

ARTICULO ORIGINAL

Identificación de las principales proteínas de unión a IGF (IGFBP) en tejidos de rata normal

Elizabeth Rico, María Teresa Ochoa, Myriam Sánchez de Gómez

Resumen

En este trabajo se investigó la presencia de las principales proteínas de unión a IGF-I en tejidos de rata y el tamaño de los complejos formados en cada caso. Mediante análisis de *Western ligand blot* (WLB) y cromatografía de exclusión molecular, se separaron e identificaron cuatro proteínas de unión, correspondientes a las IGFBP-1 a IGFBP-4. En todos los tejidos analizados, se detectó la proteína IGFBP-3, aunque su concentración varió con el tipo de órgano, siendo muy abundante en hígado, riñón y corazón y escasa en órganos linfoides (timo y bazo). IGFBP-1 e IGFBP-2 se identificaron en hígado y pulmón y, además, en corazón y músculo esquelético, órganos donde hasta el momento no se han identificado los correspondientes mRNA, como tampoco IGFBP-4, identificada en este trabajo en pulmón. En conclusión, los resultados obtenidos indican un perfil típico para las IGFBP de acuerdo con el tejido, aunque no es claro aún si su presencia es el resultado de su síntesis *in situ* o de un transporte transcapilar. La identificación de sus mensajeros es un paso esencial para comprender el papel regulador que estas proteínas desempeñan en la biodisponibilidad del IGF-I en los diferentes tejidos.

Palabras clave: IGF, proteínas de unión, WLB.

Identification of the main IGF binding proteins (IGFBPs) in normal rat tissues

Abstract

We investigated the presence of the main IGF-I binding proteins in rat tissues and the size of the complexes formed in each case. WLB and gel filtration chromatography were used to separate and identify four binding proteins: IGFBP-1 to IGFBP-4. In all the tissues studied, the presence of IGFBP-3 was detected, although its concentration seemed to change in each case, being most abundant in liver, kidney and heart, and less in lymphoid organs (spleen and thymus). IGFBP-1 and IGFBP-2 were found in liver and lung and also in heart and skeletal muscle, where their messenger RNAs, had not been previously reported, as is the case of the presence of IGFBP-4, identified in lung in the present study. In conclusion, our results show a typical profile for the IGFBPs, depending on the tissue, although it is not clear yet if they are the result of *in situ* synthesis or transcapillary transport. A better knowledge of their expression will give insight into their regulatory role on the IGF-I bioavailability in the different tissues.

Key words: IGF, binding proteins, WLB.

Laboratorio de Hormonas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido, junio 4 de 1999; aceptado, septiembre 27 de 1999

Introducción

El IGF-I (*insulin-like growth factor*) es un péptido mitogénico, regulador importante de la división y diferenciación celular (1), mediador de las acciones de la hormona de crecimiento (GH) en gran variedad de tejidos, y que ha sido empleado como indicador del status metabólico en diferentes estados fisiológicos. Este péptido presenta similitud estructural con la insulina (2), pero a diferencia de ésta, el IGF-I tiene gran afinidad por proteínas de unión específicas denominadas IGFBP (*IGF binding proteins*), de las cuales siete ya han sido caracterizadas (3). Estas proteínas presentan diferentes afinidades por el IGF-I e IGF-II y, dependiendo de su localización y de algunas condiciones metabólicas, pueden inhibir o aumentar la acción biológica de los IGF (4, 5). Las siete proteínas encontradas hasta el momento presentan similitud estructural con el carboxilo y amino-terminal, en tanto que en la región central se presenta la mayor variabilidad en la secuencia (1-4). En suero de rata, cerca de 95% del IGF-I se encuentra en forma de complejos de alto peso molecular (150 kDa) y de bajo peso molecular (40-50 kDa) (6, 7), semejantes a los encontrados en suero humano (8, 9), en tanto que sólo entre el 5 y 10% del IGF-I se encuentra libre (10).

