



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

La kisspeptina y su papel en la reproducción de los vertebrados

TESINA

Que para obtener el título de

Biólogo

PRESENTA

Edgar Trejo López

Asesor: Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas



Los Reyes Iztacala, Edo. de México. Abril 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mí mamá: infinitas gracias por tu apoyo, comprensión y sobre todo por tu amor, inconmensurable e infinito... lo mejor de todo. A tí, que siempre has visto por mí, sin importar las de más cosas alrededor, hemos estado juntos, compartido momentos felices, inolvidables... y también malos y peores, sin importar la situación siempre tienes la fuerza para salir a delante, me has enseñado la bondad y los valores que hacen a una madre, que te hacen la mejor mamá. Por estas y miles razones más te dedico lo que siempre esperaste de mí.

Te AMO, mi adorada mamá.

A mí papá: quien me enseñó lo que significa el trabajo duro, siempre luchando para salir adelante con la familia, librando obstáculos y pruebas que nos pone la vida. Has resistido como una roca, tan fuerte como el viento, pero a la vez tan comprensivo e inocente como sólo tú lo sabes ser. Son incalculables los conocimientos que has sembrado en mí, las experiencias transmitidas y las raíces que me has dejado. Por todo lo que eres, representas y seguirás siendo para mí... te dedico por lo que siempre me has enseñado a luchar.

Te AMO mi querido viejo.

...y, aunque no siempre congeniamos en la manera de ser, de pensar o de ser, en las creencias, gustos o en las decisiones. Quiero que sepan que sin ustedes, sin su apoyo, sin su amor y sin su confianza... nunca habría llegado a donde estoy.

¡¡ GRACIAS por todo!!

Y toda aflicción por la Luna, la noche y los que había amado, se había desvanecido. Tampoco sentía pena por lo sucedido. Sólo gratitud por todo. Pero quizá el Demonio tuviera razón. Quizá no había aceptado la fría y aterradoramente verdadera de la cuestión, quizá simplemente se había dejado deslizar en el reino de los recuerdos y de los fantasmas, de las pálidas criaturas que constituían la exacta materia de los sueños y de la locura.

L. d. L. (1895)

ÍNDICE

<i>Dedicatorias</i>	2
Abreviaturas.....	4
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
JUSTIFICACIÓN.....	9
OBJETIVO.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Kisspeptina.....	12
Estado de preservación de kisspeptina.....	18
Receptor a kisspeptina: kissr/GPR54.....	27
Mecanismos de acción.....	29
Neuronas-kiss.....	30
Kiss y GnIH.....	31
Expresión de kiss fuera del sistema nervioso.....	32
Expresión de kiss por dimorfismo sexual.....	33
Regulación metabólica a través de kiss.....	34
Cambios ambientales (fotoperíodo).....	35
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	39
Bibliografía.....	40



ABREVIATURAS

ABP: androgens-binding hormone/ hormona fijadora de andrógenos.

AMPC: adenosin monofosfato ciclico.

ARC: arcuate nucleus/ núcleo arcuato.

AVPV: anteroventral periventricular nucleus/ núcleo anteroventral periventricular.

Ca⁺⁺: calcio.

DAG : diacilglicerol.

DYNA: dinorfina A.

Eje HPG: hypothalamic-pituitary-gonadal axis/ eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

ER: endoplasmic reticulum/ retículo endoplásmico.

ER α : estrogens receptor alpha/ receptor a estrógenos alfa.

ER β : estrogens receptor beta/ receptor a estrógenos beta.

F: phenylalanine/ fenilalanina.

FSH: follicle-stimulating hormone/ hormona folículo estimulante.

GDP: guanosine diphosphate/ guanosin difosfato.

GH: growth hormone/ hormona del crecimiento.

GnIH: gonadotropin-inhibitory hormone/ hormona inhibidora de gonadotropinas.

GnRH: gonadotropin-releasing hormone/ hormona liberadora de gonadotropinas.

GnRHR: receptor of gonadotropin-releasing hormone/ receptor a la hormona liberadora de gonadotropinas.

GPCRs: G protein coupled receptors/ receptores acoplados a proteínas G.

GTP: guanosine triphosphate/ guanosin trifosfato.

IP₃: inositol trifosfato.

K: potasio.

Kissr: kisspeptin receptor/ receptor a kisspeptina.

Kp(s): kisspeptin(s)/ kisspepina (s).

LH: luteinizing hormone/ hormona luteinizante.

mRNA: messenger ribonucleic acid/ ácido ribonucleico mensajero.

NKB: neuroquinina B.

NLR: núcleo *recessus lateralis*.

NPPv: núcleo posterior periventricular.

NVT: ventral tuberal nucleus/ núcleo ventral tuberal.

P: proline/ prolina.

PeN: periventricular nucleus/ núcleo periventricular.

PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-biphosphate/ fosfatidil inositol difosfato.

PKA: protein kinase A/ proteína cinasa A o proteincinasa A.

PKC: protein kinase C/ proteína cinasa C o proteincinasa C.

PLC: phospholipase C/ fosfolipasa C.

POA: preoptic area/ área preóptica.

PR: progesterone receptor/ receptor a progesterona.

PRL: prolactin/ prolactina.

S: serine/ serina.

Y: tyrosine/ tirosina.

RESUMEN

Las kisspeptinas son el producto codificado por el gen *kiss1*, el cual fue descubierto inicialmente en 1996 por su capacidad para inhibir la metástasis tumoral a través de su receptor *kiss1r* (originalmente nombrado GPR54). Actualmente estos neuropéptidos son considerados los principales reguladores del eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG) en varias especies de vertebrados, donde promueven la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y el consecuente inicio de las funciones reproductivas. Nuevas investigaciones han demostrado la existencia de dos genes parálogos de kisspeptina y de su receptor en varias especies de peces y anfibios. Estos nuevos genes se han denominado *kiss1*, *kiss2*, *kiss1r* y *kiss2r*, respectivamente. En el presente estudio se realizó una revisión sobre las diferentes acciones que ejercen *kiss1* y *kiss2* en los distintos grupos de vertebrados, enfatizando la regulación neuroendocrina sobre el eje reproductivo. También se revisó sobre su preservación estructural, funcional y evolutiva en los grupos de vertebrados donde se ha reportado la presencia de *kiss1* y *kiss2*.

Palabras clave: eje HPG, GnRH, isoforma, kisspeptina(s), *kiss1*, *kiss2*, *kissr*, parálogo, reproducción, vertebrados.

INTRODUCCIÓN

El eje reproductivo

La reproducción es una fase crucial y una función de gran importancia en la vida de los organismos, ya que de esta depende la preservación de las especies. En vertebrados, la reproducción se lleva a cabo por una compleja regulación en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG; por sus siglas en inglés), donde estos tres órganos funcionan como los principales secretores, receptores y moduladores de las señales hormonales necesarias. El inicio de la función reproductiva se da por medio de señales ambientales, las cuales son captadas en el sistema nervioso central y convertidas posteriormente en señales neurales y hormonales, las cuales inciden sobre las neuronas hipotalámicas secretoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Jacobi y Martínez de la Escalera, 2008). La acción fundamental de la GnRH es estimular la secreción y síntesis de gonadotropinas: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH); aunque GnRH también parece participar en aspectos relacionados con la conducta sexual, en particular, el sistema GnRH2 (Oka, 2009). El control que ejerce la GnRH sobre el ciclo reproductivo depende de su secreción pulsátil (Kordon *et al.*, 1994; Chen y Fernald, 2008).

En los mamíferos, las gonadotropinas son sintetizadas en la adenohipófisis por células especializadas, denominadas células gonadótropas. En hembras, la FSH estimula en los ovarios el desarrollo del folículo ovárico en cada uno de los ciclos estrales y/o menstruales, dependiendo de la especie; dentro de estas acciones destaca su estimulación sobre las células de la granulosa de los ovarios para la secreción de estrógenos (Domínguez, 1993; Kordon *et al.*, 1994). En machos, la FSH actúa en los testículos estimulando la producción de la proteína de unión a andrógenos (ABP; por sus siglas en inglés) en las células de Sertoli, lo que facilita que la testosterona o dihidrotestosterona al unirse a la ABP pasen más fácilmente a la luz de los túbulos seminíferos, promoviendo la producción de espermatozoides (Domínguez, 1993; Kordon *et al.*, 1994). Por otra parte, en hembras, la LH actúa en conjunto con la FSH estimulando la liberación de los ovocitos, lo que constituye el proceso de ovulación. La LH también estimula la formación del cuerpo lúteo, el cual secreta progesterona. Los estrógenos y la progesterona preparan al útero para la implantación del huevo fertilizado y a las glándulas mamarias para la secreción de leche. En machos, la LH estimula las células de Leydig para producir testosterona (Domínguez, 1993; Kordon *et al.*, 1994).

Por todas las acciones antes mencionadas, se propuso por mucho tiempo a la GnRH como el modulador neuroendocrino de la reproducción. Sin embargo, en el 2003 se descubrió que las acciones de la GnRH eran reguladas por otro sistema neuroendocrino: la kisspeptina y su receptor (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). Proponiendo al sistema kisspeptina-receptor a kisspeptina-GnRH, como el principal regulador del inicio de la pubertad y la reproducción de los vertebrados (Roa *et al.*, 2008).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que el sistema kisspeptina/kissr se mantiene conservado funcionalmente a lo largo de la escala filogenética de los vertebrados y además juega un papel muy importante en el control neuroendocrino de la reproducción, el inicio de la pubertad, el control de la metástasis tumoral, el control de la reproducción estacional y la relación entre el balance energético, alimentación y reproducción (Elizur, 2009; Li *et al.*, 2009-a), hace especialmente interesante su estudio y comprensión, con el fin de conocer más sobre el papel que desempeña dentro del eje reproductivo HPG y sus posibles alteraciones, así como el diseño y síntesis de péptidos con capacidad agonista y/o antagonista para sus posibles aplicaciones clínicas, farmacológicas y en la salud y la reproducción animal.

Otro aspecto interesante es tratar de comprender cómo este sistema responde a los cambios ambientales, por ejemplo, el fotoperíodo, los cambios de temperatura, el balance energético, etcétera, y cómo estos cambios afectan las señales esteroideas al inicio de la pubertad y a lo largo del desarrollo reproductivo de los organismos, teniendo una opción para explicar las diferentes estrategias y comportamientos reproductivos en las diferentes especies a lo largo de una variedad inmensa de hábitat.

Por lo anterior, en el presente trabajo se propone una recopilación del conocimiento actual del sistema kisspeptina/kissr por medio de una revisión y un análisis bibliográfico, haciendo hincapié sobre las funciones que desempeña en la regulación del eje reproductivo y en el inicio de la pubertad de los vertebrados.

OBJETIVO

- ✓ Realizar una revisión de material bibliográfico sobre kisspeptina, receptores a kisspeptina y el papel que desempeñan en la reproducción de los vertebrados.

Objetivos particulares

- ✓ Realizar un análisis filogenético con base en la presencia de kiss1 y kiss2 en diferentes grupos de vertebrados.
- ✓ Analizar el grado de conservación de las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos reportadas para kiss1 y kiss2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se recopilaron, revisaron y analizaron varios artículos científicos de investigación y de revisión sobre kisspeptina. Los artículos y revisiones se consiguieron con ayuda de las bases de datos y páginas web dedicadas a la divulgación de revistas científicas, tales como PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y la biblioteca del IBT (<http://biblioteca.ibt.unam.mx/revistas.php>).

Para el análisis filogenético se realizó la propuesta de una modificación de un árbol filogenético donde se muestra la presencia o ausencia de kiss1 y kiss2 en distintos grupos de vertebrados.

El grado de conservación de las secuencias tanto de aminoácidos como de nucleótidos, se realizó con ayuda de las secuencias de kiss1 y kiss2 reportadas dentro del GenBank.

Las secuencias utilizadas se muestran en el siguiente orden: *nombre científico*; nombre común (número de acceso del GenBank).

Las secuencias de kiss1 fueron las de *Homo sapiens*; humano (NM_002256.3), *Mus musculus*; ratón (NM_178260.3), *Monodelphis domestica*; zarigüeya (NM_001144132.1), *Danio rerio*; pez cebra (AB245404), *Carassius auratus*; pez dorado (FJ236327), *Oryzias latipes*; pez medaka (NM_001122921.1), *Dicentrarchus labrax*; european sea bass o lubina (FJ008914) y *Xenopus laevis* (NM_001170453).

Las secuencias de kiss2 fueron de *Danio rerio*; pez cebra (NM_001142585), *Carassius auratus*; pez dorado (FJ465138), *Oryzias latipes*; pez medaka (AB439562), *Dicentrarchus labrax*; lubina (FJ008915) y *Xenopus siluriana* (EU853683.1).

