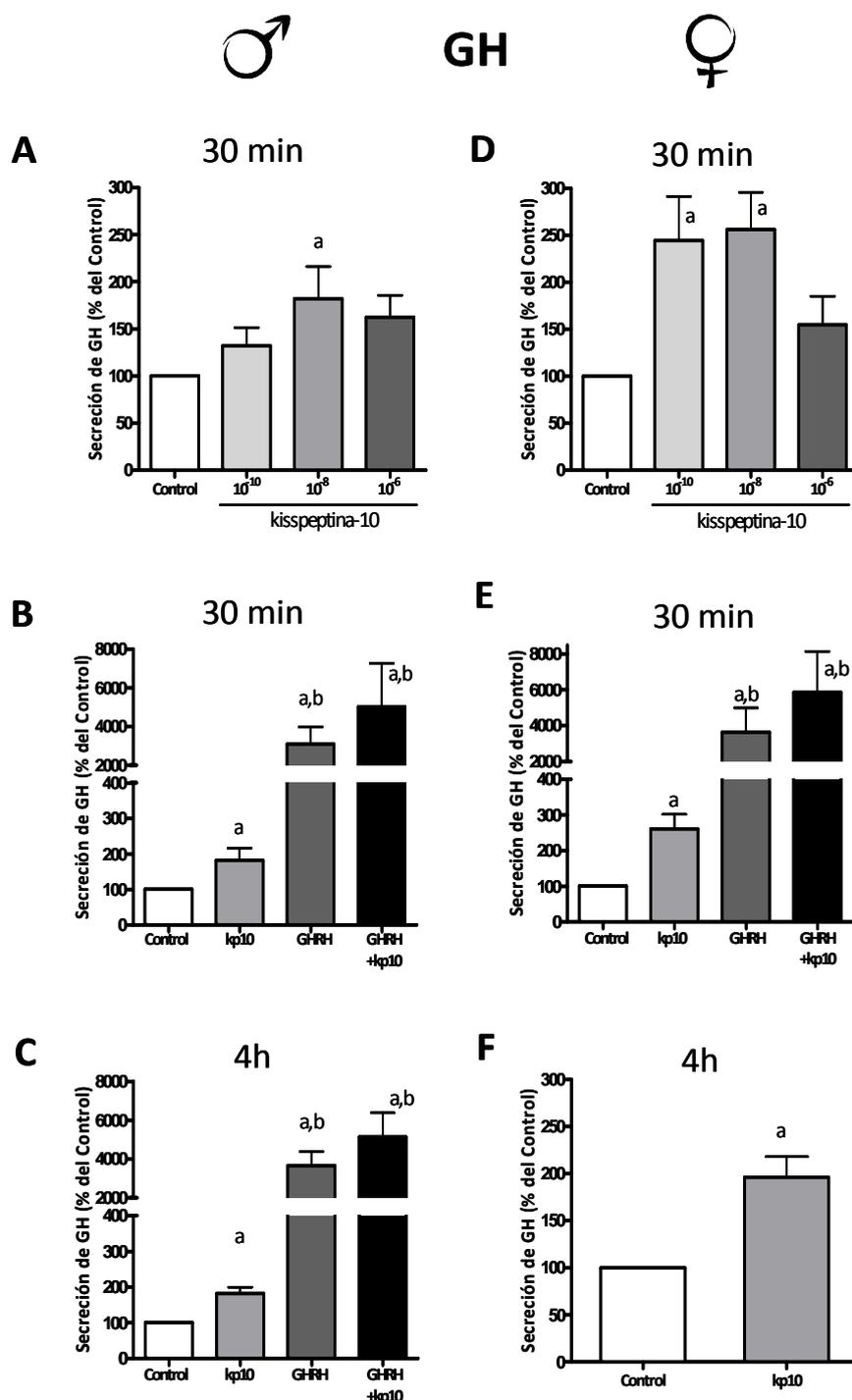


Fig.30. Efecto de la administración de distintas concentraciones de kp-10 y del tratamiento combinado de ésta con GHRH sobre la secreción de GH en cultivos de células adenohipofisarias de rata. **(A)** Efecto causado por la incubación durante 30 min con varias concentraciones de kp-10 **(B, C)** y por la administración de 10^{-8} M de kp-10 sola o combinada con 10^{-8} M de GHRH durante 30 min **(B)** o 4 h **(C)**, sobre la secreción de GH en células hipofisarias de rata macho. **(D)** Efecto provocado por la exposición durante 30 min a varias dosis de kp-10 **(E)** y a 10^{-8} M de kp-10 sola o combinada con 10^{-8} M de GHRH, **(F)** y por la incubación durante 4 horas con kp10, en la secreción de GH en células de hipófisis de ratas hembra en cultivo. Los datos se expresan como el porcentaje del valor basal en el control. (En machos; $5,48 \pm 1,75$ n rGH/ml a los 30 min, $12,07 \pm 1,76$ ng rGH/ml a las 4 h. En hembras; $4,79 \pm 1,00$ n rGH/ml a los 30 min; $10,60 \pm 1,26$ ng rGH/ml a las 4 h). Todos los valores son la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. $p < 0,05$ vs. control (a), vs. kp-10 10^{-8} M (b).

1.2. Regulación del sistema kiss1/kiss1r por esteroides sexuales en la adenohipófisis de rata.

Para esclarecer el posible efecto de los esteroides sexuales, como el estradiol (E2), sobre la funcionalidad del sistema kiss1/kiss1r a nivel adenohipofisario, analizamos por un lado el efecto de la presencia del E2 sobre la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a tratamiento con kp-10 y por otro, valoramos el papel del E2 en la liberación de hormonas hipofisarias en respuesta al tratamiento con kp-10. Para estos análisis se utilizaron cultivos de células adenohipofisarias procedentes de ratas hembra peripuberales por su baja concentración endógena de esteroides sexuales. Además, también utilizamos cultivos de células adenohipofisarias procedentes de ratas adultas ovariectomizadas, como una situación drástica de ausencia de esteroides sexuales. (El diseño experimental seguido en este estudio se detalla en el apartado 5.2 de Material y Métodos).

1.2.1. Efecto de la presencia de E2 sobre la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al tratamiento con kp-10.

Este estudio se llevó a cabo mediante ensayos de microfluorimetría. Así, analizamos la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en células gonadotropas y somatotropas en respuesta a la administración de 10^{-6} M de kp-10 en células de la hipófisis de ratas hembra peripuberales y de ratas adultas OVX, cultivadas durante 48 h en presencia o ausencia de 10^{-8} M de E2.

En cultivos celulares obtenidos a partir de hipófisis de ratas hembra peripuberales, la presencia de E2 en el medio de cultivo no alteró la proporción de células gonadotropas que respondían con un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ a la administración de kp-10 (13,2% en presencia de E2 frente al 11,9% en ausencia de E2), así como tampoco se vio afectada la amplitud máxima de la respuesta (Tabla 7). En cambio, el porcentaje de células somatotropas que mostraban un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a kp-10 aumentó de forma significativa (2,6 veces) cuando éstas fueron cultivadas en presencia de E2 (32,5% en presencia de E2 frente a 12,5% en ausencia de E2), sin que se viera modificado el incremento máximo de dicha respuesta (Tabla 7). La presencia de E2 en el medio de cultivo celular no modificó el porcentaje total de

células somatotropas o gonadotropas presentes en los cultivos de células adenohipofisarias de ratas hembra peripuberales (Tabla 7).

	PERIPUBERALES			
	Somatotropas		Gonadotropas	
	VEH	E2	VEH	E2
Células Inmunorreactivas	27,5% ± 1,4 (41)	28,8% ± 1,3 (80)	15,9% ± 1,1 (38)	16,1% ± 1,3 (67)
% células que responden a kp10	12,2% ± 0,1 (5)	32,5% ± 0,7 * (26)	13,2% ± 0,5 (5)	11,9% ± 0,6 (8)
Incremento Máximo	159,5% ± 20,2	150% ± 6,7	119,2% ± 5,3	120,5% ± 4

Tabla 7. Efecto de la incubación con E2 sobre la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al tratamiento con kp-10 en células adenohipofisarias de ratas hembra peripuberales. Se analizaron un total de 149 células somatotropas de placas incubadas con medio sin E2 (VEH) y 227 células somatotropas de placas incubadas con medio con E₂ (E2). En cuanto a células gonadotropas, se analizaron 239 células de placas VEH y 414 células de placas E₂. Las células analizadas proceden de al menos dos placas por tratamiento en cada experimento de un total de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ vs. VEH.

En cultivos celulares obtenidos a partir de adenohipófisis de ratas adultas OVX, la presencia de E2 actúa de forma similar a lo observado en cultivos de hipófisis de ratas hembra peripuberales sobre porcentaje de células gonadotropas y de células somatotropas que respondieron a la administración de kp-10. Así, la presencia de E2 no modificó el porcentaje de células gonadotropas que responden a la administración de kp-10 con un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ (11,1% en presencia de E2 frente a 9,8% en ausencia de E2), ni tampoco afectó a la amplitud de la respuesta (Tabla 8). Sin embargo, el número de células somatotropas que respondieron a la administración de kp-10 aumentó significativamente en presencia de E2 (9,4% en presencia de E2 frente a 5,2% en ausencia de E2), sin que se modificara el incremento máximo de dicha respuesta (Tabla 8). Al igual que en el caso anterior, la presencia de E2 en el medio de cultivo celular no modificó significativamente el porcentaje total de células somatotropas o gonadotropas presentes en los cultivos de células adenohipofisarias de ratas adultas OVX (Tabla 8).

	OVX			
	Somatotropas		Gonadotropas	
	VEH	E2	VEH	E2
Células Inmunorreactivas	33,3% ± 4,8 (77)	22,8% ± 2,3 (53)	12,8% ± 0,7 (51)	9,5% ± 0,6 (27)
% células que responden a kp10	5,2% ± 0,7 (4)	9,4% ± 0,6 * (5)	9,8% ± 0,4 (5)	11,1% ± 0,8 (3)
Incremento Máximo	139,8% ± 10,2	125,3% ± 2	126,6% ± 7	128,9% ± 5,6

Tabla 8. Efecto de la incubación con E2 sobre la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al tratamiento con kp-10 en células adenohipofisarias de ratas adultas ovariectomizadas. Se analizaron un total de 231 células somatotropas de placas incubadas con medio sin E2 (VEH) y 232 células somatotropas de placas incubadas con medio con E₂ (E2). En cuanto a células gonadotropas, se analizaron 398 células de placas VEH y 286 células de placas E₂. Las células analizadas proceden de al menos dos placas por tratamiento en cada experimento, de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ vs. VEH.

1.2.2. Efecto de la presencia de E2 sobre la secreción hormonal en respuesta a kp-10.

La evaluación del efecto de la presencia de E2 sobre la secreción de LH y GH en respuesta al tratamiento con kp-10 se realizó, de forma similar a lo descrito en el apartado anterior, sobre cultivos de células adenohipofisarias procedentes de ratas hembra peripuberales y ratas adultas OVX.

- Efecto de la presencia de E2 sobre la secreción hormonal en respuesta a kp-10 en ratas hembra peripuberales.

La administración de dosis 10^{-9} y 10^{-8} M de kp-10 a cultivos de células adenohipofisarias de ratas hembra peripuberales mantenidos en ausencia de E2, incrementó de forma significativa la liberación de LH con respecto al control (Fig 31A). Esta capacidad para estimular la secreción de LH no se vio modificada cuando los cultivos celulares se incubaron previamente durante 48 h con 10^{-8} M de E2 (Fig 31B).

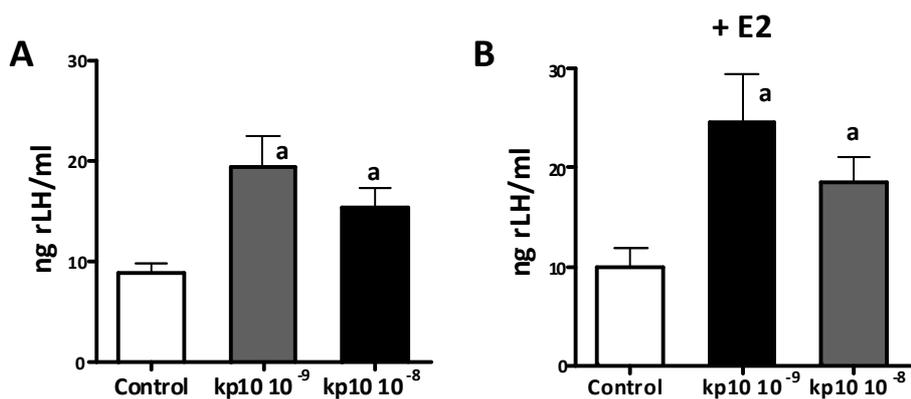


Fig. 31. Efecto de la incubación con E2 sobre la acción de kp-10 en la secreción de LH en ratas hembra peripuberales. Se evaluó la secreción de LH en respuesta a 10^{-9} y 10^{-8} M de kp-10 en células adenohipofisarias mantenidas en cultivo durante 48 h en ausencia (A) o en presencia (B) de E2 (10^{-8} M). Los valores representan la media de tres experimentos independientes. (a) $p < 0,05$ vs Control.

Bajo las mismas condiciones experimentales, la liberación de GH aumentó significativamente tras 4 h de incubación con dosis 10^{-9} y 10^{-8} M de kp-10 en cultivos celulares mantenidos durante 48 h en ausencia de E2 (Fig. 32A). De forma similar, la concentración de GH presente en el medio de cultivo tras 4 h de tratamiento con 10^{-9} y 10^{-8} M de kp-10 no se vio modificada por la presencia durante 48 h de E2 en el medio (Fig. 32B).

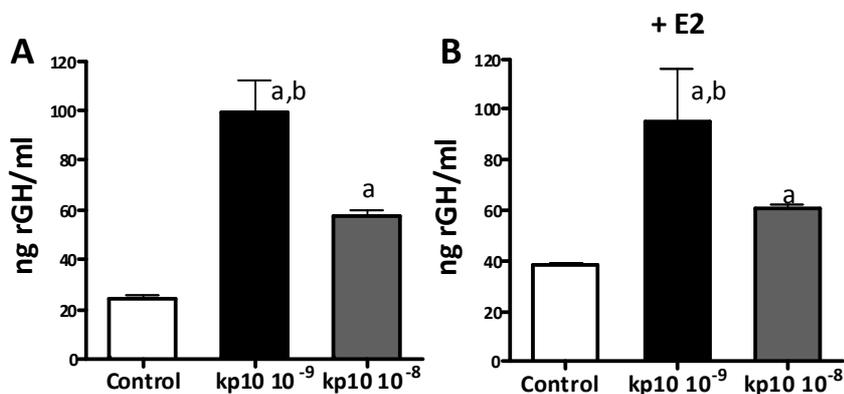


Fig.32. Efecto de la incubación con E2 sobre la acción de kp-10 en la secreción de GH en cultivos de células adenohipofisarias de ratas hembra peripuberales. Se evaluó la secreción de GH en respuesta a 10^{-9} y 10^{-8} M de kp-10 en cultivos de células hipofisarias mantenidas durante 48 h en ausencia (A) o en presencia (B) de E2 (10^{-8} M). Los valores representan la media de tres experimentos. (a) $p < 0,05$ vs. Control; (b) vs. kp10 10^{-8} M.

- Efecto de la presencia de E2 sobre la secreción de hormonas en respuesta a kp-10 en ratas adultas OVX.

Con objeto de profundizar en el estudio del efecto del E2 sobre la secreción de LH y GH *in vitro* en respuesta a kp-10, realizamos cultivos de células adenohipofisarias procedentes de ratas adultas ovariectomizadas (OVX), a las que bien se les suministraba E2 (OVX E2) o bien vehículo (OVX VEH) mediante un implante subcutáneo. Tras 15 días, los animales se sacrificaron y se realizaron cultivos de células hipofisarias que se mantuvieron durante 48 h con medio que contenía o carecía de E2 (10^{-8} M), y sobre los que finalmente se administraba la kp-10 (10^{-8} M) durante 4 h.

En los cultivos celulares de hipófisis de ratas OVX VEH mantenidos durante 48 h en ausencia de E2, el tratamiento con 10^{-8} M de kp-10 no modificó significativamente los niveles basales de LH. En cambio, cuando estos cultivos se incubaron durante 48 h en presencia de E2, el tratamiento durante 4 h con kp-10 aumentó de forma significativa la secreción de LH (Fig. 33A). En los cultivos de células de adenohipófisis de ratas OVX E2, mantenidos durante 48 h en presencia de E2, el tratamiento con 10^{-8} M de kp-10 produjo una inhibición de la liberación de LH (Fig. 33B).

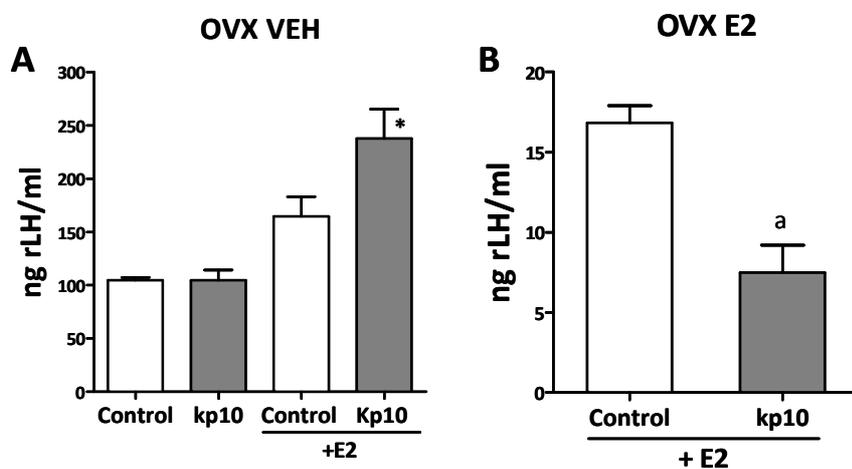


Fig.33. Efecto de la incubación con E2 sobre la secreción de LH en respuesta al tratamiento con 10^{-8} M de kp-10 en cultivos de células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas (OVX). **(A)** Secreción de LH de células adenohipofisarias de ratas OVX sin reemplazamiento hormonal (OVX VEH) mantenidas en cultivo durante 48h en presencia o ausencia de E2. **(B)** Secreción de LH de células adenohipofisarias de ratas OVX con reemplazamiento hormonal con E2 (OVX E2) mantenidas en cultivo en presencia E2. (*) $p < 0,05$ vs. resto de tratamientos; (a) vs. Control.

El estudio de la liberación de GH en este mismo modelo experimental demostró que en los cultivos de células adenohipofisarias de ratas OVX VEH mantenidos en ausencia de E2, el tratamiento con kp-10 (10^{-8} M, 4 h) estimuló significativamente la secreción de GH. Además, este efecto estimulador se vio potenciado cuando los cultivos celulares se incubaron previamente durante 48 h en presencia de E2 (Fig. 34A). Por el contrario, en los cultivos de células adenohipofisarias de ratas OVX E2, los niveles de GH no se modificaron tras el tratamiento durante 4 h con kp-10 (Fig. 34B).

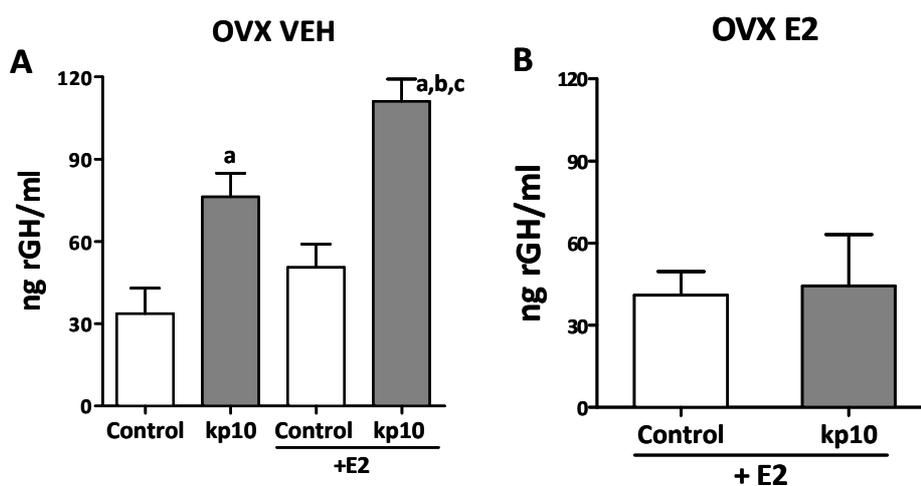


Fig.34. Efecto de la incubación con E2 sobre la secreción de GH en respuesta al tratamiento con 10^{-8} M de kp-10 en cultivos de células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas (OVX). **(A)** Secreción de GH de células adenohipofisarias de ratas OVX sin reemplazamiento hormonal (OVX VEH) mantenidas en cultivo durante 48 h en presencia o ausencia de E2. **(B)** Secreción de GH de células adenohipofisarias de ratas OVX con reemplazamiento hormonal con E2 (OVX E2) mantenidas en cultivo en presencia E2. (a) $p < 0,05$ vs. Control; (b) vs. kp10; (c) vs. Control + E2.

1.3. Regulación de la expresión del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis.

Una vez analizada la funcionalidad del sistema kiss1/kiss1r en la hipófisis, realizamos una serie de estudios con objeto de determinar la regulación de la expresión de este sistema en la glándula. Para ello, evaluamos la expresión de los genes *kiss1* y *kiss1r* durante el desarrollo postnatal, la regulación de su expresión por los factores hipotalámicos GnRH y GHRH, así como por esteroides sexuales en la hipófisis de rata, y por último estudiamos la expresión de ambos genes y su regulación en diferentes condiciones metabólicas en la hipófisis de ratón.

1.3.1. Regulación del sistema *kiss1/kiss1r* durante el desarrollo postnatal en la hipófisis de rata.

Con el objeto de estudiar la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* a nivel hipofisario durante el desarrollo postnatal, analizamos los niveles de expresión de ambos genes mediante qrt-PCR en muestras de hipófisis de ratas de diferente sexo y edad. En particular, y para ambos sexos, se obtuvieron muestras en las distintas etapas del desarrollo postnatal: etapa neonatal, infantil, prepuberal, puberal y adulta.

El perfil de expresión del ARNm de *kiss1r* en la hipófisis de ratas macho en los diferentes estadios del desarrollo reveló un significativo aumento de su expresión en animales neonatos de 1 día (Fig. 35A). En cambio, en el caso de hipófisis de ratas hembra, se observó un mayor nivel de expresión de *kiss1r* en animales de 2 días de edad, siendo este aumento aproximadamente 4 veces mayor al observado para el resto de las edades estudiadas (Fig. 35B).

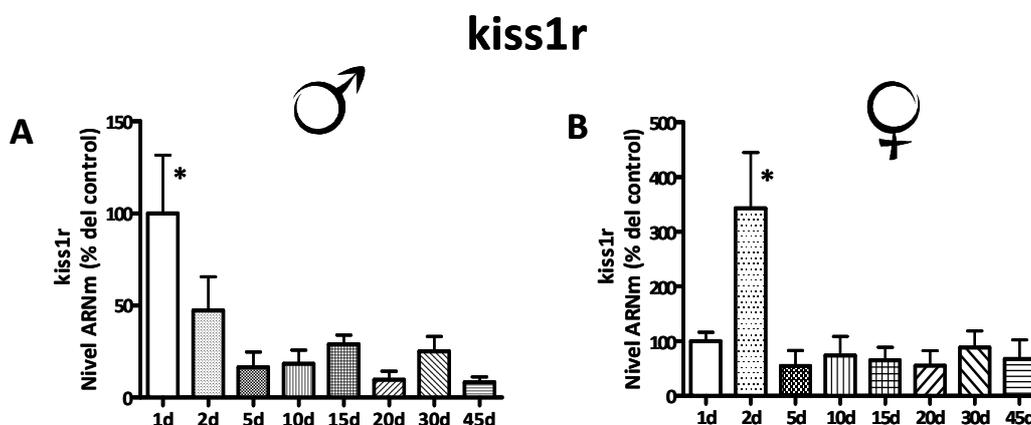


Fig.35. Perfil de expresión de *kiss1r* en hipófisis durante el desarrollo postnatal de la rata. Niveles de ARNm de *kiss1r* obtenidos mediante ensayos de rt-PCR sobre muestras hipofisarias de ratas macho (A) y de ratas hembra (B) de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 y 45 días. El valor 100% corresponde al nivel de ARNm observado en el día 1. Los datos representa la media \pm SEM de al menos 5 animales (*) $p < 0,05$ vs. resto grupos.

