

**ESTUDIO DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA
DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN LOS
TRASTORNOS DEL CRECIMIENTO Y EN LAS
ALTERACIONES DE LA NUTRICIÓN**

M^a Antonia Llopis Díaz

2002

**ESTUDIO DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LA
HORMONA DE CRECIMIENTO EN LOS TRASTORNOS DEL
CRECIMIENTO Y EN LAS ALTERACIONES DE LA
NUTRICIÓN**

**Tesis Doctoral presentada por M^a Antonia Llopis Díaz para optar al
grado de Doctor en Medicina y Cirugía**

Directores: Drs. A. Corominas Vilardell y ML. Granada Ybern

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

Barcelona, Julio 2002

A mi padre
A la memoria de mi madre
A Juan Alberto, Laura y Alicia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. August Corominas, Catedrático de Fisiología Humana de la UAB, Jefe del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Germans Trias i Pujol y director de esta tesis, por sus enseñanzas que han sido fundamentales para mi formación como especialista y por haberme concedido todas las facilidades para realizar esta tesis.

A la Dra. M^a Luisa Granada, Adjunto del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Germans Trias i Pujol, directora de esta tesis y sobre todo amiga, por el constante estímulo que ha supuesto para mí su gran profesionalidad y calidad humana; sin sus consejos y enseñanzas, sin su apoyo constante e incondicional, este trabajo no hubiera sido posible.

Al Dr. Celestino Rey-Joly, Catedrático de Patología Médica de la UAB, Coordinador de la Unidad Docente, Jefe del Servicio de Medicina Interna del Hospital Germans Trias i Pujol, tutor de esta tesis, por su generosa ayuda y colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Laura Audí, Jefe de Sección de la Unitat de Reserca en Endocrinologia i Nutrició Pediàtrica dels Hospitals Vall d'Hebron, por transmitirme su entusiasmo por la investigación, por su rigor científico y por sus inestimables enseñanzas.

A la Dra. Anna Sanmartí, Jefe del Servicio de Endocrinología del Hospital Germans Trias i Pujol, cuyos conocimientos clínicos, ayuda y consejos han sido básicos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Marius Foz, Catedrático de Medicina de la UAB, por la confianza que siempre ha demostrado en este proyecto, sus enseñanzas han sido una ayuda inestimable en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Luis Sánchez-Planell, Jefe de la Unidad de Psiquiatría del Hospital Germans Trias i Pujol, Profesor titular de Psiquiatría de la UAB, por su inestimable colaboración en el estudio clínico de gran parte de los pacientes, por su desinteresado apoyo y confianza.

Al Dr. Joan Bel, Adjunto del Servicio de Pediatría del Hospital Germans Trias i Pujol, por su generosa colaboración en el estudio clínico de algunos de los niños incluidos en este trabajo.

A los Drs. Xavier Formiguera, Antoni Alastrué y Miquel Rull, de los Servicios de Medicina Interna y Cirugía General del Hospital Germans Trias i Pujol por su inestimable ayuda en el estudio clínico de los pacientes obesos incluidos en esta tesis.

Al Dr. Fernando Marín, Departamento de Investigación Médica de Lilly, por su estímulo constante y por su apoyo incondicional al inicio de este proyecto.

A Pilar Ortiz y Ana Vega, enfermeras de la Sección de Hormonas del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Germans Trias i Pujol, por su incondicional ayuda y disposición siempre que lo he necesitado.

A todo el personal del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Germans Trias i Pujol, jefes clínicos, adjuntos, residentes, personal de enfermería, técnicos de laboratorio, auxiliares de clínica y administrativos, por su desinteresada colaboración.

A mis padres, a mi hermana Yolanda porque ellos siempre me lo han dado todo sin pedir nada a cambio, por que ellos me han enseñado que con esfuerzo, perseverancia, y confianza en mi misma, podía conseguir todo lo que me propusiera. A ellos les debo mucho más que esta tesis.

A Juan Alberto y a mis hijas Laura y Alicia, ellos son los pilares fundamentales de mi vida. Por perdonarme el tiempo que les he robado, sin su amor, apoyo constante, comprensión y paciencia este trabajo no hubiera sido posible.

ABREVIATURAS

CNTF, Factor neurotrófico ciliar

DGH, Déficit de secreción de hormona de crecimiento

FPLC, Cromatografía líquida de separación rápida

GH, Hormona de crecimiento

GHBP, Proteína transportadora de la hormona de crecimiento

GHR, Receptor de la hormona de crecimiento

GHR-tr, Forma truncada del receptor de la hormona de crecimiento

GHRH, Hormona liberadora de la hormona de crecimiento

GnRH, Hormona liberadora de las gonadotropinas

HPLC, Cromatografía líquida de alta precisión

IGFs, Factores de crecimiento similar a la insulina

IGF-I, Factor de crecimiento similar a la insulina I

IGF-R, Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina

IGFBPs, Proteínas transportadoras de los factores de crecimiento similares a la insulina

IL, Interleuquina

IMC, Índice de masa corporal

IRS-1 y -2, Substratos del receptor de la insulina

JAK 2, Janus Kinasa 2, proteína quinasa con actividad tirosina

Kb, Kilobase

KDa, Kilodaltons

LHRH, Hormona liberadora de la hormona luteinizante
LIFA, Inmunoanálisis funcional mediado por ligando
MAP, Proteínas activadas por mitógenos
OSM, Oncostatina M
PI3', Fosfatidil inositol 3' quinasa
SRIH, Somatostatina
STAT, Transductores de señales y activadores de transcripción
T₃, Triiodotironina
TACE, Enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa
TBI, Talla baja idiopática
TNF- α, Factor de necrosis tumoral alfa

1	INTRODUCCIÓN	
1.1	Fisiología del eje GH:IGF-I	3
1.2	Proteína transportadora de la hormona de crecimiento de alta afinidad	6
1.2.1	Estructura molecular y características funcionales	9
1.2.2	Origen de la GHBP	11
1.2.2.1	Receptor de la GH	12
1.2.2.2	Mecanismo de producción	19
1.2.2.3	Distribución tisular de los receptores de la GH	22
1.2.3	Funciones de la GHBP	23
1.2.4	Regulación de la expresión y concentración de la GHBP	27
1.2.4.1	Ontogenia	27
1.2.4.2	Nutrición	28
1.2.4.3	Hormonas	29
1.2.5	Implicaciones fisiopatológicas y clínicas: la GHBP como marcador del grado de sensibilidad a la acción de la GH	33
1.2.5.1	Estados de resistencia a la acción a la GH	34
1.2.5.1.1	Estados congénitos de resistencia a la GH	35
1.2.5.1.1.1	Síndrome de Laron	35
1.2.5.1.1.2	Pigmeos	39
1.2.5.1.1.3	Niños con talla baja idiopática	39
1.2.5.1.2	Estados adquiridos de resistencia a la GH	40
1.2.5.2	Estados de hipersensibilidad a la acción de la GH	42
1.2.6	Métodos para la determinación de GHBP	42
2	MOTIVACIÓN	47
3	OBJETIVOS	49
4	RESULTADOS	

4.1 ESTUDIO 1:” Comparación de dos ensayos de unión para medir la proteína transportadora de la hormona de crecimiento (GHBP): cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) y filtración en gel y adsorción mediante carbón dextrano”	50
4.1.1 Resumen	50
4.1.2 Artículo	56
4.2 ESTUDIO 2: “Determinación de la proteína transportadora de la hormona de crecimiento (GHBP) en un grupo de niños y adolescentes varones con talla baja y velocidad de crecimiento disminuida”	57
4.2.1 Resumen	57
4.2.2 Introducción	58
4.2.3 Sujetos y métodos	61
4.2.4 Resultados	66
4.2.5 Discusión	68
4.2.6 Bibliografía	71
4.3 ESTUDIO 3: “La proteína transportadora de la hormona de crecimiento depende directamente de las concentraciones de leptina en adultos con diferentes estados nutricionales”	79
4.3.1 Resumen	79
4.3.2 Artículo	81
5 DISCUSIÓN GENERAL	82
6 CONCLUSIONES	98
7 BIBLIOGRAFÍA	100

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FISILOGIA DEL EJE GH-IGF-I

La somatotropina (GH, growth hormone) es una hormona polipeptídica secretada por las células somatotropas de la hipófisis anterior, de forma pulsátil, bajo la acción de dos factores hipotalámicos, la somatoliberina y la somatostatina. Tiene un papel fundamental en la estimulación del crecimiento durante la infancia y en la regulación del metabolismo y composición corporal durante la edad adulta.

