

11281  
30



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**EXPRESIÓN DE DOS ISOFORMAS DE mRNA DEL  
RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN  
LINFOCITOS CIRCULATES**

**TESIS  
QUE PRESENTA  
LA M. EN C. RAQUEL OCHOA RESENDIZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**TUTOR: DR. ARTURO ZARATE  
COTUTORES:  
RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA Y CESAR GONZALEZ BONILLA**

MEXICO, D.F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

NOVIEMBRE 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/100Jur/2003

**ING. LEOPOLDO SILVA**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION  
ESCOLAR DE LA UNAM.  
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevo a cabo el día 18 de junio del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la M. en B. OCHOA RESENDIZ RAQUEL, con número de expediente 300932013 y número de cuenta 6808303-2 con la tesis titulada: "EXPRESIÓN DE LAS DOS ISOFORMAS DEL mRNA PARA EL RECEPTOR DE GH EN LINFOCITOS CIRCULANTES", dirigida por el Dr. Arturo Zarate Treviño.

PRESIDENTE: DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES  
SECRETARIO: DR. ARTURO ZARATE TREVIÑO  
VOCAL: DR. RICARDO TAPIA IBARGUENGOYTIA  
VOCAL: DRA. MARISELA LUNA  
VOCAL: DRA. MARIA EUGENIA TORRES MARQUEZ  
SUPLENTE: DR. CESAR GONZALEZ BONILLA  
SUPLENTE: DRA. GABRIELA MORALI DE LA BRENA

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de junio de 2003.

**Dr. Gabriel Roldán Roldán**  
Responsable  
Facultad de Medicina

**Dr. Abel Moreno Carcamo**  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.  
Tutor(a) Dr. Arturo Zarate Treviño.  
Coordinación de Doctorado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Este trabajo se llevó a cabo gracias a los siguientes apoyos:**

- **Donativo del Fondo de Fomento a la Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, Registro FP 98-716-0081**
- **Beca-crédito otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Registro No.152630**
- **Instalaciones, equipo, material y reactivos de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, IMSS**
- **Instalaciones, equipo, material y reactivos de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, del Hospital de Especialidades y en el laboratorio de Oncología Genómica de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, del Hospital de Oncología.**

**Instituto Mexicano del Seguro Social**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## **AGRADECIMIENTOS**

- **Al Dr. Arturo Zárate Treviño, por todo el apoyo que me brindó para el desarrollo de esta tesis.**
- **Al Dr. Marco Antonio Cerbón y Moisés Mercado por su valiosa asesoría.**
- **Al Dr. César González Bonilla y a la Dra. María Eugenia Torres Márquez por su valiosa ayuda y calidad humana.**
- **Al Dr. Ricardo Tapia por sus sugerencias.**
- **A la Dra. Maricela Luna y Dra. Gabriela Morali por sus aportaciones para mejorar este manuscrito.**
- **Al personal de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas y del laboratorio de Oncología Genómica de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas por su valiosa colaboración.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# CONTENIDO

I. LISTA DE ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	4
III. ABSTRACT	5
IV. INTRODUCCIÓN	6
HORMONA DE CRECIMIENTO	6
Regulación de la secreción	7
Proteínas de unión a GH	8
Secreción anormal de la GH	9
FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINOIDE TIPO I	9
Receptor del IGF-I	10
Funciones GH.-IGF-I	11
RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO	12
Distribución del GHR	16
Regulación del GHR	16
Vías de señalización para las acciones de GH	17
Regulación de la señal de JAK2	19
Características estructurales del gen del GHR	20
Heterogeneidad de transcritos del GHR	21
V. JUSTIFICACIÓN	27
VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
VII. HIPÓTESIS	28
VIII. OBJETIVO GENERAL	29
IX. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
X. MATERIAL Y METODOS	30
Muestras Sanguíneas	30
Determinaciones hormonales	30
Separación de leucocitos	32
Extracción de RNA total	32
Reacción de la transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa	33
Análisis Estadístico	35
XI. RESULTADOS	36
XII. DISCUSIÓN	44
XIII. ANEXO	48
XIV. REFERENCIAS	52
XV. PUBLICACIÓN	63

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ATF</b>	<b>Factores activadores de la transcripción</b>
<b>AUG</b>	<b>Codón de iniciación de la traducción</b>
<b>BP</b>	<b>Proteína transportadora</b>
<b>cAMP</b>	<b>Monofosfato de adenosín cíclico</b>
<b>cDNA</b>	<b>DNA complementario</b>
<b>C/EBP</b>	<b>Factor activador de la transcripción (proteína de unión al enhancer o potenciador C)</b>
<b>CV</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
<b>DEPC</b>	<b>Dietyl-pirocarbonato</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxiribonucléico</b>
<b>E<sub>2</sub></b>	<b>Estradiol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido etilendiaminotetracético</b>
<b>Elk-1</b>	<b>Factor activador de la transcripción que se une a un elemento de respuesta al suero</b>
<b>EPOR:</b>	<b>Receptor de eritropoyetina</b>
<b>GH</b>	<b>Hormona de crecimiento</b>
<b>GHBP</b>	<b>Proteínas de unión a GH</b>
<b>GHR</b>	<b>Receptor de GH</b>
<b>GHR +3</b>	<b>Isoforma del receptor de GH con el exón 3</b>
<b>GHR -3</b>	<b>Isoforma del receptor de GH sin el exón 3</b>
<b>GHRH</b>	<b>Hormona liberadora de la hormona de crecimiento</b>
<b>GLUT1</b>	<b>Transportador de glucosa 1</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



<b>GM-CSFR</b>	<b>Receptor del estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos</b>
<b>HNF-1<math>\alpha</math></b>	<b>Factor nuclear de hepatocitos 1<math>\alpha</math></b>
<b>IGF-I</b>	<b>Factor de crecimiento insulinoide tipo I</b>
<b>IGFBPs</b>	<b>Proteínas de unión al IGF</b>
<b>IGFBP-3</b>	<b>Proteína de unión 3 al IGF</b>
<b>IL-2R</b>	<b>Receptor de interleucina -2</b>
<b>IL-9R</b>	<b>Receptor de interleucina -9</b>
<b>IMC</b>	<b>Índice de masa corporal</b>
<b>IRMA</b>	<b>Ensayo inmunoradiométrico</b>
<b>IRS-1, 2 y 3</b>	<b>Substrato del receptor de insulina 1, 2 y 3 .</b>
<b>JAK-2</b>	<b>Cinasa asociada a Janus 2</b>
<b>Kb</b>	<b>Kilobases</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodaltones</b>
<b>MAPK</b>	<b>Proteína cinasa activada por mitógenos</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PBS</b>	<b>Amortiguador salino de fosfatos</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>
<b>PI-3</b>	<b>Fosfoinositol 3-cinasa</b>
<b>PRL</b>	<b>Prolactina</b>
<b>PRLR</b>	<b>Receptor de prolactina</b>
<b>RIA</b>	<b>Radioinmunoensayo</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>
<b>RNA<sub>m</sub></b>	<b>RNA mensajero</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>Reacción de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<b>Sap-1<sup>a</sup></b>	<b>Factor activador de la transcripción (Proteína I activadora del precursor del esfingolípido)</b>
<b>SH2</b>	<b>Dominio de homología con la secuencia para el protooncogen src</b>
<b>SOCS</b>	<b>Supresores de la señalización de citocinas</b>
<b>Sp</b>	<b>Proteasa de serina</b>
<b>STAT</b>	<b>Proteína transductora de señal y activadora de la transcripción</b>
<b>TCF</b>	<b>Factor complejo ternario activador de la transcripción</b>
<b>3'-UTR</b>	<b>Región no traducida 3' del transcrito</b>
<b>5'-UTR</b>	<b>Región no traducida 5' del transcrito</b>
<b>V1-V9</b>	<b>Isoformas de RNAs mensajeros que varían en su 5'-UTR</b>
<b>WSXWS</b>	<b>Secuencia de triptofano, serina, cualquier aminoácido, triptofano, serina</b>
<b>YY1</b>	<b>Yin-yang 1</b>
<b>YXXFS</b>	<b>Secuencia de tirosina, X puede ser glicina, serina, lisina o ácido glutámico; fenilalanina y serina</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## II

### RESUMEN

El receptor de la hormona de crecimiento (GHR) expresa dos isoformas, que difieren por la presencia (GHR + 3) o ausencia (GHR - 3) del exón 3, pero se ignora el mecanismo de regulación.

**Objetivos:** Determinar la expresión de las isoformas de mRNA del GHR y su relación con los niveles en plasma de la hormona del crecimiento (GH), el factor de crecimiento insulinoide tipo-I, su proteína de unión-3 (IGFBP-3) y esteroides sexuales.

**Material y Métodos.** Se incluyó un grupo de 11 pacientes con acromegalia y un grupo testigo de 12 individuos sanos, se usó la técnica de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y diferentes inmunoensayos .

**Resultados:** Se encontró en todas las muestras la expresión de ambas isoformas, pero el porcentaje de expresión de GHR + 3 y GHR - 3 fue similar en los pacientes acromegálicos ( $6.0 \pm 1.7$  y  $8.3 \pm 2.0$  %,  $M \pm EE$ ). Por el contrario, en los sujetos normales predominó la isoforma GHR - 3 ( $11.8 \pm 3.0$  y  $5.1 \pm 0.68$  %,  $M \pm EE$  respectivamente;  $p < 0.05$ ) y se encontró correlación significativa ( $p < 0.01$ ) entre el porcentaje de GHR - 3 con los niveles de IGF-I.

**Conclusiones:** Se demostró la expresión de ambas isoformas de GHR en condiciones normales y patológicas, la predominancia de GHR - 3 en sujetos normales y la relación entre esta isoforma y los niveles del IGF-I indicando que niveles elevados de GH, pueden trastornar el binomio GH-GHR resultando en una alteración del mecanismo de síntesis de IGF-I.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### III

#### ABSTRACT

Growth hormone receptor (GHR) transcripts exist in two isoforms differing by the presence (GHR + 3) or absence (GHR - 3) of exon 3. The regulation of both GHR isoforms remains unclear.

**Objective:** To determine the expression of two isoforms of the GHR and their relationship with circulating GH, insulin-like growth factor-I (IGF-I), insulin-like growth factor binding protein -3 (IGFBP-3), and sexual steroids levels in serum.

**Methods:** We used a reverse transcriptase-polymerase chain assay to study the expression of the two isoforms in lymphocytes from 12 normal subjects and 11 acromegalic patients. Hormone levels were determined by different immunoassays.

**Results:** All samples showed expression of both GHR isoforms, but the percentage of expression of GHR + 3 and GHR - 3 was similar in acromegalic patients ( $6.0 \pm 1.7$  vs  $8.3 \pm 2.0$  %,  $M \pm SE$ ). In contrast, in healthy subjects the GHR - 3 was the predominant isoform ( $11.8 \pm 3.0$  vs  $5.1 \pm 0.68$  %,  $M \pm SE$ ;  $p < 0.05$ ), and levels of expression of GHR - 3 correlated significantly with IGF-I.

**Conclusions:** These data demonstrated the co-expression of both GHR isoforms in normal and pathologic condition; however GHR - 3 is the predominant form in normal subjects, and showed a negative correlation with IGF-I levels. Therefore it is proposed that in cases of abnormal secretion of GH, the interplay between GH and its receptor is disturbed.

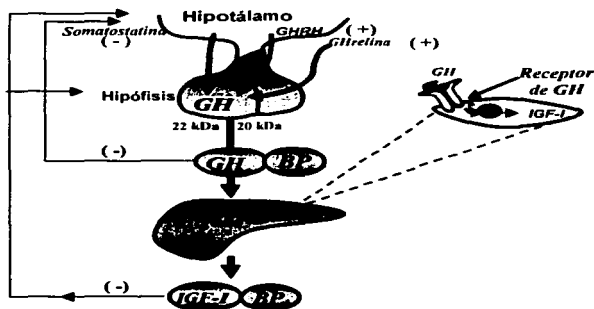
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## IV

## INTRODUCCIÓN

**HORMONA DE CRECIMIENTO**

La hormona del crecimiento (GH), el factor de crecimiento insulinoide, tipo I (IGF-I), así como de las proteínas transportadoras de ambas hormonas forman parte del eje somatotrópico (1) como se ilustra en la Figura 1. La GH es una hormona proteica, que se sintetiza en los somatotrópos de la adenohipófisis y es vertida en la circulación como varias isoformas moleculares. La mayor proporción (75%) de estas isoformas es un monómero de 191 aminoácidos con un peso molecular de



**Fig. 1 Tejidos, hormonas y receptores que componen el eje somatotrópico. Las hormonas hipotalámicas: GHRH y somatostatina provocan aumento (+) y disminución (-) de los niveles de GH, respectivamente. La GH en circulación se une al GHR sobre uno de sus tejidos blanco para inducir la secreción de IGF-I. La GH y el IGF-I también pueden regular los niveles de GH.**

22 kDa, el cual parece poseer la principal actividad biológica; en menor proporción (5-10 %) existe otro monómero de 20 kDa que resulta de un empalme alternativo del transcrito primario del gene de GH. En la circulación también se pueden detectar moléculas de GH de cerca de 40 kDa que se consideran agregados de los monómeros y se les conoce como macro-GH. En condiciones fisiológicas, durante la gestación, la placenta produce otra isoforma de GH con un peso molecular de 22 kDa con 161 aminoácidos iguales a los que contiene el monómero producido en la hipófisis (2). El feto sintetiza GH desde casi el inicio de la gestación y alcanza el máximo cerca de la semana 20 y después decrece la concentración hasta el parto; así permanece en niveles bajos, pero vuelve a incrementarse cuando se inicia la pubertad y después de ella empieza a decrecer conforme la edad avanza (3).

### **Regulación de la secreción de la GH**

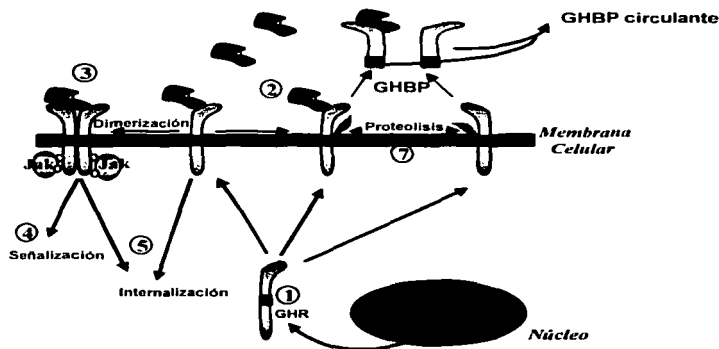
La síntesis y secreción de la GH resulta de la acción de dos neurohormonas: el efecto estimulante de la hormona liberadora de la hormona de la GH (GHRH) y el inhibitorio de somatostatina. Sobre este mecanismo dual se suman diversos factores que intervienen en la secreción de GH como son otras neurohormonas, neurotransmisores, así como condiciones fisiológicas como el estrés, el ayuno, ejercicio, sueño y otras hormonas producidas por otros tejidos (tiroides, gónadas, suprarrenal) (1). Todos estos factores dan como resultado una secreción episódica de la GH, con picos más frecuentes durante las horas de sueño, separados por valles de concentraciones mínimas; los múltiples pulsos de la GH probablemente surgen de múltiples pulsos secretores de la GHRH durante períodos de una secreción reducida de somatostatina la cual aumenta en respuesta a concentraciones elevadas de la GH y el IGF-I, se considera que el resultado neto en la secreción de la GH es la suma de los efectos de estas dos neurohormonas hipotalámicas (4).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Recientemente se ha descubierto otro estimulador de la GH llamado Ghrelina, un péptido pequeño de 28 aminoácidos cuya expresión ha sido observada en estómago, hipotálamo y en linfocitos (5). La identificación de la GHrelina sugiere que la liberación de la GH puede regularse también por señales periféricas independientes del hipotálamo.