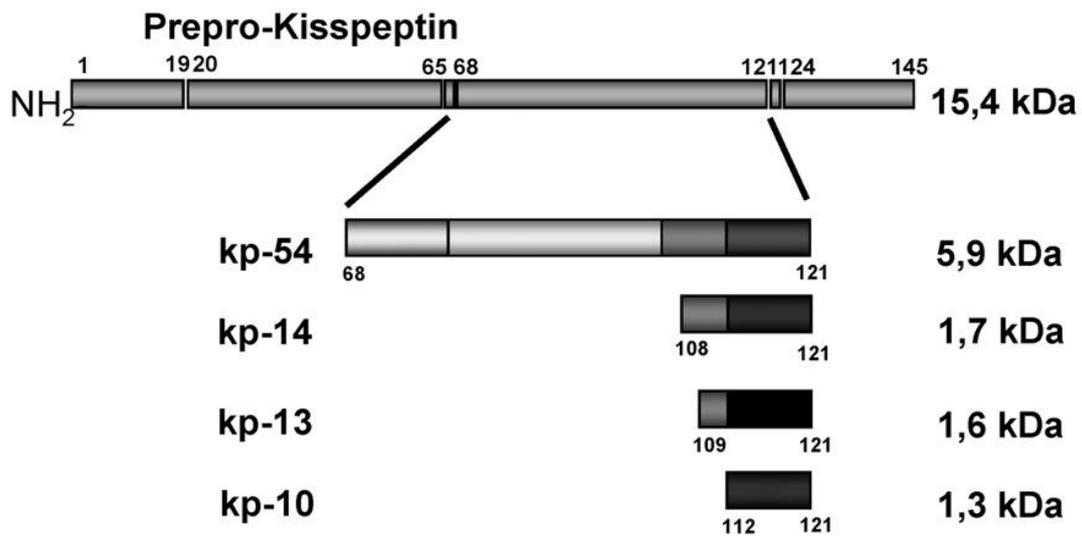
Los alineamientos de las secuencias mencionadas se realizaron por ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

ESTADO DEL ARTE

Kisspeptina

Recientemente, numerosos estudios han demostrado que el sistema kiss1/kiss1r juega un papel esencial en el control neuroendocrino del eje reproductor de los vertebrados, donde actúa estimulando la secreción de GnRH a nivel hipotalámico (Gutiérrez, 2009; Akazome *et al.*, 2010). Las kisspeptinas (kps) son péptidos que actúan como reguladores de las neuronas hipotalámicas secretoras de GnRH, las cuales expresan kiss1r (Murphy, 2005; Roa y Tena-Sempere, 2007), a su vez, las neuronas GnRH regulan la secreción hipofisaria de FSH y LH, participando en el desarrollo y la maduración gonadal, el inicio de la pubertad y en el funcionamiento normal del eje reproductivo (Li *et al.*, 2009-a; Selvaraj *et al.*, 2010; Tena-Sempere, 2010; Yang *et al.*, 2010). Las kps son originadas por el procesamiento proteolítico diferencial de un precursor común codificado por el gen *kiss1*, resultando en una preproteína de 145 aminoácidos, que da lugar como producto mayoritario a la kisspeptina-54 (kp-54) también llamada metastina; nombre que se le dio debido a que originalmente se descubrió por su capacidad para inhibir la metástasis tumoral en melanoma maligno humano (Lee *et al.*, 1996; Ohtaki *et al.*, 2001). También se originan una serie de fragmentos más cortos, los cuales presentan una secuencia más conservada, como la kisspeptina-14 (kp-14) y kisspeptina-13 (kp-13) que, junto con la kisspeptina-10 (kp-10), comparten los 10 aminoácidos de la región C-terminal (Figura 1-A). Esta región presenta el extremo terminal arginina-fenilalanina (Arg-Phe-NH₂) característico de la súper familia de péptidos RF-amida, con funciones de neurotransmisión y neuromodulación (Kriegsfeld, 2006; Popa *et al.*, 2008; Castaño *et al.*, 2009; Gutiérrez, 2009; Yang *et al.*, 2010) (Figura 1-B). Kp-10 es la región más conservada y biológicamente activa, responsable de la unión de las kisspeptinas a su receptor, GPR54, recientemente nombrado receptor a kisspeptina (kissr) y de su activación (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001).

A)



B)

Homo sapiens YNWNSFGLRFGKR
kp-10

Figura 1. A) Esquema de la estructura de prepro-kisspeptina, donde se muestran sus derivados proteolíticos, incluyendo kp-54 o metastina y kp-10, la cual representa la parte mejor conservada y biológicamente activa, responsable de la unión al receptor kissr (Tomado de Castaño *et al.*, 2009). B) Deducción de la secuencia de aminoácidos de kp de humano, la parte subraya muestra los 10 a.a. que codifican para kp-10, donde se puede observar la región terminal RF-amida.

En los últimos años, nuevos estudios han demostrado la existencia de dos genes parálogos para kisspeptina, llamándolos *kiss1* y *kiss2*, ambos genes han sido identificados en varias especies de peces y anfibios, donde se ha demostrado que tanto *kiss1* como *kiss2* son potentes activadores del eje reproductor HPG a través de sus diferentes receptores (Felip *et al.*, 2009; Kitahashi *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009-a; Akazome *et al.*, 2010), ya que también se han reportado varios genes que codifican para diferentes subtipos de receptores a kisspeptina (Parhar *et al.*, 2004; Mohamed *et al.*, 2007; Nocillado *et al.*, 2007; Filby *et al.*, 2008; Mechaly *et al.*, 2009-2010).

Se sabe que en mamíferos, particularmente en rata, ratón, oveja y primates, kisspeptina es secretada a nivel hipotalámico por neuronas de los núcleos anteroventral periventricular (AVPV), periventricular (PeN) y arcuato (ARC), y en el área preóptica (POA) (Gottsch *et al.*, 2004; Roa y Tena-Sempere, 2007). A la fecha, solo se ha reportado un gen de kisspeptina (*kiss1*) para mamíferos placentados y un marsupial, la zarigüeya (*Monodelphis domestica*). La

excepción para este grupo de vertebrados es el ornitorrinco o platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), un monotrema, el cual presenta los dos genes kisspeptina (*kiss1* y *kiss2*) (Lee *et al.*, 2009).

En ratón, la expresión de *kiss1* en el núcleo ARC está negativamente regulada por el estradiol y la testosterona, mientras que en los núcleos AVPV y PeN presenta una regulación positiva. Por lo tanto, se propone que en mamíferos, las neuronas *kiss1* de los núcleos hipotalámicos ARC y AVPV están implicadas en la regulación del eje reproductivo HPG por medio de los mecanismos de retroalimentación negativa y positiva, respectivamente, inhibiendo la expresión de *kiss1* en el núcleo ARC e induciéndola en el núcleo AVPV (Smith *et al.*, 2005-a, b) (Figura 2). Aunque para el núcleo PeN no se ha descrito aún el mecanismo de retroalimentación (*feedback*). Además, también se ha demostrado la coexpresión del mRNA de GnRH y *kissr* en el POA de rata (Irwig *et al.*, 2004), aportando más evidencias de que el sistema kisspeptina/*kissr* es un poderoso factor que regula las funciones neuronales de GnRH.

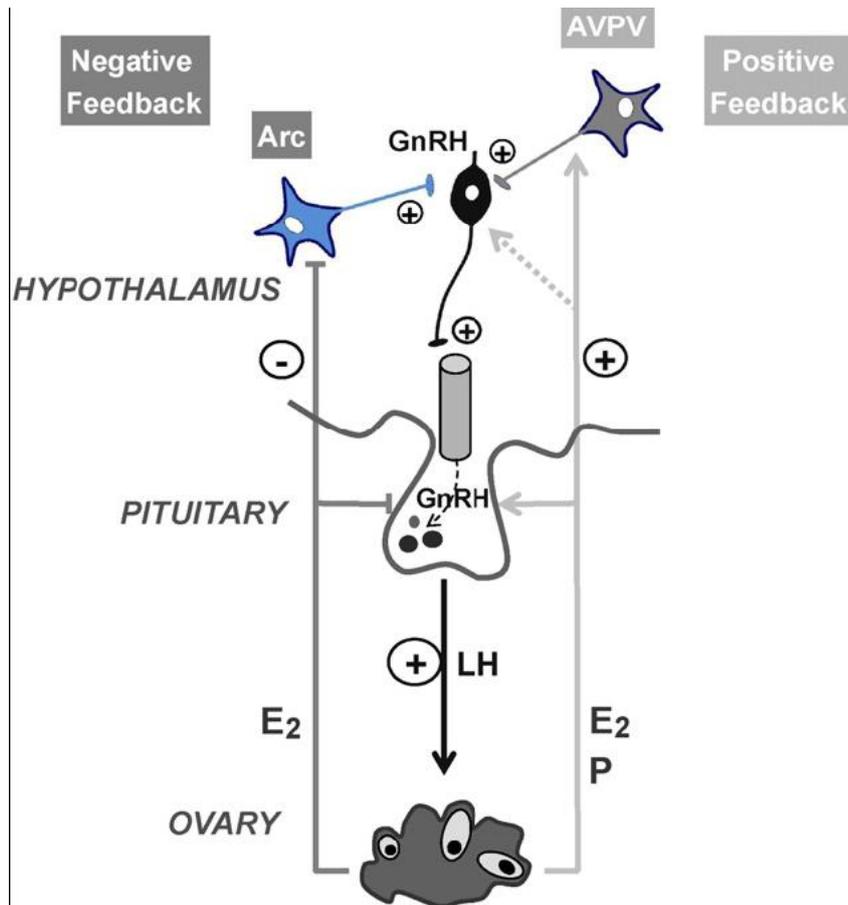


Figura 2. Modelo de los mecanismos de retroalimentación negativa (*feedback*-) y positiva (*feedback*+). Kp es secretada a nivel hipotalámico por neuronas de los núcleos AVPV y ARC, donde estimula la secreción de GnRH, la cual, induce la secreción de gonadotropinas (LH y FSH). Estas hormonas son liberadas al torrente sanguíneo, alcanzando las gónadas, en las que inducen la liberación de esteroides sexuales, los cuales, a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (*feedback*-) regulan la actividad de las neuronas kiss1 a nivel hipotalámico, inhibiendo la expresión de *kiss1* en el núcleo ARC por medio del estrógeno (E2), e induciéndola en el núcleo AVPV por medio de receptores de progesterona (P), contribuyendo a la retroalimentación positiva (*feedback*+) (Tomado de Tena-Sempere, 2010).

Interesantemente, en vertebrados no mamíferos como agnatos y teleósteos, se ha descrito la presencia de dos genes *kiss*, denominados *kiss1* y *kiss2* (Figura 3). Esta característica se ha observado en *Petromyzon marinus* (lamprea), una especie de agnato, y también en algunos teleósteos de agua dulce como *Oryzias latipes* (medaka), *Danio rerio* (pez cebra) y *Carassius auratus* (pez dorado), un teleósteo marino, *Dicentrarchus labrax* (lubina) y una especie de perciforme pelágico, *Scomber japonicus* (chub mackerel) (Kanda *et al.*, 2008; Felip *et al.*, 2009; Kitahashi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009-b; Selvaraj *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). Sin embargo, esta situación no es universal, ya que también se ha reportado sólo la presencia de *kiss2* en algunas especies de peces, como es el caso de *Ephinephelus coioides* (orange-spotted grouper) (Shi *et al.*, 2010), *Takifugu niphobles* (pequeño pez globo) (Shahjahan *et al.*, 2010),

Hippoglossus hippoglossus (Atlantic halibut) (Mechaly *et al.*, 2010) y *Solea senegalensis* (Mechaly *et al.*, 2011), siendo posible que, en efecto, sólo exista la presencia de una isoforma de kisspeptina en estas especies, o que posiblemente la otra isoforma esté por descubrirse. Además existe un novedoso caso en *Solea senegalensis*, reportándose una segunda isoforma de kiss2 generada por splicing alternativo, denominándolas: *Ss kiss2_v1* y *Ss kiss2_v2*; donde la primera produce la proteína funcional y la segunda presenta una retención intrónica (Mechaly *et al.*, 2011).

Las dos formas de kisspeptina también se han encontrado en anfibios, como *Xenopus laevis* y *Siluriana tropicalis* (Lee *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2009), mientras que en *Anolis carolinensis*, un pequeño lagarto, sólo se ha encontrado kiss2 (Lee *et al.*, 2009). El hecho de que kiss2 sólo se encuentre en anfibios, reptiles y algunas especies de peces, y de que esté ausente en mamíferos (con excepción de *Ornithorhynchus anatinus*), podría estar indicando que este gen parálogo muy probablemente pudo perderse durante la evolución.

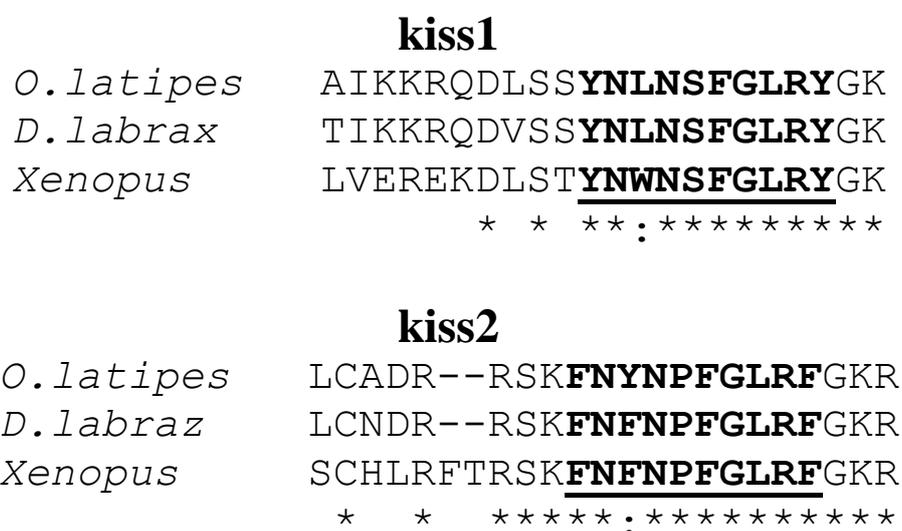


Figura 3. Alineamiento por ClustalW2 de las secuencias de aminoácidos (a.a.) de kiss1 y kiss2 de medaka (*Oryzias latipes*), lubina (*Dicentrachus labrax*) y *Xenopus laevis*. Se puede observar la diferencia en los a.a. terminales: RY corresponde a kiss1 y RF a kiss2. También al inicio de la secuencia se observa una diferencia, kiss1 presenta una Y y kiss2 una F. En la tercera posición de ambas secuencias se puede apreciar una pérdida de similitud. En la quinta posición difieren una de otra, kiss1 con una S y kiss2 con una P, pero individualmente parecen ser conservadas. El (*) muestra las regiones bien conservadas, los (:) las regiones semiconservadas.