Para ejercer sus acciones biológicas, la GH se une a un receptor específico (GHR, growth hormone receptor), el cual está presente en la mayoría de las células del organismo. Las acciones biológicas de la GH se pueden englobar en dos grupos: aquellas de tipo directo que no necesitan mediadores y aquellas que son denominadas indirectas y necesitan la mediación de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs, insulin-like growth factors). En general, las acciones directas son las que ejerce sobre el metabolismo lipídico e hidrocarbonado. Su acción principal, la estimulación del crecimiento, la realiza fundamentalmente de forma indirecta, a través del IGF-I, el cual se sintetiza principalmente en el hígado en respuesta a la unión de la GH con su receptor¹.

La GH plasmática circula unida a proteínas transportadoras (GHBP, growth hormone-binding protein). Una de ellas, denominada proteína transportadora de la GH de alta afinidad, tiene una secuencia de

aminoácidos idéntica a la porción extracelular del receptor de la GH y representa la fracción soluble de dicho receptor, del cual deriva principalmente por separación proteolítica.

La GH, la GHBP de alta afinidad, su receptor, el IGF-I y sus proteínas transportadoras (IGFBPs, insulin-like growth factor binding-proteins) forman parte del eje GH-IGF-I, principal regulador del crecimiento somático postnatal (figura 1).

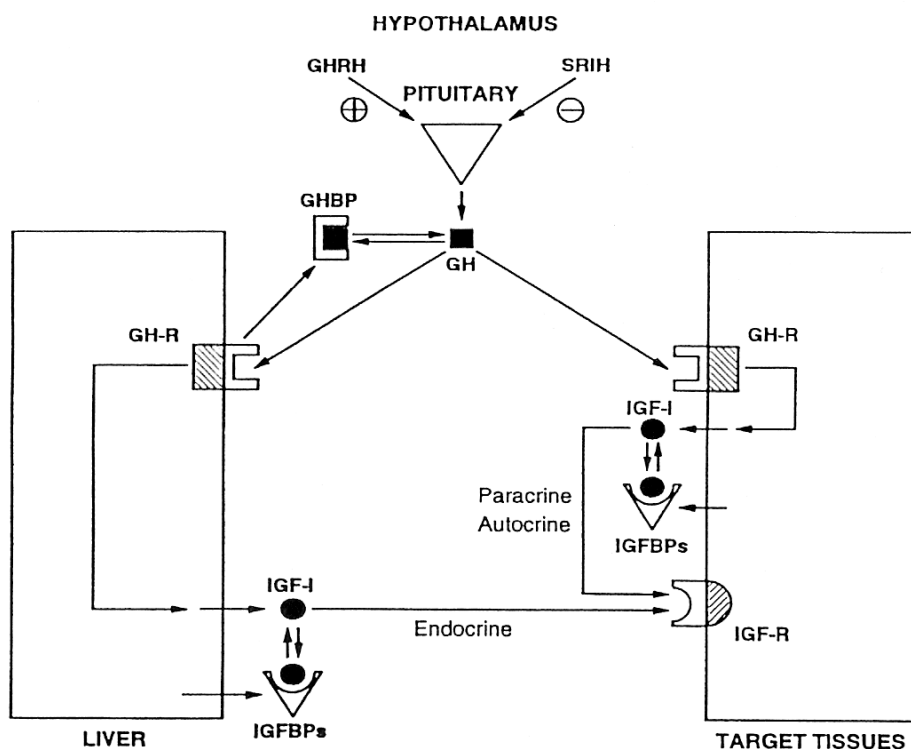


Figura 1. Eje GH-IGF-I. Reproducido de Thissen y cols. *Endocr Revs* 1994;15: 80-101 (Ref.182)

En dicho eje podemos diferenciar, de manera arbitraria, una parte proximal que estaría formado por los procesos implicados en la secreción de la GH, y una parte distal, que englobaría los procesos implicados en la acción de la GH. El receptor de la GH es una pieza fundamental para la comprensión de la parte distal del eje de la GH-IGF-I. Sin embargo, la investigación en seres humanos de la parte distal de dicho eje presenta dificultades. Por un lado, el hígado es el órgano que posee mayor concentraciones de receptores de GH, pero por razones obvias no es un órgano accesible para la investigación y experimentación; además, las concentraciones de GHR en otros tejidos diferentes al hígado son muy bajas. Por otro lado la regulación de dicho eje en el ser humano es distinta a la de otras especies animales y los resultados obtenidos en ellos no se pueden extrapolar al hombre.

Desde su descubrimiento^{2,3}, la proteína transportadora de la hormona de crecimiento de alta afinidad ha suscitado un gran interés pues gracias a su analogía con el dominio extracelular del GHR, su medida en suero puede representar una medida indirecta del estado de los receptores de GH contribuyendo al conocimiento fisiopatológico de la parte distal del eje GH-IGF-I.

1.2 PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO DE ALTA AFINIDAD.

La existencia de proteínas transportadoras (“binding proteins”) para las hormonas tiroideas y esteroideas fue descrita por primera vez en los años 50⁴. Para estas hormonas, las proteínas transportadoras tenían la función de solubilizar los ligandos que transportan, pues las hormonas esteroideas son moléculas relativamente hidrofóbicas. Por el contrario, se creía hasta hace relativamente poco que las hormonas peptídicas circulaban de forma libre, debido a su naturaleza hidrosoluble.

Las primeras evidencias en contra datan de mediados los años 70 cuando se describió que los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) circulaban en su mayor parte unidos a transportadores plasmáticos específicos^{5,6}. En el caso de la GH, el descubrimiento de las llamadas formas “big” y “big-big” en plasma fueron inicialmente atribuidas a agregados de GH^{7,8} y a pesar de que en 1977, Peeters y Friedsen describieron un factor ligante de GH en suero de ratones embarazadas⁹, no se continuó investigando en ese sentido.

La existencia de esta proteína transportadora no fue aceptada hasta 1986, año en que simultáneamente dos equipos de investigadores que actuaban de forma independiente, publicaron la caracterización de la GHBP sérica en humanos^{2,3}. Estos dos equipos investigadores partían de líneas de investigación distintas. Por un lado, Herington y cols en

Australia estaban estudiando los receptores de GH en el conejo y encontraron una forma soluble de estos receptores en el citosol hepático¹⁰. Esto les llevó a investigar en otros tejidos y en el suero de conejo¹¹. El hallazgo de una proteína transportadora en el suero de conejo pronto les llevó a realizar estudios análogos en suero humano llegando así a la descripción de la GHBP humana³. Por otro lado a Baumann y cols en Estados Unidos, sus investigaciones sobre las diferentes formas moleculares de la hormona de crecimiento⁸ les condujeron a la primera descripción de la GHBP de alta afinidad².

Hasta el momento se han identificado dos GHBPs en suero humano. Una de alta y otra de baja afinidad^{2,3,12,13}. La GHBP de alta afinidad es la que ha centrado el mayor interés debido a que a ella se une una mayor proporción de GH en suero. Además, desde el principio se sospechó su relación con el receptor de la GH debido a su especificidad y afinidad por esta hormona y a que, por lo menos en el conejo, tenía unas características inmunológicas semejantes a las del receptor¹⁴. La primera evidencia que demostró la relación de la GHBP con el receptor de la GH en el hombre llegó con el hallazgo de que en el suero de pacientes con enanismo tipo Laron, en el cual se sabe que existe un déficit del receptor de la hormona de crecimiento, no hay niveles detectables de la proteína transportadora de alta afinidad^{15,16}. Con la clonación del receptor de la GH y la secuenciación de la GHBP de alta afinidad se ha demostrado que la estructura de esta última se corresponde con el dominio extracelular del receptor hepático de la GH, con el que comparte los primeros 238-246 aminoácidos del extremo amino-terminal de la molécula del receptor¹⁷.

Posteriormente, en el suero humano se demostró una segunda GHBP cuya estructura sólo ha sido caracterizada parcialmente. Tiene un peso molecular mayor que el de la GHBP de alta afinidad, entre 100 y 170 kDa. Se une a la principal forma circulante de la GH, la GH de 22 kDa, con baja afinidad y una gran capacidad de unión (2-15 $\mu\text{g/mL}$)^{12, 13}. Debido a su baja afinidad, sólo una pequeña fracción (~5–8%) de la GH circulante se une a esta proteína transportadora a pesar de su elevada capacidad de unión¹⁸. Es más heterogénea y se une a la variante de 20 K de la GH con una preferencia relativa¹⁹. Debido a sus propiedades inmunoquímicas y a que está presente en el suero de pacientes con enanismo tipo Laron, se cree que esta GHBP de baja afinidad no está relacionada con el receptor de la GH^{12,16,19}. Aunque no ha sido totalmente demostrado, existen evidencias acerca de que la GH forma complejos con la α -2-macroglobulina o con una versión modificada de ella y por ello se ha sugerido que la GHBP de baja afinidad podría ser esta α -2-macroglobulina modificada²⁰. Se sabe que la α -2-macroglobulina se une a otras sustancias, como la leptina, con una baja afinidad similar²¹. Por el momento se desconoce la regulación, papel biológico e importancia fisiológica de esta GHBP de baja afinidad.