Por su parte, el estudio de la expresión de *kiss1* en las diferentes etapas del desarrollo postnatal de ratas macho, al igual que sucede para *kiss1r*, mostró un nivel significativamente superior de ARNm en animales de 1 día de edad, niveles que disminuyen a lo largo del desarrollo (Fig. 36A). En cambio, en ratas hembra, el nivel

más elevado de ARNm de *kiss1*, aproximadamente tres veces mayor que en el resto de edades estudiadas, se observó a los 30 días de edad, momento en el que las ratas hembra alcanzan la pubertad (Fig. 36B).

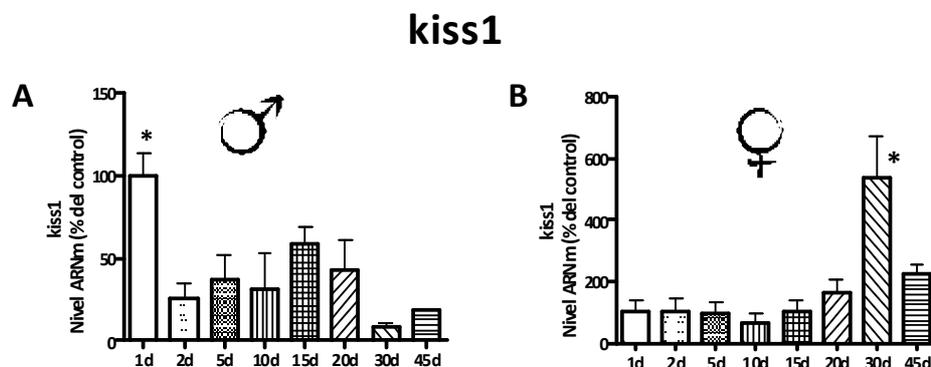


Fig.36. Perfil de expresión de *kiss1* en hipófisis durante el desarrollo postnatal de la rata. Niveles de ARNm de *kiss1* obtenidos mediante ensayos de rt-PCR sobre muestras hipofisarias de ratas macho **(A)** y de ratas hembra **(B)** de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 y 45 días. El valor 100% corresponde al nivel de ARNm observado en el día 1. Los datos representa la media \pm SEM de al menos 5 animales (*) $p < 0,05$ vs. resto grupos.

Las diferencias observadas durante el desarrollo postnatal en la expresión hipofisaria de *kiss1* y de su receptor, nos condujo a estudiar su importancia y posible significado funcional. Para ello, evaluamos la respuesta a kp-10 ensayando la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en células adenohipofisarias monodispersas en cultivo, procedentes de ratas macho y hembra de 1 y 5 días de edad, y posteriormente determinamos el tipo celular mediante inmunoidentificación post-facto. De esta forma, en estudios preliminares pudimos comprobar que en ratas macho de 5 días de edad, el 10% de la células somatotropas identificadas respondieron a la administración de kp-10 con un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, mientras que en animales de 1 día de edad, tan solo respondieron a kp-10 un 5% de las células somatotropas estudiadas. En cambio, en ratas hembra se observó una tendencia opuesta, ya que el porcentaje de células somatotropas de animales de 5 días que respondieron al tratamiento (4,5%), fue sensiblemente inferior al de células somatotropas de animales de 1 día que respondieron a kp-10 (7,7%) (Fig 37A).

En cuanto a las células gonadotropas que respondieron a la administración de kp-10, la proporción de células en ratas macho de 1 día de edad fue el doble que en animales de 5 días (26,3% frente a 13,3%). En el caso de las hembras, se observó la

misma tendencia que en machos, aunque las diferencias en el porcentaje de respuesta son menores (11,1% frente a 6,3%) (Fig. 37B).

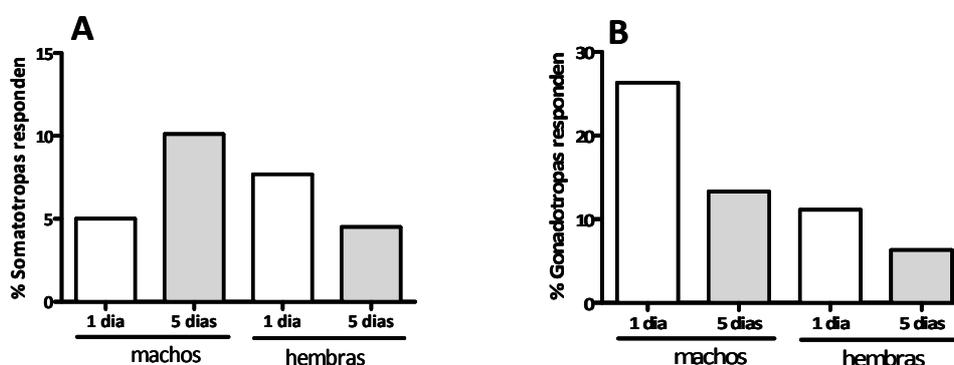


Fig.37. Porcentaje de células hipofisarias de ratas macho y hembra, de 1 y 5 días de edad que responden al tratamiento con kp-10. **(A)** Porcentaje de células somatotropas que responden a kp-10 (10^{-6} M). **(B)** Porcentaje de células gonadotropas que responden al tratamiento con kp-10. Los datos representan los valores de 1 experimento en animales de 1 día y la media 2 experimentos en animales de 5 días.

1.3.2. Regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* por factores hipotalámicos en la adenohipófisis de la rata.

Con el fin de estudiar la potencial acción reguladora que pudieran ejercer los factores hipofisiotrópicos hipotalámicos analizamos su efecto sobre la expresión de los genes *kiss1* y *kiss1r*, así como de otros receptores de interés en la hipófisis. Para ello, examinamos su expresión mediante qrt-PCR sobre muestras de ADNc procedentes de cultivos de células adenohipofisarias de ratas macho y hembra peripuberales, que habían sido previamente tratados durante 4 h con dosis 10^{-8} M de kp-10, GnRH y GHRH.

- Regulación de la expresión de *kiss1/kiss1r* por kp-10 y GnRH.

Para este estudio realizamos tratamientos de 4 h con kp-10 (10^{-8} M) y/o GnRH (10^{-8} M), y analizamos la expresión de *kiss1*, *kiss1r* y GnRH-R. Así, pudimos observar que en células adenohipofisarias de ratas macho peripuberales la expresión de *kiss1* aumentó de forma significativa en respuesta al tratamiento con kp-10 (10^{-8} M) (Fig. 38A). En cambio, la incubación con GnRH (10^{-8} M) no alteró significativamente los

niveles de ARNm de *kiss1* e incluso, inhibió el efecto estimulador de la kp-10 al administrarla de forma combinada con una dosis equimolar de ésta (Fig. 38A). Por su parte, la aplicación de idénticos tratamientos sobre cultivos de células hipofisarias de ratas hembra peripuberales, no modificó significativamente la expresión de *kiss1* (Fig. 38B).

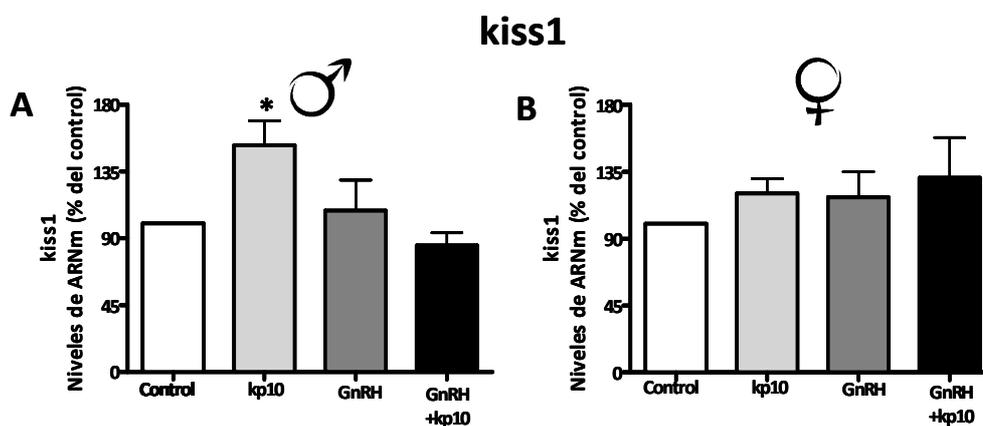


Fig.38. Efecto de GnRH y kp-10 sobre los niveles de ARNm de *kiss1* en células adenohipofisarias en cultivo de ratas peripuberales. Se presenta el perfil de expresión del gen *kiss1* tras el tratamiento con kp-10 y/o GnRH (10^{-8} M) en células adenohipofisarias en cultivo de ratas macho (A) y hembra (B). Los valores representan la media de al menos tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ vs. resto de tratamientos.

De forma similar, analizamos la expresión de *kiss1r* en células adenohipofisarias de ratas macho observando que la administración de kp-10 (10^{-8} M) y GnRH (10^{-8} M) de forma separada no modificó los niveles basales de ARNm de *kiss1r*, mientras que el tratamiento combinado con ambos péptidos estimuló la expresión del receptor de las kps (Fig. 39A). En el caso células de adenohipófisis de ratas hembra peripuberales, la incubación con GnRH (10^{-8} M) duplicó los niveles basales de ARNm de *kiss1r*, mientras que el tratamiento con kp-10 (10^{-8} M) no modificó dichos niveles, inhibiendo la estimulación causada por GnRH cuando se administró en combinación con el factor hipotalámico (Fig. 39B).

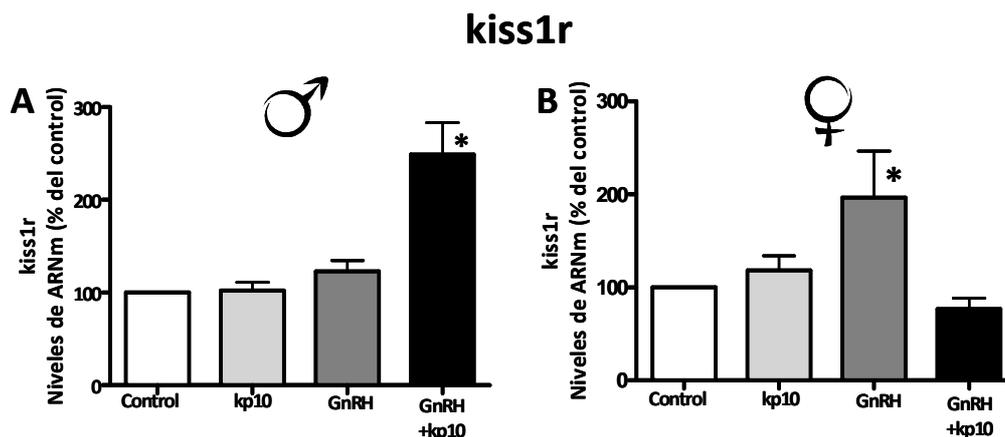


Fig.39. Efecto de GnRH y kp-10 sobre los niveles de ARNm de *kiss1r* en células adenohipofisarias en cultivo de ratas peripuberales. Se presenta el perfil de expresión del gen *kiss1r* tras el tratamiento con kp-10 y/o GnRH (10^{-8} M) en células adenohipofisarias en cultivo de ratas macho (**A**) y hembra (**B**). Los valores representan la media de al menos tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ vs. resto de tratamientos.

Por último, analizamos la expresión de GnRH-R, y pudimos observar que el tratamiento de cultivos de células adenohipofisarias de ratas macho peripuberales con GnRH (10^{-8} M, 4 h) provocó un marcado incremento en los niveles de ARNm de su propio receptor, 5 veces por encima del nivel basal. Por contra, el tratamiento con kp-10 (10^{-8} M) no modificó los niveles basales de ARNm de GnRH-R, ni potenció significativamente el efecto estimulador de la GnRH (Fig. 40A). Por su parte, en cultivos de células hipofisarias procedentes de ratas hembra peripuberales se observó un perfil de expresión similar al descrito en machos en respuesta a la administración de kp-10 y GnRH, de manera que los niveles de ARNm de GnRH-R aumentaron significativamente tras el tratamiento con GnRH (10^{-8} M) administrado solo o en presencia de una dosis equimolar de kp-10 (Fig. 40B).

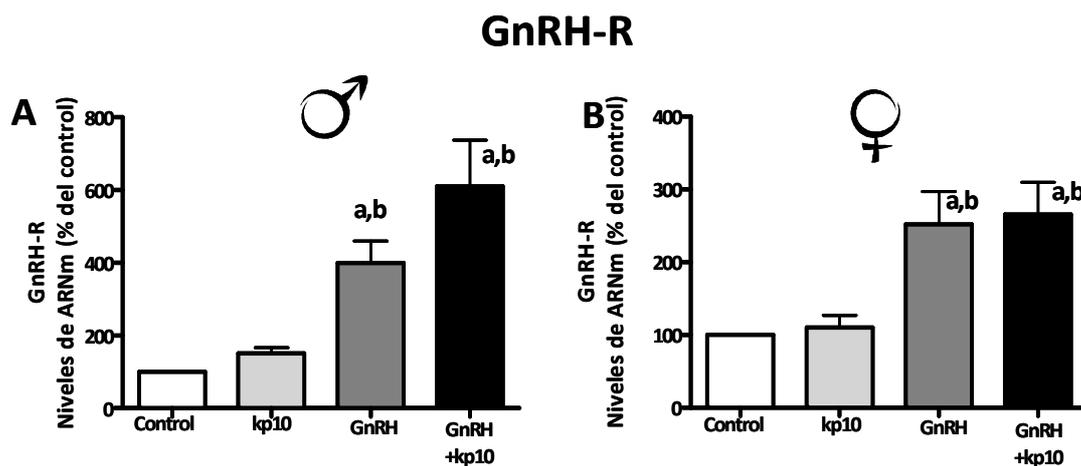


Fig.40. Efecto de GnRH y kp-10 sobre los niveles de ARNm de GnRH-R, en células adenohipofisarias en cultivo de ratas peripuberales. Se muestra el perfil de expresión del gen GnRH-R tras el tratamiento con kp-10 y/o GnRH (10^{-8} M) en células adenohipofisarias en cultivo de ratas macho (A) y hembra (B). Los valores representan la media de al menos tres experimentos independientes. (a) $p < 0,05$ vs. Control, (b) vs. kp-10 (10^{-8} M).

- Regulación de la expresión de *kiss1/kiss1r* por kp-10 y GHRH.

En este análisis, evaluamos el efecto del tratamiento con kp-10 y/o GHRH (10^{-8} M, 4 h) sobre los niveles de expresión de *kiss1*, *kiss1r* y GHRH-R, en cultivos de células adenohipofisarias de ratas peripuberales. Como muestra la figura 41, el tratamiento tanto con kp-10 como con GHRH administrados de forma individual o conjunta, incrementó significativamente los niveles de ARNm de *kiss1* en células adenohipofisarias de ratas macho peripuberales (Fig. 41A). En cambio, en el caso de las células hipofisarias procedentes de ratas hembra peripuberales, mientras que la administración de GHRH aumentó significativamente la expresión de *kiss1*, el tratamiento con kp-10 sola no modificó los niveles de ARNm de *kiss1* y, al administrarla conjuntamente con GHRH inhibió la acción estimuladora de ésta (Fig. 41B).



Fig.41. Perfil de expresión del gen *kiss1* tras el tratamiento con kp-10 y/o GHRH (10^{-8} M, 4 h) en células adenohipofisarias en cultivo de ratas macho (A) y hembra (B). Los valores representan la media de al menos tres experimentos independientes. (a) $p < 0,05$ vs. Control; (*) vs. resto de tratamientos.

Por su parte, la expresión de *kiss1r* no se modificó en células adenohipofisarias de ratas macho peripuberales tras el tratamiento con kp-10 y/o GHRH (10^{-8} M, 4 h) (Fig. 42A). Sin embargo, un análisis similar realizado sobre células adenohipofisarias en cultivo de ratas hembra peripuberales, evidenció que, al igual que para *kiss1*, el tratamiento con GHRH (10^{-8} M) estimuló la expresión de *kiss1r*. Mientras que el tratamiento con kp-10 sola no modificó los niveles basales de ARNm de *kiss1r*, la administración simultánea con GHRH inhibió el efecto estimulador de la misma (Fig. 42B).

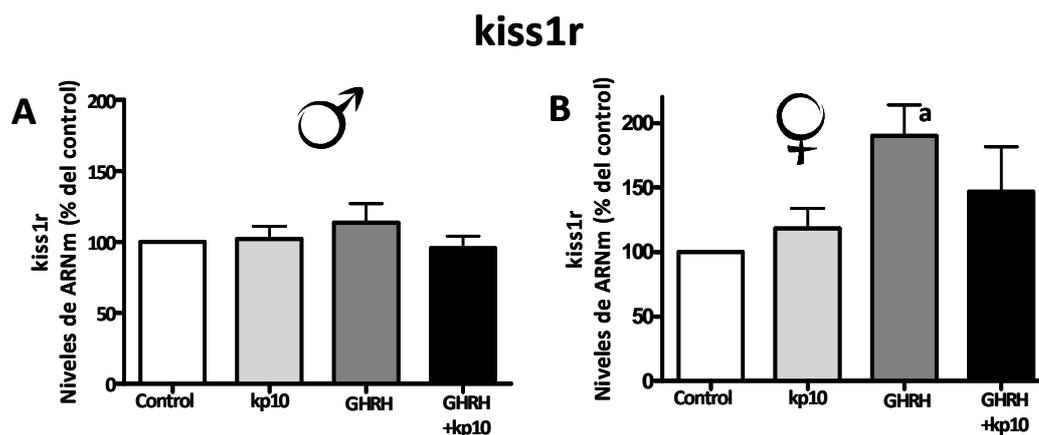


Fig.42. Perfil de expresión del gen *kiss1r* tras el tratamiento con kp-10 y/o de GHRH (10^{-8} M, 4h) y en células adenohipofisarias en cultivo de ratas macho (A) y hembra (B). Los valores representan la media de al menos tres experimentos independientes. (a) $p < 0,05$ vs. Control.

Por último, el análisis de los niveles de expresión de GHRH-R permitió observar un perfil de expresión muy similar en la respuesta de las células de ratas macho y hembra al tratamiento con kp-10 y GHRH administrados solos o de forma combinada (10^{-8} M, 4 h). Así, la administración de kp-10 aumentó de forma significativa los niveles basales del ARNm de GHRH-R (Fig. 43). Por el contrario, la administración de GHRH (10^{-8} M, 4 h) redujo la expresión de GHRH-R de forma significativa en células adenohipofisarias de ratas macho e incluso inhibió, por debajo de los niveles basales, el aumento de los niveles de ARNm observados tras la administración de kp-10 tanto en células procedentes de ratas macho como hembra (Fig. 43).

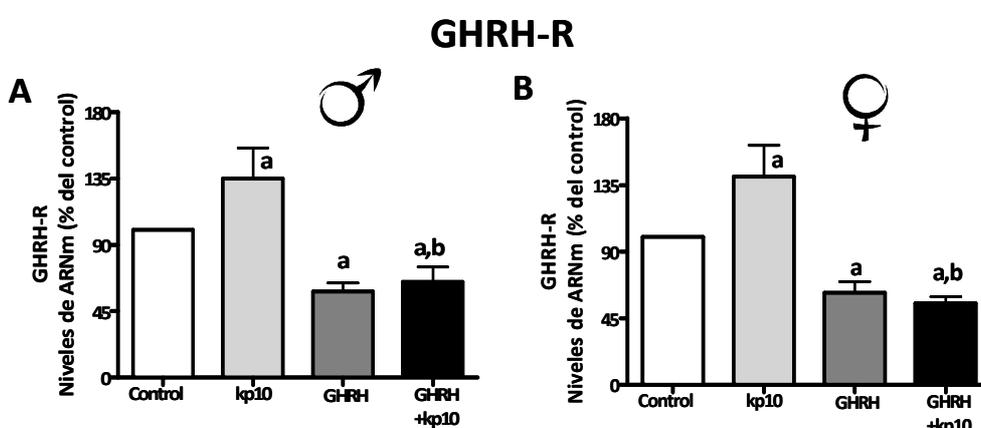


Fig.43. Perfil de expresión del gen GHRH-R tras el tratamiento con kp-10 y/o de GHRH (10^{-8} M, 4h) en células adenohipofisarias en cultivo de ratas macho (A) y hembra (B). Los valores representan la media de al menos tres experimentos independientes. (a) $p < 0,05$ vs. Control; (b) vs. kp-10 (10^{-8} M).

1.3.3. Regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* por esteroides sexuales en la hipófisis de rata.

Para este estudio, una vez realizados los tratamientos con kp-10 sobre los cultivos adenohipofisarios de ratas hembra peripuberales mantenidos en presencia o ausencia de E2 (descritos en el apartado 1.2.2. de material y métodos), las células se procesaron para el aislamiento de ARN y posterior síntesis de ADNc, que se utilizó como molde para las reacciones de qrt-PCR en el análisis de expresión de *kiss1r*, *kiss1*, GHS-R, GHRH-R y GnRH-R.

El análisis de la expresión de *kiss1* y su receptor nos permitió observar que en los cultivos de células adenohipofisarias mantenidos durante 48 h en presencia de E2, el tratamiento con 10^{-9} M de kp-10 aumentó de forma significativa la expresión tanto

de *kiss1* como de *kiss1r*, efecto que no se observó en los cultivos mantenidos en ausencia de E2 (Fig 44).

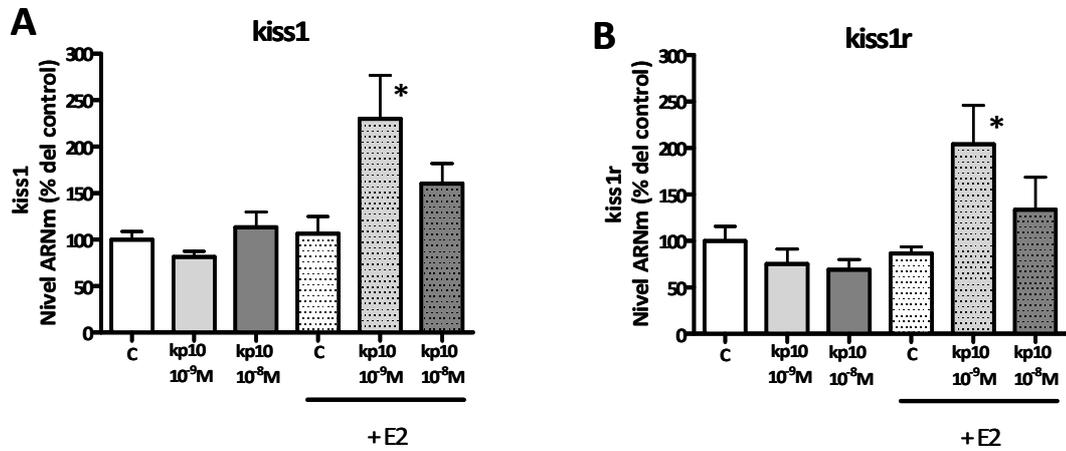


Fig.44. Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en células adenohipofisarias en cultivo de ratas hembra peripuberales. Expresión de *kiss1* (A) y de *kiss1r* (B) en células hipofisarias mantenidas en cultivo durante 48 h con medio en presencia o ausencia de E2 (10^{-8} M), en respuesta a tratamiento con con 10^{-8} M y 10^{-9} M de kp-10 o medio solo (C, control). Los valores representan la media de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ vs. datos precedentes.