### Proteínas de unión a GH

La GH circula en forma libre y aproximadamente la mitad (6), unida a proteínas de unión de alta y baja afinidad que se han etiquetado con las siglas del inglés GHPB. Las de alta afinidad corresponden al segmento extracelular del receptor de GH que se desprendió de dicho receptor por acción de proteasas (7), es por esto que



**Fig. 2** Generación de la proteína fijadora de la GH o GHPB, mecanismo de dimerización e internalización del receptor. (1) Síntesis del GHR, (2) unión de una molécula de GH al GHR insertado en la membrana, (3) dimerización de dos moléculas de receptor a una de GH y como consecuencia Jak-2 se une al receptor activado, (4) conduciendo a la transducción de señal. (5) Internalización del GHR para su reciclaje o degradación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

compite con el receptor por unirse a la GH (Fig. 2). Por lo anterior los niveles circulantes de GHBP miden indirectamente la cantidad del receptor de la GH (GHR) aunque con ciertas limitaciones (6), su determinación ha sido importante ya que es la única forma de medir al receptor de GHR *in vivo*.

Se cree que la unión de la GH a las GHBP la protege de la degradación y por lo tanto prolonga su vida media y duración de la acción biológica, aunque su significado biológico todavía no se ha determinado (6). Es también relevante que existe una mayor proporción de proteínas transportadoras en la mujer posiblemente por la acción de los estrógenos (8,9). Estados fisiológicos o patológicos que modifican la producción de proteínas circulantes se acompañan de cambios en la concentración de GHBP; así en la gestación y en obesidad se encuentran elevados los niveles de GHBP (6,10).

### **Secreción Anormal de la GH**

La sobreproducción de GH debido a un tumor hipofisario puede causar gigantismo en individuos jóvenes. Cuando esta sobreproducción se presenta en adultos, en los cuales las epífisis óseas se han cerrado y ya no es posible un mayor crecimiento longitudinal del hueso se produce la enfermedad llamada acromegalia con características clínicas de crecimiento de tejidos blandos. Por el contrario cuando se presenta un defecto en la síntesis o secreción de GH o de su receptor se presenta talla baja (17,18).

### **IGF-I**

La acción de la GH estimula en los tejidos la producción del IGF-I, el cual es secretado por el hígado y otros tejidos. Las ideas acerca del mecanismo de acción de la GH han tenido diversos cambios conforme se obtiene más información. Al principio se pensó que los efectos biológicos de GH eran el resultado de la síntesis

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



de IGF-I y en consecuencia de la acción neta de esta última sobre diversos tejidos, pero se ha comprobado que la GH puede ejercer acciones celulares directas no mediadas por IGF-I, por lo que actualmente se ha establecido que los efectos de la GH dependen de las interacciones de esta hormona y el IGF-I (11).

El IGF-I es un polipéptido de 70 aminoácidos, con secuencia y estructura similar a la de la proinsulina y peso molecular de 7 kDa, que participa en el crecimiento de casi todos los órganos del cuerpo (12). Como en el caso de la GH, IGF-I circula libre o unido a diversas proteínas fijadoras (IGFBPs) que prolongan su vida media y modulan su acción biológica. Se han identificado seis tipos de proteínas que además poseen funciones particulares; la número 3 (IGFBP-3) es la que en mayor proporción se une a IGF I y se relaciona con la concentración de GH (13).

Ha resultado difícil la estimación de los niveles de la GH en la sangre debido a la heterogeneidad de las isoformas y la secreción en forma pulsátil y episódica, lo que hace que en la mitad de los casos la GH puede ser indetectable (14). Al contarse con técnicas sensibles y específicas para medir el IGF-I se encontró que estas determinaciones reflejaban con mayor precisión el estado del eje somatotrópico debido a que las concentraciones permanecen prácticamente constantes durante todo el día y los valores se pueden interpretar con relación al estado de producción de la GH (15).

### **Receptor de IGF-I**

Es una glicoproteína con actividad de tirosina-cinasa y tiene homología con el receptor de insulina; se trata de un heterotetrámero compuesto de dos subunidades, unidas por puentes disulfuro; la subunidad  $\alpha$  se encuentra fuera de la célula y se une a la subunidad  $\beta$  que esta formada por una región extracelular, transmembranal y citoplasmática. La subunidad  $\alpha$  une al IGF-I y la subunidad  $\beta$  se encarga de las funciones de internalización y señalización (12). La unión con el receptor origina

cambios estructurales, lo que permite iniciar el proceso de fosforilación intracelular. Aunque esta forma de receptor se une preferentemente a IGF-I, también es capaz de hacerlo con insulina (13).

### **Funciones GH-IGF-I**

La GH tiene numerosas acciones biológicas, las cuales son llevadas a cabo directa o indirectamente a través de su mediador IGF-I, aunque algunas de las funciones del eje somatotrópico son llevadas a cabo por ambos integrantes (GH-IGF-I), en otros se desconoce cual de los dos componentes es el responsable (tabla 1). Las acciones metabólicas que son llevadas a cabo directamente por la GH son: a) Aumentar la lipólisis, con lo que tiende a disminuir el catabolismo de proteínas al movilizar la grasa como una fuente más eficiente de energía originando la liberación de ácidos grasos a partir del tejido adiposo e incrementando la conversión a acetil-coenzima A, del cual se deriva energía. b) Estimula el transporte de aminoácidos en el músculo y la síntesis proteica en el hígado (16).c) Afecta el metabolismo de los carbohidratos ya que un exceso de GH disminuye la utilización de los carbohidratos impidiendo la captación de glucosa por parte de la célula. Esta acción constituye una resistencia a la insulina inducida por la GH, ocasionando intolerancia a la glucosa e hiperinsulinismo secundario (12).

La hormona de crecimiento a través del IGF-I, a) Efectúa acciones proliferativas como resultado de la síntesis de DNA, la transcripción y traducción del mRNA. b) Aumenta el crecimiento lineal de los huesos interviniendo en la expansión de los condrocitos e incorporando sulfato en el cartílago. c) Presenta efectos metabólicos semejantes a la insulina como la estimulación de la síntesis de glucógeno (16). El efecto “ahorrador” de proteínas, el transporte de aminoácidos por GH y las acciones del IGF-I son los mecanismos mediante los cuales se promueve el crecimiento (14).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLA 1. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA GH y EL IGF-I**

<b>EFFECTOS DIRECTOS DE GH</b>	<b>EFFECTOS MEDIADOS POR IGF-I</b>	<b>AMBOS ( O NO SE CONOCE SI ES GH O IGF - I )</b>
Lipólisis	Expansión de condrocitos	Antagonismo de Insulina
Transporte de aminoácidos en músculo	Incorporación de sulfato en cartilago	Hiperplasia de células de los islotes de Langerhans
Síntesis de proteínas en hígado	Síntesis de DNA y RNA	Eritropoyesis
Producción de IGF-I, IGFBP-3	Retención de Na y fósforo en riñón	Retención de nitrógeno
Diferenciación de precondrocitos	Crecimiento lineal del hueso	Crecimiento somático
Lactogénesis		Aumento de función inmune
Acción hipoglicémica aguda	Síntesis de glucógeno	

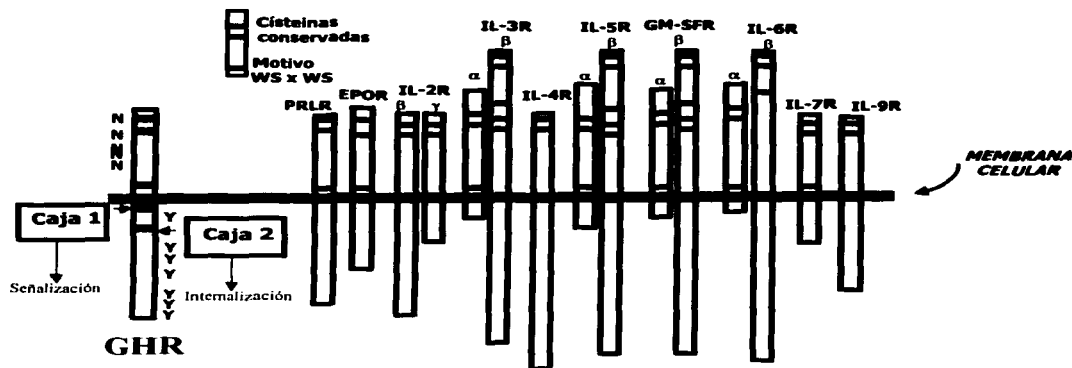
### ***RECEPTOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GHR)***

La GH ejerce sus efectos biológicos al unirse a receptores específicos en la superficie celular. El GHR es miembro de la familia de receptores de citocinas clase-I, que incluye receptores para prolactina (PRL), leptina, eritropoyetina y múltiples interleucinas (Fig 3). Estos receptores comparten algunos aspectos estructurales que permitieron su asociación en una familia: su inserción en la membrana es en un solo paso, presentan en el dominio extracelular dos pares de cisteínas conservadas involucradas en puentes disulfuro. También presentan una secuencia también conservada de triptofano, serina, cualquier aminoácido,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

triptofano y serina (WSXWS). En el GHR esta región contiene la secuencia YXXFS (tirosina, X puede ser glicina, serina, lisina o ácido glutámico; fenilalanina y serina (19). En contraste con otros receptores que tienen actividad catalítica en su porción citoplasmática, los receptores de citocinas no la tienen, pero la adquieren al unirse a una tirosina cinasa citoplasmática. El GHR une a la tirosina cinasa asociada a Janus 2 o JAK-2 (20,21).

El GHR es una glicoproteína transmembranal de 130 kDa, con 638 aminoácidos que une a la GH con alta afinidad y especificidad. El receptor es sintetizado como una proteína precursora que contiene en la región amino terminal un péptido señal corto de 18 aminoácidos que le sirve para dirigirse del retículo endoplásmico a la superficie celular. El receptor maduro (sin el péptido señal), tiene una región extracelular amino terminal de 245 aminoácidos que une al ligando y presenta 5 sitios de N-glicosilación y 6 pares de cisteína que forman tres puentes disulfuro y queda una cisteína libre. El dominio transmembranal hidrofóbico tiene 24 aminoácidos y la región carboxilo terminal intracitoplásmica contiene 350 aminoácidos, es la encargada de la señalización. En esta última región se encuentran dos dominios funcionales importantes llamados caja 1 y caja 2 (Fig.3); el primero es una región rica en prolina situada en la parte próxima a la membrana y que consiste de 8 aminoácidos conservados, y es la única región citoplasmática conservada entre todos los miembros de esta familia por lo que es el candidato obvio para la interacción receptor-JAK2; su mutación o delección impide la unión de JAK2 y evita la mayor parte de la señalización activada por la GH. La caja 2 es una región localizada aproximadamente a 30 aminoácidos de la región carboxilo terminal de la caja 1 y consiste en una secuencia de 10 aminoácidos que son esenciales para la internalización y degradación del receptor (22,23) (Fig.3). La estructura tridimensional de la parte extracelular muestra siete cadenas  $\beta$

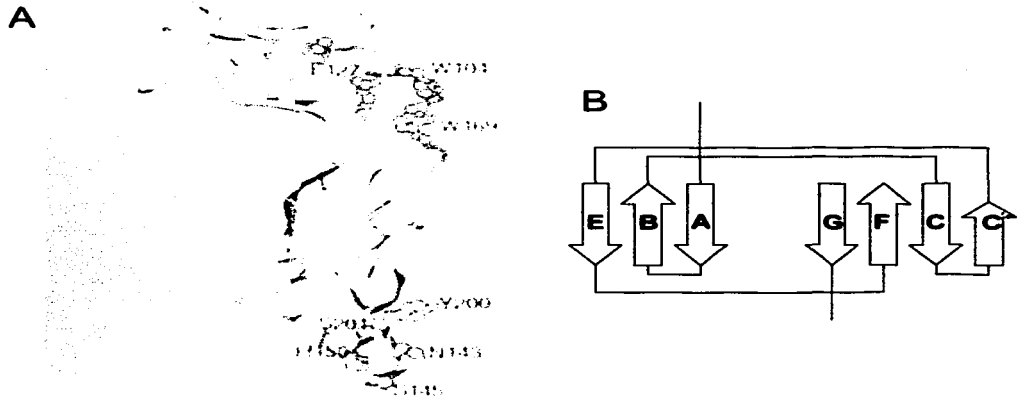


**Fig. 3** Representación esquemática de la familia de receptores de citocinas clase-1. GHR, PRLR: receptor de prolactina, EPOR: receptor de eritropoyetina, IL-2R...IL-9R:receptor de interleucina -2...-9, GM-CSFR: receptor del estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos. Las líneas gruesas negras indican las cisteínas conservadas la secuencia conservada WSXWS. Algunos receptores están formados por subunidades ( $\alpha$ , $\beta$  o  $\gamma$ ). La caja 1 y 2 son regiones funcionales del GHR. N:sitios potenciales de N-glicosilación y Y: tirosinas intracelulares importantes para la fosforilación.

denominadas A, B, C, C', E, F y G divididas en dos láminas, Las cadenas A, B y E pertenecen a una lámina; C, C', F y G a la otra (Fig.4). El dominio amino-terminal contiene los tres puentes disulfuro, dos de ellos unen las cadenas  $\beta$  vecinas y el tercero une las dos láminas del receptor (Figura 4).

Estudios de difracción de rayos X y de mutación dirigida del dominio extracelular del GHR en presencia de la GH (21), han permitido caracterizar los aminoácidos del GHR involucrados en la unión con GH (Figura 4), así como caracterizar la relación estequiométrica de la GH con su receptor. Esta relación es  $GH_1(GHR)_2$ , ya que GH tiene dos sitios de unión a receptores y cuando la GH se une a un receptor el

otro sitio de acoplamiento atrae al otro receptor para generar un homodímero. Este dímero, resultado de la unión con la hormona, marca el inicio de la señalización ya que se produce un cambio en la conformación de la parte citoplasmática del receptor uniendo a la JAK2 y provocando la fosforilación de la JAK2 y del GHR sobre sus residuos de tirosina, las cuales forman sitios de alta afinidad para una variedad de proteínas involucradas en señalización (24,25).



**Fig. 4 Estructura tridimensional de la parte extracelular del GHR. (A) Los aminoácidos involucrados en la unión con la hormona se representan en azul: triptofano 104 (W104), Ácido Glutámico 127 (E127) y triptofano 169 (W169) en dimerización en verde: tirosina 200 (Y200), serina 201 (S201), histidina 150 (H150), asparagina 143 (N143) y serina 145 (S145), secuencia la Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) en gris y los tres puentes disulfuro en amarillo (B) Diagrama de las regiones de la GHPB mostrando las siete cadenas  $\beta$  denominadas A, B, C, C', E, F y G divididas en dos láminas. Las cadenas A, B y E pertenecen a una lámina; C, C', F y G a la otra (de Vos. 1992. Science. 255:306).**

### **Distribución del GHR**

El GHR es abundante en hígado y riñón, donde se caracterizó originalmente por experimentos de unión con GH radiactiva (26). El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular y la disponibilidad de sondas radiactivas y métodos muy sensibles han permitido determinar la presencia del mRNA e identificar que los sitios de síntesis del GHR se encuentran en casi todos los tejidos del cuerpo (12). La expresión del mRNA del receptor en leucocitos es muy baja comparada con la del hígado y se ha demostrado que el 30% expresa receptores para GH, con una baja expresión en células T. En cambio casi todos los linfocitos B y monocitos tienen una alta expresión del GHR, encontrándose este receptor en un 90% de estas células. Su expresión se relaciona con la edad, aunque los resultados son conflictivos respecto a la relación que guarda con GHBP (27,28).

