

Metabolic effects of growth hormone

John J. Kopchick,^{a,b,d} and Lucilaa Sackmann-Sala,^{c,d}

^aMolecular and Cellular Biology Program, Ohio University, Athens, Ohio. 45701

^bDepartment of Biomedical Sciences, College of Osteopathic Medicine, Ohio University, Athens, Ohio 45701.

^cDepartment of Biological Sciences, College of Arts and Sciences, Ohio University, Athens, Ohio. 45701

^dEdison Biotechnology Institute, Ohio University, Athens, Ohio. 45701

SUMMARY

Human growth hormone (hGH) is a key 'player' in the regulation of growth and metabolism. Several disease conditions, mostly involving growth retardation or GH deficiency, have been approved for recombinant hGH replacement therapy. The focus of this review centers on the metabolic effects of GH on carbohydrates, lipids and proteins. Current knowledge of GH signaling pathways and metabolic attributes of GH deficient and GH excess (acromegaly) states are described. Mouse models commonly used for the study of GH action also are compared to further illustrate the metabolic role of GH. Finally, the metabolic effects of a GH receptor antagonist (Pegvisomant) used for the treatment of acromegaly are mentioned.

BACKGROUND ON GH

hGH is a 22 kDa. protein (191 amino acids) secreted by the somatotrophic cells of the anterior pituitary lobe. The pattern of secretion is pulsatile, with more pronounced patterns in males than females¹. Although GH plays a central role in the regulation of body growth, it displays various biological effects, such as nitrogen retention, enhanced production of milk, lipolysis and anti-lipogenesis, and other diabetogenic-like effects (reviewed previously²).

To exert its action, one molecule of GH binds to two pre-dimerized GH receptors (GHRs) on the membrane of target cells³. Two distinct sites on the GH molecule recognize two unique sites on each of the GHRs^{4,5}. GH binding promotes a change in the receptor's conformation with subsequent activation of intracellular signaling systems³.

The biological actions of GH are mediated through direct signaling in cells of the target organ (direct action), or via stimulation of expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which is also a growth promoting molecule (indirect action) (reviewed previously²). This dual-effector theory of GH action was proposed in 1985 by Green et al.⁶. The theory states that GH promotes cellular differentiation directly, whereas cell proliferation is induced by IGF-1⁶. Intriguingly, attempting to discern the direct effects of GH from those of IGF-1 is a major challenge.

CLINICAL USES APPROVED FOR ADMINISTRATION OF RECOMBINANT hGH

Recombinant hGH may be administered in a number of clinical scenarios, and the indications of hGH therapy continue to expand with time. The guidelines for hGH use in adults and children were reviewed in 2003 by the American Association of Clinical Endocrinologists⁷. Current uses of hGH, as approved by the FDA, are for treatment of several conditions related to growth retardation in children including GH deficiency (GHD), chronic renal disease, Turner syndrome, Prader-Willi syndrome, children born small for gestational age (intrauterine growth retardation), and idiopathic short stature. In adults, hGH administration has been approved for GHD associated with a history of hypothalamic pituitary disorders and, more recently, for human immunodeficiency virus (HIV)-associated wasting⁷.

The benefits of the administration of hGH in adult patients who have reached a normal adult height are based on the various metabolic actions of GH including (1) increases in bone density, lean body mass, cardiac

Correspondence: John J. Kopchick, Ph.D., Goll-Ohio Professor of Molecular Biology, Edison Biotechnology Institute, Konneker Research Laboratories, 25 Water Tower Drive, The Ridges, Ohio University, Athens, Ohio 45701, USA. emailE-mail: kopchick@ohio.edu

contractility, and exercise capacity; (2) decrease in adipose tissue content; (3) recuperation of vitality^{7,8}. Additionally, the effects of GH on cardiac performance have been extensively studied by Colao and coworkers⁹⁻¹². Heart failure can develop both in GH deficiency and GH excess (acromegaly), however the pathogenesis in these two settings is different: hypertension, glucose intolerance and dyslipidemia are linked to hypertrophy in acromegalic heart disease¹⁰, whereas GHD is related to endothelial dysfunction, atherosclerosis and coronary disease, leading to ischemic cardiomyopathy⁹. Colao et al.^{11,12} found a significant correlation between severity of GHD and disturbance of cardiac performance and dyslipidemia in GHD adults. GH replacement therapy in GHD, and GHR antagonist (Pegvisomant, see below) administration in acromegaly have been shown to revert heart failure^{9,10,13}. Also, significant effects of GH replacement therapy and Pegvisomant treatment were found on cholesterol levels of GHD and acromegalic patients respectively^{14,15}.

In any case of hGH administration, a clinical endocrinologist should supervise the therapy and be on the lookout for side effects including the development of insulin resistance⁷. Further indications for hGH treatment require additional testing to eliminate controversies about the benefits of the treatment against safety issues⁷. For instance, effects of hGH therapy administered to healthy elderly individuals have been recently evaluated by Liu *et al.*¹⁶ They conclude that hGH therapy in the healthy elderly produces little benefits compared to high rates of adverse effects¹⁶.

THE DIABETOGENIC EFFECTS OF GH – ANTAGONISM OF INSULIN ACTION

In 1936, Houssay¹⁷ reported that hypophysectomy caused animals to develop hypoglycemia, often leading to death. He also demonstrated that injection of extracts from the anterior pituitary lobe increased insulin resistance in normal and hypophysectomized animals¹⁷. Thus, the anterior pituitary lobe was suggested to contain anti-insulin activity.

For years now, GH has been known to elicit such diabetogenic effects¹⁸⁻²⁵. In tissues that are sensitive to both GH and insulin, GH signaling can induce insulin resistance. Such an effect has been found to occur in muscle²⁶⁻³⁰, liver^{31,32} and white adipose tissue (WAT)^{26,30,33,34}.

Related to this diabetogenic activity of GH are patients with active acromegaly, who show insulin resistance and impaired glucose tolerance²⁵. In contrast, children with GHD have higher insulin-sensitivity and sometimes develop fasting hypoglycemia, similar to the animals studied by Houssay^{17,25}. In addition, administration of hGH in supraphysiological doses can induce insulin resistance similarly to that observed in

acromegaly; whereas treatment of acromegalic patients with a GHR antagonist (Pegvisomant) can help restore glucose tolerance and insulin sensitivity to normal values^{25,35,36}. As opposed to insulin, which functions post-prandially (promoting glucose uptake and oxidation, and lipogenesis), the metabolic action of GH is related to fasting periods, during which this hormone promotes lipid oxidation, protein conservation and inhibits glucose uptake and utilization³⁷. Finally, increased insulin-sensitivity is also observed in mice carrying a deletion of the GH receptor/binding protein gene (GHR/BP^{-/-} mice), which are GH insensitive³⁸.

In this article, we will describe the current understanding of GH's effects on carbohydrate, lipid and protein metabolism. For this, we will refer to clinical data as well as data obtained from different mouse models widely used for the study of GH action. These models include GHR/BP^{-/-} mice that are dwarf and have no GHRs such that GH signaling and action are void; giant mice carrying a bovine GH transgene (bGH mice) such that their levels of GH are constitutively increased; and dwarf mice that express a GHR antagonist (GHA mice), which have normal levels of GHRs but decreased GH signaling due to competitive inhibition by the GHA. The phenotypes of the three mouse models with a wild type control are¹⁶ shown in figure 1.

EFFECT OF GH ON CARBOHYDRATE METABOLISM

The liver, the main glycogen store in the body, is critical for the maintenance of adequate blood glucose levels. This organ can produce glucose through glycogenolysis and gluconeogenesis, metabolic pathways that are regulated by insulin. When blood glucose levels increase (inducing the secretion of insulin by the pancreas), insulin travels through the portal vein to the liver, reaching this organ before any other. The inhibitory effect of insulin on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis is, therefore, crucial for the maintenance of normal glycemia. Because the liver is also responsive to GH action, and given that GH antagonizes insulin activity, signaling of GH can affect glucose metabolism in the liver, allowing glycogenolysis and gluconeogenesis to occur in spite of high levels of insulin in the bloodstream^{19,39,40}.