En *Oryzias latipes* la expresión de kiss1 se detectó en neuronas de los núcleos hipotalámicos ventral tuberal (NVT), posterior periventricular (NPPv) y en la habérnula; mientras que kiss2 fue encontrada en neuronas del núcleo *recessus lateralis* (NLR). Se sabe que en esta especie

kiss1 es la que participa en el control reproductivo (Kanda *et al.*, 2008; Kitahashi *et al.*, 2009). En *Danio rerio*, las neuronas que expresan kiss1 fueron localizadas en la región ventromedial de la habérnula, y las neuronas kiss2 en el núcleo posterior tuberal y en las zonas dorsal y ventral del hipotálamo periventricular, así como en el POA y el mesencéfalo (Kitahashi *et al.*, 2009; Servili *et al.*, 2011). Ambos grupos científicos proponen que tanto kiss1 como kiss2 regulan la reproducción en el pez cebra, pero que kiss2 es más potente estimulando la síntesis y secreción de gonadotropinas. Un estudio en *Dicentrarchus labrax* demostró que kiss2 posee una mejor actividad estimuladora sobre la secreción de FSH y LH en esta especie (Felip *et al.*, 2009). En *Carassius auratus*, kiss1 actúa directamente en la hipófisis, induciendo la secreción de LH, prolactina (PRL) y hormona del crecimiento (GH) (Yang *et al.*, 2010). La inyección intraperitoneal de kiss2 en un organismo maduro de *Ephinephelus coioides* promovió el incremento de los niveles del mRNA de GnRH1 en el hipotálamo y de FSH en la hipófisis. Estos resultados proveen una amplia evidencia de la participación de kisspeptina en la reproducción de peces; sin embargo, las acciones específicas ejercidas tanto por kiss1 como por kiss2, aún no son muy claras, ya que estas varían a través de las especies.

Para ambos grupos de vertebrados (mamíferos y teleósteos), kisspeptina estimula la secreción de GnRH a nivel hipotalámico (Murphy, 2005). En el caso de mamíferos esta llega a la adenohipófisis por medio del sistema porta hipotálamo-hipofisario, mientras que en teleósteos las neuronas GnRHérgicas inervan la hipófisis directamente. El resultado es la secreción de gonadotropinas (LH y FSH). Estas hormonas son liberadas al torrente sanguíneo, alcanzando las gónadas, en las que estimulan la esteroidogénesis y la gametogénesis (Roa y Tena-Sempere, 2007; Kanda *et al.*, 2008).

Basados en análisis filogenéticos y de sintenia, Felip *et al.*, (2009), proponen que *kiss1* y *kiss2* se encuentran presentes muy tempranamente en la evolución de los vertebrados, ya que la coexistencia de ambos genes en un solo genoma puede ser detectada desde Agnathos (lamprea) hasta Gnathostomados (teleósteos, anfibios y monotrema). Aunque a la fecha, la ausencia de ambos genes en el linaje de las aves no se ha podido explicar, interesantemente, las regiones del Cromosoma 26 y del Cromosoma 1 de pollo, guardan cierta relación de sintenia con regiones que contienen *kiss1* y *kiss2*, respectivamente, en otras especies de vertebrados. Por lo tanto, se cree que en las aves pudieron haberse perdido ambos genes. Aun así, este grupo taxonómico conserva la mayoría de los blancos río abajo (“*downstream*”) de la

D.labrax T-----CGCCTTCAGCACA 89
O.latipes T-----CACCTTCGACAGA 25
H.sapiens TCCTGCCCAGGCCAGGACTGAGGCAAGCCTCAAGGCACTTCTAGGACCTGCCTCTTCTCA 149
M.musculus T-----GTA-----GACCTGCCCTTCCTC 33
Monodelphis TT-----CA-----GACAAGTTTGCTCCTG 82
Xenopus TTATTTTTT-----TAAA-----AAGTGGGTGTTTTAGT 124
C.auratus T-----AGTTTTGGTCCCA 49
D.ferio T-----CTTCTCTTTCTGA 56
*

D.labrax CCGAG--GAAT---TTCAGCAGGTCTGTAC-----GATG-----CCCCGACTCATTG 132
O.latipes ---AA--GAGT---TTC-----T-----GGCG-----GCTCCACTAATAG 53
H.sapiens CCAAGATGAA---CTCACTGGTTTCTTGGC-----AGCTA-----CTGCTTTTCTCT 192
M.musculus CCAGAATGAT---CTCAATGGCTTCTTGGC-----AGCTG-----CTGCTTCTCTCT 76
Monodelphis CTGAGCC-A-----GGAAGCATCT---TCATCTG-----CAAGCT---CT 114
Xenopus CAAGGCTGAAAACATACGCTATTTTGTGGCCAACAAAGATGATTATGCCCGGTTTGTAT 184
C.auratus -----AA----CGCATTAA-----AAATG-----AACCTACTTACCA 77
D.ferio -----AA----CACATTAA-----AA-TG-----ATGCTGCTTACTG 83
* * *

D.labrax TCGCTCTGAT-----GATAGCTGCTTTGTCAACAG-----AGATCTA--- 169
O.latipes TTGCTGTGAT-----AATGTGGGCTGTGTTGGCAC-----AGGTGTGGAC 93
H.sapiens CTGTGCC-ACCCACTTTGGGGAGCCATTAGAAAAGGTGGCCTCTGTGGGGAATTCTAGAC 251
M.musculus CTGTGTC-GCCACCTATGGGGAGCCGCTGGCAAAAGTG-----AAGCCTGGAT 123
Monodelphis CTGAGCC-A-----GGAAGCATCT---TCATCTG-----ACTTTTCTGC 149
Xenopus CTGTTCTTGTTTTTTGTGGGAATTCACTTGGGAAGGTC-----TGACCGCACAGCCAGAA 239
C.auratus TAATTTT-----GATGTTGTGAGGGGCAAATG-----GGGATCCATAC 115
D.ferio TCATATT-----GATGTTGTGAGTGGCGAGGG-----TACACACAAAC 121

D.labrax ----CAACACCAGC-A-----TGATATCCAGCTACCACAGTAAAGATCAGGTAA-----T 214
O.latipes CGCCCACCACCGCC-A-----TCA-GTCCACCATCCACACAGAAGACAATGCTC-----T 141
H.sapiens C-CACAG-GCCAGC-A---GCTAGAATCCCTGGGCCTC-CTGGCCCCGGGGAGCAGAGC 304
M.musculus C-CACAG-GCCAGC-A---GTCCGGACCCAGGAACCTCGTTAATGCCTGGGAAAAGGAAT 177
Monodelphis T-C-TAG-GACAGCCA---GGTCG-ACTCCTGGCCAC-CTGATTCCTGGGAAAGGGAGG 201
Xenopus A-TGCAG-GTGAGCTATATAGCCAAGTGCCTGGACAGAGTCAGTGGCTCGGCTC-----C 292
C.auratus CCTTCAG-GCCATT-----TTCAATATTATTTAAAAAATGAAACTCCTAAAAAA---TC 165
D.ferio CCCTCTG-GGCATT-----TTCAGTATTACTTAGAAGATGAAACTCCAGAGGAAACATC 174

D.labrax ACTCAAAGCCCTGAGAGATTTAAGCCA--TGCATCAATACTGGCATCAGCAA-AGAAT-- 269
O.latipes GCTCAAGATGCTGAGGAATTTCAACTA--C-----CTCTCTTCTCCTCCA-TGAA--- 186
H.sapiens CTGCCGTGACCCGAGAGG---AAGCCAGCTGCTACT--GCCAGGCTGAGCCGTCGGG-- 357
M.musculus C-GCGGTATGCAGAGAGC---AAGCC---TGGGTCT--GCAGGGCTGCGGCTCGTAG-- 226
Monodelphis CCACAATGCTTGGAGA-----AGCC---AGAACA--GACAGGACAGACA--CAGAGAC 247
Xenopus TTGCTGTGCTCCTGAAAAG---ATGCCAGACTCATCGAGGGCAGAACAGACACCTGTAC-- 347
C.auratus ACTCCAGGTTCTCAGGGG---AACTG-----ATACTCGTCCCACGGCT-- 205
D.ferio ACTCCGGGTCCTCAGGGG---AACAG-----ACACTCGTCCCACAGAT-- 214
* * *

D.labrax -TCCGGGAATTTACCTGCT-GATAAG-GT-----CCA-----TTCAGCTGATGG---AA 312
O.latipes -----GGAGTG-----GCC-AAAGAGTGA-----TCG-----TTCATCTGATGG---AG 221
H.sapiens -GACCTCGCTGTCCCCGCCCCCGAGAGC----TCCGGGAGCCCCCAGCAGCCGGGCCTG 412
M.musculus -GTCGTGCGCCATGCCCGCCGTTGAGGGC----CCCAGGGGCGCCAGCGGCC---CCTG 278
Monodelphis TGGCCATGCTCTGTCCCTCTGATGAGGCC----TCTG---ACCCCTTGTGGCCAGGTCTG 300
Xenopus TTGCTCTATTATG-CCGCAGGAAGAAATCATTTTCTACAGGACATCACTGGTCTA--CAG 404
C.auratus -----GGATCT--CCGTCTCCAAGCTC-----TCAGGGCACTTCTCCA--TGAGTGCA 250
D.ferio -----GGATCT--CCTCCATCTAAACTC-----TCAGCGCTCTTCTCCA--TGGGTGCA 259
*

D.labrax AGTTTCCCAGGTCAGAATGGTTGATCTCAAAGCT---GGTCCTCCCTCAGACTATCAAG 368
O.latipes GGACTCCAATGGTGGGATGCTGGATGGTGAAGGC---GCTCCACCCTGTGGCTATAAAG 277
H.sapiens TCCGCCCCCAGC--AGCCGCAGATCCCCGCACCCAGGGCGCGGTGCTGGTGCAGCGGG 470
M.musculus TGTGCCTCCCGC--AGTCGCTGATCCCTGCGCCCCGCGGAGCGGTGCTGGTGCAGCGGG 336
Monodelphis TGTCCCACTCGC--AGCCGACTGATCACAGCACCCCAAGGAGCATGCTGGTGGAGCGGG 358

Xenopus	GCTCCCTACTGCCTAGCCAATCTATTTCTGCACCTACAGGGGAGTTCTTGGTGGAAAGAG	464
C.auratus	AATCCTCACCG---AAACACACGGGGGTGGGCTCC---TGTAACCTTACACAAAAGG	304
D.rerio	GGTCTCAGAA---AAACACATGGTGGTGGTCTCC---AGAAAGTCTTACACCAAGAGG	313
	* *	
D.labrax	AAACGTCAAGATGTGTCCTCA TACAACCTCAACTCCTTTGGTCTACGTTAC GGAAAGTGA	428
O.latipes	AAACGCCAGGACCTGTCCCTCA TACAACCTAAACTCCTTTGGTCTCCGTTAT GGAAAATGA	337
H.sapiens	AGA---AGGACCTGCCGAAC TACAACCTGGAACCTCTTCGGCCTGCGCTTC GGCAAGCGG	526
M.musculus	AGA---AGGACCTGTCCAC TACAACCTGGAACCTCTTCGGCCTGCGCTAC GGCAGGAGG	392
Monodelphis	AGA---AGGACATGTCAAC TACAATTGGAACCTCTTCGGCCTGCGTTAT GGGAAGCGC	414
Xenopus	AAA---AAGATCTCTAC TACAACCTGGAACCTCTTTGGCCTCAGATAT GGCAAGAGA	520
C.auratus	AAGC---AAAAGGTTGCATAC TACAATCTCAATTCCTTCGGCCTCCGCTAT GGAAAAAAA	361
D.rerio	AGAC---AGAATGTAGCTTAC TACAATCTCAACTCCTTCGGCCTCCGCTAT GGCAAGAGA	370
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
D.labrax	CACAAGACCTGATGTCTGTTGT-TA-----TTCTGTGTT-AG---AGCT	467
O.latipes	CA-----GGTGTCTGCT-----	349
H.sapiens	GAGG----CGGCACCAGGGAA-CCACGGCAGAAGCGCTGGGCGGGGCTGAG---GGCG	576
M.musculus	CAGG----CGGCGC--GGG-----CAGCA-----CGGGGCTGAG---TGCT	424
Monodelphis	CAGA-----CAA-AC-----CGGGG--AAA---GGCT	435
Xenopus	GACT-----CCGGGTCAGAAA-TT-----CCAAGGTGAAG---ATCT	554
C.auratus	AAGCAAAA--CATGCTTGCTGAGTTTAAACAAAAAATACCTATGAAGTGAAGTGAAGGACC	419
D.rerio	GAACAGGA--CATGCTCACAGATTGAAACAGAAAAGTCCTGTAAAGTGAAG---GACC	424
	*	
D.labrax	GATATT-----TTTATATATTTTCTTTGTACA-----	494
O.latipes	--TGTT-----TTCTCCTGGTTTGTTTGT-----	371
H.sapiens	CA--GG-----TGCGGGGCAGTGAACCTCAGACCCCAAAGGA	611
M.musculus	GG--GC-----TGCAGG----TGGATTGTAGA-----	445
Monodelphis	CG--GG-----TGC-----	442
Xenopus	GGTAGT-----TCTAAGCAAAAAGCAAAAGATCTTTGATCA	591
C.auratus	ACTGGG-----TCGG-GCTAAATC--TTGTGTAT-----TGTTCTTTGAGGTT-----	459
D.rerio	AATAATGTTCTTTGGTGTTTTATCATTACGTAATAACATGTTTTCTGTTTTTA-----	478
D.labrax	-----TTCAGAGTGGGA-----	506
O.latipes	-----TTC-----	374
H.sapiens	GTCAGAGCATGCGGGGCGGGGCGGGGGCGGGGACGTAGGGCTAAGGGAGGGGGC----	667
M.musculus	-----GGCCAAGCAGGG-----	458
Monodelphis	-----	
Xenopus	CTTTTTTT-----GCAGTCAGAGATACCTTATACTGACTAA----	627
C.auratus	--TTATATTA----ATTAGAAATGATCTGT---AGATTGATTTCTAGACAAAACAT----	506
D.rerio	-TTTCTGTTATTTTGTGGGTGTAATTAGTTTCATTTGGGTGTTTAGGTAGGGGATATGT	537
D.labrax	-----	
O.latipes	-----	
H.sapiens	-----GCTGGAGCTTCCA-----	680
M.musculus	-----AGCTTCTA-----	466
Monodelphis	-----	
Xenopus	-----TATTAATCCCCTACA-----G	643
C.auratus	-----TAGTGCAATAGTTACAGACTTTAGTAA-CTGTGAGGA-----CACGTTT	550
D.rerio	TTTTTTTTGTGTATTATTTTCTG---TTGGTCCTCTCTGAGGTATTTGCC TTCATGTTT	594
D.labrax	---AAAGAAAAGTGTAAATGTCACTGTTGAAAGCTCAATAAAAAATGTTGGTTAAAGATT--	561
O.latipes	-----TGTA-----AATAAAA-TATCA-----	392
H.sapiens	---ACCCGAGGCAATAAAAGAAATGTTGCG---TAAC TCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA---	731
M.musculus	---GACTTGTGCAATAAAAGCAATGCTGC---CGTC-----	496
Monodelphis	-----CTGCC---TGA-----	450
Xenopus	GAGATGACATCGATTGGAATACTATTGTGGATTGTCCTCCACTAATAAATAAAGCCTGG	703
C.auratus	T----GCTAGTAATAAATACAAATGTTTTGT--CAAACAATCTGAATAAAGGATTTTAT	604
D.rerio	TAGGTGTTAAAAAGAAAGAAAAATACAAGA----AAAAAGACAAATAAACGGACCTTAC	650