El complejo de 150 kDa está formado por la IGFBP-3, una unidad no enlazante de IGF denominada subunidad ácido-lábil, y por el IGF-I o el IGF-II. Aproximadamente el 75% del IGF-I presente en el suero es transportado en este complejo ternario, predominantemente en el suero de rata adulta (6) y suero humano (8). Este complejo limita el acceso del IGF-I a los tejidos, ya que es incapaz de cruzar la barrera endotelial -actuando muy probablemente como reservorio (4, 6, 7)- a diferencia del complejo de 40-50 kDa, formado por el IGF-I y las cinco proteínas de unión restantes, el cual puede cruzar la barrera endotelial debido a su menor tamaño (4, 6, 7, 11), participando, de esta forma, en el transporte de IGF a los tejidos blanco.

Aunque la mayor fuente de IGFBP-1 e IGFBP-3 es el hígado, sus mRNA han sido detectados en riñón, músculo, corazón y bazo de rata. El mRNA

para IGFBP-2, se ha identificado en riñón, cerebro y pulmón de ratas adultas y, para IGFBP-4 en hígado y riñón (12, 13).

El objetivo principal de este trabajo fue establecer los perfiles para las principales IGFBP en tejidos de rata normal y sus posibles niveles en cada tipo de tejido. La evidencia experimental encontrada ha permitido identificar las cuatro principales IGFBP en diferentes tejidos de rata normal, así como la formación de complejos de bajo peso molecular en los mismos tejidos, lo que ha servido de base para evaluar los cambios en la distribución relativa de las IGFBP como resultado de alteraciones metabólicas (malnutrición).

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho, de ocho semanas de edad, obtenidas del bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad controladas y con libre acceso a una dieta estándar y a agua.

Estándares hormonales

IGF-I e IGF-II *receptor grade* de GroPep (*Peptides for Growth Ltd.*, Australia).

Radioisótopo

Na¹²⁵I (17 mCi/μg), Amersham, Inglaterra.

Detección de IGFBP y formación de complejos

Se realizaron análisis por cromatografías de exclusión por tamaño y de *Western ligand blot* (WLB) para observar la presencia de las principales proteínas de unión a IGFs y la formación de los complejos característicos.

Cromatografías de exclusión por tamaño

Se incubaron el suero y los extractos de tejidos de rata reconstituídos en PBS (100 μl) con ¹²⁵I IGF-I (≈150.000 cpm) durante toda la noche a 4 °C y luego se sometieron a cromatografía de filtración en gel sobre Ultrogel AcA54 (columna 80x1,6 cm); como eluyente se utilizó *buffer* fosfato

0,05 M pH 7,4, a una velocidad de elución de 0,5 ml/min. Se recolectaron y contaron fracciones de 2 ml en un contador automático de rayos gamma (1470 Wizard, Wallac). El volumen muerto de la columna se determinó con azul dextrán y como marcadores de peso molecular se emplearon IgG (160 kDa), BSA (67 kDa), pepsina (34,7 kDa) e IGF-I (7,6 kDa). El volumen total de la columna se obtuvo por cálculos matemáticos.

Western ligand blot (WLB)

Se analizaron extractos de tejidos de rata (hígado, riñón, corazón, timo, bazo, pulmón y músculo esquelético) y sueros humano y de rata. De acuerdo con el contenido de proteína de cada órgano, el liofilizado se pesó y reconstituyó en *buffer* Laemmli (100 µl) y se realizó la separación electroforética (35 µg de proteína total). Los sueros se diluyeron 1:10 con *buffer* Laemmli y se aplicaron 15 µl de muestra en el gel de electroforesis.

Empleando la técnica estandarizada por Ochoa *et al.* (14), los extractos de tejidos y sueros anteriormente citados se separaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio (PAGE-SDS) al 12%. Posteriormente, las proteínas separadas se inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa (0,2 µm) y se incubaron con IGF-I y II marcados radioactivamente (500.000 cpm) para su posterior exposición a una película de rayos gamma a -70 °C durante 5 días. La marcación de los ligandos se llevó a cabo por el método de la cloramina-T, previamente estandarizado en el Laboratorio de Hormonas del Departamento de Química de la Universidad Nacional (15).