In skeletal muscle, insulin promotes the translocation of the glucose transporter GLUT4 from the cytoplasm to the plasma membrane, allowing for glucose uptake. The presence of GH antagonizes insulin's action, so that glucose cannot enter the muscle cells and instead remains in the bloodstream. Studies by Rabinowitz et al.²⁶ in the 1960s revealed GH diabetogenic activity when they showed that GH reduces glucose uptake not only in muscle but also in adipose tissue. Insulin resistance stimulated by GH has been linked to a

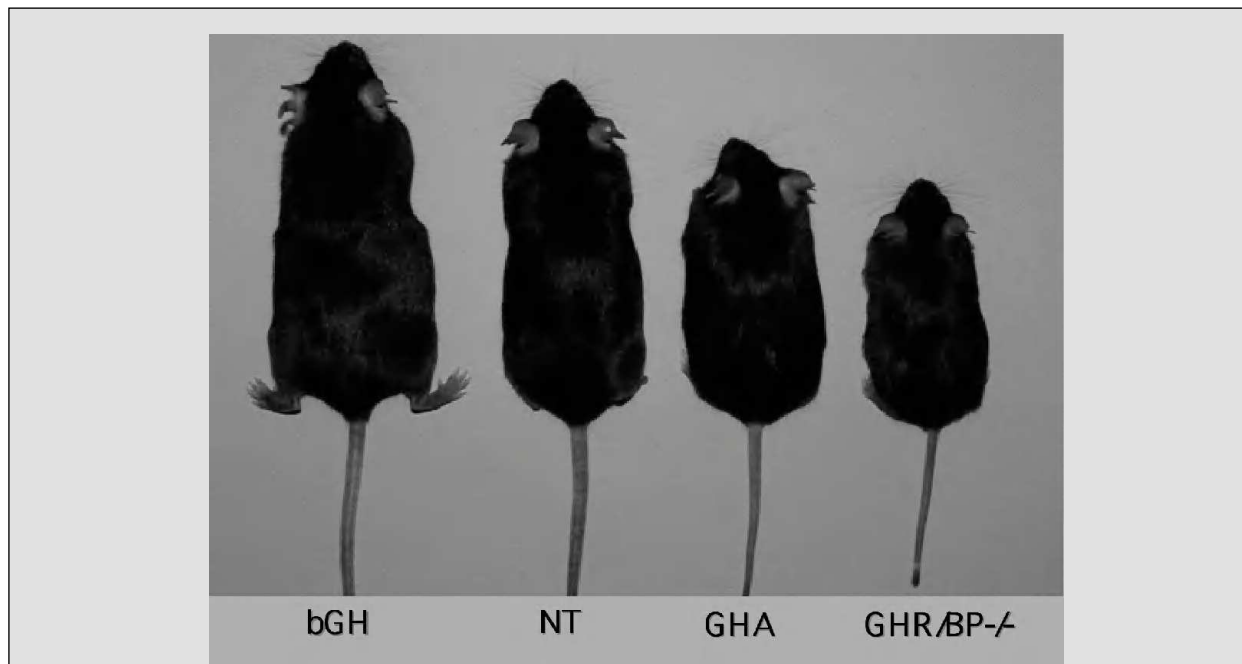


Figura 1. Phenotype of different transgenic mouse models used for the study of growth hormone (GH) action. From left to right, mice carrying a bovine GH transgene (bGH); wild type, nontransgenic mice (NT); mice that express a GHR antagonist transgene (GHA); and GH receptor/binding protein gene disrupted or 'knockout' mice (GHR/BP^{-/-}). (Adapted from Kopchick, JJ, Okada, S, and Coschigano, KT (2001). Lessons from growth hormone (GH) antagonist and GH receptor 'knockout' mice. In *Targets for growth hormone and IGF-1 action*, R. Bouillon, ed. (Bristol, BioScientifica Ltd.)

reduction in the activity of muscle glycogen synthase, but insulin binding and insulin receptor kinase activity seem to be unaffected⁴¹. Recently, Jorgensen et al.³⁰ have shown that GH action affects intracellular signaling of insulin in skeletal muscle. In addition, Barbour et al.²⁹ found that excess of GH in this tissue is related to an increase in the regulatory subunit (p85a) α of phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase, which decreases insulin signaling and leads to insulin resistance. Similar results were obtained in WAT by del Rincon et al.⁴² Higher p85a α levels were measured in WAT in conditions of GH excess, whereas lower p85a α were found in GH deficiency; these data correlate respectively with the low and high insulin sensitivity detected in each condition⁴².

Glucose and insulin levels have been evaluated in the different mouse models used for the study of GH action. Blood glucose levels are normal to low in GHR/BP^{-/-} mice, with significantly decreased fasting glucose and insulin levels; thus, impaired GH signaling results in increased insulin sensitivity^{38,43}. On the contrary, bGH mice are hyperinsulinemic with normal fasting glycemia. Thus, overexpression of GH results in insulin resistance^{44,45}. Finally, GHA mice display normal levels of glucose and insulin⁴³.

A hypothesis that explains the effects of GH and other hormones (e.g. insulin, cortisol) on glucose metabolism

was proposed by Randle et al.⁴⁶. They proposed that the metabolism of glucose and fatty acids in muscle and adipose tissue are tightly interrelated. According to their hypothesis, which is called the glucose-fatty acid cycle or Randle cycle, the uptake of glucose by adipose tissue would inhibit lipolysis in that tissue, such that the flow of fatty acids from adipose tissue to muscle would decrease⁴⁶. In a similar manner, increased fatty acid levels in the bloodstream would decrease glucose uptake by the muscle. In this scenario, the glucose-fatty acid cycle would maintain adequate blood glucose levels independently of hormonal control, but would be sensitive to modification by hormones⁴⁶. For instance, Randle et al.⁴⁶ suggested that the effects of GH were caused by an increase in lipolysis, which subsequently promoted a decrease in glucose uptake in the muscle, inducing insulin resistance. Effects of GH on glucose metabolism may be due to the glucose-fatty acid cycle, and to other mechanisms such as impaired glucose phosphorylation and inhibition of glycogen synthase²⁵. In a recent review, Jorgensen et al.⁴⁷ discussed these and other proposed mechanisms for insulin resistance caused by GH.

EFFECT OF GH ON LIPID METABOLISM

The action of insulin on adipose tissue consists of promoting lipogenesis and preventing lipolysis by

inhibition of hormone-sensitive lipase. Thus, insulin promotes accumulation of triglycerides in adipocytes by decreasing the concentration of FFA in the bloodstream.

The presence of GH inhibits lipogenesis and promotes lipolysis (probably due to activation of hormone-sensitive lipase⁴⁸), producing an increase of FFA and glycerol release from adipose tissue into the bloodstream⁴⁹⁻⁵¹. Also, GH inhibits lipoprotein lipase activity, preventing triglyceride uptake into the adipocytes^{50,52}. The increased serum levels of FFA and lipids are consistent with an insulin resistant state. In fact, pharmacological depression of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), which hinders lipid mobilization by inhibiting hormone-sensitive lipase, can reverse GH's effects, such as glucose intolerance and type 2 diabetes⁴⁸.

Consistent with GH's lipolytic effect, GH deficient children are frequently obese⁵³, and adults with GH deficiency have higher body fat mass and lower body lean mass than control individuals^{54,55}. In addition, these characteristics tend to normalize with GH replacement therapy^{53,56}.

Regulation of lipid storage and release from adipose tissue, however, is far from simple. White adipose tissue was originally thought to be merely an energetic store for the body, but is now considered a true endocrine organ. Hormones and bioactive molecules secreted by WAT are referred to as 'adipokines' and include a wide range of compounds that have endocrine, paracrine or autocrine activity^{57,58}.

Two important adipokines related to glucose and lipid metabolism are leptin and adiponectin. These adipokines promote insulin sensitivity in the tissues^{59,60} and are inhibited by GH: leptin levels decrease after long term GH exposure⁶¹, and adiponectin secretion is reduced by GH both *in vitro* and *in vivo*³³.

Accordingly, GHR/BP^{-/-} mice have higher adiponectin and lower insulin levels than control mice⁶². Compared to wild type, these mice are obese, but they are also extremely insulin sensitive (as mentioned above), which may be due to the higher levels of adiponectin⁶². A most interesting characteristic of GH action on adipose tissue in these mice is that distinct adipose depots appear to respond differently to the lack of GH action. For instance, subcutaneous fat pads are significantly larger than those of control mice, whereas intra-abdominal fat pads are normal or smaller. These differences among depots have been shown for other animal models, but they seem to vary depending on the model system used⁶²⁻⁶⁴. The fact that the number of GH receptors present in adipocytes varies among distinct depots could explain the differences in GH's effect observed⁵¹. GH's action on adipose tissue, however, extends further than lipid metabolism. GH also acts as a growth factor regulating adipocyte proliferation and differentiation⁴⁹⁻⁵¹.

Finally, in skeletal muscle, GH produces an increase in uptake and oxidation of FFA²⁶. This effect seems to take place in a second phase, after a first phase of inhibition of glucose uptake⁶⁵.

