



# Factores de crecimiento insulino similares: estructura, bioactividad y métodos de ensayo\*

ANA M. CORTIZO<sup>1</sup>  
y ANTONIO D. McCARTHY<sup>2</sup>

\* Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), 47 y 115 (1900) La Plata, Argentina.

<sup>1</sup> Doctor de Ciencias Bioquímicas, Profesor Titular, UNLP.

<sup>2</sup> Bioquímico, UNLP.

## Resumen

El sistema de los factores de crecimiento insulino-símiles (IGF) se halla involucrado en diferentes aspectos de la regulación celular y tisular, como así también en el desarrollo y el crecimiento corporal. Este sistema depende de la interacción entre ligandos (IGF-I, IGF-II), receptores (Tipo I, Tipo II), proteínas ligadoras o transportadoras (IGFBP-1 a -6), y proteasas específicas para las IGFBPs. La acción de los IGFs se encuentra regulada por diferentes factores y estímulos, tales como la hormona de crecimiento, que actúan a diversos niveles. El desarrollo de nuevos métodos para analizar los diferentes componentes del sistema de los IGFs ha aportado elementos adicionales para la evaluación, diagnóstico y seguimiento de pacientes con alteraciones del crecimiento.

**Palabras clave:** factores de crecimiento insulino similares \* proteínas transportadoras \* receptores \* regulación \* proteasas \* crecimiento \* desarrollo \* fosforilación \* matriz extracelular \* métodos de ensayo.

## Summary

*The insulin-like growth factor system is known to be involved in different aspects of cellular and tissue regulation, as well as in body growth and development. This system depends on the interaction between ligands (IGF-I and IGF-II), receptors (Type I and Type II), binding proteins (IGFBP-1 to -6), and proteases which are specific for IGFBPs. The action of IGFs can be modulated by different factors and stimuli, such as growth hormone, which exert their control at different levels. The development of new methods for the analysis of the different constituents of the IGF system, have provided alternative tools for the evaluation, diagnosis and follow-up of patients with growth impairment.*

**Key words:** insulin-like growth factors \* binding proteins \* receptor \* regulation \* growth \* development \* phosphorylation \* extracellular matrix \* assay methods.

ACTA

BIOQUIMICA

CLINICA

LATINOAMERICANA

Vol. XXXII, Nº 4, 471-516, 1998.

Incorporada al Chemical

Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCIDL.

ISSN 0325-2957

## Introducción

Los factores de crecimiento insulino similares (IGF), o somatomedinas, pertenecen a un grupo de péptidos circulantes que juegan un papel muy importante tanto en el crecimiento como en el desarrollo humano y de otros vertebrados (1) (2). Los IGF constituyen una familia de péptidos estructuralmente relacionados con la insulina (3), que se descubrieron inicialmente en base a su actividad como factores de sulfatación del cartílago, y a su capacidad para reemplazar la actividad de la hormona de crecimiento (GH) (4). Posteriormente, se demostró que tenían otros efectos y se los denominó insulino similares.

El sistema de los IGF está integrado por dos factores de crecimiento insulino-símiles (el IGF-I y el IGF-II), que son reconocidos por dos receptores específicos, el de tipo I y el de tipo II. También forman parte de este sistema una serie de proteínas ligadoras o transportadoras (IGFBP), de las cuales se han descrito seis, y proteasas específicas para estas IGFBP (5) (6).

La evidencia acumulada hasta el momento sugiere que es el IGF-I el que actúa como mediador de las acciones promotoras del crecimiento de la GH (7) (8). El IGF-I puede ejercer todas las acciones promotoras del crecimiento de la GH, aunque no se conoce bien cuáles son los roles relativos de ambos en el crecimiento y desarrollo normal (5).

El modelo de acción más aceptado para este sistema propone que la GH actúe controlando los niveles de IGF-I, y que sea el IGF-I el que tenga acción a nivel celular. Los niveles de IGF-I total circulante generalmente correlacionan bien con la secreción de GH en la vida post-natal, y la expresión global de IGF-I es mayoritariamente un reflejo de los niveles de GH. El crecimiento post-natal está asociado con la expresión de IGF-I, y la mayor parte de la actividad de GH es mediada por este IGF. Sin embargo, los IGF son también sintetizados localmente en múltiples tejidos y tienen así potencialmente acción *paracrina* y *autocrina*. De hecho, las acciones de los IGF en el feto son principalmente por vía *autocrina/paracrina*, e independientes de la GH. Por otro lado, los IGF poseen efectos hipoglucemiantes *in vivo*, aunque controlados por la presencia de proteínas ligadoras, como será descrito posteriormente.

El avance en el conocimiento de las alteraciones de este sistema en diversas situaciones, ha despertado gran interés por las posibles aplicaciones clínicas de esta clase de factores de crecimiento en el tratamiento de patologías como Diabetes mellitus, osteoporosis, estados de resistencia insulínica extrema, insuficiencia renal crónica, distrofia miotónica, neuropatía periférica, y especialmente en casos de niños con resistencia a la GH.

Esta revisión resume los conceptos más aceptados sobre cada uno de los componentes del sistema de los IGF, así como su estructura, acciones biológicas y métodos de ensayo aplicables al laboratorio clínico.

## Ligandos

El IGF-I, el IGF-II y la insulina constituyen una familia de hormonas relacionadas estructuralmente (fig. 1), mostrando aproximadamente 40-50% de homología de secuencia de aminoácidos entre ellas (8-10).

Los IGF circulantes son mayoritariamente péptidos de 70 aminoácidos que, al igual que la insulina, contienen un dominio A y uno B. Sin embargo, difieren de la insulina en dos aspectos:

- 1) retienen el péptido conector C;
- 2) contienen una secuencia adicional, el dominio D, en su extremo carboxilo terminal. Estos IGF son sintetizados como moléculas de pre-pro IGF, conteniendo un péptido *señal* y un péptido de *extensión*, el péptido E. Estos dos péptidos son removidos durante las etapas de procesamiento que llevan al IGF maduro. Hay evidencias de que estas reacciones pueden ocurrir en el aparato de Golgi trans, o en las vesículas secretorias. En algunas especies, existe más de un péptido señal asociado con el IGF maduro.

Se ha encontrado que el IGF-I aislado de cerebro, de útero y de calostro bovino, no contiene los tres primeros restos de aminoácidos del extremo amino terminal (Gly-Pro-Glu) (11). La remoción del tripéptido presumiblemente resulta de un evento post-traducciona, aunque el mecanismo bioquímico aún no se ha identificado. Esta forma trunca de IGF-I tiene una potencia biológica mucho mayor que el IGF-I intacto, principalmente porque tiene una menor afinidad

por las IGFBP. De esta manera, aumenta su disponibilidad para interactuar directamente con el receptor de IGF-I.

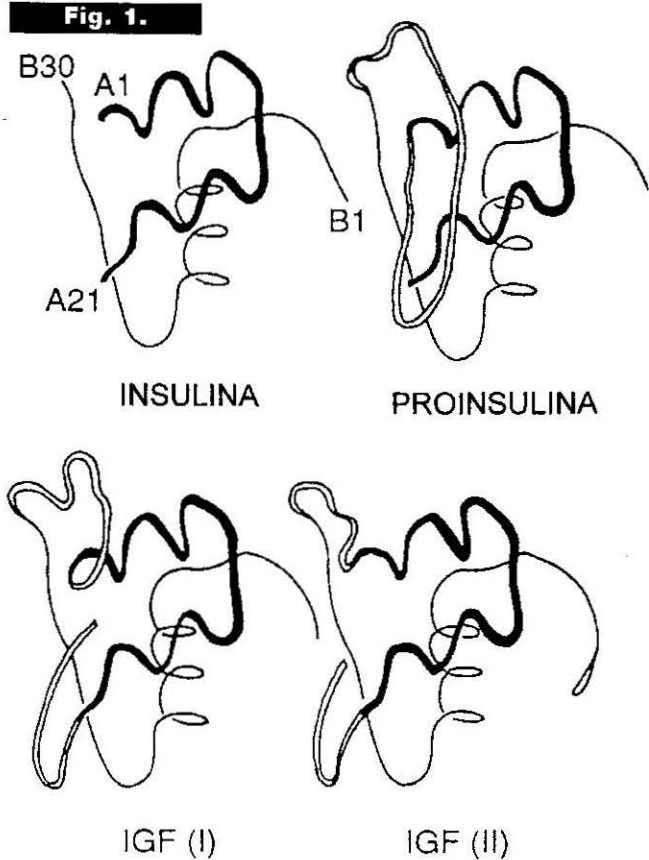
La molécula de IGF-I ha sido altamente conservada a lo largo de la evolución de los vertebrados (3).

#### ESTRUCTURA Y EXPRESION DEL GEN DE IGF-I

El IGF-I es codificado por un gen de copia simple, localizado en el cromosoma 12 en los humanos (12) y en el 10 en el ratón (13). Poseen una extensión de por lo menos 90 kb de ADN cromosomal. El análisis por Northern Blot del ARNm aislado tanto de tejido hepático como extra-hepático, y de diferentes estadios de desarrollo, muestra la presencia de múltiples transcritos, con tamaños de 0,8-7,5 (3). Los genes de IGF-I humano y de rata poseen múltiples sitios de inicio de la transcripción a lo largo de una región de aproximadamente 350 pares de bases de extensión. La expresión del ARNm de IGF-I producto de cada uno de estos sitios alternativos de iniciación de la transcripción, es específica de tejido y se encuentra regulada por factores hormonales y dependientes del desarrollo.

#### ESTRUCTURA Y EXPRESION DEL GEN DE IGF-II

El gen de IGF-II humano tiene una extensión de aproximadamente 30 kb de ADN. Se encuentra sobre el extremo distal del brazo corto del cromosoma 11, adyacente al extremo 3' del gen de la insulina (14). El gen de IGF-II consiste de 9 exones; sin embargo, el péptido maduro es codificado por los exones 7, 8 y 9. El exón 9 contiene además una extensa serie de repeticiones terminales con múltiples secuencias AUUUA (el 3'-UTR), cuya presencia podría explicar la relativa inestabilidad del ARNm (8). La expresión del gen es controlada por 4 promotores diferentes (P1-P4) que preceden algunos de los exones *leader*. Al igual que en el



Estructura terciaria propuesta para la familia de péptidos relacionados con los factores de crecimiento insulino-símiles: IGF-I, IGF-II, insulina y proinsulina.

gen del IGF-I, estos exones *leader* codifican para múltiples 5'-UTR. En la especie humana, los promotores son activados diferencialmente, en forma dependiente del tejido y de la etapa de desarrollo.

De la misma forma que para el IGF-I, se producen múltiples transcritos de ARNm para IGF-II (2,2-6,0 kb), pero en este caso la heterogeneidad en el tamaño del promotor se produce como consecuencia de la utilización alternativa de múltiples sitios de poliadenilación (15).

Por último, y a diferencia del IGF-I, los ARNm del IGF-II codifican para un péptido E y un péptido señal sencillos.

#### Receptores

Los IGFs ejercen sus acciones biológicas por medio de su unión a una familia de re-

ceptores específicos de membrana plasmática. Ellos son el receptor de IGF de tipo I y el receptor de IGF de tipo II (16) (fig. 2). En esta sección será descrito inicialmente el receptor de insulina, y luego los receptores específicos para los IGF. Finalmente se describirán los receptores híbridos IGF/insulina que han sido aislados de distintos tejidos, y que podrían inducir efectos similares a los de los receptores de IGF, al menos *in vitro*.

### RECEPTOR DE INSULINA

Este receptor es una glicoproteína rica en manosa de PM 350 kDa (17). Está constituido por un tetrámero, con dos subunidades  $\alpha$  (PM 135 kDa) y dos  $\beta$  (PM 95 kDa). La subunidad  $\alpha$  es enteramente extracelular y contiene los sitios de unión para la insulina. En la subunidad  $\beta$  se hallan los sitios de fosforilación y la actividad de tirosina kinasa (TK). Así, el receptor posee tres dominios: uno extracelular, otro que presenta interacciones hidrofóbicas con la membrana plasmática y el tercero intracelular o citoplasmático (fig. 2).

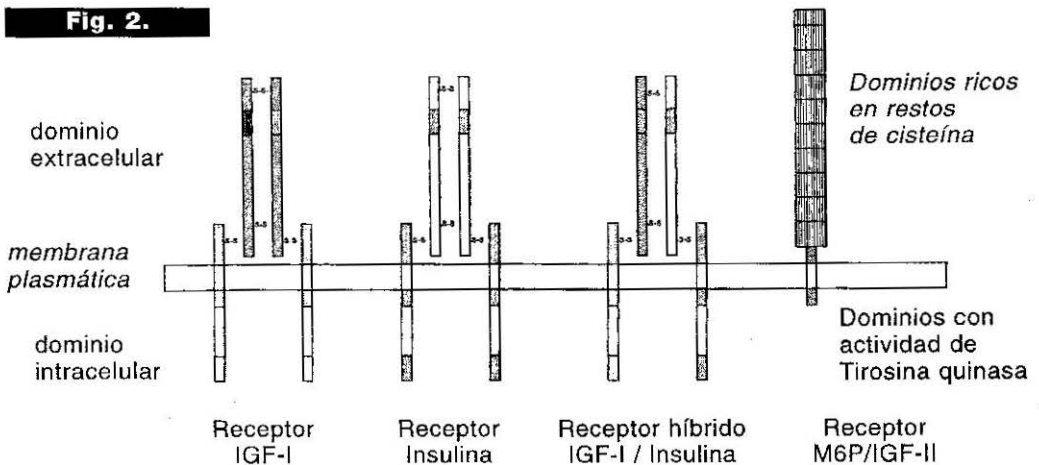
Luego que la insulina se ha unido a su receptor, se estimula la fosforilación de la subunidad  $\beta$  del mismo (autofosforilación) (18). Esta reacción es muy rápida y ocurre sobre residuos de tirosina. Como consecuencia, el receptor adquiere actividad de TK. Subsecuentemente son fosforilados otros si-

tios sobre el receptor de insulina, en residuos de serina y treonina.

En ciertos tejidos tales como el cerebro, la estructura del receptor de insulina es algo diferente: posiblemente difiera en el grado de glicosilación de las subunidades  $\alpha$  (19). Sin embargo, el receptor de insulina de cerebro no es internalizado y su rol es desconocido.

La sola presencia del receptor de insulina no asegura la respuesta del tejido a dicha hormona. Este receptor se ha encontrado en tejidos en los cuales no se conoce una acción específica de la insulina. Éste es el caso de las células neuronales en cultivo y de las células sanguíneas circulantes. En particular, las células neuronales en cultivo requieren de insulina y otros factores de crecimiento (IGF, FGF) para diferenciarse. En presencia de estos factores se observa un aumento en la producción de neuritas, extensiones celulares, síntesis de ARNm total, y en particular de ciertas proteínas como la tubulina (20) (21). Sin embargo, no responden a la insulina en una forma clásica (esto es, aumentando la captación de glucosa o la síntesis de glucógeno), aunque aumentan la captación de aminoácidos en presencia de insulina. En otras palabras, la respuesta a la insulina es específica del tejido.

El receptor de insulina no sólo une insulina con alta afinidad, sino que también es capaz de unir IGF-I e IGF-II (aunque con menor afinidad).



Estructura de los receptores para IGF de tipo I, insulina, híbrido insulina-IGF-I y el receptor para IGF de tipo II/M6P.



## RECEPTOR DE IGF DE TIPO I

Este receptor es muy semejante al receptor de insulina. Está formado por un tetramero del tipo  $\alpha_2\beta_2$  (3) (8) (22) (fig. 2). Las subunidades  $\alpha$  poseen un PM aproximado de 125 kDa y las  $\beta$  de 90 kDa. El receptor posee tres dominios: uno extracelular constituido mayoritariamente por la subunidad  $\alpha$ , donde se halla el sitio de unión para el ligando; un dominio hidrofóbico en contacto con la membrana; y uno hidrofílico intracelular que incluye la actividad de TK del receptor, los sitios de fosforilación de tirosina y el sitio de unión al ATP. Después de la unión del IGF al receptor de tipo I, se estimula la fosforilación en restos de tirosina de la subunidad  $\beta$ , no sólo del receptor de tipo I sino también del receptor de la insulina.

El receptor de IGF de tipo I es codificado por un gen de copia simple, localizado en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 15 (8). Este gen, al igual que el gen del receptor de la insulina, consiste de 22 exones que se expanden como mínimo a lo largo de 100 kb del ADN cromosomal (23). A diferencia del gen del IGF-I, el gen del receptor de IGF de tipo I en el humano y en la rata posee un sitio principal de iniciación de la transcripción que define una especie de ARNm predominante de 11 kb (24). El péptido señal y las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son sintetizadas colinealmente como componentes de un receptor precursor (pre-pro-receptor) de 1367 aminoácidos. Durante el procesamiento en el retículo endoplásmico, el péptido señal se escinde y el pro-receptor resultante es glicosilado en varios sitios de N-glicosilación, formando así una glicoproteína de 180 kDa. La separación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  ocurre en una zona de 4 aminoácidos básicos (Arg-Lys-Arg-Arg) localizados después del residuo 706. Las subunidades posteriormente se vuelven a unir por puentes disulfuro. La forma tetramérica final del receptor se logra por unión de dos dímeros  $\alpha\beta$  a través de otros puentes disulfuro (3).

La unión de IGF a la subunidad  $\alpha$  extracelular ocurre en dominios ricos en cisteína.

El receptor de IGF de tipo I une igualmente IGF-I e IGF-II con alta afinidad ( $10^{-10}$  M), mientras que su afinidad para la insulina es mucho menor ( $10^{-8}$ ) (3). Estas diferencias en las afinidades de unión entre el

receptor de insulina y el de IGF de tipo I, y sus ligandos, probablemente se deban a diferencias en la subunidad  $\alpha$ .