De forma similar, el análisis de los niveles de ARNm de los receptores de ghrelina (GHS-R), GHRH (GHRH-R) y GnRH (GnRH-R) reveló que el tratamiento con kp-10 (10^{-9} M, 4 h) estimuló la expresión de GHS-R y GHRH-R en los cultivos celulares mantenidos durante 48 h en presencia de E2 (Fig 45A y B). Mientras que la expresión de GnRH-R no varió en respuesta a kp-10 ni en presencia ni en ausencia de E2 (Fig 45C)

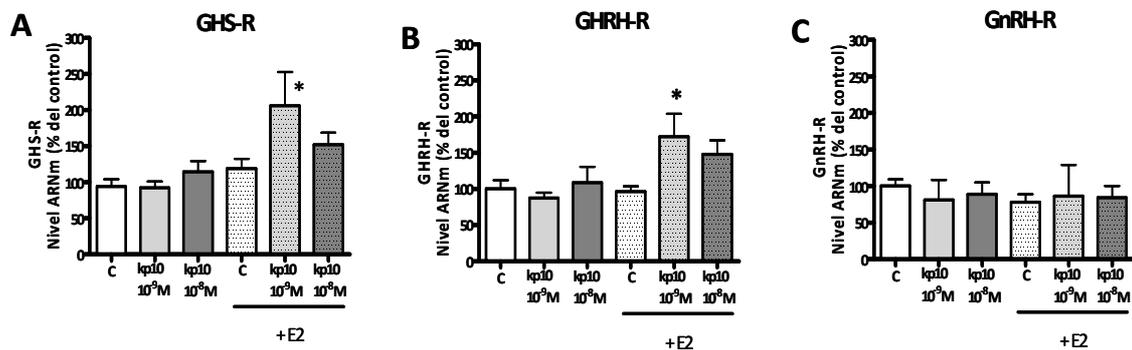


Fig.45. Expresión de GHS-R, GHRH-R y GnRH-R en células adenohipofisarias en cultivo de ratas hembra peripuberales. Expresión de GHS-R (A), GHRH-R (B) y GnRH-R (C) en células hipofisarias mantenidas en cultivo durante 48 h con medio en presencia o ausencia de E2 (10^{-8} M) en respuesta al tratamiento con 10^{-8} o 10^{-9} M de kp-10 o con medio solo (C, control). Los valores representan la media de tres experimentos independientes. (*) $p < 0,05$ vs. datos anteriores.

1.3.4. Regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* bajo distintas condiciones metabólicas en la hipófisis de ratón.

Para este estudio utilizamos muestras de hipófisis de ratones macho adultos, en las que analizamos la expresión de *kiss1r* bajo diferentes condiciones metabólicas como el ayuno (12,24 y 48 h), la obesidad y la interacción con factores metabólicos de relevancia como la leptina.

El análisis de la expresión de *kiss1r* en hipófisis de ratones macho sometidos a ayuno durante 12, 24 y 48 h, reveló que el ayuno no afecta de forma significativa la expresión de *kiss1r* (Fig. 46).

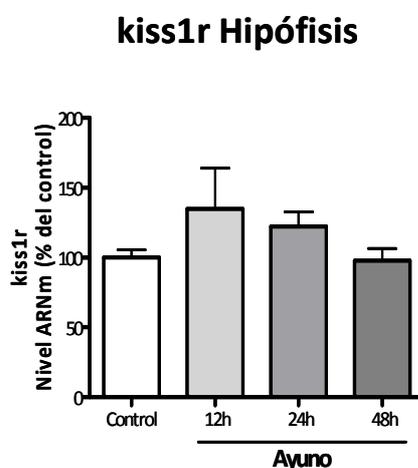


Fig.46. Efecto del ayuno sobre los niveles de expresión de *kiss1r* en hipófisis de ratones macho. Se presenta el perfil de expresión de *kiss1r* en ratones alimentados de forma normal (Control), sometidos a ayuno durante 12, 24 y 48 horas. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 5 animales por grupo.

Con objeto de evaluar el efecto de la obesidad sobre los niveles de ARNm de *kiss1r* en la hipófisis, determinamos su expresión en ratones normales (WT) y en ratones obesos deficientes en leptina (*ob/ob*), y consecuentemente obesos. Así, pudimos determinar que en ratones *ob/ob*, el nivel de expresión de ARNm de *kiss1r* en hipófisis es comparable al encontrado en ratones WT (Fig 47).

kiss1r Hipófisis

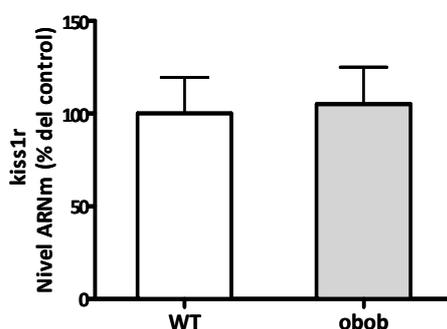


Fig.47. Efecto de la obesidad inducida por la carencia del gen de la leptina sobre los niveles de expresión de *kiss1r* en hipófisis de ratones macho. Se presenta el perfil de expresión de *kiss1r* en ratones silvestres (WT) y ratones obesos *ob/ob* (*ob/ob*). Los datos representan la media \pm SEM de al menos 5 animales por grupo.

A continuación, estudiamos el efecto del reemplazamiento con leptina en ratones *ob/ob* (Lep), comprobando que la expresión de *kiss1r* es superior a la observada en ratones *ob/ob* alimentados de forma normal (Veh) y de ratones *ob/ob* alimentados con la misma cantidad de comida que comen los ratones *ob/ob* tratados con leptina (PF) (Fig 48)

kiss1r Hipófisis

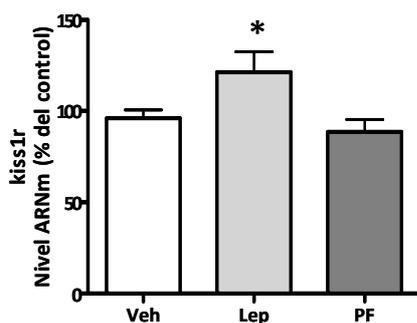


Fig.48. Efecto del reemplazamiento con leptina en ratones macho obesos *ob/ob* sobre los niveles de expresión *kiss1r* en hipófisis de ratones macho. Se presenta el perfil de expresión de *kiss1r* en ratones obesos *ob/ob*; alimentados de forma normal (Veh), tratados con leptina (Lep), o alimentados con la misma cantidad que comen los ratones tratados con leptina (PF). Los datos representan la media \pm SEM de 5 animales. (*) $p < 0,05$ vs. Veh y PF.

Por último, analizamos la regulación de la expresión *kiss1r* en hipófisis de ratones obesos en los que la obesidad fue causada por la alimentación con una dieta rica en grasa. Para ello, determinamos los niveles de ARNm de *kiss1r* de ratones alimentados con una dieta normal, con bajo contenido en grasa (LFD) y de ratones alimentados con una dieta rica en grasa (HFD). Este estudio reveló que la expresión de *kiss1r* disminuyó significativamente en la hipófisis de ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasa (HFD) (Fig 49).

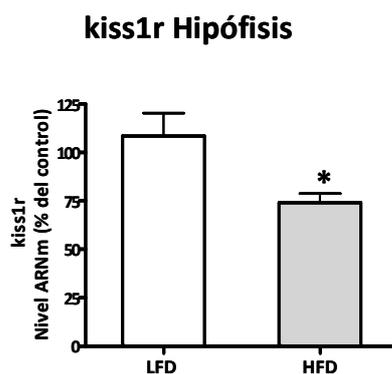


Fig.49. Efecto de la obesidad inducida por la dieta sobre la de expresión de *kiss1r* en hipófisis de ratones macho. Nivel de expresión de *kiss1r* en hipófisis de ratones con una dieta baja en grasa (LFD) y de ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasa (HFD). Los datos representan la media \pm SEM de 6 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ vs. LFD.

2. Regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en dianas externas al sistema hipotálamo-hipofisario en rata y ratón.

La observación de que el sistema *kiss1/kiss1r* posee capacidad funcional y que está sujeto a una estrecha regulación no solo en el hipotálamo sino también a nivel hipofisario, nos llevó a investigar la posible presencia y regulación de este sistema en organismos distales al eje hipotálamo-hipofisario. Puesto que los resultados obtenidos mostraban un efecto directo de la kp-10 sobre la liberación de hormonas hipofisarias, específicamente sobre LH y GH, seleccionamos dos órganos diana de estas hormonas como punto inicial para estudiar la presencia y regulación de *kiss1* y de su receptor en los mismos. En concreto, analizamos la expresión de este sistema en el testículo, como ejemplo de órgano diana de LH, y analizamos asimismo muestras del tejido adiposo, como un órgano diana de GH.

2.1. Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el testículo.

Para estudiar la regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en testículo, en primer lugar analizamos su perfil de expresión durante el desarrollo postnatal en muestras procedentes de ratas de distintas edades. A continuación, para profundizar en el posible papel integrador de las kps entre la reproducción y el metabolismo, estudiamos los niveles de ARNm de *kiss1* y de su receptor en muestras de testículo de ratones sometidos a diferentes condiciones metabólicas.

- Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el testículo de la rata durante el desarrollo postnatal.

El análisis de los niveles de ARNm *kiss1* en el testículo de rata, demostró un aumento significativo en animales de 15 días respecto al resto de edades analizadas, excepto en ratas de 5 días, donde también se detectó un aumento que no alcanzó significancia estadística. Además, se observó una disminución de los niveles de expresión de *kiss1* a partir de los 15 días de edad, alcanzándose un nivel mínimo a los 45 días de *kiss1*, momento en el que estos animales ya alcanzan la pubertad (Fig 50A). En el mismo diseño experimental se analizó la expresión de *kiss1r*, observando que la expresión de éste era baja en animales de 2 días y aumentaba notablemente en el testículo de ratas de 5, 10 y 15 días de edad, para disminuir progresivamente a partir de esta edad hasta alcanzar niveles mínimos a los 45 días (Fig 50B).

Testículo

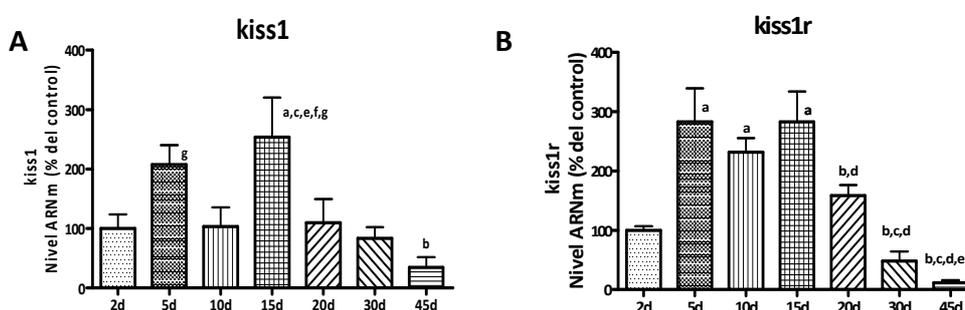


Fig. 50. Perfil de expresión de *kiss1* y *kiss1r* en el testículo durante desarrollo postnatal de rata. Niveles de ARNm de *kiss1* (A) y *kiss1r* (B) obtenidos mediante ensayos de rt-PCR sobre muestras de testículo de rata de 2, 5, 10, 15, 20, 30 y 45 días. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 animales por grupo de edad. (a) $p < 0,05$ vs. 2d; (b) vs. 5d; (c) vs. 10d; (d) vs. 15d; (e) vs. 20d; (f) vs. 30d; (g) vs. 45d.

- Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el testículo de ratón bajo distintas condiciones metabólicas.

Una vez analizada la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en testículo de rata durante el desarrollo postnatal, y con el objetivo de esclarecer el posible papel integrador de *kiss1* entre los ejes metabólico y reproductor, analizamos la expresión de este sistema en muestras de testículo de ratones sometidos a distintas condiciones metabólicas.

En primer lugar, analizamos el efecto del ayuno sobre el perfil de expresión del sistema *kiss1/kiss1r*, determinando sus niveles en el testículo de ratones sometidos a 12, 24 y 48 horas de ayuno. Estos estudios demostraron un marcado aumento de la expresión de *kiss1* dependiente del tiempo, de forma que en animales sometidos a 24 y 48 horas de ayuno, los niveles de ARNm de *kiss1* fueron significativamente mayores a los de animales alimentados de forma normal (control) (Fig 51A). Al analizar el perfil de expresión de *kiss1r* se observó un patrón similar, si bien el aumento de los niveles de ARNm solo fue significativo en animales sometidos a 48 horas de ayuno (Fig 51B).

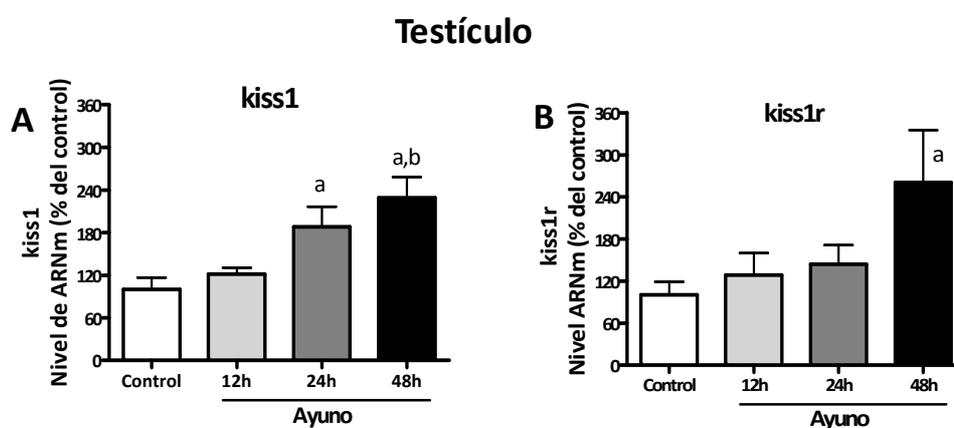


Fig.51. Efecto del ayuno sobre los niveles de ARNm de *kiss1* y *kiss1r* en el testículo de ratón. Perfil de expresión de *kiss1* (**A**) y *kiss1r* (**B**), en ratones alimentados de forma normal (Control) o sometidos a ayuno durante 12, 24 y 48 horas. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 5 animales por grupo. (a) $p < 0,05$ vs. Control; (b) vs. Ayuno 12h.

A continuación estudiamos el efecto del reemplazamiento con leptina en ratones obesos *ob/ob*, en los que se observó un claro aumento de los niveles de expresión de *kiss1* tras el tratamiento con leptina respecto a los detectados en ratones alimentados de forma normal (Veh) y en ratones alimentados con la misma cantidad de comida que los tratados con leptina (PF) (Fig 52A). Al analizar el perfil de expresión

de *kiss1r* se observó un patrón de respuesta similar, de manera que los niveles de expresión del receptor aumentaron significativamente en animales obesos tratados con leptina (Fig 52B).

Testículo

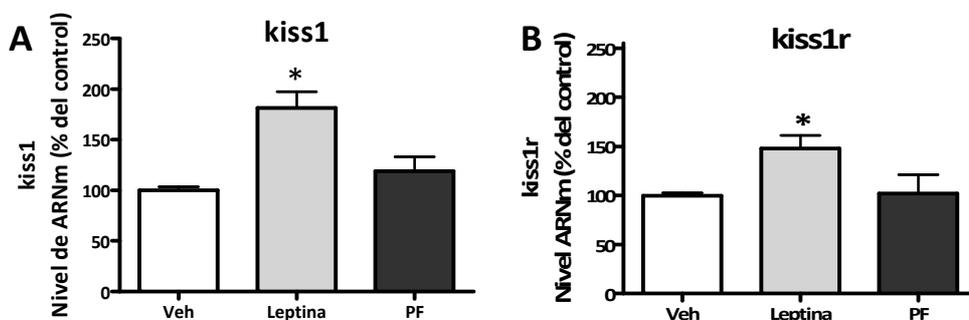


Fig.52. Efecto del reemplazamiento con leptina sobre los niveles de expresión de *kiss1/kiss1r* en el testículo de ratones obesos *ob/ob*. Perfil de expresión de *kiss1* (A) y *kiss1r* (B), en ratones obesos; alimentados de forma normal (Veh), tratados con leptina (Leptina), o alimentados con la misma cantidad que comen los ratones tratados con leptina (PF). Los datos representan la media \pm SEM de 5 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ vs. Veh y PF.

Por último, estudiamos la regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el testículo de ratones obesos, en los que la obesidad fue causada por una alimentación rica en grasa. En este caso, no se observaron cambios ya que los niveles de expresión de ambos genes son similares en ratones con dieta baja en grasa (LFD) y en ratones con obesidad inducida por la alimentación con una dieta rica en grasa (HFD) (Fig 53).

Testículo

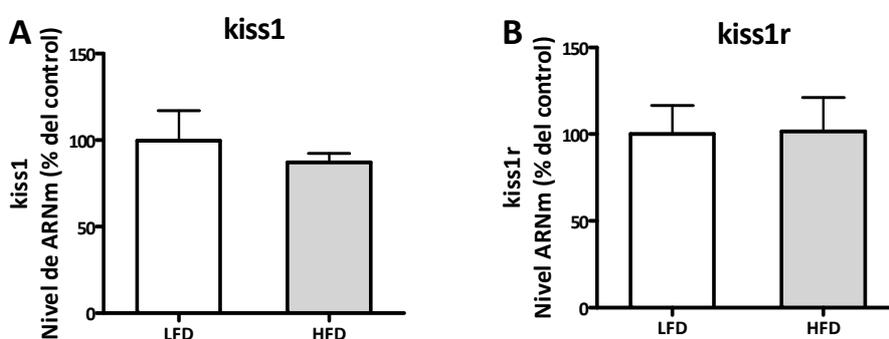


Fig.53. Efecto de la obesidad inducida por la dieta sobre la expresión de *kiss1* y *kiss1r* en el testículo de ratón. Expresión de *kiss1* (A) y de *kiss1r* (B) en el testículo de ratones con una dieta baja en grasa (LFD) y de ratones con obesidad inducida por alimentación con una dieta rica en grasa (HFD). Los datos representan la media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo.

2.2. Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el tejido adiposo.

Para determinar la regulación de *kiss1* y su receptor en tejido adiposo, estudiamos en primer lugar su perfil de expresión durante el desarrollo postnatal en muestras procedentes de ratas macho y hembra de distintas edades y, a continuación, analizamos los niveles de ARNm de *kiss1* y de su receptor en muestras de tejido adiposo de ratones macho sometidos a diferentes condiciones metabólicas.

- Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el tejido adiposo de la rata durante el desarrollo postnatal.

Para ello, cuantificamos mediante rt-PCR los niveles de ARNm de ambos genes en muestras de tejido adiposo, tanto visceral como subcutáneo, procedentes de ratas macho y hembra de 20, 30 y 45 días de edad.

Al analizar los niveles de ARNm de *kiss1r* en tejido adiposo de ratas macho se observó que su expresión en muestras de grasa visceral de animales de 20 días es tres veces superior a la medida en muestras de animales de 30 y 45 días (Fig 54A). En cambio, en el caso de las muestras de grasa subcutánea no se observó ningún cambio significativo en la expresión de *kiss1r* en las tres edades estudiadas (Fig. 54B).

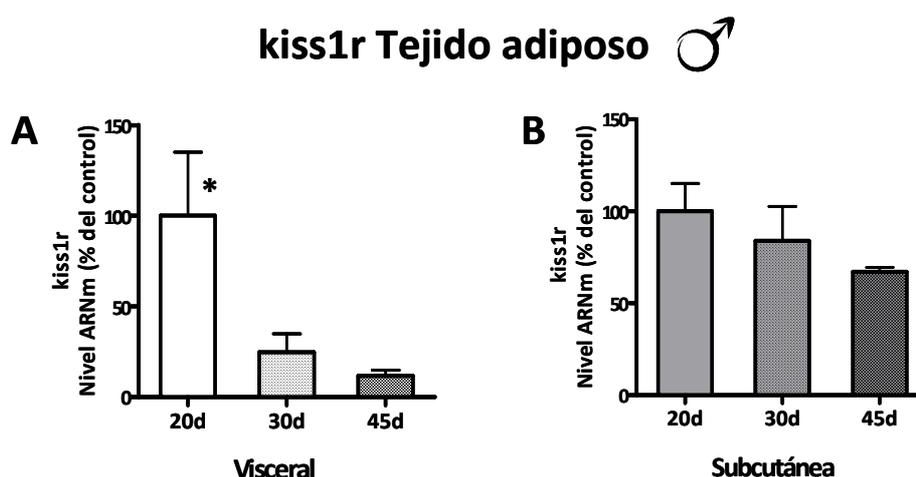


Fig.54. Perfil de expresión de *kiss1r* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas macho durante el desarrollo postnatal. Se presenta el nivel de ARNm de *kiss1r* en muestras de grasa visceral (**A**) y subcutánea (**B**) de ratas de 20, 30 y 45 días, referidos al nivel medido a los 20 días (100%). Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ vs. resto de tratamientos.

Los mismos estudios llevados a cabo sobre muestras procedentes de tejido adiposo de ratas hembra mostraron un patrón de expresión totalmente distinto. Así, se observó un incremento en el nivel de ARNm de *kiss1r* en muestras de tejido adiposo visceral de animales de 30 días, edad alrededor de la cual las ratas hembra alcanzan la pubertad (Fig 55A). Por contra, en el caso de la grasa subcutánea, los niveles de ARNm de *kiss1r* permanecen constantes hasta los 45 días de edad, momento en que aparecen los niveles máximos de expresión del receptor de las kps (Fig. 55B).

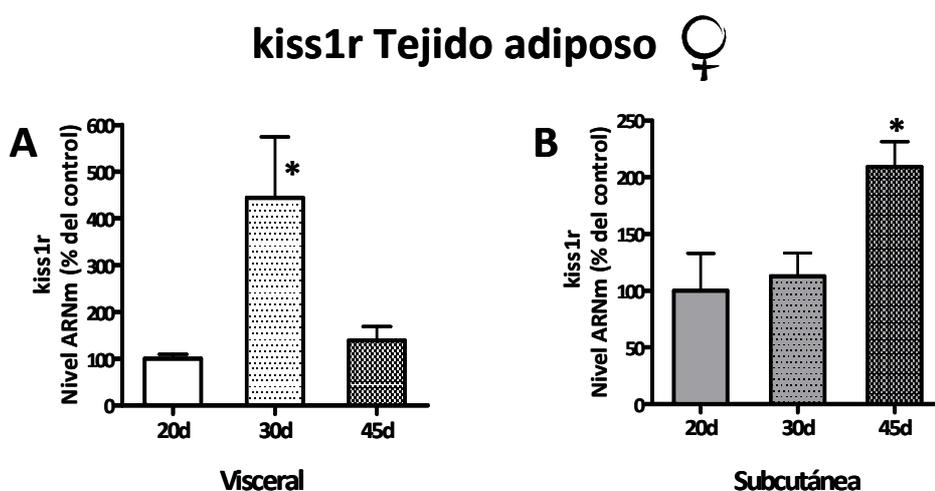


Fig.55. Perfil de expresión de *kiss1r* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas hembra durante el desarrollo postnatal. Se presentan los valores de ARNm de *kiss1r* en muestras de grasa visceral (**A**) y subcutánea (**B**) de ratas de 20, 30 y 45 días, referidos al nivel medido a los 20 días (100%). Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ vs. resto de tratamientos.

Por su parte, la evaluación de los niveles de expresión de *kiss1* en estos mismos estudios mostró tendencias muy similares a los perfiles de ARNm de su receptor. De manera que en muestras de tejido adiposo visceral de ratas macho, los niveles de ARNm de *kiss1* fueron significativamente superiores en ratas de 20 días, disminuyendo posteriormente (Fig. 56A). En el caso de muestras de tejido adiposo subcutáneo, los niveles de ARNm de *kiss1* se mantuvieron inalterados en las edades analizadas (Fig. 56B).

kiss1 Tejido adiposo ♂

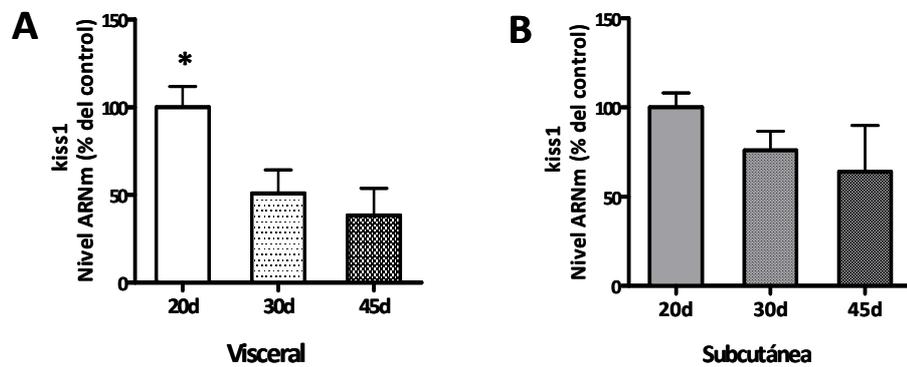


Fig.56. Perfil de expresión de *kiss1* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas macho durante el desarrollo postnatal. Se muestran los niveles de ARNm de *kiss1* en muestras de grasa visceral (A) y subcutánea (B) de ratas de 20, 30 y 45 días, referidos al nivel medido a los 20 días (100%). Los datos representan la media \pm SEM de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ vs. resto de tratamientos.