### **Regulación del GHR**

El estudio de la regulación del GHR en el humano ha sido difícil debido a la dificultad para obtener tejidos para su estudio y es por esto que la mayor parte de la información se basa en la determinación de la GHBP y en estudios de GHR en animales, en los que se ha determinado que varía con la edad y que se encuentra bajo el control de diferentes hormonas. Así, su expresión ha sido descrita en el hígado de rata desde los 16 días de vida embrionaria, aumenta substancialmente en la vida postnatal y alcanza niveles máximos en el momento del desarrollo de la función reproductora, lo cual ocurre en la mayor parte de las especies estudiadas. En la rata los niveles de expresión aumentan cuando se administra la GH pero por otra parte, la administración aguda de GH puede inducir una regulación a la baja del receptor (9). Hay discrepancias en relación al efecto de los esteroides sexuales: en la rata se ha reportado un efecto estimulador del estradiol sobre la expresión de GHR en hígado, además de presentarse un dimorfismo sexual ya que GHR es más

abundante en ratas hembras que en ratas macho (29). Sin embargo en conejos se ha observado un efecto inhibitorio a dosis fisiológicas de estradiol en hígado y en cartílago de crecimiento (30). En humanos se conoce poco acerca de la regulación del GHR bajo condiciones fisiológicas o patológicas, ya que el ayuno y la desnutrición provocan una disminución en la expresión de receptores, asimismo su expresión disminuye después de una cirugía y con enfermedades crónicas (31). Algunas investigaciones en líneas celulares humanas han sugerido que los niveles circulantes de hormonas tiroideas y esteroides desempeñan una función en la regulación del receptor (32). Las concentraciones de GH a niveles fisiológicos aumentan la expresión de mRNA del GHR y por el contrario dosis elevadas la disminuyen (33). También el tratamiento con glucocorticoides a corto plazo aumenta la expresión del receptor mientras que a largo plazo tiene efecto supresor (34). En linfocitos no se ha encontrado asociación entre la expresión del GHR con género, niveles en suero de GH o de IGF-I, pero sí con la edad y con respecto a la GHRP los resultados son contradictorios (27,28).

### **Vías de señalización para las acciones de GH**

#### *Regulación de la transcripción*

La GH ejerce muchas de sus funciones fisiológicas regulando la transcripción de genes para una variedad de proteínas, como IGF-I, factores de transcripción y enzimas metabólicas (35).

La principal vía de señalización de GH involucrada en esta regulación es a través de la familia de factores de transcripción citoplasmáticos llamada: proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STATs), que cuando son activadas migran al núcleo. La fosforilación de JAK2 activado por la dimerización del receptor en respuesta a GH a su vez fosforila por lo menos a cuatro miembros de esta familia (STAT 1, 3, 5a y 5b), lo que conduce también a dimerización de los



STATs , formando homodímeros y heterodímeros que se mueven hacia el núcleo, en el que actúan como factores de transcripción uniéndose al DNA (36). Una segunda vía que es importante para la regulación de la transcripción por GH es la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (337). El número de factores de transcripción activados por la GH va en aumento y recientemente se han incluido además de los miembros de la familia Sp, proteínas que se unen al potenciador o enhancer CCAAT, al receptor de glucocorticoides, el YY1, los factores TCF (Factor complejo ternario) Elk-1 (Factor de transcripción que se une a un elemento de respuesta al suero) y Sap-1<sup>a</sup> (Proteína 1 activadora del precursor del esfingolípido) el factor activador de la transcripción (ATF)-2 y la proteína homóloga C/EBP, el factor nuclear de hepatocitos 1 $\alpha$ (HNF-1 $\alpha$ ) y HNF-4, pero el responsable para la activación del IGF-I todavía no se conoce (35,38).

#### *Acciones metabólicas del GHR*

Como ya se dijo la GH tiene efectos tanto semejantes a insulina como anti-insulina sobre células y tejidos. Las acciones semejantes a insulina son el aumentar el transporte de glucosa y aminoácidos, la lipogénesis y la síntesis proteica, por lo que GH e insulina pueden activar algunas vías de señalización comunes, como la fosforilación del substrato de insulina 1, 2 y 3 (IRS-1, -2 y -3), a través de JAK2, lo que resulta en un sitio de unión para el dominio con homología de la secuencia para el protooncogen src (SH2) de la subunidad regulatoria de 85 kDa de la fosfoinositol 3-cinasa (PI-3). Aunque esta PI-3 cinasa es requerida para el transporte de glucosa estimulado por insulina, no se ha reportado que el transporte de glucosa estimulado por GH requiera PI-3 cinasa. Sin embargo la inhibición de PI-3 cinasa bloquea la síntesis de lípidos estimulada por GH además de la acción anti-lipolítica de GH, lo que sugiere que la actividad PI-3 cinasa es importante para la acción semejante a insulina de la GH (39).

La reducción de grasa corporal inducida por GH involucra tanto una disminución de la lipogénesis como un aumento en la lipólisis. Los mecanismos de señalización por los que GH regula estos procesos todavía no se conocen pero parece ser que GH inhibe la diferenciación del adipocito (40) y que el mecanismo por el que GH aumenta la lipólisis es por acción de proteínas G, que aumentan el cAMP, por acción de una adenilciclase y produce la activación de la lipasa sensible a la hormona (41).

Las vías de señalización involucradas en la estimulación de la síntesis proteica son desconocidas, pero se sabe que algunas tirosinas específicas en el dominio citoplasmático del GHR son necesarias para la estimulación de ésta síntesis, lo que sugiere un reclutamiento de moléculas de señalización directamente al GHR (42).

El aumento crónico de la GH produce resistencia a la insulina y diabetes. Este efecto parece ser debido a la disminución del receptor de insulina y a la inhibición de la expresión del gen que codifica al transportador de glucosa 1 (GLUT1) (43).

#### *Regulación del citoesqueleto por GH*

Debido a que GH es un regulador positivo del crecimiento celular y de la diferenciación la GH estimula el movimiento celular y la expansión. El citoesqueleto está involucrado en la regulación de la morfología y el movimiento. Se sabe que GH estimula el rearrreglo de actina y la polimerización de microtúbulos, pero no se ha aclarado cómo exactamente la JAK2 activada transmite la señal al citoesqueleto (35).

### **Regulación de la señal de JAK2**

#### *Supresores de la señalización de citocinas*

En la regulación de la señal de JAK2 estimulada por GH es importante la familia de genes inducidos por citocinas llamados supresores de la señalización de citocinas o SOCS, que son un grupo de proteínas involucradas en la regulación negativa de la

acción de las citocinas a través de la inhibición de los STATs. De los ocho miembros de la familia de los SOCS, la GH induce la expresión de los SOCS-1, -2, -3 y CIS en hígado de rata, aunque no se conoce cómo la GH induce la transcripción de estos reguladores (44,45).

#### *Fosfatasa*

Además de los SOCS, la desactivación de los STATs se debe a la activación y/o el reclutamiento de una o más fosfatasa de tirosina para defosforilar al receptor, terminando así con el reclutamiento de las moléculas de señalización. Probablemente después de la fosforilación el receptor es internalizado y degradado, pero estas fosfatasa no se han identificado, aunque se piensa que pudieran ser fosfatasa del dominio SH2 de JAK2 (35,45).

#### **Características estructurales del gen del GHR**

El GHR es codificado por un solo gen localizado en el brazo corto del cromosoma 5p13.1-p12 (46). Este gen no ha sido completamente caracterizado, lo que hace difícil determinar cómo se lleva a cabo su regulación. El gen presenta 10 exones y el mRNA que transcribe consiste de 9 ya que el exón 1 codifica para la región no traducida 5' o 5'-UTR del mRNA, después del cual se encuentran los nueve exones codificantes (exones 2-10). El exón 2 codifica la secuencia de los 11 pares de bases (pb) finales del 5'-UTR, los 18 aminoácidos del péptido señal y los primeros cinco aminoácidos de la región extracelular del receptor. Los exones 3-7 codifican la mayor parte de la región extracelular, el ocho codifica los 3 aminoácidos finales de la región extracelular, los 24 aminoácidos de la región hidrofóbica transmembranal y los primeros cuatro aminoácidos del dominio intracelular. Los exones 9 y 10 codifican los 346 aminoácidos restantes del dominio intracelular y el exón 10 también codifica las 2 Kilobases (Kb) de la región no traducida 3' o 3'-UTR del transcrito (47) (Fig.5).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El transcrito primario que genera el mRNA puede sufrir un procesamiento alternativo produciendo varios mRNAs (44). El mRNA principal que codifica para el receptor completo mide aproximadamente 4.7 Kb, esto es dos veces más largo del mínimo necesario para codificar los 638 aminoácidos del receptor y del péptido señal. El exceso de este mRNA se debe a la presencia de la región de aproximadamente 2 Kb del 3'-UTR, aunque la función específica no se ha investigado se piensa que afectan el grado de degradación de mRNAs y quizá también el inicio de la traducción (49).

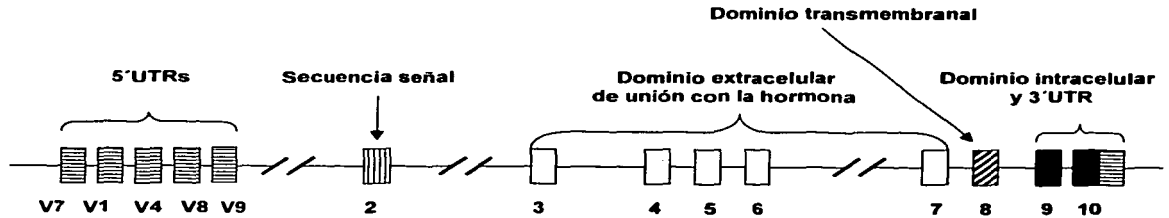


Fig 5 Gen del GHR humano. La línea horizontal representa la secuencia de los intrones, las líneas diagonales en la línea representan las porciones de los intrones no clonados, las cajas representan los exones 2 al 10. Los exones con bandas horizontales codifican los UTRs del transcrito (5'-UTRs y 3'-UTRs). El exon con bandas verticales codifica la secuencia señal. Los exones V1, V4, V7, V8 y V9 son los exones que han sido clonados de los nueve que codifican para las secuencias alternativas del 5'UTR (Modificado de Edens, Talamantes. 1998. *Endocrine Reviews* 19:559).

### ***Heterogeneidad de transcritos del GHR***

Se ha encontrado una heterogeneidad en el tamaño y secuencia de transcritos de GHR (47). Esta heterogeneidad es generada por varios tipos de procesamiento alternativo del transcrito primario, que incluye omisión de exones, retención de intrones, el uso de sitios alternativos de empalme, sitios alternativos del comienzo de la transcripción y el uso de sitios alternativos de poliadenilación. En algunos

casos el procesamiento alternativo genera transcritos que difieren significativamente en tamaño del transcrito de 4.7 Kb, por lo que se usa el término transcrito completo para indicar el transcrito que codifica el GHR completo, que contiene la totalidad de la región extracelular, transmembranal e intracelular. Los transcritos generados por procesamiento alternativo se dividen en tres categorías: **1)** transcritos con heterogeneidad de la región 5'-UTR, **2)** transcritos que codifican delecciones o truncamientos del receptor transmembranal y citoplasmático y **3)** transcritos que codifican delecciones en la región de unión con la hormona (9).

***1) Heterogeneidad de 5'-UTRs.*** En el hígado humano, el análisis del mRNA del GHR ha demostrado nueve diferentes RNAs mensajeros que varían en su 5'-UTR (V1-V9) (50), los diferentes 5'-UTR son idénticos en las primeras 11 bases río arriba del codón de iniciación de la traducción: AUG, y divergen en la secuencia a partir de la 12ava base. El exón 2 codifica las 11 bases finales del 5'-UTR, así como los primeros 23 aminoácidos de la región codificadora, por lo que el punto de divergencia de las secuencias del 5'-UTR coincide exactamente con el límite del exón 2, de tal manera que todos codifican la misma proteína. La mayoría de los 5'-UTRs de GHR presentan uno o más codones AUG. Los codones AUG se presentan en menos del 10% de todos los 5'-UTRs eucariontes, pero se encuentran en mayor frecuencia en los 5'-UTRs de protooncogenes, factores de crecimiento y receptores (51). Los 5'-UTRs son codificados por múltiples versiones de exones uno, los cuales se empalman al comienzo del exón 2 para formar el mRNA de GHR alternativos y se ha demostrado que algunos 5'-UTRs se asocian con transcritos de tejidos específicos como el V3 que se expresa en hígado fetal y postnatal, en cambio el V1 se expresa exclusivamente en el hígado postnatal (52).

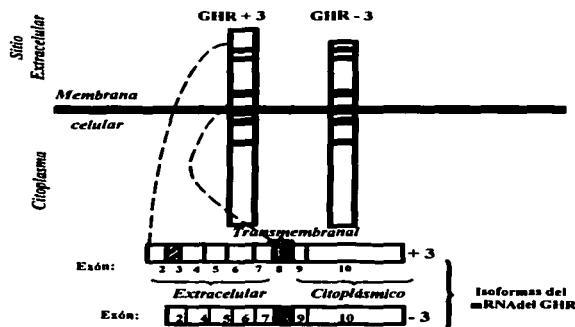
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**2) Truncamientos de la región intracelular.** Debido a que el dominio intracelular del receptor es el responsable del inicio de la transducción de señal, alteraciones en esta región pueden alterar la respuesta a GH. La presencia de transcritos de GHR con una secuencia diferente en el dominio intracelular fue detectada primeramente en conejo y confirmada en humanos (53). Estos transcritos pierden la mayor parte del dominio intracelular debido a un empalme alternativo en el que el sitio donador de empalme del exón 8 se une a un sitio alternativo aceptor de empalme localizado a 26 pb dentro del exón 9, conduciendo a un codón de stop en la posición 280 y resultando en un receptor truncado que contiene los 246 aminoácidos del dominio extracelular, 24 de la región transmembranal. Los primeros tres aminoácidos de la región intracelular seguidos de 6 aminoácidos nuevos antes del codón de término lo que significa un receptor truncado en el 97.5% del dominio citoplasmático, debido a que el número total de aminoácidos de esta proteína truncada es 279 se le conoce como GHR<sub>279</sub> (9) y se ha encontrado expresado en hígado, glándula mamaria, placenta, tejido adiposo, pulmón, riñón, estómago y en músculo. Los niveles de expresión de este transcrito en glándula mamaria, tejido adiposo y placenta fueron comparables a los niveles encontrados del transcrito completo, pero en hígado y riñón se encontraron niveles más bajos, los niveles en hígado de la forma GHR<sub>279</sub> fueron 10% menores a los de la forma completa y en pulmón, estómago y músculo fueron apenas detectables (54). La expresión de esta isoforma en tejidos humanos es baja comparada con la expresión del receptor completo y estudios funcionales han confirmado que aunque GHR<sub>279</sub> es inactivo, ya que los aminoácidos faltantes en esta isoforma son necesarios para la activación de JAK2, puede actuar como un regulador negativo de la forma completa de el GHR. Además el GHR<sub>279</sub> no se internaliza y comparado con el receptor completo presenta una gran capacidad de generar GHBP, lo que sugiere que esta isoforma puede ser un mecanismo para producir GHBP (48,55).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3) Deleciones en la región extracelular de GHR

Se ha demostrado que existen dos isoformas de mRNA del receptor de la GH debidas a la retención o exclusión del exón 3 (Fig. 5). Este descubrimiento causó gran interés debido a que se sabe que mutaciones del dominio extracelular de GHR conducen a una pérdida de la unión o menor afinidad por GH. El análisis de cDNAs aislados de una genoteca de placenta humana con enzimas de restricción demostraron que había dos tamaños de cDNAs correspondientes a GHR y la secuenciación de dichos cDNAs mostró que el cDNA de mayor tamaño correspondía al transcrito de tamaño completo y que el pequeño era idéntico en secuencia excepto por la omisión de 66 bases en la región extracelular y que estas bases correspondían a las bases codificadas por el exón 3 del gen de GHR. La



**Fig. 6 Representación esquemática de la síntesis de las isoformas del mRNA de la región extracelular del receptor de la hormona de crecimiento humana.**

coincidencia de la secuencia omitida con el exón 3 sugirió que este transcrito era producido por un empalme alternativo en el que el sitio donador del empalme del exón 2 era unido con el sitio aceptor del exón 4 y se le llamó al transcrito que excluye al exón 3 o isoforma - 3 (56). La ausencia del exón 3 produce un receptor sin 22 aminoácidos (los aminoácidos 7-28) en el dominio de unión con la hormona, con la pérdida de un sitio de N-glicosilación y la substitución de un aminoácido neutro por uno con carga negativa (alanina por aspartato). Todo esto conduce a un cambio de carga, tamaño e hidrofobicidad. Cuando se compara esta isoforma con otros miembros de la familia de receptores de citocinas se observa que la región que codifica para el exón 3 no se encuentra en el receptor de PRL por lo que la isoforma carente del exon 3 tiene mayor homología con el receptor de PRL que la isoforma completa (56).