De aquí en adelante para ofrecer una mayor claridad, con el término GHBP nos referiremos a la GHBP de alta afinidad, el estudio de la cual ha sido objeto de esta tesis.

1.2.1 Estructura molecular y características funcionales

La GHBP de alta afinidad es una glicoproteína de cadena simple con un peso molecular de ~ 60 kDa y un punto isoeléctrico alrededor de 5^{2,3,22}. Su esqueleto proteico representa aproximadamente el 50% del peso molecular de la GHBP natural (28,5 kDa) mientras que al resto contribuyen los residuos de carbohidratos. Por el momento, se desconoce el sitio exacto de glicosilación y el tipo de estructura de la fracción glucídica. A pesar de estar muy glicosilada, se sabe que la porción glucídica no es necesaria para la unión a la GH, desconociéndose por el momento su significado funcional²³. La disponibilidad de una forma recombinante no glicosilada ha permitido dilucidar con detalle su estructura proteica.

La GHBP de alta afinidad forma un complejo de 85-90 kDa con la GH humana (GHBP:GH). A pesar de que una molécula de GH es capaz de unirse a dos moléculas de GHBP por dos lugares de unión distintos^{24,25}, en el suero, el complejo formado entre GH y GHBP muestra principalmente aunque no exclusivamente una estequiometría 1:1^{2,3,13}. La relativa baja concentración de GHBP en el plasma favorece la unión 1:1, mientras que en los tejidos la concentración de GHR es mucho mayor, alrededor de 5 a 10 veces superior a la de GHBP, favoreciéndose la formación de complejos 2:1 (GHR:GH:GHR). Esta dimerización del receptor de la GH es necesaria para que se produzca la transmisión de la señal²⁶.

La GHBP de alta afinidad tienen una gran especificidad por la GH. En el hombre, la especificidad está restringida a la GH humana y sus variantes moleculares y se ha demostrado que incluso moléculas muy relacionadas a la GH como es el lactógeno placentario no son reconocidas por la proteína transportadora.

La GHBP de alta afinidad en el hombre une la GH de 22K con una constante de asociación (K_a) de 2 a $11 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ dependiendo del método utilizado en la determinación^{2,3,13,27, 28,29}. La asociación es rápida a 37° ($k_{on} = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) y la disociación a 37° es considerablemente más lenta ($k_{off} = 0.037 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$)^{2,30}. Estas constantes permiten que se formen complejos GHBP:GH rápidamente *in vivo* después de un pulso secretor de GH.

La GHBP en plasma tiene una capacidad de unión limitada oscilando entre 0.5 a 2 nM , o 11 - $45 \text{ } \mu\text{g GH/L}$ de plasma en individuos adultos^{2,3,13,28}. Esta GHBP tiene mucha menor afinidad ($K_a < 10^6 \text{ M}^{-1}$) por la variante de 20K ¹⁹, pero une la GH placentaria con igual afinidad que la GH hipofisaria³¹. Se han descrito afinidades ligeramente superiores para la GHBP recombinante que para la GHBP natural^{17,23}.

1.2.2 Origen de la GHBP

El gen del receptor de la GH está presente en el genoma como una copia única, se extiende a través de 87 Kb en la porción proximal del brazo corto del cromosoma 5 (5p 13.1-p12)³². De los 9 exones que corresponden a la proteína del receptor de GH, el exón 2 codifica el péptido señal, los exones 3-7 corresponden al dominio extracelular, el exón 8 al dominio de transmembrana y los exones 9-10 al dominio intracelular. En el extremo 5' existen varios exones que no se traducen. No se ha encontrado un gen para la GHBP de alta afinidad, por lo tanto dicho gen codifica para ambos GHR y GHBP de alta afinidad (figura 2). La GHBP de alta afinidad es la forma soluble, circulante del receptor de la GH, existiendo una relación compleja entre ambos. Para comprender el mecanismo de producción de la GHBP a partir del GHR describiremos en primer lugar las principales características estructurales y funcionales de dicho receptor.

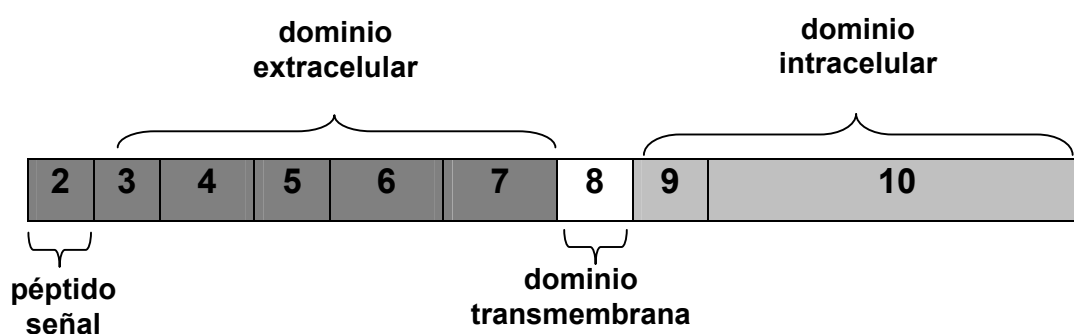


Figura 2. Esquema de los exones del gen del receptor de la GH que codifican los diferentes dominios de dicho receptor.

1.2.2.1 Receptor de la hormona de crecimiento

Es una proteína transmembranosa de 620 aminoácidos compuesta por un dominio extracelular de unión al ligando de 246 aminoácidos, una pequeña porción transmembrana y una sección intracitoplasmática de aproximadamente 350 residuos¹⁷. El receptor de la GH (GHR) pertenece a la gran familia de los receptores de clase I de las citoquinas/hematopoyetinas y fue el primero en identificarse. Esta superfamilia también incluye los receptores de la prolactina, la eritropoyetina, la trombopoyetina, el factor inhibidor de leucemia, la oncostatina M (OSM), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la leptina, varias citoquinas y factores de crecimiento, como son el factor neurotrófico ciliar (CNTF), las interleuquinas (IL) 2-7 y 9, el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y el factor estimulante de colonias de granulocitos^{33,34,35}.

Muchos de los receptores de esta familia comparten con el receptor de la GH, la característica de presentar formas solubles en plasma análogas a la GHBP que han sido demostradas a varios niveles (mRNA o proteína). Los aspectos funcionales de la mayoría de ellas no son bien conocidas³⁶. La GHBP ha sido el primer receptor soluble demostrado y es quizá una de las mejor estudiadas. El concepto de fragmento de receptor o de receptores circulantes desarrollado para el GHR se desvía del concepto clásico en endocrinología de un receptor estacionario y una llave móvil,

la hormona. Esto confiere a los receptores y a sus derivados solubles nuevas e importantes implicaciones fisiopatológicas^{37,38}.

A excepción del receptor del factor neurotrófico ciliar (CNTF) anclado en la membrana por un glucosil-fosfatidilinositol, los receptores de las citoquinas presentan un dominio de membrana único y otras analogías de estructura en su dominio extracelular. Todos estos receptores tienen en su dominio extracelular un módulo de 210 aminoácidos que incluyen numerosos aminoácidos conservados, en particular, un motivo WSxWS (triptófano-serina-cualquier aminoácido-triptófano-serina) cerca del dominio transmembrana y la presencia de dos pares de cisteínas incluidos en puentes disulfuro intracatenarios, casi siempre en la región N-terminal de la molécula, necesarios para la fijación del ligando²⁴. En su dominio intracelular, estos receptores no poseen un sitio de fijación para el ATP y ni una secuencia con actividad tirosina quinasa. Finalmente, en su dominio intracitoplasmático, el GHR comparte dos regiones con los otros miembros de la familia, denominados Box-1 y Box-2 que tienen un papel importante en la transmisión de la señal mediada por el receptor³⁴.

Mediante el desarrollo de métodos de transfección celular de cDNA de GHR clonado, ha sido posible demostrar que las múltiples acciones biológicas de la GH están mediadas por el receptor clonado, por lo tanto, los procesos proliferativos, metabólicos, así como los de diferenciación son mediados por el mismo GHR. Además, utilizando la transfección de formas mutantes del GHR en varias líneas celulares, se han identificado dentro de la región intracitoplasmática del GHR distintos dominios funcionales. De esta forma, se han podido identificar que para la

actividad transcripcional son necesarios dos dominios, uno localizado en los 184 aminoácidos del extremo C-terminal, y otro en el dominio rico en prolinas (Box-1), y que para las acciones metabólicas es importante un dominio situado en, o cerca de esta región rica en prolinas²⁵.

Aunque el receptor de la GH es una cadena polipeptídica simple, la inducción efectiva de la señal intracelular requiere la formación de un homodímero, es decir, que dos sitios distintos de la molécula de GH circulante interaccionen con un mismo lugar de unión específico de dos receptores. Este lugar de unión se halla situado cerca del extremo aminoterminal del dominio extracelular. A este fenómeno se le conoce con el nombre de dimerización del receptor de la GH. Por lo tanto una molécula de GH se une secuencialmente a dos moléculas de receptor provocando tanto su dimerización como cambios conformacionales importantes para que la GH pueda efectuar sus acciones^{26,39}.