Estudios de unión de ligandos marcados a receptores de superficie, han revelado otra diferencia importante entre los receptores de insulina y los de IGF de tipo I (8) (25). Los ensayos de unión del receptor de IGF de tipo I generalmente dan gráficos de Scatchard lineales, sugiriendo una clase única de receptores. Por el contrario, los receptores de insulina clásicamente generan gráficos curvilíneos, sugiriendo la existencia de múltiples sitios receptores, o de cooperatividad negativa. Sin embargo, no se conocen las bases estructurales de estos fenómenos.

La subunidad  $\beta$  del receptor de IGF de tipo I está formada por un dominio extracelular corto involucrado en la unión a la subunidad  $\alpha$ , un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que contiene la actividad de TK. El dominio de TK se encuentra altamente conservado en diferentes especies, y contiene una secuencia de consenso para la unión al ATP, así como múltiples residuos de tirosina pasibles de ser fosforilados cuando el ligando se une a la subunidad  $\alpha$ .

En el caso de varios receptores de hormonas y factores de crecimiento, entre los que se encuentran los de la insulina y el IGF, se ha encontrado que posteriormente a la unión del ligando, se produce una agregación de receptores seguida por la autofosforilación de ciertos restos de tirosina en una de las subunidades  $\beta$ . Éste es un fenómeno descrito por Jacobs y Cuatrecasas en 1986; estos autores también encontraron una transfosforilación intramolecular posterior de la otra subunidad  $\beta$  (26). A partir de allí, se produce una cascada de eventos que llevan a la acción biológica tejida específica de la hormona.

Inmediatamente después de la autofosforilación de la subunidad  $\beta$  del receptor, éste adquiere actividad de tirosina quinasa. A su vez, esta TK asociada al receptor fosforila una proteína de 185 kDa que también se ha demostrado que es fosforilada por el receptor de la insulina. Esta proteína se denomina IRS-1 (sustrato del receptor de insulina) y contiene dominios homólogos al src o SH2. Después de la fosforilación de IRS-1 en varios residuos de tirosina, se une a proteínas que contienen los dominios SH2. Entre estas últimas se encuentra la subuni-

dad reguladora de fosfatidil inositol-3-quinasa (PI-3K). La activación de esta quinasa conduce a la formación de fosfatidil inositol-3-fosfato, el cual puede servir como una señal para el crecimiento celular.

Existe otro mecanismo de transducción de señales relacionado con el receptor de IGF de tipo I (25). Las proteínas *ras* (p21) constituyen una familia de productos génicos que se han conservado a lo largo de la evolución. Se encuentran unidas a membrana y muestran actividad de unión a nucleótidos de guanina así como débil actividad de GTPasa; es decir, son funcionalmente similares a las proteínas G. Esta vía de fosforilación, también iniciada por IRS-1, desencadena la fosforilación de una serie de quinasas asociadas a mitógenos (MAPquinasas), las cuales también juegan un rol como señales para la regulación del crecimiento celular.

Así, el IRS-1 se considera a una proteína "docking", la cual después de ser fosforilada por los receptores de insulina o de IGF de tipo I forma un complejo proteico que activa múltiples cascadas de fosforilaciones (5).

#### EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR DE IGF DE TIPO I

El receptor de IGF de tipo I se expresa en casi todos los tejidos del cuerpo (27). Esto pone de relieve su rol vital en las funciones fisiológicas normales. De hecho, la importancia del receptor de IGF de tipo I en mantener las funciones celulares básicas es ilustrada por el hecho que la mayoría de los tipos celulares parecen requerir IGF (o grandes concentraciones de insulina) para su crecimiento en cultivo (3).

La expresión de los receptores varía en función de la etapa del desarrollo y de la edad. Se halla controlada por numerosas hormonas en diferentes tejidos (28). En la rata, durante los días 14-15 del desarrollo embrionario (un estadio que corresponde a una organogénesis temprana), la expresión del ARNm para el receptor del IGF de tipo I es particularmente alta en varias áreas del cerebro y músculo en desarrollo (27). Post-natalmente existe una reducción significativa en la expresión del gen que coincide con el aumento en los niveles de IGF-I, sugiriendo que el receptor de IGF de tipo I sufre una retro-regulación. En el hígado de individuos adultos, la expresión del receptor es casi indetectable, aunque en la mayoría de

los demás tejidos adultos existe una expresión significativa. Durante el desarrollo fetal y post-natal temprano existen altos niveles de ARNm para el receptor de IGF de tipo I, y elevada capacidad de unión de este receptor, lo cual sugiere que este receptor pueda estar involucrado en la diferenciación y el crecimiento de diversos órganos en estas etapas. En el estado post-natal tardío, cuando los procesos de diferenciación se han completado, hay bajos niveles de expresión del receptor de IGF de tipo I; sin embargo, aún pueden mediar los efectos de crecimiento longitudinal de la GH. La disminución post-natal de la expresión del gen del receptor de IGF de tipo I está inversamente relacionada con el incremento en los niveles circulantes de IGF-I, sugiriendo que el IGF-I afecta la expresión del receptor. Este efecto global, sin embargo, no se observa en todos los tejidos.

La expresión del gen del receptor de IGF de tipo I también es condicionada por determinadas situaciones fisiológicas y patológicas. Se ha encontrado que los niveles de GH regulan la expresión de este gen. La inyección de hGH a ratas hipofisectomizadas aumenta al doble los niveles del ARNm para el receptor de IGF de tipo I en varios tejidos, incluyendo cartilago, riñón y músculo. Estos resultados sugieren que el tratamiento con GH, por medio del aumento tanto en el ARNm específico para el receptor, como en la capacidad de unión del mismo a IGF, podría jugar un rol en la respuesta de un individuo al IGF-I (29).

En ratas ayunadas, la expresión del receptor de IGF de tipo I aumenta significativamente en varios tejidos. Este hecho podría deberse a una retroalimentación positiva del receptor, frente a la caída en los niveles circulantes de insulina e IGF-I observados durante el ayuno (30). La expresión del receptor retorna a sus valores normales cuando se restablece la alimentación del animal. Similarmente, la expresión del receptor de IGF de tipo I en el riñón se encuentra incrementada durante una diabetes insulínopénica, una condición patológica en la cual existe una disminución significativa en los niveles circulantes de IGF-I (31).

#### RECEPTORES HÍBRIDOS

En esta sección se describirá un fenómeno definido por la presencia de receptores

heterogéneos. Como se ha visto, los receptores para la insulina y para el IGF de tipo I son productos génicos diferentes, y se cree que normalmente son expresados separadamente, como receptores transmembrana constituidos por heterotetrámeros (3). Se considera que el receptor de insulina regula primariamente funciones metabólicas y que el receptor para IGF de tipo I controla el crecimiento, la diferenciación, así como diferentes funciones de regulación. Sin embargo, varios estudios sugieren que cada receptor podría ser capaz de mediar las acciones del otro. En ciertas células y tejidos donde existen niveles significativos de ambos receptores, se pueden formar receptores híbridos (fig. 2). Estos híbridos son receptores tetraméricos formados por un heterodímero  $\alpha\beta$  del receptor de insulina, ligado por puentes disulfuro a un heterodímero  $\alpha\beta$  del receptor de IGF de tipo I. Estos híbridos se formarían durante las modificaciones post-traduccionales normales de los receptores. Dado que han sido encontrados en diferentes líneas celulares, varios investigadores estudiaron su posible rol como mediadores de las acciones biológicas tanto de la insulina como del IGF-I (32).

En concentraciones fisiológicas los IGF pueden unirse a estos receptores híbridos, y estimular así la autofosforilación de la subunidad  $\beta$  de ambos heterodímeros como se ha descrito. Por el contrario, estos receptores híbridos muestran una afinidad muy reducida por la insulina, y su acción a través de ellos a concentraciones fisiológicas sería menos importante.

Actualmente se están realizando estudios para entender la función de estos receptores híbridos y conocer su distribución en diferentes tejidos. Hasta el momento, su rol fisiológico es desconocido.

### RECEPTOR PARA IGF DE TIPO II

Otro receptor específico para los IGF es el receptor de IGF-II o de tipo II. Estructuralmente, este receptor se parece más al receptor de LDL que a cualquiera de los receptores para factores de crecimiento. Está constituido por un monómero de peso molecular aproximado de 260 kDa. La glicosilación del receptor es esencial para que puedan unirse los IGF. Su secuencia aminoacídica tiene un 80% de homología con el receptor de manosa-6-fosfato independiente de

caciones. En los mamíferos, el receptor IGF-II/M6P une IGF-II con alta afinidad, pero también interviene en el transporte de aproximadamente 50 enzimas lisosomales hacia los lisosomas. Su función en el sistema de los IGF sería de degradar el IGF-II extracelular a través de su internalización mediada por receptores (33).

Las enzimas lisosomales que son reconocidas por el receptor de tipo II deben estar glicosiladas, siendo importantes para la unión los residuos de manosa. La captación de estas enzimas es inhibida por 100 mM de manosa, fosfomananos de levaduras o manosa-6-fosfato (M6P). Este receptor, cuando se encuentra localizado sobre la superficie celular, puede entonces unir glicoproteínas extracelulares que contengan M6P e internalizarlas en los endosomas.

Para la M6P, el receptor de IGF de tipo II posee una  $K_d = 7 \cdot 10^{-6}$  M y una estequiometría de unión de 2,17 mol/mol; para  $\beta$ -galactosidasa (una enzima lisosomal extracelular), la  $K_d = 2 \cdot 10^{-8}$  M y su estequiometría de unión 0,9 mol/mol; por otro lado, para el IGF-II la  $K_d = 2 \cdot 10^{-10}$  M y la estequiometría de unión 0,95 mol/mol (34). Otras glicoproteínas que contengan M6P pueden unirse también al receptor (por ej., el TGF $\beta$ 1 compete con M6P por la unión al receptor de tipo II) (35).

En el receptor de tipo II, existen dos sitios de unión, separados entre sí, para IGF-II y restos de fosfomanosilo (34). En general, ambos son mutuamente inhibitorios: la unión de IGF-II es inhibida en un 50% por 25 nM de  $\beta$ -galactosidasa. El IGF-II a su vez, inhibe la captación de  $\beta$ -galactosidasa radioactivamente marcada, en células en cultivo. Sin embargo, M6P no inhibe la unión de IGF-II al receptor tipo II, sino que paradójicamente lo aumenta.

Durante el remodelamiento óseo, los osteoclastos secretan enzimas lisosomales que digieren la matriz; el IGF-II podría modular este proceso inhibiendo la captación celular de estas enzimas lisosomales (34).

Como hemos visto, el receptor de tipo II une IGF-II con muy alta afinidad ( $10^{-10}$ - $10^{-11}$  M). Sin embargo, el IGF-I posee una afinidad aproximadamente 500 veces menor, y la insulina no es reconocida por el receptor.

El receptor de IGF de tipo II no posee actividad de TK; sin embargo, parecería activar una proteína  $G_{12}$ . En células BALBc/3T3, la estimulación del receptor de tipo II au-

menta el influjo de  $Ca^{2+}$ , generando  $IP_3$  y diacilglicerol. Estos resultados, aunque no confirmados por otros autores, sugerirían que el receptor de IGF de tipo II podría acoplarse a canales de calcio a través de una proteína G sensible a la toxina pertusis.

La función de este receptor en la fisiología de los IGF podría ser la de una vía degradativa (receptor tipo *scavenger*), removiendo IGF-II del entorno extracelular. Sin embargo, el rol fisiológico de este receptor es mucho menos conocido que el de IGF de tipo I. Aunque evidencia reciente sugeriría que algunas acciones del IGF-II podrían ser mediadas por el receptor de tipo II, se cree que en realidad la mayoría de las funciones de los IGF serían ejercidas a través del receptor de tipo I.

#### REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DEL RECEPTOR PARA IGF DE TIPO II

Los niveles del receptor de IGF de tipo II en la rata se encuentran elevados en tejidos fetales, pero disminuyen dramáticamente en el último período de gestación y en el período post-natal temprano. Esta variación con las etapas de desarrollo sigue de cerca los niveles de IGF-II. Esto sugiere que el sistema IGF II / receptor de tipo II juega un rol importante en el desarrollo fetal, probablemente durante el proceso de remodelamiento tisular (8).

Recientemente se ha identificado una forma circulante de este receptor de tipo II, a la cual le falta la porción citoplasmática correspondiente al receptor de superficie celular. Ello sugeriría que el receptor soluble (circulante) deriva de la ruptura proteolítica del receptor de membrana, aunque podría representar otra proteína de unión de IGF (8). De hecho, el dominio extracelular del receptor de tipo II de membrana también es proteolíticamente hidrolizado en cultivos celulares, y liberado en forma soluble al medio de cultivo. No se conoce la función de esta forma soluble del receptor de tipo II.

### Acciones de los IGFs

Muchas células en cultivo poseen un requerimiento absoluto de IGF-I para su crecimiento. Estas células incluyen: fibroblastos, células epiteliales, células de músculo

liso, linfocitos T, condriocitos, osteoblastos y células progenitoras obtenidas de médula ósea. Por otro lado, se sabe que el agregado de factores de crecimiento tales como PDGF y EGF aumentan la secreción de IGF-I hacia el medio de cultivo celular. Algunas líneas de células transformadas en cultivo, secretan cantidades muy grandes de IGF-I hacia el medio de cultivo (cáncer de próstata, glioblastoma). Las pocas células que pueden crecer en un medio de cultivo libre de suero, lo hacen a través de mecanismos autocrinos; esto es, por activación de receptores de tipo I a través de la unión de IGF-I de producción endógena. Las acciones de los IGF han sido estudiados por medio de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

#### ACCIONES *IN VITRO*

Los receptores de IGF se han encontrado en una amplia variedad de células. En general, los efectos de los IGF *in vitro* se pueden dividir en anabólicos agudos sobre proteínas e hidratos de carbono, o efectos a largo término sobre la replicación y diferenciación celular. Se describirán varios de estos efectos *in vitro*.

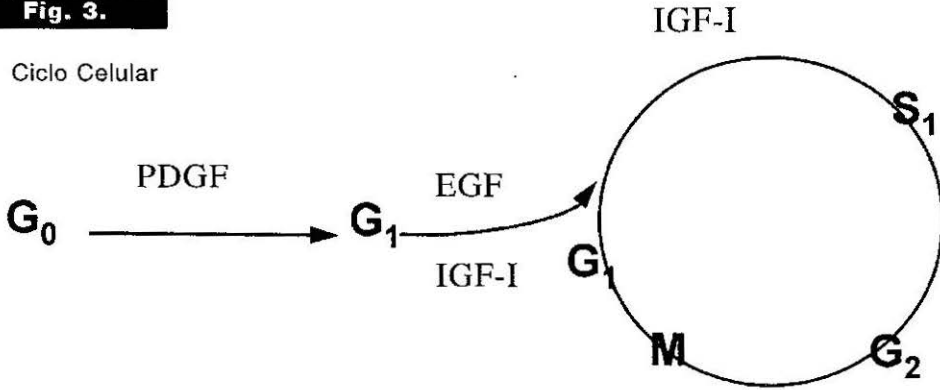
1. *Efectos sobre la progresión del ciclo celular.* Los IGF actúan como factores de progresión en el ciclo celular. Esto se estudió principalmente en células BALBc/3T3. El ciclo celular consiste de varias fases (fig. 3): una presintética  $G_1$ , la de síntesis de ADN (S), la premitótica ( $G_2$ ) y la mitótica (M). Las células quiescentes ( $G_0$ ) se encuentran en una fase fuera del ciclo. La fase  $G_1$  puede dividirse a su vez en subfases: de competencia, de entrada, de progresión y de ensamble. El proceso de competencia es estimulado por PDGF, y la subfase de entrada es inducida por EGF e insulina. Sin embargo, el IGF es el único factor de crecimiento requerido para la progresión, una subfase que requiere de síntesis de proteínas. La fase de ensamble no requiere factores de crecimiento.

Se ha observado que PDGF aumenta la densidad celular de sitios de unión para IGF-I en fibroblastos (36). También se ha visto que bFGF produce fosforilación de la cadena  $\beta$  del receptor de IGF de tipo I (37). Así, en ciertas condiciones este factor de crecimiento podría sustituir al IGF-I en la estimulación de la progresión celular, posible-



Fig. 3.

Ciclo Celular



Esquema de las distintas fases del ciclo celular: fase presintética (G<sub>1</sub>), fase de síntesis de ADN (S), fase premitótica (G<sub>2</sub>) y fase de mitosis (M); las células quiescentes se encuentran en una fase fuera del ciclo celular (G<sub>0</sub>). La subfase de entrada al ciclo celular puede ser estimulada por EGF e insulina, mientras que IGF-I es el único factor requerido para la subfase de progresión.

mente como resultado de dicha fosforilación del receptor de IGF-I.

### 2. Efectos sobre la proliferación celular.

Como se ha visto, el receptor de IGF-I sería clave para la regulación de la progresión de muchas células a través del ciclo celular. No es sorprendente entonces que una amplia variedad de células muestren una respuesta mitogénica frente a la estimulación con IGF-I. Se ha encontrado que el IGF estimula la proliferación celular en células como fibroblastos, condriocitos, osteoblastos, queratinocitos, células foliculares tiroideas, células del músculo liso, células del músculo esquelético, células progenitoras eritroides, epitelio tímico, ovocitos, células de granulosa, espermatogonias, células de Sertoli, y varias líneas de células cancerosas (5) (38-40).