EFFECT OF GH ON PROTEIN METABOLISM

Effects of GH on protein metabolism are highly anabolic⁶⁶ and include inhibition of protein degradation and/or activation of protein synthesis, depending on the tissue studied, the method of GH administration and the physiological status of the subjects (reviewed by Norrelund et al.³⁷). For example, in GHD adults, both fed and fasted, hGH promotes protein anabolism by inhibiting oxidation of amino acids, thus promoting protein synthesis and inhibiting protein degradation⁶⁷. An increase in the rate of protein synthesis and nitrogen retention has also been reported for GH in healthy humans, and children experiencing chronic protein catabolism (reviewed by Mauras⁶⁶).

In general, GH increases lean body mass: acromegalic and GHD patients have increased and decreased lean body mass respectively³⁷. Consistently, hGH replacement therapy in GHD children and adults helps increase lean body mass^{8,66}. This action is analogous to that of IGF-1, which stimulates protein synthesis and inhibits proteolysis³⁷, and of postprandial insulin secretion, which inhibits proteolysis⁶⁸. The anabolic effects of GH on protein are most probably mediated by induction of IGF-1⁶⁶. Studies of the GHR expression in skeletal muscle are inconclusive, whereas IGF-1 receptors are known to be present throughout the muscle fibers⁶⁶.

The size of muscle fibers seems to be affected by GH as well, as suggested by the larger and smaller size of muscle fibers present in bGH and dwarf (GHA and GHR/BP^{-/-}) mice respectively, when compared to wild type controls⁶⁹. However, current knowledge of the direct effects of GH on muscle fibers is relatively limited⁶⁹.

GHR ANTAGONISTS - METABOLIC EFFECTS

The discovery of a GH analog with GHR antagonistic action has provided a novel approach for the therapy of acromegaly. This drug, named Somavert (Pegvisomant for injection), is a genetically modified GH that contains several amino acid substitutions including glycine to arginine at position 120. We have reported that this amino acid is crucial for GH's biological activity⁷⁰⁻⁷⁴. This substitution affects GH's binding site 2 that interacts with the second receptor in the GHR dimer. Thus, Pegvisomant binds to the GHR dimer improperly and does not promote subsequent intracellular signaling. This molecule acts as a GHR antagonist, competing with endogenous GH for the available GHRs⁷⁵⁻⁷⁸.

Clinical studies have shown that Pegvisomant successfully counteracts the metabolic problems

associated with acromegaly, namely insulin resistance, and restores serum IGF-1 levels^{35,76,79,80}. Normalization of glucose tolerance and improvement of insulin sensitivity by Pegvisomant are much more efficient than those observed when somatostatin analogues are used for therapy in patients with acromegaly^{35,81}.

CONCLUSION

We have described the metabolic effects of GH on carbohydrates, lipids and proteins as they are currently understood. Beyond the scope of this article, however, are other metabolic effects of GH, such as bone growth (reviewed by Isaksson *et al.*⁸²), and decreased sodium and water excretion⁸³, among others. The available information on GH action has made therapeutic administration of hGH applicable in many clinical scenarios. Further research to distinguish the metabolic effects of GH versus IGF-1 may provide novel strategies for the use of GH or IGF-1 to treat other metabolic disorders.

REFERENCES

- Giustina A and Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev.* 1998;19:717-97.
- Okada S and Kopchick JJ. Biological effects of growth hormone and its antagonist. *Trends Mol Med.* 2001;7:126-132.
- Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos RA, Wan Y, McKinstry WJ, Palethorpe K, et al. Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12:814-21.
- de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science.* 1992;255:306-12.
- Waters MJ, Rowlinson SW, Clarkson RW, Chen CM, Lobie PE, Norstedt G, et al. Signal transduction by the growth hormone receptor. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1994;206:216-20.
- Green H, Morikawa M, Nixon T. A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation.* 1985;29:195-8.
- Gharib H, Cook DM, Saenger PH, Bengtsson BA, Feld S, Nippoldt TB, et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for growth hormone use in adults and children—2003 update. *Endocr Pract.* 2003;9:64-76.
- Carroll PV, Christ ER, Sonksen PH. Growth hormone replacement in adults with growth hormone deficiency: assessment of current knowledge. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:231-8.
- Colao A, Di Somma C, Savanelli MC, De Leo M, Lombardi G. Beginning to end: cardiovascular implications of growth hormone (GH) deficiency and GH therapy. *Growth Horm. IGF Res.* 2006;16 Suppl A:S41-8.
- Pivonello R, Galderisi M, Auriemma RS, De Martino MC, Galdiero M, Ciccarelli A, et al. Treatment with growth hormone receptor antagonist in acromegaly: effect on cardiac structure and performance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:476-482.
- Colao A, Cerbone G, Pivonello R, Aimaretti G, Loche S, Di Somma C, et al. The growth hormone (GH) response to the arginine plus GH-releasing hormone test is correlated to the severity of lipid profile abnormalities in adult patients with GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1277-82.
- Colao A, DiSomma C, Cuocolo A, Filippella M, Rota F, Acampa W, et al. The severity of growth hormone deficiency correlates with the severity of cardiac impairment in 100 adult patients with hypopituitarism: an observational, case-control study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5998-6004.
- Burger AG, Monson JP, Colao AM, Klibanski A. Cardiovascular risk in patients with growth hormone deficiency: effects of growth hormone substitution. *Endocr Pract.* 2006;12:682-9.
- Abs R, Mattsson AF, Bengtsson BA, Feldt-Rasmussen U, Goth MI, Koltowska-Haggstrom M, et al. Isolated growth hormone (GH) deficiency in adult patients: baseline clinical characteristics and responses to GH replacement in comparison with hypopituitary patients. A sub-analysis of the KIMS database. *Growth Horm IGF Res.* 2005;15:349-59.
- Colao A, Pivonello R, Auriemma RS, De Martino MC, Bidlingmaier M, Briganti F, et al. Efficacy of 12-month treatment with the GH receptor antagonist pegvisomant in patients with acromegaly resistant to long-term, high-dose somatostatin analog treatment: effect on IGF-I levels, tumor mass, hypertension and glucose tolerance. *Eur J Endocrinol.* 2006;154:467-477.
- Liu H, Bravata DM, Olkin I, Nayak S, Roberts B, Garber AM et al. Systematic review: the safety and efficacy of growth hormone in the healthy elderly. *Ann Intern Med.* 2007;146:104-15.
- Houssay B. The hypophysis and metabolism. *N Engl J Med.* 1936;214:961-85.
- Bratusch-Marrain PR, Smith D, De Fronzo RA. The effect of growth hormone on glucose metabolism and insulin secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;55:973-82.
- Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE. Effects of growth hormone on insulin action in man. Mechanisms of insulin resistance, impaired suppression of glucose production, and impaired stimulation of glucose utilization. *Diabetes.* 1982;31:663-9.
- Hansen I, Tsalikian E, Beaufrere B, Gerich J, Haymond M, Rizza R. Insulin resistance in acromegaly: defects in both hepatic and extrahepatic insulin action. *Am J Physiol.* 1986;250:E269-73.
- Davidson MB. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr Rev.* 1987;8:115-31.
- Foss MC, Saad MJ, Paccola GM, Paula FJ, Piccinato CE, Moreira AC. Peripheral glucose metabolism in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;72:1048-53.
- Clemmons DR. Roles of insulin-like growth factor-I and growth hormone in mediating insulin resistance in acromegaly. *Pituitary.* 2002;5:181-3.
- Clemmons DR. Role of insulin-like growth factor in maintaining normal glucose homeostasis. *Horm Res.* 2004;62 Suppl 1:77-82.
- Jorgensen JO, Krag M, Jessen N, Norrelund H, Vestergaard ET, Moller N, et al. Growth hormone and glucose homeostasis. *Horm Res.* 2004;62 Suppl 3:51-5.
- Rabinowitz D, Klassen GA, Zierler KL. Effect of human growth hormone on muscle and adipose tissue metabolism in the forearm of man. *J Clin Invest.* 1965;44:51-61.
- Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J, et al. Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes.* 2001;50:1110-8.
- Bramnert M, Segerlantz M, Laurila E, Daugaard JR, Manhem P, Groop L. Growth hormone replacement therapy induces insulin resistance by activating the glucose-fatty acid cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1455-63.
- Barbour LA, Mizanoor Rahman S, Gurevich I, Leitner JW, Fischer SJ, Roper MD, et al. Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J Biol Chem.* 2005;280:37489-94.
- Jorgensen JO, Jessen N, Pedersen SB, Vestergaard E, Gormsen L, Lund SA, et al. GH receptor signaling in skeletal muscle and