Los cambios conformacionales del GHR son necesarios para incrementar la unión al GHR de la JAK2 (Janus kinasa 2), una tirosinaquinasa intracelular no incluida en el receptor, y la activación enzimática de la misma. Dentro del dominio intracelular del GHR, la zona Box-1, también parece ser importante para la unión o activación de la JAK2.

Como resultado de la activación de la JAK2, se fosforilan y activan, además de la propia JAK2 y el GHR, un gran número de proteínas responsables de la transformación de las señales bioquímicas en las respuestas biológicas de la GH (figura 3). Entre ellas se encuentran las

quinasas MAP (mitogen-activated protein kinase) denominadas ERKs 1 y 2; los sustratos del receptor de la insulina (IRS-1 y -2); la quinasa fosfatidilinositol 3' (PI 3'); la fosfolipasa A₂; la proteinquinasa C y los transductores de señales y activadores de transcripción STAT (signal transducers and activators of transcription factors) 1, 3 y 5¹.

La GH lleva a cabo sus acciones fisiológicas por medio de la regulación de la transcripción de los genes de varias proteínas, como son el transportador de glucosa GLUT1, el IGF-I, la subunidad ácido lábil del complejo de unión IGF-I/IGFBP-3, el receptor de las LDL, factores de transcripción (p.e. c-Fos, c-Jun, c-Myc), enzimas metabólicas (p.e. la lipasa sensible a las hormonas, el inhibidor de serinproteasa *spi* 2.1, algunas isoformas del citocromo P-450). Muchas de las señales y cascadas de fosforilación descritas anteriormente culminan en cambios en la expresión de estos genes en las células diana, entre ellas la fosforilación, vía JAK2 de las proteínas STAT citoplasmáticas que participan en la transmisión de la señal desde el receptor hasta el núcleo de la célula⁴⁰.

- **Isoformas del receptor de la GH**

En el hombre como en otras especies animales, además de la forma original completa del receptor de la GH descrita por Leung y cols¹⁷ se han descrito otras dos isoformas. Una de ellas se conoce como GHRd3, está codificada por un mRNA que deriva por corte y empalme alternativo ("alternative splicing") del pre-mRNA junto con la delección del exón 3 del gen que codifica el dominio extracelular del GHR. Esta isoforma inicialmente se identificó en la placenta⁴¹ y se creyó que era específica de tejido pero ahora se sabe que su expresión es más generalizada^{42,43}. La heterogeneidad de este exón proviene de un polimorfismo en el gen GHR, con retención diferencial en los dos alelos⁴⁴. La mayor parte de la población es heterocigota para este polimorfismo. Este GHRd3 se ha comprobado que es un receptor completamente funcional, capaz de unirse a la GH y de transmitir la señal, sin embargo, el significado fisiológico de esta isoforma del GHR todavía se desconoce⁴⁵. A partir de la escisión proteolítica de ambos receptores se obtienen dos isoformas de GHBP, que se diferencian en los 21 aminoácidos que codifica el exón 3. Una isoforma contiene el exón 3 y otra excluye el exón 3. La distribución de ambas isoformas en sangre periférica y su relevancia funcional por el momento se desconoce. Sin embargo, Kratzsch y cols⁴⁶ han demostrado en una publicación muy reciente que la regulación de ambas isoformas es distinta. La isoforma que retiene el exón 3 tiene una relación mayor con las diferentes medidas de grasa corporal (IMC, masa grasa y circunferencia abdominal) y los factores de riesgo metabólico de la obesidad (como insulina en ayuno, triglicéridos, ácido úrico, apolipoproteína B y presión sanguínea

diastólica). Para estos autores, estas diferencias indicarían que su significado funcional es distinto y por ello la capacidad de los ensayos para la determinación de las distintas isoformas de GHBP puede ser importante para el estudio del receptor de la GH y su forma soluble, la GHBP de alta afinidad.

La otra isoforma es una forma truncada del GHR (GHR-tr) que se ha aislado en varios tejidos humanos y de otras especies. Esta forma truncada carece de la mayor parte del dominio intracelular del GHR. La secuencia de nucleótidos del m-RNA que codifica este GHR-tr es idéntica a la del GHR completo, excepto en la delección de 26 pares de bases del exón 9 . Esta isoforma tiene una secuencia idéntica a la forma completa pero carece del 97,5% del dominio intracelular^{47,48,49}. Tanto la forma completa como la forma truncada del receptor muestran una afinidad de unión por la GH similar, se expresan en varios tejidos y pueden encontrarse una junto a otra, pero la forma truncada no puede transmitir la señal. El significado biológico de la existencia de esta isoforma está siendo materia de estudio.

Se ha demostrado que esta forma truncada (GHR-tr) tiene mayor capacidad para generar GHBP que la forma completa del GHR ^{47,50}. Recientemente, se ha demostrado que esta forma truncada puede modular la función de la forma completa del GHR, inhibiendo la transmisión de la señal. Fisker y cols ⁵¹ han demostrado en un grupo de pacientes con déficit de GH, que los cambios que acontecen en la composición corporal tras el tratamiento con GH podrían deberse a una

expresión diferencial de la forma truncada y completa del receptor en el tejido adiposo y músculo esquelético. Tras cuatro meses de tratamiento

con GH, observaron en el tejido adiposo subcutáneo, un aumento de la expresión del GHR-truncado mientras que la expresión de la forma completa no presentaba modificaciones. En el músculo esquelético se observaron cambios inversos a los anteriores. Al finalizar los cuatro meses de tratamiento, la composición corporal de estos pacientes cambió, reduciéndose la masa corporal grasa y las concentraciones de GHBP también disminuyeron significativamente. En resumen, el aumento de la expresión de la forma truncada del GHR en el tejido adiposo inhibiría la acción de la forma completa y por ello disminuye la acción de la GH en el tejido adiposo. En el tejido muscular se observa el fenómeno contrario. Estos hallazgos sugieren que la expresión diferencial de estas isoformas de GHR puede representar un papel significativo en la señal del GHR, separación del GHR y generación de la GHBP⁵².

1.2.2.2 Mecanismo de producción

La GHBP se puede generar por dos mecanismos distintos: separación proteolítica de la región extracelular del receptor ("shedding") o por corte y empalme alternativo del pre-RNA mensajero ("alternative splicing"). Este distinto mecanismo de origen podría tener importantes implicaciones en la regulación de la generación de GHBP. Así, mientras que en el procesamiento alternativo del mRNA, la GHBP se puede producir como un producto de secreción independiente, en el caso de la GHBP derivada por proteólisis, el GHR es un intermediario obligado⁵². Estos dos mecanismos pueden coexistir pero según las especies predomina uno de ellos.

En las ratas y ratones la GHBP se genera por el mecanismo de corte y empalme alternativo del pre-mRNA del receptor de la GH. En ellos se ha demostrado la presencia de dos mRNA: un mRNA de 4 kb que codifica la forma completa del receptor y un mRNA de 1,2 kb que codifica una forma truncada del receptor, en el que la región de transmembrana es sustituida por una secuencia corta de aminoácidos hidrofílica^{53,54}. Esta cola hidrofílica permite que la GHBP sea secretada en lugar de ser retenida en la membrana citoplasmática⁵⁵.

El mecanismo de ruptura proteolítica tiene como resultado la separación de la GHBP del GHR, con la consiguiente liberación de la GHBP al espacio extracelular ("shedding"). Aunque este mecanismo es utilizado por muchas especies animales, en el ser humano y el conejo, las dos especies donde mejor se ha estudiado, resulta ser la vía de producción dominante^{17,49,56}. Actualmente, la localización exacta donde tiene lugar esta separación no se conoce con certeza.

Recientemente, se ha identificado la enzima responsable de la separación del GHR y liberación de la GHBP, como la enzima convertidora del TNF- α (TACE, Tumor Necrosis Factor- α converting enzyme) un componente de la familia de las metaloproteasas zinc-dependiente^{57,58}. Esta metaloproteasa, localizada en la membrana plasmática, cataliza la liberación del TNF- α a partir de su precursor de transmembrana y parece ser que también estaría involucrada en la generación fisiológica de GHBP así como de otras proteínas de transporte de membrana^{59,60}. El residuo aminoácido concreto del GHR donde se realiza la escisión proteolítica todavía se desconoce. Se ha

especulado que la cisteína libre (Cys²⁴¹), proximal al dominio transmembrana del GHR podría ser importante en el proceso de escisión. Sin embargo, los experimentos con formas mutantes de GHR en los que esta cisteína se ha sustituido por una alanina han demostrado que la generación de GHBP no se ve afectada por la ausencia de esta cisteína⁶¹. Conte y cols han demostrado que la delección de tres residuos localizados cerca del dominio transmembrana impide la liberación de GHBP sin modificar la unión de la GH al receptor, identificando de este modo una región crítica para la proteólisis del GHR⁶². La comparación de las secuencias de GHR en las especies en que utilizan el mecanismo de ruptura proteolítica de forma dominante (ej. conejos, hombre) respecto a aquellos en los que no existe separación (ej. ratas) tampoco ha desvelado la clave de porqué existen diferentes tendencias proteolíticas^{47,56}.