En muestras de tejido adiposo visceral procedentes de ratas hembra, los niveles de expresión de *kiss1* aumentaron marcadamente alrededor de los 30 días, recuperándose posteriormente (45 días) niveles similares a los de 20 días (Fig 57A). En cambio, en muestras de tejido adiposo subcutáneo, los niveles máximos de ARNm de *kiss1* se alcanzaron a los 45 días de edad, coincidiendo con los niveles máximos de expresión de su receptor (Fig 57B).

kiss1 Tejido adiposo ♀

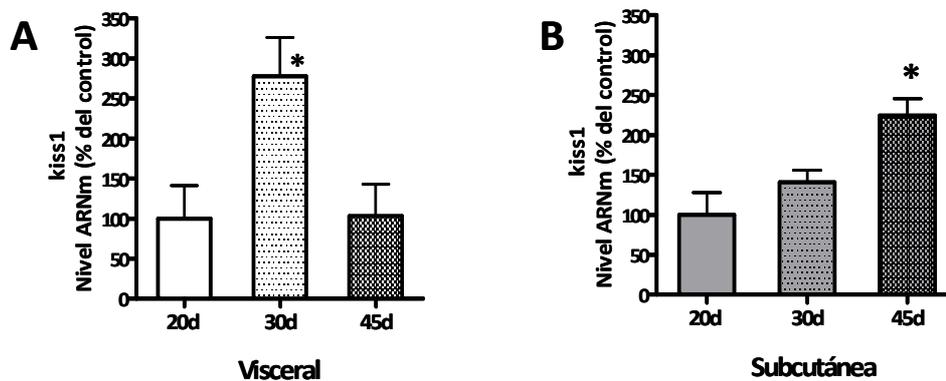


Fig.57. Perfil de expresión de *kiss1* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas hembra durante el desarrollo postnatal. Se presentan los valores de ARNm de *kiss1* en muestras de grasa visceral (A) y subcutánea (B) de ratas de 20, 30 y 45 días, referidos al nivel medido a los 20 días (100%). Los datos representa la media \pm SEM de 4 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ vs. resto de tratamientos.

- Influencia de los esteroides sexuales en la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en tejido adiposo.

Diversas observaciones clínicas realizadas en los últimos años indican que los esteroides sexuales están implicados en la regulación funcional y molecular del tejido adiposo en mujeres ¹⁴². En este contexto, nos propusimos estudiar la regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* por E2 en tejido adiposo de rata. Concretamente, analizamos la expresión de los genes *kiss1* y *kiss1r* en muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas OVX con y sin reemplazamiento hormonal.

En los estudios de expresión en grasa visceral se observó que el reemplazamiento hormonal con E2 redujo significativamente los niveles de ARNm de *kiss1* en los animales OVX. En cambio, en muestras de grasa subcutánea, los niveles de *kiss1* fueron similares a los de grasa visceral y no se modificaron por el reemplazamiento con E2 (Fig 58A). En el caso de la expresión de *kiss1r*, se observó que, en muestras de grasa visceral, los animales OVX con reemplazamiento con E2 presentan, al igual que para *kiss1*, una reducción de los niveles de ARNm con respecto a los animales OVX VEH. Por el contrario, los niveles de *kiss1r* en grasa subcutánea en animales OVX sin reemplazamiento son inferiores a los de la grasa visceral, y no varían con el reemplazamiento con E2 (Fig 58B).

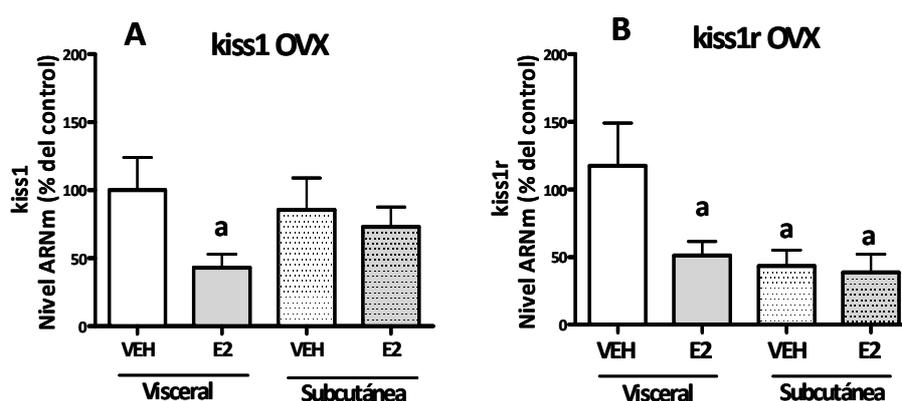


Fig.58. Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratas OVX. Se presenta los valores de ARNm de *kiss1* (A) y de *kiss1r* (B), en grasa visceral y subcutánea con o sin reemplazamiento con E2. Los datos representan la media \pm SEM de 9 animales. (a) $p < 0,05$ vs. VEH Visceral.

-Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el tejido adiposo de ratón.

Para profundizar en el estudio de la regulación del sistema *kiss1/kiss1r* en el tejido adiposo, así como su posible implicación en el control del metabolismo y en la integración de los ejes reproductor y metabólico, utilizamos muestras procedentes de ratones macho adultos sometidos a distintas condiciones experimentales dentro del paradigma de extremos metabólicos. En concreto, analizamos mediante rt-PCR la expresión del receptor *kiss1r* en muestras de tejido adiposo procedentes ratones macho adultos sometidos a distintos tiempo de ayuno, de ratones con obesidad inducida por la dieta y de ratones obesos, *ob/ob*, tratados con leptina. En todos los casos analizamos muestras tanto de grasa visceral como de grasa subcutánea, ya que se ha descrito en numerosas ocasiones una regulación diferencial en ambos depósitos de la expresión de distintos genes, como es el caso de la leptina, que se expresa más en grasa subcutánea.

El análisis del perfil de expresión de *kiss1r* en tejido adiposo de ratones macho adultos sometidos a 12, 24 y 48 horas de ayuno, demostró que los niveles de ARNm del receptor en muestras de grasa, tanto visceral como subcutánea, procedentes de animales sometidos a ayuno durante 24 y 48 horas, eran significativamente superiores a los observados en ratones alimentados de forma normal (Fig. 59A y B).

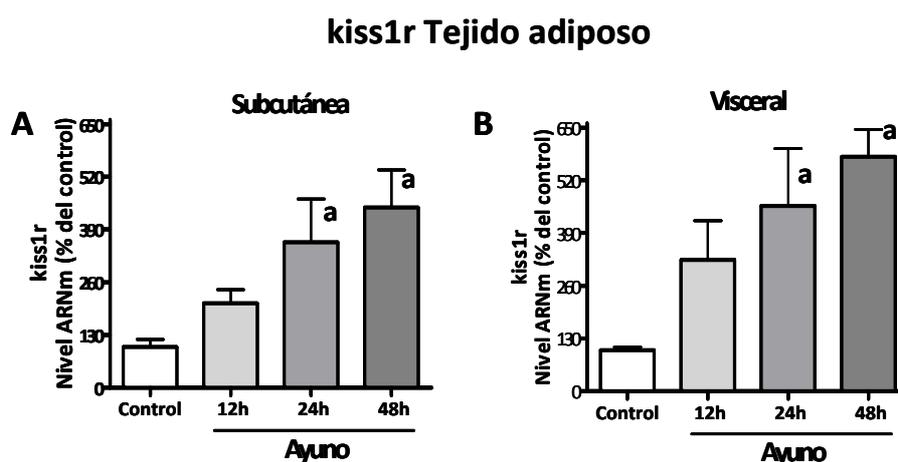


Fig.59. Efecto del ayuno sobre los niveles de ARNm de *kiss1r* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de ratón. Se muestran los niveles de expresión de *kiss1r* en grasa subcutánea (A) y en grasa visceral (B). Los datos representan la media \pm SEM de 5 animales por grupo. (a) $p < 0,05$ vs. Control.

Se cuantificó la expresión de *kiss1r* en el tejido adiposo de ratones obesos *ob/ob* para estudiar el efecto del reemplazamiento con leptina. Como muestra la figura 60A, la grasa subcutánea de los ratones *ob/ob* tratados con leptina (Lep) presentaba unos niveles de ARNm de *kiss1r* significativamente superiores a la de los ratones obesos sin reemplazamiento con leptina y alimentados de forma normal (Veh), así como en los controles alimentados con la misma cantidad de comida que los ratones tratados con leptina (PF) (Fig 60A). Por su parte, en el análisis realizado sobre grasa visceral se observó que los niveles de ARNm de *kiss1r* fueron significativamente mas elevados en ratones tratados con leptina (Lep) que en ratones Veh, y numéricamente mas altos que en animales PF, si bien estas diferencias no alcanzaron significación estadística (Fig 60B).

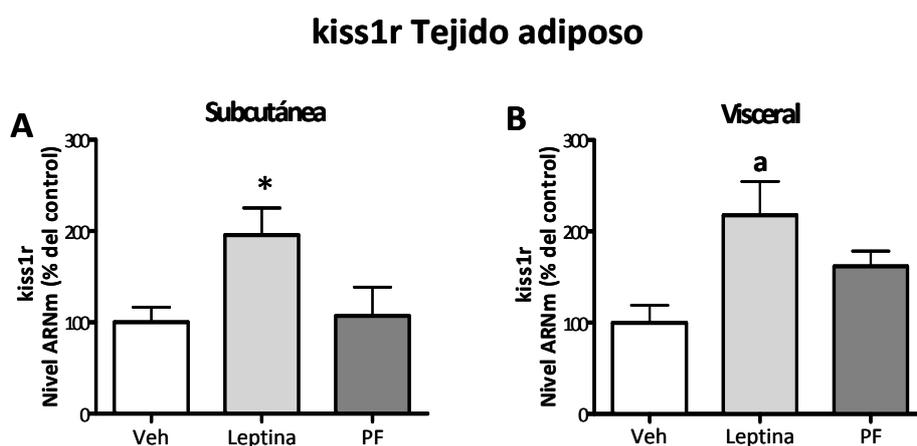


Fig.60. Efecto del reemplazamiento con leptina de ratones obesos *ob/ob* sobre los niveles de expresión de *kiss1r* en el tejido adiposo. Se presentan los valores de expresión de *kiss1r* en grasa subcutánea (A) y en grasa visceral (B) de ratones alimentados de forma normal (Veh), tratados con leptina (Leptina), o alimentados con la misma cantidad que comen los ratones tratados con leptina (PF). Los datos representan la media \pm SEM de 5 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ vs. resto de tratamientos; (a) vs. Veh.

Finalmente, completamos el estudio de la expresión de *kiss1r* en tejido adiposo, analizando el efecto de la obesidad inducida por la dieta sobre su perfil de expresión en ratones normales. En estos estudios se observó que, tanto en grasa subcutánea como en grasa visceral, los niveles de ARNm de *kiss1r* fueron significativamente inferiores en animales con obesidad inducida por una dieta rica en grasa (HFD), que en ratones alimentados con una dieta baja en grasa (LFD) (Fig. 61).

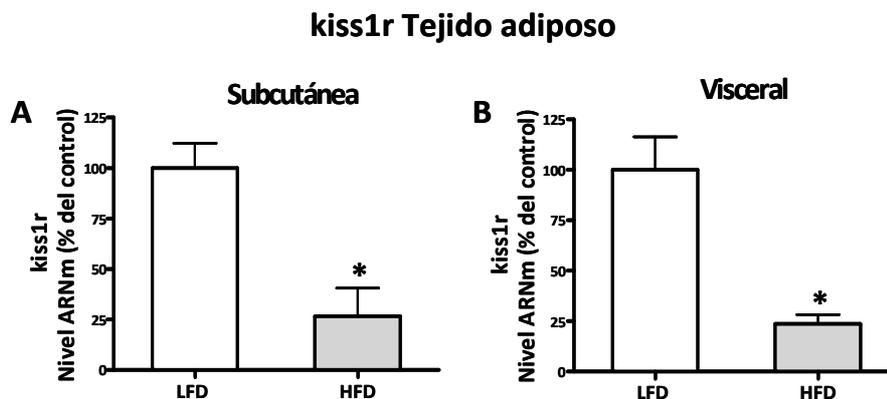


Fig.61. Efecto de la obesidad inducida por la dieta sobre los niveles de expresión de en el tejido adiposo de ratón. Se presentan los niveles de ARNm de *kiss1r* en grasa subcutánea (**A**) y de grasa visceral (**B**) de ratones con una dieta baja en grasa (LFD) y de ratones con una dieta rica en grasa (HFD). Los datos representan la media \pm SEM de 3 animales por grupo. (*) $p < 0,05$ vs. LFD.

3. Diseño y análisis funcional de nuevos análogos de la kp-10 de rata.

Los resultados hasta aquí expuestos, junto con estudios publicados en los últimos años, demuestran el importante papel que desempeñan las kps no solo a nivel hipotalámico, sino también a otros niveles (hipófisis, tejido adiposo, testículo, páncreas, placenta, etc), donde ejercen funciones clave en el control neuroendocrino de la reproducción, y pueden además estar implicadas en otras acciones biológicas. Por todo ello, resultaría muy interesante y de gran utilidad obtener agonistas y antagonistas de la kp-10, en especial por sus potenciales aplicaciones terapéuticas.

Así pues, iniciamos el diseño, síntesis y análisis funcional de una serie de análogos estructurales derivados de la kp-10 de rata, obtenidos mediante sustituciones puntuales de cada uno de los aa del decapeptido por Alanina (Ala) (Tabla 9).

hkp10	Tyr ¹ -Asn ² -Trp ³ -Asn ⁴ -Ser ⁵ -Phe ⁶ -Gly ⁷ -Leu ⁸ -Arg ⁹ -Phe ¹⁰ -NH ₂
r kp10	Tyr ¹ -Asn ² -Trp ³ -Asn ⁴ -Ser ⁵ -Phe ⁶ -Gly ⁷ -Leu ⁸ -Arg ⁹ -Tyr ¹⁰ -NH ₂
kp10 Ala1	Ala-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
kp10 Ala2	Tyr-Ala-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
kp10 Ala3	Tyr-Asn-Ala-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
kp10 Ala4	Tyr-Asn-Trp-Ala-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
kp10 Ala5	Tyr-Asn-Trp-Asn-Ala-Phe-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
kp10 Ala6	Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Ala-Gly-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
kp10 Ala7	Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Ala-Leu-Arg-Tyr-NH ₂
kp10 Ala8	Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Ala-Arg-Tyr-NH ₂
kp10 Ala9	Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Ala-Tyr-NH ₂
kp10 Ala10	Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Ala-NH ₂

Tabla 9. Secuencia aminoacídica de la kp-10 humana (hkp10), de rata (rkp10), así como de una serie de análogos sintéticos derivados de rkp10, y obtenidos mediante sustituciones puntuales de cada uno de los aa del decapeptido por Alanina.

Una vez sintetizada esta batería de péptidos realizamos una serie de estudios funcionales determinar sus características estructurales y su capacidad de unirse y activar al receptor kiss1r de rata.

En primer lugar, estudiamos la actividad funcional de cada uno de estos péptidos sobre la línea celular CHO-K1rkiss1r mediante análisis de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ usando para ello el sistema de evaluación múltiple FlexStation II. Estos estudios mostraron que los análogos de la kp-10 generados por sustituciones puntuales en los residuos aminoacídicos 1 a 5 y 7 a 9, presentaban valores de EC_{50} en el rango de $1,04 \times 10^{-8}$ M a $1,27 \times 10^{-7}$ M, muy similares a los valores obtenidos para la kp-10 humana y de rata sin modificar ($EC_{50} = 1,54 - 2,6 \times 10^{-8}$ M). Estos datos son indicativos de que estos análogos conservan la capacidad de unirse y activar al receptor. En claro contraste, los análogos de la kp-10 generados por la sustitución puntual de las posiciones 6 y 10 por Alanina, denominados $[Ala^6]kp-10$ y $[Ala^{10}]kp-10$, mostraron un incremento en el valor EC_{50} con respecto a las kp-10 sin modificar ($> 6,46 \mu M$), lo que implica una disminución de su capacidad para unirse y activar al receptor (**Tabla 10, Fig 62A**).

Péptido	Agonista			Antagonista	
	n	Eficacia Máx. (%)	pEC ₅₀	n	Eficacia Máx. (%) pIC ₅₀
rKp-10	11	100	8,00 ± 0,03		
hKp-10	4	100,3 ± 7,3	7,81 ± 0,23		
[Ala¹]kp-10	6	87,2 ± 2,3	7,85 ± 0,11		
[Ala²]kp-10	6	91,2 ± 5,4	7,88 ± 0,11		
[Ala³]kp-10	5	92,2 ± 5,5	8,23 ± 0,18		
[Ala⁴]kp-10	5	89,6 ± 5,6	7,19 ± 0,04		
[Ala⁵]kp-10	4	79,0 ± 2,8	7,80 ± 0,02		
[Ala⁶]kp-10	7	49,9 ± 2,8	5,48 ± 0,24	10	6,06 ± 0,26
[Ala⁷]kp-10	4	88,9 ± 3,7	7,70 ± 0,21		
[Ala⁸]kp-10	5	84,1 ± 5,5	7,27 ± 0,19		
[Ala⁹]kp-10	6	74,2 ± 4,2	6,87 ± 0,14		
[Ala¹⁰]kp-10	4	24,1 ± 5,6	<5	10	inactivo

Tabla 10. Parámetros funcionales de la respuesta de las células CHO-K1rkiss1r al tratamiento con diferentes kps determinadas mediante la tecnología FlexStation II. La eficacia máxima se expresa como el porcentaje de la amplitud inducida por la administración 10⁻⁶M de la kp-10 de rata.

Basándonos en estos resultados, llevamos a cabo ensayos de competición para analizar el posible carácter antagonista de los análogos, [Ala⁶]kp-10 y [Ala¹⁰]kp-10. Para ello, se usaron dosis crecientes de los análogos en presencia de una concentración fija de kp-10 y se midieron los cambios en la [Ca²⁺]_i. En estos ensayos, sólo el análogo [Ala⁶]kp-10, presentó ciertas propiedades antagonistas con un valor de IC₅₀ de 9,31 x 10⁻⁷ M (Tabla 10, Fig 62B). Sin embargo, en estudios para caracterizar la capacidad antagonista de este análogo de la kp-10 se observó que el péptido [Ala⁶]kp-10 no se comporta como un antagonista competitivo reversible típico (Fig. 62C).

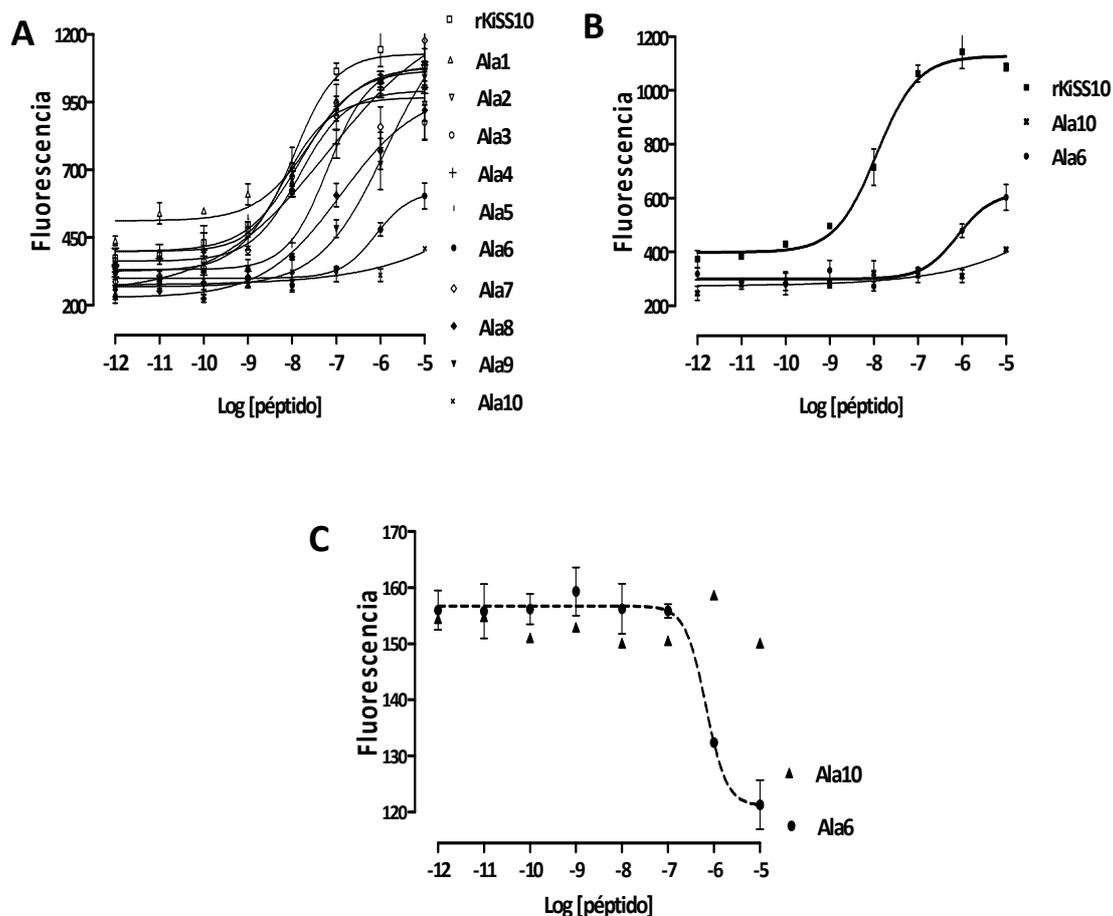


Fig.62. Evaluación *in vitro* de las propiedades funcionales de la kp-10 y sus análogos. Se evaluaron los efectos de concentraciones crecientes de los diferentes análogos derivados de la kp-10 midiendo mediante el sistema FlexStation II los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ en células CHO-K1 que expresan de forma estable el receptor kiss1r. **(A)** Curvas dosis respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ observados para la kp-10 y sus análogos Ala1,2,3,4,5,7,8 y 9. **(B)** Curvas dosis respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ para la kp-10 y sus análogos $[Ala^6]kp-10$ y $[Ala^{10}]kp-10$. **(C)** Ensayos de competición con los análogos $[Ala^6]kp-10$ y $[Ala^{10}]kp-10$ con kp-10. Los valores representan la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes.

Para profundizar en el estudio de las propiedades de los análogos derivados de la kp-10, examinamos su efecto sobre la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ en células CHO-K1 individuales que expresan de forma estable el receptor kiss1r. De forma similar a los estudios con poblaciones celulares, la administración de los análogos de kp-10 con sustituciones puntuales de los residuos aminoacídicos de 1 a 5 y de 7 a 9 no se observaron cambios apreciables en la proporción de células que responden al tratamiento, en comparación con el porcentaje de células que respondieron a la administración de la propia kp-10 sin modificar o de la forma larga de la kp humana (kp-54). En cambio, los tratamientos con los análogos $[Ala^6]kp-10$ y $[Ala^{10}]kp-10$

mostraron un descenso significativo de la proporción de células que respondieron al tratamiento (Fig. 63A).

En estos estudios, pudimos observar además que las células requerían más tiempo requerido para alcanzar el incremento máximo de la $[Ca^{2+}]_i$ tras el tratamiento con los análogos $[Ala^6]kp-10$ y $[Ala^{10}]kp-10$, en comparación con el tiempo para alcanzar el incremento máximo en respuesta a $kp-54$, $kp-10$ y el resto de análogos (Fig. 63B).