Resultados

Cromatografías de exclusión por tamaño

En la figura 1 se observa el perfil cromatográfico obtenido para suero de rata que permite apreciar tres picos característicos. El primer pico (68-78 ml), correspondiente a un PM de 130 kDa, el segundo (106-128 ml) y un PM de 45 kDa, y un tercer pico (150-170 ml), correspondiente a un

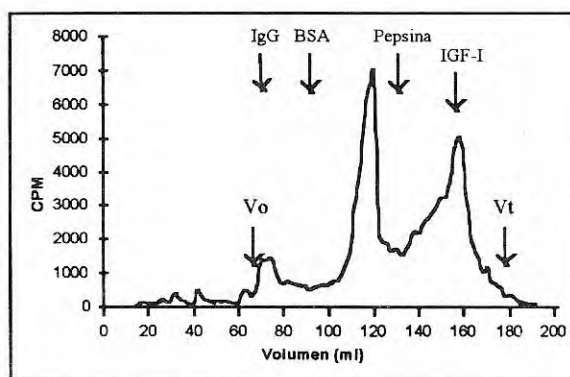


Figura 1. Perfil cromatográfico para suero. Se incubaron muestras de suero de rata con ^{125}I -IGF-I y, luego, se sometieron a filtración en gel (Ultrogel AcA54) para la separación por tamaño de los complejos formados. La muestra es representativa de dos ensayos realizados en las mismas condiciones.

PM de 7,5-8,0 kDa. Los dos primeros picos corresponden, muy probablemente, a las formas enlazadas en que circula el IGF-I, como el complejo ternario de alto peso molecular y binarios de 40-50 kDa. El último pico corresponde al IGF-I libre. Datos no mostrados indican que en suero humano se da la formación de los complejos ternario y binario, lo que se asemeja a lo encontrado en suero de rata.

En la figura 2 se observa el perfil obtenido para el extracto de hígado de rata normal. En éste, al igual que en todos los extractos realizados para los otros tejidos (perfiles no mostrados), no se detectó el complejo ternario (150 kDa), siendo evidente únicamente la presencia de los complejos binarios de menor peso molecular (volumen: 106-126). Se ha podido demostrar que la formación del complejo de 150 kDa depende de la subunidad ácido-lábil (ALS), la cual sólo está presente en el plasma, aunque su sitio de síntesis es el hígado (16). Dado su gran peso molecular, este complejo no cruza la barrera endotelial, lo que podría explicar su ausencia en los tejidos estudiados.

La naturaleza de los complejos binarios (con IGFBP-1, 2 y 4), se comprobó indirectamente con la adición de una mezcla de ácido-etanol en frío, que eliminó esta región (resultados no mostrados).

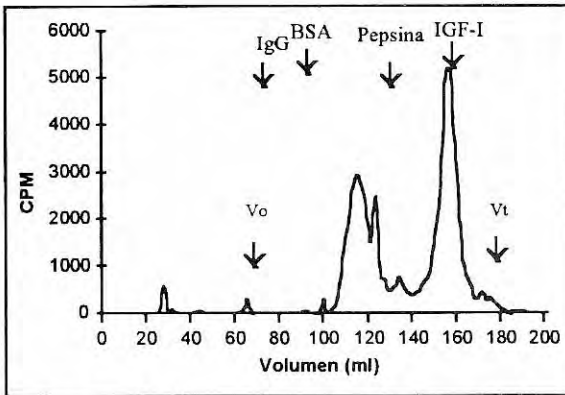


Figura 2. Perfil cromatográfico para extractos de tejidos de rata. Se incubó extracto de hígado de rata con ¹²⁵I-IGF-I y, luego, se sometió a filtración en gel (Ultrogel AcA54) para la separación por tamaño de los complejos formados. La muestra es representativa de dos ensayos realizados en las mismas condiciones.

Western ligand blot

En la figura 3 se observan los perfiles obtenidos para los extractos de tejidos de rata y suero humano y de rata.

En los carriles números 3 y 7 (suero humano y suero de rata normal), se observa el perfil típico

de las IGFBP para estos fluidos, que coincide con los informados hasta el momento (6, 8). Se tiene, así, una banda de 39-42 kDa correspondiente a la IGFBP-3, en sus variantes de glicosilación. Las bandas de 28-32 kDa corresponden a IGFBP-2 y/o IGFBP-1, y la banda de 24 kDa, a la IGFBP-4.