1.2.2.3 Distribución tisular de los receptores de GH

La distribución tisular de los receptores de GH en el hombre se ha estudiado mediante técnicas inmunocitoquímicas y mediante técnicas de hibridación *in situ* para investigar la localización celular del mRNA del GHR. Se ha demostrado la expresión del gen del GHR en hígado, músculo esquelético, riñón, miocardio, piel, timo, tejido adiposo, tracto gastrointestinal, placenta, testículo, ovario y glándula mamaria^{63,64,65,66}. El hígado es el órgano que expresa la mayor concentración de receptores de GH, seguido aunque en concentraciones mucho más bajas del músculo, riñón, epidermis y corazón⁶⁵. La expresión del GHR es ubicua pero cuantitativamente poco definida, por ello las fuentes y/o contribución de los diferentes tejidos a la producción de GHBP no se conoce con detalle. En el caso de la producción de GHBP a través de separación proteolítica, además de la expresión del GHR, es necesaria la expresión de la enzima TACE, la proteasa involucrada en la separación del GHR y liberación de la GHBP, esta enzima tiene una amplia expresión y se ha demostrado su presencia en el hígado⁵⁹.

En los roedores la identificación de los tejidos productores de GHBP es posible, pues en ellos la GHBP deriva de un mRNA distinto al del receptor y puede ser reconocida inmunológicamente de forma específica gracias a su porción hidrofílica. Sin embargo, aunque se han identificado los tejidos donde se expresa GHBP, su contribución relativa al total de GHBP del organismo se desconoce pues incluso en los roedores los aspectos cuantitativos de producción y secreción se desconocen en gran medida.

Respecto a la distribución de la GHBP una vez liberada al torrente circulatorio, además de en el suero, se ha determinado en otros fluidos biológicos como son orina⁶⁷, linfa⁶⁸, líquido amniótico⁶⁹, líquido folicular⁷⁰ y leche⁷¹. En la mayoría de estos fluidos la GHBP no sólo deriva de la GHBP sérica, sino que en parte es producida localmente. La GHBP también está presente dentro de las células e incluso en el núcleo¹¹ pero el significado funcional de esta GHBP intracelular es completamente desconocido.

1.2.3 Funciones de la GHBP

La función principal y obvia de la GHBP *in vivo* es la formación de complejos con la GH circulante. *In vivo*, la GHBP puede unir una gran proporción de la GH circulante. Las concentraciones plasmáticas de GHBP no varían mucho a lo largo del día. Se cree que una de las funciones de la GHBP sería formar complejos GH:GHBP que actuarían de reservorio, amortiguando las fluctuaciones en la concentración de GH secundarias a la marcada pulsatilidad de su secreción. A los pocos minutos de un pulso de secreción, se alcanza la máxima unión. En situaciones de equilibrio, un 40-50 % de la GH circulante se une a la GHBP de alta afinidad^{13, 72, 73} y otro 5-8% a la GHBP de baja afinidad¹⁸; la proporción de la hormona que se une puede ser inferior cuando las concentraciones de GH son superiores a 10-15 ng/mL, debido a la saturación de la GHBP⁷². Después de un pulso de GH, la fracción unida puede ser superior (70-80%). Veldhuis y cols³⁰, mediante un modelo matemático y estimulación computerizada de la dinámica de la GH, han

publicado que el porcentaje de GH unida puede variar rápidamente entre 10% y 80%, dependiendo de la concentración de GH existente.

La GH unida a la GHBP tiene *in vivo* una cinética distinta de la GH libre. Baumann y cols han demostrado que si se inyectan los complejos covalentes GH-GHBP a ratas, éstos son aclarados de la sangre y degradados a una velocidad diez veces más lenta que la GH libre⁷⁴. Cuando se une a la GHBP, la GH se protege de la degradación, siendo la vida media de la hormona libre más corta que la de la hormona unida. En virtud de su tamaño molecular, la GH unida es aclarada más lentamente de la circulación, por lo tanto la GHBP previene el acceso de la GH a los lugares de degradación, incluyendo la filtración glomerular y la endocitosis mediada por receptor en las células dianas. La vida media de la GH total (unida a la GHBP y libre) es aproximadamente de 20 minutos, mientras que la vida media de la GH libre es de sólo 3-7 minutos³⁰. Por todo ello, la presencia de GHBP puede tener como consecuencia la prolongación de la bioactividad de la GH y así aumentar la acción de la GH⁷⁵.

La segunda consecuencia de la formación de complejos con la GH es la modulación de la acción de la GH a nivel celular. Se ha especulado que en los tejidos, la GHBP puede bloquear la acción de la hormona compitiendo con la unión de la GH al receptor y regulando su acceso a los receptores de membrana. En estudios *in vitro* se han demostrado algunos efectos inhibitorios de forma dosis-dependiente^{76,77}. Esto ocurre a concentraciones fisiológicas de GHBP y parece que la GHBP pudiera modular la acción de la GH a través de este mecanismo. Sin embargo, la

transferencia de la GH desde la GHBP al receptor está asegurada pues tanto la afinidad de unión como la concentración local son superiores para el receptor de la GH que para la GHBP.

A pesar de que *in vitro* se ha observado este efecto de inhibición sobre la acción de la GH, Clarck y cols⁷⁵ en estudios *in vivo*, en ratas, han mostrado que la GH preincubada con GHBP recombinante antes de ser inyectada produce un efecto mayor que la hormona sola en la estimulación del crecimiento y en el aumento de peso así como en las concentraciones de IGF-I, presumiblemente por su efecto sobre la vida media de la GH. Sin embargo, Tzanela y cols no consiguen demostrar este efecto⁷⁸.

En resumen, de las dos posibles influencias opuestas de la GHBP sobre la acción de la GH, inhibición de la unión al receptor y prolongación de la biodisponibilidad, parecen ser que este último es el efecto dominante *in vivo*.

Otros autores han demostrado que la GHBP, por sí misma, también podría tener un papel en la regulación de la transcripción del gen del GHR. Mullis y cols^{79,80}, añadiendo distintas concentraciones de GHBP a líneas celulares que expresan el GHR, han demostrado que la GHBP a concentraciones bajas aumenta la transcripción del gen del GHR, pero a medida que aumenta su concentración disminuye la expresión del gen.

Jorgensen y cols⁸¹ han especulado que las concentraciones de GHBP/GHR pueden influir en el balance o reparto entre las acciones

directas, y las acciones indirectas de la GH. Así, aquellos estados en los que las concentraciones de GHBP/GHR se hallan disminuidas, como por ejemplo en la desnutrición, las concentraciones de IGF-I también disminuyen mientras que las de GH aumentan, al disminuir el retrocontrol negativo que ejerce el IGF-I sobre su secreción. Lo contrario se observaría en los estados en los que la GHBP se encontrara aumentada.

El efecto integrado *in vivo* de estas acciones moduladoras de la GHBP sobre la acción de la GH es difícil de predecir pues algunas tienden a aumentar la acción de la GH y otras a disminuirla. Esta complejidad es todavía mayor si se tienen en cuenta la intrincada relación entre GHBP y GHR, pues es muy difícil manipular cualquiera de ellos, GHR o GHBP, sin afectar al otro miembro del par GHR/GHBP⁵⁵.

Todo ello hace pensar que la GHBP más que un receptor soluble que transporta pasivamente la GH, es un componente activo que representa un papel importante en la regulación del eje GH-IGF-I.

1.2.4 Regulación de la expresión y concentración de la GHBP

Las concentraciones séricas de GHBP están sometida a un complejo control multifactorial, similar al del GHR^{82, 83}. El mecanismo de generación de GHBP a partir del receptor, según se ha descrito anteriormente, difiere de unas especies a otras y por lo tanto no siempre es posible extrapolar los resultados obtenidos sobre el control de la generación de GHBP en otras especies distintas del hombre. Además, es posible que las concentraciones séricas de GHBP en el hombre dependan no sólo de la expresión del gen que codifica el receptor de la GHR, sino que también pueden depender de la expresión del gen que codifica la enzima TACE, responsable de la separación proteolítica del receptor en la membrana celular^{84,85}.

Se sabe que existe una regulación de la GHBP de alta afinidad ontogénica, nutricional y hormonal. Los principales factores reguladores son los dos primeros: el estado de desarrollo del individuo y la nutrición. El efecto que sobre la expresión del GHR tienen estos dos factores es similar en las distintas especies mientras que el efecto de los factores hormonales varía según la especie.