- adipose tissue in human subjects following exposure to an intravenous GH bolus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291:E899-905.
31. Yakar S, Setser J, Zhao H, Stannard B, Haluzik M, Glatt V, et al. Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-1-deficient mice. *J Clin Invest.* 2004;113:96-105.
 32. Yakar S, Pennisi P, Kim CH, Zhao H, Toyoshima Y, Gavrilova O O, et al. Studies involving the GH-IGF axis: Lessons from IGF-I and IGF-I receptor gene targeting mouse models. *J Endocrinol Invest.* 2005;28:19-22.
 33. Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, Bramnert M, Egecioglu E, Kindblom J, et al. Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:1120-6.
 34. Roupas P, Towns RJ, Kostyo JL. Isolated adipocytes from growth hormone-treated obese (ob/ob) mice exhibit insulin resistance. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1052:341-4.
 35. Liu JL, Coschigano KT, Robertson K, Lipsett M, Guo Y, Kopchick JJ, et al. Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;287: E405-13.
 36. Rose DR and Clemmons DR. Growth hormone receptor antagonist improves insulin resistance in acromegaly. *Growth Horm IGF Res.* 2002;12:418-24.
 37. Trainer PJ. Metabolic effects of GH antagonism in patients with acromegaly. *Growth Horm IGF Res.* 2003;13 Suppl A:S152-6.
 38. Norrelund H, Riis AL, Moller N. Effects of GH on protein metabolism during dietary restriction in man. *Growth Horm IGF Res.* 2002;12:198-207.
 39. Butler P, Kryshak E, Rizza R. Mechanism of growth hormone-induced postprandial carbohydrate intolerance in humans. *Am J Physiol.* 1991;260:E513-20.
 40. Fowelin J, Attvall S, von Schenck H, Smith U, Lager I. Characterization of the insulin-antagonistic effect of growth hormone in man. *Diabetologia.* 1991;34:500-6.
 41. Bak JF, Moller N, Schmitz O. Effects of growth hormone on fuel utilization and muscle glycogen synthase activity in normal humans. *Am J Physiol.* 1991;260:E736-42.
 42. del Rincón JP, Iida K, Gaylann BD, McCurdy CE, Leitner JW, Barbour LA, et al. Growth hormone regulation of p85 expression and phosphoinositide 3-kinase activity in adipose tissue: mechanism for growth hormone-mediated insulin resistance. *Diabetes.* 2007; accepted for publication.
 43. Coschigano KT, Holland AN, Riders ME, List EO, Flyvbjerg A, Kopchick JJ. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology.* 2003;144:3799-810.
 44. List EO, Coschigano KT, Kopchick JJ. Growth hormone receptor/binding protein (GHR/BP) knockout mice: a 3-year update. *Mol Genet Metab.* 2001;73:1-10.
 45. Kopchick JJ, Bellush LL, Coschigano KT. Transgenic models of growth hormone action. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:437-61.
 46. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963;1:785-9.
 47. Jorgensen JO, Vestergaard ET, Krag M, Nielsen C, Moller L, Gormsen L et al. Skeletal muscle as a metabolic target for growth hormone. *Horm Res.* 2006;66 Suppl 1:22-5.
 48. Nielsen S, Moller N, Christiansen JS, Jorgensen JO. Pharmacological antilipolysis restores insulin sensitivity during growth hormone exposure. *Diabetes.* 2001;50:2301-8.
 49. Wabitsch M, Braun S, Hauner H, Heinze E, Ilondo MM, Shymko R et al. Mitogenic and antiadipogenic properties of human growth hormone in differentiating human adipocyte precursor cells in primary culture. *Pediatr Res.* 1996;40:450-6.
 50. Nam SY and Lobie PE. The mechanism of effect of growth hormone on preadipocyte and adipocyte function. *Obes Rev.* 2000;1:73-86.
 51. Flint DJ, Binart N, Kopchick J, Kelly P. Effects of growth hormone and prolactin on adipose tissue development and function. *Pituitary.* 2003;6:97-102.
 52. Richelsen B. Action of growth hormone in adipose tissue. *Horm Res.* 1997;48 Suppl 5:105-10.
 53. Wabitsch M, Hauner H, Heinze E, Teller WM. The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism.* 1995;44:45-9.
 54. Salomon F, Cuneo RC, Hesp R, Sonksen PH. The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *N Engl J Med.* 1989;321:1797-803.
 55. Rosen T, Bosaeus I, Tolli J, Lindstedt G, Bengtsson BA. Increased body fat mass and decreased extracellular fluid volume in adults with growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993;38:63-71.
 56. Bengtsson BA, Eden S, Lonn L, Kvist H, Stokland A, Lindstedt G, et al. Treatment of adults with growth hormone (GH) deficiency with recombinant human GH. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76:309-17.
 57. Flier JS. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell.* 1995;80:15-8.
 58. Rajala MW and Scherer PE. Minireview: The adipocyte—at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology.* 2003;144:3765-73.
 59. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 2001;7:941-6.
 60. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem.* 2002;277:25863-6.
 61. Vestergaard ET, Hansen TK, Nielsen S, Moller N, Christiansen JS, Jorgensen JO. Effects of GH replacement therapy in adults on serum levels of leptin and ghrelin: the role of lipolysis. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:545-9.
 62. Berryman DE, List EO, Coschigano KT, Behar K, Kim JK, Kopchick JJ. Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling. *Growth Horm IGF Res.* 2004;14:309-18.
 63. Bengtsson BA, Brummer RJ, Eden S, Rosen T, Sjostrom L. Effects of growth hormone on fat mass and fat distribution. *Acta Paediatr Suppl.* 1992;383:62-5; discussion 66.
 64. Flint DJ, and Gardner MJ. Influence of growth hormone deficiency on growth and body composition in rats: site-specific effects upon adipose tissue development. *J Endocrinol.* 1993;137:203-11.
 65. Moller N, Butler PC, Antsiferov MA, Alberti KG. Effects of growth hormone on insulin sensitivity and forearm metabolism in normal man. *Diabetologia.* 1989;32:105-10.
 66. Murras N. Growth Hormone and Testosterone: Effects on Whole Body Metabolism and Skeletal Muscle in Adolescence. *Horm Res.* 2006;66 Suppl 1:42-8.
 67. Shi J, Sekhar RV, Balasubramanyam A, Ellis K, Reeds PJ, Jahoor F et al. Short- and long-term effects of growth hormone (GH) replacement on protein metabolism in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5827-33.

68. Nissen S and Haymond MW. Changes in leucine kinetics during meal absorption: effects of dietary leucine availability. *Am J Physiol.* 1986;250:E695-701.
69. Clark RP, Schuenke M, Keeton SM, Staron RS, Kopchick JJ. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on muscle in mouse models of human growth disorders. *Horm Res.* 2006;66 Suppl 1:26-34.
70. Chen WY, Chen NY, Yun J, Wight DC, Wang XZ, Wagner TE, et al. Amino acid residues in the third alpha-helix of growth hormone involved in growth promoting activity. *Mol Endocrinol.* 1995;9:292-302.
71. Chen WY, Chen N, Yun J, Wagner TE, Kopchick JJ. In vitro and in vivo studies of the antagonistic effects of human growth hormone analogs. *J Biol Chem.* 1994;269:20806.
72. Chen WY, White ME, Wagner TE, Kopchick JJ. Functional antagonism between endogenous mouse growth hormone (GH) and a GH analog results in dwarf transgenic mice. *Endocrinology.* 1991;129:1402-8.
73. Chen WY, Wight DC, Mehta BV, Wagner TE, Kopchick JJ. . Glycine 119 of bovine growth hormone is critical for growth-promoting activity. *Mol Endocrinol.* 1991;5:1845-52.
74. Chen WY, Wight DC, Wagner TE, Kopchick JJ. Expression of a mutated bovine growth hormone gene suppresses growth of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:5061-5.
75. Kopchick JJ. Discovery and mechanism of action of pegvisomant. *Eur J Endocrinol.* 2003;148 Suppl 2:S21-5.
76. Kopchick JJ, Parkinson C, Stevens EC, Trainer PJ. Growth hormone receptor antagonists: discovery, development, and use in patients with acromegaly. *Endocr Rev.* 2002;23:623-46.
77. van der Lely AJ, Kopchick JJ. Growth hormone receptor antagonists. *Neuroendocrinology.* 2006;83:264-8.
78. Muller AF, Kopchick JJ, Flyvbjerg A, van der Lely AJ. Clinical review 166: Growth hormone receptor antagonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:1503-11.
79. Muller AF and van der Lely AJ. Pharmacological therapy for acromegaly: a critical review. *Drugs.* 2004;64:1817-38.
80. Trainer PJ, Drake WM, Katznelson L, Freda PU, Herman-Bonert V, van der Lely AJ, et al. Treatment of acromegaly with the growth hormone-receptor antagonist pegvisomant. *N Engl J Med.* 2000;342:1171-7.
81. Arosio M, Ronchi CL, Epaminonda P, di Lembo S, Adda G. New therapeutic options for acromegaly. *Minerva Endocrinol.* 2004;29:225-39.
82. Isaksson OG, Ohlsson C, Bengtsson BA, Johannsson G. GH and bone—experimental and clinical studies. *Endocr J.* 2000;47 Suppl:S9-16.
83. Dimke H, Flyvbjerg A, Bourgeois S, Thomsen K, Frokiaer J, Houillier P et al. Acute growth hormone administration induces antidiuretic and antinatriuretic effects and increases phosphorylation of NKCC2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292:F723-35.