B) kiss1 /a.a.

```

H.sapiens      --MNSLVSWQLLLFLCATHFGEPLKVASVGNRSRPTGQQLESGLLLA----- 45
M.musculus    --MISMASWQLLLLLLCVATYGEPLAKVK----PGSTGQQSGPQELVN----- 41
Monodelphis   --MRSSVYWQLLLLLLSVSPFGETSDKFAPVENPGRTGTSSLSQEASSSDFSALGQPGRLL 58
D.rerio       -----MMLLTVILMLSVARVHTNPSGHFQYYLEDETPEETSLRVLRG----- 42
C.auratus     -----MNLLTIILMLSGANGDPYPSGHFQYYLKNETPKK-SLQVLRG----- 41
O.latipes     -----MAAPLIVAVIMWAVLAQVWTAHHRHQSTIHTEDNALLKMLRN----- 42
D.labrax      -----MPR-LIVALMIAALSTEIYNTS--MISSYHSKDQVILKALRD----- 39
Xenopus       MIMPGLYLFLFLLGIHLGRSDRTARNAGELYSQVPGQSQWLGSLLCP----- 47
                .: :
                .

H.sapiens     ----PGEQSLPCTERKPAATARLSRRGTSLSPPPESSGSPQQPGLSAPHSRQIPAPQGAV
101
M.musculus    ----AWEKESRYAESKPGSAGLRARR-SSPCPPVEGPAGRQRP-LCASRSRLIPAPRGAV 95
Monodelphis   AHLIPWEGRPQCLE-KPEQTG-QTQRLAMLCPSDEAS-DPLWPGLCPTRSRLITAPQGAL
115
D.rerio       -----TDTRP-----TDGSPPSKLSALFMSGAGPQKNTWWWSPEPSP-- 78
C.auratus     -----TDTRP-----TAGSPSPKLSGHFSMSANPHRNTRGWAPVKP-- 77
O.latipes     -----FNYLS--SSMKEWP--KSDR--SSDGGTPMVGCWVMVKALHPV 78
D.labrax      -----LSHASILASAKNSGNLPADKVHSADGKFPARSEWLI SKLVLPQ 81
Xenopus       -----EKMPDSSRAEQTPVLALLCRRKKSFSSTGHHWSTGSLLPQSISAPTGEF 96

H.sapiens     LVQREKDLPNYNWNSFGLRFGKREAAPGNHGRSAGRG-- 138
M.musculus    LVQREKDLSTYNWNSFGLRYGRRQAAR-----AARG-- 126
Monodelphis   LVEREKDMSTYNWNSFGLRYGKRQTNRG-----KARVPA 149
D.rerio       YTKRRQNVAYYNLNSFGLRYGKREQDMLTRLKQKSPVK- 116
C.auratus     YTKRKQKVAYYNLNSFGLRYGKKKQNMLAEFKQKIPMK- 115
O.latipes     AIKKRQDLSSYNLNSFGLRYGK----- 100
D.labrax      TIKKRQDVSSYNLNSFGLRYGK----- 103
Xenopus       LVEREKDLSTYNWNSFGLRYGKRDSGSENSKVKIW---- 131
                :.:.:.:. ** *.:.:.:.:.::

```

Figura 4. Alineamiento por Clustaw2 de las secuencias de kiss1 de algunos vertebrados. Humano (*H. sapiens*), ratón (*M. musculus*), zarigüeya (*Monodelphis domestica*), pez cebra (*D. rerio*), pez dorado (*C. auratus*), medaka (*O. latipes*) y *Xenopus laevis* (rana africana). La parte que codifica para kp-10 está subrayada y encerrada en color gris. A) Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de kiss1, se observa claramente el poco grado de conservación de kisspeptina, incluso los 30 a.a. que codifican para kp-10 muestran poca similitud. En este caso se puede observar que no hay una relación entre los 3 grupos de vertebrados. B) Deducción y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de kiss1. También se aprecia muy poca similitud, aunque la parte de kp-10 se muestra más conservada en forma de a.a. Aquí se aprecia cierto alineamiento por clado, poniendo en primer lugar a los mamíferos, siguiendo los peces y por último los anfibios. El (*) muestra las regiones bien conservadas, los (:) las regiones semiconservadas y el (.) las regiones con más de una modificación.


```

O.latipes TCCCTCTGATGTCCCTGTT-TCA-----GGAGGT--GCCACCTGA-----AC 376
Xenopus   CCCGACGGCTCCTCCCTTTTCTGCTGAAGCTGAAGGACAAACGGTGCAGCG-----AGA 507
          * * * * *

D.rerio   TCAAG-----TTTTCGTCAGAAGGATGCGATTTTCTT---GGTTGAAA---ACTTGGG 452
C.auratus TCACA-----TTTCTGTCAG-----TCTTCATCAGAATGGAAA---ACTGTGG 477
D.labrax  GTGTC-----TTCCTCTGAGGACTT----GTGTCCCATTGGTGAAAAGTCAACATGTG 455
O.latipes ACCCC-----CCCCCCC-AGGA-----TGTC-----AAGG---ACATGTG 407
Xenopus   GCGTCGGGGAATCCTGCTGAG-----CCCC-----AAA----ACTTTGT 542
          ** * ** **

D.rerio   GTAA-----TTACGATTCAGG-CACACTTTGCC-----GGTT-----A 484
C.auratus GTAA-----TTAT--TTCAGG-CACGCCCTGCC-----TGTT-----A 507
D.labrax  ACAAGTCTTTCCATGTGTTTAAAA-TAGGCCTTTTACTTCAGATAAAAAGGTTTCGGTGAA 514
O.latipes G-----GTGGG--GAGG-TGGG-----GGTT--AGAGGG 431
Xenopus   ATTC-----TCTCCGTTAAAGGGCAAGTTCTCTC-----AGAT-----A 576
          * * * * *

D.rerio   TTATGCTTTT-----ATGGAATTAGAAAAGCGCACTTTGTTT---TATT 524
C.auratus TTATGCTTTTTTTTTTTATTTCCAGTCATGGAATTTTATGGCGCGCTT-GTTT---CAGT 563
D.labrax  TTAAACTTTTTTGT-----ACCTACCTTTACTGTG-ACATGATTTGAACATG 559
O.latipes TCAGCCTTTTTTGT-----AC--AGTGTT--TGTG-AAATTATT---CATA 468
Xenopus   TTTATTTTCT-----ACCTGCGGTGACGCCGGGAG--ATTC---CACT 614
          * ** * * * *

D.rerio   GAGTTAT-----TGTAGCCTATTTGTGCAATAAACGTTTTTA-----T 561
C.auratus CCGTAAT-----TGTA-----TTTGTGCAATAAACGTTTTTA-----T 595
D.labrax  GAAGAATACGAGAGAAAAACACACTTACAACAG---TGTAACAGAATGCTTTAGACAAT 616
O.latipes ATCAAA-----CAACA-----TGGAAATAAAA-----491
Xenopus   GTATCGT-----CCTGTTTGGGTTTACTTTGCCTTCA-----646
          * **

D.rerio   ATTGTT---AAAAA-----AAAAAAAA---580
C.auratus TTTGTTT-GAAAAA-----AAAAAAAAAT--617
D.labrax  ATCATTTTGTAATAATGTTTGCTTTTCTCATCTCAGTTTTTAAGAAATCTAAATGAAACAG 676
O.latipes -----GAAAAA-----AAGTGAAA---505
Xenopus   --TGTTCTGCCAA-----657
          **

D.rerio   -----AAAAAA---A-----588
C.auratus -----TTGTACCTACCTGTAAAAAA-----AAAAAAAAAA-----648
D.labrax  TCCAATGGACTTTTATGATGATGGGAAAGGAGTAGTTCATTTACAATAAAAGCACTGTA 736
O.latipes -----AAAAAA-----AAAAAA-----519
Xenopus   -----

```

B) kiss2 /a.a.

```

D.rerio   MNTRALILFMSAMVSQS-TAMRAILTDM DTP--EPMPDPKPRFLSMERRQFEE-----50
C.auratus MKIKALILFMSAMICQS-TALRASFTDMDISDSEPVPSKQHYLSVERRQFDE-----52
D.labrax  MRLVALVVVCGLILGQDGGSVGAALPELDSA---QRTGATGSLLSALRRRTAG-----50
O.latipes MTRAVVLVLCALIAAQDGGRAAAGLAARDSG---RGTHATG-VLWILRRSEDD-----49
Xenopus   ---MLLLLLLTLVISQHAVGGTMFRGDEEGLELEEIGGPETSYPEGDPREKSESYELIPS 57
          : : * : *

D.rerio   ---PSASDDASLCLFFIQEKDETSQISCKHRLARSKFNYNPFGLRFGKRNEATTSD--SDR 105
C.auratus ---PSSDDASLCLFFFQEKDESTHISCQHRLPRGKFNYNPFGLRFGKRNEAPT-----DR 104
D.labrax  ---EFFGEDSSPCFSLRENEEQRQLLCNDR--RSKFNYNPFGLRFGKRYIYRRA---LKR 102
O.latipes ---SAAG-GAGLCSLREDDE--QLLCADR--RSKFNYNPFGLRFGKRAPPFRG---AHR 98
Xenopus   ADTLSPGRSNICYFIREGRLESQLSCHLRFTRSKFNYNPFGLRFGKRARGDANGEGLAP 117
          : * : * : * * * : * * * * *

```

D.rerio	LKHKHL LPMMLYL RKQLETS-----	125
C.auratus	PKHKHL LPMMIYL RKQSETT-----	124
D.labrax	ARTNRFSPLFLFSRELEVPT-----	122
O.latipes	ARAMKLPLMSLFQ---EVPT-----	115
Xenopus	LVPRLLPFLLKLDKRCSESVGESC	143
	: : : .	

Figura 5. Alineamiento por Clustaw2 de las secuencias de kiss2 de algunos teleósteos y un anfibio. Pez cebra (*D. rerio*), pez dorado (*C. auratus*), lubina (*D. labrax*), medaka (*O. latipes*) y *Xenopus tropicalis* (sapo africano). La parte que codifica para kp2-10 está subrayada y encerrada en color gris. A) Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de kiss2, se observa el poco grado de conservación de la secuencia, aunque kiss2 parece ser un poco más conservada que kiss1. B) Deducción y alineamiento de las secuencias de aminoácidos de kiss2. Al igual que para kiss1, la parte que codifica para kp2-10 se muestra más conservada en forma de a.a. En ambos casos se puede ver un alineamiento en base al grupo taxonómico, agrupando primero las 4 secuencias de peces y dejando al último la de anfibio. El (*) muestra las regiones bien conservadas, los (:) la regiones semiconservadas y el (.) las regiones con más de una modificación.