Posteriormente fueron examinadas las propiedades biológicas de ambas isoformas *in vitro* expresándolas artificialmente en reticulocitos de conejo, ovocitos de *Xenopus* (57) y en células COS-7 (58) y se observó que la ausencia de estos aminoácidos no afecta la afinidad por la hormona clásica, la de placenta o la PRL y que ambas isoformas se internalizan de igual manera (59). Recientemente se ha desarrollado un ensayo para la determinación de cada una de las isoformas que por proteólisis se convierten en GHbPs, demostrándose que ambas son liberadas a la circulación (60). Varios grupos han investigado estas isoformas usando RT-PCR y han encontrado su expresión en todos los tejidos y líneas celulares humanas, mostrando patrones de tres tipos de patrón: **a)** expresión solo de la isoforma +3, **b)** solo de la -3 y **c)** la coexpresión de ambas. Algunos estudios informaron que la variación de la relación de la isoforma -3 con respecto al transcrito completo era específica de tejido (56,58,61) y que la forma que omite el exón 3 se expresaba principalmente en placenta (56), mientras que otros encontraron que esta relación no cambiaba de tejido a tejido pero variaba de individuo a individuo, ya que

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



diferentes tejidos obtenidos del mismo individuo mostraron el mismo patrón, sugiriendo que la expresión estaba regulada por factores que afectan a todos los tejidos del individuo como son los hormonales o metabólicos (62,63). También fue sugerido que el patrón de expresión estaba regulado por el grado de diferenciación o desarrollo (62) y recientemente se ha descrito que la expresión de los dos transcritos es producto de la herencia Mendeliana de dos alelos codominantes, de forma que un alelo produce solo el transcrito completo y el otro solo la forma -3, por lo que individuos heterocigotos expresan ambos transcritos y los homocigotos solo expresan uno de los dos tipos encontrando en la población estudiada un 10% de homocigotos para el alelo -3 (64,65). Finalmente se ha sugerido también que la presencia de estas isoformas es específica de especie debido a que transcritos hepáticos del GHR de ovejas y de ratón solo presentan la forma completa (66,67) mientras que en primates se encuentran ambos transcritos (68). Todos estos estudios han arrojado resultados contradictorios sin que se haya definido el significado funcional de estas isoformas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## V

**JUSTIFICACIÓN**

El eje somatotrópico es uno de los principales sistemas hormonales que regulan tanto el crecimiento fetal como postnatal en mamíferos y aunque mucho se ha avanzado en su conocimiento, el significado funcional de las isoformas del receptor de la GH no se ha aclarado. Las isoformas del GHR se expresan en casi todos los tejidos, el patrón de expresión ha sido motivo de grandes discrepancias, se ha informado su presencia en forma aislada o combinada y en proporciones variables. En uno de los trabajos se encontró el mismo patrón en diferentes tejidos obtenidos de un mismo individuo, concluyéndose que el patrón de estas isoformas es específica de individuo. Basándonos en estos datos se sugiere que la expresión del GHR puede estar regulada por factores que afectan a todos los tejidos del individuo como son los hormonales o metabólicos, por ejemplo los niveles de la GH, las hormonas esteroides o el IGF-I. El contar con células accesibles y técnicas de alta sensibilidad para medir la expresión del receptor y sus isoformas *in vivo*, permitirá conocer la participación del ambiente celular en la expresión de este receptor, sustentando la información determinada en forma indirecta a través de su proteína de unión de alta afinidad o en otras especies.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la dificultad para medir el receptor, éste se ha evaluado principalmente en forma indirecta a través de la proteína de unión de la GH, de aquí que no se conozca con precisión cuáles son los factores que regulan su expresión.

La determinación del mRNA de las isoformas del GHR en células accesibles como los leucocitos de sangre periférica puede facilitar el estudio de los factores que afectan la regulación del receptor en humanos.

Las preguntas que se plantean en este estudio son:

1. ¿Cuál es el patrón de expresión del GHR en leucocitos?
2. ¿La expresión cambia cuando existe un ambiente celular con niveles altos de GH?

## VII

### HIPÓTESIS

En leucocitos humanos se expresan las dos isoformas de mRNA del GHR y los niveles de expresión se relacionan con los niveles de GH, IGF-I, IGFBP-3 y/o esteroides sexuales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VIII

### OBJETIVO GENERAL

Conocer el patrón de expresión de las isoformas de mRNA del receptor de GH en leucocitos y su relación con los niveles en plasma de GH, IGF-I, IGFBP-3 y esteroides sexuales en humanos.

## IX

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar la expresión de las isoformas del mRNA del receptor de GH en leucocitos de individuos sanos y en el estado de hipersecreción de GH (acromegalia).
- b) Medir los niveles plasmáticos de GH, IGF-I, IGFBP-3, estradiol y testosterona.
- c) Establecer asociación de las isoformas del mRNA del receptor de GH con los niveles plasmáticos de GH, IGF-I, IGFBP-3, estradiol y testosterona

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**X****MATERIAL Y MÉTODOS****Muestras sanguíneas**

Se obtuvieron muestras de sangre venosa antecubital de 12 individuos sanos (cinco hombres de 24-50 años y siete mujeres de 31-48 años) y un grupo de 11 pacientes (seis hombres de 32-58 años y cinco mujeres de 29-48 años) con diagnóstico de hipersecreción de GH; el índice de masa corporal fue semejante en ambos grupos (tabla 2) y se excluyeron los pacientes con diabetes mellitus. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social y todos los pacientes dieron su consentimiento al ingresar al estudio.

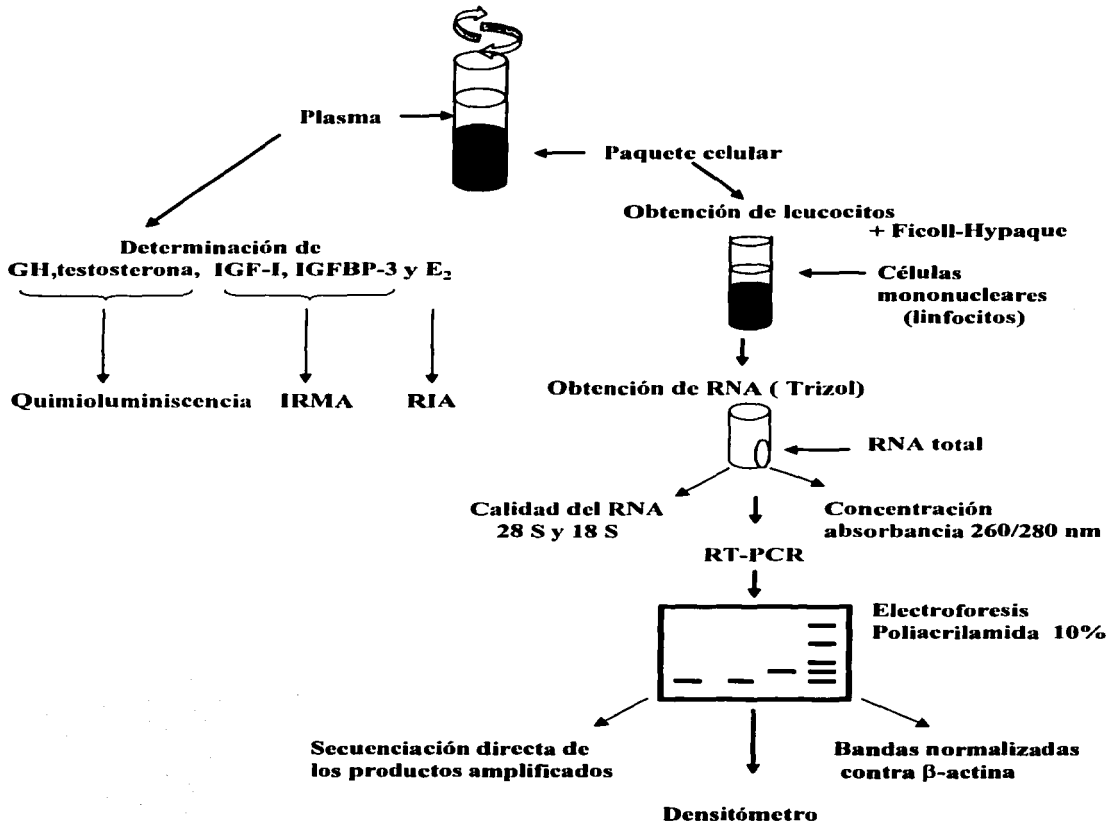
**Determinaciones hormonales**

Las muestras de sangre venosa fueron tomadas entre las 8-9 hs, después de un ayuno de 8 hs; en tubos conteniendo 80  $\mu$ l de una solución de EDTA al 15%. Estas muestras se centrifugaron a 400 g por 15 minutos a 4C. Se separó el plasma y las alícuotas se congelaron inmediatamente a  $-35C$ , almacenándose hasta el momento en que se realizaron los ensayos (Fig. 7).

Las determinaciones hormonales se hicieron en el plasma, mediante estuches comerciales y de acuerdo al protocolo proporcionado por cada una de las diferentes casas comerciales. La GH y la testosterona fueron determinadas con un método quimioluminiscente y estuches de Diagnostic Products Co, Los Angeles, CA, USA. El IGF-I, su proteína de unión (IGFBP-3) y el  $17-\beta$  estradiol ( $E_2$ ), con estuches de Diagnostic System Laboratories, Webster, Tx, USA. IGF-I e IGFBP-3 mediante el método inmunoradiométrico (IRMA). La determinación de IGF-I total

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Muestras sanguíneas (20 mL) en EDTA  
(Individuos sanos y pacientes con hipersecreción)**



**Fig. 7. Procedimiento general**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

incluye una extracción con una solución alcohol-ácida, en la que el IGF-I es separado de sus proteínas de unión (69). La determinación de E<sub>2</sub> se hizo por radioinmunoanálisis de fase sólida, con estuches de Diagnostic System Laboratorios, Webster, Tx, USA. Los criterios del control de calidad de estos ensayos se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Control de calidad de inmunoensayos**

	<u>Coefficiente de Variación (%)</u>			
	Sensibilidad	Intraensayo	Interensayo	banda Normal
<b>Quimiluminiscencia</b>				
GH	0.02 ng/mL	2.7	4.2	0.05 – 2 ng/m
Testosterona	0.1 ng/mL	7.4	9.7	2.1 - 7.4 ng/m
<b>Inmunoradiométrico (IRMA)</b>				
IGF-I	0.3 ng/mL	2.6	4.4	167 – 372 ng/m
IGFBP-3	0.3 ng/mL	1.9	3.9	1764 – 3070 ng/m
<b>Radioinmunoensayo (RIA)</b>				
E <sub>2</sub>	10.0 pg/mL	4.0	8.6	60 – 160 pg/m

### **Separación de leucocitos**

Del paquete celular de las muestras de sangre se separaron los leucocitos por medio de un gradiente de densidad con Ficoll-hypaque (Techgen International, Les Ulis, France); los leucocitos obtenidos de la interfase fueron lavados tres veces mediante centrifugaciones (400 x g, 10 min, 20 C) con amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4. La viabilidad fue determinada por la técnica de azul tripano.

### **Extracción de RNA total.**

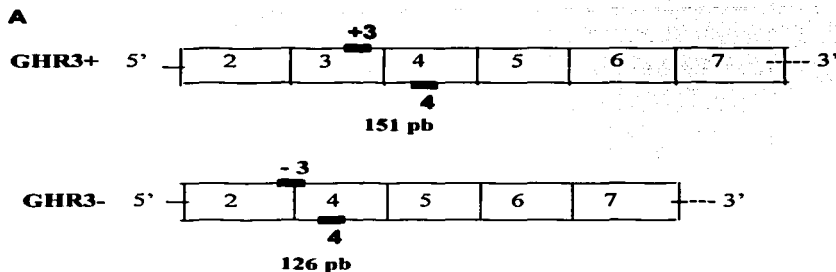
La extracción del RNA se hizo a partir de  $1 \times 10^8$  células mediante el reactivo de Trizol (Life Technologies, Inc., Melbourne, Australia), siguiendo las

recomendaciones del distribuidor. El precipitado de RNA total se disolvió en agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) (Merck Darmstadt R.F., Germany), determinándose su concentración y pureza mediante lecturas a 260 y 280 nm. La calidad del RNA fue determinada examinando las bandas 28S y 18S en electroforesis con geles desnaturalizantes. Cada muestra de RNA se trató con DNasa a 37 C durante una hora, seguido de extracción (70). El RNA se almacenó a - 70 C hasta hacer la reacción de transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

### **Reacción de la Transcriptasa Inversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Para el análisis de expresión se usó el sistema Access RT-PCR (Promega Corporation, Madison, WI, USA), el cual usa oligonucleótidos gene-específicos para producir un cDNA también específico. En cada reacción de RT-PCR se usaron 4 µg de RNA total para GHR +3 y GHR -3 y 250 ng para β-actina. La RT se hizo a 48 C durante 45 min seguida de la PCR en la que se realizaron 35 ciclos, el primero de ellos consta de una desnaturalización larga de 2 min a 92° C. En los ciclos subsecuentes se realizó una desnaturalización a 94 C por 30 s, alineación a 54 C por 1 min y extensión a 68 C por 2 min, la extensión final se llevó a cabo a 68 C durante 7 min. El número de ciclos fue determinado previamente dentro del rango exponencial de la reacción del PCR. Los oligonucleótidos usados para la amplificación de las isoformas GHR +3 y GHR -3 y de β-actina ya han sido descritos previamente en la literatura (61) y su secuencia, denominación y localización se ilustran en la figura 8. Como un control negativo se substituyó el RNA total por agua destilada tratada con DEPC y como control positivo en todos los ensayos de RT-PCR se usó RNA total de células de hígado obtenido en autopsia. Los controles se amplificaron en forma paralela a las muestras. Alícuotas de los productos de PCR se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% teñido con



**B**

Oligonucleótido	Secuencia	Orientación
4	5' - CAGCTGTATGGGTCCTAGG -3'	antisentido
+ 3	5' - GAGTCTGCAAAGTGTTAATCC -3'	sentido
- 3	5' - GGAAGTGAGGATTCTTCTAAG -3'	sentido
1 $\beta$ -actina	5' - CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC -3'	antisentido
2 $\beta$ -actina	5' - AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC -3'	sentido

**Fig. 8. A) Representación esquemática de la estructura de los exones 2-7 de las dos isoformas de GHR en donde se localizan los oligonucleótidos iniciadores utilizados, B) secuencia y orientación de los mismos.**

bromuro de etidio y analizados en un sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, USA). La densidad de las bandas fue cuantificada en un sistema de imagen (SynGene GeneTools, versión 3.00.22, SynGene Laboratories). Las cantidades de GHR +3 y GHR -3 se normalizaron con respecto a los niveles de mRNA de  $\beta$ -actina

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

y fueron expresados como un porcentaje de GHR +3 o GHR -3 con respecto a  $\beta$ -actina.