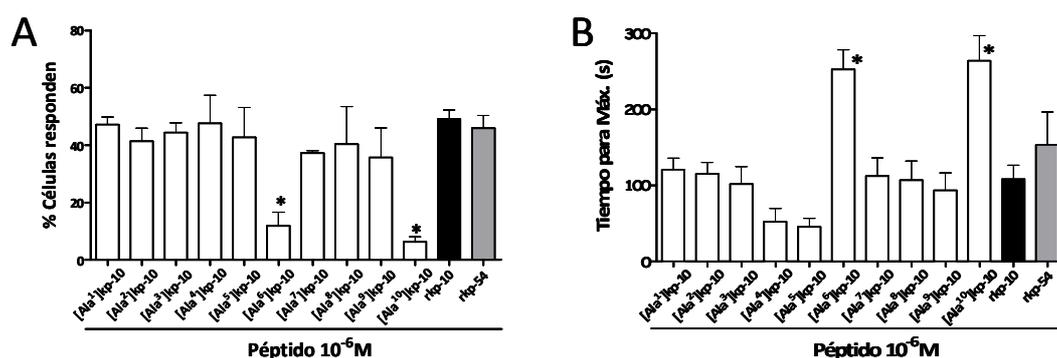


Fig.63. Análisis *in vitro* de las propiedades funcionales de los análogos de la $kp-10$ sobre células CHO-K1rkiss1r individuales. Estudios de microfluorimetría para determinar el porcentaje de células que responden al tratamiento con una dosis 10^{-6} M de $kp-54$, $kp-10$ y de sus análogos (A) y el tiempo necesario para alcanzar el incremento máximo de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al tratamiento (B). Los valores representan la media de un mínimo de tres experimentos, en cada experimento se analizaron dos placas de forma independiente, y en cada placa se analizó un mínimo de 40 células CHO-K1-rkiss1r individuales. (*) $p < 0,05$ vs. resto de tratamientos.

El conjunto de los resultados obtenidos *in vitro* indica que las posiciones 6 y 10 del decapeptido deber ser cruciales para la unión y/o activación del receptor, y posiblemente por tanto para la actividad funcional de la $kp-10$.

En el contexto de la colaboración establecida con los grupos dirigidos por el Dr. Vaudry y el Dr. Tena-Sempere para estudiar de forma más completa las propiedades de estos análogos, el grupo del Dr. Tena-Sempere se llevaron a cabo estudios *in vivo* para monitorizar la capacidad de los análogos $[Ala^6]kp-10$ y $[Ala^{10}]kp-10$ de la $kp-10$ para reproducir o antagonizar los efectos de la propia $kp-10$ sobre la dinámica de secreción de LH. Puesto que los resultados de estos ensayos son cruciales para comprender mejor las propiedades de dichos análogos, se incluyen aquí los principales hallazgos producto de esta colaboración. Concretamente, en primer lugar se analizó la respuesta de secreción de LH tras la administración i.c.v. de un bolo de $kp-10$ o de los

análogos en ratas macho adultas. Los resultados mostraron que la sustitución en la posición 6 de la kp-10 provocó una reducción significativa del efecto estimulador del decapeptido sobre la secreción de LH, ya que la concentración de LH liberada en respuesta a la inyección del análogo [Ala⁶]kp-10 apenas alcanzó un cuarto de la hormona liberada en respuesta a la administración de kp-10 sin modificar. De hecho, mientras que la kp-10 aumenta 8 veces los niveles de LH en suero que persisten elevados 120 min después de la administración i.c.v., una dosis equimolar de [Ala⁶]kp-10 aumenta cuatro veces los niveles circulantes de LH solo a los 15 min después de la inyección, desapareciendo el efecto a los 60 min. Por su parte, los resultados muestran que la sustitución [Ala¹⁰]kp-10 elimina completamente la capacidad del compuesto para inducir secreción de LH tras la administración i.c.v., con respuestas de LH dinámicas e integradas similares a las observadas en los controles donde solo se inyecta vehículo (Fig. 64).

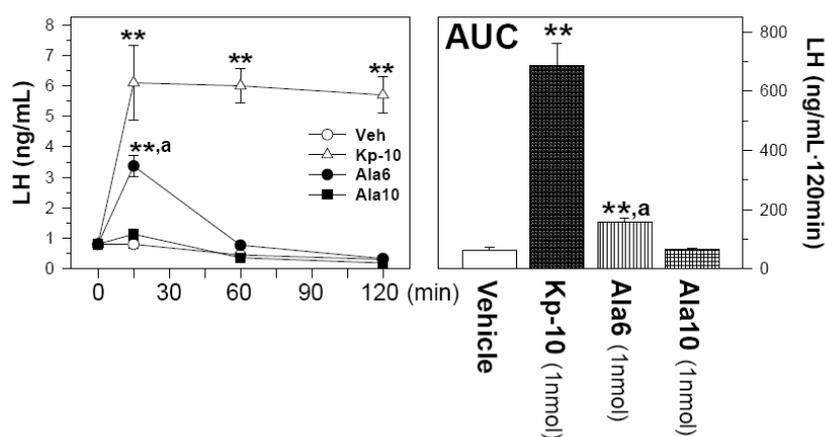


Fig 64. Análisis *in vivo* del efecto de los análogos [Ala⁶]kp-10 y [Ala¹⁰]kp-10 en la secreción de LH en ratas macho adultas. Los animales recibieron una inyección i.c.v. de una dosis 1nmol de [Ala⁶]kp-10, [Ala¹⁰]kp-10 o kp-10, y se recogieron muestras de sangre para determinar la concentración de LH antes (0 min), y 15, 60 y 120 min después de la administración del tratamiento. Las ratas inyectadas i.c.v. con el vehículo sirven como control. Además del perfil tiempo respuesta (panel izquierdo), también se muestran las respuestas secretoras integradas tras la administración de los análogos de la kp-10, calculadas como el área bajo la curva (AUC), del estudio de 120 min (panel derecho). Los valores hormonales representan la media \pm SEM de al menos 10 determinaciones independientes por grupo. (**) $p < 0,01$ vs. correspondiente grupo inyectado con el vehículo; (a) vs. correspondiente grupo inyectado con kp-10.

Seguidamente, con el objetivo de estudiar el potencial efecto antagonista de los análogos de la kp-10, se analizó el efecto de la administración *in vivo* de una combinación de [Ala⁶]kp-10 o [Ala¹⁰]kp-10 con kp-10 sobre la liberación de LH., No

obstante, considerando la gran potencia de la kp-10 para inducir secreción de LH tras la administración i.c.v., se co-administró una dosis 1 nmol de cada análogo con una dosis 100 pmol de kp-10. La inyección de kp-10 indujo una robusta respuesta secretora de LH que alcanza el máximo a los 15 min y disminuye progresivamente. Tras la co-inyección i.c.v. de kp-10 con [Ala⁶]kp-10 o [Ala¹⁰]kp-10 se observó un perfil de secreción similar, con respuestas individuales similares a las provocadas por la administración de kp-10 sola. De la misma manera, la respuesta integrada de LH (120 min) tras la inyección de kp-10 fue similar a la obtenida tras la co-administración con [Ala⁶]kp-10 o [Ala¹⁰]kp-10 (Fig 65).

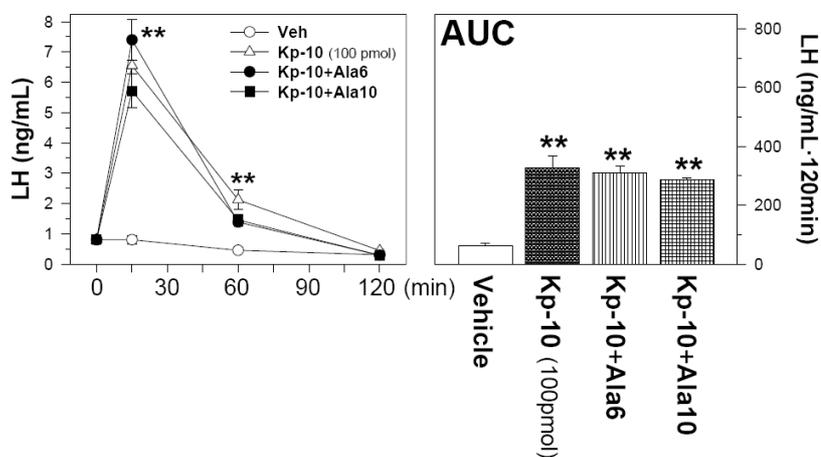


Fig 65. Análisis del efecto *in vivo* de la co-administración de kp-10 con los análogos [Ala⁶]kp-10 o [Ala¹⁰]kp-10 sobre la secreción de LH en ratas macho adultas. Los animales recibieron una inyección i.c.v. de una dosis 100 pmol de kp-10, sola o en combinación con un bolo 1 nmol de [Ala⁶]kp-10 o [Ala¹⁰]kp-10. Se recogieron muestras de sangre para determinar la concentración de LH antes (0 min), y 15, 60 y 120 min después de la administración del tratamiento. Las ratas inyectadas i.c.v. con el vehículo sirven como control. Además del perfil tiempo respuesta (panel izquierdo), también se muestran las respuestas secretoras integradas tras la administración de los análogos de la kp-10, calculadas como el área bajo la curva (AUC) del estudio de 120 min (panel derecho). Los valores hormonales representan la media \pm SEM de al menos 10 determinaciones independientes por grupo. (**) $p < 0,01$ vs. correspondiente grupo inyectado con el vehículo.

Por último, se estudió el efecto *in vivo* de los análogos [Ala⁶]kp-10 y [Ala¹⁰]kp-10 sobre la respuesta secretora de LH en ratas macho ORX. Como se había descrito previamente, la orquidectomía induce un estado de elevada expresión de *kiss1* en el hipotálamo, que se traduce en un aumento de los niveles circulantes de LH. Por lo tanto, se asume que el bloqueo central de las kps debería dar lugar a una reducción detectable de los niveles circulantes de LH en animales ORX. En concreto, se siguió un

protocolo de inyección i.c.v. repetida de bolos de 1 nmol de [Ala⁶]kp-10 o [Ala¹⁰]kp-10, con un total de tres inyecciones a intervalos de 60 min, y se monitorizaron los niveles de LH 15 min después de cada inyección. Como se esperaba, la orquidectomía produjo una elevación de los niveles basales de LH sobre los valores control de ratas macho intactas ($10,5 \pm 0,9$ ng/ml en ORX vs, $0,8 \pm 0,16$ ng/ml). La administración i.c.v. repetida de 1 nmol de [Ala⁶]kp-10 produjo un incremento en los niveles circulantes de LH a los 15 min de cada inyección. En cambio, la inyección central de [Ala¹⁰]kp-10 no modificó los niveles de LH en ninguno de tiempos estudiados (Fig 66).

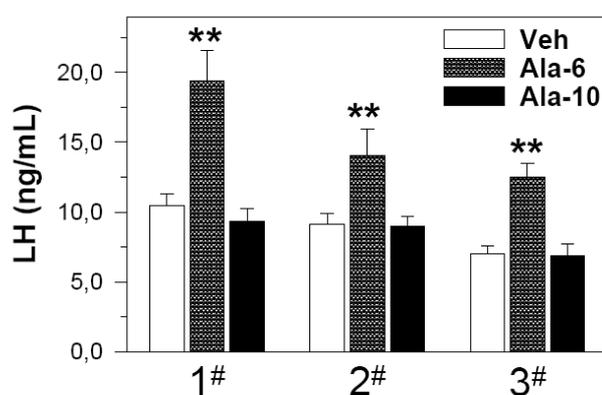


Fig 66. Análisis del efecto *in vivo* de los análogos [Ala⁶]kp-10 y [Ala¹⁰]kp-10 en la hipersecreción de LH de ratas orquidectomizadas (ORX). Una semana después de la ORX, los animales recibieron tres inyecciones i.c.v. consecutivas (a intervalos de 60 min) de una dosis 1 nmol de [Ala⁶]kp-10 o [Ala¹⁰]kp-10, y se recogieron muestras de sangre para la determinación de LH mediante punción yugular tras 15 min de cada inyección i.c.v de los análogos. Las ratas ORX inyectadas i.c.v. con el vehículo sirven como control. Los valores hormonales representan la media \pm SEM de al menos 10 determinaciones independientes por grupo. (**) $p < 0,01$ vs. correspondiente grupo inyectado con el vehículo.

VI.DISCUSIÓN

1. Sistema *kiss1/kiss1r* en la adenohipófisis.

1.1. Funcionalidad del sistema *kiss1/kiss1r* en la adenohipófisis.

Un gran número de estudios realizados en los últimos años ha demostrado que el sistema *kiss1/kiss1r* desempeña una función crucial en el control neuroendocrino del eje reproductor, que consiste básicamente en la inducción de un potente efecto estimulador sobre la secreción de gonadotropinas, que se ejerce a nivel hipotalámico, mediante la activación de las neuronas GnRH y la consiguiente liberación de GnRH^{57, 182, 183}. Por el contrario, y a pesar de que los primeros estudios sobre el receptor *KISS1R* (GPR54) ya demostraron una elevada expresión del mismo en la hipófisis de humanos y otras especies^{4, 5}, el posible significado funcional de este sistema no se ha analizado con detalle a nivel hipofisario. En el presente trabajo describimos por primera vez la expresión simultánea de *kiss1* y *kiss1r* en células adenohipofisarias en cultivo de ratas peripuberales. Estas observaciones originales han sido confirmadas en estudios posteriores, de manera que otros grupos también han detectado la presencia de *kiss1r* en fracciones de células hipofisarias de oveja⁶⁹, y más recientemente mediante inmunohistoquímica de doble marcaje se ha demostrado la presencia de ambas proteínas en células gonadotropas de rata hembra adulta, y también en la línea de células gonadotropas murina LβT2⁷¹. Además, en estos últimos estudios no se descarta la posibilidad de que ambos genes se expresen en otros tipos celulares hipofisarios, pues se ha detectado inmunorreactividad en células que no se corresponden exclusivamente con células gonadotropas⁷¹.

Inicialmente, el análisis de la acción de la kp-10 sobre la liberación de LH en cultivos celulares o en fragmentos de hipófisis dio lugar a un conjunto de diferentes resultados, en ocasiones contradictorios, cuestionando la relevancia de una posible función del sistema *kiss1/kiss1r* a nivel hipofisario^{39, 41-43}. En claro contraste, los resultados de nuestros ensayos *in vitro* demuestran por primera vez que la kp-10 actúa de forma directa sobre una subpoblación de células gonadotropas y somatotropas en cultivo, provocando un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y consecuentemente, un significativo incremento de la liberación de LH y GH. Por ello, el conjunto de nuestros datos indica de forma inequívoca que *kiss1r* se expresa a nivel hipofisario, se traduce en una proteína

funcional y puede transducir la acción de la kp-10, ocasionando una respuesta celular consistente y medible.

La observación, mediante ensayos de cinética de la $[Ca^{2+}]_i$, de que tan solo una parte de la población de células gonadotropas responden al tratamiento con kp-10 puede explicar el moderado efecto estimulador ejercido por el decapeptido sobre la liberación de LH en cultivos de células adenohipofisarias. La administración de GnRH durante 30 min sólo y/o combinado con kp-10 nos permitió observar que únicamente en los cultivos adenohipofisarios de ratas macho, la kp-10 fue capaz de potenciar el efecto estimulador de GnRH. Nuestros resultados concuerdan con lo publicado previamente por Navarro *et al.*, que demuestra en diferentes modelos un efecto liberador de LH por la kp-10 en cultivos de hemihipófisis ^{41, 42}. Además, un estudio posterior realizado sobre células de hipófisis ovina también demuestra un aumento de la secreción de LH tras una incubación de tres horas con kp ¹⁸⁴, y más recientemente, estudios realizados en cultivos celulares de adenohipófisis de terneros y de cerdo concluyen que la kp-10 también estimula la liberación de LH ⁷⁰. Sin embargo, y en contraste con lo anterior, no se ha observado ningún efecto de la kp-10 sobre la liberación de LH en cultivos celulares de hipófisis de ratas hembra adultas ³⁹ o en incubaciones de fragmentos de hipófisis de ratas macho adultas ⁴³. Parece entonces razonable sugerir que las células gonadotropas de ratas peripuberales pueden ser especialmente sensibles a la acción directa de la kp-10, y que por lo tanto, la edad, y posiblemente el género del animal puedan determinar la respuesta de las células gonadotropas al tratamiento con kp-10. Aunque para esclarecer definitivamente este punto será necesario realizar análisis más detallados, nuestros resultados sobre los cambios en la expresión de kiss1r durante el desarrollo postnatal parecen apoyar esta idea.

Por otra parte, estudios recientes indican que las diferencias observadas acerca del efecto *in vitro* de la kp-10 a nivel hipofisario podrían deberse, además de a la edad y a los diferentes parámetros experimentales empleados, a los distintos estadios del desarrollo o del ciclo estral analizados. Así, en ovejas, los cultivos primarios de hipófisis muestran una elevada secreción de LH en respuesta a kp sólo en las muestras tomadas durante la fase folicular del ciclo ⁶⁹, mientras que no se observó respuesta en células

obtenidas durante la fase luteínica o en ovejas OVX⁶⁹. De forma similar, se ha descrito que la sensibilidad a dosis bajas de kp es máxima en células de ratas en diestro¹⁸⁵. Por otro lado, el efecto *in vivo* de las kps sobre la liberación de LH en mujeres es mayor durante la fase preovulatoria y menor en la fase folicular del ciclo menstrual¹⁸⁶. Así pues, el conjunto de datos disponibles sugiere que la sensibilidad de las células hipofisarias a la acción de la kp-10 depende del momento del desarrollo postnatal así como del ambiente esteroideo en que se encuentre el animal. En este sentido, el estadio peripuberal de las ratas utilizadas en nuestro estudio parece conferir a las células una mayor sensibilidad a la acción de las kps que la observada en otras edades y condiciones. Como se discutirá más adelante, el papel de los esteroides sexuales, de acuerdo con nuestros resultados, parece resultar decisivo en esta sensibilidad.

Nuestros resultados demuestran que, además de actuar de forma directa sobre las células gonadotropas, la kp-10 también incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ en células somatotropas, algo que resultó inesperado, aunque no sorprendente, ya que en estudios previos se han descrito diferentes péptidos que ejercen acciones similares sobre estos dos tipos celulares. Tal es el caso del PACAP, que estimula tanto células gonadotropas como células somatotropas en distintas especies¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Este hallazgo refuerza la conocida vinculación funcional existente entre estos dos tipos celulares, cuyos productos hormonales y cuya regulación muestran una estrecha interacción a distintos niveles en determinados momentos del desarrollo postnatal.

Por otro lado, el análisis de las respuestas de estos tipos celulares demostró que la kp-10 provoca cinéticas de la $[Ca^{2+}]_i$ con dos perfiles diferentes, perfil tipo pico y tipo plateau, en ambos casos. Estas distintas cinéticas pueden estar relacionadas con la activación de diferentes cascadas de señalización en un mismo tipo celular, como se ha descrito previamente en el caso de las respuestas de las células somatotropas porcinas a PACAP y a GHRH¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

El análisis de los resultados obtenidos demuestra que, de acuerdo con su capacidad para inducir un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en células somatotropas, la kp-10 estimula la secreción de GH en cultivos de células adenohipofisarias de ratas peripuberales. De manera similar a lo observado en las células gonadotropas, la proporción de células

somatotropas que muestra un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al tratamiento con kp-10 es relativamente baja, lo que puede explicar que su efecto estimulador sobre la liberación de GH sea inferior al causado por GHRH, y que la kp-10 no potencie el efecto estimulador de GHRH. Estudios más recientes, realizados sobre cultivos celulares de hipófisis de vaca, han confirmado que las células somatotropas responden al tratamiento con kp-10 con una liberación de GH ^{70, 192}, y además han demostrado que la kp-10 estimula la liberación de prolactina en esta especie ⁷⁰.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio y los de otros autores apoyan la idea de que las kisspeptinas, en determinados momentos de la vida del animal pueden complementar la reconocida acción estimuladora de la kp sobre la liberación de gonadotropinas vía GnRH ^{182, 183} mediante una acción directa a nivel hipofisario. Teniendo en cuenta que las kps están presentes en regiones hipotalámicas típicamente reguladoras de la actividad hipofisaria y que se han detectado niveles apreciables de kps en la circulación portal ⁶⁹, es razonable pensar que estos péptidos puedan contribuir a la regulación de esta glándula como nuevos péptidos hipofisiotrópicos, no sólo en el caso de las gonadotropas, sino también en el de las somatotropas ¹⁹³. Además, puesto que ambos genes, *kiss1* y *kiss1r*, se expresan en hipófisis de ratas peripuberales, cabría también la posibilidad de que se establezca un bucle autocrino/paracrino funcional (Fig 1). Con todo, la potencial relevancia fisiológica de los efectos que ejercen las kps sobre una subpoblación de somatotropas y gonadotropas está aún por determinar. El hecho de que los ratones carentes de *kiss1* o *kiss1r* no muestren defectos evidentes en la respuesta hipofisaria a GnRH, o que no presenten problemas obvios de crecimiento no invalida la posibilidad de que las kps puedan cumplir funciones moduladoras y/o reguladoras importantes para el correcto funcionamiento de gonadotropas y somatotropas en periodos concretos de la vida del animal.

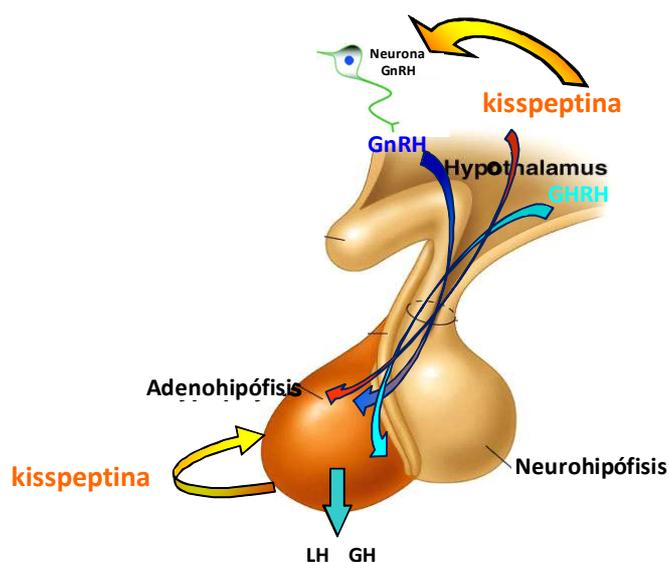


Fig 67. Diagrama simplificado que muestra las posibles vías de acción de las kps sobre las células adenohipofisarias. Las kps hipotalámicas además de actuar sobre las neuronas GnRH, podrían actuar también como neuropéptidos hipofisiotrópicos sobre una subpoblación de células hipofisarias que incluye gonadotropas y somatotropas.

1.2. Regulación de la acción del sistema kiss1/kiss1r por esteroides sexuales en la adenohipófisis.

Está claramente establecido que existe una conexión entre en la secreción de GH y el estado reproductivo, que es especialmente estrecha en momentos tales como la pubertad, y que esta correlación implica procesos de regulación a nivel hipotalámico, hipofisario y gonadal, en los que juegan un papel destacado los esteroides sexuales¹⁹⁴. Sin embargo, los mecanismos moleculares y celulares que median la relación entre los ejes somatotrópico y gonadotrópico no son del todo conocidos. Igualmente, es bien sabido que ambos ejes están a su vez interrelacionados con el estado metabólico del individuo. En este contexto, resulta significativo que diferentes estudios realizados en los últimos años hayan propuesto al sistema kiss1/kiss1r como un potencial integrador de los ejes metabólico y reproductor, así como lo es que las kps puedan actuar, como aquí se demuestra, tanto sobre la secreción de LH como de GH. Por todo ello, nos propusimos analizar las posibles interacciones entre estos tres ejes reguladores, analizando distintas condiciones experimentales susceptibles de influir de manera global en tales interacciones, para lo cual seleccionamos como punto de partida el estudio del efecto de los esteroides sexuales.