A pesar de que kp-10 es la parte más conservada de las secuencias, se ha demostrado que los decapeptidos generados para kiss1 y kiss2, difieren en algunas posiciones específicas. Realizando una comparación de los diez aminoácidos de kp1-10 y kp2-10 de algunos grupos de vertebrados, se puede considerar una clasificación bastante buena para los péptidos de kp-10 (Roa *et al.*, 2008; Mechaly *et al.*, 2011). Notoriamente, kiss2 se distingue de la forma RY-amida (presente en kiss1 de algunos vertebrados no mamíferos y de peces óseos), presentando la forma RF-amida (la cual se encuentra más estrechamente vinculada con la forma kiss1 de humanos y otros primates) (Figura 6). Otra característica importante de resaltar es que kiss1 presenta una tirosina (Y) en la primer posición y una fenilalanina (F) o una Y en la última posición, correspondiendo a las formas Y-Y y Y-F respectivamente. Por el contrario, kiss2 siempre corresponde a la forma F-F, presentando una fenilalanina tanto en la primer como en la última posición (Figuras 3 y 6) (Kriegsfeld, 2006; van Aerle *et al.*, 2008; Biran *et al.*, 2009; Felip *et al.*, 2009; Kitahashi *et al.*, 2009; Mechaly *et al.*, 2011). La parte menos conservada se encuentra en el tercer aminoácido, donde se observa muy poca homología, incluso entre una misma isoforma, aunque todos los aminoácidos presentes en esta posición tienen algo en común, son altamente hidrofóbicos (Akazome *et al.*, 2010). En la posición del quinto aminoácido existe una variación entre kiss1 y kiss2, donde kiss1 siempre presenta una serina (S) y kiss2 siempre una prolina (P), pero individualmente parecen ser conservadas. Las posiciones 2, 4 y de la 6 a la 9 se encuentran muy bien conservadas entre ambas isoformas de kiss (Figuras 3 y 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
<i>H. sapiens</i> kiss1 (Y-F)	Y	N	W	N	S	F	G	L	R	F	GKR	RF-amida
<i>M. musculus</i> kiss1 (Y-Y)	Y	N	W	N	S	F	G	L	R	Y	GRR	RY-amida
<i>Monodelphis</i> kiss1 (Y-Y)	Y	N	W	N	S	F	G	L	R	Y	GKR	RY-amida
<i>D. rerio</i> kiss1 (Y-Y)	Y	N	L	N	S	F	G	L	R	Y	GKR	RY-amida
<i>C. auratus</i> kiss1 (Y-Y)	Y	N	L	N	S	F	G	L	R	Y	GKK	RY-amida
<i>O. latipes</i> kiss1 (Y-Y)	Y	N	L	N	S	F	G	L	R	Y	GK-	RY-amida
<i>D. labrax</i> kiss1 (Y-Y)	Y	N	L	N	S	F	G	L	R	Y	GK-	RY-amida
<i>Xenopus</i> kiss1 (Y-Y)	Y	N	W	N	S	F	G	L	R	Y	GKR	RY-amida
<i>D. rerio</i> kiss2 (F-F)	F	N	Y	N	P	F	G	L	R	F	GKR	RF-amida
<i>C. auratus</i> kiss2 (F-F)	F	N	Y	N	P	F	G	L	R	F	GKR	RF-amida
<i>O. latipes</i> kiss2 (F-F)	F	N	Y	N	P	F	G	L	R	F	GKR	RF-amida
<i>D. labrax</i> kiss2 (F-F)	F	N	F	N	P	F	G	L	R	F	GKR	RF-amida
<i>Xenopus</i> kiss2 (F-F)	F	N	F	N	P	F	G	L	R	F	GKR	RF-amida

Figura 6. Comparación de las secuencias de a.a. de kiss 1 y kiss2 de humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*), zarigüeya (*Monodelphis domestica*), pez cebra (*Danio rerio*), pez dorado (*Carassius auratus*), medaka (*Oryzias latipes*), lubina (*Dicentrachus labrax*) y *Xenopus laevis*. Los residuos conservados entre kiss1 y kiss2 están marcados con **gris claro**, los residuos específicos para kiss1 con **gris oscuro** y los residuos únicos de kiss2 con **negro**. Se puede apreciar el extremo terminal RF-amida de kiss1 de humano, similar a kiss2 de peces y anfibios, mientras que kiss1 de mamíferos no primates y de otros vertebrados como peces y anfibios, siempre pertenecen a la familia de neuropéptidos RY-amida. También se puede observar que kiss1 puede presentar la forma Y-F (en caso de humanos) o Y-Y (para los demás vertebrados) y kiss2 siempre presenta la forma F-F. En todos los casos kiss1 presenta una S en la quinta posición, mientras que kiss2 una P.

En conclusión, *kiss1* y *kis2* serían genes parálogos, los cuales podrían tener un mismo o diferente fin funcional. En muchos casos, uno de los parálogos es funcionalmente perdido, convirtiéndose en un pseudogen, denominando a dicha característica como una “no-funcionalización”. Menos frecuente, una de las copias adquiere una nueva función mientras que la otra preserva la función ancestral, llamando a la primera: “neo-funcionalización”. En un tercer escenario, ambos parálogos pueden perder un subconjunto diferente de las funciones, complementándose entre sí para cumplir con la función ancestral: “sub-funcionalización”. Con todos los datos que se tienen referente a las dos formas de kiss, se puede pensar que estos genes divergieron en los diferentes linajes, adquiriendo una de estas tres nuevas características sobre la función que desempeñan regulando el eje HPG (Felip *et al.*, 2009; Akazome *et al.*, 2010).

Basándose en estos datos, Akazome *et al.*, (2010), proponen un esquema hipotético sobre la evolución de kiss en vertebrados, donde se sugiere un vertebrado ancestral que haya poseído ambos genes de *kiss*. Ambas formas de *kiss* persistirían en agnatos, como la lamprea

(*Petromyzon marinus*). Después, tanto *kiss1* como *kiss2* se perderían en aves, mientras que en los reptiles sólo se conservaría *kiss2*. En el linaje de los mamíferos, se conservaría *kiss1* en marsupiales y placentados, mientras que los monotremas conservarían ambos genes, *kiss1* y *kiss2*. Por otra parte, en los teleósteos ocurriría una evolución independiente a la de los tetrápodos, donde podrían conservarse ambos genes y/o perderse solo uno (*kiss1*), pero nunca *kiss2*, el cual siempre está presente en este grupo de vertebrados (Figura 7).

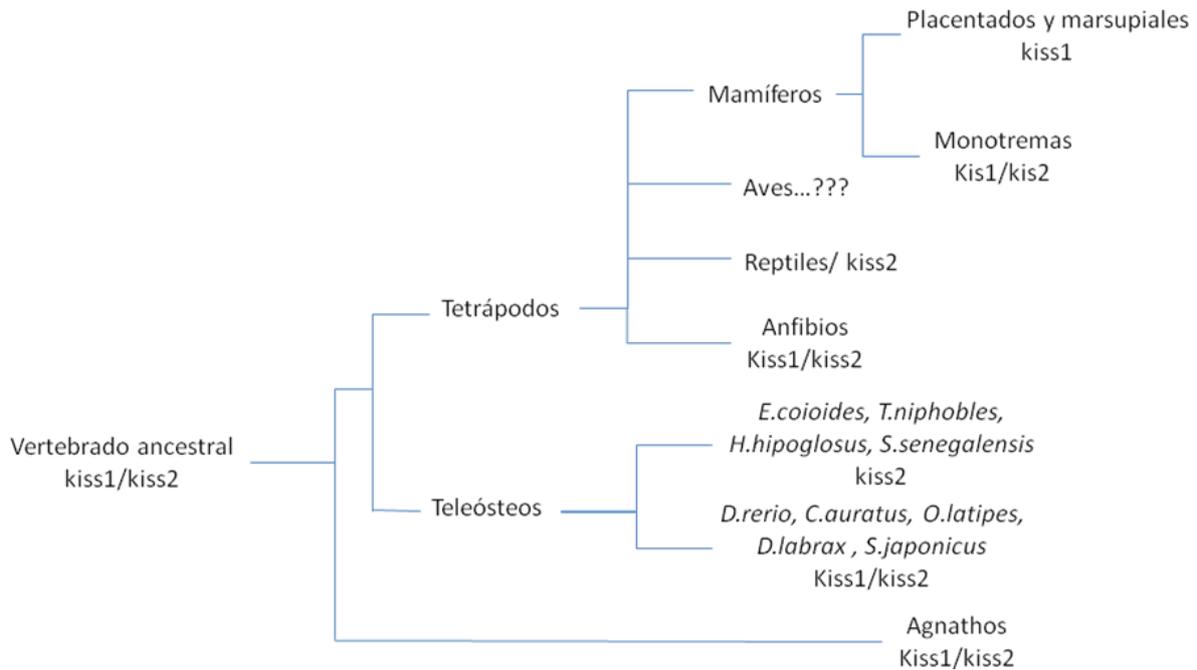


Figura 7. Esquema hipotético donde se muestra la evolución de *kiss* en los vertebrados. Se aprecia en qué linaje se conservaron ambos genes (anfibios, teleósteos, agnatos y monotremas), en cuáles se perdió *kiss2* (mamíferos placentados y marsupiales) y en cuáles se perdió *kiss1* (reptiles y algunos peces). Interesantemente se pueden perder ambos, como se observa en aves (Modificado de Akazome *et al.*, 2010).

Tomando en cuenta la propuesta de este esquema, se facilita la explicación de cuál de los dos genes de *kiss* ejerce la función reguladora sobre el eje HPG en los diferentes linajes. Por ejemplo, en las especies que sólo conservan un gen *kiss* (ya sea *kiss1* o *kiss2*), evidentemente ese gen es el que actúa sobre las funciones reproductivas; esta característica se refleja claramente en los mamíferos placentados y marsupiales, donde *kiss1* es quien regula el eje HPG, y en *Anolis carolinensis* (representado a los reptiles) y algunos peces como el pez globo y *Solea senegalensis*, donde *kiss2* es quien regula la reproducción. Por otra parte, las especies que presentan ambos parálogos, como es el caso de monotremas, anfibios y varias especies de teleósteos, se puede dar un proceso de neo-funcionalización, donde uno de los parálogos preserva su función original sobre el eje reproductor y el otro asume funciones no

reproductivas; como en el pez medaka y el pez dorado, donde kiss1 es quien está involucrado en la regulación del eje reproductivo (Kanda *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009-b). También puede presentarse el caso de que ambos parálogos actúen sobre la función original, por ejemplo en el pez cebra, donde tanto kiss1 como kiss2 actúan sobre el eje HPG, a lo que se le conoce como una sub-funcionalización (Kitahashi *et al.*, 2009; Servili *et al.*, 2011). Un caso especial se observa en las aves, donde hay una especie de “degradación” o pérdida de ambos genes (Proudman *et al.*, 2006; Akazome *et al.*, 2010). Aunque la regulación del eje reproductivo HPG en las aves sigue modulado por GnRH, uno de los principales blancos “río abajo” de kisspeptina.

Receptor a kisspeptina: kissr/GPR54

Los receptores metabotrópicos difieren fundamentalmente de los receptores ionotrópicos en que afectan a los canales iónicos a través de la activación de las proteínas G. Todos los receptores metabotrópicos de neurotransmisores forman parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR's). GPR54 o kissr pertenece a esta familia de receptores (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001), los cuales se caracterizan por presentar una arquitectura molecular común, la cual consiste en 7 dominios transmembranales, de los cuales, mínimo cuatro contribuyen al sitio de fijación para el neurotransmisor, también cuentan con 3 asas extracelulares, 3 asas intracelulares, y sus respectivos extremos carboxilo y amino terminal; la región intracelular forma el sitio de unión a las proteínas G (Purves *et al.*, 2001; Bear *et al.*, 2007; Hadley & Levine, 2007).

Las proteínas G presentan una estructura heterotrimérica, esto quiere decir que están conformadas por tres subunidades (α , β y γ). Se les llamó proteínas G porque la subunidad α se une a nucleótidos de guanina, como guanosin trifosfato (GTP) y guanosin difosfato (GDP). En su estado inactivo existe GDP unido a la subunidad α , al activarse ocurre un intercambio de GDP por GTP y la subunidad α se disocia del complejo β - γ (Purves *et al.*, 2001; Bear *et al.*, 2007; Hadley & Levine, 2007; Kanda *et al.*, 2008; Castaño *et al.*, 2009) (Figura 8). Existen cuatro principales vías de señalización mediadas por proteínas G, las cuales actúan a través de efectores enzimáticos:

- 1) *G_s*: cuando la adeniliclasa (enzima presente en casi cualquier tipo celular) se une a una proteína G estimuladora (*G_s*) para generar AMPc (adenosin monofosfato cíclico) y activar así la proteincinasa A (PKA).
- 2) *G_i*: cuando la proteína G inhibe la adeniliclasa.
- 3) *G_o*: al activar a la fosfolipasa C se producen dos segundos mensajeros, inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), resultando en la liberación de calcio intracelular y la activación de la proteincinasa C (PKC), respectivamente.
- 4) *G_q*: la activación de la fosfolipasa A₂ produce la liberación de ácido araquidónico.

Los productos terminales de cada una de estas vías de señalización, pueden abrir o cerrar los canales iónicos de la célula blanco (Purves *et al.*, 2001; Hadley & Levine, 2007).

Kissr juega un papel muy importante en la correcta función del inicio de la pubertad atribuido al sistema kiss/kissr; ya que se ha reportado que mutaciones sufridas en este receptor (de humano y de rata) provocan desordenes en el correcto desempeño del sistema y alteraciones del eje reproductivo, como el hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003), retardo del crecimiento gonadal, infertilidad y decremento en las concentraciones de LH y FSH (Funes *et al.*, 2003; d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007). Además, la expresión del mRNA de kissr se ha detectado en hipófisis de rata (Richard *et al.*, 2009) y humano (Ohtaki *et al.*, 2001).