### **Análisis estadístico**

Los resultados del porcentaje de las isoformas y los niveles hormonales se expresan como la media  $\pm$  error estándar ( $M \pm EE$ ). Las diferencias entre los valores del grupo control y el de acromegalia se establecieron usando una prueba no paramétrica (U Mann-Whitney) y se usó el análisis de Spearman para los estudios de correlación entre los valores de las isoformas y los niveles hormonales. Fue considerado un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## XI

### RESULTADOS

En la tabla 2 se encuentran los resultados de los diferentes características bioquímicas en los sujetos normales y con hipersecreción de GH, en donde claramente se observa que los dos grupos son diferentes en cuanto a las concentraciones de GH ( $0.46 \pm 0.20$  y  $25.0 \pm 4.2$  ng/mL,  $M \pm EE$ ), IGF-I ( $253.8 \pm 16$  y  $1407 \pm 179$  ng/mL), IGFBP-3 ( $2648 \pm 120$  y  $5174 \pm 304$  ng/mL) y  $E_2$  ( $82.6 \pm 120$  y  $29.0 \pm 10$  pg/mL), determinados por los diferentes inmunoensayos, en cambio no hubo diferencia en la edad ( $39.6 \pm 2.3$  y  $43.0 \pm 3.0$

**Tabla 2. Principales características clínicas y bioquímicas en sujetos normales y con hipersecreción de GH.**

	Normal	Hipersecreción de GH
Edad (años)	39.6 $\pm$ 2.3	43.0 $\pm$ 3.0
IMC <sup>a</sup> (Kg/m <sup>2</sup> )	26.5 $\pm$ 1.8	27.2 $\pm$ 1.3
GH (ng/mL)	0.46 $\pm$ 0.20	25.00 $\pm$ 4.20**
IGF-I (ng/mL)	253.8 $\pm$ 16	1407 $\pm$ 179**
IGFBP-3 (ng/mL)	2648 $\pm$ 120	5174 $\pm$ 304**
17 - $\beta$ estradiol (pg/mL) <sup>b</sup>	82.6 $\pm$ 120	29.0 $\pm$ 10**
Testosterona (ng/mL) <sup>c</sup>	4.3 $\pm$ 2.9	3.9 $\pm$ 1.5

<sup>a</sup> IMC: índice de masa corporal; <sup>b</sup>determinado solo en mujeres; <sup>c</sup> determinado solo en hombres  
\*\*  $p < 0.001$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

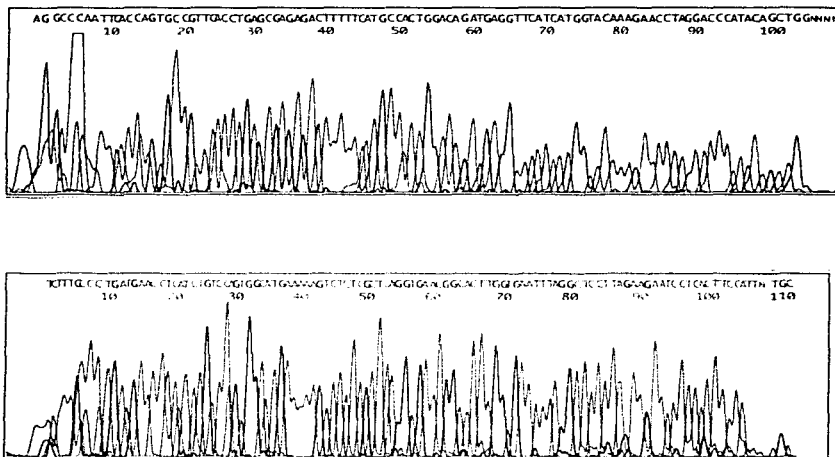
años ), IMC (  $26.5 \pm 1.8$  y  $27.2 \pm 1.3$  kg/m<sup>2</sup> ) y niveles de testosterona (  $4.3 \pm 2.9$  y  $3.9 \pm 1.5$  ng/mL ).

Cuando las alícuotas de los productos de PCR se analizaron en geles de poliacrilamida el tamaño del transcripto de GHR +3 fue de 151 pb y el de GHR -3 de 126 pb. La secuenciación directa de los productos amplificados confirmó la secuencia que ha sido descrita con anterioridad (Fig 9).

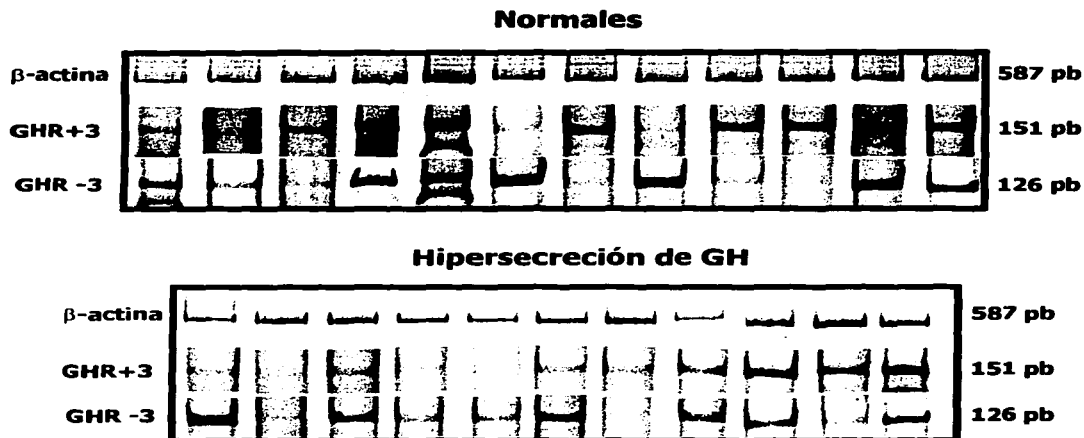
En la Figura 10 se muestra el patrón de corrimiento de las isoformas de GHR +3 y GHR -3 en el gel de poliacrilamida. Como se puede observar ambas isoformas estuvieron presentes en todos los individuos estudiados tanto en los sujetos normales (Fig. 10, panel superior), como en individuos con hipersecreción de GH, (Fig. 10, panel inferior). La densidad de las bandas de dichas isoformas presentó grandes variaciones de individuo a individuo en ambos grupos. En la parte superior de cada gel se encuentra el patrón de corrimiento del gen constitutivo usado ( $\beta$ -actina), estas bandas que correspondieron a un fragmento de 587 pb, no presentaron diferencia significativa.

La densidad de las bandas de GHR +3 y GHR -3 fue cuantificada y relacionada al nivel de transcripción del gen constitutivo usado (  $\beta$ -actina ) y expresadas como un porcentaje de GHR +3 o GHR -3 con respecto a  $\beta$ -actina (Fig 11), obteniéndose en el grupo normal que la isoforma GHR -3 predominó sobre GHR +3 (  $11.8 \pm 3.0$  y  $5.1 \pm 0.7$  %,  $M \pm EE$  respectivamente;  $p < 0.05$  ) (Fig. 11 A). En las mujeres de este grupo también la isoforma -3 predominó sobre la isoforma +3 (  $17.4 \pm 3.8$  y  $4.5 \pm 0.7$  % respectivamente,  $p < 0.01$ ), además tuvieron una proporción significativamente mayor (  $p < 0.01$ ) de GHR -3 en comparación con los hombres de este grupo normal (  $17.4 \pm 3.8$  y  $3.9 \pm 1.4$  %, respectivamente ) como se ilustra en la Figura 11B.

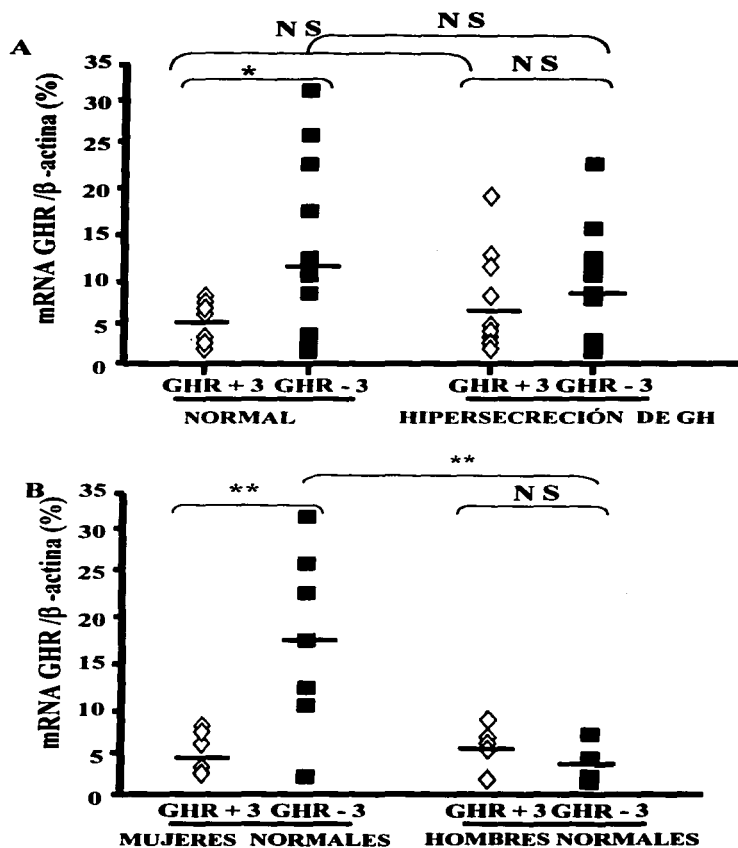
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 9.** Esferograma parcial del gen del receptor de la hormona de crecimiento obtenido de los productos del RT-PCR después de la purificación y marcaje con el sistema Big-Dye (Perkin Elmer). El color rojo representa a la timina, el verde a la adenina, el azul a la citosina y el negro a la guanina. Los números representan las bases. La identificación se realizó con el programa BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

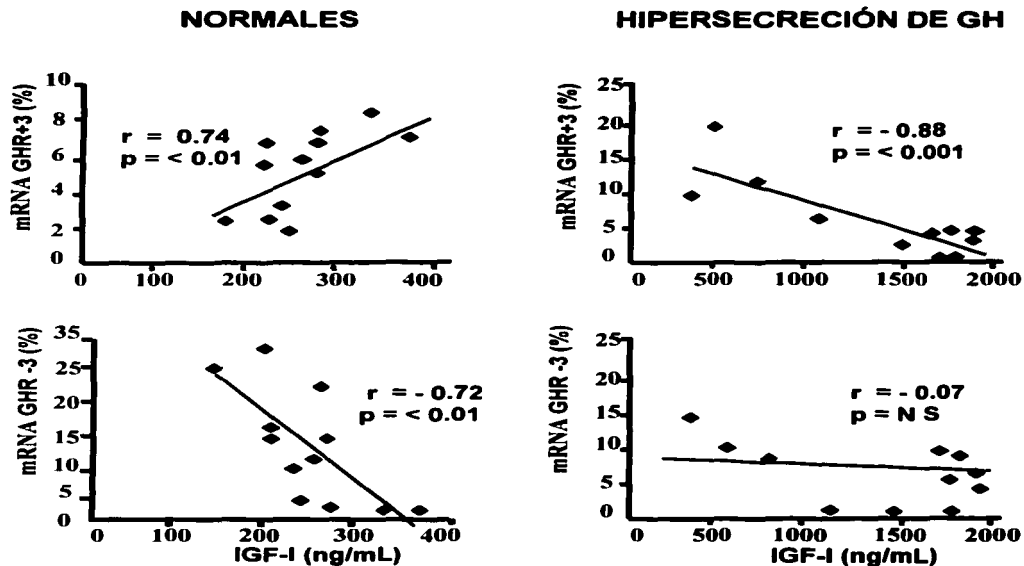


**Fig. 10.** Electroforesis en gel de acrilamida de los productos de RT-PCR del RNA total de los linfocitos de los sujetos normales y con hipersecreción de GH, empleando oligonucleótidos iniciadores para GHR +3, GHR -3 y  $\beta$  - actina. Cada carril corresponde a un sujeto normal (arriba) o a un paciente con hipersecreción (abajo). El tamaño de los productos amplificados en pares de bases (pb) se muestran a la derecha de cada gel. Se observa la presencia de las bandas correspondientes a ambas isoformas del GHR, aunque con grandes variaciones entre ellas.



**Fig. 11** Porcentaje de mRNA de GHR +3 y GHR -3 relacionado a  $\beta$ -actina en A) sujetos normales y con hipersecreción de GH y B) en mujeres y hombres normales. No se encontró diferencia entre las isoformas GHR+3 y GHR -3 de los individuos normales y los pacientes con hipersecreción de GH.

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



**Fig. 12.** Relación de las isoformas del GHR con los niveles circulantes de IGF-I, en sujetos normales y con hipersecreción de GH. Se observa asociación entre ambas isoformas y el IGF-I en individuos normales. En los pacientes con hipersecreción de GH solamente se observa asociación con la isoforma + 3.



**Tabla 4. Análisis de correlación de las isoformas de GHR con las principales características clínicas y bioquímicas en sujetos normales y con hipersecreción de GH.**

		<b>GHR + 3 (r)</b>	<b>GHR - 3 (r)</b>
<b>Edad</b>	<b>Normal</b>	<b>0.31</b>	<b>0.44</b>
	<b>Hipersecreción de GH</b>	<b>- 0.05</b>	<b>- 0.39</b>
<b>IMC</b>	<b>Normal</b>	<b>- 0.38</b>	<b>0.36</b>
	<b>Hipersecreción de GH</b>	<b>- 0.39</b>	<b>- 0.55</b>
<b>GH</b>	<b>Normal</b>	<b>- 0.24</b>	<b>0.72*</b>
	<b>Hipersecreción de GH</b>	<b>0.15</b>	<b>0.22</b>
<b>IGF-I</b>	<b>Normal</b>	<b>0.74*</b>	<b>- 0.72*</b>
	<b>Hipersecreción de GH</b>	<b>- 0.88**</b>	<b>- 0.07</b>
<b>IGFBP-3</b>	<b>Normal</b>	<b>0.39</b>	<b>0.29</b>
	<b>Hipersecreción de GH</b>	<b>0.16</b>	<b>0.08</b>
<b>17-β estradiol</b>	<b>Normal</b>	<b>0.55</b>	<b>- 0.66</b>
	<b>Hipersecreción de GH</b>	<b>0.16</b>	<b>- 0.08</b>
<b>Testosterona</b>	<b>Normal</b>	<b>0.31</b>	<b>- 0.16</b>
	<b>Hipersecreción de GH</b>	<b>0.20</b>	<b>- 0.10</b>

\* p<0.01; \*\* p < 0.001

Las mujeres normales también tuvieron una mayor proporción de GHR-3 que las mujeres acromegálicas (  $17.4 \pm 3.8$  y  $10.4 \pm 3.6$  % respectivamente,  $p < 0.05$  ). En el análisis de correlación se encontró principalmente una asociación entre las isoformas y el IGF-I. En el grupo de los sujetos normales se encontró una correlación significativa (  $p < 0.01$  ) entre el porcentaje de GHR +3 y GHR -3 con los niveles circulantes de IGF-I (Fig. 12) y de GHR -3 con los niveles de GH (tabla 4). Los niveles de  $E_2$  aunque mostraron una correlación negativa con el porcentaje de GHR -3, esta correlación no fue significativa ( $p = 0.6$ ).