El IGF-I estimula la proliferación de cultivos primarios de condriocitos de pollo, cuando se lo agrega al medio de cultivo libre de suero. En este ensayo, IGF-I es mucho más potente que bFGF o PDGF. La incorporación de <sup>3</sup>H-timidina frente a un estímulo con TSH en células foliculares tiroideas, se ve potenciada cuando las células se transfectan con un vector de expresión para IGF-I humano. En este sistema autocrino, los efectos de IGF-I solamente se observan si el factor de crecimiento es secretado al medio, y subsecuentemente actúa sobre los receptores superficiales para IGF de tipo I. El IGF-I también estimula la síntesis de ADN y secreción de hormonas en célu-

las epiteliales tímicas. La proliferación de células progenitoras eritrocitarias humanas y de linfocitos T es estimulada por IGF-I e IGF-II a través de receptores de tipo I.

### 3. Efectos sobre la apoptosis o muerte celular.

Una acción celular de los IGF que es complementaria a su estimulación de la proliferación celular es su capacidad, en ciertas células, de inhibir la muerte celular. Esta acción ha sido bien caracterizada en células hematopoyéticas. En estas células se cree que la muerte celular programada o apoptosis tiene un rol importante en la regulación de la progresión de células sanguíneas por factores de crecimiento (41).

En células progenitoras eritroides humanas, la ruptura del ADN asociada con apoptosis como consecuencia de la privación de suero, es suprimida por el IGF-I. Este efecto es comparable al inducido por el factor estimulador de colonias eritroides, pero menor al que provoca la eritropoyetina (42). Similarmente, tanto en una línea de linfocitos pre-B murinos (BAF-3) dependiente de IL-3, como en cultivos primarios de células plasmáticas aisladas de médula ósea, la apoptosis es inhibida por IGF-I (43).

### 4. Efectos sobre la diferenciación celular.

Los IGFs pueden promover la diferenciación de múltiples tipos celulares (39).

Los IGFs son potentes inductores de la diferenciación terminal en mioblastos (44). Se ha demostrado que el IGF-I induce la expresión de genes miogénicos. Esta inducción



de la diferenciación de mioblastos puede ser específicamente bloqueada con oligonucleótidos *antisense* complementarios a la secuencia de los genes miogénicos. Además, bajo ciertas condiciones los mioblastos secretan IGF-II, que podría *per se* inducir diferenciación. Esta acción autocrina se puede inhibir por exposición de las células a un oligonucleótido *antisense* complementario al ARNm del IGF-II. Por el contrario, en los mioblastos L6, elevadas concentraciones de IGF-I o la sobre-expresión de los receptores de IGF de tipo I resultan en la inhibición de la diferenciación celular.

IGF-I e IGF-II también promueven la diferenciación de osteoblastos, condriocitos, osteoclastos, células neuronales y adipocitos (39). En el hueso, se ha demostrado que el sistema de los IGF juega un papel importante en el mecanismo de remodelamiento óseo, que involucra la formación y resorción ósea (45-47). Estos IGF se encuentran almacenados en el hueso, posiblemente unidos a sitios específicos de la matriz extracelular. Tanto el IGF-I como el IGF-II incrementan la síntesis de colágeno en cultivos primarios de osteoblastos de rata fetal, y en cultivos primarios de explantes de calvaria. Además, se ha demostrado que también incrementan la aposición de matriz extracelular y la replicación celular.

5. *Efectos sobre funciones celulares específicas.* Los IGFs son capaces de regular la secreción de hormonas en varios tipos de células (5). Así, estimulan la síntesis y secreción de hormonas en células de la teca y granulosa de ovario, y la secreción de timulina por el epitelio tímico. El tratamiento con IGF-I de células de la fasciculata adrenal incrementa el número de receptores para ACTH, y potencia la secreción de hormonas esteroideas en respuesta al ACTH. El IGF-I también estimula la secreción de hormonas en células de Leydig y en células foliculares tiroideas.

Los IGF pueden afectar una amplia variedad de funciones celulares específicas. En células somatotropas hipofisarias en cultivo, el IGF-I inhibe la secreción de GH. Este efecto es potenciado por la sobre-expresión del receptor de IGF de tipo I. Ciertas funciones de los linfocitos T citotóxicos *in vitro* son potenciadas por el IGF-I. La secreción de histamina por los basófilos en respuesta a la IgE es potenciada por el IGF-I.

Este factor de crecimiento puede también funcionar como un neuromodulador en células de Purkinje, en las cuales inhibe la secreción de ácido  $\gamma$ -aminobutírico glutamato-dependiente. El IGF-I además incrementa la migración quimiotáctica de linfocitos T, células epiteliales bronquiales, células de melanoma y de células epiteliales pigmentarias retinales.

Por otro lado, el IGF-I ejerce importantes efectos sobre el reconocimiento celular por el sistema inmune. Usando células de glioma C6, se ha demostrado que la expresión de IGF-I permite a las células evadir el sistema inmune del huésped.

El IGF-I produce efectos anabólicos, los cuales serán descritos junto con los efectos *in vivo*. Estos efectos metabólicos de los IGF pueden ser mediados por mecanismos diferentes a los que dan lugar a sus efectos mitogénicos. Incluso, en ciertas células las alteraciones en el metabolismo pueden no requerir estimulación de la actividad de TK del receptor. Se ha visto que en la mayor parte de las células que expresan receptores para IGF de tipo I, los IGF estimulan en algún grado la captación de glucosa y aminoácidos, así como la síntesis de proteínas en general. En el músculo esquelético *in vitro*, el IGF-I tiene en líneas generales efectos insulino similares, aunque a diferencia de la insulina no estimula la oxidación de glucosa. En condriocitos, fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales (38), el IGF-I aumenta la síntesis de proteínas de matriz extracelular, especialmente colágeno y proteoglicanos.

### ACCIONES IN VIVO

El uso de técnicas de ingeniería genética permitió la producción de IGF-I recombinante humano en gran escala, lo cual ha permitido conocer con mayor profundidad las acciones biológicas de los IGF *in vivo*. Así, varios estudios han implicado a estos factores en el crecimiento y el desarrollo normal del feto, en el crecimiento somático durante la vida post-natal y en el control de múltiples eventos metabólicos.

El crecimiento y desarrollo normal del feto depende de varios factores, entre los cuales figuran los factores genéticos, nutricionales y hormonales. Así como el sistema de la GH y el eje hipofisario-tiroideo son importantes para el crecimiento en la vida post na-

tal, los IGF parecen ser esenciales en el control del desarrollo fetal (5). En los primeros estadios del desarrollo fetal, la insulina de origen materno junto con el IGF-I embrionario, así como la expresión de sus receptores, estimulan el crecimiento de la masa celular. El IGF-II producido localmente por tejidos fetales parece ser muy importante, ya que se expresa antes que la insulina y el IGF-I. Este factor circula en niveles mayores que los de IGF-I durante la embriogénesis y el desarrollo fetal, y cae después del nacimiento. Por otro lado, los niveles de IGF-I comienzan a aumentar post natalmente (48). De igual manera, los niveles de los receptores para IGF-I e IGF-II se expresan en altos niveles pre-natalmente, y también caen dramáticamente después del nacimiento.

La importancia de los IGF en el desarrollo y crecimiento pre- y post-natal se ha demostrado con animales transgénicos que sobre-expresan IGF-I o GH, y con ratones que poseen deleciones en los genes que codifican para los IGF o sus receptores (5). Estos estudios muestran que el crecimiento post-natal está asociado con la expresión de IGF-I, y que la mayor parte de la actividad promotora del crecimiento post-natal de la GH es mediada por el IGF-I. Por otro lado, en la vida prenatal, el IGF-I y el IGF-II ejercen efectos esenciales (pero independientes uno del otro) sobre el crecimiento y desarrollo fetal. Estos efectos son ejercidos principalmente a través del receptor de tipo I.

La tabla I enumera una serie de situaciones o alteraciones patológicas en las que

se ve involucrado el sistema de los IGF. Algunas de ellas serán descriptas a continuación.

*Síndrome de retardo del crecimiento.* Inicialmente se sugirió que el efecto de la GH sobre el crecimiento longitudinal era mediado por una "somatomedina" circulante que derivaba del hígado. Se demostró posteriormente que este factor de sulfatación, como también se lo llamó originalmente, era el IGF-I. En síndromes de deficiencia de GH, o de resistencia a la GH, la disminución en el crecimiento corporal se acompaña de bajos niveles circulantes de IGF-I. Además, en situaciones de déficit de crecimiento en los que se administra GH y se encuentra un incremento en el crecimiento corporal subsecuente, existe un aumento concomitante en los niveles de IGF-I (8) (49).

Los efectos anabólicos a largo término del IGF-I han sido comprobados en numerosos modelos. El enanismo de tipo Laron se caracteriza por resistencia a la GH, causada por un defecto en el receptor de GH (50). Como consecuencia de ello, los niveles circulantes del IGF-I son muy bajos y no aumentan con la administración exógena de GH. En cambio, la inyección subcutánea de rhIGF-I por un período de 12 meses incrementa significativamente la velocidad de crecimiento en pacientes con síndrome de Laron.

En ratas con déficit genético de GH o hipofisectomizadas, la correlación entre el crecimiento lineal y la administración exógena de GH, es más importante que con la

**TABLA I.  
ALTERACIONES PATOLÓGICAS ASOCIADAS CON CAMBIOS  
EN LOS IGF.**

- *Síndrome de retardo de crecimiento*
  - Deficiencia de GH
  - Resistencia a la GH
  - Enanismo de Laron
  - Deficiencia del receptor de GH (Ecuador)
  - Pigmeos africanos
- *Acromegalia*
- *Alteraciones nutricionales*
  - Ayuno
  - Diabetes mellitus
- *Reparación y regeneración tisular*
  - Isquemia muscular
  - Nefrectomía unilateral
- *Cicatrización de heridas*

infusión de IGF-I (51) (52). Estos resultados sugieren que la GH estimula el crecimiento a través de la producción hepática (endocrina) de IGF-I, como así también a través de efectos locales (paracrinos) adicionales: es decir, la producción de IGF-I en las placas de crecimiento. Además, y de acuerdo con la hipótesis del "efecto dual" de la regulación del crecimiento, GH puede amplificar la respuesta de las células al IGF-I, incrementando los niveles del receptor para IGF-I. Existen otros efectos de la GH que no se observan post-tratamiento con IGF-I, tales como el aumento en los niveles de IGF-BP-3 e insulina que son importantes en la acción global de la GH. La infusión de IGF-I, a diferencia de la de GH, produce un crecimiento del bazo, el riñón y el timo, que es relativamente mayor que el crecimiento inducido en el hueso (8).

Se ha descrito también un síndrome de deficiencia del receptor para la GH en comunidades con un alto grado de consanguinidad, en las poblaciones de Loja y El Oro, en el sur de Ecuador (53). En estos pacientes existe un predominio de mujeres afectadas, y el defecto de crecimiento está caracterizado por niveles de IGF-I y II extremadamente bajos, con bajos niveles del IGF-BP-3 y de la proteína ligadora de GH (GHBP). El defecto está dado por una mutación que lleva a la delección de 8 amino-ácidos en el receptor para la GH. Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que estos pacientes responden bien al tratamiento con rhIGF-I.

En el caso de los pigmeos africanos se da una situación de resistencia a la GH. Ella es debida a un defecto, aún no identificado, que conduce a una disminución en la expresión del gen del receptor para la GH (54).

*Acromegalia.* En la acromegalia activa los niveles de IGF-I se encuentran elevados, sirviendo así como parámetro diagnóstico. Por otra parte, los niveles de IGF-II en esta patología son normales (55). Se ha analizado también la relación molar entre el IGF-I y la IGF-BP-3, encontrando un incremento en los pacientes acromegálicos. Así, se ha sugerido que esta relación refleja los niveles de IGF-I "libre" o biológicamente activa, la cual sería dependiente de los niveles de GH.

*Alteraciones de origen nutricional.* La infusión de rhIGF-I tanto en animales como en humanos, tiene efectos significativos sobre ciertos parámetros metabólicos (56). La

infusión produce una caída significativa a corto plazo en los niveles de glucosa plasmática como consecuencia de un aumento en la captación periférica de glucosa, principalmente en el músculo. Concomitantemente, la producción hepática de glucosa se ve disminuida tanto por una depresión en la glucogenólisis como por la supresión de la gluconeogénesis, ambos efectos mediados por el IGF-I. Cuando se compara con los mismos efectos de la insulina, el IGF-I es de una potencia similar en cuanto a los incrementos producidos en la captación de glucosa periférica, pero de menor potencia en cuanto a la disminución en la producción de glucosa hepática y a la inhibición de la lipólisis en tejido adiposo. Estos resultados sugerirían que los efectos del IGF-I sobre el músculo (captación de glucosa) ocurren a través de sus propios receptores, y que los efectos tanto sobre el hígado (producción de glucosa) como sobre el adipocito (reducción de la lipólisis) serían mediados por el receptor de la insulina.

Los efectos anabólicos a corto plazo han sido demostrados en animales y humanos. Se ha encontrado que el estado nutricional es uno de los principales reguladores de los niveles de IGF-I circulantes (57). La infusión de IGF-I en ratas ayunadas puede reducir la degradación de proteínas tisulares. La infusión de IGF también atenúa la necrosis tubular que ocurre luego de una oclusión arterial renal en ratas. En humanos con dieta hipocalórica, la infusión de rhIGF-I puede ser útil a corto plazo para revertir el estado catabólico, que en esta situación comúnmente se asocia con una resistencia a la GH.

Se han demostrado así efectos anabólicos del IGF-I sobre la síntesis de proteínas y el balance de nitrógeno (58), observándose en ciertos estudios un efecto positivo sobre los procesos de cicatrización, recuperación de la función renal y aumento del contenido de proteína corporal total.

La diabetes es una patología en la cual se ha remarcado el rol del IGF-I sobre el crecimiento y metabolismo celular (59). Se ha observado que ratas hipoinsulinémicas tienen bajos niveles de IGF-I y baja velocidad de crecimiento. El IGF-I restaura estos parámetros, aún sin normalizar la glucemia. Aunque tanto la insulina como el IGF-I restauran la velocidad de crecimiento global en ratas diabéticas, la insulina produce un aumento proporcionalmente mayor en el contenido de

grasa corporal. Este patrón de respuesta podría reflejar la mayor abundancia relativa en los adipocitos de receptores de insulina, que de receptores para IGF-I. También se ha demostrado la capacidad del IGF-I para aumentar la sensibilidad a la insulina en pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente. Estos estudios sugieren la posibilidad del tratamiento con IGF-I en casos de resistencia insulínica importante.

*Reparación y regeneración tisular.* Utilizando diferentes modelos experimentales, así como estudios en humanos, se ha demostrado el rol potencial de los IGF en la regeneración de tejidos. Por ejemplo, la isquemia del músculo esquelético produce un incremento en los niveles de IGF-I en células involucradas en la reparación del daño muscular. Esto es el resultado de una síntesis local del IGF-I, el cual promueve la proliferación y diferenciación de mioblastos (44). Similarmente, el rol de los IGF en estos procesos ha sido demostrado usando animales "knock out" para IGF o sus receptores.

La nefrectomía unilateral tanto en ratas como en humanos conduce a un incremento compensatorio del riñón remanente, secundario a un proceso de hipertrofia e hiperplasia. En este contexto, se ha demostrado en la rata que los niveles tisulares de IGF-I en el riñón remanente se encuentran aumentados (60).

*Procesos de cicatrización.* Otro efecto biológico importante del IGF-I es promover la cicatrización de heridas. La producción local de IGF-I por macrófagos invasivos induce la proliferación de fibroblastos y la migración de células epiteliales, importantes en la re-epitelización. El IGF-I funciona así en una forma autocrina/paracrina sobre las células del tejido epitelial y conectivo (61). Actualmente se está evaluando el uso del IGF-I, solo o en combinación con IGFBP y/u otros factores de crecimiento, para el tratamiento de determinado tipo de heridas.

*Efectos autocrino/paracrina versus endocrino de los IGF.* Como se ha descrito previamente, el IGF-I y el IGF-II poseen potentes efectos mitogénicos y metabólicos cuando se agregan exógenamente y cuando son secretados por células en cultivo. Además, dado que los IGF son sintetizados y secretados por muchos tejidos en animales

intactos, y dado que los receptores para IGF se hallan ampliamente distribuidos, se cree que en ciertos tejidos el IGF-I y el IGF-II tienen un modo de acción fundamentalmente autocrino/paracrina. Usando diferentes modelos se ha podido diferenciar este modo de acción del endocrino.

## Proteínas ligadoras de los IGF (IGFBP)

### CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES GENERALES

Los IGF circulan en el plasma unidos a proteínas ligadoras o transportadoras (5) (6). Se puede dividir a estas proteínas transportadoras (o IGFBP) en dos grupos de acuerdo con su peso molecular. El primer grupo incluye las de alto peso molecular, que se asocian formando un complejo de 150 kDa, el cual une aproximadamente el 90% de todos los IGF circulantes. Este complejo está integrado por los IGF (I y II), una proteína ligadora denominada IGFBP3 de 40 kDa, y un tercer componente llamado subunidad ácido lábil (ALS) de peso molecular 60 kDa, que no se une al IGF sino al complejo IGF-IGFBP-3. Este complejo ternario aumenta la vida media del IGF de pocos minutos a unas 12 h (62). El segundo grupo está formado por las IGFBP de bajo peso molecular, que en plasma son esencialmente tres: IGFBP-1, IGFBP-2 e IGFBP-4. En otros fluidos corporales se han encontrado IGFBP-5 y -6, también de bajo peso molecular, cuya concentración plasmática es muy baja. En resumen, se han descrito seis IGFBP de diferentes tamaños para dos IGF. ¿Cuál es la razón de esta variedad de IGFBP? ¿Ejercen diferentes efectos sobre las acciones de los IGF?