Kisspeptinas y pubertad

M. Tena-Sempere

Sección de Fisiología. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. España.
CIBER CB06/03 Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

RESUMEN

Las kisspeptinas fueron inicialmente identificadas como un grupo de péptidos estructuralmente relacionados, codificados por el gen *KiSS-1*, con capacidad de inhibir la metástasis de ciertos tumores mediante la activación del receptor acoplado a proteínas G, *GPR54*. No obstante, a finales de 2003, sendas publicaciones demostraron que mutaciones inactivantes del gen *GPR54* se asocian a ausencia de pubertad e hipogonadismo hipogonadotrópico, tanto en humanos como en roedores, lo que puso de manifiesto el papel clave del sistema ligando-receptor *KiSS-1/GPR54* en el control del eje reproductor en general, y de los mecanismos de activación de la pubertad en particular. Estas observaciones iniciales se han visto sustanciadas en los últimos 3 años a través de numerosos estudios experimentales en diversas especies (desde roedores hasta humanos), que han permitido establecer el papel absolutamente crucial de las kisspeptinas y su receptor en la regulación de diversas facetas de la función reproductora. En este trabajo revisaremos los aspectos más sobresalientes del papel del sistema *KiSS-1/GPR54* en el control del eje gonadotrópico, con especial atención a la descripción de la implicación de las kisspeptinas en la activación puberal del sistema reproductor y su modulación por factores relevantes, tales como el estado energético y metabólico del organismo.

Palabras clave:

KiSS-1. GPR54. GnRH. LH. FSH. Pubertad. Hipogonadismo.

ABSTRACT

Kisspeptins were first identified as a family of structurally-related peptides, encoded by the *KiSS-1* gene, with ability to inhibit tumor metastasis through binding to the G protein-coupled receptor *GPR54*. However, in late 2003, two independent publications demonstrated the presence of inactivating mutations of *GPR54* gene in patients suffering lack of puberty onset and hypogonadotropic hypogonadism; a phenotype which was also observed in mice with genetic inactivation of *GPR54*. These observations disclosed the essential roles of the ligand/receptor system *KiSS-1/ GPR54* in the control of reproductive function in general, and in the regulation of puberty onset in particular. These contentions have been fully substantiated during the last three years, by a number of experimental studies in different species (from Mouse and rats to humans), which have defined the indispensable role of kisspeptins and their receptor in the regulation of different aspects of reproduction. In the present article, we will review the most salient facets of the *KiSS-1/GPR54* system in the control of the gonadotropic axis, with special emphasis on the potential involvement of kisspeptins in the pubertal activation of the reproductive system and its modulation by key regulatory factors, such as energy balance and the metabolic status of the organism.

Key words:

KiSS-1. GPR54. GnRH. LH. FSH. Puberty. Hypogonadism.

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

INTRODUCCIÓN

La pubertad se define como el período de transición entre la etapa infantil y la adulta en el que se adquiere la capacidad reproductora y tiene lugar la maduración de los órganos genitales y el desarrollo completo de los caracteres sexuales secundarios, además de importantes cambios somáticos y de conducta¹. Este conjunto orquestado de cambios endocrinos y físicos está determinado por una gran variedad de factores, desde genéticos a ambientales, cuya interacción dinámica es la responsable de la cronología de la pubertad y de sus posibles alteraciones (pubertad precoz, retrasada o ausente). Habida cuenta la extraordinaria importancia de este proceso madurativo, la fisiología y fisiopatología de la pubertad han sido objeto de estudio pormenorizado, empleando para ello diversas aproximaciones experimentales y especies modelo^{1,2}.

Desde un punto de vista neuroendocrino, la pubertad está caracterizada por la activación completa del denominado eje gonadotrópico (o hipotálamo-hipófiso-gonadal [HHG])¹⁻³. En este eje neuroendocrino, el decapeptido GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), sintetizado por un número reducido y relativamente disperso de neuronas hipotalámicas, juega un papel jerárquico clave, siendo el principal estímulo fisiológico de la síntesis y liberación de las gonadotropinas hipofisarias, LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo-estimulante)³. Éstas, a su vez, operan sobre receptores específicos a nivel gonadal, siendo los principales reguladores hormonales tanto de la generación de gametos maduros a partir de la pubertad (gametogénesis), como de la secreción de esteroides y otras hormonas gonadales (hormonogénesis)³. El control dinámico de este eje neuro-hormonal se apoya en las acciones *feedback* negativas y positivas de las señales hormonales procedentes de las gónadas, así como de la acción reguladora de numerosos factores adicionales, tanto centrales como periféricos, que actúan primariamente sobre el sistema GnRH hipotalámico³.

NEUROENDOCRINOLOGÍA DE LA PUBERTAD: MECANISMOS

De acuerdo a la organización jerárquica del eje gonadotrópico arriba indicada, la activación peripuberal del eje reproductor vendría desencadenada por un incremento progresivo de la actividad neurosecretora del sistema neuronal hipotalámico GnRH. De acuerdo al modelo globalmente aceptado, la neurona GnRH operaría como integrador dinámico de una gran diversidad de señales reguladoras (excitatorias o inhibitorias) y efector último de las acciones de las mismas en términos de control de la secreción de gonadotropinas. A pesar del consenso generalizado en este punto, durante las últimas décadas se han formulado diversas hipótesis acerca de los mecanismos neuroendocrinos responsables

del desencadenamiento de la pubertad en mamíferos; hipótesis que han hecho énfasis, entre otros, en modificaciones en la sensibilidad a las acciones *feedback* de los esteroides gonadales o cambios en el balance entre señales centrales excitatorias e inhibitorias que proyectan sobre las neuronas GnRH^{1,2,4}. El objetivo último de estas hipótesis es dar respuesta a una pregunta simple, con implicaciones complejas: ¿cuáles son los factores desencadenantes de la pubertad?

En relación con las señales centrales, numerosos estudios experimentales, publicados en los últimos 25 años, han permitido identificar algunos de los principales neurotransmisores y neuropéptidos responsables del control sináptico de las neuronas GnRH y de su activación durante la pubertad, que incluyen entre otros el glutamato, la noradrenalina, el ácido γ -amino butírico (GABA), los péptidos opioides y el neuropéptido Y (NPY)^{1,2,4}. Es destacable que algunos de estos factores llevan a cabo acciones predominantemente inhibitorias sobre el sistema GnRH (tales como GABA y opioides), por lo que la activación puberal de este sistema vendría definida por modificaciones en el equilibrio entre señales centrales excitatorias e inhibitorias. Así, la quiescencia funcional del eje reproductor durante el período infantil estaría producida por una inhibición central del sistema GnRH, que daría paso a un predominio progresivo de los circuitos excitatorios durante el período peripuberal². Por otra parte, en los últimos años, ha quedado puesto de manifiesto que el control central del sistema neuronal GnRH no es llevado a cabo únicamente por señales trans-sinápticas (procedentes de otras neuronas), sino que en él intervienen igualmente factores procedentes de células de la glía⁵. Este conjunto de señales reguladoras (de origen neuronal y glial) se encontraría bajo el control de diversos factores de transcripción, cuya expresión está igualmente regulada de forma precisa a lo largo del desarrollo puberal⁶. De esta forma, Ojeda et al han propuesto recientemente una aproximación holística, relacionada con la biología de sistemas, para el integral análisis de los mecanismos desencadenantes de la pubertad, dirigida a identificar circuitos de señales, más que factores individuales, implicados en este proceso⁶.