1.2.4.1 Ontogenia

Las concentraciones séricas de GHBP son muy bajas en el feto y en el neonato, incrementan rápidamente durante el primer y segundo año de vida y más gradualmente durante la infancia y adolescencia temprana⁸⁶.

⁸⁷. Durante la adolescencia tardía las concentraciones se estabilizan, alcanzándose las concentraciones que se encuentran en el adulto. El aumento postnatal en las concentraciones de GHBP coincide con el desarrollo de la sensibilidad a la GH ⁸⁸.

En la edad adulta, las concentraciones permanecen relativamente constantes hasta los 60 años y después disminuyen progresivamente^{89,90}. Existen importantes variaciones de un individuo a otro tanto en adultos como en niños^{13,18,91,92}. Respecto a los cambios diurnos de GHBP, a excepción de un estudio ⁹³, no se han encontrado variaciones en las concentraciones de GHBP a lo largo del día^{94, 95}. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que las concentraciones de GHBP están sometidas a variaciones intraindividuales a lo largo del año ^{96, 97}. Según Gelandar y cols⁹⁷ existe una pequeña variación estacional, encontrándose concentraciones más elevadas de GHBP durante el invierno.

2.4.2 Nutrición

El estado nutricional del individuo es el principal regulador de las concentraciones de GHBP de alta afinidad^{27,98, 99, 100, 101, 102, 103,104}. Durante la edad adulta, la variación interindividual de las concentraciones de GHBP está en función básicamente de su estado nutricional. Existe una relación directa entre GHBP y las distintas medidas de grasa corporal (índice de masa corporal (IMC), grasa subcutánea, grasa visceral) incluso en sujetos con normopeso, siendo la adiposidad abdominal el parámetro que presenta la mayor correlación

^{27,105}. En los estados de desnutrición, las concentraciones de GHBP están disminuidas ^{98,99,100}, mientras que en la obesidad, los valores de GHBP están aumentados ^{100,101,102,103}. La baja concentración de GHBP/expresión del GHR se ha sugerido que puede ser una de las causas de la falta de sensibilidad a la acción de la GH observada en los estados de desnutrición a pesar de que cursan con concentraciones elevadas de GH. Por el contrario, en el niño obeso, el aumento en la expresión del GHBP/GHR se asocia con concentraciones elevadas de IGF-I y explica la mayor velocidad de crecimiento observada a pesar de las bajas concentraciones de GH. Hasta el momento, se desconoce el factor nutricional responsable de los cambios en las concentraciones de GHBP/GHR así como el significado biológico de los cambios adaptativos del eje GH-IGF-I relacionados con la nutrición.

1.2.4.3 Hormonas

En la literatura, existen datos contradictorios respecto al papel que ejerce la GH sobre su proteína transportadora. Esto se debe a las diferencias significativas que existen en la fisiología del eje GH-IGF-I entre las distintas especies, a las discrepancias entre las concentraciones o dosis de GH fisiológicas o farmacológicas así como a las variaciones según el modo de administración.

En individuos normales se ha encontrado una relación inversa entre las concentraciones de GHBP y la secreción de GH tanto estimulada como espontánea ^{104,105}, así como con la excreción urinaria de GH⁹⁷. Sin embargo, esta relación no se mantiene en los estados patológicos en

que existe una alteración de la secreción de GH. En estudios realizados en niños o adultos con déficit de GH se han encontrado tanto niveles normales^{106,107,108} como disminuidos^{109,110,111} e incluso aumentados^{112,113} de GHBP que no se modificaban¹⁰⁷ o que aumentaban^{109,114,115} durante el tratamiento con GH. Asimismo, en pacientes con acromegalia, algunos autores han encontrado concentraciones disminuidas de GHBP^{116,117,118,119} mientras que otros no han encontrado diferencias respecto a individuos normales^{89,120,121}.

Es difícil diferenciar los efectos directos de la GH sobre las concentraciones de GHBP de aquellas inducidas secundariamente (p.e los cambios que induce la GH en la adiposidad, que a su vez también influye sobre las concentraciones de GHBP). Analizando todos estos datos conjuntamente, estas discrepancias sugieren que en el hombre el estado de la secreción de GH no es un regulador predominante de las concentraciones de GHBP.

Algunos autores han observado que las concentraciones de GHBP son ligeramente superiores en las mujeres respecto a los hombres pero estas diferencias no son significativas^{13,92,122}. La relación entre las hormonas sexuales y las concentraciones séricas de GHBP es compleja y sobre ella también se han publicado resultados contradictorios. Durante la pubertad normal, en algunos estudios se ha encontrado que la GHBP no se modifica^{96,123} mientras que en otro la GHBP disminuye¹²⁴.

En niñas con pubertad precoz, las concentraciones de GHBP se han encontrado normales¹²⁵ o aumentadas¹²². Por el contrario, en niños con

pubertad precoz la GHBP inicialmente disminuida, aumenta cuando las concentraciones de testosterona disminuyen al ser tratados con LHRH (lutein hormone releasing hormone)¹⁰⁹. De forma similar a lo que sucede en los niños, el tratamiento de niñas con pubertad precoz con un análogo de la GnRH (gonadotrophin releasing hormone) produce un incremento de las concentraciones de GHBP^{122,126}.

En niños con pubertad retrasada se han encontrado niveles normales de GHBP que disminuyen significativamente cuando son tratados con testosterona¹⁰⁹. En hombres con hipogonadismo, con o sin déficit de GH se han encontrado niveles normales de GHBP que disminuyen con el tratamiento con testosterona¹²⁷. Estos datos muestran claramente que el tratamiento con testosterona disminuye las concentraciones de GHBP⁸⁴.

Los estrógenos tienen un efecto más complejo sobre la GHBP. Diferentes autores han demostrado una relación inversa entre GHBP y estrógenos endógenos en distintos grupos de pacientes: Massa y cols¹²⁸ en un grupo de mujeres premenopáusicas, mientras que Juul y cols¹²² lo hacen en un grupo de niñas con pubertad precoz. Por el contrario, Bondanelli y cols obtienen una relación positiva entre GHBP y estrógenos endógenos en un grupo de mujeres premenopáusicas¹²⁹.

La administración exógena de esteroides sexuales puede modificar la concentración de GHBP, probablemente debido a que las dosis y vías de administración son distintas de las que suceden fisiológicamente. En diferentes estudios se ha comprobado que la administración oral de estrógenos produce un aumento de las concentraciones de

GHBP^{130,131,132} mientras que la administración transdérmica no las modifica¹³⁰, sugiriendo que al igual que otros efectos hepáticos mediados por los estrógenos, el tratamiento oral induce la síntesis hepática de GHBP a través de un efecto de primer paso.

Finalmente, a diferencia de lo que ocurre en otras especies animales en que existe un gran aumento de la GHBP durante el embarazo¹³³, en el ser humano no se han encontrado diferencias en las concentraciones de GHBP entre mujeres embarazadas y no embarazadas^{18,29,130}. Sin embargo, durante la primera mitad del embarazo las concentraciones de GHBP aumentan ligeramente para disminuir después¹³⁰.

En el hombre, se ha demostrado que existe una relación positiva entre GHBP y las hormonas tiroideas. Las concentraciones séricas de GHBP están disminuidas en pacientes con hipotiroidismo y aumentadas en pacientes con hipertiroidismo^{134, 135}. Asimismo, en un estudio reciente se ha demostrado que la triiodotironina (T₃) estimula la transcripción del gen GHR/GHBP¹³⁶.

Finalmente, se ha demostrado que la insulina tiene un papel importante en la regulación de la expresión de GHBP. La insulinopenia de la diabetes mellitus tipo I se asocia a concentraciones bajas de GHBP y el grado de insulinización de estos pacientes correlaciona positivamente con las concentraciones de GHBP^{137,138,139}. Por otro lado en pacientes obesos con diabetes mellitus tipo II también se ha demostrado una fuerte relación entre las concentraciones de insulina y las de GHBP¹⁴⁰. Recientemente se ha demostrado que la actividad GHBP plasmática está

influida tanto por la secreción como por la sensibilidad a la insulina^{141,142} manteniendo con esta última una relación negativa.

1.2.5 Implicaciones fisiopatológicas y clínicas: la GHBP como marcador del grado de sensibilidad a la acción de la GH.

La GHBP es el primer marcador disponible, de fácil acceso, que informa del estado de los receptores tisulares de GH. Su determinación junto con la de los otros parámetros del eje GH-IGF-I constituye una herramienta valiosa en la investigación de las alteraciones de dichos receptores y proporciona información acerca de la sensibilidad de los mismos a la acción de la GH. En general, las concentraciones de GHBP se encontrarán aumentadas o disminuidas en aquellos estados en que exista un aumento o una disminución de la sensibilidad a la acción de la GH, respectivamente.