En efecto, datos recientes demuestran que los esteroides sexuales regulan la expresión de *kiss1* en el hipotálamo de mujeres⁶², monos^{61, 62}, ratas⁴⁰, ratones^{63, 64} y ovejas^{59, 65}. Por tanto, una vez demostrada la acción directa de kp-10 sobre células somatotropas y gonadotropas, decidimos analizar si el E2 también regula el sistema *kiss1/kiss1r* a nivel hipofisario. Para ello, estudiamos la acción de la kp-10 sobre células adenohipofisarias en cultivo en situaciones experimentales de ausencia o presencia de E2. Por un lado, utilizamos adenohipófisis de ratas hembra peripuberales, en las que la producción endógena de E2 es ya relevante pero aún baja. Por otro lado, estudiamos una situación drástica de presencia o ausencia de E2, empleando ratas adultas OVX, a uno de cuyos grupos se les proporcionó un tratamiento de reemplazamiento hormonal mediante la implantación de una capsula de E2 (OVX E2), mientras que al otro se les implantó una cápsula vacía (OVX VEH). Las células adenohipofisarias procedentes tanto de las ratas peripuberales como de las ratas adultas se mantuvieron en cultivo durante 48 h en medio en presencia o ausencia de E2 (ver detalle del diseño experimental en apartado 4.5.2.).

Esta aproximación mostró que la presencia de E2 en el medio de cultivo produce un aumento del porcentaje de células somatotropas que responden al tratamiento con kp-10 mostrando un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, tanto en los cultivos adenohipofisarios procedentes de ratas peripuberales como en los de ratas OVX. En cambio, en estos mismos cultivos no se alteró la proporción de células gonadotropas que respondieron a kp-10 tras la incubación en presencia de E2. Estos datos indican que el ambiente esteroideo puede facilitar la acción de la kp-10 a nivel hipofisario, y que lo hace de forma diferencial, sensibilizando a las somatotropas, pero no a las gonadotropas, a la acción de la kp-10.

Inesperadamente, el efecto sensibilizador ejercido por el E2 a nivel celular (reflejado en aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$), no se tradujo en un incremento de la capacidad estimuladora de la kp-10 sobre la secreción de GH. Esto sugiere, por una parte, que los niveles endógenos de E2 en ratas peripuberales serían ya suficientes para que la kp-10 desarrolle su máxima capacidad estimuladora sobre la secreción de GH y LH. Pero, además, estos datos también permiten proponer que el sistema *kiss1/kiss1r* debe realizar otras funciones a nivel hipofisario, distintas al control de la secreción hormonal que aún están por esclarecer.

El efecto facilitador del E2 sobre la acción de la kp-10 fue más evidente en el caso de las células adenohipofisarias de ratas adultas OVX VEH, pues se observa que la presencia de E2 en el medio es necesaria para que la kp-10 ejerza una acción estimuladora sobre la liberación de LH, y potencia además el efecto estimulador de la kp-10 sobre la secreción GH.

Sin embargo, es probable que esta acción del E2 sea compleja, y dependa de la concentración y el tiempo de exposición, ya que en ratas OVX E2, la exposición prolongada de la hipófisis a una elevada concentración de E2 parece causar un efecto contrario al que cabría esperar, pues en las células gonadotropas de estos animales el tratamiento con kp-10 reduce inesperadamente los niveles basales de LH (ya de por sí anormalmente bajos), mientras que en las células somatotropas esta exposición prolongada a E2 parece desensibilizarlas a la acción de la kp-10, que no modifica los niveles basales de GH.

En resumen, el conjunto nuestros resultados indica que la presencia de E2 en el medio capacita a las células adenohipofisarias para responder al tratamiento con kp-10, y lo hace de forma diferencial aumentando la sensibilidad de las células somatotropas a dicho tratamiento. El hecho de que los esteroides sexuales no solo regulen la expresión de *kiss1* a nivel hipotalámico sino que también modulen la acción de la kp-10 a nivel hipofisario, refuerza la posibilidad de que el sistema *kiss1/kiss1r* participe en la integración funcional de los ejes reproductor y somatotrópico, y apoya nuestra idea inicial de que este sistema puede ejercer otras funciones relevantes en la hipófisis, además de la regulación de la secreción hormonal.

1.3. Regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en la adenohipófisis.

Expresión de *kiss1/kiss1r* en la adenohipófisis de rata durante el desarrollo postnatal.

Una de las propiedades que caracterizan a un sistema como potencialmente relevante desde un punto de vista fisiológico es, junto con su capacidad para regular la función de una diana (ej. secreción hormonal), la de ser regulado por factores fisiológicamente importantes (ej. desarrollo postnatal, esteroides sexuales,

condiciones metabólicas, reguladores hipotalámicos, etc.). En este sentido, el análisis de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* a nivel adenohipofisario durante el desarrollo postnatal de la rata reveló que los niveles de ARNm de ambos genes fluctúan de forma considerable a lo largo del tiempo y lo hacen de forma diferente según el sexo del animal y el gen que se considere. Así, mientras que los niveles máximos de ARNm del receptor aparecen muy pronto durante el periodo neonatal, el día 1 en machos y el día 2 en la hipófisis de ratas hembra, el nivel máximo de expresión de *kiss1* también se alcanza en este periodo (día 1) en machos, pero aparece más adelante, el día 30, en hembras, coincidiendo por tanto con el inicio de la pubertad. Esta última observación coincide además con los estudios de expresión realizados durante el desarrollo postnatal a nivel hipotalámico, en los que se han observado niveles máximos de ARNm de *kiss1* y *kiss1r* en el inicio de la pubertad, en este caso no sólo en ratas hembra sino también en macho⁴⁰. El aumento de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el inicio de la pubertad de ratas hembra tanto en el hipotálamo como en la hipófisis, sugiere que dicho sistema puede contribuir a la activación del eje gonadotrópico en este momento del desarrollo. En apoyo de esta idea, estudios funcionales llevados a cabo *in vivo* han demostrado que la administración central de kp-10 en ratas prepuberales incrementa notablemente los niveles plasmáticos de LH en esta edad temprana, siendo los niveles absolutos más elevados en el caso de la hembra que en el macho⁴⁰. Parece lógico especular que el dimorfismo sexual de la expresión de *kiss1* en hipófisis durante el periodo peripuberal, y concretamente la presencia de niveles más elevados en la rata hembra y muy bajos en macho, podrían contribuir a mantener niveles de LH más altos en hembras respecto a machos.

De particular interés nos pareció la observación de que la expresión de *kiss1* y *kiss1r* en hipófisis de rata varía de forma notable y brusca durante el periodo postnatal temprano. Ello sugiere que el sistema *kiss1/kiss1r* puede ser un factor relevante para la función de las células hipofisarias durante el desarrollo perinatal. La comparación de nuestros datos con estudios ontogénicos de expresión de componentes del eje somatotrópico (GHRH-R y GHS-R) y del eje gonadotrópico (GnRH-R), puso de manifiesto la existencia de una similitud entre los perfiles de expresión del sistema *kiss1/kiss1r* y de GHRH-R y GHS-R, pero no con el perfil ontogénico de GnRH-R. Así,

estudios de expresión en hipófisis de rata muestran que los niveles más elevados de ARNm de GHRH-R y GHS-R aparecen en los días 1 y 30 tanto en ratas macho como en hembra^{195, 196}. Sin embargo, los estudios expresión de GnRH-R a nivel hipofisario muestran que los niveles de ARNm de este receptor alcanzan el pico máximo a los 20 días en ratas hembra, y en ratas macho alcanzan el máximo en la pubertad^{197, 198}.

Las marcadas diferencias observadas entre los perfiles de expresión de *kiss1* y *kiss1r* durante el periodo perinatal y el resto de los periodos del desarrollo postnatal analizados, nos llevó a realizar una serie de ensayos preliminares para comprobar si estas diferencias poseían una consecuencia funcional detectable. En efecto, mediante estudios de microfluorimetría pudimos observar que el porcentaje de células gonadotropas que aumentan la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al tratamiento con kp-10 es aparentemente superior en ratas de 1 día que en las de 5 días, tanto en cultivos procedentes de ratas macho como en hembras. De forma similar, en ratas hembra, el porcentaje de células somatotropas que responden a kp-10 es mayor en ratas de 1 día. Es preciso recordar que los estos datos deben tomarse con cautela hasta tanto se cuente con un mayor número de observaciones, algo técnicamente complicado por el reducido tamaño de las glándulas y la dificultad de obtener un número suficiente de las mismas de forma simultánea. Pese a ello, resulta llamativo que estas observaciones iniciales concuerden de forma tan clara con los resultados de los estudios de ontogenia, en los que los niveles máximos de expresión de *kiss1* y *kiss1r* de ratas macho, y de *kiss1r* de ratas hembra aparecen en el periodo neonatal. Como excepción, el porcentaje de células somatotropas que responden a kp-10 en los cultivos adenohipofisarios de ratas macho es mayor en animales de 5 días, lo que hace pensar que los elevados niveles de expresión de *kiss1r* observados en los estudios de ontogenia en el periodo perinatal podrían corresponder de forma predominante a la población de células gonadotropas. Obviamente, para comprender mejor estos cambios, sería muy interesante complementar nuestros estudios en el futuro mediante análisis inmunocitoquímicos donde se detecte la presencia de *kiss1* y *kiss1r* en somatotropas y gonadotropas durante este periodo perinatal, algo también difícil de llevar a cabo dada la escasez de anticuerpos fiables para ambas proteínas. En todo caso, consideramos que el conjunto de nuestros resultados sobre la expresión de

ambos genes y la diferente sensibilidad de las células a kp-10 proporcionan pruebas suficientes para proponer que el sistema kiss1/kiss1r puede contribuir a la regulación a nivel hipofisario del eje gonadotrópico, y quizás también somatotrópico, durante el desarrollo temprano de la rata.

Regulación de la expresión de kiss1/kiss1r por kp-10, GnRH y GHRH en cultivos de células adenohipofisarias de rata.

La respuesta de las células adenohipofisarias a sus reguladores depende no sólo de la concentración de éstos que alcanza la célula en un determinado momento, sino también de la cantidad de receptores disponibles para cada regulador en la superficie celular. Por ello, la expresión de los receptores y, en su caso, de sus ligandos, constituye un importante punto de control donde ejercen también su acción los factores hipotalámicos. En el presente trabajo, los estudios sobre la regulación homóloga, es decir, por kp-10, y heteróloga (por GHRH y GnRH), de la expresión del kiss1 y kiss1r mostraron que este sistema está sujeto a un control muy específico, dependiente tanto del tipo de regulador como del sexo del animal. De hecho, observamos que el tratamiento con kp-10 aumenta el nivel de ARNm de *kiss1* en cultivos de células adenohipofisarias de ratas macho peripuberales, pero no en hembras, lo que demuestra que las kps pueden regular, de forma homóloga, su propia expresión en la hipófisis, y que esta regulación es dependiente del sexo. Más aún, mientras que el tratamiento con GnRH no afectó por sí solo a la expresión de *kiss1*, su administración conjunta con kp-10 eliminó el efecto estimulador de ésta, lo que, asumiendo una acción directa de ambos péptidos sugiere que el aumento de expresión inducido por la kp-10 ocurre a nivel de las gonadotropas.

Pero, además, la kp-10 aumenta los niveles de expresión de GHRH-R en cultivos de adenohipófisis de ratas tanto macho como hembra peripuberales, lo que confirma la capacidad de las kps para actuar sobre las somatotropas, y pone de manifiesto que su acción reguladora sobre el eje somatotrópico no se limita sólo a aumentar la secreción de GH, sino que también se extiende al control de la expresión del receptor del principal estímulo de las somatotropas, cuyo incremento es probable que favorezca una mayor respuesta posterior a GHRH.

Por su parte, el tratamiento con GHRH estimuló la expresión de *kiss1* tanto en células adenohipofisarias de ratas macho como de hembra, siendo su acción en éstas últimas bloqueada en presencia de kp-10: Estos resultados sugieren, por un lado, que *kiss1* se expresa, además de en gonadotropas, en somatotropas, donde es regulado por GHRH, y por otro, que en este tipo celular también existe un marcado dimorfismo sexual en la regulación del sistema *kiss1/kiss1r*. En línea con esta idea, la GHRH aumenta niveles de ARNm de *kiss1r* en cultivos de células adenohipofisarias de ratas hembra peripuberales, pero no en macho. Además, como cabía esperar, la GHRH redujo los niveles expresión de su propio receptor, GHRH-R, mediante un marcado efecto inhibitor que incluso bloquea por completo la estimulación inducida por la kp-10 sobre la expresión de este receptor. Así pues, nuestros resultados indican que la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* está regulada de forma heteróloga por el factor hipotalámico GHRH, principal estímulo del eje somatotrópico, y que ésta regulación varía en función del género.

El tratamiento con GnRH confirmó el inequívoco dimorfismo sexual de la regulación del sistema *kiss1/kiss1r* en hipófisis, puesto que la administración de esta hormona sólo aumentó los niveles de ARNm de *kiss1r* en cultivos celulares de ratas hembra. Más aún, en estas células, la administración combinada de GnRH con kp-10 bloqueó la estimulación inducida por GnRH, mientras que el mismo tratamiento conjunto estimuló notablemente la expresión de *kiss1r* en células de ratas macho, en las cuales ninguno de los dos péptidos por separado modificó dicha expresión. De acuerdo con estos resultados, estudios previos de expresión realizados en hipófisis de ratas adultas indican que la GnRH estimula la expresión de *kiss1r* en hipófisis ⁷¹, y muestran además que la presencia de kp-10 modula el efecto regulador de GnRH de una forma dependiente de género. Por otro lado, tanto en células de ratas macho como de hembra, la administración de GnRH aumentó la expresión de GnRH-R, efecto que no se vio alterado por la presencia de kp-10. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran que la propia GnRH es el principal regulador de la expresión de su receptor, y que dicha expresión disminuye tras la eliminación de la secreción endógena de GnRH y aumenta por la administración de GnRH ^{199, 200}.

Así pues, el conjunto de nuestros resultados demuestra que la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en cultivos de células adenohipofisarias de ratas peripuberales

está sujeto a una regulación sutil, específica, y fuertemente dependiente del género, que implica tanto un control homólogo como otro heterólogo, ejercido por los dos factores primordiales en la regulación de somatotropas y gonadotropas, cuyos receptores son, a su vez, susceptibles de ser modulados por las kps. Estas observaciones refuerzan la posibilidad de que el sistema *kiss1/kiss1r* ejerza una función reguladora relevante a nivel hipofisario, donde podría actuar como integrador de los ejes somatotrópico y gonadotrópico.

Regulación de la expresión de *kiss1/kiss1r* por esteroides sexuales en cultivos de células adenohipofisarias de rata.

La regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* por esteroides sexuales a nivel hipotalámico ha sido objeto de intensos análisis en los últimos años en distintas especies animales. Estos estudios se han centrado especialmente en detallar cómo el E2 regula de forma diferencial la expresión de *kiss1* en los núcleos ARC y AVPV, dos puntos críticos para el control integrado de la producción de GnRH. Así, en roedores se ha descrito que las neuronas *kiss1* del núcleo ARC están implicadas en la retroalimentación negativa de la secreción de gonadotropinas inducida por E2, mientras que las neuronas *kiss1* del núcleo AVPV contribuyen a la retroalimentación positiva por E2 de la secreción de gonadotropinas^{63, 201}. En nuestros estudios sobre ratas hembra peripuberales, los niveles de ARNm tanto de *kiss1* como de *kiss1r* aumentaron tras el tratamiento con kp-10 sólo en los cultivos celulares mantenidos en presencia de E2, pero no en células cultivadas en ausencia de esteroides. Estos datos indican que la presencia de esteroides sexuales es un requisito para la regulación homóloga positiva del sistema *kiss1/kiss1r* en hipófisis, lo que concuerda con el papel en general facilitador que ejerce el E2 sobre la capacidad de la kp-10 para estimular la secreción hormonal, mostrado en este mismo estudio. En consonancia con la idea de que el E2 es importante para el estatus del sistema *kiss1/kiss1r* en hipófisis, se ha descrito que la ovariectomía provoca en ratas adultas una marcada reducción en los niveles de ARNm de *kiss1* a nivel hipofisario, que se restauran tras la inyección de E2, pero no tras la administración de un agonista o antagonista de GnRH⁷¹. Por tanto, los resultados disponibles, incluidos los aquí presentados, confirman que los niveles circulantes de estrógenos también contribuyen a definir y regular la expresión de *kiss1*

y *kiss1r* en hipófisis, donde parecen actuar en el mismo sentido positivo que lo hacen sobre las neuronas *kiss1* en el núcleo AVPV hipotalámico, o como se ha descrito *in vitro* en la línea celular GT1-7, derivada de neuronas GnRH²⁰².

En línea con lo anterior y con lo descrito previamente acerca del efecto positivo diferencial del E2 sobre la sensibilidad de las células somatotropas y gonadotropas a la kp-10 en términos funcionales, el estudio de la expresión de GHRH-R, GHS-R y GnRH-R en cultivos de células adenohipofisarias de ratas hembra peripuberales reveló una respuesta diferencial a kp-10, dependiente tanto del E2 como del tipo celular. Así, mientras que la expresión de GnRH-R no varió tras el tratamiento con kp-10 ni en presencia ni en ausencia de E2, los niveles de ARNm de GHS-R y GHRH-R sí aumentaron en respuesta a kp-10, pero sólo en los cultivos mantenidos con E2, mostrando pues el mismo perfil de expresión que el observado para el sistema *kiss1/kiss1r*. Estos datos indican que la incubación de los cultivos adenohipofisarios con E2 confiere a las células la capacidad de responder al tratamiento con kp-10, aumentando no sólo la expresión de *kiss1* y *kiss1r*, sino también, y de forma dependiente de tipo celular, la de GHS-R y GHRH-R, por lo que el E2 podría contribuir a sensibilizar a las células somatotropas a sus principales reguladores. Estos resultados coinciden y refuerzan las observaciones realizadas sobre el efecto del E2 en la acción directa de la kp-10 en células adenohipofisarias en cultivo mediante medidas de la secreción hormonal y de la cinética de la $[Ca^{2+}]_i$, al indicar que la presencia de esteroides sexuales faculta a las células hipofisarias a responder mejor a kp-10 y lo hace de forma diferencial, aumentando especialmente la sensibilidad de las células somatotropas. Más aún, esta respuesta de las somatotropas a la kp-10 en presencia de E2, aumentando la expresión de GHRH-R y GHS-R, podría ayudar a comprender mejor la falta de correlación que se describió anteriormente entre el aumento de respuestas a kp-10 que provocaba el E2 en términos de $[Ca^{2+}]_i$ y la ausencia de un aumento correspondiente en la secreción de GH en respuesta a kp-10.

Expresión de *kiss1/kiss1r* en adenohipófisis de ratón bajo distintas condiciones metabólicas.

Para profundizar en el estudio de la regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* a nivel hipofisario, y analizar su posible papel como integrador de las señales metabólicas y los ejes somatotrópico y gonadotrópico, evaluamos el impacto

que producen algunos reguladores metabólicos esenciales, así como cambios en los niveles energéticos, en la expresión de *kiss1r* a nivel hipofisario, empleando para ello muestras procedentes de ratones mantenidos bajo distintas condiciones metabólicas.

Los resultados más significativos de este análisis demuestran que, mientras que la ausencia de leptina (ratones *ob/ob*) no modifica por si misma los niveles de expresión de *kiss1r* en la hipófisis de ratón, el reemplazamiento con leptina en ratones *ob/ob* sí provoca un aumento de los niveles hipofisarios de ARNm de *kiss1r*. Esta observación concuerda claramente con los resultados obtenidos en muestras de hipotálamo procedentes de estos mismos ratones, en los que la ausencia de leptina no altera la expresión de *kiss1r* con respecto a animales normales ⁸³, pero en los que el reemplazamiento con leptina también produce un incremento de la expresión de *kiss1r* (y de *kiss1*) en comparación con los niveles de ARNm de animales PF ⁸³. De hecho, este mismo estudio demuestra que la leptina, pero no la insulina o el IGF-1, estimula la expresión de *kiss1* en la línea celular hipotalámica de ratón N6 ⁸³, sugiriendo así que el papel fisiológico de la leptina está fundamentalmente relacionado con la prevención de la caída de los niveles de expresión de *kiss1* y *kiss1r* en el estado de desnutrición más que con la estimulación de la expresión de *kiss1* en condiciones de abundancia energética. En relación con esto, un estudio realizado con una línea celular similar a las neuronas GnRH hipotalámicas humanas (FNC-B4), muestra que la leptina y las hormonas sexuales están implicadas en la regulación diferencial de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en este tipo celular ²⁰³. En conjunto, estas observaciones junto con nuestros datos indican que la leptina, un regulador clave del estado metabólico, controla la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* no sólo a nivel hipotalámico sino también a nivel hipofisario, donde a su vez este sistema puede modular diferencialmente la función de somatotropas y gonadotropas. Todo ello refuerza la hipótesis de que el tándem *kiss1/kiss1r* puede actuar como un integrador del metabolismo, la función reproductora y el eje somatotrópico a distintos niveles.

En apoyo de esta idea, nuestros análisis demuestran que la obesidad inducida por la dieta (HFD) disminuye la expresión de *kiss1r* en hipófisis con respecto a los ratones alimentados de forma normal (LFD), algo que contrasta con la ausencia de cambios observados en el hipotálamo de estos mismos ratones ⁸³. En cambio, y también a diferencia de lo que sucede en hipotálamo, donde el ayuno disminuye de los niveles de

expresión de *kiss1* y *kiss1r* tanto en ratón⁸³ como en rata^{81, 98}, el ayuno, incluso severo (48 h), no modificó la expresión de *kiss1r* en hipófisis. Esto sugiere que la regulación de la expresión de *kiss1r* por la ingesta en la hipófisis es en general opuesta a la del hipotálamo, de forma que en hipófisis sus niveles se reducen en situaciones de exceso energético, pero se mantienen inalterados en situaciones de insuficiencia energética. En todo caso, nuestros resultados demuestran que la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* está regulada en hipófisis de ratón por diferentes factores metabólicos y señales de balance energético, y que lo está de un modo distinto al del hipotálamo. Por tanto, parece razonable pensar que este sistema podría funcionar en la integración de señales del balance energético, el metabolismo, y los ejes somatotrópico y reproductor tanto a nivel hipofisario como a nivel hipotalámico.

Así pues, el análisis de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en cultivos celulares adenohipofisarios de rata y en hipófisis de ratón ha permitido identificar y caracterizar distintos factores que pueden contribuir a regular la actividad y el funcionamiento de este sistema en la hipófisis (Fig. 68). Nuestros datos indican que la expresión de *kiss1/kiss1r* está sujeta a una regulación muy sutil por diferentes factores, como son: el estadio del desarrollo postnatal, la propia kp-10, factores hipotalámicos, el estradiol y diferentes condiciones metabólicas. En todos los casos, el patrón de regulación del sistema *kiss1/kiss1r* presenta un mayor paralelismo con el patrón de regulación del eje somatotrópico que con el del eje gonadotrópico. Estos datos permiten sugerir la existencia de una compleja interacción entre señales metabólicas, somatotrópicas y sexuales, que en conjunto regulan la acción del sistema *kiss1/kiss1r* a nivel hipofisario.

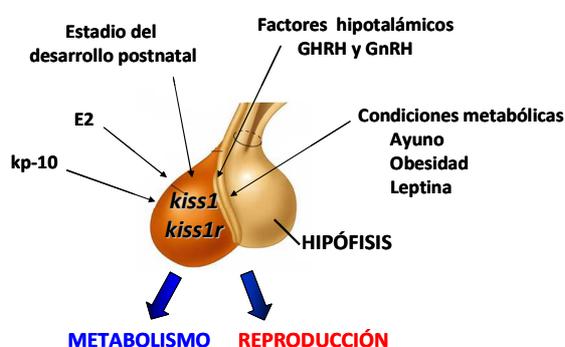


Fig. 68. Factores implicados en la regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en la adenohipófisis.

2. Regulación de la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en dianas externas al eje hipotálamo-hipofisario en la rata y el ratón.