Al igual que para kisspeptina, se han reportado varias isoformas para el receptor, las cuales se denominan: *kiss1ra*, *kiss1rb*, *kiss2ra* y *kiss2rb* (Biran *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009-b). Demostrándose que *kiss1ra* de pez cebrá usa la vía de transducción de señales proteína cinasa C (PKC), mientras que *kiss1rb* puede actuar por ambas vías, PKC y proteína cinasa A (PKA). Tanto *kiss1ra* como *kiss1rb* de pez cebrá son altamente expresados en cerebro posterior, mientras que *kiss1ra* es moderadamente expresado en el telencéfalo y *kiss1rb* moderadamente en el diencéfalo y cerebro medio (Biran *et al.*, 2008). Además, tanto *kiss1* como *kiss2* han demostrado poder activar todos los subtipos de kissr's a diferentes

potencias (Lee *et al.*, 2009), sugiriendo que los receptores a kiss no son selectivos. Basándose en estos datos, se ha llegado a una discusión sobre las relaciones ligando-receptor y las funciones fisiológicas que estas impliquen, así como los eventos evolutivos a través de los cuales se ha modificando dicha interacción (Akazome *et al.*, 2010; Mechaly *et al.*, 2011).

Mecanismos de acción

En particular, el efecto estimulador de kisspeptina (ligando) sobre la secreción de GnRH a través de kissr (receptor) utiliza múltiples mecanismos de acción y vías de señalización, entre las que destacan la activación de la fosfolipasa C (PLC), con la subsecuente hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-difosfato (PIP₂) para generar inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ abre los canales de calcio (Ca⁺) del retículo endoplásmico (ER) permitiendo la salida y movilización de Ca⁺ intracelular al citoplasma y el cierre de los canales de potasio (K⁺). Por otra parte, el DAG activa la vía PKC, la cual puede activar vías relacionadas al mitógeno activador de proteínas cinasas (MAPK); especialmente ERK1, ERK2 y kinasa-p38 (p38k) (Castaño *et al.*, 2009; Oakley *et al.*, 2009; Tena-Sempere, 2010) (Figura 8).

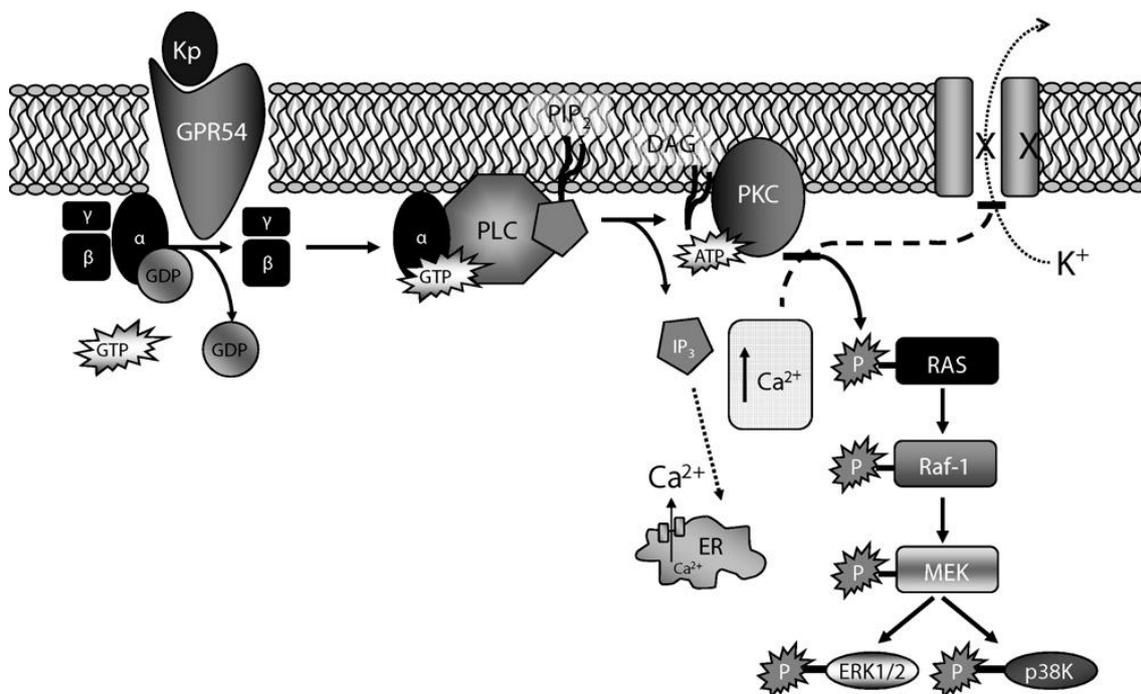


Figura 8. Activación de la vía de señalización por medio de la cual kisspeptina (kp) estimula la liberación de GnRH a través de GPR54. La cual involucra la activación de la PLC, movilización de Ca⁺ intracelular y reclutamiento de ERK1, ERK2 y kinasa-p38 (Tomado de Tena-Sempere, 2010).

Neuronas-kiss

También 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. Dado que en ratones macho, alrededor del 65% de las neuronas *kiss1* del núcleo ARC también expresan el receptor androgénico y alrededor del 90% expresan el receptor alfa de estrógeno ($ER\alpha$), mientras que en ratones hembra, la mayoría de las neuronas *kiss1* de los núcleos ARC, AVPV y PVN expresan $ER\alpha$ y sólo entre un 25% y 40% expresan el receptor a estrógeno beta ($ER\beta$). En ratas, alrededor del 60% al 70% de las neuronas *kiss1* de los núcleos ARC y AVPV expresan $ER\alpha$ y entre 10% y 20% expresan $ER\beta$. Por otra parte, en ovejas se encuentra una proporción de expresión más similar entre ambos subtipos de receptores, habiéndose reportado que el 90% de las neuronas *kiss1* del POA expresan $ER\alpha$ y el 86% expresan el receptor de progesterona (PR) (Gutiérrez, 2009). Otro dato interesante es que la mayoría de las neuronas GnRH-1 (>80%) de peces, ratas y ratones adultos, expresan mRNA de *kissr* (Irwing *et al.*, 2004; Parhar *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005).

Las neuronas *kiss1* del núcleo ARC de ovejas también expresan los neuropéptidos dinorfina A (DYNA) y neuroquinina B (NKB), ambos ligados al $ER\alpha$ y PR, e 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 kisspeptina (Goodman *et al.*, 2007; Gutiérrez, 2009; Tena-Sempere, 2010). Estos datos también se han reportado en otras especies de vertebrados como rata, ratón y humano (Oakley *et al.*, 2009). En el núcleo AVPV, las neuronas kisspeptina no expresan DYNA ni NKB en ninguna de las especies estudiadas, sin embargo, las neuronas kisspeptina del núcleo AVPV de ratón co-expresan tirosina hidroxilasa, sugiriendo que estas células también podrían ser dopaminérgicas (Goodman *et al.*, 2007; Gutiérrez, 2009; Oakley *et al.*, 2009; Tena-Sempere, 2010).

En medaka (*Oryzias latipes*) mediante la técnica de hibridación *in situ*, se encontraron dos poblaciones de neuronas kisspeptina en los núcleos hipotalámicos posterior paraventricular (NPPv) y ventral tuberal (NVT). Las neuronas *kiss1* del NVT varían en número por dimorfismo sexual en condiciones de crianza (machos >> hembras) y son sensibles a estrógenos ováricos, mientras que las neuronas del NPPv no se ven afectadas por ninguna de estas dos variantes. Esto sugiere cambios en la expresión del mRNA de *kiss1* por ser sensibles

a los esteroides, de acuerdo a los cambios de la estación y la etapa reproductiva, sugiriendo fuertemente que el sistema neuronal kisspeptina se encuentra involucrado en la regulación central de las funciones reproductivas (Kanda *et al.*, 2008; Oka, 2009).

Investigaciones electrofisiológicas han demostrado que kisspeptina ejerce un potente y prolongado efecto estimulador sobre la excitabilidad eléctrica de la mayoría de las neuronas GnRH (Dumalska *et al.*, 2008; Clarkson *et al.*, 2010). Esta acción estimuladora es resultado de la capacidad de kissr de activar múltiples canales iónicos en las neuronas GnRH, incluyendo canales de K⁺ y canales catiónicos no selectivos (Liu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008), mientras que una respuesta prolongada a estos impulsos, parece depender de una propiedad intrínseca de las neuronas GnRH (Dumalska *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008).

Con base en estudios por electrofisiología realizados en roedores hembra, se proponen tres principales mecanismos neurobiológicos mediante los cuales, kisspeptina activa las neuronas GnRH para llevar a cabo el inicio de la pubertad. 1) La expresión de altos niveles de mRNA de kissr en las neuronas GnRH conforme avanza la pubertad, 2) un leve incremento en la respuesta eléctrica de las neuronas GnRH por la activación de kissr, y 3) la “repentina” aparición de kisspeptina en los axones que rodean las dendritas proximales al soma de las neuronas GnRH, justo antes del inicio de la pubertad (Clarkson *et al.*, 2010). Estas características nos indican que la síntesis de kisspeptina de los núcleos AVPV y ARC, los cuales inerva las neuronas GnRH, inicia pocos días antes del comienzo de la pubertad.

Kiss y GnIH

Recientes estudios en ovejas hembra sugieren una interacción recíproca entre las kisspeptinas y el homólogo de mamífero de hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH), llamado RFRP, en el control central de las neuronas GnRH, pues, mientras que los niveles de kisspeptina en el núcleo ARC se ven elevados, los niveles de RFRP en el hipotálamo dorsomedial decrecen. Esto se observó en estados de máxima activación del eje gonadotrópico (por ejemplo en estado de crianza) (Smith *et al.*, 2008). Kisspeptina y RFRP pertenecen a la súper familia de neuropéptidos RF-amida, dichos péptidos juegan roles opuestos en términos del control de la secreción de gonadotropinas, resultando en un balance entre estimulación (kp) e inhibición (RFRP) (Kriegsfeld, 2006). Aunque GnIH parece tener

un papel crucial en el control reproductivo de las aves, el gen *kiss1* no se ha identificado en ellas (Tsutsui *et al.*, 2007; Tena-Sempere, 2010).

Expresión de kiss fuera del sistema nervioso

En adición al papel fundamental que ejerce el sistema kisspeptina/kissr sobre el control neuroendocrino del eje reproductor, se ha incrementado la evidencia que muestra que la señalización de kisspeptina esta relacionada en otros procesos y funciones, tales como el sistema inmune (Cardon *et al.*, 2009), la supresión de la metástasis (Lee *et al.*, 1996), la vasoconstricción (Mead *et al.*, 2007) y la estimulación de la secreción de insulina (Bowe *et al.*, 2009). Además de que los transcritos, tanto de *kiss1* como de *kiss2*, se han detectado en otros órganos aparte del cerebro, el hipotálamo y la hipófisis. Por ejemplo: en las gónadas, la placenta, los pulmones, las branquias, el corazón, el hígado, el riñón, el intestino, el páncreas y el tejido adiposo (Oakley *et al.*, 2009; Selvaraj *et al.*, 2010).

En las gónadas, tanto *kiss1* como *kiss1r* se expresan en testículo y ovario, pero 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 con ratas se ha sugerido un efecto directo de kisspeptina en el testículo, pues la administración subcutánea de kp-54 produce un incremento de LH, y un aumento significativo de las concentraciones de testosterona. En ese mismo estudio, la administración crónica subcutánea de kp-54 también provoca degeneración testicular (Gutiérrez, 2009). La administración repetitiva de kisspeptina en ratas hembra prepuberales incrementa los niveles de LH en plasma y adelanta la apertura vaginal en un promedio de 4 días, esto se observó en comparación con los controles, asociándolo con un inicio precoz de la pubertad (Navarro *et al.*, 2004). Los niveles de *kiss1* en ovario de rata varían en una manera cíclica, incrementándose durante la ovulación (Castellano *et al.*, 2006).

La expresión de *kiss1* y *kiss1r* en placenta humana es especialmente elevada durante el primer trimestre de la gestación, disminuyendo a lo largo del embarazo. 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 mRNA de *kiss1* se expresa en el sincitiotrofoblasto, el cual representa la interfase entre la placenta y la sangre materna, teniendo un papel central en el transporte de nutrientes de la madre al feto. Estos datos

sugieren que la placenta es la mayor fuente de kisspeptinas durante el embarazo (Lee *et al.*, 1996; Horikoshi *et al.*, 2003; Hiden *et al.*, 2007).