La tabla II resume las diferentes características y funciones de las IGFBP. En líneas generales se puede ver que algunas poseen en su estructura la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), que es la secuencia de consenso para la unión de ciertas proteínas de matriz extracelular a los receptores conocidos como integrinas (63). Otras son glicoproteínas, mientras que otras pueden ser fosforiladas/defosforiladas. Individualmente difieren en su afinidad por cada uno de los IGF, aunque esta afinidad es normalmente del orden de  $10^{-10}$  M o mayor. Por otro lado, la afinidad intrínseca de las IGFBP por



TABLA II.  
PROPIEDADES DE LA IGFbps HUMANAS.

Proteína	Peso molecular (kDA)	Estructura	Afinidad relativa	Regulación in vivo	Efectos sobre IGF
IGFBP-1	25	RGD* Fosforilada	IGF-II = IGF-I	Insulina y glucosa ↓ Glucocort ↑ Desarrollo	↓ Fosfor Ser ↑ No fosfor.
IGFBP-2	31,4	RGD	IGF-II > IGF-I	Insulina ↓ IGF-I ↑ Desarrollo	↑
IGFBP-3	28,7	N-glicosilada	IGF-II = IGF-I	GH / IGF-I ↑	↓ ↑ asociación a la célula
IGFBP-4	26	N-glicosilada	IGF-II = IGF-I		↓
IGFBP-5	22,5		IGF-II > IGF-I		↓ o ↑
IGFBP-6	28,0	O-glicosilada	IGF-II > IGF-I		↓

\* tripéptido Arg-Gly-Asp

↑: indica un efecto estimulatorio

↓: indica un efecto inhibitorio

IGF-I puede ser modificada por su asociación con la superficie celular, con la matriz extracelular, o por fosforilación.

Existe un alto grado de homología de secuencia entre las distintas IGFBP (40-50%). También entre las distintas especies, donde se ha observado un grado considerable de conservación.

Se conocen las regiones del IGF-I y del IGF-II que están involucradas en la unión a las IGFBP-1, -2 y -3. Estos sitios difieren de los de unión a los receptores.

Como se ha mencionado anteriormente, la vida media del complejo de 150 kDa es de aproximadamente 14-18 h, la de la fracción de bajo peso molecular es de 30 min, y la del IGF-I libre es de sólo 10 min.

Existen proteasas específicas para las IGFBP que pueden degradarlas en ciertas condiciones, y así modular la acción de los IGF.

#### CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES GENERALES

Las IGFBP transportan IGF-I e IGF-II en forma específica y con alta afinidad. Originalmente estas proteínas se observaron usando cromatografía de exclusión molecular y el método de Western Ligand Blot (WLB) (fig. 4).

Las IGFBP previenen los efectos metabólicos agudos (tales como la hipoglucemia) que provocarían los IGF en ausencia de las proteínas ligadoras. Esto es debido a que la concentración plasmática de los IGF es aproximadamente 100-1000 veces mayor que la de la insulina circulante (64).

Las IGFBP de bajo peso molecular pueden atravesar la barrera capilar, en cambio las mayoritarias de alto peso molecular no la atraviesan. De esta manera las proteínas ligadoras pueden restringir la salida del IGF del espacio vascular (principalmente la IGFBP-3) y prolongar así la vida media de los IGF (5).

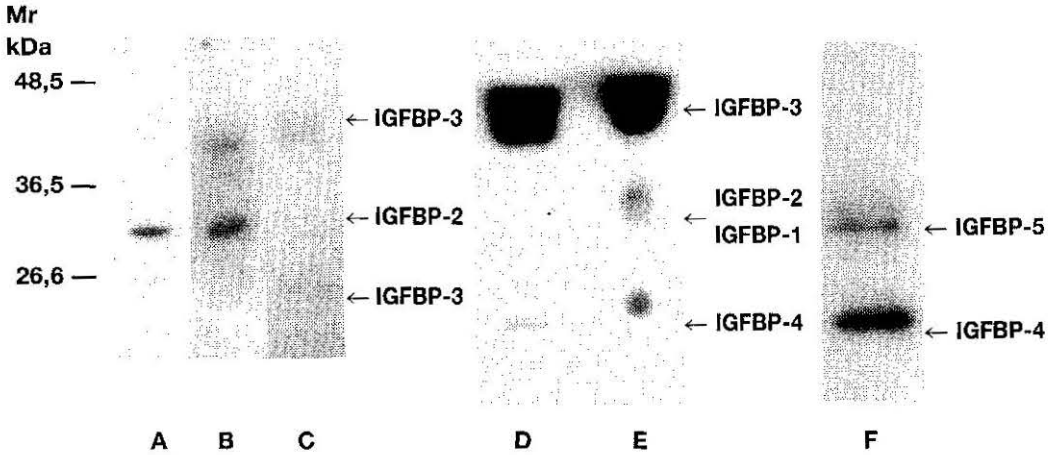
Se ha demostrado que las IGFBP son capaces de modular la acción de los IGF a nivel celular. Esto puede lograrse por dos mecanismos opuestos: por un lado, restringiendo el acceso a los receptores, lo cual inhibe el crecimiento celular; y por otro, facilitando el acceso y aumentando la interacción de los IGF con el receptor.

#### DISTRIBUCIÓN DE LAS IGFbps

Las IGFbps se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo, no sólo en el suero sino también en diferentes fluidos corporales, según se observa en la tabla III.



Fig. 4.



Western ligand blot para IGFBP de diferentes fuentes: (A) medio condicionado de células  $\beta$  Hit-T15; (B) suero bovino fetal; (C) medio condicionado de fibroblastos Swiss 3T3 de ratón; (D) suero humano adulto normal; (E) suero de rata; (F) medio condicionado de células de osteosarcoma de rata UMR106. A la izquierda de la figura se muestran los marcadores de pesos moleculares precolorados. A la derecha de cada panel se indican las posiciones de las diferentes proteínas ligadoras de los IGF (IGFBP-1 a -5).

### IGFBP-1

Esta proteína fue la primera de las proteínas ligadoras de IGF que se purificó. Se obtuvo originalmente de líquido amniótico, placenta y endometrio humano, llamándose proteína placentaria 12, y no se reconoció su función hasta mucho tiempo después (65). Es sintetizada por el endometrio secretor y decidua, y existe en grandes cantidades en el líquido amniótico. También se ha aislado del medio de cultivo de células de hepatoma HepG2. La concentración plasmática en el adulto en ayunas, oscila entre 0,02 y 0,04 mg/l.

### Estructura

Contiene la secuencia RGD en su extremo carboxilo terminal. Este descubrimiento ha llevado a considerar la posibilidad de la asociación de IGFBP-1 con las integrinas, que son receptores de superficie celular las cuales reconocen ciertas proteínas de matriz extracelular. El agregado exógeno del tripéptido sintético RGD produce una inhibición de la unión de IGFBP-1 a la superficie de determinadas células, y consecuentemente un bloqueo de la respuesta proliferativa celular secundaria a esta unión (5) (66).

Algunas proteínas de matriz extracelu-

lar pueden formar oligómeros, y así aumentar su afinidad por el receptor de integrinas. Se ha observado que la IGFBP-1 a pH neutro también se oligomeriza por medio de la formación de puentes disulfuro.

La IGFBP-1 se puede fosforilar intracelularmente en residuos de serina, y se ha demostrado que un determinante de su actividad es su grado de fosforilación (67). Este grado de fosforilación define la existencia de distintas isoformas, con diferentes números de fosfatos. Así, la incubación con fosfatasa alcalina modifica su actividad. La IGFBP-1 fosforilada tiene aproximadamente 6 veces más afinidad por el IGF-I que la IGFBP-1 no fosforilada. De esta manera, la isoforma defosforilada de la IGFBP-1 aumenta la actividad biológica del IGF. Una isoforma de IGFBP-1 con baja afinidad por el IGF-I (es decir, con afinidad semejante al receptor de tipo I) permitiría que este factor de crecimiento se particione entre el receptor de IGF y un receptor de integrinas (ya que este último une IGFBP-1), lo cual probablemente potencia los efectos del IGF. Por otro lado, una isoforma de IGFBP-1 con alta afinidad atraparía al IGF, sin dejarle acceso al receptor, y de esta manera inhibiría la respuesta mitogénica del IGF (5).

**TABLA III.**  
**DISTRIBUCIÓN DE LAS IGFBP.**

<i>Líquidos extracelulares</i>	<i>IGFBPs</i>
Plasma humano adulto	Heterogéneo: IGFBP-3 - complejo de 150 kDa IGFBP-2, 4, 6 - fracción de 50 kDa
Suero de rata adulta	También IGFBP-5
Líquido cefalorraquídeo (LCR) humano	IGFBP de 34 kDa = IGFBP-2 IGFBP de 30-32 kDa = IGFBP-6 Fragmento de 22 kDa = IGFBP-5 IGFBP de 30 kDa glicosilada = IGFBP-3
LCR de rata	IGFBP-2 (predominante), IGFBP-3 (menor%)
LCR bovino	IGFBP-2 (de 30,5 kDa)
Líquido Amniótico humano	IGFBP-1 (principal), conc. 100-500 x mayor que el suero IGFBP-3, conc. 1/15 la de IGFBP-1, no detectada por WLB
Líquido Amniótico de rata	IGFBP-6, niveles similares al suero IGFBP-2 (principal), (diferencia con el humano)
Linfá humana	Fracción principal: 50 kDa (por gel filtración). No 150 kDa
Linfá de rata	IGFBP-3 (principal), en el complejo de 150 kDa (diferencia con el humano)
Linfá de vaca	IGFBP-1, 2 y 4, aumentadas respecto a IGFBP-3 (= humano)
Líquido folicular humano	IGFBP-1. También están presentes IGFBP-3 y 2
Leche humana, porcina y calostro	Complejo de 150 kDa y también el de 50 kDa IGFBP-3, IGFBP-2 y una de 24 kDa
Plasma seminal humano	IGFBP-2 y posiblemente IGFBP-4. IGFBP-3 no detectada
Fluido vítreo de rata	IGFBP-2 (principal), más baja en adultos. IGFBP-6 ?
Orina normal, concentrada por filtración	IGFBP-2, menos IGFBP-3 que el suero. Otras formas de bajo PM

IGFBP-1 es codificado por un gen de copia simple de 5,2 kb y que posee 4 exones. Este gen se ha localizado en la banda p12-p13 del cromosoma 7 (65). El gen de IGFBP-1 humano es regulado positivamente por el cAMP, y en forma negativa por la insulina. Aunque su ARNm se expresa en varios tejidos, es particularmente abundante en el hígado fetal y el endometrio. Los niveles de ARNm hepático para IGFBP-1 están aumentados en pacientes diabéticos y durante el ayuno. Su expresión también está aumentada en hepatocarcinoma, mientras que en células de hepatoma de rata la expresión es inducida por dexametasona, cAMP y ésteres de forbol, e inhibida por insulina. Estas moléculas regulan la expresi-

ión del ARNm para IGFBP-1 predominantemente a nivel transcripcional.

### Regulación

*Regulación in vivo.* Los niveles de IGFBP-1 son regulados principalmente por factores metabólicos y hormonales (65).

Su concentración plasmática es mayor en mujeres que en hombres. Además, en mujeres embarazadas aumenta durante el tercer trimestre de gestación.

Su expresión es reprimida durante las comidas, y aumenta durante el ayuno nocturno, lo cual define un ritmo circadiano bien marcado.

En general, los niveles circulantes en el

adulto son bajos, y muestran una correlación negativa con la edad. De hecho tanto los niveles de la proteína como el ARNm son regulados a través del desarrollo, siendo más altos en el feto y disminuyendo después del nacimiento hasta alcanzar los niveles del adulto.

La insulina parece ser el determinante fisiológico más importante de la expresión de IGFBP-1, aunque la glucosa también podría tener un rol independiente. La IGFBP-1 se encuentra aumentada en situaciones donde la concentración de insulina disminuye: es decir, en el ayuno, diabetes y ejercicio prolongado.

La IGFBP-1 puede actuar también como hormona contrarreguladora de la insulina, previniendo los efectos hipoglucemiantes del IGF-I cuando la disponibilidad de glucosa es baja.

Otros factores también regulan la expresión de la IGFBP-1: los glucocorticoides la aumentan, un efecto independiente de la insulina; los análogos de la somatostatina también aumentan el IGFBP-1; la infusión de EGF en ratas neonatas provoca un retardo en el crecimiento, disminución en los niveles de IGF-I y aumento en la expresión de IGFBP-1.

*Regulación in vitro.* Estudios *in vitro* confirman la regulación metabólica y hormonal de la IGFBP-1 (65), siendo la insulina y la glucosa los determinantes más importantes. También se ha demostrado que los glucocorticoides, los agentes que estimulan el cAMP y el EGF en células de origen hepático inducen tanto la IGFBP1 como su ARNm.

### **IGFBP-2**

Esta proteína ligadora se purificó originalmente de células BRL-3A de rata, y de células MDBK de riñón bovino (65). También se la ha purificado de suero humano (68) y del medio de cultivo de astrocitos de cerebro de ratas de 21 días (69).

### **Estructura del gen y la proteína**

El gen de IGFBP-2 humano está localizado en la banda q33-q34 del cromosoma humano 2, y tiene un tamaño de 32 kb (65).

Es una proteína algo mayor que las otras IGFBP (con excepción de la IGFBP-3). Posee un peso molecular de entre 29,5 y 31 kDa. Las diferencias de tamaño derivan

principalmente de la inserción de 10 a 14 aminoácidos en el exón 1 de la IGFBP-2 bovina y humana. La secuencia de aminoácidos de la IGFBP-2 de rata, humano y bovino comparten un 80% de identidad en los exones 1 y 2, 98% en el 3 y 89% en el 4. En todos los casos, la proteína madura contiene 18 cisteínas conservadas.

Al igual que la IGFBP-1, la IGFBP-2 posee una secuencia RGD cerca del extremo carboxilo terminal. Así, la IGFBP-2 se ha encontrado asociada con proteínas de membrana de células de carcinoma de pulmón.

No se ha demostrado que exista glicosilación ni fosforilación de esta proteína.

El ARNm de la IGFBP-2 se expresa en altos niveles en varios tejidos (en especial en hígado), y es regulado inversamente con el desarrollo. En la rata adulta, su expresión persiste en el plexo coroide del cerebro, y también en tejido ovárico y testicular.

### **Regulación**

*Regulación in vivo.* Esta proteína es regulada a través del desarrollo: en la rata se ha visto que sus niveles son relativamente elevados en el feto y disminuyen postnatalmente (70). En el hombre, los niveles en sangre de cordón son más altos que los del suero de individuos adultos. En el suero fetal bovino, analizado por WLB, se encuentra un aumento relativo de IGFBP-2 sobre IGFBP-3 (fig. 4).

La insulina es el principal regulador metabólico de la IGFBP-2. Los niveles de ARNm están aumentados en el hígado de ratas hipofisectomizadas, diabéticas y ayunadas, condiciones asociadas con niveles de insulina circulantes disminuidos (71).

En el caso de hipoglucemia debida a tumores de células extrapancreáticas con disminución de insulina circulante, la IGFBP-2 se encuentra aumentada. También se observa un aumento de IGFBP-2 en el hipopituitarismo, y post-infusión de IGF-I (72).

En hombres que padecen cáncer de próstata se ha observado un aumento en los niveles de IGFBP-2.

Asimismo, esta proteína ligadora se halla aumentada en casos de deficiencia de GH o del receptor de GH (72).

La infusión de GH en sujetos normales aumenta la concentración de insulina e IGF-I, pero no altera los niveles de IGFBP-2.

Se ha encontrado que los niveles de IGF-

BP-2 plasmáticos responden menos a las alteraciones metabólicas agudas que los de IGFBP-1 (73) y, a diferencia de IGFBP-1, muestran mínimas variaciones circadianas.

*Regulación in vitro.* La regulación *in vitro* de esta proteína, depende del modelo utilizado para su estudio (65):

En hepatocitos de rata, la IGFBP-2 basal es baja pero aumenta en respuesta al ácido retinoico y es suprimida por la insulina.

En calvaria de rata neonatal, los niveles de IGFBP-2 basales son altos y disminuyen en respuesta al ácido retinoico. En estas células la insulina no tiene efecto sobre la expresión de IGFBP-2. Bajas dosis de  $\beta$ -estradiol la disminuyen, pero altas concentraciones la aumentan. La dexametasona suprime la IGFBP-2 en un 90%, mientras que IGF-I y  $1,25\text{-(OH)}_2$  vitD<sub>3</sub> aumentan sus niveles (74).

En astrocitos de rata neonatal, bFGF y EGF aumentan la expresión de IGFBP-2.

En células obtenidas de estroma endometrial humano, tanto los estrógenos como la progesterona estimulan los niveles del ARNm para IGFBP-2.

En células de cáncer de mama humano, IGF-I aumenta la concentración de IGFBP-2 sin cambios en los niveles del ARNm, a través de un mecanismo mediado por el receptor para IGF de tipo I.

En riñón fetal humano, la insulina y el IGF-I aumentan la IGFBP-2 (y la síntesis de proteínas en general), sin alterar la transcripción del ARNm de IGFBP-2. En células MDBK, tanto la IGFBP-2 como su ARNm disminuyen un 75% después de 48 h de incubación con forskolina.

En células obtenidas de músculo liso vascular porcino, se ha observado que una IGFBP de 31 kDa aumenta post-tratamiento con insulina o con IGF-I, y disminuye por incubación con dexametasona (75).

En células pancreáticas  $\beta$  HIT-T15 clonadas, forskolina induce el aumento de una IGFBP de 30 kDa, presumiblemente IGFBP-2 (76) (fig. 4). Un efecto similar se ha observado en el medio de cultivos de islotes de Langerhans de hámster, estimulados con altas concentraciones de glucosa (77).