Con respecto a los resultados obtenidos de los pacientes con hipersecreción, se encontró la misma proporción de la expresión de ambas isoformas de GHR (  $6.0 \pm 1.7$  y  $8.3 \pm 2.0$  % ) para GHR + 3 y GHR - 3 respectivamente y no se encontró diferencia entre las isoformas del GHR +3 y GHR -3 de los individuos normales y los pacientes con hipersecreción de GH. (Fig. 11 A). En estos pacientes solamente la isoforma GHR +3 presentó correlación significativa ( $p < 0.001$ ) con las concentraciones de IGF-I (Fig. 12) y los niveles de GH, IGFBP-3 y esteroides sexuales no se relacionaron con ninguna de las isoformas del GHR (tabla 4) .

## XII

### DISCUSIÓN

En el presente estudio se demostró que en el humano ocurre la expresión de las dos isoformas de GHR en células accesibles como los leucocitos de sangre periférica lo que facilita el estudio de los factores que afectan la regulación del receptor *in vivo* (70). El estudio del patrón de expresión de las isoformas del GHR ha arrojado datos contradictorios. Nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que estudiando otros tejidos de varios individuos demostraron la coexpresión de las isoformas en todos ellos y que la expresión de las dos isoformas varían de un individuo a otro (61,63), lo que apoya la propuesta de que la regulación de la expresión de las isoformas está determinada por factores que afectan a todo el organismo (63). Por otro lado, nuestros resultados están en desacuerdo con el único estudio en leucocitos (71) en donde se examinaron por Northern Blot, ocho muestras de leucocitos de pacientes con cáncer de mama y en el que se informa que en algunos casos solo se expresó la isoforma +3. Nuestro estudio incluyó 23 muestras y las diferencias pueden deberse a que en nuestro trabajo se empleó el método mas sensible de detección de mRNA, geles de acrilamida y oligonucleótidos específicos para cada una de las isoformas.

En cuanto a la proporción relativa de las isoformas del GHR, llama la atención el que en los sujetos considerados normales se encontró un predominio de la isoforma GHR -3 que es la que carece de 22 aminoácidos en el segmento extracitoplasmático y por lo tanto se confirma que dicho dominio no interfiere con la función del GHR (57), sino que por el contrario puede tener importancia en la fisiología del

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

crecimiento. A este respecto, en individuos con insensibilidad a la GH conocido también como Síndrome de Larón que se caracteriza por retardo en el crecimiento postnatal asociado a altas concentraciones de GH y bajos niveles de IGF-I e IGFBP-3, se han reportado mutaciones en el receptor de GH. Estas mutaciones se han identificado en varios exones codificantes del gen del GHR, pero no en el exón 3, pero recientemente se identificó la primera mutación en el exón 3 del GHR en un paciente con insensibilidad a GH (72). Este hallazgo confirma la importancia de la presencia de la isoforma que excluye el exón 3 en el crecimiento normal.

Aunque se ha sugerido que los niveles de mRNA del GHR no se relacionan con las concentraciones de GH o de IGF-I en leucocitos (73), no se había investigado la relación de estos factores con las isoformas del GHR. En este trabajo se demostró que en las personas sanas ambas isoformas muestran una correlación con los niveles de IGF-I y solo la isoforma -3 con la GH. En cambio los pacientes acromegálicos que cursan con niveles marcadamente elevados de GH no mostraron correlación de las isoformas del GHR con los niveles de GH pero sí con IGF-I, con dicho factor de crecimiento se encontró una correlación negativa con la isoforma +3, de tal manera que la isoforma +3 tuvo una tendencia a aumentar conforme los niveles del IGF-I aumentaban cambiando a una pendiente negativa cuando se presentaron niveles altos de este factor. Este mecanismo es homólogo a los estudios de regulación del receptor completo de GH en leucocitos IM-9 (74) y en hígado de rata (75), en donde niveles fisiológicos de GH como los de los individuos normales regulan a la alta al GHR y por el contrario niveles altos de GH lo regulan a la baja. De acuerdo con el concepto de que la determinación del IGF-I refleja la secreción de GH en 24 horas siendo el marcador más sensible de los cambios en los niveles de la GH, se podría pensar que ambos factores (GH e IGF-I) regularan la isoforma +3. En cuanto al comportamiento de la isoforma -3 en niveles fisiológicos tuvo una tendencia opuesta pero significativa a la forma +3, pero a niveles altos de GH no se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

observó ninguna tendencia. Esto podría apoyar la teoría de que en trastornos de hipersomatotropinemia se altera la interacción GH-GHR y se puede suponer que los niveles elevados de GH e IGF-I que resultan de un adenoma hipofisario en la acromegalia llegan a trastornar el binomio GH-GHR y que esto desencadena una señal anormal para el mecanismo molecular en la síntesis del receptor. Otra observación paralela interesante fue que en las mujeres del grupo testigo con concentraciones dentro de los límites normales de  $E_2$ , GH y/o IGF I se encontró una mayor proporción de la isoforma del GHR3- en comparación con los hombres del mismo grupo. En contraste, en el grupo de acromegálicos, las mujeres que característicamente presentaban hipoestrogenismo, tuvieron una proporción semejante de ambas isoformas. Este patrón influenciado por el género también se ha observado con la GHBP. Recientemente ha sido demostrado que el dominio extracelular de ambas isoformas sufren proteólisis y son liberadas a la circulación como GHBP+3 y GHBP-3 y son detectadas en el plasma encontrándose que su proporción es también género-dependiente, con una mayor proporción de GHBP3- en mujeres (60). Estas observaciones sugieren que los niveles de estrógenos circulantes pueden ser un factor que module el empalme GHR3-, como ocurre en otras especies y para otros componentes del eje somatotrópico (76). Por ejemplo la GH que en las mujeres presentan concentraciones mayores en 24 hs comparadas con hombres (14,77) y a pesar de esta mayor secreción los niveles en suero de IGF-I de las mujeres son menores (78). Esta diferencia sugiere una resistencia a nivel de receptor o la presencia de una isoforma que por diferencias estructurales, pudiera modificar la conformación de la proteína y con esto la capacidad de la isoforma para interactuar con proteínas involucradas en la transmisión de señal para la transcripción del IGF-I. De resultar así cantidades menores de IGF-I se observarían cuando se presenta mayor cantidad de dicha isoforma, en este trabajo se observó

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

que a mayor proporción de isoforma GHR3- se presentaron menores niveles de IGF-I.

En suma nuestros resultados muestran que: a) Ambas isoformas se expresan en leucocitos periféricos de todos los sujetos estudiados, en diferente proporción relativa. b) En sujetos sanos el porcentaje relativo de GHR-3 es mayor que en individuos con hipersecreción de GH. c) Este porcentaje es dependiente de género con una mayor proporción en mujeres. d) La proporción de ambas isoformas se relacionan con los niveles en plasma de IGF-I. Con base en todo lo anteriormente descrito, podríamos postular que los estrógenos participan en la regulación de las isoformas del GHR y los niveles de estas isoformas determinan los niveles del IGF-I.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **XIII**

## **ANEXO**

### **Inmunoensayos.**

#### **Quimioluminiscencia**

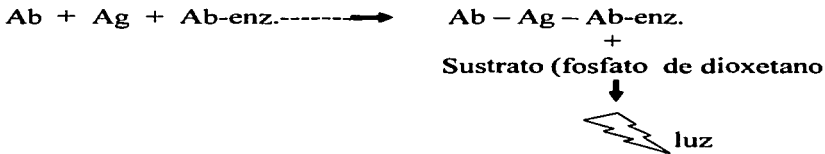
La GH y la testosterona, se determinaron por un ensayo de quimioluminiscencia usando el sistema automatizado IMMULITE (Diagnostic Products Co, Los Angeles, CA. USA). En este sistema se utiliza una curva de calibración que se procesa por cuadruplicado y las muestras una sola vez.

Este método se basa en la obtención de energía luminosa a partir de la reacción química entre una enzima que es la fosfatasa alcalina y uno de sus sustratos, el fosfato de dioxetano el cual es un compuesto inestable, que al reaccionar con la enzima pierde un grupo fosfato, emitiendo luz. Esta señal luminosa es amplificada unas cien veces obteniéndose una gran sensibilidad. La reacción también es estable manteniéndose por más de 30 min. Este método por ser un inmunoensayo, se basa en la unión de un antígeno (Ag) y su anticuerpo específico (Ab) y cualquiera de ellos puede ser marcado con la enzima para producir quimioluminiscencia (79).

Existen dos tipos principales de inmunoensayos quimioluminiscentes que se utilizan en la medición de hormonas: El llamado inmunométrico, se empleó para la determinación de testosterona y requiere dos anticuerpos monoclonales. Se utiliza una fase sólida (perlas de poliestireno), en donde se pega un anticuerpo monoclonal específico el cual va a unir a la hormona que se quiere determinar y que se encuentra en la muestra del paciente, una vez incubados ambos componentes; se añade el otro anticuerpo, el cual esta conjugado a la enzima formándose un

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

complejo  $Ab-Ag-Ab-enzima$ , en una relación directamente proporcional a la hormona presente en la muestra y con la presencia del sustrato (fosfato de dioxetano), se lleva a cabo la degradación del mismo (emisión de luz). La cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de hormona presente en la muestra.



El otro método usado es el denominado competitivo, que se usó para la determinación de la GH, en donde la marca (enzima) la lleva el Ag, el cual compete con el Ag de la muestra por los sitios de unión de un anticuerpo que se encuentra pegado a la fase sólida (también perlas de poliestireno), después se realiza un lavado y se adiciona un anti-anticuerpo marcado con la fosfatasa alcalina. En ambos la función de la enzima es la de hidrolizar al sustrato (fosfato de dioxetano) y catalizar la reacción química que produce luz. (tabla 1).

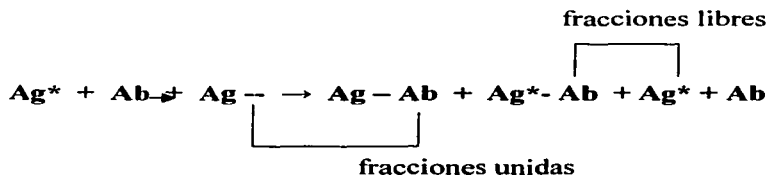
### Radioinmunoanálisis (RIA).

Este método se utilizó para la determinación de E2, RIA fase sólida (Diagnostics Products Corporation). En este inmunoensayo cada punto de la curva y cada muestra se procesa por duplicado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



El RIA se ha utilizado para la cuantificación de hormonas por su elevada especificidad, precisión, sensibilidad y exactitud en su determinación. En este método el marcaje se realiza con un radioisótopo el  $^{125}\text{I}$ . Este método se basa en una reacción inmunológica de competencia, que se establece entre el antígeno que se va a cuantificar, en este caso la hormona presente de la muestra biológica (Ag) y el antígeno marcado con I - 125 ( $\text{Ag}^*$ ), idéntico en estructura química al que se va a determinar, ambos compiten por una concentración limitada del anticuerpo específico (Ab) (81). Con lo que se obtiene una relación inversamente proporcional a la concentración de Ag presente en la muestra por lo que entre mayor cantidad de hormona se presente en la muestra, el complejo marcado ( $\text{Ag}^* - \text{Ab}$ ) será menor.



El nombre de RIA de fase sólida se le da por el sistema como separa la fracción unida (unión Ag-Ab) de la libre ( $\text{Ag}^*$  y Ab). En este método se utilizan tubos de polipropileno en cuyas paredes se encuentra adsorbido el anticuerpo específico al Ag, realizándose la unión Ag-Ab durante un periodo de incubación posteriormente por decantación se elimina la fracción libre de la unida. La radiactividad contenida en los tubos se detecta en un contador de emisiones gamma durante un minuto. ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Método inmunoradiométrico (IRMA)**

El método IRMA se utilizó para las determinaciones de IGF-I y su proteína de unión (IGFBP-3) (DSL Diagnostic System Laboratories). En este inmunoensayo al igual que en el RIA cada punto de la curva y muestras se procesan por duplicado.

Los métodos inmunoradiométricos o IRMA (Inmunoradiometric assay), son sistemas de medición basados también en la unión Ag-Ab, utilizando como marcador el  $^{125}\text{I}$  como en el RIA. A diferencia del RIA en estos métodos el sistema de reacción no es competitivo, sino inmunométrico es decir una relación directamente proporcional a la concentración del analito a determinar (Ag), otra diferencia con el RIA es que la marca radiactiva no se encuentra en el antígeno, se encuentra en el anticuerpo el cual es de tipo monoclonal (81). El método utilizado es el del sistema tipo sandwich en el que el analito a cuantificar es atrapado entre dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado o pegado a una fase sólida (tubo de polipropileno) y otro soluble que es el que lleva la marca radiactiva y que es el que permite cuantificar directamente el antígeno presente, por lo que en este tipo de ensayo se obtiene una curva de calibración, en la que la cantidad de la hormona a medir será igual a la radiactividad presente. También la lectura de la radiactividad se hace en un contador de emisiones gamma durante un minuto para cada tubo.

Fase sólida-Ab + Ag + Ab\*m ----> Fase sólida-Ab -Ag - Ab\*m

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**XIV****REFERENCIAS**

1. Kaplan SL. 1999. Hormonal regulation of growth and metabolic effects of growth hormone. In Handbook of Physiology. Kostyo JL, ed. Oxford University Press, pp 129-143
2. Baumann G. 1991. Growth hormone heterogeneity: Genes, isohormones, variants, and Binding proteins. *Endocrine Reviews*. 12:424-449
3. Zadik A, Chalew SA, McCarter RJ, Meistas M, Kowarski A. 1985. The influence of age on the 24-hour integrated concentration of growth hormone in normal individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 60:513-516
4. Müller EE, Locatelli V, Cocchi D. 1999. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev*. 79:51-607
5. Hattori N, Takanori S, Yagyu T, Jiang B, Kitagawa K, Inagaki CH. 2001. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and Ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:4284-4291
6. Amit T, Youdim MBH, Hochberg. 2000. Does serum growth hormone (GH) binding protein reflect human receptor function? *J Clin Endocrinol Metab*. 85:927-932
7. Baumann G, Amburn K, Shaw MA. 1988. The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man. *Endocrinology*. 122:976-984
8. Daughaday W H, Trivedi B, Andrews A. 1987. The ontogeny of serum GH

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

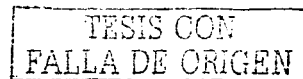
- binding protein in man: a possible indicator of hepatic GH receptor development. *J Clin Endocrinol Metab.* 65:1072-1074
9. Talamantes F, Ortiz R. 2002. Beyond carrier proteins. Structure and regulation of expression of the mouse GH receptor. *J Endocrinol.* 175:55-59
  10. Baumann G. 1994. Growth hormone-binding proteins: state of the art. *J Endocrinol.* 141:1-6
  11. Murphy LJ, Friesen HG. 1988 Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-growth factor I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology.* 122:325-332
  12. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. 2001. Somatomedin Hypothesis 2001. *Endocr Rev.* 22:53-74.
  13. Hwa V, Youngman O, Rosenfeld RG. 1999. The Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews.* 20:761-787
  14. Chapman IM, Hartman ML, Straume M, Johnson ML, Veldhuis JD, Thorner MO. 1994. Enhanced sensitivity growth hormone (GH) chemiluminiscence assay reveals lower postglucose nadir GH concentration in men than women. *J Clin Endocrinol Metab.* 78:1312-1315
  15. Teale JD. 1994. The diagnostic application of serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF-I), and IGF binding protein measurements. *JIFCC.* 6:164-167
  16. Kaplan SL. 1999. Hormonal regulation of growth and metabolic effects of growth hormone; in *Handbook of physiology.* Kostyo JL ed. Oxford University Press., pp 129-143
  17. Melmed S, Casanueva FF, Cavagnini F, Chanson P, Frohman A, Grossman K, Ho D, Kleinberg S, Lamberts E, Laws G. 2001. Consensus. Guidelines for acromegaly management. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:

4054-4058

18. Wagner JK, Eble A, Hindmarsh PC, Mullis PE. 1998. Prevalence of human GH gene alterations in patients with isolated growth hormone deficiency. *Pediatr Res.* 1998. 43:105-110
19. Baumgartner JW, Wells CA, Chen CM, Waters MJ. 1994. The role of the WSXWS equivalent motif in growth hormone receptor function. *J Biol Chem* 269:29094-29101
20. Moutoussamy S, Kelly PA, Finidori J. 1998. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. *Eur J Biochem.* 255:1-11
21. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science.* 255:306-312
22. Argetsinger LS, Carter-Su C. 1996. Mechanisms of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev.* 76:1089-1103
23. Frank SJ, Yi W, Zhao Y, Goldsmith JF, Gilliland G, Jiang J, Sakai I, Kraft AS. 1995. Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor. *J Biol Chem.* 270:14776-14785
24. Frank SJ. 2002. Minireview: Receptor dimerization in GH and erythropoietin action-it takes two to tango, but how? *Endocrinology.* 143:2-10
25. Gent J, Van Den Eijnden M, Van Kerkhof P, Strous GJ. 2003. Dimerization and signal transduction of the growth hormone receptor. *Mol Endocrinol.* 17:967-975
26. Sonenberg M, Money WL, Dorans JF, Lucas B, Bourque L. 1954. The distribution of radioactivity in tissues of the rat after the administration of radioactivity in tissues of the rat after the administration of radioactive growth hormone preparations. *Endocrinology.* 55:709-720

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

27. Bresson J, Jeay S, Gagnerault M, Kayser CH, Bressi N, Wu Z, Kinet S, Dardenne M, Postel-Vinay M. 1999. Growth hormone (GH) and prolactin receptors in human peripheral blood mononuclear cells: Relation with age and GH-Binding protein. *Endocrinology*. 140:3203-3209
28. Rapaport R, Sills I, Green L, Barret P, Labus J, Skuza K A, Chartoff A, Goode L, Stene M, Petersen BH. 1995. Detection of human growth hormone receptors on IM-9 cells and peripheral blood mononuclear cell subsets by flow cytometry: correlation with growth hormone-binding protein levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 80:2612-2619
29. Bennet PA, Levy A, Carmignac DF, Robinson ICAF, Lightman SL. 1996. Differential regulation of the growth hormone receptor gene: effects of dexamethasone and estradiol. *Endocrinology*. 137:3891-3896
30. Yu MY, Domené HM, Stein J, Counts DR, Cassorla F. 1996. Developmental changes and differential regulation by testosterone and estradiol of growth hormone receptor expression in the rabbit. *Eur J Endocrinol*. 135:583-590
31. Hermansson M, Wickelgren RB, Hammarqvist F, Bjarnason L, Wennström I, Wernerman J, Carlsson A, Carlsson JMS. 1997. Measurement of human growth hormone receptor messenger ribonucleic acid by a quantitative polymerase chain reaction-based assay: demonstration of reduced expression after selective surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:421-428
32. Lin CHJ, Mendonca BB, Lucon AM, Guazzelli ICD, Nicolau W, Villares SMF. 1997. Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal and pathologic human adrenocortical tissues-an analysis by quantitative polymerase chain reaction technique. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:2671-2676
33. Mullis PE, Lund T, Patel MS. 1991 Regulation of human growth hormone



- receptor gene expression by human growth hormone in a human hepatoma cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 76:125-129
34. Vottero A, Kimchi-Sarfaty C, Kratzsch J, Chrousos GP, Hochberg Z. 2003. Transcriptional and translational regulation of the splicing isoforms of the growth hormone receptor by glucocorticoids. *Horm Metab Res.* 35:7-12
35. Herrington J, Carter-Su Ch. 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 12:252-257
36. Herrington J, Smit LS, Schwartz J, Carte Su C. 2000. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene.* 19:2585-2597
37. Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter Su C, Schwartz J. 1998. Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of Elk-1 and expression of *c-fos*, *egr-1* and *junB* through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem.* 273:31327-31336
38. Boisclair YR, Seto D, Hsieh S, Hurst KR, Ooi GT. 1996. Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:10028-10033
39. Yamauchi T, Kaburagi Y, Ueki K, Tsuji Y, StarK GR, Kerr IM, Tsushima T, Akanuma Y. 1998. Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK Kinase. *J Biol Chem.* 273:15719-15726
40. Hansen LH, Madsen B, Teisner B, Nielsen JH, Billestrup N. 1998. Characterization of the inhibitory effect of growth hormone on primary preadipocyte differentiation. *Mol Endocrinol.* 12:1140-1149

41. Yip RG, and Goodman HM. 1999. Growth hormone and dexamethasone stimulate lipolysis and activate adenylyl cyclase in rat adipocytes by selectively shifting  $G_i\alpha_2$  to lower density membrane fractions. *Endocrinology*. 140:1219-1227
42. Lobie PE, Allevato G, Nielsen JH, Norstedt G, Billestrup N. 1995. Requirement of tyrosine residues 333 and 338 of the growth hormone (GH) receptor for selected GH stimulated function. *J Biol Chem*. 270:21745-21750
43. Smith TR, Elmondorf JS, David TS, Turinsky J. 1997. Growth hormone-induced insulin resistance: role of the insulin receptor, IRS-1, GLUT-1 and GLUT-4. *Am J Physiol*. 272: E1071-E1079
44. Metcalf D, Greenhalgh Ch J, Viney E, Willson TA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. 2000. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature*. 405:1069-1073
45. Gebert CA, Park S, Waxman DJ. 1999. Termination of growth hormone pulse-induced STAT5b signaling. *Mol Endocrinology*. 13:38-56
46. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G. 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*. 330:537-543
47. Edens A, Talamantes F. 1998. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocrine Reviews*. 19:559-585
48. Amit T, Bergman T, Dastot F, Youdim MBH, Amselem S, Hochberg Z. 1997. A membrane-fixed, truncated isoform of the human growth hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:3813-3817
49. Oldham ER, Binham B, Baumbach WR. 1993. A functional polyadenylation signal is embedded in the coding region of chicken growth hormone receptor RNA. *Mol Endocrinol*. 7:1379-1390



50. Goodyer CG, Zogopoulos G, Schwartzbauer G, Zheng H, Hendy GN, Menon RK. 2001. Organization and evolution of the human growth hormone receptor gene 5'-flanking region. *Endocrinology*. 142:1923-1934
51. Geballe AP, Morris DR. 1994. Initiation codons with 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation. *Trends Biochem Sci*. 19:159-164
52. Zou L, Burmeister LA, Sperling MA. 1997. Isolation of a liver-specific promoter for human growth hormone receptor gene. *Endocrinology*. 138:1771-1774
53. Dastot F, Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Goossens M, Amselem S. 1996. Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:10723-10728
54. Ross RJ, Esposito N, Shen XY, Von Laue S, Chew SL, Dobson PR, Postel-Vinay MC, Finidori J. 1997. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol Endocrinol*. 11:265-273
55. Billestrup N, Allevato G, Norstedt G, Moldrup A, Nielsen JH. 1994. Identification of intracellular domains in the growth hormone receptor involved in signal transduction. *Proc Soc Exp Biol Med*. 206:205-209
56. Urbanek M, MacLeod JN, Cooke NE, Liebhaber SA. 1992. Expression of a human growth hormone (hGH) receptor isoforms is predicted by tissue-specific alternative splicing of exon 3 of the hGH receptor gene transcript. *Mol Endocrinol*. 6:279-287
57. Urbanek M, Russell JE, Cooke NE, Liebhaber SA. 1993. Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. *J Biol Chem*. 268:19025-19032

58. Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Amselem S, Goossens M. 1993. Expression and binding properties of two isoform of the human growth hormone receptor. *FEBS Lett.* 319:16-20
59. Bass SH, Mulkerrin MG, Wells JA. 1991. A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:4498-4502
60. Kratzsch J, Wu Z, Kiess W, Dehmel B, Bosse-Henck A, Reuter W, Pflaum CD, Strasburger CJ. 2001. The exon 3-retaining and the exon 3-deleted forms of the growth hormone-binding protein (GHBP) in human serum are regulated differently. *Clin Endocrinol.* 54:61-68
61. Mercado M, Davila N, MacLeod J, Bawmann G. 1994. Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 78:731-735
62. Zogopoulos G, Figueiredo R, Jenab A, Ali Z, Lefebvre Y, Goodyer CG. 1996. Expression of exon 3-retaining and -deleted human growth hormone receptor messenger ribonucleic acid isoforms during development. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:775-782
63. Wickelgren RB, Landin KL, Ohlsson C, Carlsson LM. 1995. Expression of exon 3-retaining and exon 3-excluding isoforms of the human growth hormone receptor is regulated in an interindividual, rather than a tissue-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 80:2154-2157
64. Stallings-Mann ML, Ludwiczak RL, Klinger KW, Rottman F. 1996. Alternative splicing of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:12394-12399
65. Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. 2000. Species-specific alternative splice mimicry at the growth

- hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *J Biol Chem.* 275:18664-18669
66. Pratt SL, Anthony RV. 1995. The growth hormone receptor messenger ribonucleic acid present in ovine fetal liver is a variant form. *Endocrinology.* 136:2150-2155
67. Barnard R, Southard JN, Edens A, Talamantes F. 1993. Growth hormone receptor and growth hormone-binding protein messages in mouse placenta contain the exon analogous to human exon 3. *Endocrinology.* 133:1474-1477
68. Martini JF, Pezet A, Guezennec CY, Edery M, Postel-Vinay MC, Kelly PA. 1997. Monkey growth hormone (GH) receptor gene expression. Evidence for two mechanisms for the generation of the GH binding protein. *J Biol Chem.* 272:18951-18958
69. Baxter R, Turtle J, 1978. Regulation of hepatic growth hormone receptors by insulin. *Biochem Biophys Res Comm.* 84:350-357
70. Chen XL, Hartzell DL, McGraw RA, Hausman GJ, Dean RG, Lee K. 1999. Analysis of a 762-bp proximal leptin promoter to drive and control regulation of transgene expression of growth hormone receptor in mice. *Biophys Res Commun.* 262:187-192
71. Decouvelaere C, Peyrat J-P, Bonnetterre J, Djiane J, Jammes H. 1995. Presence of the two growth hormone receptor messenger RNA isoforms in human breast cancer. *Cell Growth Differentiation.* 6:477-483.
72. Pantel J, Grulich-Henn J, Bettendorf M, Strasburger ChJ, Heinrich U, Amselem S. 2003. Heterozygous nonsense mutation in exon 3 of the growth hormone receptor (GHR) in severe GH insensitivity (Laron syndrome) and the issue of the origin and function of the GHRd3 isoform. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:1705-1710

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

73. Fukuda I, Hizuka N, Takano K, Kazama T, Okubo Y, Asakawa-Yasumoto K. 1998. Growth hormone (GH) receptor and IGF-I receptor messenger RNA expression in peripheral lymphocytes from patients with GH deficiency and acromegaly. *Endocr J.* 45:S109-S112
74. Lesniak MA, Roth J. 1976. Regulation of receptor concentration by homologous hormone. *J Biol Chem.* 251:3720-3726
75. Maiter D, Underwood LE, Maes M, Ketelslegers JM. 1988. Acute down-regulation of somatogenic receptors in rat liver by a single injection of growth hormone. *Endocrinology.* 122:1391-1396
76. Ho KY, Evans WS, Blizzard RM. 1987. Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 64:51-58
77. van den Berg G, Veldhuis JD, Frolich M, Roelfsema F. 1996. An amplitude-specific divergence in the pulsatile mode of growth hormone (GH) secretion underlies the gender difference in mean GH concentrations in men and premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:2460-4267
78. Dall R, Longobardi S, Ehrnborg C, Keay N, Rosen T, Jotgensen JO, Cuneo RC, Boroujerdi MA, Cittadini A, Napoli R. 2000. The effect of four weeks of supraphysiological growth hormone administration of the insulin-like growth factor axis in women and men. GH-2000 study group. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:4193-4200
79. Babson AL. 1991. The IMMULITE Automated Immunoassay System. *J. Clin Immunoassay.* 14:83-88
80. Yalow RS, Berson SA. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.* 184:1618-1619
81. Miles LEM, Lipschitz DA, Bieber CP, Cook JD. 1974. Measurement of

**serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. Analyt Biochem.**

**61:209-224**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**XV**

**PUBLICACIÓN**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Expression of Growth Hormone Receptor Isoform Exon-3-Excluding and Exon-3-Retaining Messenger RNAs in Peripheral Lymphocytes from Normal and Acromegalic Subjects

Raquel Ochoa<sup>a</sup> Arturo Zárate<sup>a</sup> Marco A. Cerbón<sup>c</sup> Mauricio Salcedo<sup>b</sup>  
Ricardo López<sup>b</sup> Rosa E. Galván<sup>a</sup> Marcelino Hernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Endocrine Research Unit and <sup>b</sup>Oncology Research Unit, National Medical Center, Instituto Mexicano del Seguro Social, and <sup>c</sup>National University of México, México, D.F., México

### Key Words

Growth hormone · Growth hormone receptor · Insulin-like growth factor I · Acromegaly · Reverse-transcriptase polymerase chain reaction

### Abstract

**Aim:** To determine the expression of two isoforms of the growth hormone (GH) receptor (GHR), which differ by the presence (GHR3+) or absence (GHR3-) of exon 3, and their correlation with circulating GH and insulin-like growth factor I (IGF-I) in normal subjects and in acromegalic patients. **Methods:** The expression of GHR isoforms was determined by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in lymphocytes from 12 normal subjects and from 11 patients with acromegaly. The levels of GHR mRNA were normalized to those of  $\beta$ -actin, and ratios were calculated to assess the relative levels of expression. **Results:** All samples showed expression of both GHR isoforms, but the expression of GHR3+ and GHR3- was similar in acromegalic patients ( $6.0 \pm 1.7$  vs.  $8.3 \pm 2.0\%$ , mean  $\pm$  SE). In contrast, in healthy subjects, GHR3- was the predominant isoform ( $11.8 \pm 3.0$  vs.  $5.1 \pm 0.68\%$ ;  $p < 0.05$ ), and the levels of expression of GHR3- correlated significantly with IGF-I. **Conclusions:** These data demonstrate coexpression of both GHR iso-

forms under normal and pathological conditions; however, GHR3- is the predominant form in normal subjects and shows a negative correlation with IGF-I levels.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

### Introduction

It has been established that the growth hormone (GH) receptor (GHR) gene consists of nine exons that encode the receptor as well as some additional untranslated exons [1, 2]. Two messenger ribonucleic acid (mRNA) transcripts have been identified for human GHR: one containing exon 3 (GHR3+) and one in which exon 3 is absent (GHR3-). Early studies suggested that the expression of these two GHR isoforms is tissue specific [3], but other reports demonstrated that the expression of the GHR variants is not specific for a certain tissue and is different in each individual [4, 5]. In addition, it has also been suggested that the expression of GHR isoforms is produced by a retrovirus-mediated alternative splice mimicry [6]. The role of GH in regulating the isoform expression pattern of GHR has been excluded, since it is not different between healthy and acromegalic patients, despite the markedly elevated serum levels of GH in acromegaly [4]. Exon 3 encodes a segment of the extracellular

**KARGER**

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel  
0301-0163/03/6002-0068\$19.50/0

Accessible online at:  
www.karger.com/hr

Dr. A. Zárate  
Endocrine Research Unit  
Hospital de México, Agraroma 206401  
11800 México DF (México)  
Tel: 52 5555401744 E-Mail zarate@iisgm.com.mx

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

domain of the GHR, and a deletion of exon 3 gives rise to a shorter GHR; however, the presence or absence of exon 3 does not affect the receptor function [7, 8]. Experimental studies have demonstrated that both GHR isoforms are translated as functional receptors and that the extracellular domains of both variants are released into the circulation as GH-binding protein, exon 3 retaining and GH-binding protein, exon 3 deleted isoforms [9]. It has been previously reported [10] that circulating lymphoid cells express GHR variants, so that clinical studies with peripheral lymphocytes are useful for evaluating the GHR physiology and tissue biopsies are not required.