Lo expuesto hasta aquí, junto con la información de otros estudios, demuestra que el sistema *kiss1/kiss1r* está presente y tiene capacidad funcional tanto a nivel hipotalámico como a nivel hipofisario, donde además su expresión está regulada por diferentes factores, como los esteroides sexuales, el desarrollo postnatal, el estatus energético y factores metabólicos. A su vez, numerosas evidencias demuestran que existe un control integrado entre el balance energético y la función reproductora^{204, 205}, que está mediado por una serie de señales que actúan no sobre un único órgano, sino a distintos niveles, a lo largo de todo el eje neuroendocrino-metabólico, gobernando la ingesta de nutrientes, la homeostasis energética, el metabolismo y la fertilidad. Un ejemplo claro de este tipo de señales lo constituye la leptina, que opera como un regulador pleiotrópico actuando principalmente a nivel hipotalámico, pero también sobre hipófisis y gónadas^{205, 206}; la adiponectina, cuya expresión se ha detectado en testículo, ovario e hipófisis²⁰⁷⁻²⁰⁹; y la ghrelina, cuya expresión y la de su receptor se ha detectado, además de en estómago, hipotálamo e hipófisis, en testículo de rata²¹⁰. Por todo ello, nos planteamos si el sistema *kiss1/kiss1r* podría contar con órganos diana adicionales, relacionados con sus acciones en hipotálamo e hipófisis, donde ejercer y completar su acción. Con el objetivo de identificar estos posibles órganos diana y contribuir a esclarecer si las kisspeptinas también representan una señal integradora de los ejes reproductor, somatotrópico y metabólico, estudiamos su expresión en muestras de testículo y de tejido adiposo de rata y ratón .

2.1. Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el testículo.

Una serie de estudios han descrito la expresión de los genes *kiss1* y/o *kiss1r* en diferentes tejidos periféricos, como el ovario y el testículo^{6, 8}, donde la función de este sistema permanece poco explorada. En un estudio reciente se ha descrito que en el ovario de la rata los niveles de ARNm de *kiss1* fluctúan a lo largo del ciclo estral, y documentan la capacidad del pico preovulatorio de LH para inducir la expresión de *kiss1* en este periodo. Esto sugiere que la kp producida de forma local ejerce un papel

en el control de la ovulación ⁸⁵. También se ha detectado la expresión diferencial de *kiss1* y *kiss1r* en ovario durante ciclo estral y el fotoperiodo en hámster Siberiano ²¹¹.

Sin embargo, no se había realizado hasta el momento ningún estudio detallado sobre la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el testículo. En los últimos años se ha demostrado que diferentes factores con papeles clave en el control del eje somatotrópico (GHRH e IF-1) y en la homeostasis del peso corporal (leptina) están potencialmente implicados en la regulación de la función testicular ²¹²⁻²¹⁴. Por ello, evaluamos su perfil de expresión y su regulación a este nivel, y así determinar del papel de la kp producida localmente en la fisiología del testículo y su posible papel integrador del eje metabólico y reproductor.

Nuestros resultados sobre el análisis de expresión durante el desarrollo postnatal en testículo de rata indican, que los niveles máximos de ARNm de *kiss1* y *kiss1r* aparecen en animales de 15 días. En este momento del desarrollo se produce la aparición de la población adulta de células de Leydig, que sustituye a la población fetal, así como la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli ²¹⁵. Esto nos hace pensar que las kps producidas de forma local podrían estar implicadas en el control del desarrollo testicular. Sin embargo, sería necesaria la identificación de los tipos celulares que expresan estos genes para determinar el papel fisiológico del sistema *kiss1/kiss1r* a este nivel.

Por otro lado, nuestro estudio sobre la influencia de diferentes condiciones metabólicas en la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en testículo de ratón muestra que en condiciones de ayuno severo, se produce un aumento de los niveles de ARNm de ambos genes. Este aumento de expresión, podría considerarse como un mecanismo compensador para el correcto desarrollo de la función reproductora en situaciones metabólicas desfavorables. Además, se observan distintos perfiles de expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en situaciones de ayuno a nivel testicular, hipofisario e hipotalámico. Esto indica una regulación diferencial de este sistema, y que por tanto su función varía dependiendo del órgano.

En ratones obesos *ob/ob*, el tratamiento con leptina aumenta de forma significativa los niveles de ARNm de *kiss1* y *kiss1r*. Estudios previos proponen un efecto

inhibidor de la leptina en la esteroidogénesis testicular en roedores y humanos^{40, 216-218}. Por ello sería necesario y de gran interés realizar nuevos experimentos que permitieran determinar si el sistema *kiss1/kiss1r* está o no implicado en este proceso, y profundizar en el estudio de la función de este sistema en testículo.

Por último, observamos que los niveles de ARNm de *kiss1* y *kiss1r* no se modifican en condiciones de obesidad inducida por la alimentación con una dieta rica en grasa, HFD. Esto coincide con los perfiles de expresión de estos genes observados en muestras de hipotálamo de estos mismos ratones⁸³, donde además se observaron unos niveles bajos de testosterona. La reducción de estos niveles, podría explicarse por el efecto inhibidor de la leptina en la esteroidogénesis testicular, ya que los niveles de esta adipoquina aumentan en ratones obesos.

El conjunto de nuestros resultados muestra que el sistema *kiss1/kiss1r* se expresa en testículo, que su expresión está regulada por factores metabólicos y a lo largo del desarrollo postnatal, y que esta regulación es diferente a la observada a nivel hipotalámico e hipofisario. Estas observaciones refuerzan la idea de que el sistema *kiss1/kiss1r* actúa como una señal integradora, regulando de forma diferencial distintos sistemas fisiológicos.

2.2. Expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en el tejido adiposo.

En la actualidad, el tejido adiposo se considera como un órgano endocrino implicado en una gran variedad de funciones, que incluyen la regulación del metabolismo y la reproducción²¹⁹. En un estudio reciente se observó que el gen *kiss1* se expresa en tejido adiposo de ratas hembras adultas, que su expresión está regulada de forma diferencial por hormonas sexuales, por la ingesta de alimento y por la obesidad, y que ésta regulación es independiente de hipotálamo, sugiriendo que las kps podrían actuar como adipoquinas o como reguladores locales de la función del tejido adiposo²²⁰.

Nuestros estudios de expresión en tejido adiposo de rata durante el desarrollo postnatal, demuestran la presencia de *kiss1* y *kiss1r* en muestras de grasa visceral y subcutánea. Además, se observa que su perfil de expresión varía en las distintas etapas

del desarrollo analizadas, coincidiendo con cambios en el ambiente esteroideo, y la existencia de un dimorfismo sexual en la regulación del sistema *kiss1/kiss1r*. Esto, junto con observaciones previas que demuestran el papel regulador de los esteroides sexuales sobre la expresión de *kiss1* y *kiss1r* a nivel hipotalámico e hipofisario, nos llevó a analizar el papel del estradiol en la expresión de ambos genes en tejido adiposo. Así, observamos en ratas adultas OVX que los niveles de ARNm de *kiss1* y *kiss1r* disminuyen en presencia de E2 en muestras de grasa visceral, y no se modifican en muestras de grasa subcutánea. Esto demuestra el papel regulador diferencial del E2 sobre la expresión del sistema *kiss1/kiss1r* en tejido adiposo, y confirma las observaciones realizadas por el grupo de Brown *et al.*²²⁰.

A continuación estudiamos el efecto de diferentes condiciones metabólicas en la expresión de *kiss1r* en tejido adiposo de ratón, y pudimos observar que el ayuno durante 24 y 48 h provoca un aumento de los niveles de ARNm de *kiss1r*. Esto coincide con lo observado previamente en ratas hembra adultas, donde los niveles de ARNm de *kiss1* en grasa aumentan tras 18 h de ayuno²²⁰. Por tanto, se produce una regulación del sistema *kiss1/kiss1r* en tejido adiposo en situaciones metabólicas desfavorables, de forma similar a lo observado en muestras de testículo de estos mismos ratones, y diferente a lo observado en hipotálamo e hipófisis. Esta regulación a la baja del sistema *kiss1/kiss1r* en tejido adiposo en situaciones desfavorables, también se observa al analizar los niveles de ARNm de *kiss1r* en muestras de tejido adiposo de ratones obesos HFD. Nuestros resultados coinciden con lo observado previamente en tejido adiposo de ratas hembra HFD²²⁰.

Por último, en ratones *ob/ob* tratados con leptina los niveles de ARNm de *kiss1r* en tejido adiposo son mayores que en ratones control. Esto coincide con lo observado en muestras de testículo, pero no con lo observado en hipófisis e hipotálamo de ratón. Se ha observado recientemente que las neuronas *kiss1* expresan el receptor de la leptina, y que ésta es capaz de normalizar la expresión hipotalámica defectuosa de *kiss1* en modelos de secreción alterada de gonadotropinas, como es el caso de los ratones *ob/ob* y las ratas con diabetes^{84,98}. La leptina, juega por tanto un papel crucial en el control metabólico del sistema *kiss1/kiss1r*, y junto con las neuronas GALP,

POMC, y NPY, las neuronas kiss1 parecen conducir la información sobre los niveles de leptina e insulina hacia el eje reproductor neuroendocrino.

Nuestros datos confirman la presencia del sistema kiss1/kiss1r en tejido adiposo de rata y ratón, e indican que su expresión está regulada a lo largo del desarrollo postnatal y por señales metabólicas. Estas observaciones apoyan el papel del sistema kiss1/kiss1r como vía molecular para la regulación del metabolismo y la función reproductora, un fenómeno con potenciales implicaciones fisiológicas y terapéuticas.

Como conclusión general, los datos de este estudio indican que el sistema kiss1/kiss1r opera a distintos niveles, no solo dentro del eje hipotálamo-hipofisario, sino en dianas externas como testículo y tejido adiposo. La presencia del sistema, y la regulación de su expresión por distintos factores, le confieren un papel coordinador en el control de la función gonadal, e integrador del balance energético y la reproducción. Esta función integradora implica una compleja interacción con otros neuropéptidos hipotalámicos, hormonas metabólicas, niveles energéticos, y esteroides sexuales.

3. Diseño y análisis funcional de nuevos análogos de la kp-10 de rata.

La participación del sistema kiss1/kiss1r a distintos niveles y en funciones de relevancia como el control neuroendocrino de la reproducción, de la metástasis tumoral, de la invasión del trofoblasto, de la reproducción estacional a través del fotoperiodo y su acción como vasoconstrictor, hace muy interesante el diseño de nuevos péptidos con capacidad agonista y/o antagonista de kiss1r, por sus potenciales aplicaciones clínicas y farmacológicas. Así, los agonistas del receptor podrían utilizarse como tratamiento en casos de trastornos en el inicio de la pubertad y para inducir la ovulación, mientras que los antagonistas podrían ser útiles en el tratamiento de la pubertad precoz dependiente de gonadotropinas y como anticonceptivos femeninos. Además, resultaría de especial utilidad el uso de los análogos de kiss1r para la

detección y tratamiento de algunos tipos de cáncer como por ejemplo el cáncer de próstata, el carcinoma de varico, de vesícula biliar y el hepatocarcinoma. Por ello, en este trabajo hemos llevado a cabo el diseño y síntesis de una serie de análogos de la kp-10 de rata, y así poder determinar los requerimientos estructurales que confieren la actividad agonista de kiss1r.

Los estudios sobre la relación entre la estructura y la actividad peptídica constituyen una valiosa herramienta para obtener información crítica en el desarrollo de nuevos análogos de péptidos biológicamente activos con potenciales aplicaciones clínicas. La consistencia de este tipo de estudios aumenta considerablemente mediante la aplicación combinada de otras aproximaciones interdisciplinarias, como en nuestro caso, donde el análisis estructural y los ensayos *in vitro* de la actividad de los análogos de kiss1r, se completan con ensayos funcionales *in vivo* realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Tena-Sempere.

Los resultados de los ensayos *in vitro* realizados para estudiar las características estructurales de los análogos derivados de la kp-10 revelan que los residuos Phe⁶ y Tyr¹⁰ en posición C-terminal son esenciales para la actividad del péptido. Así, hemos examinado tanto poblaciones celulares mediante el sistema FlexStation II, como a nivel de célula individual, y hemos observado que los aa en posición 6 y 10 del decapeptido son residuos críticos para la actividad de la kp-10. El papel del residuo Tyr¹⁰ era esperado, ya que previamente se había descrito la relevancia de este aa en el mantenimiento de la capacidad funcional de la kp^{6, 92, 221}, así como de otros miembros de la familia de péptidos RF-amida, como el péptido estimulador de la secreción de prolactina y el neuropéptido FF, donde el motivo Arg-Phe C-terminal es también crítico en su actividad biológica^{222, 223}. Sin embargo, el reemplazamiento de Phe⁶ por diferentes aa como tirosina, triptófano y fenilalanina, no supone una pérdida de la potencia o eficacia de los péptidos RF-amida²²²⁻²²⁴. En cambio, el reemplazamiento de Phe⁶ por residuos como el ciclohexilalanina, suprime la actividad biológica de la kp-10⁹².

Nuestros resultados completan y amplían los estudios previos que han analizado las características funcionales y farmacológicas de análogos derivados de la kp-10 y kp-13 humana. En estos estudios, el análisis *in vitro* de la hkp-10 revela que los residuos Phe⁶, Lau⁸, Arg⁹ y Phe¹⁰ son esenciales para la actividad del decapeptido^{92, 221}.

Nuestros datos concuerdan con lo descrito previamente, pues encontramos que los residuos Phe⁶ y Tyr¹⁰ de la kp-10 también son cruciales en la activación del receptor. Por el contrario, en nuestro estudio, los residuos Leu⁸ y Arg⁹ no parecen presentar un papel clave. Basándonos en los resultados de los estudios *in vitro*, seleccionamos los análogos [Ala⁶]kp-10 y [Ala¹⁰]kp-10 y evaluamos su efecto sobre la secreción de LH *in vivo*. Concretamente, el análisis sobre el efecto liberador de LH *in vivo* de los compuestos [Ala⁶]kp-10 y [Ala¹⁰]kp-10 confirmó nuestras observaciones iniciales sobre el papel esencial de las posiciones Phe⁶ y Tyr¹⁰ en la capacidad agonista de la kp-10 *in vitro*. Sin embargo, nuestros estudios *in vivo* revelaron algunas diferencias interesantes sobre la relevancia funcional de estos dos residuos. Así, aunque el residuo Phe⁶ de la kp-10 de rata resulta crítico en la activación máxima de kiss1r *in vivo*, no es indispensable para la unión del péptido a su receptor, ya que el análogo [Ala⁶]kp-10 es capaz de estimular significativamente la liberación de LH, en menor magnitud que la kp-10. Estos datos indican su acción como un agonista parcial. Además, incluso una dosis diez veces mayor del análogo [Ala⁶]kp-10 fue incapaz de inhibir el efecto estimulador de la kp-10 exógena, y tampoco fue capaz de suprimir los niveles elevados de LH en ratas orquidectomizadas (ORX), en las que existe un elevado tono de kp⁴⁰. Por tanto, y en contraste con los resultados obtenidos *in vitro* en células CHO-K1-*rkiss1r*, no encontramos evidencias que apoyen el papel del análogo [Ala⁶]kp-10 como antagonista en la acción de las kps *in vivo*. Por otro lado, nuestros resultados *in vivo* confirmaron que [Ala¹⁰]kp-10 carece completamente de actividad, ya que es incapaz de inducir la liberación LH, no previene el efecto secretor de LH de la kp-10, y no afecta a los niveles elevados de LH en ratas ORX tras su administración de forma repetida. Por todo lo anterior y dada la inactividad del análogo [Ala¹⁰]kp-10, para actuar como agonista o antagonista, proponemos que la posición C-terminal del decapeptido puede ser esencial para su unión al receptor, aunque esta sugerencia necesita ser confirmada experimentalmente.

Desde un punto de vista general, estos resultados revelan la importancia de una caracterización integral de los derivados de kp, incluyendo su análisis *in vivo*. En este sentido, resulta interesante señalar que los estudios realizados hasta ahora con los pentapéptidos derivados de la región C-terminal de la kp, han revelado la

conservación aparente de su capacidad en la activación del receptor en modelos celulares, aunque aún no han sido aún analizados en términos de secreción de gonadotropinas. Estos estudios se han centrado fundamentalmente en el descubrimiento y/o diseño de análogos con propiedades superagonistas, que pudieran usarse para rentabilizar la capacidad antimetastásica de la kp. Sin embargo, en el campo de la endocrinología reproductiva ya ha sido demostrada la gran potencia funcional y eficacia de la kp-10 en estudios *in vivo*, por lo que en este campo en particular, sería más valioso obtener compuestos con capacidad antagonista del sistema kiss1/kiss1r.

En resumen, nuestros resultados demuestran que el reemplazamiento del residuo Tyr¹⁰-NH₂ de la kp-10 por un motivo L-Ala-NH₂ suprime la actividad agonista del decapeptido tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que el reemplazamiento del residuo Phe⁶ por L-Ala da lugar a un débil antagonista *in vitro*, que *in vivo* muestra una actividad agonista reducida. Estos datos abren el camino para el futuro diseño y caracterización de nuevos agonistas y/o antagonistas del receptor kiss1r con posibles aplicaciones experimentales y clínicas.

VII.CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

- 1.- El sistema kiss1/kiss1r se expresa de manera funcional en células adenohipofisarias de ratas peripuberales. En concreto, la kp-10 actúa de forma directa sobre una subpoblación de células somatotropas y gonadotropas provocando un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la estimulación de la secreción de LH y GH.
- 2.- El estradiol favorece la acción de la kp-10 a nivel hipofisario de forma diferencial, sensibilizando en mayor medida la respuesta de las somatotropas a este péptido.
- 3.- La expresión del sistema kiss1/kiss1r en la adenohipófisis está sujeta a una regulación específica que implica de forma distinta a somatotropas y gonadotropas e incluye diversos factores tales como el desarrollo postnatal, la propia kp, los factores hipotalámicos GHRH y GnRH, el estradiol, y las condiciones metabólicas. Esta regulación compleja y sutil por una interacción de señales metabólicas y sexuales hacen del sistema kiss1/kiss1r un buen candidato para actuar como integrador de las señales de los ejes metabólico, somatotrópico y reproductor en la glándula.
- 4.- El sistema kiss1/kiss1r también está presente en testículo y en tejido adiposo, donde su expresión está regulada de manera diferencial por diversos factores fisiológicamente relevantes. Esto sugiere su implicación en funciones adicionales al control hipotalámico del eje reproductor y refuerza la idea de que puede funcionar como señal integradora de éste eje con los ejes somatotrópico y metabólico actuando a múltiples niveles.
- 5.- Los ensayos realizados con análogos modificados de la kp-10 de rata demuestran que el residuo Tyr10 es clave para la actividad del péptido tanto *in vivo* como *in vitro*. En cambio la sustitución del residuo Phe6 por alanina da lugar a un débil antagonista *in vitro* que muestra una severa reducción de su capacidad agonista *in vivo*. Estos datos, sientan las bases para el diseño y caracterización de nuevos agonistas y/o antagonistas de kiss1r con potenciales aplicaciones clínicas y experimentales.

CONCLUSIONS

1.- The Kiss1/kiss1r system is functionally expressed in pituitary cells from peripubertal rats. In particular, kp-10 directly acts on a subset of both gonadotropes and somatotropes by increasing $[Ca^{2+}]_i$ and, consequently, stimulating LH and GH release, respectively.

2.- Estradiol differentially facilitates kp-10 action at the pituitary level, by sensitizing, especially in somatotropes, the response to this peptide.

3.- Expression of the kiss1/kiss1r system at the pituitary is under a specific regulation, which differentially involves somatotropes and gonadotropes, and comprises diverse factors such as postnatal development, kp-10 itself, hypothalamic factors as GHRH and GnRH, estradiol, and several metabolic conditions. This fine and complex regulation exerted by an interplay of metabolic and sexual signals at the pituitary indicate the kiss1/kiss1r system as a good candidate to act as an integrator in the gland of signals derived from metabolic, somatotropic and reproductive axes.

4.- The Kiss1/kiss1r system is also expressed at the testis and adipose tissue, where its expression is differentially regulated by several physiologically relevant factors. This suggests that this system also exerts additional functions, distinct from the hypothalamic control of reproductive axis, and thus reinforces the proposal of this system as an integrative signal of the later with the somatotropic and metabolic axes by acting at various levels.

5.- Assays carried out on rat kp-10 modified analogs show that the Tyr10 residue is key for the activity of the peptide both *in vivo* and *in vitro*. In contrast, Phe6 substitution by alanine generates a weak antagonist *in vitro*, which shows a dramatic reduction in its *in vivo* agonistic ability. These data provide the basis for the design and characterization of new kiss1r agonists and/or antagonists with potential clinical and experimental applications.

VIII.BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

1. Lee, J.H. *et al.* KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* **88**, 1731-1737 (1996).
2. Lee, J.H. & Welch, D.R. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer* **71**, 1035-1044 (1997).
3. West, A., Vojta, P.J., Welch, D.R. & Weissman, B.E. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* **54**, 145-148 (1998).
4. Kotani, M. *et al.* The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* **276**, 34631-34636 (2001).
5. Muir, A.I. *et al.* AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* **276**, 28969-28975 (2001).
6. Ohtaki, T. *et al.* Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **411**, 613-617 (2001).
7. Lee, D.K. *et al.* Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* **446**, 103-107 (1999).
8. Terao, Y. *et al.* Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochim Biophys Acta* **1678**, 102-110 (2004).
9. van Aerle, R., Kille, P., Lange, A. & Tyler, C.R. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* **29**, 57-64 (2008).
10. Moon, J.S. *et al.* Molecular cloning of the bullfrog kisspeptin receptor GPR54 with high sensitivity to *Xenopus* kisspeptin. *Peptides* (2008).
11. Nocillado, J.N., Levavi-Sivan, B., Carrick, F. & Elizur, A. 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 (2007).
12. Mohamed, J.S., Benninghoff, A.D., Holt, G.J. & Khan, I.A. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *Journal of molecular endocrinology* **38**, 235-244 (2007).
13. Parhar, I.S., Ogawa, S. & Sakuma, Y. 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 (2004).
14. Filby, A.L., van Aerle, R., Duitman, J. & Tyler, C.R. The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biol Reprod* **78**, 278-289 (2008).
15. Gottsch, M.L., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. From KISS1 to Kisspeptins: An Historical Perspective and Suggested Nomenclature. *Peptides* **1**, 4-9 (2009).

16. Lee, J.H. & Welch, D.R. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* **57**, 2384-2387 (1997).
17. Masui, T. *et al.* Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 85-92 (2004).
18. Jiang, Y. *et al.* KiSS1 suppresses metastasis in human ovarian cancer via inhibition of protein kinase C alpha. *Clin Exp Metastasis* **22**, 369-376 (2005).
19. Sanchez-Carbayo, M., Capodiceci, P. & Cordon-Cardo, C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am J Pathol* **162**, 609-617 (2003).
20. Ikeguchi, M., Hirooka, Y. & Kaibara, N. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **129**, 531-535 (2003).
21. Ohta, S. *et al.* Downregulation of metastasis suppressor genes in malignant pheochromocytoma. *Int J Cancer* **114**, 139-143 (2005).
22. Dhar, D.K. *et al.* Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* **111**, 868-872 (2004).
23. Ikeguchi, M., Yamaguchi, K. & Kaibara, N. Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 1379-1383 (2004).
24. Harms, J.F., Welch, D.R. & Miele, M.E. KiSS1 metastasis suppression and emergent pathways. *Clin Exp Metastasis* **20**, 11-18 (2003).
25. Martin, T.A., Watkins, G. & Jiang, W.G. KiSS-1 expression in human breast cancer. *Clin Exp Metastasis* **22**, 503-511 (2005).
26. Schmid, K. *et al.* KiSS-1 overexpression as an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Virchows Arch* **450**, 143-149 (2007).
27. de Roux, N. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10972-10976 (2003).
28. Seminara, S.B. *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England journal of medicine* **349**, 1614-1627 (2003).
29. Cadman, S.M., Kim, S.H., Hu, Y., Gonzalez-Martinez, D. & Bouloux, P.M. Molecular pathogenesis of Kallmann's syndrome. *Hormone research* **67**, 231-242 (2007).
30. Lanfranco, F. *et al.* Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* **153**, 845-852 (2005).
31. Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* **29**, 48-69 (2008).
32. Funes, S. *et al.* The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1357-1363 (2003).