### IGFBP-3

Ha sido purificada de múltiples fuentes: plasma humano, suero de rata, suero porcino, suero bovino, líquido folicular ovárico y fibroblastos Swiss 3T3 de ratón (65).

### Estructura del gen y la proteína

El gen que codifica para la IGFBP-3 se encuentra en el cromosoma 7, a 20 kb del gen de IGFBP-1 (78). Los principales sitios de expresión de IGFBP-3 en la rata son el riñón, tejido gástrico y placenta. En el hígado, por técnicas de hibridización *in situ*, se la ha localizado en tejido no parenquimatoso, especialmente en vena porta y endotelio sinusoidal.

Se diferencia de las otras IGFBP por su capacidad para asociarse con una subunidad ácido lábil (ALS) y con el IGF, formando de esta manera un complejo ternario de 150 kDa.

Su concentración plasmática oscila entre 3 y 5 mg/l (tomando como base estándares glicosilados; ver sección de Métodos de ensayo). Por análisis de Western Ligand Blot (WLB), aparece como un doblete de aproximadamente 40 kDa (fig. 4). El doblete de IGFBP-3 se debe a la existencia de formas glicosiladas. Contiene en su secuencia tres sitios potenciales de N-glicosilación. La forma no glicosilada, tal como se expresa en *E. coli* transfectada, es de aproximadamente 30 kDa, y aparece como una banda simple cuando se analiza por WLB.

La IGFBP-3 humana posee un sitio de unión para IGF con una  $K_a = 2\text{-}3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , y una afinidad similar para IGF-I y II. La IGFBP-3 de rata posee una  $K_a = 7\text{-}10 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ . La alta afinidad de esta proteína por los IGF plantea el problema de cómo se disocian del complejo de 150 kDa. Una posibilidad parece ser la presencia de proteasas específicas para la proteína ligadora, cuya acción disminuya la afinidad de la IGFBP-3 por los IGF (5).

Las proteínas de origen humano, bovino, porcino y de rata, comparten aproximadamente 80% de homología de secuencia entre sí.

Esta IGFBP no contiene la secuencia RGD. En humanos, transporta aproximadamente el 90% de los IGF circulantes. Es la proteína transportadora de IGF mayoritaria durante la vida post-natal. Se la ha encontrado también en otros líquidos corporales.

### Regulación

*Regulación in vivo.* La concentración plasmática de la IGFBP-3 disminuye hasta un 80% en el hipopituitarismo y en la defi-



ciencia de GH. De esta forma el dosaje de esta proteína sería útil en el diagnóstico de niños con deficiencia de GH. Por otro lado, aumenta 2-3 veces en pacientes acromegálicos, y post-inyección de GH (79-81).

Los niveles de IGFBP-3 correlacionan con los de IGF-I, de tal manera que su concentración baja cuando el IGF-I disminuye y aumenta luego de la inyección de IGF-I. Así, el IGF-I parece ser el regulador más importante de los niveles de la IGFBP-3, siendo los efectos de la GH indirectos (es decir, mediados a través del IGF-I).

La edad es otro factor determinante. Los niveles de IGFBP-3 son bajos en niños, luego aumentan aproximadamente al triple en la pubertad y finalmente en el adulto disminuyen lentamente con la edad. Este patrón es muy semejante al del IGF-I, aunque el pico de IGF-I en la pubertad es mucho más marcado.

Dado que la IGFBP-3 es la proteína transportadora de IGF mayoritaria en circulación, se ha sugerido que la relación molar IGF-I/IGFBP-3 refleja el IGF-I "libre" o biológicamente activo (55). Se ha encontrado que la disminución de IGF-I con la edad es más rápida que la de IGFBP-3, observándose así una disminución en la relación IGF-I/IGFBP-3. Así, la bioactividad del IGF-I decae con la edad.

Se ha observado que los niveles de IGF total aumentan durante el embarazo. La IGFBP-3 (medida por radioinmunoensayo) se encuentra también aumentada, pero disminuye su afinidad por el IGF-I según se observa por Western Ligand Blot. Esto quizá signifique un aumento en la biodisponibilidad del IGF (82-84).

La IGFBP-3 muestra muy pocas variaciones circadianas, o cambios con el ayuno de corto término.

En la rata, se ha demostrado que disminuye la concentración plasmática de IGFBP-3 después de la hipofisectomía, al igual que en ratones transgénicos deficientes en GH. Esta disminución se puede restaurar por medio de la terapia con GH, por infusión de IGF-I, o a través de la sobre-expresión de IGF-I en los ratones transgénicos deficientes en GH (65). Estos resultados sugieren que IGF-I sería el regulador primario de los niveles de IGFBP-3 en el animal intacto.

*Regulación in vitro.* Distintos tipos celulares sintetizan y secretan IGFBP-3 en el

medio de cultivo. Por ejemplo, los cultivos primarios de hepatocitos sólo sintetizan ALS, IGF y algunas IGFBP, pero no IGFBP-3. Sí secretan IGFBP-3: células de hepatoma HEP 3B, células de rhabdomyosarcoma, células de endotelio vascular, astrocitos, células gliales, fibroblastos de piel y de hueso, fibroblastos Swiss 3T3, células de Sertoli, condriocitos y osteoblastos.

La regulación de la secreción de IGFBP-3 depende del tipo y origen celular, así como de la especie animal en cuestión (tabla IV).

### SUBUNIDAD ÁCIDO LÁBIL (ALS)

#### Estructura

El complejo ternario plasmático de 150 kDa está compuesto por IGF-I o IGF-II, IGFBP-3 y la ALS. Esta ALS es inestable a pH menor de 5, por lo cual no puede recuperarse por medio de la gel-filtración a pH 3 normalmente usada para disociar y separar los IGF de sus proteínas transportadoras (ver sección Métodos de ensayo).

La ALS fue purificada por Baxter y colaboradores en 1989 (86) a partir de plasma humano. Aparece como un doblete de 84-86 kDa cuando se lo fracciona por SDS-PAGE, lo cual probablemente represente variantes con diferente grado de glicosilación. La ALS es sintetizada mayormente en el hígado.

La ALS no se une a la IGFBP-3 en ausencia de IGF-I o II. La afinidad de unión de la ALS al complejo IGF/IGFBP-3 es de  $6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ , dos órdenes de magnitud menor que la afinidad de unión entre la IGFBP-3 y el IGF-I (entre  $2 \cdot 10^{10}$  y  $3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ).

La afinidad de unión del ALS al complejo IGF-I/IGFBP-3 es dos veces mayor en ausencia de sales, que en presencia de 0,15 M NaCl. La heparina, probablemente actuando como un polianión (dado que su efecto es revertido por sulfato de protamina), inhibe la unión de ALS al complejo, pero no afecta la asociación de IGF-I con IGFBP-3. El heparán sulfato y el condrotín sulfato también inhiben la formación del complejo ternario, pero menos efectivamente que la heparina. Baxter ha propuesto que los proteoglicanos, presentes en la superficie de las células endoteliales capilares, podrían facilitar la disociación de ALS del complejo ternario, liberando así el complejo IGF/IGFBP-3. Éste podría ser un posible mecanismo para que los IGF ingresen al espacio extravascular (87).



**TABLA IV.**  
**REGULACIÓN IN VITRO DE LA PRODUCCIÓN DE IGFBP-3.**

<i>Tipo celular</i>	<i>Aumenta</i>	<i>Disminuye</i>
Fibroblastos de piel humana	constitutiva	
Fibroblastos Swiss 3T3	IGF-I, EGF, PDGF, TPA, Bombesina, vasopresina	Dexametasona, IBMX
MDBK	Forskolina (IGFBP-3 y ARNm) Insulina, Análogos de IGF	
Células tiroideas de cabra	EGF, Éster de forbol, TPA (agentes que estimulan la proliferación)	Hormonas y/o tirotropina
Células endoteliales humanas	GH o Insulina no afectan	
Fibroblastos humanos	IGF, FGF, no GH, TGF $\beta$	Dexametasona
Fibroblastos diploides humanos normales senescentes	aumento de IGFBP-3 y ARNm	
Hueso: calvaria de rata recién nacida, Osteoblastos PyMS	PGE <sub>2</sub> (ARNm y prot), GH o IGF-I Estradiol	Cortisol
Sistema reproductor: células de granulosa porcina	EGF	TGF $\beta$ , FSH
Células de Sertoli	IGF-I	FSH, db cAMP
Células de cáncer de mama	Ácido retinoico	

### Regulación

La ALS inmunorreactiva ha sido detectada en plasma, pero no en líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo o plasma seminal.

La concentración de ALS es dos veces mayor que la de IGFBP-3, y puede detectarse ALS libre en plasma. Esto significa que prácticamente todo el complejo IGFBP-3/IGF es convertido al complejo ternario.

Los niveles plasmáticos de ALS son 5 veces mayores en la adolescencia que en el período neonatal, y presentan una leve disminución en la población geriátrica (88). ALS se encuentra aumentado al doble en la acromegalia, y disminuido a la cuarta parte en la deficiencia de GH. Esta dependencia es similar a la encontrada para IGFBP-3.

La síntesis (o activación) de ALS se encuentra regulada en forma directa por GH.

### IGFBP-4

La IGFBP-4 se ha purificado a partir de varias líneas celulares: osteoblastos UMR106 y fibroblastos en cultivo; células de carcinoma de próstata PC3; sarcomas osteogénicos humanos TE89 y U-1; células de carcinoma de colon humano HT29; de glioblastoma humano T98G; de neuroblastoma de rata B104. También se la ha aislado de suero de rata, plasma bovino y de plasma humano. La IGFBP-4 es la segunda en abundancia de las proteínas transportadoras de IGF en el suero de rata (fig. 4) (65).

### Estructura del gen y la proteína

Su ARNm específico se expresa mayoritariamente en el hígado, aunque también se ha demostrado su expresión en otros te-

jididos. No se ha identificado en su estructura la secuencia RGD.

Además de los 18 residuos de cisteína conservados en todas las IGFBP, la IGFBP-4 contiene dos residuos de cisteína en la región no conservada de la proteína.

Existen formas glicosiladas y no glicosiladas, ya que esta proteína posee un sitio potencial de N-glicosilación.

Se puede identificar fácilmente por Western Ligand Blot en plasma humano, como una banda que migra con peso molecular aparente de 24-30 kDa, siendo la de mayor masa una variante glicosilada (fig. 4).

### Regulación

*Regulación in vivo.* En un estudio reciente se ha encontrado un aumento de IGFBP-4 circulante (determinada por Western Ligand Blot) en mujeres de edad avanzada con fracturas óseas, con respecto a mujeres de la misma edad sin fracturas. También se ha observado una fuerte correlación entre la concentración plasmática de IGFBP-4 y los niveles de PTH. Esto podría explicar la disminución en el funcionalismo de los osteoblastos en la osteoporosis dependiente de la edad, dado que IGFBP-4 inhibe la actividad mitogénica del IGF sobre los osteoblastos.

*Regulación in vitro.* Su principal mecanismo de regulación es mediado por cAMP. Los estudios realizados en sistemas de cultivos celulares se resumen en la tabla V.

### IGFBP-5

Esta proteína se ha purificado del suero de rata, y de hueso humano (89) (90). No se la ha encontrado en suero humano. También se la ha aislado de células de glioblastoma humano T98G (91). Se ha demostrado su expresión en fibroblastos humanos, donde es inducible por IGF.

### Estructura del gen y la proteína

Por técnicas de Western Ligand Blot se la puede ver como una banda de 29 kDa (fig. 4).

Es una proteína O-glicosilada, pero el sitio de esta glicosilación es desconocido.

Esta proteína contiene una región de aminoácidos básicos altamente cargados, que incluyen una secuencia de consenso para la unión de heparina. Esto podría ser im-

portante para su unión a glicosaminoglicanos. La IGFBP-5 contiene las 18 cisteínas conservadas, pero no posee sitios de N-glicosilación ni la secuencia RGD.

Tiene una afinidad para IGF-II 10 veces mayor que para IGF-I.

El gen que codifica para IGFBP-5 se encuentra en el cromosoma 2, muy cerca del gen de IGFBP-2, aunque con la orientación opuesta. Contiene 4 exones y un primer intrón inusualmente grande de 25 kb. Los ARNm específicos para IGFBP-5 son expresados mayoritariamente en el riñón, y por análisis de Northern Blot muestran un tamaño de aproximadamente 6 kb.

### Regulación

*Regulación in vivo.* En ratas hipofisectomizadas hay un aumento en los niveles tanto del ARNm como de IGFBP-5. Esto se ha demostrado para la proteína ligadora asociada a la membrana en túbulo proximal y en glomérulo renal de la rata. Existe además una regulación específica de tejido (6).

Por otro lado, una dieta baja en proteínas induce cambios similares a los de la hipofisectomía sobre la expresión de IGFBP-5 en el riñón de la rata.

*Regulación in vitro.* En cultivo de fibroblastos humanos, esta proteína ligadora es secretada al medio de cultivo como respuesta al IGF-I e IGF-II. Sin embargo, la insulina y la GH no afectan su expresión.

En cultivos de fibroblastos fetales humanos, IGF-I e IGF-II provocan el aumento significativo de una IGFBP de 30 kDa (91), mientras que la insulina induce sólo un aumento pequeño. Dicha estimulación con IGF-I parece requerir una interacción directa con ciertas IGFBP, y es menos dependiente de la unión del IGF-I a su receptor de tipo I. Adicionalmente, en este medio de cultivo de fibroblastos, se ha identificado inmunológicamente la presencia de IGFBP-5 post-incubación con IGF-I. Este aumento no es acompañado por un aumento en el ARNm específico para IGFBP-5, lo cual sugiere que IGF-I y II actúan inhibiendo la proteólisis de IGFBP-5. Por otro lado, la forskolina produce un aumento en el ARNm y la secreción de IGFBP-5, en fibroblastos de piel fetal humanos.

Los cultivos confluentes de mioblastos C2 (92) se diferencian a miocitos 48 h después

**TABLA V.**  
**REGULACIÓN IN VITRO DE LA PRODUCCIÓN DE IGFBP-4.**

Tipo celular	Aumenta	Disminuye
Hueso humano: Células de osteosarcoma TE89	db cAMP, forskolina PTH: aumenta prot. y ARNm	
Cultivos primarios de células de hueso humano	db cAMP	
Hueso de rata: UMR106 de osteosarcoma	PTH: aumenta una BP-29 kDa agentes vía cAMP: aum BP24	
Hueso de rata: Calvaria de rata fetal		$\beta$ -Estradiol: dismin una BP-24
Hueso de ratón: Osteoblastos MC3T3E1	1,25(OH) <sub>2</sub> vitD <sub>3</sub>	
Células de neuroblastoma B104	IGF-I y alta concentración de Insulina	IGF-II
Células endoteliales paratiroides bovina	Forskolina y agentes vía cAMP: aumentan la proteína y la ARNm	
Fibroblastos de piel de feto humano	Forskolina: aumenta ARNm Insulina	IGF-III
Células de estroma decidua humano	Insulina	IGF-I
Células de carcinoma de mama humano	Ac retinoico: aumenta la proteína y el ARNm	
Células de musculo liso vascular	PDGF	
Mioblastos L6	bFGF, Insulina	Trombina, TGF $\beta$

de reemplazar en el medio de cultivo, suero bovino fetal por suero de caballo. Este cambio se asocia con un aumento en 25 veces del IGF-II, un incremento pequeño y transitorio de IGF-I, un incremento en los receptores para IGF de tipo I y II, y un aumento en una IGFBP de 29 kDa, identificada como IGFBP-5. En otro sistema, se observa el aumento de una IGFBP de 31 kDa (posiblemente IGFBP-5), cuando mioblastos de rata L6 se diferencian a miocitos. La secreción de esta IGFBP de 31 kDa es incrementada por IGF-I, y en menor grado por altas concentraciones de insulina.

En células de tiroides de rata FRTL5, tanto la IGFBP-5 como su ARNm se estimulan por incubación con IGF-I, y en menor proporción por IGF-II e insulina. Esto indicaría que el efecto podría ser mediado por el receptor de IGF de tipo I.

En células de osteosarcoma de rata UMR106, PTH y otros agentes que aumentan tanto el cAMP como el db-cAMP, incrementan el ARNm y la expresión de IGFBP-5. En osteoblastos humanos, el ARNm y la proteína disminuyen con el agregado de cortisol (65). Por otro lado, la incubación de células osteoblásticas de ratón MC3T3E1 con

1,25-(OH)<sub>2</sub> vit D<sub>3</sub>, aumenta la secreción de IGFBP-5 14 veces después de 24 h de incubación, y su ARNm 8 veces después de 8 h (93).

### IGFBP-6

Esta proteína ligadora se ha purificado de líquido cefalorraquídeo (LCR) de adultos y niños, y de fibroblastos de pulmón humanos normales o transfectados con el virus SV40. También se la ha encontrado en suero humano, suero de rata, líquido folicular ovárico porcino, y en la línea de células de osteosarcoma humano U-2 (65).

#### Estructura del gen y la proteína

En el humano contiene un sitio potencial de N-glicosilación.

Posee mucha mayor afinidad por el IGF-II (10<sup>11</sup> M<sup>-1</sup>) que por el IGF-I (10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>).

Su concentración plasmática es de 0,2 mg/l.

En la rata, los niveles más altos de ARNm para la IGFBP-6 se encuentran en pulmón. Tanto en la rata como en el humano, la IGFBP-6 se halla O-glicosilada. Esto da origen a formas diversas con peso molecular entre 28 y 34 kDa.

Posee una serie de residuos de aminoácidos básicos con elevada densidad de carga, que podrían intervenir en la unión a glicosaminoglicanos.

El gen que codifica para el IGFBP-6 humano se encuentra en el cromosoma 12.