En cuanto al resto de carriles, se observan los perfiles de IGFBP en los diferentes extractos de los tejidos analizados. La banda correspondiente a la IGFBP-3 (39-42 kDa), se encuentra presente en todos los tejidos analizados, pero su concentración parece variar con cada tejido, siendo más abundante en órganos como hígado, riñón y corazón, menor en pulmón y músculo esquelético y casi indetectable en timo, donde se confirmó su presencia por análisis densitométrico (datos no mostrados). Estos hechos se corresponden con la expresión del mRNA para esta proteína en los tejidos antes mencionados (12). En cuanto a las proteínas de menor peso, se confirmó la presencia de las proteínas IGFBP-1 y/o IGFBP-2 en hígado y riñón (carriles 4 y 6), en los que se han detectado también sus mensajeros. En pulmón, sólo se ha

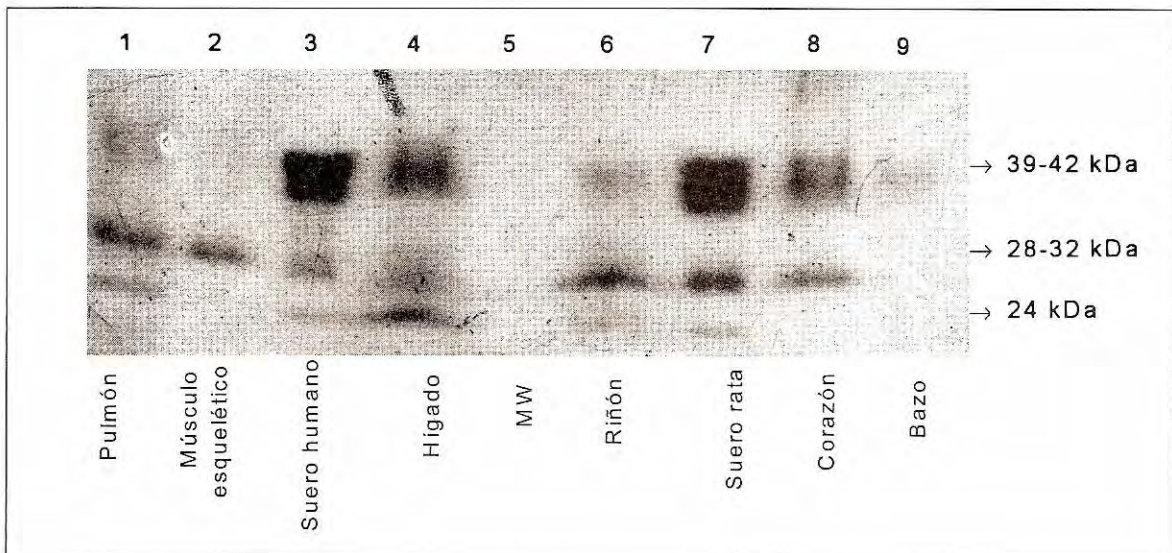


Figura 3. Western ligand blot. Las proteínas presentes en extractos de tejidos de rata (35 µg de proteína total) y sueros humano y de rata se separaron por electroforesis y se inmobilizaron en membranas de nitrocelulosa, para luego analizarlos por Western ligand blot empleando ¹²⁵I-IGF-I e ¹²⁵I-IGF-II como ligandos. La figura es representativa de 2 ensayos realizados en las mismas condiciones.

identificado la expresión del mensajero para la IGFBP-2, por lo que la banda observada de 28-32 kDa, muy probablemente corresponda a dicha proteína. En los casos del corazón y del músculo esquelético (gastrocnemios), aún no existen informes sobre la expresión del mensajero para las proteínas IGFBP-1 e IGFBP-2. Nuestros resultados muestran la presencia, por lo menos de una, si no de las dos proteínas, lo que muy probablemente estaría indicando su transporte transcápilar o un mecanismo de acción paracrino.

Por último, tenemos la banda de 24 kDa, correspondiente a la IGFBP-4, proteína a la que se atribuye actividad inhibitoria y cuyo mensajero ha sido detectado en hígado, riñón y hueso, únicamente. Nuestros resultados mostraron su presencia en riñón, hígado y pulmón. Probablemente en este último, se encuentra la proteína debido a su propia acción paracrina.