En pez cebra (*Danio rerio*) y medaka (*Oryzias latipes*), se encontró que kiss2 es expresado en el cerebro, el testículo, el ovario, el intestino, el riñón y el corazón, participando tanto en procesos reproductivos como en procesos no reproductivos (Kitahashi *et al.*, 2009; Servili *et al.*, 2011). En pez dorado (*Carassius auratus*) se reportó la presencia de kiss1, kiss2 y sus respectivos receptores, kiss1r y kiss2r, de ellos, el gen *kiss1* es fuertemente expresado en el techo óptico (*tectum* óptico), el intestino, el riñón y el testículo, mientras que el gen *kiss2* se encontró principalmente en el hipotálamo, el telencéfalo, el techo óptico, el tálamo, el tejido adiposo, el riñón, el corazón y las gónadas (Li *et al.*, 2009-b). En el pez cebra se expresan los 4 péptidos: kiss1, kiss2, kiss1ra y kiss1rb. Tanto kiss1 como kiss2 se expresan en el cerebro (kiss1 en la región ventromedial de la habérnula y kiss2 en el núcleo posterior tuberal y en el hipotálamo ventricular), y en tejidos periféricos, como en el testículo y el intestino. Mientras que, individualmente kiss1 es expresado en la hipófisis, el tejido adiposo, el páncreas, el corazón y el hígado, y kiss2 en el ovario y el riñón (van Aerle *et al.*, 2008; Biran *et al.*, 2009; Kitahashi *et al.*, 2009; Servili *et al.*, 2011). En *Dicentrarchus labrax* kiss1 y kiss2 son expresados principalmente en el cerebro y el tejido gonadal (Felip *et al.*, 2009). El hecho de tener dos formas diferentes de kiss, que se expresen en diferentes tejidos y que una pueda perderse en uno u otro organismo, nos lleva a la incógnita de cual será la función exacta de cada isoforma, ya que los efectos ejercidos por kiss1 y kiss2 pueden variar a través de las especies.

Expresión de kiss por dimorfismo sexual

Está bien documentado que existen cambios en la expresión de kisspeptina de acuerdo al dimorfismo sexual y al estado de maduración del organismo. Por ejemplo, en peces se ha demostrado una diferencia en los niveles de la expresión de kiss1 y kiss2 entre machos y hembras (Kanda *et al.*, 2008; Felip *et al.*, 2009; Kitahashi *et al.*, 2009; Selvaraj *et al.*, 2010; Mechaly *et al.*, 2011). En un estudio con *Scomber japonicus* se demostró que en machos de esta especie, los niveles cerebrales de ambas isoformas decrecen gradualmente en estados inmaduros de espermación, cayendo a los niveles mínimos durante el periodo de post-desove. En contraste, los niveles de kiss1 del cerebro de hembras no muestran una variación significativa a lo largo de las diferentes etapas gonadales. Sin embargo, los niveles de kiss2

fluctúan de igual manera que en los machos, decayendo gradualmente en estados inmaduros y después del desove. En contraste, los niveles de kiss1 en las gónadas se ven altamente elevados durante la espermación y la vitelogénesis tardía (Selvaraj *et al.*, 2010). En medaka también se ha reportado una variación por dimorfismo sexual, donde las neuronas kiss1 del NVT tienen mayor expresión en machos en condiciones de crianza (Kanda *et al.*, 2008).

Un hecho interesante es que los niveles de kiss1 y kiss2 son altamente expresados en el tejido adiposo de peces machos en espermación y de hembras con vitelogénesis tardía, aunque no está del todo claro si la expresión en las gónadas por dimorfismo sexual está relacionada con la expresión en el tejido adiposo (Selvaraj *et al.*, 2010). Una buena evidencia para pensar en una relación, es que en el tejido adiposo de rata la expresión de kiss1 está regulada por esteroides sexuales y la ingesta de alimento (Brown *et al.*, 2008), abriendo camino a investigaciones sobre el papel que ejerce kisspeptina en la reproducción a través del metabolismo.

Regulación metabólica a través de kiss

Otras investigaciones han mostrado un particular interés sobre el posible papel que desempeña kisspeptina sobre la relación entre el balance de energía y la reproducción. Se sabe que el eje reproductivo es inhibido por un balance negativo de energía, entre otros factores, influyen la mala ingesta de comida y/o el ayuno (Luque *et al.*, 2007; Popa *et al.*, 2008; Castellano *et al.*, 2005, 2009). A pesar de este hecho, estudios que relacionan el balance de energía y la reproducción vía señalización kisspeptina, son muy limitados. En ratón (*Mus musculus*) y rhesus macaco (*Macaca mulatta*) las condiciones de ayuno disminuye los niveles de mRNA de kisspeptina y su receptor (Luque *et al.*, 2007; Wahab *et al.*, 2008). En rata, la expresión de kiss1 en el tejido adiposo se encuentra regulada por la ingesta de alimento (Brown *et al.*, 2008). La leptina, hormona secretada por el tejido adiposo la cual actúa como factor permisivo, informando al cerebro sobre las reservas de energía para el inicio de la pubertad y que además influye en la ingesta de alimento, el metabolismo y la reproducción; puede regular la expresión de kiss1 e influir en la pubertad y la fertilidad, sugiriendo una conexión entre la energía del metabolismo, nutrición, reproducción y fertilidad (Tena-Sempere, 2006; Castellano *et al.*, 2009; Li, 2009-a). De igual manera, la co-localización de mRNA de kiss1 y el receptor de leptina ha sido confirmada mediante hibridación *in situ* en los núcleos ARC y dorsomedial de rata. Sugiriendo que las neuronas

kiss1 son blancos directos de la leptina, de esta forma es interesante elucidar la relación entre la ingesta de comida o el estado nutricional y la reproducción (Brown *et al.*, 2008; Kanda *et al.*, 2008; Li, 2009-a).

Cambios ambientales (fotoperíodo):

Existe una correlación entre el fotoperíodo y la expresión de kiss1/kiss1r. En la tilapia, la exposición a luz constante resulta en el decremento en la expresión de kissr (Martínez *et al.*, 2008), mientras que en medaka expuesto a condiciones de un día largo (14 horas de luz / 10 horas de oscuridad), permisivo al desarrollo reproductivo, muestra un gran número de neuronas kiss1 en el NVT, en comparación a cuando se es expuesto a condiciones de un día corto (10 horas de luz / 14 horas de oscuridad) (Elizur, 2009). Resultados similares también se han observado en hámster (Revel *et al.*, 2006-a y b). Este tipo de correlaciones soportan la idea de que algunos sistemas de señales hormonales, como kiss1/kiss1r, también puedan estar mediados por respuestas a factores ambientales como el fotoperíodo.

DISCUSIÓN

Con base en la recopilación de los datos obtenidos en las diversas investigaciones que se han realizado sobre las funciones que ejerce el sistema kisspeptina/kissr, se llega a la conclusión de que efectivamente este sistema ligando-receptor, desempeña un papel crucial sobre el control de la regulación neuroendocrina del eje reproductivo HPG de los vertebrados. Aunque este efecto parece estar mediado y relacionado con otros factores externos, tales como, índices nutricionales, factores ambientales y morfológicos. Por ejemplo, la diferencia en la expresión del mRNA de las kisspeptinas por dimorfismo sexual, cambios en la expresión de kiss1 y kiss2 por el fotoperíodo, las variaciones dentro de las etapas del ciclo reproductivo o su inhibición por un balance nutricional negativo.

A pesar de que su descubrimiento inicial fue como un potente inhibidor de la metástasis en tumores malignos de humano (Lee *et al.*, 1996), no se le dio seguimiento a esta investigación. Se le dio mucho mayor importancia a los efectos que demostró sobre el incremento en los niveles de FSH y LH en varias especies de mamíferos (Gottsch *et al.*, 2004; Irwig *et al.*, 2004).

Al parecer el sistema kisspeptina también puede estar relacionado con otras funciones o procesos fisiológicos, ya que se ha detectado la presencia de sus dos isoformas (kiss1 y kiss2) en órganos periféricos como el corazón, el hígado, el riñón, el páncreas, el estómago, los pulmones, las branquias, el tejido adiposo y las gónadas (Mead *et al.*, 2007; Cardon *et al.*, 2009; Oakley *et al.*, 2009; Selvaraj *et al.*, 2010). Los efectos que ejerce cada isoforma de kiss sobre estos órganos aún no están muy claros, ya que las investigaciones realizadas se enfocan mucho más hacia su papel en la reproducción. Recientemente se han realizado estudios donde se relaciona el estatus nutricional, la ingesta de alimento y la reproducción vía señalización kisspeptina (Luque *et al.*, 2007; Wahab *et al.*, 2008), demostrándose que con bajos niveles de energía o una mala alimentación, el eje reproductivo es inhibido, por consecuente, los niveles de kisspeptina también se ven afectados, lo que puede acarrear un retraso en la pubertad y bajos índices gonadosomáticos (Luque *et al.*, 2007; Popa *et al.*, 2008; Castellano *et al.*, 2005, 2009; Selvaraj *et al.*, 2010). La participación de las kisspeptinas dentro del ciclo reproductivo y la reproducción estacional también han sido comprobadas, demostrándose que los niveles tanto de esteroides sexuales como de kisspeptina muestran variaciones en las diferentes estaciones y etapas del ciclo reproductivo.

También se ha demostrado que tanto *kiss1* como *kiss2* son esenciales para los vertebrados, ya que se pueden encontrar desde peces mandibulados (como la lamprea), manteniéndose en algunos peces óseos como el pez cebra, el pez dorado, el pez medaka, etc., e incluso llegando a preservarse en anfibios (*Xenopus laevis* y *Siluriana tropicalis*). Sin embargo no siempre se conservan ambos genes, ya que algunos peces como el pez globo, *Solea senegalensis* y *E. coioides*, entre otros, han perdido *kiss1*, esta característica también se observa en *Anolis carolinensis* (un reptil). En estas especies donde sólo se conserva una de las dos isoformas de *kiss* (en este caso *kiss2*) es lógico que esta isoforma sea quien regule la reproducción. Avanzando en la evolución de los vertebrados, nos encontramos con que en tetrápodos también se pierde un gen de *kiss*, *kiss2*, conservándose únicamente *kiss1*. Esta característica se observa en mamíferos placentados como los primates, roedores y ovejas, y en un mamífero marsupial, la zarigüeya. En el linaje de los mamíferos existe un caso especial, el ornitorrinco, un monotrema, el cual presenta ambas formas de *kiss*, *kiss1* y *kiss2*. Un caso aun más especial es el de las aves, en donde se pierden ambos genes (Akazome *et al.*, 2010; Mechaly *et al.*, 2011).

A pesar de que kisspeptina es una molécula poco conservada, ya que se ha demostrado que sólo la parte que codifica para kp-10 es la que se mantiene un poco más conservada, a demostrado persistir a lo largo de la escala filogenética, tanto funcional como fisiológicamente. Ya que su principal acción sobre la secreción de GnRH es activada desde el hipotálamo, en todas las especies estudiadas.

Como se puede observar en los alineamientos de las figuras 4 y 5, las secuencias de aminoácidos tanto de *kiss1* como de *kiss2* se encuentran más conservadas que las secuencias de nucleótidos, lo que ha dificultado su aislamiento y estudio en diversas especies. A pesar de que estos alineamientos den la impresión de que las kisspeptinas estén algo conservadas entre diferentes grupos de vertebrados, la realidad es totalmente opuesta, ya que al introducir más secuencias al servicio de alineamiento de Clustalw2, el resultado es algo desalentador. Al introducir más secuencias de kisspeptina en un alineamiento este se empieza a “romper”, por ejemplo, al anexar secuencias de otros mamíferos y demás peces, se observa una separación de la parte que codifica para kp-10 (en el caso de nucleótidos), “partiendo” esta región en dos e incluso en tres partes (dependiendo el número de secuencias que se anexen). Por esta razón, en este trabajo se enfatiza el hecho de que las secuencias de kisspeptina son muy poco

conservadas en su estructura, aunque interesantemente su presencia se preserve a lo largo de la evolución de los vertebrados, donde sigue ejerciendo su función original sobre la regulación del eje HPG, hablese tanto de kiss1 como kiss2.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Como conclusión se recalca la participación de las kisspeptinas sobre la modulación del eje reproductor de los vertebrados, señalando la reciente aparición de dos isoformas (kiss1 y kiss2), donde una de ellas o ambas pueden preservar su función original o adquirir nuevas funciones. Por lo que es un tema muy interesante de estudiar y de comprender, el cual genera varias preguntas como:

- 1) ¿El por qué la presencia de dos isoformas de kiss?
- 2) ¿Cuál es la función específica de cada isoforma en cada especie y en cada órgano?
- 3) ¿Por qué algunos grupos de vertebrados preservan una o ambas formas de kiss y otros no?
- 4) ¿Qué pasa en los organismos que pierden ambas formas de kiss?

Bibliografía

- Akazome, Y., Kanda, S., Okubo, K., Oka, Y. 2010. Functional and evolutionary insights in to vertebrate kisspeptin systems from studies of fish brain. *Journal of Fish Biology*. 76: 161-182.
- Bear, F.M., Connors, W.B., Paradiso, A.M. 2007. NEUROSCIENCE Exploring the brain. 3a ed. Editorial, Lipponcott Williams & Wilkins.
- Biran, J., Ben-Dor, S. & Levavi-Sivan, B. 2008. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptins/kisspeptins receptor system in lower vertebrates. *Biology of Reproduction*. 79: 776–786.
- Bowe, J.E., King, A.J., Kinsey-Jones, J.S., Foot, V.L., Li, X.F., O’Byrne, K.T., Persaud, S.J., Jones, P.M., 2009. Kisspeptin stimulation of insulin secretion: mechanisms of action in mouse islets and rats. *Diabetologia*. 52: 855–862.
- Brown, R.E., Imran, S.A., Ur, E., Wilkinson, M., 2008. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 281: 64-72.
- Cardon, M., Ron-Harel, N., Cohen, H., Lewitus, G.M., Schwartz, M., 2009. Dysregulation of kisspeptin and neurogenesis at adolescence link inborn immune deficits to the late onset of abnormal sensorimotor gating in congenital psychological disorders. *Mol. Psychiatry*. 15: 415–425.
- Castaño, P.J., Martínez, F.A.J., Gutiérrez, P.E., Hubert, V., Tena-Sempere, M., Malagón, M.M. 2009. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do múltiple signals underlie function diversity ?. *Peptides*. 30: 10-15.
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., Vazquez, M.J., Vigo, E., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M. 2005. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*. 146: 3917–3925.
- Castellano, J.M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V.M., Bellido, C., 2006. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation. *Endocrinology*. 147: 4852-4862.
- Castellano, J.M., Roa, J., Luque, R.M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2009. KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. *Peptides*. 30: 139–145.
- Chen, C.C. y Fernald, R.D. 2008. GnRH and GnRH receptors: distribution, fuction and evolution. *Journal of Fish Biology*. 73:1099-1120.
- Clarkson, J., Han, S.K., Liu, X., Lee, K., Herbison, A.E. 2010. Neurobiological mechanisms undelying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. *Molecular and Cellular Endocrinology*. doi:10.1016/j.mce.2010.01.026.
- d’Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L. A., Dixon, J. P., Day, K., Leitch, H. G., Hendrick, A. G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M. B., Aparicio, S. A. & Colledge, W. H. 2007. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 10714–10719.

de Roux, N., Genin, E., Jean-Claude, C., Matsuda, F., Jean-Louis, C., Milgrom, E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 19: 10972-10976.