#### Regulación

*Regulación in vivo.* Aunque uno de los sitios originales de identificación de la IGFBP-6 fue el LCR, se ha encontrado que los niveles en suero, líquido amniótico y folicular ovárico, son mayores que los del LCR (8) (65).

La concentración plasmática de IGFBP-6 se encuentra disminuida en un 60% en pacientes con acromegalia.

Por otro lado, se encuentra que los niveles de ARNm son mayores en el ovario de ratas inmaduras que en el ovario adulto.

La hipofisectomía provoca el aumento de los niveles de ARNm para la IGFBP-6 en tejido ovárico. Posteriormente, el reemplazo con FSH disminuye su expresión pero la infusión de GH no tiene efecto sobre la misma.

Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión del gen de IGFBP-6 es específica de tejido.

*Regulación in vitro.* En fibroblastos humanos en cultivo, el ácido retinoico aumenta la IGFBP-6 aproximadamente 3 veces; sin embargo, el TGFβ1 y agentes que aumentan el cAMP disminuyen su expresión. Asimismo, en células de carcinoma de mama humano, el ácido retinoico aumenta el ARNm de IGFBP-6.

## Rol biológico y mecanismos de acción de las IGFs

Se ha propuesto que las IGFs llevan a cabo cinco funciones importantes, esenciales para coordinar y regular las actividades biológicas de los IGF (94):

- 1) Actúan como *proteínas de transporte* en el plasma, y controlan el flujo de los IGF desde y hacia el compartimiento vascular.
- 2) Prolongan la *vida media* de los IGF y regulan su clearance metabólico.
- 3) Proveen un medio para la *localización de los IGF específica* de tejido y tipo celular.
- 4) Modulan *en forma directa* las interacciones de los IGF con sus receptores, y así indirectamente controlan sus acciones biológicas.
- 5) Actualmente existe alguna evidencia que sugiere que las IGFs puedan tener *efectos directos* sobre ciertas funciones celulares, y al menos una de las IGFs parecería ser el ligando de un receptor de superficie celular.

### A. FUNCIONES COMO PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

#### 1. Complejo de 150 kDa

En el suero la mayor parte de los IGFs circulan formando un complejo ternario de 150 kDa. Aproximadamente un 75% del IGF-I y II plasmático es transportado de esta manera (5).

Cuando se asocian con el complejo de 150 kDa, los IGFs permanecen en el compartimiento vascular, y aumentan así marcadamente su vida media plasmática (12-15 h),



en contraste con 20-30 min para la fracción de 50 kDa (ver más adelante) y de 10-12 min para el IGF-I libre.

Este complejo ternario no ha sido detectado en la linfa, ni tampoco se ha encontrado ALS en otros líquidos extravasculares, sosteniendo la hipótesis de que el complejo ternario nunca deja el espacio vascular.

Las concentraciones de IGF libre después de la inyección de un bolo intravenoso de IGF-I (100 ng/ml), son suficientes para producir hipoglucemia clínica. Sin embargo, esta hipoglucemia fisiológicamente no ocurre, a pesar de que la concentración combinada de IGF-I y II totales en el plasma es de 800 ng/ml (aproximadamente 100 nM). Esto se debe a que el secuestro de IGF en el complejo ternario los retiene en el espacio vascular, y protege al organismo contra el desarrollo de la hipoglucemia.

La función exacta de esta gran cantidad de IGF almacenada en el complejo ternario del suero es desconocida, aunque se cree que éste podría ser un *pool* funcional disponible para su utilización en situaciones de estrés. El reciente descubrimiento de varias proteasas para IGFBP-3, algunas de las cuales se activan durante el estrés, es consistente con esta hipótesis. Luego de la proteólisis, se puede detectar un fragmento de 30 kDa de la IGFBP-3, cuya afinidad por el IGF-I está reducida en 20-30 veces. Por otro lado, los proteoglicanos sobre la superficie de las células endoteliales pueden interferir con la formación del complejo ternario, siendo éste un mecanismo posible para el control del flujo de los IGF hacia y desde el compartimiento vascular.

## 2. Complejo de 50 kDa

Las IGFBP obtenidas de plasma humano por gel filtración, en la región de 50 kDa, son relativamente heterogéneas. Por métodos de WLB y análisis de secuencia de aminoácidos, se han identificado en esta fracción IGFBP-2, una forma truncada de IGFBP-3, IGFBP-4 glicosilada y no glicosilada, e IGFBP-6.

Es muy probable que las IGFBP en la región de 50 kDa no estén completamente saturadas con IGF-I y II.

El rol de estas proteínas ligadoras de bajo peso molecular no se conoce completamente. Estudios de infusión de IGFBP-1 o 2 en ratas, han mostrado que la vida media de

estas proteínas es de aproximadamente 90 min.

Existen varias situaciones en las cuales la relación entre el IGF unido al complejo ternario, y el IGF unido a las IGFBP de bajo peso molecular, se halla disminuida (5). Tales condiciones incluyen la deficiencia de GH, la restricción proteica, el ayuno y la hipoglucemia por tumores. En estas condiciones patológicas, se ha postulado que los IGF tengan una menor vida media, lo que podría traducirse en alteraciones de la actividad biológica de los IGF. Sin embargo, esto no se ha determinado aún.

Dado que se ha demostrado la existencia de IGFBP libre circulante, se cree que los niveles plasmáticos de IGF-I o -II libres, deben ser muy bajos (es decir, las IGFBP están en exceso con respecto a los IGF).

## B. MODULACIÓN DE LA ACCIÓN DE LOS IGFS

Como ya se ha visto, las IGFBP serían importantes moduladores de la acción de los IGF sobre sus células *blanco*. Bajo condiciones apropiadas las IGFBP pueden inhibir o potenciar las acciones de los IGF (5, 6). *In vivo*, el efecto regulatorio neto se encuentra determinado por diversos factores. Por ejemplo: por el patrón de IGFBP que son sintetizadas por un tipo celular en particular, o por sus células vecinas; por las IGFBP que pasan desde el plasma hacia el líquido extravascular, bañando así un determinado tipo de células o tejidos en particular; por otro lado, las IGFBP secretadas por un tejido pueden permanecer solubles, o unirse a receptores de la superficie celular o de la matriz extracelular formando así un reservorio de proteínas ligadoras de rápido acceso; finalmente, estas proteínas pueden permanecer intactas o sufrir modificaciones como proteólisis limitada, glicosilación o fosforilación.

La evidencia más definitiva sobre su *rol inhibitorio* en la acción de los IGF deriva de dos hechos recientemente descriptos:

- 1) El agregado de IGFBP (1, 2, 3 o 4) e IGF-I, en una relación molar de al menos 4:1, a un cultivo celular en un medio libre de suero, provoca una inhibición en la inducción de la síntesis de ADN estimulada por IGF-I.
- 2) En general, las IGFBP inhiben *in vitro* los efectos insulino-símiles de los IGF.



Estas observaciones son consistentes con la bien documentada capacidad de las IGFBP para prevenir *in vivo* la hipoglucemia inducida por los IGF.

Existen similitudes entre las diferentes IGFBP con respecto a sus modificaciones post-traduccionales. Así, se ha demostrado la fosforilación en residuos de serina de IGFBP-1, 3 y 5, aunque esta modificación se traduce en un cambio significativo en la afinidad por IGF-I sólo en el caso de IGFBP-1.

Se ha demostrado glicosilación en IGFBP-3, -4, -5 y -6, aunque sólo en IGFBP-5 y 6 se trata de glicosilación O-ligada. El significado funcional de esta glicosilación no se conoce, aunque Conover ha demostrado que, en el caso de IGFBP-3, no es necesaria para su bioactividad (95).

Se ha encontrado también proteólisis de IGFBP-2, -3, -4 y -5. En el caso de IGFBP-3 e IGFBP-5, los fragmentos proteolíticos pueden retener una cierta afinidad por IGF-I o II, mientras que en el caso de IGFBP-2 y 4 los fragmentos prácticamente pierden esta afinidad. Por otro lado, en el caso de IGFBP-3 y 5, los fragmentos pueden potenciar las acciones de los IGF aún cuando la afinidad por IGF se halla sustancialmente reducida. La caracterización preliminar de estas proteasas indica que son serino-proteasas dependientes de calcio. Cada proteasa parece ser específica para una IGFBP determinada. Sin embargo, dado que la mayoría de estas proteasas actúan sobre residuos de serina, un inhibidor general de serino-proteasas podría aumentar simultáneamente la abundancia de más de una IGFBP (5).

Las IGFBP-1, 3 y 5 son reconocidas por moléculas de la superficie celular. IGFBP-1 se une al receptor de integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Se ha demostrado que esta integrina transmite señales intracelulares, y que la unión de IGFBP-1 a la misma se asocia con una estimulación de la migración celular en células CHO. Sin embargo, no se han encontrado señales específicas intracelulares generadas por esta unión de IGFBP-1 a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . IGFBP-3 y 5 se pueden adherir a diferentes moléculas presentes en la superficie celular y en la matriz extracelular. El aumento de la asociación de IGFBP-3 a la superficie celular, y de IGFBP-5 a la matriz extracelular, se encuentra asociada con una disminución en su afinidad por el IGF-I, y por lo tan-

to, con un incremento en la respuesta mitogénica mediada por IGF-I.

En las próximas secciones se describirán los efectos y mecanismos de acción de cada una de las proteínas ligadoras.

### 1. IGFBP-1

a) *Inhibición de las acciones de IGF*: Si IGFBP-1 junto con IGF-I (pero con un exceso relativo de la proteína ligadora) se agrega a células en cultivo en un medio sin suero, el efecto predominante es generalmente una inhibición de la acción del IGF. Se cree que esto se debe a la formación de complejos IGF-IGFBP-1 que impiden al IGF unirse a sus receptores de superficie celular (57). Existe también evidencia de que la fosforilación de IGFBP-1 hace más probable esta respuesta inhibitoria, y en muchos experimentos en los que se estudiaban los efectos celulares de IGFBP-1 no se analizó el grado de fosforilación de esta proteína ligadora. Rutanen ha demostrado que IGFBP-1 bloquea la interacción del IGF-I con sus receptores sobre membranas de endometrio humano, evidenciando así un efecto inhibitorio directo (96). También se ha demostrado que IGFBP-1 inhibe la síntesis de ADN en células de la granulosa lútea humana en cultivo. En este sistema, usando un exceso de IGFBP-1 sobre IGF-I de 4:1, se observa que es inhibida la unión de IGF a sus receptores (97).

En resumen, el agregado de un exceso molar de IGFBP-1 sobre IGF-I en un medio libre de suero, está claramente asociado con una inhibición de la acción del IGF-I. El rol exacto que esto juega en la fisiología normal del organismo, queda aún por determinarse.

b) *Potenciación de las acciones de IGF*: Se ha demostrado que la IGFBP-1 purificada del líquido amniótico potencia el efecto del IGF-I sobre la síntesis de ADN en células de músculo aórtico porcino. Este efecto necesita el agregado de una pequeña cantidad de plasma pobre en plaquetas (PPP) en el medio de cultivo (98), ya que la IGFBP-1 sola no tiene efecto. Esto también se observó en otros sistemas celulares, tales como fibroblastos de embrión de ratón y de pollo. Se demostró que el factor suministrado por el PPP no es dializable, es estable al ácido y al calor, y no puede ser reemplazado por otros factores de crecimiento. En es-

tos experimentos, el efecto de potenciación requiere que el IGF-I se una tanto a la IGF-BP-1 como al receptor de IGF de tipo I. En otros estudios en fibroblastos de piel humana, se ha demostrado que la respuesta proliferativa al IGF-I es potenciada por IGF-BP-1, pero que esto no ocurre con la respuesta al IGF-II, sugiriendo que se trata de un efecto selectivo para el IGF-I.

c) *Asociación / unión al receptor integrina  $\alpha 5 \beta 1$  de superficie celular.* Durante el aislamiento de la IGFBP-1 de líquido amniótico, se obtienen dos fracciones que difieren en su capacidad para unirse a la superficie celular, y de formar multímeros ligados por puentes disulfuro cuando se agregan al medio de cultivo celular. La forma que se asocia a la superficie celular y forma multímeros, también potencia la acción del IGF-I en presencia de PPP. Esta asociación a la superficie celular puede inhibirse por co-incubación con péptidos que contienen la secuencia RGD. La otra isoforma, que no se asocia con la superficie celular, no se polimeriza más allá de la formación de dímeros, e inhibe las acciones de los IGF. Estos datos sugieren que la asociación a la superficie celular y/o formación de multímeros son necesarios para que la IGFBP-1 potencie la acción del IGF-I (5).

La presencia de la secuencia de reconocimiento de integrinas RGD en la IGFBP-1 (y en la IGFBP-2) indicaría que ambas proteínas transportadoras pueden unirse a las superficies celulares por medio de uno o más receptores de integrinas. Recientemente, Jones (66) ha demostrado que la IGFBP-1 se une específicamente al receptor integrina  $\alpha 5 \beta 1$ , que se caracteriza por reconocer al ligando fibronectina. Es posible entonces que en ciertos tipos celulares la unión de IGFBP-1 al receptor  $\alpha 5 \beta 1$  pueda potenciar las acciones mediadas por los IGF. Esto podría deberse a que la IGFBP-1 unida a integrina sirviera como un reservorio de moléculas de IGF localizados en la superficie celular. Así, existiría una alta concentración local de IGF, capaz de estimular al receptor de IGF de tipo I. Alternativamente, se podría generar una señal a través de la integrina  $\alpha 5 \beta 1$  posterior a su unión con IGFBP-1, la cual podría interactuar con componentes de la vía de transducción de señales del receptor de IGF de tipo I, y modular las señales liberadas al núcleo.

d) *Fosforilación.* Se ha encontrado que la IGFBP-1 de cultivos de decidua humana se halla fosforilada, así como la proteína secretada por células CHO transfectadas con IGFBP-1, y por células Hep G2. Se ha desarrollado una técnica de PAGE no desnaturante que separa 4 formas fosforiladas y una no fosforilada, demostrando que la IGFBP-1 se encuentra fosforilada tanto *in vivo* como en medios de cultivo celular (99). La IGFBP-1 purificada de líquido amniótico contiene dos isoformas (fosforiladas y no fosforiladas) y se observa que ellas difieren en su capacidad para modular la acción del IGF-I sobre la incorporación de timidina en células de músculo liso. El análisis de IGFBP-1 por cromatografía de intercambio aniónico ha revelado que las isoformas que inhiben la acción de IGF se encuentran fosforiladas, mientras que la isoforma que potencia la acción de IGF es no fosforilada (5).

Jones ha demostrado que la IGFBP-1 no fosforilada tiene 4-6 veces menos afinidad por el IGF-I que la IGFBP-1 fosforilada (99). Esto favorecería el secuestro de IGF-I por la IGFBP-1 fosforilada, y una liberación más completa de IGF-I a sus receptores por la forma no fosforilada. La fosforilación ocurre solamente en residuos de serina, y las serinas 101, 169 y 119 son los blancos primarios de fosforilación. Todos estos residuos se hallan en regiones ácidas de la molécula de IGFBP-1, siendo así blancos potenciales para una PK de la familia de las caseín-quinasas. Esto se ha demostrado *in vitro* en experimentos de fosforilación de IGFBP-1.

## 2. IGFBP-2

a) *Inhibición de las acciones de IGF:* La IGFBP-2 purificada inhibe la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina mediada por IGF-I en fibroblastos de embrión de pollo, y en células astrogiales de rata. También inhibe la síntesis de ADN estimulada por IGF-II en una línea de carcinoma de pulmón. Esta proteína ligadora además inhibe la unión de IGF-I o II a la superficie de células MDBK, limitando así el acceso de estos factores de crecimiento a sus receptores específicos (5).

b) *Potenciación de las acciones de IGF:* La IGFBP-2 es un potenciador débil de las acciones del IGF (5). La IGFBP-2 parcialmen-

te purificada, estimula débilmente el efecto del IGF-I sobre el transporte de glucosa y la captación de ácido amino-isobutírico en células endoteliales microvasculares, en un medio libre de suero. En otro estudio se observó que la IGFBP-2 incrementa la respuesta de células de músculo liso aórtico porcino frente al IGF-I en un 80%, en presencia de bajas concentraciones de PPP. En un medio libre de suero, sin embargo, esta proteína se comporta como un potente inhibidor de la síntesis de ADN estimulada por IGF-I.

### 3. IGFBP-3

a) *Inhibición de las acciones de IGF:* Se ha observado que fracciones de suero enriquecidas en IGFBP-3 inhiben la incorporación de glucosa en adipocitos. De Mellos y Baxter (100) han demostrado que un exceso de IGFBP-3 purificada, agregado junto con IGF-I a cultivos de fibroblastos, inhibe significativamente la síntesis de ADN estimulada por el IGF-I. El mecanismo por el cual la IGFBP-3 inhibe la acción del IGF, está relacionado con su capacidad para inhibir la unión del IGF a sus receptores específicos en la superficie celular. La IGFBP-3 en solución tiene una afinidad significativamente mayor por los IGF que el receptor de tipo I, y es claramente capaz de prevenir la interacción del IGF con su receptor por un fenómeno de competencia directa. Por el contrario, la IGFBP-3 asociada con la superficie celular tiene una afinidad reducida por IGF-I y II, y así es capaz de modular las interacciones del receptor del IGF tal que los IGF sean más fácilmente disponibles para su unión al receptor (5). Sin embargo, el complejo IGF-IGFBP-3, que es capaz de asociarse a la membrana celular, no parece hacerlo a través de un puente al receptor de IGF, ya que hasta el momento no se ha demostrado la formación de un complejo ternario con IGF unida simultáneamente a su receptor, y a la IGFBP-3 asociada con la superficie celular.