En hígado, Lemozy y colaboradores (17) utilizaron anticuerpos específicos contra dichas proteínas (*immunoblotting*) para identificar las correspondientes a PM 45 y 30 kDa, y la IGFBP-4. Esto corrobora los resultados encontrados en el presente estudio. Aún no se han encontrado los perfiles típicos de dichas proteínas para los otros tejidos, por lo que éste constituye un primer informe.

Discusión

Aunque ya se han desarrollado métodos de radioinmunoanálisis para la cuantificación de las IGFBP (1, 10), los métodos de inmunoanálisis y *Western ligand blot* siguen siendo los más usados para la determinación de las proteínas de unión a IGF en diferentes fluidos biológicos. A pesar de que estos métodos son semicuantitativos, pueden utilizarse para observar cambios en los perfiles de las proteínas en diferentes estados metabólicos.

Aunque el significado funcional de las diferentes especies de proteínas de unión es incierto, su identificación en tejidos de rata indica que pueden estar desempeñando un papel importante en la regulación de la biodisponibilidad del IGF-I en los tejidos, además de las diversas acciones complementarias que pueden realizar en los

mismos. Se ha podido establecer que las IGFBP ejercen otras funciones biológicas independientes de los IGF. Estas proteínas pueden unirse a receptores específicos de la familia de las integrinas (18) o a dominios de unión de la heparina (19), reduciendo la unión de la IGFBP a su ligando específico (IGF). Así mismo, se ha establecido que la IGFBP-3 inhibe la proliferación de células de cáncer de seno y próstata por una vía de señalización que no involucra a los IGF (20, 21). En cuanto a la IGFBP-5, se ha observado su papel de promoción de la proliferación celular en osteoblastos, probablemente a través de la unión a sitios putativos en la superficie celular (22). Todo esto sin contar con las acciones inhibitorias o agonistas sobre los IGF, como el transporte de IGF-I a los tejidos adyacentes, la disminución de la depuración metabólica y la intervención en la unión de los IGF a sus respectivos receptores de membrana.

Como se puede observar en los resultados mostrados, los perfiles de estas proteínas difieren en cada tejido, presentándose variación en la intensidad de la señal y en la presencia o ausencia de alguna proteína específica. Aunque el método utilizado en el presente trabajo, WLB, no es completamente cuantitativo, se puede inferir una relación entre la cantidad de IGFBP y la concentración tisular de IGF-I. Así, para órganos con un mayor contenido de IGF-I, como es el caso del riñón y del hígado (23), se esperaría una mayor concentración de BP, que realicen algunas de las funciones mencionadas antes, como son las de transporte, prolongación de la vida media del IGF-I, protección del ligando de la degradación y el ataque proteolítico, localización tisular y modulación de su acción en el tejido, entre otras.

Es sabido, por lo informado en muchas investigaciones, que las IGFBP pueden inhibir así como aumentar las acciones biológicas de su ligando específico (IGF), al actuar como moduladores de su bioactividad (4, 24, 25). La detección e identificación de las IGFBP y los complejos formados entre éstas y el IGF-I en los diferentes tejidos de rata, permiten asegurar que parte del IGF-I presente en el tejido, ya sea por síntesis local o por medio de la acción endocrina/

paracrina, no está totalmente disponible para la unión a su receptor. Esto se corrobora, además, por la cuantificación del IGF-I presente en muestras de tejido sin una extracción previa de las proteínas de unión (23). Como se observa en los resultados presentados en este trabajo, en algunos tejidos de rata se encontraron proteínas de unión a IGF, que muy probablemente estén allí actuando de una forma endocrina/paracrina y, aunque hasta el presente no se han identificado sus mARN, no se descarta que estas proteínas puedan sintetizarse *in situ* y, de esta forma, actuar por una vía autocrina. La comprensión del papel que estas proteínas desempeñan en la regulación de las acciones del IGF-I adquiere cada vez más importancia a la luz del reciente empleo terapéutico del IGF-I como agente anabólico.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al *International Program in the Chemical Sciences (IPICS)*, Universidad de Uppsala (Suecia) por la financiación de este estudio.