Por otra parte, además de las señales centrales (arriba indicadas), la activación del eje gonadotrópico en la pubertad está condicionada por un número considerable de factores tanto endógenos (periféricos) como ambientales⁷. De entre éstos, es especialmente relevante el papel del estado energético del organismo, y en concreto de la hormona leptina, en el control funcional del eje reproductor a lo largo del desarrollo puberal⁸. La leptina es una hormona de origen adiposo que informa, entre otros, a los centros de control de la reproducción del estado de los depósitos grasos del organismo, siendo necesarios unos niveles mínimos de leptina circulan-

te, como índice de una masa grasa crítica, para que se produzca un desarrollo puberal adecuado⁸. Otras hormonas implicadas primariamente en el control del balance energético, tales como la ghrelina, podrían cooperar con la leptina en la integración funcional de los ejes reproductor, del crecimiento y metabólico durante el período puberal⁹. Adicionalmente, la pubertad es sensible a la acción de diversos moduladores ambientales que incluyen desde cambios en los ciclos luz-oscuridad a la acción de compuestos químicos con actividad hormonal⁷. En este contexto, se considera que la pubertad es el resultado final de la interacción dinámica entre factores genéticos (muy relevantes) y una serie amplia de reguladores tanto endógenos como exógenos; interacción que determinaría en cada individuo la cronología (normal o patológica) del desarrollo puberal.

SISTEMA KiSS-1/GPR54: IDENTIFICACIÓN Y FUNCIONES NO REPRODUCTORAS

El sistema KiSS-1/GPR54 es un sistema ligando-receptor, inicialmente identificado en el contexto de la biología del cáncer. Así, el gen KiSS-1 fue catalogado en 1996 como un gen supresor de metástasis en ciertos melanomas¹⁰. Más adelante, en 2001, se demostró que el producto del gen KiSS-1 es una proteína precursora de 145 aminoácidos, que por procesamiento proteolítico resulta en la generación de la metastina (54 aminoácidos), y otros péptidos de menor tamaño, tales como kisspeptina-14 y kisspeptina-13, que (junto a la kisspeptina-10) forman la familia de las kisspeptinas¹¹⁻¹³. Desde un punto de vista estructural, estos péptidos comparten su región C-terminal, donde presentan un motivo característico Arg-Phe-amida. Por su parte, el gen GPR54 se clonó en 1999 como un receptor huérfano acoplado a proteínas G con 7 dominios transmembrana y cierto grado de similitud con los receptores de galanina¹⁰. Estudios funcionales en sistemas celulares heterólogos demostraron que este receptor utiliza la ruta de los inosítoles fosfato y calcio intracelular, con la subsiguiente fosforilación de quinasas intracelulares, tales como ERK 1/2 y p38 kinasa¹³. Estos análisis establecieron igualmente que la región de 10 aminoácidos del extremo C-terminal de las kisspeptinas (kisspeptina-10) es suficiente para producir una máxima activación de GPR54 en sistemas *in vitro*¹³.

Como se ha apuntado, el sistema KiSS-1 en general, y la metastina en particular, fueron considerados inicialmente como factores de supresión de metástasis. Así, un número de publicaciones demostró la posible función anti-metastática de la metastina en diversos tumores, tales como melanoma, cáncer de mama, cáncer de tiroides y cáncer de páncreas, entre otros¹⁰, mientras que la pérdida de expresión del gen KiSS-1 se identificó como índice de mal pronóstico en distintas neoplasias. Adicionalmente, se ha demostrado que los péptidos

KiSS-1 inhiben la migración de diversas líneas tumorales *in vitro*¹⁰. A pesar de todo ello, la relevancia del sistema KiSS-1 en el control de la metástasis tumoral es actualmente objeto de cierto debate.

Por otra parte, los análisis de expresión de los genes KiSS-1 y GPR54 en tejidos humanos y de roedores permitieron sugerir sitios de localización prominente de los elementos de este sistema, tales como la placenta, diversas áreas del sistema nervioso central (incluyendo el hipotálamo y la médula espinal), la hipófisis y el páncreas, entre otros¹⁰⁻¹³. Más aun, las características estructurales de la proteína KiSS-1 (con un péptido señal y diversos sitios de corte y amidación) indicaban la posible la generación de productos secretados. Todo ello permitió sugerir posibles funciones biológicas adicionales de este sistema. De entre ellas, concitó especial interés el posible papel de las kisspeptinas en el control de la fisiología placentaria en general, y de la invasión del trofoblasto placentario durante la nidación en particular¹⁴; un proceso que se asemeja parcialmente a la invasión tumoral durante la metástasis. Una observación interesante es que durante la gestación en humanos se produce una marcadísima elevación de los niveles circulantes de metastina, que puede alcanzar concentraciones hasta 7.000 veces superiores a las del período no gestacional¹⁵. No obstante, la importancia fisiológica de este fenómeno no ha sido aún esclarecida.

SISTEMA KiSS-1/GPR54 Y CONTROL DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA

La implicación del sistema KiSS-1/GPR54 en el control de la reproducción no fue evidenciada hasta finales del año 2003, momento en que de modo independiente los grupos de Roux¹⁶ y Seminara¹⁷ identificaron diversas delecciones y mutaciones inactivantes del gen GPR54 en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (IHH). Estas observaciones sugerían un papel crucial, previamente insospechado, de este receptor, y sus ligandos, en los mecanismos de regulación del eje gonadotrópico. Más aun, esta forma de hipogonadismo central fue igualmente observada en ratones genéticamente manipulados con inactivación del gen GPR54¹⁷, lo que demostró un alto grado de conservación del papel esencial del sistema KiSS-1/GPR54 en el control del eje reproductor en mamíferos.

Estas observaciones iniciales en modelos animales y humanos hicieron necesaria la caracterización exhaustiva de los efectos y mecanismos de acción de las kisspeptinas sobre el sistema neuroendocrino de la reproducción. Uno de los aspectos analizados en primer lugar fue el de sus acciones sobre la secreción de gonadotropinas. Así, en los dos años siguientes a la identificación de su papel en el control de la reproducción, diversos estudios demostraron la capacidad de las kisspeptinas de estimular muy potentemente la secreción

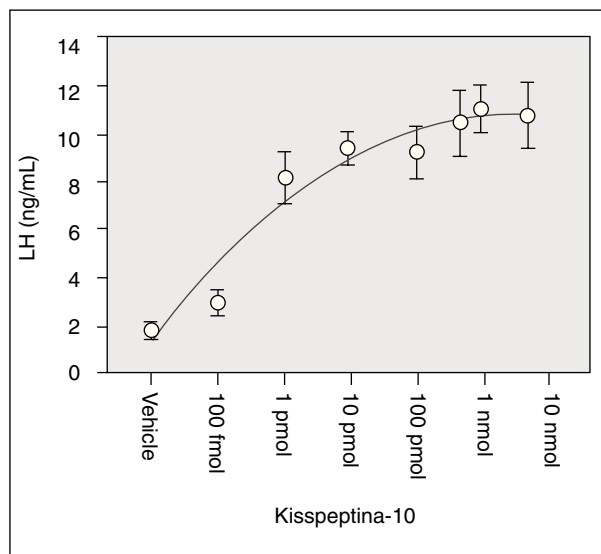


Figura 1. Potente efecto estimulador de la kisspeptina sobre la secreción de LH en la rata. Se muestran valores circulantes de LH a los 15-min tras la administración intracerebral de dosis crecientes de kisspeptina-10 (5 nmol, 1 nmol, 500 pmol, 100 pmol, 10 pmol, 1 pmol y 100 fmol).

de gonadotropinas en diversas especies, incluyendo la rata, el ratón, la oveja, el mono y el hombre¹⁰. De hecho, se considera que las kisspeptinas son el activador más potente del eje gonadotrópico conocido hasta la fecha (excluido el propio GnRH). A modo de ejemplo, en la figura 1 se ilustra el potente efecto estimulador de kisspeptina-10 sobre la secreción de LH en la rata. El mecanismo por el que las kisspeptinas llevan a cabo este potente efecto estimulador implica la inducción de la liberación hipotalámica de GnRH, a través (muy probablemente) de un efecto directo sobre las neuronas GnRH, que expresan el gen GPR54¹⁰. El efecto estimulador de la kisspeptina sobre la secreción de GnRH requeriría de la activación de fosfolipasa-C y la movilización de calcio intracelular, así como del reclutamiento de ERK1/2 y p38 kinasas, como sugieren recientes datos de nuestro grupo empleando modelos hipotalámicos *ex vivo*¹⁸.