1.2.5.1 Estados de resistencia a la acción de la GH

La insensibilidad o resistencia a la acción de la GH, es un estado fisiopatológico caracterizado por la incapacidad de la GH para llevar a cabo sus acciones biológicas. En este síndrome existe una alteración en la relación fisiológica entre la secreción de GH, la síntesis de IGF-I y las acciones biológicas de la GH. La sensibilidad de los tejidos a la GH endógena es un factor importante en la regulación del crecimiento lineal y dependiendo de la duración de este estado de resistencia a la acción

de la GH, se puede observar un retraso de crecimiento. Este estado de resistencia a la acción de la GH puede ser debido a un defecto congénito o puede ser adquirido, secundario a diferentes estados clínicos.

Los diferentes estados de resistencia a la GH han sido clasificados recientemente por Laron y cols ^{143, 144}. En esta clasificación, el término “síndromes de insensibilidad a la GH” se refiere a los síndromes primarios o congénitos en los que la insensibilidad a la GH, es el proceso patológico principal. El déficit del receptor de la GH o síndrome de Laron, es la forma más intensa de insensibilidad congénita a la GH. Por otro lado, existen estados de insensibilidad a la GH que son secundarios a diferentes condiciones adquiridas.

1.2.5.1.1 Estados congénitos de resistencia a la GH

La forma de presentación de los síndromes de insensibilidad a la GH es heterogénea. Dentro de este grupo pueden presentarse diferentes alteraciones. En primer lugar, pueden ser debidos a un defecto primario del GHR que afecte su capacidad de unirse a la GH y/o de iniciar el mecanismo de transmisión de la señal. De forma alternativa, pueden también existir defectos a nivel post-receptor en la transmisión de la señal intracelular o pueden ser defectos de la síntesis de IGF-I ^{143,144}.

1.2.5.1.1.1 Síndrome de Laron

Es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva caracterizada por una resistencia completa a la acción de la GH. Clínicamente, estos pacientes presentan un retraso de crecimiento muy severo, obesidad, mandíbulas pequeñas, frente prominente, escleróticas azules, manos y pies desproporcionadamente pequeños, microfalus y alteraciones del cabello y de la dentición. En un 30-50% de los casos presentan hipoglicemias.

Desde el punto de vista bioquímico, a diferencia del déficit de GH, estos pacientes presentan una secreción basal y estimulada de GH normal o aumentada y concentraciones plasmáticas de IGF-I e IGFBP-3 muy disminuidas que no aumentan tras el tratamiento con GH.

Este síndrome fue descrito por primera vez por Laron en tres hermanos de origen israelí¹⁴⁵ y está causado por alteraciones del gen que codifica el receptor de la GH. Como resultado, los niveles de GHR pueden estar ausentes, ser muy bajos o ser disfuncionales. Aunque originalmente se describieron en Israel, en familias judías de antepasados sefardíes o árabes, también se han descrito casos de enanismo tipo Laron en otros países del Medio Este, Europa, Asia, Sudamérica y Norteamérica. Los estudios realizados hasta el momento se han centrado en tres cohortes: una de pacientes procedentes de Israel, principalmente judíos orientales¹⁴⁶, otra de dos provincias vecinas en Ecuador¹⁴⁷ y una tercera formada por pacientes procedentes de varios países principalmente europeos^{148, 149}.

Desde que en 1989 se demostró por primera vez que el síndrome de Laron era debido a defectos moleculares en el gen que codifica el GHR^{150,151}, se han identificado cerca de 30 alteraciones distintas y dependiendo de la localización de la mutación, la función o producción de GHBP puede estar o no estar alterada. La mayoría de ellas (~77%) se localizan en la región extracelular del GHR y los sujetos afectados tienen concentraciones muy bajas o indetectables de GHBP de alta afinidad, mientras que la GHBP de baja afinidad permanece inalterada (también se denomina síndrome de Laron GHBP-negativos)¹⁴⁸. Un 20-25 % de los casos presentan mutaciones en regiones del receptor que afectan otras funciones del mismo distintas a la de unión a la GH (dimerización, señal intracelular, etc.) que se sitúan en los dominios transmembrana o citoplasmático, dando lugar a fenotipos tipo Laron con GHBP detectable (denominados síndrome de Laron GHBP-positivos)^{148,152,153}.

Algunas de estas mutaciones son particularmente interesantes pues afectan específicamente la generación de GHBP. Las mutaciones que dan lugar a la eliminación del exón 8^{154, 155} o del exón 9^{156,157} se traducen en la presencia de un dominio intracelular muy truncado, con sólo tres o siete residuos intracelulares, respectivamente y adicionalmente en el caso de eliminación del exón 8, ausencia del dominio de transmembrana. En este último caso, la pérdida de la hélice hidrofóbica de transmembrana da lugar a un GHR soluble mutante (o GHBP) que es liberado al espacio extracelular. En la mutación que da lugar a la eliminación del exón 9, el GHR truncado es idéntico a la isoforma de GHR truncado que se obtiene de forma natural y se sabe

que genera una gran cantidad de GHBP⁵⁰, por ello en estos pacientes las concentraciones de GHBP son anormalmente altas pues también la producción de GHBP está aumentada. Los pacientes que presentan la mutación de eliminación del exón 8, tienen concentraciones de GHBP del orden de 20 a 50 veces más altas de lo normal (incluso en estados heterocigotos)^{154,155}. Los pacientes afectados por la mutación del exón 9 (heterocigotos) tienen concentraciones de GHBP altas, del orden de 2 a 10 veces los valores normales^{156,157}. Esta mutación no se ha descrito en estado homocigoto. El estudio de estas mutaciones ha ayudado a la comprensión de la función y biología de la GHBP destacando los siguientes hechos⁵⁵:

- a) En ausencia del dominio intracelular del GHR, la GHBP es incapaz de promover la acción de la GH, incluso cuando está presente en grandes cantidades.
- b) Incluso una ligera sobreexpresión relativa de la forma truncada del receptor GHR-tr (delección del exón 9) muestra un efecto dominante negativo sobre la transmisión de la señal del GHR y la acción de la GH. Este GHR-tr carece del dominio necesario para la internalización y forma heterodímeros con el GHR-completo, inhibiendo la señal y produciendo gran cantidad de GHBP.
- c) Los pacientes con la mutación del exón 8 (dominio de transmembrana) no presentan este efecto negativo a pesar de tener cantidades mayores de GHBP circulantes que los pacientes con mutaciones en el exón 9. La razón de esta discrepancia se desconoce

pues ambos receptores truncados carecen del dominio intracelular y debería esperarse que en ambos casos se formaran heterodímeros no productivos con los GHR normales.

- d) La insensibilidad a la acción de la GH es menos intensa en los pacientes con Síndrome de Laron GHBP-positivos que en los GHBP-negativos. Las razones de estas diferencias también se desconocen.

1.2.5.1.1.2 Pigmeos

En algunas poblaciones que tienen una talla particularmente baja se ha demostrado la existencia de una forma parcial de resistencia a la GH¹⁵⁸. Entre ellas se encuentran los pigmeos africanos considerados la población con la talla más baja del mundo (talla del adulto 132-146 cm). Esta población posee unas concentraciones de GHBP un 50% más bajas que los observados en otras poblaciones africanas o norteamericanas de estatura normal. Presentan una secreción endógena de GH es normal junto con niveles de IGF-I bajos, así como una respuesta al tratamiento con GH exógena ausente o disminuida^{159,160}. Otras poblaciones geográficamente aisladas con talla baja y concentraciones de GHBP similares a las observadas en los pigmeos africanos, se ha identificado en Papua-Nueva Guinea (población de las Montaña OK)¹⁶¹ y en Filipinas^{162,163}. En la primera de ellas las concentraciones de IGF-I son normales, mientras que en los pigmeos filipinos las concentraciones de IGF-I son bajas al igual que en los africanos.

1.2.5.1.1.3 Niños con talla baja idiopática

Se ha descrito que algunos niños con talla baja idiopática presentan alteraciones en la sensibilidad a la GH debido a alteraciones menores del gen del GHR¹⁶⁴ (polimorfismos o mutaciones leves) que se asocian con concentraciones plasmáticas de GHBP disminuidas. En algunos de estos pacientes, las concentraciones de IGF-I también están disminuidas y la secreción de GH aumentada. Por lo tanto parece posible identificar una población de niños con retraso de crecimiento idiopático que presenten características bioquímicas de síndrome de insensibilidad a la GH, aunque sea sólo parcial^{165,166,167,168}. En los individuos afectados de insensibilidad parcial a la GH se pueden encontrar las características clínicas y biológicas del déficit de IGF-I, sin déficit de GH, y ausencia de los rasgos dismórficos característicos del síndrome de Laron¹⁶⁹. Por lo tanto, en la investigación de un niño con talla baja idiopática, una vez descartada la insuficiencia de GH, se ha sugerido que debería incluirse el estudio de la sensibilidad a la GH, analizando los parámetros más relevantes, principalmente IGF-I, IGFBP-3 y GHBP, como posibles indicadores de una alteración de la sensibilidad a la GH¹⁷⁰.