Referencias

1. **Ranke M, Eimlinger M.** Functional role of Insulin-like growth factor binding proteins. *Hormone Research* 1997;48(suppl):9-15.
2. **Greenspan FS.** Basic and clinical endocrinology. New Jersey: Prentice Hall International Inc.;1991:133.
3. **Oh Y.** IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47(3):283-93.
4. **Jones JL, Clemmons DR.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Review* 1995;16(1):3-34.
5. **Zapf J.** Physiological role of the insulin-like growth factor binding proteins. *Eur Endocrinol* 1995;132:645-654.
6. **Yang Y, Wang J, Orłowski C, Nissley S, Rechler M.** Structure, specificity and regulation of the insulin-like growth factor-binding proteins in adult rat serum. *Endocrinology* 1989;125(2):1540-55.
7. **Young L, Rechler MA.** Major portion of the 150 kilodalton insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) complex in adult rat serum contains unoccupied, proteolytically nicked IGFBP-e that inhibits IGF-II preferentially. *Endocrinology* 1995;136(2):668-78.
8. **Young Lee C, Hai-Bin W, Dae-Shik S, Rechler M.** Insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentration in 150 kDa complexes containing human IGF-binding protein-3 (hIGFBP-3) after intravenous injection of adult rats with hIGFBP-3. *Endocrinology* 1997;138(4):1649-57.
9. **Baxter R.** Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Hormone Research* 1994;42:140-4.
10. **Rajaram S, Baylink D, Mohan S.** Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocrine Reviews* 1997;18(6):801-31.
11. **Cohen P, Rosenfeld R.** Physiological and clinical relevance of the insulin-like growth factor binding proteins. *Current Opinion in Pediatrics* 1994;6:462-7.
12. **Albiston A, Herington A.** Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid (mRNA) in the rat: comparison with IGF-I mRNA expression. *Endocrinology* 1992;130(1):497-502.
13. **Martina A, Gosteli P, Kaspar H, Schmid C, Froesch E, Zapf J.** Expression and regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-I and growth hormone. *Endocrinology* 1994;135(6):2558-2567.
14. **Ochoa M, Fhølenhang K, Malmöf K, Sánchez-Gómez M, Skottner A.** Reliability of the Western Ligand Blot method for the simultaneous relative estimations of serum insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 1997;47:331-7.
15. **Rodríguez S, Sánchez-Gómez M, Anzola C, Lombana N, Pérez E.** Método de radioinmunoanálisis para la determinación del factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I) en suero humano. *Información Tecnológica* 1997;8(4):145.
16. **Ooi G, Cohen F, Tseng L, Rechler M, Boisclair Y.** Growth hormone stimulates transcription of the gene for the acid-labile subunit of the 150 kDa IGF-binding protein complex. 10th International Congress of Endocrinology. San Francisco, USA.; 1996: Poster. P1-567.
17. **Lemozy S, Pucilowska J, Underwood L.** Reduction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in protein-restricted rats is associated with differential regulation of IGF-binding protein messenger ribonucleic acids in liver and kidney, and peptides in liver and serum. *Endocrinology* 1994;135(2):617-23.
18. **Jones J, Gockerman A, Busby W, Wright G, Clemmons D.** Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Nat Acad Sci* 1993;90:10553-7.
19. **Booth B, Boes M, Andress D, et al.** IGFBP-3 and IGFBP-5 association with endothelial cells: role of C-terminal heparin binding domain. *Growth Regulation* 1995;5:1-17.
20. **Cohen P, Lamson G, Okajima T, Rosenfeld R.** Transfection of the human insulin-like growth factor binding protein-

- 3 gene into Balb/c fibroblast inhibits cellular growth. *Molecular Endocrinology* 1993;7:380-6.
21. **Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG.** Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J Biol Chem.* 1993;268(20):14964-71.
 22. **Mohan S, Nakao Y, Honda Y, et al.** Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem* 1995;267:22467-72.
 23. **Rico E, Sánchez-Gómez M.** Cuantificación del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) total en tejidos de rata. *Biomédica* 1998;18(2):129-33.
 24. **Clemmons DR, Busby W, Clarke JB, Parker A, Duan C, Nam TJ.** Modifications of insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Endocr J* 1998;45(Suppl):S1-8.
 25. **Clemmons DR.** Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 1998;140(1-2):19-24.