Prueba adicional de la importancia fisiológica de este sistema en el control de la secreción de gonadotropinas es que la expresión hipotalámica de los genes KiSS-1 y GPR54 está bajo el control de los esteroides gonadales, elementos clave en el control *feedback* del eje gonadotrópico. Así, la eliminación de las hormonas gonadales mediante gonadectomía (que produce una drástica elevación de los niveles circulantes de LH y FSH) indujo un aumento muy significativo en los niveles hipotalámicos de expresión de el gen KiSS-1 (y en menor medida de GPR54); respuesta que prevenida mediante el re-emplazamiento con andrógenos o estrógenos²¹. Mediante hibridación *in situ*, este fenómeno ha sido recientemente localizado en el núcleo arcuato

(ARC) del hipotálamo¹⁹, lo que sugiere la implicación de neuronas de este núcleo, que expresan KiSS-1, en la mediación de las acciones de retroalimentación negativa de los esteroides sexuales sobre la secreción de gonadotropinas. Sin embargo, en otra área hipotalámica, como es el área anteroventral del núcleo periventricular (AVPV), la respuesta de expresión del gen KiSS-1 a la gonadectomía y el tratamiento hormonal sustitutivo es por completo opuesta, con disminución de los niveles de mRNA de KiSS-1 tras la gonadectomía y aumento tras la administración de estrógenos²⁰. Estas evidencias sugieren que las neuronas KiSS-1 del AVPV participarían en la mediación de los efectos *feedback* positivos del estradiol y, consecuentemente, en el desencadenamiento de la liberación preovulatoria de gonadotropinas, como parecen confirmar datos experimentales publicados muy recientemente^{21,22}.

SISTEMA KiSS-1/GPR54 Y PUBERTAD: PAPEL FISIOLÓGICO Y MECANISMOS

Otro de los aspectos de la función del sistema KiSS-1 -como regulador esencial de la reproducción- que concitó una mayor atención desde un inicio (finales de 2003) fue su posible papel en los mecanismos neuroendocrinos de la pubertad. Tal interés quedó de manifiesto ya en las primeras publicaciones acerca del fenotipo reproductor de humanos y roedores con inactivación del gen de GPR54 durante el desarrollo, caracterizado, entre otros, por ausencia de pubertad¹⁷. Más aun, la demostración de la extraordinaria capacidad de las kisspeptinas de activar el eje gonadotrópico, incluso en el período prepuberal^{10,19}, reforzaron el interés por este sistema como posible factor "desencadenante" de la pubertad. En este sentido, es destacable que el desarrollo de las neuronas GnRH, y la adquisición de su capacidad secretora, es muy anterior a su activación puberal; la estimulación eléctrica o neuroquímica puede inducir la activación precoz de este sistema. Todo ello indica que son los cambios en los sistemas reguladores los que determinan el estado de quiescencia o activación de generador de pulsos GnRH, y por extensión del eje reproductor². Las evidencias acumuladas en los últimos 3 años sugieren que el sistema KiSS-1 podría jugar un papel relevante en este proceso.

Además de los resultados de estudios en modelos de alteración genética (p. ej., GPR54 KO), se han obtenido datos de expresión y funcionales que apoyan un papel del sistema KiSS-1 en la activación del eje gonadotrópico en pubertad. En términos de expresión, los análisis llevados a cabo en la rata sugieren que los niveles hipotalámicos de expresión del gen KiSS-1 y de su receptor GPR54 son relativamente bajos en el período prepuberal y aumentan coincidiendo con la llegada de la pubertad¹⁹; observaciones que han sido confirmadas en primates, en los que se ha observado un incremen-

to en la expresión hipotalámica de los genes KiSS-1 y GPR54 en torno a la pubertad²³. Desde el punto de vista funcional, los datos de administración de kisspeptina en animales inmaduros refuerzan la idea de un papel relevante del sistema KiSS-1 en la activación puberal del eje reproductor. Así, la administración sistémica de kisspeptina indujo ovulación en ratas hembra inmaduras (tras *priming* standard con gonadotropinas)²⁴, mientras que la administración crónica de kisspeptina-10 en ratas hembra prepuberales fue capaz de desencadenar pubertad precoz, estimada por un adelanto significativo en la edad de apertura vaginal y una marcada elevación del peso del útero y los niveles circulantes de LH, FSH y estradiol²⁵. Un fenómeno similar se ha detectado en primates, en los que la administración repetida de kisspeptina-10 en la fase juvenil tardía indujo un patrón de liberación de pulsos de GnRH similar al que se detecta en la pubertad²⁶. Este conjunto de observaciones parece apuntar que la activación (siquiera farmacológica) de GPR54 es suficiente para activar los fenómenos neuroendocrinos que conducen a la activación puberal del eje gonadotrópico.

Los mecanismos por los que se produce la activación del sistema GnRH por las kisspeptinas durante la pubertad son diversos, sofisticados y altamente regulados, reflejo de la importancia funcional de los mismos. Cuatro serían los posibles procesos implicados, identificados hasta la fecha: 1) aumento del tono endógeno de kisspeptinas, reflejado por un incremento de la expresión del gen KiSS-1 en torno a la pubertad^{19,23}; 2) posible aumento de la expresión del receptor GPR54, de menor magnitud que la del ligando^{19,23}; 3) incremento de la sensibilidad a las acciones estimuladoras de la kisspeptina durante la transición puberal^{18,27}, que se asociaría a un aumento de la eficacia del acoplamiento de GPR54 a sus rutas de señalización²⁷; y 4) incremento de los contactos sinápticos entre neuronas KiSS-1 y neuronas GnRH a lo largo de la pubertad²⁸. Estos mecanismos aparecen esquemáticamente representados en la figura 2. En su conjunto, estas observaciones sugieren que la activación peripuberal del sistema hipotalámico KiSS-1/GPR54 es un proceso polifacético y altamente regulado, que juega un papel esencial en el desencadenamiento de la pubertad en mamíferos.

SISTEMA KiSS-1/GPR54 Y CONTROL DE LA PUBERTAD POR SEÑALES METABÓLICAS

Como ya ha sido apuntado en epígrafes previos, la pubertad es el resultado de la interacción dinámica entre factores genéticos y múltiples moduladores, tanto endógenos como ambientales. Así, de entre los factores que participan en la modulación de la pubertad destacan los relacionados con el estado energético del organismo, que es señalizado a través de factores hormonales tales como la leptina^{8,9}. Considerando la estrecha relación en-

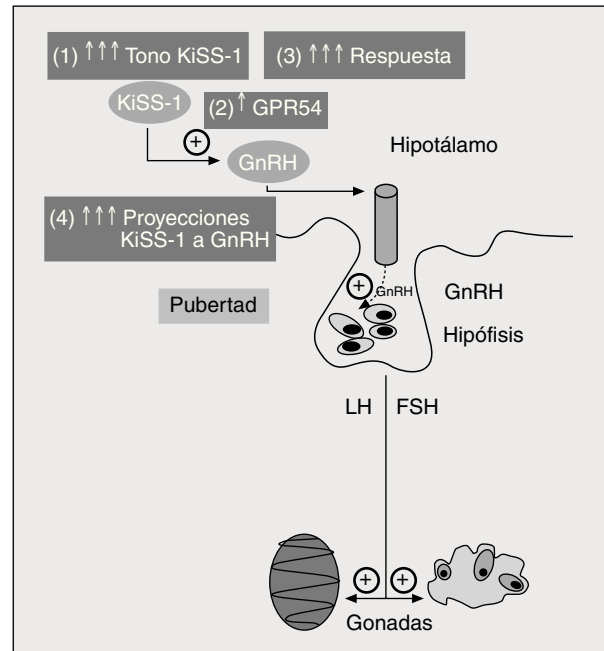


Figura 2. Esquema tentativo de los mecanismos implicados en la activación peripuberal de las neuronas GnRH por el sistema KiSS-1/GPR54 hipotalámico. Éstos incluirían: 1) aumento del tono endógeno de kisspeptinas, reflejado por un incremento de la expresión del gen KiSS-1 en torno a la pubertad; 2) aumento de la expresión del receptor GPR54, de menor magnitud que la del ligando; 3) incremento de la sensibilidad a las acciones estimuladoras de la kisspeptina durante la transición puberal, que se asociaría a un aumento de la eficacia del acoplamiento de GPR54 a sus rutas de señalización; y 4) incremento de los contactos sinápticos (proyecciones) entre neuronas KiSS-1 y neuronas GnRH a lo largo de la pubertad.