33. Kauffman, A.S. *et al.* The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J Neurosci* **27**, 8826-8835 (2007).
34. Lapatto, R. *et al.* Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology* **148**, 4927-4936 (2007).
35. Messenger, S. Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty. *J Neuroendocrinol* **17**, 687-688 (2005).
36. d'Anglemont de Tassigny, X. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10714-10719 (2007).
37. Irwig, M.S. *et al.* Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* **80**, 264-272 (2004).
38. Castellano, J.M. *et al.* Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* **257-258**, 75-83 (2006).
39. Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H. & Ohtaki, T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 383-388 (2004).
40. Navarro, V.M. *et al.* Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* **145**, 4565-4574 (2004).
41. Navarro, V.M. *et al.* Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **146**, 1689-1697 (2005).
42. Navarro, V.M. *et al.* Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* **146**, 156-163 (2005).
43. Thompson, E.L. *et al.* Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* **16**, 850-858 (2004).
44. Gottsch, M.L. *et al.* A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* **145**, 4073-4077 (2004).
45. Messenger, S. *et al.* Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1761-1766 (2005).
46. Plant, T.M. The male monkey as a model for the study of the neurobiology of puberty onset in man. *Mol Cell Endocrinol* **254-255**, 97-102 (2006).
47. Shahab, M. *et al.* Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2129-2134 (2005).
48. Dhillon, W.S. *et al.* Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 6609-6615 (2005).
49. Seminara, S.B., Dipietro, M.J., Ramaswamy, S., Crowley, W.F., Jr. & Plant, T.M. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored

- indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* **147**, 2122-2126 (2006).
50. Ramaswamy, S. *et al.* Effect of continuous intravenous administration of human metastin 45-54 on the neuroendocrine activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* **148**, 3364-3370 (2007).
 51. Thompson, E.L. *et al.* Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E1074-1082 (2006).
 52. Han, S.K. *et al.* Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* **25**, 11349-11356 (2005).
 53. Quaynor, S. *et al.* Expression of a Functional G Protein-Coupled Receptor 54-Kisspeptin Autoregulatory System in Hypothalamic Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Molecular Endocrinology* **21**, 3062–3070 (2007).
 54. Smith, J.T. Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: Comparative aspects. *Peptides* (2008).
 55. Kauffman, A.S., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends in neurosciences* **30**, 504-511 (2007).
 56. Clarkson, J. & Herbison, A.E. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* **147**, 5817-5825 (2006).
 57. Dungan, H.M., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* **147**, 1154-1158 (2006).
 58. Revel, F.G. *et al.* Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord* **8**, 57-65 (2007).
 59. Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A. & Clarke, I.J. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* **148**, 1150-1157 (2007).
 60. Kinoshita, M. *et al.* Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* **146**, 4431-4436 (2005).
 61. Shibata, M., Friedman, R.L., Ramaswamy, S. & Plant, T.M. Evidence that down regulation of hypothalamic KiSS-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J Neuroendocrinol* **19**, 432-438 (2007).
 62. Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L. & Rance, N.E. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 2744-2750 (2007).
 63. Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* **146**, 3686-3692 (2005).

64. Smith, J.T. *et al.* Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* **146**, 2976-2984 (2005).
65. Pompolo, S., Pereira, A., Estrada, K.M. & Clarke, I.J. Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology* **147**, 804-810 (2006).
66. Smith, J.T. Kisspeptin signalling in the brain: Steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res Rev* (2007).
67. Franceschini, I. *et al.* Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* **401**, 225-230 (2006).
68. Goodman, R.L. *et al.* Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* **148**, 5752-5760 (2007).
69. Smith, J.T. *et al.* Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* **149**, 1951-1959 (2008).
70. Suzuki, S., Kadokawa, H. & Hashizume, T. Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci* **103**, 360-365 (2008).
71. Richard, N., Galmiche, G., Corvaisier, S., Caraty, A. & Kottler, M.L. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* **20**, 381-393 (2008).
72. Bergendahl, M., Wiemann, J.N., Clifton, D.K., Huhtaniemi, I. & Steiner, R.A. Short-term starvation decreases POMC mRNA but does not alter GnRH mRNA in the brain of adult male rats. *Neuroendocrinology* **56**, 913-920 (1992).
73. Panidis, D. *et al.* Plasma metastin levels are negatively correlated with insulin resistance and free androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **85**, 1778-1783 (2006).
74. Ahima, R.S., Dushay, J., Flier, S.N., Prabakaran, D. & Flier, J.S. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *The Journal of clinical investigation* **99**, 391-395 (1997).
75. Carro, E. *et al.* Influence of endogenous leptin tone on the estrous cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. *Neuroendocrinology* **66**, 375-377 (1997).
76. Chehab, F.F., Mounzih, K., Lu, R. & Lim, M.E. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* **275**, 88-90 (1997).
77. Chehab, F.F., Lim, M.E. & Lu, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature genetics* **12**, 318-320 (1996).
78. Mounzih, K., Lu, R. & Chehab, F.F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* **138**, 1190-1193 (1997).
79. Coleman, D.L. Diabetes and obesity: thrifty mutants? *Nutrition reviews* **36**, 129-132 (1978).
80. Johnson, L.M. & Sidman, R.L. A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse. *Biol Reprod* **20**, 552-559 (1979).

81. Castellano, J.M. *et al.* Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* **146**, 3917-3925 (2005).
82. Smith, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G.E. & Steiner, R.A. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* **26**, 6687-6694 (2006).
83. Luque, R.M., Kineman, R.D. & Tena-Sempere, M. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology* **148**, 4601-4611 (2007).
84. Smith, J.T., Acohido, B.V., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* **18**, 298-303 (2006).
85. Castellano, J.M. *et al.* Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* **147**, 4852-4862 (2006).
86. Pallais, J.C., Bo-Abbas, Y., Pitteloud, N., Crowley, W.F., Jr. & Seminara, S.B. Neuroendocrine, gonadal, placental, and obstetric phenotypes in patients with IHH and mutations in the G-protein coupled receptor, GPR54. *Mol Cell Endocrinol* **254-255**, 70-77 (2006).
87. Castano, J.P. *et al.* Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* (2008).
88. Popa, S.M., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annual review of physiology* **70**, 213-238 (2008).
89. Bilban, M. *et al.* Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci* **117**, 1319-1328 (2004).
90. Mead, E.J., Maguire, J.J., Kuc, R.E. & Davenport, A.P. 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 (2007).
91. Tomita, K. *et al.* SAR and QSAR studies on the N-terminally acylated pentapeptide agonists for GPR54. *J Med Chem* **50**, 3222-3228 (2007).
92. Orsini, M.J. *et al.* Metastin (KiSS-1) mimetics identified from peptide structure-activity relationship-derived pharmacophores and directed small molecule database screening. *J Med Chem* **50**, 462-471 (2007).
93. Tomita, K., Oishi, S., Ohno, H., Peiper, S.C. & Fujii, N. Development of Novel G-Protein-Coupled Receptor 54 Agonists with Resistance to Degradation by Matrix Metalloproteinase. *J Med Chem* (2008).
94. Janneau, J.L. *et al.* Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 5336-5339 (2002).
95. Horikoshi, Y. *et al.* Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 914-919 (2003).
96. Hauge-Evans, A.C. *et al.* A role for kisspeptin in islet function. *Diabetologia* **49**, 2131-2135 (2006).

97. Silvestre, R.A., Egido, E.M., Hernandez, R. & Marco, J. Kisspeptin-13 inhibits insulin secretion without affecting glucagon or somatostatin release: study in the perfused rat pancreas. *The Journal of endocrinology* **196**, 283-290 (2008).
98. Castellano, J.M. *et al.* Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes* **55**, 2602-2610 (2006).
99. Schally, A.V. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* **173**, 1036-1038 (1971).
100. Witkin, J.W. Access of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the vasculature in the rat. *Neuroscience* **37**, 501-506 (1990).
101. Millar, R.P. GnRHs and GnRH receptors. *Anim Reprod Sci* **88**, 5-28 (2005).
102. Millar, R.P. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine reviews* **25**, 235-275 (2004).
103. Rispoli, L.A. & Nett, T.M. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. *Anim Reprod Sci* **88**, 57-74 (2005).
104. Grosse, R. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G(q/11) proteins. *J Biol Chem* **275**, 9193-9200 (2000).
105. Neill, J.D., Musgrove, L.C. & Duck, L.W. Newly recognized GnRH receptors: function and relative role. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 383-392 (2004).
106. Guillemin, R. Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *The Journal of endocrinology* **184**, 11-28 (2005).
107. Muller, E.E., Locatelli, V. & Cocchi, D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiological reviews* **79**, 511-607 (1999).
108. Campbell, R.M. *et al.* GRF analogs and fragments: correlation between receptor binding, activity and structure. *Peptides* **12**, 569-574 (1991).
109. Frohman, L.A., Downs, T.R. & Chomczynski, P. Regulation of growth hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* **13**, 344-405 (1992).
110. Frohman, L.A. & Jansson, J.O. Growth hormone-releasing hormone. *Endocrine reviews* **7**, 223-253 (1986).
111. Mayo, K.E., Godfrey, P.A., Suhr, S.T., Kulik, D.J. & Rahal, J.O. Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. *Recent progress in hormone research* **50**, 35-73 (1995).
112. Mayo, K.E., Miller, T.L., DeAlmeida, V., Zheng, J. & Godfrey, P.A. The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **805**, 184-203 (1996).
113. Pierce, K.L., Premont, R.T. & Lefkowitz, R.J. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-650 (2002).
114. Miller, T.L., Godfrey, P.A., Dealmeida, V.I. & Mayo, K.E. The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* **140**, 4152-4165 (1999).

115. Schally, A.V., Varga, J.L. & Engel, J.B. Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: an emerging new therapy for cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **4**, 33-43 (2008).
116. Melmed, S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1603-1618 (2003).
117. Imura *Comprehensive Endocrinology. The Pituitary gland.* (1985).
118. Bradley, A.S. & Wissig, S.L. The anatomy of secretion in the follicular cell of the thyroid gland. 3. The acute effect in vivo of thyrotropic hormone on amino acid uptake and incorporation into protein by the mouse thyroid gland. *The Journal of cell biology* **30**, 433-436 (1966).
119. Ooi, G.T., Tawadros, N. & Escalona, R.M. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Mol Cell Endocrinol* **228**, 1-21 (2004).
120. Yeung, C.M., Chan, C.B., Leung, P.S. & Cheng, C.H. Cells of the anterior pituitary. *The international journal of biochemistry & cell biology* **38**, 1441-1449 (2006).
121. Bousfield, G.R. & Ward, D.N. Evidence for two folding domains in glycoprotein hormone alpha-subunits. *Endocrinology* **135**, 624-635 (1994).
122. Themmen, A.P.N. & Huhtaniemi, I.T. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine reviews* **21**, 551-583 (2000).
123. McNeilly, A.S., Crawford, J.L., Taragnat, C., Nicol, L. & McNeilly, J.R. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement* **61**, 463-476 (2003).
124. Albanese, C. *et al.* The gonadotropin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control. *Recent progress in hormone research* **51**, 23-58; discussion 59-61 (1996).
125. Farnworth, P.G. Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph? *The Journal of endocrinology* **145**, 387-395 (1995).
126. Pernasetti, F. *et al.* Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone-beta by activin and gonadotropin-releasing hormone in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* **142**, 2284-2295 (2001).
127. Yamada, K. *et al.* Gene expression of basic helix-loop-helix transcription factor, SHARP-2, is regulated by gonadotropins in the rat ovary and MA-10 cells. *Biol Reprod* **70**, 76-82 (2004).
128. Naylor, S.L. *et al.* Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. *Somatic cell genetics* **9**, 757-770 (1983).
129. Denef, C. Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol* **20**, 1-70 (2008).
130. Coss, D., Thackray, V.G., Deng, C.X. & Mellon, P.L. Activin regulates luteinizing hormone beta-subunit gene expression through Smad-binding and homeobox elements. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **19**, 2610-2623 (2005).
131. Baumann, G. & Loriaux, D.L. Failure of endogenous prolactin to alter renal salt and water excretion and adrenal function in man. *J Clin Endocrinol Metab* **43**, 643-649 (1976).
132. Archer, D.F. Physiology of prolactin. *Clinical obstetrics and gynecology* **23**, 325-335 (1980).

133. Stringer, B.M., Rowson, J. & Williams, E.D. Effect of raised serum prolactin on breast development. *Journal of anatomy* **162**, 249-261 (1989).
134. Fernandez, G., Cacicedo, L., Lorenzo, M.J., de los Frailes, M.T. & Sanchez Franco, F. Growth hormone-releasing factor production by fetal rat cerebrocortical and hypothalamic cells in primary culture. *Endocrinology* **125**, 1991-1998 (1989).
135. Chomczynski, P., Downs, T.R. & Frohman, L.A. Feedback regulation of growth hormone (GH)-releasing hormone gene expression by GH in rat hypothalamus. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **2**, 236-241 (1988).
136. Kojima, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-660 (1999).
137. Caminos, J.E. *et al.* Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology* **144**, 5089-5097 (2003).
138. de Lecea, L. Cortistatin-Functions in the central nervous system. *Mol Cell Endocrinol* **286**, 88-95 (2008).
139. Gahete, M.D. *et al.* Are somatostatin and cortistatin two siblings in regulating endocrine secretions? In vitro work ahead. *Mol Cell Endocrinol* **286**, 128-134 (2008).
140. Cinti, S. The adipose organ. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **73**, 9-15 (2005).
141. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* **84**, 277-359 (2004).
142. Wajchenberg, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine reviews* **21**, 697-738 (2000).
143. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994).
144. Rajala, M.W. & Scherer, P.E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144**, 3765-3773 (2003).
145. Fruhbeck, G. & Gomez-Ambrosi, J. Rationale for the existence of additional adipostatic hormones. *Faseb J* **15**, 1996-2006 (2001).
146. Trayhurn, P. & Beattie, J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *The Proceedings of the Nutrition Society* **60**, 329-339 (2001).
147. Trayhurn, P. & Wood, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British journal of nutrition* **92**, 347-355 (2004).
148. Hauner, H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *The Proceedings of the Nutrition Society* **64**, 163-169 (2005).
149. Trayhurn, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta physiologica Scandinavica* **184**, 285-293 (2005).
150. Ahima, R.S. Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Frontiers of hormone research* **26**, 42-56 (2000).
151. Harris, R.B. Leptin--much more than a satiety signal. *Annual review of nutrition* **20**, 45-75 (2000).
152. Masuzaki, H. *et al.* Augmented expression of obese (ob) gene during the process of obesity in genetically obese-hyperglycemic Wistar fatty (fa/fa) rats. *FEBS Lett* **378**, 267-271 (1996).

153. Maffei, M. *et al.* Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine* **1**, 1155-1161 (1995).
154. Bado, A. *et al.* The stomach is a source of leptin. *Nature* **394**, 790-793 (1998).
155. Smith-Kirwin, S.M. *et al.* Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1810-1813 (1998).
156. Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N. & Rossetti, L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* **393**, 684-688 (1998).
157. Senaris, R. *et al.* Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* **138**, 4501-4504 (1997).
158. Hoggard, N. *et al.* Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* **232**, 383-387 (1997).
159. Klein, S., Coppack, S.W., Mohamed-Ali, V. & Landt, M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* **45**, 984-987 (1996).
160. Friedman, J.M. Obesity in the new millennium. *Nature* **404**, 632-634 (2000).
161. Sharpe, R.M. & Franks, S. Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue. *Nature cell biology* **4 Suppl**, s33-40 (2002).
162. El-Hefnawy, T., Ioffe, S. & Dym, M. Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology* **141**, 2624-2630 (2000).
163. Caprio, M. *et al.* Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells. *Biol Reprod* **68**, 1199-1207 (2003).
164. Tena-Sempere, M. *et al.* Molecular mechanisms of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *The Journal of endocrinology* **170**, 413-423 (2001).
165. Jope, T., Lammert, A., Kratzsch, J., Paasch, U. & Glander, H.J. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int J Androl* **26**, 335-341 (2003).
166. Barash, I.A. *et al.* Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* **137**, 3144-3147 (1996).
167. Jockenovel, F. *et al.* Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2510-2513 (1997).
168. Quintero, J.C., Ruíz-Cortez, T. Effects of the leptin in the onset of puberty in animal males. *Rev Colomb Cienc Pecu* **21**, 97-108 (2008).
169. Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J. & Martin, R.J. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* **2**, 239-254 (2001).
170. Gomez-Ambrosi, J. *et al.* Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity. *Faseb J* **18**, 215-217 (2004).
171. Bray, G.A. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2583-2589 (2004).
172. Bays, H.E., Chapman, R.H. & Grandy, S. The relationship of body mass index to diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia: comparison of data from

- two national surveys. *International journal of clinical practice* **61**, 737-747 (2007).
173. Trayhurn, P. & Bing, C. Appetite and energy balance signals from adipocytes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **361**, 1237-1249 (2006).
 174. Dobado-Berrios, P.M. *et al.* Heterogeneity of growth hormone (GH)-producing cells in aging male rats: in vitro GH releasing activity of somatotrope subpopulations. *Mol Cell Endocrinol* **123**, 127-137 (1996).
 175. Gutierrez-Pascual, E. *et al.* Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol* **19**, 521-530 (2007).
 176. Tennant, J.R. Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. *Transplantation* **2**, 685-694 (1964).
 177. Duran-Prado, M. Caracterización Molecular de los Receptores de Somatostatina (sst) Porcinos y de sus interacciones, e identificación de dos nuevas isoformas truncadas funcionales de los sst5 humano y porcino. *Tesis de Licenciatura* (2007).
 178. Luque, R.M., Park, S. & Kineman, R.D. Severity of the catabolic condition differentially modulates hypothalamic expression of growth hormone-releasing hormone in the fasted mouse: potential role of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **148**, 300-309 (2007).
 179. Luque, R.M. & Kineman, R.D. Impact of obesity on the growth hormone axis: evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function. *Endocrinology* **147**, 2754-2763 (2006).
 180. Luque, R.M., Huang, Z.H., Shah, B., Mazzone, T. & Kineman, R.D. Effects of leptin replacement on hypothalamic-pituitary growth hormone axis function and circulating ghrelin levels in ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E891-899 (2007).
 181. Ahima, R.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring, Md)* **14 Suppl 5**, 242S-249S (2006).
 182. Tena-Sempere, M. Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology* **146**, 3683-3685 (2005).
 183. Smith, J.T., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* **131**, 623-630 (2006).
 184. Smith JT, P.A., Rao A, Clarke IJ Kisspeptin-10 stimulates luteinising hormone release from the ovine pituitary gland in vitro. *Front Neuroendocrinol* **27**, 63-79 (2006).
 185. Roa, J. *et al.* Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female Rat. *Endocrinology* **147**, 2864-2878 (2006).
 186. Dhillon, W.S. *et al.* Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 3958-3966 (2007).
 187. Gracia-Navarro, F., Lamacz, M., Tonon, M.C. & Vaudry, H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates calcium mobilization in amphibian pituitary cells. *Endocrinology* **131**, 1069-1074 (1992).

188. Vaudry, D. *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacological reviews* **52**, 269-324 (2000).
189. Martinez-Fuentes, A.J., Castano, J.P., Malagon, M.M., Vazquez-Martinez, R. & Gracia-Navarro, F. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides 38 and 27 increase cytosolic free Ca²⁺ concentration in porcine somatotropes through common and distinct mechanisms. *Cell calcium* **23**, 369-378 (1998).
190. Ramirez, J.L. *et al.* Growth hormone-releasing factor mobilizes cytosolic free calcium through different mechanisms in two somatotrope subpopulations from porcine pituitary. *Cell calcium* **23**, 207-217 (1998).
191. Martinez-Fuentes, A.J., Castano, J.P., Gracia-Navarro, F. & Malagon, M.M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) 38 and PACAP27 activate common and distinct intracellular signaling pathways to stimulate growth hormone secretion from porcine somatotropes. *Endocrinology* **139**, 5116-5124 (1998).
192. Kadokawa, H., Suzuki, S. & Hashizume, T. Kisspeptin-10 stimulates the secretion of growth hormone and prolactin directly from cultured bovine anterior pituitary cells. *Anim Reprod Sci* **105**, 404-408 (2008).
193. Nazian, S.J. Role of metastin in the release of gonadotropin-releasing hormone from the hypothalamus of the male rat. *J Androl* **27**, 444-449 (2006).
194. Hull, K.L. & Harvey, S. GH as a co-gonadotropin: the relevance of correlative changes in GH secretion and reproductive state. *The Journal of endocrinology* **172**, 1-19 (2002).
195. Korytko, A.I., Zeitler, P. & Cuttler, L. Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* **137**, 1326-1331 (1996).
196. Kamegai, J., Wakabayashi, I., Kineman, R.D. & Frohman, L.A. Growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) and growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) mRNA levels during postnatal development in male and female rats. *J Neuroendocrinol* **11**, 299-306 (1999).
197. Zapatero-Caballero, H., Sanchez-Franco, F., Guerra-Perez, N., Fernandez-Mendez, C. & Fernandez-Vazquez, G. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of male rats. *Biol Reprod* **68**, 1764-1770 (2003).
198. Zapatero-Caballero, H. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of female rats. *Biol Reprod* **70**, 348-355 (2004).
199. Marian, J., Cooper, R.L. & Conn, P.M. Regulation of the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor. *Molecular pharmacology* **19**, 399-405 (1981).
200. Clayton, R.N. Gonadotropin-releasing hormone modulation of its own pituitary receptors: evidence for biphasic regulation. *Endocrinology* **111**, 152-161 (1982).
201. Adachi, S. *et al.* Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* **53**, 367-378 (2007).
202. Li, D. *et al.* Estrogen regulates KiSS1 gene expression through estrogen receptor alpha and SP protein complexes. *Endocrinology* **148**, 4821-4828 (2007).

203. Morelli, A. *et al.* Sex steroids and leptin regulate the "first Kiss" (KiSS 1/G-protein-coupled receptor 54 system) in human gonadotropin-releasing-hormone-secreting neuroblasts. *The journal of sexual medicine* **5**, 1097-1113 (2008).
204. Frisch, R.E. Body fat, puberty and fertility. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **59**, 161-188 (1984).
205. Spicer, L.J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domestic animal endocrinology* **21**, 251-270 (2001).
206. Casanueva, F.F. & Dieguez, C. Growth Hormone Secretagogues: Physiological Role and Clinical Utility. *Trends Endocrinol Metab* **10**, 30-38 (1999).
207. Caminos, J.E. *et al.* Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology* **149**, 3390-3402 (2008).
208. Lagaly, D.V., Aad, P.Y., Grado-Ahuir, J.A., Hulsey, L.B. & Spicer, L.J. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol* **284**, 38-45 (2008).
209. Psilopanagioti, A., Papadaki, H., Kranioti, E.F., Alexandrides, T.K. & Varakis, J.N. Expression of Adiponectin and Adiponectin Receptors in Human Pituitary Gland and Brain. *Neuroendocrinology* (2008).
210. Barreiro, M.L. *et al.* Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod* **67**, 1768-1776 (2002).
211. Shahed, A. & Young, K.A. Differential ovarian expression of KiSS-1 and GPR-54 during the estrous cycle and photoperiod induced recrudescence in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Molecular reproduction and development* (2008).
212. Ciampani, T., Fabbri, A., Isidori, A. & Dufau, M.L. Growth hormone-releasing hormone is produced by rat Leydig cell in culture and acts as a positive regulator of Leydig cell function. *Endocrinology* **131**, 2785-2792 (1992).
213. Baker, J. *et al.* Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **10**, 903-918 (1996).
214. Tena-Sempere, M. *et al.* Developmental and hormonal regulation of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Biol Reprod* **64**, 634-643 (2001).
215. Oloumi, A., Lam, W., Banath, J.P. & Olive, P.L. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *Int J Radiat Biol* **78**, 483-492 (2002).
216. Tena-Sempere, M. & Barreiro, M.L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol* **188**, 9-13 (2002).
217. Tena-Sempere, M. *et al.* Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *The Journal of endocrinology* **161**, 211-218 (1999).
218. Caprio, M., Fabbri, E., Isidori, A.M., Aversa, A. & Fabbri, A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 65-72 (2001).
219. Kaplowitz, P.B. Link between body fat and the timing of puberty. *Pediatrics* **121 Suppl 3**, S208-217 (2008).
220. Brown, R.E., Imran, S.A., Ur, E. & Wilkinson, M. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol Cell Endocrinol* **281**, 64-72 (2008).

221. Niida, A. *et al.* Design and synthesis of downsized metastin (45-54) analogs with maintenance of high GPR54 agonistic activity. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 134-137 (2006).
222. Mazarguil, H. *et al.* Structure-activity relationships of neuropeptide FF: role of C-terminal regions. *Peptides* **22**, 1471-1478 (2001).
223. Boyle, R.G. *et al.* Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide. *J Pept Sci* **11**, 161-165 (2005).
224. Tomita, K. *et al.* Structure-activity relationship study on small peptidic GPR54 agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry* **14**, 7595-7603 (2006).