También se ha estudiado la inhibición modulada por IGFBP-3 sobre funciones de células diferenciadas. En osteoblastos de rata en cultivo, la IGFBP-3 se comporta como un potente inhibidor de los efectos del IGF sobre la síntesis de ADN y de colágeno (101). Se ha sugerido que la función primaria de la IGFBP-3 sintetizada constitutivamente, sea la de inhibir la acción del IGF.

b) *Posible inhibición directa del crecimiento celular:* Villandry ha demostrado que la IGFBP-3 inhibe la síntesis de ADN en fibroblastos de embrión de ratón estimulados con 1% de suero o FGF (102). De esta manera, por primera vez se muestra que la IGFBP-3 inhibe la respuesta de otros factores de crecimiento (es decir, que no sean IGF), y así sugiere que el efecto inhibitorio podría ser independiente de su unión al IGF. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de que FGF esté actuando por estimulación de la síntesis local de IGF, el cual podría entonces unirse a la IGFBP-3.

Otros investigadores han demostrado efectos similares de la IGFBP-3, en fibroblastos estimulados por TGF $\beta$ . Oh (103) ha encontrado que IGFBP-3 puede inhibir el crecimiento de las células de cáncer de mama humano HS5 78T independientemente de su estimulación por IGF. En estos estudios no se agregaba IGF al sistema, aunque la posibilidad que IGF-I o II fueran sintetizados por las células no puede excluirse.

c) *Potenciación de las acciones de IGF:* DeMellow y Baxter (100) han observado efectos variados de IGFBP-3 sobre la síntesis de ADN estimulada por el IGF-I. La preincubación de un cultivo de fibroblastos humanos con IGFBP-3, con eliminación de esta proteína ligadora previo a la incubación de las células con IGF-I, resulta en una importante potenciación de los efectos del IGF-I. Sin embargo, la incubación simultánea con IGF-I e IGFBP-3, resulta en una inhibición de los efectos de IGF-I. Dado que la IGFBP-3 se puede adherir a la superficie celular, es probable que durante la incubación el IGF se equilibre entre la IGFBP-3 unida a la superficie celular, la IGFBP-3 soluble en el medio de cultivo, y el receptor de IGF de tipo I. Conover ha confirmado que la IGFBP-3 bovina, co-incubada con diferentes concentraciones de IGF-I, produce una inhibición dependiente de la dosis en la captación de ácido amino-iso-butírico (AIB) por los fibroblastos en cultivo (104). Por el contrario, cuando los fibroblastos son preincubados durante 24 h con IGFBP-3 bovina, y si la misma es posteriormente removida del medio, se produce un incremento dependiente de la dosis en la captación de AIB en respuesta al IGF-I. Estudios de afinidad de "cross-linking" realizados después de esta preincubación con IGFBP-3, demuestran un in-

cremento en la IGFBP-3 asociada a la superficie celular. Ernst y Rodan han observado efectos similares sobre cultivos de osteoblastos primarios (105). Estos cultivos producen IGFBP-3 en forma constitutiva, y se observa una potenciación de los efectos del IGF sobre la replicación celular, y sobre la expresión del gen del colágeno  $\alpha 1$ , luego de una exposición a la GH (la cual aumenta la acumulación de IGFBP-3 en el medio).

Un mecanismo post-traducciona que puede afectar las acciones de IGFBP-3 es la *proteólisis*. Se ha demostrado que el plasma posee proteasas que hidrolizan específicamente la IGFBP-3 a una forma de 30 kDa, que tiene una afinidad mucho menor por el IGF-I. Como hemos visto, formas truncadas de IGFBP-1 con baja afinidad por IGF, potencian el efecto de IGF. Por analogía, se han probado los efectos de estos fragmentos de IGFBP-3 sobre la incorporación de timidina tritiada en una línea de células de osteoblastos de rata (101). Bajo esas condiciones la IGFBP-3 nativa, pero no sus fragmentos proteolíticos, es inhibitoria.

Una característica común de todos estos estudios, es que la asociación de IGFBP-3 a la superficie celular parece ser necesaria para su potenciación de las acciones del IGF. Dado que esta unión a receptores de la superficie celular lleva a una marcada disminución en la afinidad de la IGFBP-3 por los IGF, se la postula como mecanismo para explicar tal potenciación. La IGFBP-3 anclada en la superficie celular de fibroblastos debe representar un sitio de unión importante para el IGF, ya que los receptores para el IGF dan cuenta sólo del 3% de la IGF marcada unida a la superficie celular. De la misma manera, se ha visto que la capacidad de unión de la IGFBP-3 unida a la superficie celular es mucho mayor que la capacidad de unión de la IGFBP-3 soluble en el medio de cultivo. Así, una proporción importante del IGF puede unirse a estos sitios, aunque su afinidad sea relativamente más baja que la de los sitios solubles (5).

d) *Estudios in vivo*: Se han descrito diversos estudios *in vivo* que analizan el efecto de la IGFBP-3 sobre las acciones del IGF. En el modelo de cicatrización de heridas de Hunt y Schilling (106), se demuestra que la aplicación de concentraciones equimolares de IGFBP-3 e IGF-I resulta en una aceleración de la cicatrización, y en un

aumento de la cantidad de tejido de cicatrización.

Clark, en un estudio comparativo directo ha encontrado que la inyección subcutánea de IGFBP-3 humana e IGF-I en ratas con déficit de GH, resulta en un aumento de peso corporal dos veces mayor, y con mayor amplitud epifisaria, que en ratas tratadas sólo con IGF (107).

Recientemente, Stewart ha demostrado que la IGFBP-3 intravascular puede potenciar las acciones de los IGF (108). Ellos infundieron anticuerpos policlonales contra IGF-I recombinante en roedores con déficit de GH, y midieron el crecimiento en ausencia o presencia de una infusión de IGF-I. Los animales tratados con IGF más el anticuerpo anti-IGF, muestran una mayor ganancia de peso corporal que los ratones tratados sólo con el IGF. Así, la infusión conjunta de anti-IGF-I resulta en un incremento mayor de la masa muscular, y mayores niveles plasmáticos de IGF-I, comparada con la infusión de IGF solo. Los autores concluyen que el anticuerpo policlonal se comporta de una forma similar al complejo ternario de IGFBP-3, haciendo aparecer un reservorio estable de IGF-I en el suero. El anticuerpo en cuestión tiene una afinidad por el IGF-I levemente menor que la del receptor para IGF de tipo I. Así, éste podría constituir un mecanismo para la liberación lenta de IGF-I a las células y tejidos. Aunque este estudio es indirecto y utiliza anticuerpos en lugar de IGFBP-3, podría ser ésta una vía alternativa para simular los efectos de la IGFBP-3 *in vivo*, con posible aplicación clínica en el tratamiento de heridas de difícil cicatrización.

#### 4. IGFBP-4

a) *Inhibición de las acciones del IGF*: En contraste con las otras proteínas ligadoras descriptas hasta aquí, la IGFBP-4 inhibe las acciones del IGF en casi todas las condiciones experimentales probadas (5). IGFBP-4 no parece unirse a la superficie celular, y puede ser proteolíticamente hidrolizada formando fragmentos que tienen muy baja o ninguna afinidad por el IGF. De hecho, la IGFBP-4 se aisló originalmente, en base a su capacidad para inhibir el crecimiento celular. Mohan la ha purificado de una línea de células de osteosarcoma (109). Estos autores utilizan un bioensayo con cartílago de



pollo para demostrar que la IGFBP-4 posee un efecto inhibitorio de la acción del IGF. Dicha inhibición es dependiente de la dosis, y proporcional a la capacidad de IGFBP-4 para interferir con la unión del IGF a sus receptores de superficie. A bajas concentraciones de IGFBP-4, su efecto inhibitorio puede sobrepasarse usando elevadas concentraciones de IGF. Es decir que si existe suficiente IGF como para saturar esta proteína ligadora, el IGF se puede unir a los receptores de superficie y revertir el efecto inhibitorio.

b) *Proteólisis*: Recientemente se ha sugerido que la proteólisis constituye un mecanismo a través del cual ciertas células pueden liberarse del efecto inhibitorio tónico sobre el crecimiento, ejercido por la IGFBP-4. Conover (110) ha demostrado, en fibroblastos humanos transformados que secretan proteasas específicas para IGFBP-4, que la cantidad de IGFBP-4 intacta en el medio de cultivo puede disminuirse por exposición a IGF-II. Este efecto puede ser bloqueado agregando inhibidores de proteasas. La proteasa en el medio es específica para la IGFBP-4 y requeriría de IGF-I o II para su actividad. La IGFBP-4 así proteolizada pierde sus efectos inhibitorios sobre la captación de ácido amino-iso-butírico estimulada por IGF-I. En una línea de fibroblastos que no secretan dicha proteasa específica, la administración de IGFBP-4 al medio de cultivo produce una inhibición dependiente de la dosis sobre la acción del IGF. Esto sugiere que la IGFBP-4 intacta (pero no la proteolizada) está asociada con la inhibición del crecimiento.

En resumen, los resultados disponibles sugieren que la IGFBP-4 funciona únicamente como un inhibidor de la acción de los IGF, y que su principal función podría ser la de proteger a ciertas células de una sobre-estimulación por IGF, o de permitir la activación de determinadas vías de transducción de señales alternativas que son inhibidas por los IGF.

## 5. IGFBP-5

a) *Inhibición*: La IGFBP-5, en exceso molar con respecto a IGF-I, puede inhibir la síntesis de ADN y de glucógeno estimulada por IGF-I, en células de osteosarcoma humano. En condiciones similares, en células

de la granulosa se observa también una inhibición de la esteroideogénesis estimulada por IGF-I.

b) *Estimulación*: Se ha observado que la IGFBP-5 se puede adherir a la matriz extracelular sintetizada por fibroblastos. La IGFBP-5 incubada con la matriz extracelular, potencia el efecto del IGF-I sobre el crecimiento de células sobre esa matriz (111). Sin embargo, la IGFBP-5 directamente agregada al medio de cultivo es proteolizada, y no potencia las acciones del IGF-I. También se ha visto que la IGFBP-5 unida a la matriz extracelular por agregado exógeno, o la depositada allí por los fibroblastos, se mantiene intacta, sugiriendo que se encuentra protegida de la proteólisis. En la matriz extracelular la afinidad de la IGFBP-5 por el IGF-I es aproximadamente 7 veces menor que la de IGFBP-5 soluble, sugiriendo que el IGF-I asociado a la matriz a través de IGFBP-5 sería más fácilmente liberado, para poder interactuar así con los receptores de superficie celular. Éstos podrían ser factores importantes para la capacidad de la IGFBP-5 unida a la matriz extracelular de potenciar las acciones del IGF. Altas concentraciones salinas inhiben la asociación de IGFBP-5 con la matriz extracelular, sugiriendo que su sitio de unión podrían ser los proteoglicanos de la matriz.

Bautista (112) ha demostrado que la co-incubación de osteoblastos de ratón MC-3T3E1 con cantidades equimolares de IGF-II e IGFBP-5, lleva a una potenciación de la acción del IGF-II. Se han realizado estudios con fragmentos proteolíticos de IGFBP-5, los cuales pueden asociarse con la superficie celular en osteoblastos en cultivo. Dado que estos fragmentos de IGFBP-5 unen IGF-I con menor afinidad que la IGFBP-5 intacta, se ha sugerido que la proteólisis podría ser importante en permitir que la IGFBP-5 potencie las acciones de los IGF. También se ha observado que los fragmentos de IGFBP-5 tienen un efecto mitogénico en ausencia de IGF-I, sugiriendo así un mecanismo independiente.

En resumen, la IGFBP-5 tiene la propiedad única de adherirse a la matriz extracelular. Cuando se asocia con la matriz, esta proteína potencia las acciones de los IGF. También se puede asociar con la superficie celular, y potenciar así las acciones de los IGF en una forma similar a la IGFBP-3.

## 6. IGFBP-6

Los estudios *in vitro* de IGFBP-6 son muy limitados. Un trabajo reciente indica que IGFBP-6 puede tener efectos antigonadotróficos en ovario, tal como IGFBP-2, -3, -4 y -5. La producción de IGFBP-6 por el ovario, estimulado por una combinación de FSH y LH, se asocia con una inhibición de la esteoroideogénesis inducida por IGF-I (5).

## PROTEASAS

Se han identificado *in vitro* e *in vivo* proteasas específicas para todas las IGFBP excepto IGFBP-1. Así, se las ha encontrado en la sangre y otros tejidos, en diversos fluidos corporales y medios de cultivo celulares. Algunas proteasas para IGFBP químicamente identificadas incluyen: plasmina, metaloproteasas de matriz extracelular, catépsina, kaliceínas, como así también el antígeno prostático específico (PSA).

Las proteasas mejor caracterizadas son las de IGFBP-3 (5).

### Proteasas para IGFBP-3

Se cree que los niveles de IGFBP-3 son regulados por proteólisis. Como hemos visto, se han identificado fragmentos de 30 kDa amino terminales en suero de rata y suero humano. La proteólisis parcial de IGFBP-3 ocurre cuando se encuentra formando parte del complejo ternario de 150 kDa. Esto se describió inicialmente en el suero de embarazadas (83). Posteriormente se ha observado en otras condiciones patológicas, como en el caso de pacientes post-quirúrgicos y con enfermedades terminales. Los péptidos hidrolizados pueden permanecer asociados con la subunidad ALS bajo condiciones fisiológicas (es decir, a pH neutro); pero se disocian y pierden su capacidad de unión a IGF, después de la exposición a ácidos o calentamiento en presencia de SDS. El fragmento de 30 kDa se ha purificado. De esta manera se ha visto que tiene una afinidad 20 veces menor para el IGF-I, y 3 veces menor para el IGF-II, que la IGFBP-3 intacta. La proteólisis limitada de IGFBP-3 facilita así la disociación de IGF-I del complejo de 150 kDa, lo cual podría aumentar su accesibilidad para los tejidos "blanco".

También se han descrito proteasas para IGFBP-3 en diversos tejidos y fluidos corporales. Cohen ha demostrado que el anti-

geno prostático específico, una kaliceína glandular, es una proteasa de IGFBP-3 que se encuentra presente en el plasma seminal humano. Se diferencia de la proteasa de IGFBP-3 presente en el suero en embarazadas por el tamaño de los fragmentos proteolíticos que genera, y por su activación (en lugar de inhibición) con el agregado de EDTA. Davenport ha descrito que las proteasas de IGFBP-3 presentes en la decidua de ratas preñadas a término, al igual que las proteasas de IGFBP-3 del suero de rata, son serino-proteasas dependientes de cationes (es decir, semejantes a la tripsina). Se ha demostrado que ciertas metaloproteasas de matriz extracelular (MNP1 y MNP3) son responsables de la mayor parte de la actividad proteolítica de IGFBP-3 del suero de ratas preñadas, y del medio condicionado de fibroblastos humanos.

El grupo de Binoux ha estudiado la proteólisis de IGFBP-3 durante el embarazo, sugiriendo que el complejo ternario se encuentra funcionalmente alterado, afectando así la biodisponibilidad de los IGF. También se ha encontrado que existe proteólisis de IGFBP-3 en estados normales, dependiendo el grado de proteólisis del "status" del sistema GH/IGF. Funcionalmente esto significa que la regulación de la actividad de proteasas podría adaptarse para aumentar (en estados de deficiencia de GH) o inhibir (en acromegalia) la disponibilidad del IGF-I cuando sea necesario.

En el embarazo, el análisis por Western Ligand Blot revela una fuerte reducción (o virtual desaparición) del característico doblete de 42-39 kDa de IGFBP-3. Esto se puede confirmar por Immunoblot usando anticuerpos específicos contra IGFBP-3. En los Immunoblot se observa una banda densa correspondiente a los fragmentos de 30 kDa, que no se observa en el suero normal. Así, la modificación proteolítica de IGFBP-3 produce una pérdida significativa en su afinidad de unión a IGF.

Una consecuencia de la proteólisis de IGFBP-3 es que la distribución de IGF entre el unido a las fracciones mayoritarias de IGFBP (150 y 40 kDa) y el IGF libre podría modificarse. Usando gel filtración, se encuentra un aumento del IGF-I asociado con la fracción de 50 kDa, una disminución en la de 150 kDa, y un aumento de aproximadamente 2 veces en la fracción de IGF-libre. Considerando la vida media de estas

diferentes fracciones de IGF en el hombre, podría calcularse que la velocidad de producción de IGF-I debería cuadruplicarse. Así, es evidente que la biodisponibilidad de IGF-I se encuentra aumentada durante el embarazo, como respuesta a un aumento en los requerimientos metabólicos y de crecimiento que acompañan el desarrollo de la unidad feto-placentaria. Esta biodisponibilidad incrementada de IGF-I podría explicar ciertas características de tipo acromegálicas que se observan durante el embarazo.

### Proteasas para IGFBP-4 y 5

Las proteasas de IGFBP-4 y 5 son también serino-proteasas, dependientes de calcio, pero no son metaloproteasas dado que no se activan con Zn. Usando diferentes inhibidores de proteasas se ha observado que son inhibidas por aprotinina y benamidina.

El grupo de Clemmons (113) ha estudiado el rol de estas proteasas sobre el cultivo de fibroblastos y de células de músculo liso (pSMC), agregando cantidades crecientes de IGFBP-4 en un ensayo de síntesis de ADN estimulada por IGF-I. Así, han observado una fuerte inhibición, dependiente de dosis, en los cultivos de fibroblastos pero no en las células de músculo liso. Luego, analizando el medio condicionado por Immunoblot, han encontrado que los fibroblastos no alteran la IGFBP-4 en el medio, pero sí las células de músculo liso, que producen fragmentos proteolíticos de 14 y 16 kDa. Estos fragmentos no se detectan por Western Ligand Blot, sugiriendo una muy baja afinidad de los fragmentos por el IGF. Estos experimentos han llevado a la conclusión de que la ruptura proteolítica de IGFBP-4 agregada exógenamente resulta en una completa inactivación de su capacidad para inhibir la acción del IGF-I.