tre el balance energético, la masa grasa corporal y la pubertad, nuestro grupo de investigación ha estado particularmente interesado en evaluar 1) la posible implicación del sistema KiSS-1/GPR54 en la mediación de los efectos del estado energético sobre la activación del eje reproductor en pubertad; y 2) el papel de la hormona leptina en la regulación funcional del sistema KiSS-1. Nuestros análisis de expresión en modelos de balance energético negativo, caracterizados por la supresión de la función reproductora y el retraso o bloqueo del desarrollo puberal, pusieron de manifiesto una disminución de la expresión hipotalámica del gen KiSS-1, asociada a un incremento moderado de los niveles de GPR54, fenómeno este último que sugiere un cierto estado de sensibilización por disminución del tono de kisspeptina endógeno en condiciones de insuficiencia energética²⁹. Por su parte, nuestros experimentos de administración repetida de kisspeptina a ratas inmaduras sometidas a subnutrición durante la pubertad (30% de restricción calórica) demostraron que este protocolo es capaz de revertir (hasta en un 60% de los casos) la au-

sencia de apertura vaginal y de inducir (en un 100% de los casos) potentes respuestas de secreción de gonadotropinas en ratas hembras peripuberales sometidas a una restricción calórica²⁹. Estos datos sugieren que el sistema KiSS-1 operaría como un "sensor" del estado energético del organismo, responsable de la modulación de la activación del eje reproductor en pubertad por factores metabólicos y/o nutricionales³⁰. De hecho, estudios recientes de nuestro grupo en modelos de alteración metabólica asociados a hipogonadotropismo (tales como la diabetes experimental) confirman que situaciones de déficit energético severo se asocian a la supresión de la expresión hipotalámica del gen KiSS-1³¹.

La pregunta que surge de las observaciones anteriores es cuál es la señal(es) responsable de la regulación metabólica del sistema KiSS-1. Resultados recientes sugieren que la leptina operaría como regulador de la expresión hipotalámica del gen KiSS-1. Así se ha demostrado en modelos de alteración metabólica asociados a hipogonadotropismo (diabetes experimental en la rata), donde la infusión intracerebral de leptina normalizó los niveles de expresión del mRNA de KiSS-1³¹. Del mismo modo, se ha publicado recientemente que en el ratón deficiente en leptina *ob/ob*, la expresión del gen KiSS-1 en el ARC está disminuida y ésta puede ser estimulada por la administración exógena de leptina³². Este conjunto de datos apunta a un importante papel de la leptina en la modulación funcional del sistema KiSS-1 hipotalámico, que podría constituir el mecanismo por el cual la leptina lleva a cabo sus conocidas acciones positivas sobre el eje reproductor en pubertad. No obstante, teniendo en cuenta el papel predominantemente permisivo (más que estimulador) de la leptina sobre la maduración puberal, es previsible que otros factores (centrales y/o periféricos) cooperen con la leptina en el control metabólico del sistema KiSS-1, contribuyendo así al acoplamiento funcional entre el estado energético del organismo y la activación del eje reproductor en pubertad³⁰.

CONCLUSIONES

En los últimos 3 años hemos asistido a la identificación y caracterización inicial del papel fisiológico del sistema KiSS-1/GPR54 en el control del eje reproductor en general, y de su activación durante la pubertad en particular. El conjunto de evidencias acumuladas hasta la fecha permite afirmar que las kisspeptinas y su receptor juegan un papel clave en la regulación de muy diversas facetas de la función reproductora, lo que ha conducido a postular que la identificación del sistema KiSS-1 es el hallazgo más relevante producido en el ámbito de la Neuroendocrinología de la Reproducción desde el aislamiento del propio GnRH a principios de la década de los setenta. Entre otras funciones, los datos disponibles indican que la activación peripuberal del

sistema KiSS-1/GPR54, a través de diversos mecanismos finamente regulados (que incluyen no sólo un aumento del tono endógeno de kisspeptina, sino también el incremento de la sensibilidad a sus acciones estimuladoras y de la densidad de sus proyecciones sobre neuronas GnRH), constituye un evento esencial en la definición de la cronología de la pubertad en mamíferos.

A pesar del rápido avance de nuestro conocimiento en esta área, aspectos relevantes de la función del sistema KiSS-1 en el control de la pubertad permanecen todavía parcialmente desconocidos. Así, no ha sido aún establecido si las kisspeptinas operarían como "desencadenantes" fisiológicos (primarios) de la pubertad o actuarían como efectores de otras señales activadoras. En este sentido, se hace necesaria una exhaustiva caracterización de las señales y mecanismos responsables del control del sistema KiSS-1 hipotalámico, así como de sus proyecciones e interacciones con otros sistemas centrales implicados en el control de las neuronas GnRH. Igualmente, aunque se ha descrito que la inactivación de GPR54 se asocia a ausencia de pubertad en humanos, se desconoce en gran medida el impacto epidemiológico de mutaciones en los genes GPR54 y, eventualmente, KiSS-1 en formas de pubertad retrasada o precoz en diversas poblaciones. Finalmente, será interesante establecer la posible influencia de compuestos ambientales con actividad hormonal (xeno-estrógenos) sobre la organización, expresión y función del sistema hipotalámico KiSS-1. Este aspecto puede ser especialmente relevante si tenemos en cuenta que ciertas formas de precocidad en el desarrollo puberal se han asociado a cambios en los patrones de exposición a compuestos disruptores endocrinos⁷. Es previsible que, en los próximos años, este y otros aspectos de la fisiología y fisiopatología del sistema KiSS-1 constituyan una de las líneas de trabajo más activas de la Neuroendocrinología contemporánea.

Agradecimientos

El autor expresa su agradecimiento a los miembros de los grupos de investigación de las Universidades de Córdoba y Santiago de Compostela que han contribuido decisivamente a la realización de los trabajos propios descritos en esta revisión. Este trabajo fue financiado con fondos de los proyectos de investigación BFI 2002-00176 y BFI 2005-07446 de la DGESIC (Ministerio de Educación y Ciencia), y del Instituto de Salud Carlos III (Red de Centros RCMN C03/08 y proyecto PI042082; Ministerio de Sanidad).

BIBLIOGRAFÍA

1. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res.* 2002;57:2-14.
2. Ojeda SR, Urbanski HF. Puberty in the rat. En: Neill JD, editor. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 2005. p. 2061-126.

3. Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. Gonadotropins and gonadotropin receptors. En: Fauser BCJM, editor. Reproductive Medicine - Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals. New York: Parthenon Publishing; 2003. p. 225-44.
4. Richter TA, Terasawa E. Neural mechanisms underlying the pubertal increase in LHRH release in the rhesus monkey. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12:353-9.
5. Ojeda SR, Ma YJ, Lee BJ, Prevot V. Glial-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Recent Prog Horm Res.* 2000; 55:197-223.
6. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, et al. The neuroendocrine regulation of puberty: Is the time for a systems biology approach? *Endocrinology.* 2006;147:1166-74.
7. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev.* 2003;24:668-93.
8. Casanueva FF, Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20:317-63.
9. Fernández-Fernández R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, et al. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;254-255:127-32.
10. Tena-Sempere M. GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human Reprod Update.* 2006;12:631-9.
11. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G protein-coupled receptor. *Nature.* 2001; 411:613-7.
12. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 2001;276:28969-75.
13. Kotani M, Dethoux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* 2001;276:34631-6.
14. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci.* 2004;117:1319-28.
15. Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki T, Kitada C, Usuki S, et al. Dramatic elevation of plasma metastatin concentrations in human pregnancy: metastatin as a novel placental-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:914-9.
16. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:10972-6.
17. Seminara SB, Messager S, Chatzidakis EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New Engl J Med.* 2003;349:1614-27.
18. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castano JP, Malagón MM, Aguilar E, et al. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;257-258:75-83.
19. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sánchez-Criado JE, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor GPR54 in rat hypothalamus and potent LH releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* 2004;145:4565-74.
20. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. 2005 Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology.* 2005;146:3686-92.
21. Tena-Sempere M. Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology.* 2005;146:3683-5.
22. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci.* 2006;26:6687-94.
23. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:2129-34.
24. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320:383-8.
25. Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol.* 2004;561:379-86.
26. Plant TM, Ramaswamy S, DiPietro MJ. Repetitive administration of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology.* 2006;147:1007-13.
27. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* 2005;25:11349-56.
28. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. *Endocrinology.* 2006;147:5817-25.
29. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, et al. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology.* 2005;146:3917-25.
30. Tena-Sempere M. KiSS-1 and reproduction: Focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinology.* 2006; 83:275-81.
31. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Roa J, Vigo E, Pineda R, et al. Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes.* 2006;55:2602-10.
32. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurons are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol.* 2006;18:298-303.