Domínguez, R. 1993. Las Secreciones Periódicas y la Regulación de la Ovulación. Comunicación Neuroendocrina, Bases Celulares y Moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. México. pp. 251-254.

Dumalska, I., Wu, M., Morosova, E., Liu, R., van den Pol, A. & Alreja, M. 2008. Excitatory effects of the puberty-initiating peptide kisspeptin and group I metabotropic glutamate receptor agonists differentiate two distinct subpopulations of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Journal of Neuroscience*. 28: 8003-8013.

Elizur, A. 2009. The KiSS1/GPR54 system in fish. *Peptides*. 30: 164-170.

Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., Gomez, A. 2009. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 312: 61-71.

Filby, A. L., van Aerle, R., Duitman, J. & Tyler, C. R. 2008. The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biology of Reproduction*. 78: 278-289.

Funes, S., Hedrick, J. A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F. J. & Gustafson, E. L. 2003. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312: 1357-1363.

Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coleen, L.M., de Oliveira, C.V., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., Clarke, I.J. 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*. 148: 5752-5760.

Gottsche, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 2004. A Role for Kisspeptins in the Regulation of Gonadotropin Secretion in the Mouse. *Endocrinology*. 145 (9): 4073-4077.

Gutiérrez, P.M.E. 2009. Mecanismos celulares y moleculares de acción del sistema KISS1/KISS1R en la hipófisis. *Tesis de Doctorado*. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, España. p193.

Hadley, M.E. & Levine, J.E. 2007. Endocrinology. Sixth Edition. Ed. PEARSON Prentice Hall. USA. pp. 500.

Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Herbison, A.E. 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *Journal of Neuroscience*. 25: 11349-11356.

Harmin, S.A., Crim, L.W., Wiegand, M.D., 1995. Plasma sex steroid profiles and the seasonal reproductive cycle in male and female winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Marine Biology*. 121: 601-610.

Hiden, U., Bilban, M., Knöfler, M., Desoye, G. 2007. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 8: 31-39.

Horikoshi, Y., Matsumoto, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Kitada, C., Usuki, S., Fujino, M. 2003. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as novel placenta-derived hormone in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 88: 914-919.

Irwig, M. S., Fraley, G. S., Smith, J. T., Acohido, B. V., Popa, S. M., Cunningham, M. J., Gottsch, M. L., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*. 80: 264–272.

Jacobi, E.J.S. y Martínez de la Escalera, G. 2008. Modulación estrogénica del eje reproductivo por acción directa sobre las neuronas GnRHérgicas: Regulación de la expresión de receptores adrenérgicos, estrogénicos y del sistema kisspeptina/GPR54 por 17 β -Estradiol en células GT1-7. *Tesis de Doctorado*. Instituto de Neurobiología, UNAM. Juriquilla, Querétaro.

Kanda, S., Akazome, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, N., Yamada, S., Tsukamura, H., Maeda, K., Oka, Y. 2008. Identification of KiSS-1 Product Kisspeptin and Steroid-Sensitive Sexually-Dimorphic Kisspeptin Neurons in Medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology*. 149: 2467-2476.

Kime, D.E., 1993. Classical and nonclassical reproductive steroids in fish. *Reviews of Fish Biology*. 3: 160-180.

Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S. 2009. Cloning and expresión of kiss2 in the zebrafish and medaka. *Endocrinology*. 150: 821–831.

Kordon, C., Drouva, S.V., Martínez de la Escalera, G., Weiner, R.I. 1994. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. *The Physiology of Reproduction*. Ed. Knobil E y Neil JD, New York. pp 1623-1629.

Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J-M., Le Poul, E., Bre´zillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M. 2001. The Metastasis Supresor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (37): 34631-34636.

Kriegsfeld, L.J. 2006. Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel. *Hormones and Behavior*. 50: 655–666.

Lee, J-H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R. 1996. KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene. *Journal of the National Cancer Institute*. 88: 1731-1737.

Lee, Y.R., Tsunekawa, K., Moon, M.J., Um, H.N., Hwang, J.I., Osugi, T., Otaki, N., Sunakawa, Y., Kim, K., Vaudry, H., Kwon, H.B., Seong, J.Y., Tsutsui, K. 2009. Molecular Evolution of Multiple Forms of Kisspeptins and GPR54 Receptor in Vertebrates. *Endocrinology*. 150: 2837-2846.

Li, D., Yu, W., Liu, M. 2009-a. Regulation of *KiSS1* gene expression. *Peptides*. 30: 130-138.

Li, S., Zhang, Y., Liu, Y., Huang, X., Huang, W., Lu, D., Zhu, P., Shi, Y., Cheng, C.H.K., Liu, X., Lin, H. 2009-b. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Endocrinology*. 201: 407–418.

Liu, X., Lee, K., Herbison, A.E. 2008. Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology*. 149: 4605-4614.

Luque, R.M., Kineman, D., Tena-Sempere, M. 2007. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: Análisis using mouse models and a cell line. *Endocrinology*. 148: 4601–4611.

Martinez, C.C.C., Minghetti, M., Migaud, H. 2008. GPR54 and rGnRH I gene expresión during the onset of puberty in Nile tilapia. *General and Comparative Endocrinology*. 156: 224-233.

- Mead, E.J., Maguire, J.J., Kuc, R.E., Davenport, A.P., 2007. Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. *Endocrinology*. 148: 140–147.
- Mechaly, A. S., Vinas, J. & Piferrer, F. 2009. Identification of two isoforms of the Kisspeptin-1 receptor (kiss1r) generated by alternative splicing in a modern teleost, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Biology of Reproduction*. 80: 60–69.
- Mechaly, A.S., Viñas, J., Murphy, C., Reith, M., Piferrer, F. 2010. Gene structure and regulation of the Kiss-1 receptor-2 (Kiss1r-2) in the Atlantic halibut: insights into the evolution and regulation of Kiss1r genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 317: 78–89.
- Mechaly, A.S., Viñas, J., Piferrer, F. 2011. Gene structure analysis of kisspeptin-2 (Kiss2) in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Characterization of two splice variants of Kiss2, and novel evidence for metabolic regulation of kisspeptin signaling in non-mammalian species. *Molecular and Cellular Endocrinology*. doi:10.1016/j.mce.2011.03.004.
- Mohamed, J. S., Benninghoff, A. D., Holt, G. J. & Khan, I. A. 2007. Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *Journal of Molecular Endocrinology*. 38: 235–244.
- Moon, J. S., Lee, Y. R., Oh da, Y., Hwang, J. I., Lee, J. Y., Kim, J. I., Vaudry, H., Kwon, H. B. & Seong, J. Y. 2009. Molecular cloning of the bullfrog kisspeptin receptor GPR54 with high sensitivity to *Xenopus* kisspeptin. *Peptides*. 30: 171–179.
- Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Mesón, P., Faull, R., Philpott, K.L., Harrison, D.C. 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (31): 28969-28975.
- Murphy, K.G. 2005. Kisspeptins: regulators of metástasis and hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Journal of Neuroendocrinology*. 17: 519-525.
- Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, J.M., Roa, J., Mayen, A., Bareiro, M.L., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M. 2004. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *Journal of Physiology*. 561: 379-386.
- Nocillado, J. N., Levavi-Sivan, B., Carrick, F. & Elizur, A. 2007. Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *General and Comparative Endocrinology*. 150: 278–287.
- Oakley, E.A., Donald, K.C., & Robert, A.S. 2009. Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews*. 30 (6): 713-743.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M. 2001. Metastasis supresor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 411: 613-617.

- Oka, Y. 2009. Three Types of Gonadotrophin-Releasing Hormone Neurones and Steroid-Sensitive Sexually Dimorphic Kisspeptin Neurones in Teleosts. *Journal of Neuroendocrinology*. 21: 334-338.
- Parhar, I. S., Ogawa, S. & Sakuma, Y. 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology*. 145: 3613–3618.
- Popa, S.M., Clifton, D.K., Steiner, R.A. 2008. The Role of Kisspeptins and GPR54 in the Neuroendocrine Regulation of Reproduction. *Annual Review of Physiology*. 70: 213-238.
- Proudman, J.A., Scanes, C.G., Johannsen, S.A., Berghman, L.R., Camp, M.J. 2006. Comparison of the ability of the three endogenous GnRHs to stimulate release of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in chickens. *Domestic Animal Endocrinology*. 3: 141-153.
- Purves, D., Augustine, J.G, Fitzpatrick, D., Lawrence, C.K., LaMantia, A-S., McNamara, O.J. 2001. Invitación a la Neurociencia. Ed, Médica Panamericana.
- Revel, F.G., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V. 2006-a. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Current Biology*. 16 (17): 1730-1735.
- Revel, F.G., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V. 2006-b. KiSS-1: a likely candidate for the photoperiodic control of reproduction in seasonal breeders. *Chronobiology International*. 23 (1-2): 277-287.
- Richard, N., Corvaisier, S., Camacho, E., Kottler, M.L. 2009. KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. *Peptides*. 30: 123-129.
- Roa, J., Tena-Sempere, M. 2007. KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *General and Comparative Endocrinology*. 153: 132–140.
- Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2008. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front. Neuroendocrinol*. 29: 48–69.
- Selvaraj, S., Kitano, H., Fujinaga, Y., Ohga, H., Yoneda, M., Yamaguchi, A., Shimizu, A., Matsuyama, M. 2010. Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two Kiss genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages. *General and Comparative Endocrinology*. 169: 28–38.
- Seminara, B.S., Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, S.J. Jr., Shagoury, K.J., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwino, M.K., Hendrick, G.A., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, B.U., Slaugenhaupt, A.S., Gusella, F.J., O’Rahilly, S., Carlton, B.L.M., Crowley, F.W. Jr., Aparicio, A.J.R.S., Colledge, H.W. 2003. The *GPR54* Gene as a Regulator of Puberty. *The New England Journal of Medicine*. 349: 1614-1627.
- Servili, A., Le Page, Y., Leprince, J., Caraty, A., Escobar, S., Parhar, I. S., Seong, J. Y., Vaudry, H., and Kah, O. 2011. Organization of Two Independent Kisspeptin Systems Derived from Evolutionary-Ancient Kiss Genes in the Brain of Zebrafish. *Endocrinology*. 152(4): 1527-1540.
- Shahjahan, M., Motohashi, E., Doi, H., Ando, H. 2010. Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. *General and Comparative Endocrinology*. 169: 48–57.

- Shi, Y., Zhang, Y., Li, S., Liu, Q., Lu, D., Liu, M., Meng, Z., Cheng, C.H.K., Liu, X., Lin, H. 2010. Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17 α -methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. ***Biology of Reproduction***. 83: 63–74.
- Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. 2005-a. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. ***Endocrinology***. 146: 3686–3692.
- Smith, J. T., Dungan, H. M., Stoll, E. A., Gottsch, M. L., Braun, R. E., Eacker, S. M., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. 2005-b. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. ***Endocrinology***. 146: 2976–2984.
- Smith, J.T., Coolen, L.M., Kriegsfeld, L.J., Sari, I.P., Jaafarzadehshirazi, M.R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., Ubuka, T., Bentley, G.E., Clarke, I.J., Lehman, M.N., 2008. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. ***Endocrinology***. 149: 5770–5782.
- Tena-Sempere, M. 2006. KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. ***Neuroendocrinology***. 83: 275–281.
- Tena-Sempere, M. 2010. Kisspeptin signaling in the brain: Recent developments and future challenges. ***Molecular and Cellular Endocrinology***. 314: 164-169.
- Tsutsui, K., Bentley, G.E., Ubuka, T., Saigoh, E., Yin, H., Osugi, T., Inoue, K., Chowdhury, V.S., Ukena, K., Ciccone, N., Sharp, P.J., Wingfield, J.C. 2007. The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). ***General and Comparative Endocrinology***. 153: 365–370.
- van Aerle, R., Kille, P., Lange, A., Tyler, C.R. 2008. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. ***Peptides***. 29: 57–64.
- Wahab, F., Aziz, F., Irfan, S., Zaman, W., Shahab, M. 2008. Short-term fasting attenuates the response of the HPG axis to kisspeptin challenge in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). ***Life Sci***. 83: 633–637.
- Yang, B., Jiang, Q., Chan, T., Ko, W.K.W., Wong, A.O.L. 2010. Goldfish kisspeptin: Molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. ***General and Comparative Endocrinology***. 165: 60-70.
- Zhang, C., Roepke, T.A., Kelly, M.J., Ronnekleiz, O.K. 2008. Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cation channels. ***Journal of Neuroscience***. 28: 4423-4434.