1.2.5.1.2 Estados adquiridos de resistencia a la GH

Existe un gran número de condiciones clínicas que se asocian con una resistencia a la acción a la GH. Entre ellas se encuentran los estados de malnutrición crónica (anorexia nerviosa, enfermedad celíaca, marasmo, Kwashiorkor)^{99,100,101,} , diabetes mellitus insulino-dependiente^{137,138,139,} enfermedades críticas^{171,172,} cirrosis hepática^{18,173,174,175,} insuficiencia renal^{18,176,} ¹⁷⁷ hipotiroidismo^{134,135} y síndrome de inmunodeficiencia adquirida¹⁷⁸ . El perfil bioquímico hallado en estas enfermedades es similar al encontrado en el síndrome de Laron: una disminución de las concentraciones séricas de GHBP junto con una disminución de las concentraciones de IGF-I, de IGFBP-3 y un aumento de la secreción de GH. La mayoría de estos estados de resistencia a la GH secundarios tienen en común una malnutrición proteico-calórica asociada con frecuencia a un incremento del catabolismo proteico. En los estados catabólicos coexisten muchos procesos patológicos, entre los cuales se ha postulado que las alteraciones de la nutrición que se observan en estos pacientes junto con la presencia factores circulantes como las citoquinas serían los responsables de la resistencia a la acción de las GH^{179,180} . Por lo tanto, en los estados de resistencia a la acción de la GH secundarios, no existiría un defecto estructural del receptor sino que su concentración se encontraría disminuida obedeciendo a un mecanismo fisiológico adaptativo de eje GH: IGF-I a estas patologías.

En este sentido, se ha estudiado la expresión del GHR y el GHR-tr en pacientes con cirrosis hepática¹⁷⁴ . En el hígado cirrótico, la expresión de

ambos GHR y GHR-tr está disminuida; sin embargo, hay una reducción proporcionalmente mayor de la expresión del GHR-tr. Esta expresión disminuida de la forma truncada puede ser un mecanismo de compensación para facilitar la señal de la GH y también explicaría las concentraciones bajas de GHBP encontradas en la cirrosis hepática.

1.2.5.2 Estados de hipersensibilidad a la acción de la GH

La obesidad es la única condición que se ha asociado claramente con un aumento de las concentraciones de GHBP de alta afinidad¹⁸¹. Por otro lado, si los cambios en las concentraciones circulantes de GHBP reflejan los cambios en los niveles de receptor de GH en los tejidos diana, este incremento puede sugerir una mayor sensibilidad de estos tejidos a la acción a la GH en los sujetos obesos. Esto podría explicar el hecho de que en los pacientes obesos, las concentraciones de IGF-I e IGFBP-3 son normales e incluso altas a pesar de que la secreción de GH está disminuida.

Como se ha descrito previamente, en los estados de malnutrición sucede lo contrario, observándose una resistencia a la acción de la GH. Por lo tanto malnutrición y obesidad representan dos extremos opuestos de la amplia relación que existe entre nutrición y el eje GH: IGF-I¹⁸².

1.2.6 Métodos para la determinación de GHBP

Por el momento, la determinación de la concentración plasmática de GHBP no se realiza de forma rutinaria y todavía constituye una herramienta de investigación. La única indicación clínica bien establecida es el síndrome de Laron, en el cual la concentración de GHBP es muy baja o indetectable en la mayoría de los casos. Desde que en 1986 se descubrió la existencia de la proteína transportadora de la hormona de crecimiento de alta afinidad, se han descrito varios métodos para determinar esta proteína en suero que se pueden clasificar en dos grandes grupos^{88,183}. Aquellos que miden la capacidad funcional de unión de la GHBP o ensayos de unión y aquellos que miden la GHBP inmunorreactiva.

- **Métodos de unión**

Los ensayos de unión no miden las concentraciones de GHBP sino que miden la actividad GHBP en suero o la capacidad de unión a la GH, la mayor parte de la cual se atribuye a la GHBP de alta afinidad. En estos métodos existe un primer paso común en el que se incuba el suero del paciente con una cierta cantidad de GH-I¹²⁵ durante el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de la unión; diferenciándose entre ellos en el método de separación de la fracción de GH-I¹²⁵ libre de la fracción de GH-I¹²⁵ unida a la GHBP. En estas condiciones, la mayoría de GH-I¹²⁵ unida es directamente proporcional a la concentración plasmática de GHBP y el porcentaje

de GH-I¹²⁵ unida representa la actividad GHBP. La unión de la GH-I¹²⁵ con la GHBP puede verse afectada por la GH endógena presente en la muestra, ya que competirá con la GH-I¹²⁵ por los lugares de unión a la proteína. Como resultado de esta interferencia los valores de GHBP se encontraran falsamente disminuidos. En diferentes estudios publicados, la saturación parcial de la GHBP se vuelve significativa a concentraciones de GH endógena entre 5 y 10 ng /mL, pero debe valorarse en cada método para poder realizar las correcciones apropiadas.

Se puede realizar un análisis de saturación, determinándose el efecto que tienen concentraciones crecientes de GH no marcada radioactivamente sobre la unión de la GH- I¹²⁵ a la GHBP en una misma muestra. Esto permite además una medida directa de la afinidad y la capacidad de unión máxima mediante análisis Scatchard o procedimientos similares⁸⁸.

La separación de la GH-I¹²⁵ unida a la GHBP de la GH-I¹²⁵ libre se puede efectuar de distintas formas: a) la cromatografía clásica de filtración en gel utiliza columnas de diferentes dimensiones y composiciones ^{2,3,27} para conseguir la separación de estas fracciones libre y unida según su distinto peso molecular; variantes más recientes de ésta son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)¹³ y la cromatografía líquida de separación rápida (FPLC)¹⁸⁴ que se basan en el mismo principio analítico acortando el tiempo de análisis; b) cromatografía de intercambio iónico¹⁸⁵; c) adsorción de la GH-I¹²⁵ libre a la GHBP a partículas de carbón dextrano²⁹, y d)

inmunoprecipitación de la GH-I¹²⁵ unida a la GHBP con anticuerpos anti-receptor y PEG^{28,120}.

Además de diferenciarse en su practicabilidad, estos métodos se diferencian en su capacidad de separar la GHBP de alta afinidad de la de baja afinidad. Por ejemplo el uso de columnas cortas⁸⁸ en cromatografía o la adsorción con carbón dextrano no permite realizar dicha separación²⁹, sino que miden la capacidad de unión total (GHBP de alta y baja afinidad).

- **Métodos inmunorreactivos**

El segundo grupo de métodos serían aquellos en los que se determina la GHBP inmunorreactiva. Entre ellos se encuentran unos métodos situados a medio camino entre los ensayos de unión y los ensayos independientes de la unión a la GH. El más utilizado de ellos se conoce como LIFA (ligand-mediated immunofunctional assay), es un ELISA ,de tipo sandwich, con reconocimiento doble de la GHBP mediante un anticuerpo anti-receptor (Mab263) unido a una fase sólida y un anticuerpo anti-GH marcado como método de detección de los complejos GHBP:GH¹⁸⁶. Otro ensayo similar es de fase líquida y utiliza la inmunoprecipitación de los complejos GHBP:GH formados¹²¹. Recientemente se ha descrito un fluoroinmunoanálisis de tiempo retardado para determinar GHBP total y funcional basado en un inmunoensayo comercial para GH, el GH-DELFA (Wallac Yo, Turku, Finlandia)¹⁸⁷.

Finalmente, se ha descrito un radioinmunoensayo que utiliza GHBP recombinante como marcador. Este RIA mide la GHBP inmunorreactiva independientemente de su unión a la GH¹¹⁶. Sólo este tipo de método es capaz de reconocer las GHBP disfuncionales (p. e. aquellas que derivan de las formas truncadas del GHR que tienen el sitio de unión alterado).

En general, con estos métodos se obtienen resultados paralelos pero sólo en pocos casos se han comparado de forma directa^{89,120,121,132,183,187}. Sin embargo, los distintos métodos de determinación muestran una gran variedad de rangos de normalidad y las comparaciones entre los distintos laboratorios son difíciles. Estos resultados dependen del diseño del ensayo, y en el caso de los ensayos inmunofuncionales también dependen de las características de unión, p.e especificidad del epítipo y afinidad del anticuerpo empleado, así como del tipo de calibrador empleado. Por razones desconocidas con un ensayo inmunofuncional se han obtenido valores mucho más bajos que con otros ensayos¹⁸⁶.

Por ultimo, destacar, que recientemente se ha descrito un RIA que permite medir específicamente la isoforma de GHBP que retiene el exón 3¹⁸⁸.