To determine the expression patterns of GHR isoforms, the mRNA levels in the lymphocytes from healthy individuals and from patients with active acromegaly were measured by using semiquantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). These results were correlated with each one of the following: insulin-like growth factor I (IGF-I), GH, and insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) levels in serum.

**Subjects and Methods**

The study included 12 healthy subjects (5 men, 24–50 years old, and 7 women, 31–48 years old) and 11 patients with acromegaly (6 men, 32–58 years old, and 5 women, 29–48 years old; table 1). The diagnosis of acromegaly was based on clinical features associated with elevated serum levels of both GH and IGF-I; in addition, a glucose load was unable to decrease the GH concentrations to <1 µg/l [11]. Acromegalic patients were subjected to transphenoidal pituitary surgery, and the presence of somatotrope adenoma by immunocytochemistry analysis was confirmed in all cases. The study was approved by the ethical committee of Instituto Mexicano del Seguro Social, and all participants were informed about the purpose of the study and gave written consent to participate.

*Human Peripheral Lymphocyte Preparation*

Blood samples were drawn in tubes containing EDTA between 07.00 and 08.00 h after an overnight fast. The blood was centrifuged at 400 g for 20 min, and plasma aliquots were separated and maintained frozen at -70°C until assayed in a single assay run for each measurement. The blood cells were diluted 1:4 with phosphate-buffered saline, and then they were layered onto Ficoll-Hypaque gradient and centrifuged at 400 g for 40 min at room temperature. The mononuclear cell fraction was taken as peripheral lymphocytes, and the cells were washed three times in phosphate-buffered saline.

*RNA Extraction*

Total RNA was extracted and purified from approximately 1 × 10<sup>8</sup> cells by using Trizol (Life Technologies, Melbourne, Australia), as recommended by the manufacturer. After precipitation, RNA pellets were dissolved in diethylprocarbonate-treated water and stored at -70°C. The RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm. The quality of the RNA samples was checked by examining

**Table 1.** Main clinical and biochemical data in normal subjects and in patients with acromegaly (mean ± SE)

	Normal subjects (n = 12)	Acromegaly (n = 11)	p
Age, years	39.6 ± 2.3	43 ± 3	NS
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	26.5 ± 1.8	27.2 ± 1.3	NS
GH, ng/ml	0.46 ± 0.2	25 ± 4.2	<0.001
IGF-I, ng/ml	253.8 ± 16	1,407 ± 179	<0.001
IGFBP-3, ng/ml	2,648 ± 120	5,174 ± 304	<0.001
E <sub>2</sub> , pg/ml <sup>a</sup>	82.58 ± 12.9	29.1 ± 10.5	<0.01

<sup>a</sup> Measurements performed in women only.

28S and 18S bands by using denaturing gel electrophoresis. Each total RNA sample was treated with DNase at 37°C for 1 h, followed by extraction as previously described [12].

*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*

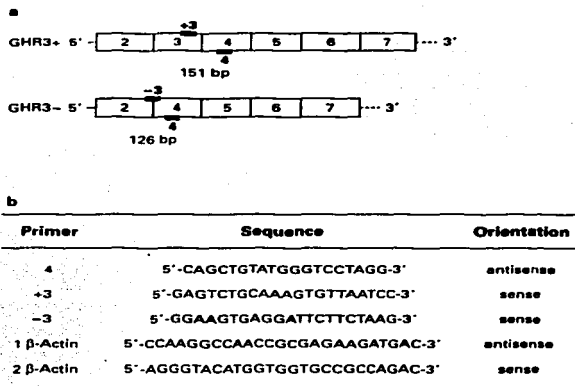
The expression analysis was performed using the Access RT-PCR system (Promega, Madison, Wis., USA). This system is a one-tube, one-step, two-enzyme system and uses gene-specific primers to produce a single cDNA product. In each RT-PCR reaction, we used 4 µg of total RNA for GHR3+ and GHR3- and 250 ng of total RNA for β-actin, using specific primers. RT was performed at 48°C for 45 min followed by the PCR amplification which was done by denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 54°C for 1 min, and extension at 68°C for 2 min. Final extension was carried out at 68°C for 7 min for 35 cycles which was determined previously to be within the exponential range of the PCR product amplification. Primers used for GHR3+ , GHR3-, and β-actin detection have been previously reported [3]. Localization, nomenclature, and sequences of primers are shown in figure 1. As a negative control, the substitution of total RNA for distilled water was utilized. As a positive control in all RT-PCR assays, total RNA from liver cells obtained at autopsy (within 6 h) was used. Both controls were amplified in parallel to the samples. The amplified fragments were subjected to electrophoresis in 10% polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide, and visualized in a Eagle Eye II imaging system (Stratagene, La Jolla, Calif., USA). The density of bands was quantified by the image system GeneTools (version 3.00.22; Syngene, Frederick, Md., USA). The quantities of GHR3+ and GHR3- were normalized to the β-actin mRNA levels and expressed as a percentage of GHR3+ or GHR3- versus β-actin mRNA levels.

*Hormone Assays*

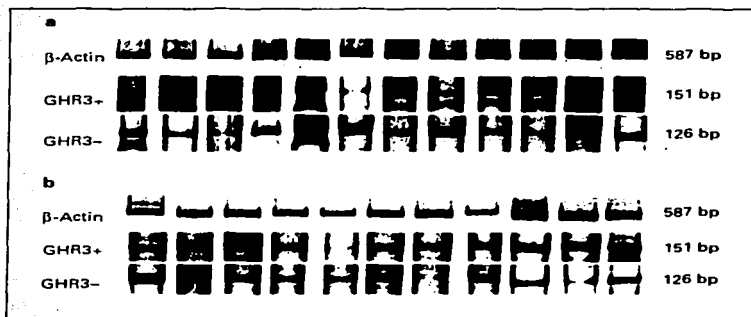
All hormones were quantified using commercial kits: GH was measured by a chemiluminescent immunometric assay (Diagnostic Products, Los Angeles, Calif., USA); IGF-I, IGFBP-3, and 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) were measured by using specific kits (Diagnostic System Laboratories, Webster, Tex., USA). IGF-I and IGFBP-3 were analyzed by a two-site immunoradiometric assay; measurement of IGF-I included an acid-ethanol extraction step to separate IGF-I from its binding protein. Methods of quality control used in our laboratory have been reported previously [13].







**Fig. 1.** **a** Schematic presentation of the structures from exons 2 to 7 of the two GHR isoforms and localization of the primers which were used to predict product sizes. **b** Nomenclature, sequence, and orientation of the primers used for the RT-PCR assays.



**Fig. 2.** Acrylamide gel electrophoresis of RT-PCR products in total RNA of lymphocytes from normal subjects (**a**) and acromegalic patients (**b**), using primers for GHR3+, GHR3-, and  $\beta$ -actin. Molecular size of products given as base pairs (bp).

#### Statistics

Percentages of isoforms and the hormone levels are given as mean values  $\pm$  SE and were analyzed by employing the Mann-Whitney U test. Spearman's correlation analysis between isoforms and hormonal values was performed.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

#### Results

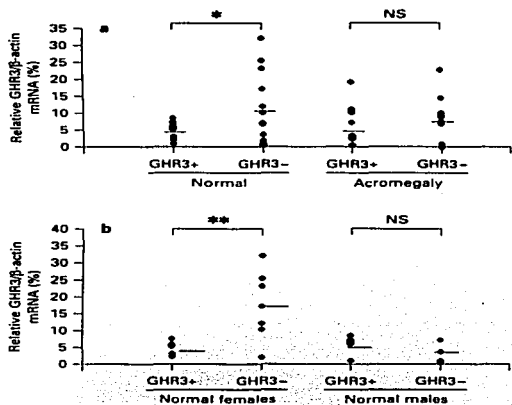
As expected, the predicted size of the RT-PCR products were 151 bp for the full-length transcript and 126 bp for the GHR3- isoform. Direct sequencing of the amplified products confirmed the predicted sequences. Total

RNA in the peripheral lymphocytes from normal subjects expressed both GHR isoforms (fig. 2). When the band density of GHR3+ and GHR3- was normalized with respect to that of the  $\beta$ -actin transcription level, GHR3- was the predominant isoform ( $11.8 \pm 3.0$  vs.  $5.1 \pm 0.68\%$ ,  $p < 0.05$ ; fig. 3). Normal women had the circulating  $E_2$  levels within normal limits, and they exhibited a significant ( $p < 0.01$ ) major proportion of GHR3- as compared with normal men ( $17.43 \pm 3.8$  vs.  $3.94 \pm 1.43\%$ ; fig. 3). In addition, there was a significant correlation ( $p < 0.01$ ) between GHR3- and IGF-I (fig. 4).

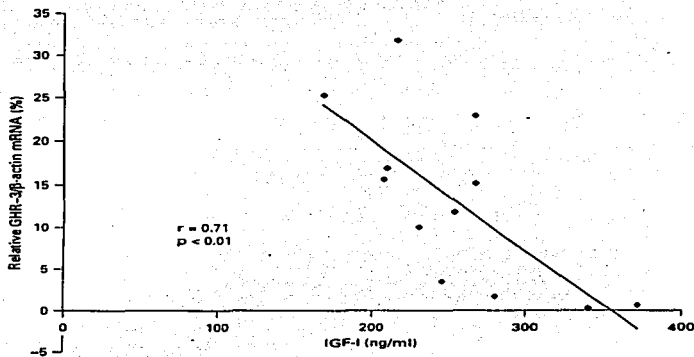
Both GHR isoforms were expressed in lymphocytes from acromegalic patients; however, no difference in the proportions of both isoforms, GHR3+ and GHR3- ( $6.0 \pm 1.7$  vs.  $8.3 \pm 2.0\%$ ), was observed. Finally, the isoforms in the acromegalic patients did not correlate with GH, IGF-I, and IGFBP-3 levels.

## Discussion

The present study confirmed that the coexpression of the two GHR isomers can be properly estimated in peripheral lymphocytes which facilitates the analysis [10]. It was also demonstrated that the proportion of GHR isomers could exhibit differences among individuals and confirmed the fact that GH itself is not a major regulator of the expression pattern. Another observation was the



**Fig. 3.** Percentage of GHR3+ and GHR3- related to  $\beta$ -actin mRNA showing the predominance of GHR3- in normal subjects (a). Normal women also exhibited a major proportion of GHR3- (b). RT-PCR results were quantified using an image system and expressed as a percentage of abundance relative to  $\beta$ -actin. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



**Fig. 4.** Significantly negative correlation between GHR3- and IGF-I levels.

predominance of the GHR3- isoform of GHR in healthy individuals which supports the theory that the absence of exon 3 does not impair the GHR physiology [7, 8]. It has been proposed that the expression of GHR isoforms is the result of a polymorphism [14] or a novel physiological mechanism which mimics alternative splicing [6], with a simple Mendelian inheritance of two differing alleles with three expression patterns of GHR isoforms: only GHR3+, only GHR3-, or coexpression of each at similar levels. However, in our study, we observed only one pattern of GHR isoforms. Although it was suggested previously that the receptor mRNA levels of both GH and IGF-I do not correlate with the circulating GH and IGF-I levels [15], the present study demonstrated that the GHR3- isoform had a negative correlation with serum IGF-I levels in healthy individuals. In contrast, acromegalic patients who had a marked elevation of GH and IGF-I levels expressed similar amounts of the two GHR isoforms, and these forms neither correlated with GH levels nor with circulating IGF-I. This may suggest that the interaction between GH and its receptor is altered in acromegaly. In this respect, it has been previously reported that the relative proportion of the two isoforms of the GH-binding protein 3 in lymphocytes from normal individuals is gender dependent, with a major proportion of the exon 3 exclu-

ing isoform of GH-binding protein in women as compared with men [9]. Another observation in the present study was that healthy women who had normal E<sub>2</sub> concentrations showed a major proportion of GHR3-; in contrast, the acromegalic women who had decreased E<sub>2</sub> levels expressed similar proportions of the two GHR isoforms.

A particular finding derived from this study was the negative correlation between the levels of GHR3- and IGF-I in normal subjects. Contrarily, acromegalic patients failed to present any relationship between IGF-I and each one of the two GHR isoforms. Therefore, it is proposed that in cases of abnormal secretion of GH, such as in acromegaly, the interplay between GH and its receptor is disturbed. However, the physiological significance of the GHR isoform distribution deserves further research.

### Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Mexican Institute of Social Security. R. Ochoa and R. López were recipients of educational grants from the National Council of Science and Technology (CONACYT). The authors are greatly indebted to Dra Eulalia Valdéz and the medical residents working at the Hospital General de México for the assistance in performing the clinical studies.

### References

- Godowski PJ, Leung DW, Metcham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Kerel R, Rotwein PS, Parks JS, Larou Z, Wood WL: Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8083-8087.
- Edens A, Talamantes F: Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr Rev* 1998;19:559-585.
- Mercado M, DaVila N, McLeod JF, Baumann GJ: Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:731-735.
- Wickelgren RB, Landin KL, Ohlsson C, Carlsson LM: Expression of exon 3-retaining and exon 3-excluding isoforms of the human growth hormone receptor is regulated in an interindividual, rather than a tissue-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2154-2157.
- Zogopoulos G, Figueredo R, Jenab A, LeFebvre AY, Goodyer CG: Expression of exon 3-retaining and deleted human growth hormone receptor messenger ribonucleic acid isoforms during development. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:775-782.
- Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S: Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *J Biol Chem* 2000;275:18664-18669.
- Urbanek M, Russell JE, Cooke NE, Liebhaber SA: Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. *J Biol Chem* 1993;268:19025-19032.
- Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Amselem S, Goossens M: Expression and binding properties of two isoforms of the human growth hormone receptor. *FEBS Lett* 1993;319:16-20.
- Kratzsch J, Wu Z, Kiess W, Delmel B, Bosse-Henck A, Reuter W, Pfaffm CD, Strasburger CJ: The exon 3-retaining and the exon 3-deleted forms of the growth hormone-binding protein (GHBP) in human serum are regulated differently. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;54:61-68.
- Decouvelaere C, Peyrat JP, Bonnetierre J, Djiane J, Jammes H: Presence of the two growth hormone receptor messenger RNA isoforms in human breast cancer. *Cell Growth Differ* 1995;6:477-483.
- Chapman IM, Hartman ML, Straume M, Johnson ML, Veldhuis JD, Thorne MO: Enhanced sensitivity growth hormone (GH) chemiluminescence assay reveals lower post-glucose nadir GH concentration in men than women. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1312-1319.
- Chen XL, Hartzell DL, McGraw RA, Hausman GJ, Dean RG: Analysis of a 762-bp proximal leptin promoter to drive and control regulation of transgene expression of growth hormone receptor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:187-192.
- Ochoa R, Fonseca M, Basurto L, Galván RE, Hernández M, Zárate A: Serum leptin and somatotropin components correlate with neonatal birth weight. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52:243-247.
- Stallings-Mann ML, Ludwiczak RL, Klinger KW, Rottman F: Alternative splicing of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12394-12399.
- Fukuda I, Hizuka N, Takano K, Kazama T, Okubo Y, Asakawa-Yasumoto K, Demura H: Growth hormone (GH) receptor and IGF-I receptor messenger RNA expression in peripheral lymphocytes from patients with GH deficiency and acromegaly. *Endocr J* 1998;45(suppl):109-112.