Por el contrario, la proteólisis de IGFBP-5 potencia la actividad de IGF-I en cultivos de osteoblastos humanos. Así, la proteólisis de IGFBP-5 sería un importante potenciador de la acción del IGF en el tejido óseo.

El grupo de Conover ha estudiado la proteólisis de IGFBP-4, y su regulación en un sistema de cultivo de osteoblastos (114). En condiciones libres de suero, los osteoblastos derivados de un humano adulto normal, secretan principalmente IGFBP-3 y 4. El tratamiento de estas células con IGF resulta en un aumento de los niveles de IGFBP-3, y una desaparición aparente del IGFBP-4. Este efecto del IGF es independien-

te de su interacción con los receptores de tipo I, y tampoco se observan cambios en los niveles de expresión de los ARNm específicos para IGFBP-3 y 4. Subsecuentemente se ha establecido que la incubación del medio condicionado de los fibroblastos con IGF, en ausencia de células, lleva a una pérdida específica de IGFBP-4. Este fenómeno es dependiente del tiempo y de la temperatura de incubación, y no se observa en ausencia de IGF-II. Además, el IGF-II no altera los niveles de IGFBP-3. Todos estos estudios indican que la disminución en la IGFBP-4 es debida a la presencia de una proteasa. Esta actividad puede ser inhibida por EDTA, 1,10-fenantrolina, y es lábil al calor.

Una característica importante de esta proteasa para IGFBP-4 es su estricta dependencia de los IGF para su activación. Así, otros péptidos u hormonas esteroideas en el medio de incubación no alteran los niveles de IGFBP-4 en este sistema de ensayo libre de células. Además se ha observado que IGF-II es más potente que IGF-I en la inducción de esta proteasa. La proteólisis también parece requerir una asociación física específica entre el IGF-II y la IGFBP-4, dado que anticuerpos neutralizantes anti IGF-II bloquean la proteólisis de la IGFBP-4.

Se ha estudiado la regulación de esta actividad proteolítica. La proteólisis de IGFBP-4 dependiente del IGF, es detectable en el medio condicionado de fibroblastos humanos fetales y adultos, y no se modifica con la edad del donante. También se ha evaluado el efecto de reguladores del crecimiento de fibroblastos. Se ha podido observar que el tratamiento de las células con ésteres de forbol, que actúa vía Proteín-quinasa-C, bloquea la proteólisis de IGFBP-4; mientras que el tratamiento con forskolina, que estimula a la Proteín-quinasa-A, no afecta la proteólisis de IGFBP-4.

Se sabe que la IGFBP-4 es un potente inhibidor de la acción del IGF-I sobre células de hueso, células de neuroblastoma y fibroblastos. Se ha analizado cuál es la consecuencia de la proteólisis de IGFBP-4 inducida por IGF en estas células, estudiando en paralelo dicha proteólisis y las alteraciones en la incorporación de timidina en el ADN celular. Ni el IGF-II, ni la insulina, estimularon la incorporación de timidina tritiada. Sin embargo, en fibroblastos la

pre-exposición a IGF-II aumenta la incorporación de timidina inducida por IGF-I. Estos datos sugieren que la IGFBP pericelular limitaría el acceso de IGF-I a sus receptores celulares de tipo I, y que el pre-tratamiento con IGF-II puede mitigar este efecto de barrera. También se ha propuesto que el IGF-II aumente la respuesta de los fibroblastos al IGF-I, parcialmente a través de su capacidad para regular la actividad de proteasas para IGFBP-4. El IGF-II es más eficiente que el IGF-I en inducir la proteólisis de IGFBP-4, y el IGF-I es más potente que el IGF-II en activar las señales mediadas por el receptor para IGF de tipo I. De esta manera, se ha propuesto un modelo para la regulación de la hiperproliferación focal: en condiciones basales, los fibroblastos humanos secretan IGFBP-4 inhibitoria para los efectos de IGF, y proteasas para IGFBP-4 en estado latente. En estas condiciones, los fibroblastos son relativamente insensibles a la estimulación con IGF-I. La introducción de IGF-II inicia una rápida inducción de la proteólisis de IGFBP-4, incrementando así el IGF-I local disponible para la interacción con los receptores celulares para IGF de tipo I. Además, los fibroblastos secretan otras IGFBP, principalmente IGFBP-3 que es regulada positivamente por IGF a través de un mecanismo independiente de sus receptores. Estas IGFBP reguladas por IGF juegan un papel importante y aún poco definido en la biología celular de los fibroblastos humanos.

## Métodos de ensayo

El desarrollo de la terapia sustitutiva con GH en pacientes con déficit de GH, lleva implícita la necesidad de encontrar métodos para el diagnóstico y seguimiento de individuos que pudieran beneficiarse con este tratamiento.

En el listado que se detalla a continuación, se enumeran los parámetros que debieran estudiarse inicialmente para la evaluación de un niño de estatura corta y/o con disminución de la velocidad de crecimiento, a fin de determinar la factibilidad de un tratamiento sustitutivo con GH recombinante (obviamente, deben descartarse otras patologías que presenten un cuadro clínico similar, pero que no sean dependientes de GH) (116):

### Historia clínica y examen físico

RX de cráneo, edad ósea de la mano izquierda

Folato, caroteno, anticuerpos antigliadina, eritrosedimentación

Electrolitos plasmáticos, urea, creatinina

Cariotipo en niñas

Función tiroidea: T4, TSH

Respuesta secretoria de GH frente a una estimulación farmacológica y/o perfiles de secreción espontáneos diarios o nocturnos

IGF-I e IGFBP-3

Empero, en la interpretación de los resultados de estos parámetros debe tenerse en cuenta la edad del paciente, ya que de ella dependerá en parte la posible etiología de retardo de crecimiento (tabla VI). Luego, en base a los datos clínicos y bioquímicos, se podrá llegar a un diagnóstico presuntivo (tabla VII y tabla VIII).

Sin embargo, los métodos disponibles para medir la secreción de GH (véase más abajo) son poco convenientes y confiables. Por otro lado, las concentraciones séricas de IGF-I e IGFBP-3 se encuentran disminuidas en estados de desnutrición o enfermedad hepática. En conclusión, actualmente el parámetro más fiel en el estudio de un niño con retardo de crecimiento sigue siendo la evaluación clínica, con un énfasis especial en la medición exacta y seriada de la altura del paciente para la determinación de su velocidad de crecimiento (117).

La estimación de la secreción de GH, ya sea espontánea o provocada farmacológicamente, sigue siendo de valor, aunque no debería ser obligatoria para el diagnóstico del déficit de GH. A menos que exista una historia familiar de síndrome de resistencia a la GH, un valor de GH al azar elevado que sugiera el diagnóstico de este síndrome, o la presencia clínicamente evidente de desnutrición o enfermedad hepática, una disminución en la concentración sérica de IGF-I e IGFBP-3 en pacientes clínicamente sospechosos puede considerarse diagnóstico de un déficit de GH (117).

### DOSAJE DE GH SÉRICO

Este enfoque, aunque directo, presenta varios inconvenientes (116) (117):



**TABLA VI.**  
**ETIOLOGÍA DEL RETARDO DE CRECIMIENTO SEGÚN LA EDAD.**  
**TOMADO DE LA REFERENCIA 116.**

<i>Lactancia</i>	Retardo de crecimiento intrauterino. Déficit calórico (desnutrición, enfermedad celíaca). Enfermedades metabólicas, insuficiencia renal. Hipotiroidismo. Hipopituitarismo.
<i>Niñez</i>	Estatura corta genética. Déficit calórico (enanismo psico-social, enfermedad celíaca). Déficit de GH. Hipotiroidismo. Enfermedad ósea genéticamente determinada. Síndrome de Turner (niñas). Síndrome de Cushing.
<i>Pubertad</i>	Retraso constitucional de la pubertad. Síndrome de Turner (niñas). Hipopituitarismo. Anorexia nervosa. Enfermedades crónicas.

- Como se sabe, existe una liberación hipofisaria episódica de GH.
- La vida media sérica de GH es relativamente corta.
- Individuos normales pueden tener al azar valores bajos de GH.
- Se necesitan determinaciones seriadas (sin estímulo, o post-estímulo fisiológico o farmacológico) para llegar a un diagnóstico.
- Estas determinaciones seriadas son complicadas y onerosas (por ej., de 36 a 72 determinaciones con espacio de 20 min entre una y otra).
- Sumado a ello, no hay acuerdo sobre los valores de corte diagnósticos.
- Debido a la heterogeneidad de formas de GH circulante, y de sus afinidades de unión por las proteínas transportadoras específicas, existe una discrepancia considerable entre la medida de GH por métodos inmunológicos o por bioensayo. Además, cada una de estas formas moleculares diversas de la GH pueden no ser igualmente reconocidas por diferentes inmunoensayos.

#### **EVALUACION DEL EJE IGF-IGFBP**

Existen varias metodologías disponibles para evaluar el eje IGF-IGFBP:

1. Métodos inmunológicos:
  - \* Dosaje de IGF-I (RIA, IRMA, DELFIA, ELISA)
  - \* Dosaje de IGF-II (RIA, IRMA)
  - \* Dosaje de IGFBP específicas (RIA, IRMA, ELISA)
2. IGFBP cuali/cuantitativos (SDS-PAGE, *Binding capacity*)
3. Receptores de IGF
4. Ensayos de proteasas para IGFBPs.

El *dosaje inmunológico de IGF-I* resulta particularmente interesante debido a que el IGF-I es en gran medida dependiente de la GH, aunque para la interpretación de los resultados debe tenerse en cuenta que (118):

- La concentración sérica de IGF-I es relativamente estable a lo largo del día, debido fundamentalmente a su asociación con IGFBP-3 y ALS (menos del 5% del IGF-I circula en forma libre).
- La interpretación correcta de los valores séricos de IGF-I requieren considerar la

**TABLA VII.**  
**RETARDO DEL CRECIMIENTO: GUÍAS PARA UNA EVALUACIÓN CLÍNICA Y**  
**BIOQUÍMICA. TOMADO DE LA REFERENCIA 116.**

<i>Causa</i>	<i>Signos clínicos</i>	<i>Signos bioquímicos / hormonales</i>	<i>Posibles diagnósticos</i>
<i>Historia familiar y neonatal</i>	Estatura corta paterna y/o retraso en la pubertad.	Normal.	Retardo en el crecimiento genético/constitutivo.
	Nivel socio-económico bajo.	GH normal, IGF-I bajo.	Déficit calórico/proteico.
	Abuso infantil, familia conflictiva.	GH normal, IGF-I bajo.	Enanismo psico-social.
	Pequeño para su edad.	Normal.	Retardo en el crecimiento intrauterino.
	Características dismórficas.	Normal.	Desórdenes esqueléticos o cromosómicos.
<i>Causas endócrinas</i>	Características del déficit de GH, hipoglucemia, o retraso del crecimiento, asociados con defectos de la línea media o asfixia perinatal secundaria a una irradiación craneana o tumor cerebral aislado (esporádico o aislado).	GH bajo, IGF-I bajo.	Déficit de GH aislado o déficit pituitario múltiple.
		GH bajo, IGF-I bajo.	Déficit de GH aislado (déficit de GHRF).
		GH alto, IGF-I bajo.	Delección en el gen de GH.
			Mutación en el receptor de GH: síndrome de insensibilidad a la GH.
	Hipotiroidismo.	T3/T4 bajo, TSH alto.	Hipotiroidismo primario.
	Obesidad, osteoporosis.	Cortisol plasmático/urinario elevado.	Síndrome de Cushing.
	Terapia con corticoides.	DHEA sulfato bajo.	Iatrogénico.
	Retraso en la pubertad.	Falta de secreción de esteroides sexuales.	Retraso en la pubertad (transitorio u orgánico).
Poliuria, polidipsia.	Imposibilidad de concentrar la orina.	Diabetes insípida con déficit de vasopresina.	
Diabetes mellitus.	GH normal, IGF-I bajo.	Control metabólico inadecuado.	
<i>Causas no endócrinas</i>	Anemia, raquitismo.	25-OH D3 bajo, anemia, ferremia baja.	Déficit de vitamina D y/o ferropenia.
	Características tipo Turner (niñas).	Cariotipo 45, XO.	Síndrome de Turner.
	Baja relación Peso/Talla.	GH normal, IGF-I bajo.	Desnutrición, anorexia nerviosa.
	Diarrea crónica.	Anticuerpos antigliadina, folato bajo.	Enfermedad celiaca.
	Dolor abdominal, fiebre.	Eritrosedimentación aumentada.	Íleítis de Crohn.
	Anemia, edema.	Úrea y creatinina aumentadas.	Insuficiencia renal crónica.
	Poliuria, polidipsia.	Falta de respuesta a la vasopresina.	Diabetes insípidas con resistencia a la vasopresina.

**TABLA VIII.**  
**RETARDO DEL CRECIMIENTO DEBIDO A ANORMALIDADES**  
**DEL EJE GH/IGF-I: CLASIFICACIÓN SEGÚN SUS CONCENTRACIONES**  
**PLASMÁTICAS. TOMADO DE LA REFERENCIA 116.**

*GH BAJA, IGF-I BAJA:*

**1. Déficit de GH primario**

- Genético: Mutación en el gen de GH autosómico dominante, o recesivo X-ligado.
- Idiopático: Déficit de GH aislado (probable déficit de GHRH).

**2. Déficit hormonal pituitario múltiple primario**

- Genético: Autosómico o X-ligado, recesivo.  
Mutación en el gen del factor de diferenciación hipofisaria.
- De desarrollo: Defectos de la línea media.  
Aplasia hipofisaria.  
Displasia óptico-septal.
- Orgánico: Irradiación craneana.  
Tumores hipotalámico-hipofisarios.  
Trauma.
- Idiopático: Trauma perinatal y asfixia.  
Interrupción del tallo hipofisario.

**3. Déficit de GH secundario**

- Desnutrición crónica.
- Hemocromatosis, enanismo psico-social, talasemia.

*GH ALTA, IGF-I BAJA:*

**1. Insensibilidad primaria a la GH**

- Enanismo tipo Laron (Mutación en el gen del receptor de GH y ausencia de la proteína plasmática de unión a GH).
- Enanismo genético con baja actividad del receptor de GH (pigmeos).

**2. Insensibilidad secundaria a la GH**

- Ayuno pronunciado.
- Desnutrición crónica, déficit calórico-proteico.

**3. GH bioactivo pero inmunorreactivo**

- No hay casos probados de GH endógeno anormal, pero respuesta normal al agregado exógeno de hGH.

*GH ALTA, IGF-I NORMAL O ALTA:*

1. Insuficiencia renal crónica con exceso de IGFBP-3 (se supone que exista una resistencia a GH/IGF-I).
2. Defecto primario del receptor de IGF-I (no demostrado).

edad, el sexo y el estado nutricional del paciente (tabla IX).

- Los niveles séricos de IGF-I se encuentran disminuidos en la mayoría de los pacientes (pero no en todos) con déficit de GH, malnutrición y síndrome de Laron.
- La concentración sérica de IGF-I está aumentada en los pacientes acromegálicos, debido al exceso de GH.

- Sin embargo, niños con déficit de crecimiento constitutivo (es decir, sin alteración en el eje GH/IGF) pueden tener valores de IGF-I bajos. Por consiguiente, este dato aislado no es diagnóstico, sino que debe analizarse juntamente con el resto de los datos del paciente.

El valor diagnóstico relativo del dosaje

**TABLA IX.**  
**CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE IGF-I E IGF-II SEGÚN EDAD Y SEXO**  
**(RIA POST CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR EN CONDICIONES**  
**ÁCIDAS).**

Edad (años)	Normal			Estructura corta normal			Déficit de GH		
	n	IGF-I	IGF-II	n	IGF-I	IGF-II	n	IGF-I	IGF-II
<b>Niños</b>									
< 3	10	77 ± 33	480 ± 85	3	38 ± 39	477 ± 640	0		
3-5	9	157 ± 103	573 ± 259	5	80 ± 75	244 ± 100*	9	28 ± 17*	288 ± 227*
6-8	15	211 ± 112	607 ± 185	9	99 ± 41*	339 ± 139*	9	38 ± 20*	271 ± 137*
9-11	10	301 ± 173	505 ± 189	8	148 ± 109	580 ± 380	11	101 ± 94*	409 ± 380
12-14	38	466 ± 188	500 ± 114	5	207 ± 94	490 ± 171	5	92 ± 76*	352 ± 164
> 15	14	516 ± 139	531 ± 107	1	252	384	4	73 ± 75*	603 ± 201
<b>Niñas</b>									
< 3	10	134 ± 53	419 ± 145	0			0		
3-5	15	247 ± 175	526 ± 201	3	103 ± 52	300 ± 129	7	31 ± 35*	273 ± 145*
6-8	20	298 ± 151	601 ± 228	4	198 ± 42	704 ± 119	8	47 ± 67*	452 ± 444
9-11	16	366 ± 109	522 ± 135	4	196 ± 126*	412 ± 220	7	60 ± 59*	286 ± 138*
12-14	26	521 ± 164	498 ± 116	1	90	231	7	54 ± 23*	509 ± 361
> 15	14	464 ± 141	466 ± 145	1	122	824	1	25*	669

Valores expresados como Media ± SD nanogramos por mililitro.

\* Significativamente diferente de los individuos normales ( $p < 0,05$ ).

Tomado de la referencia 115.

de IGF-I sérico aún no ha sido completamente resuelto, debido fundamentalmente a tres factores (118):

1. Inseguridad en el criterio de referencia, es decir el dosaje directo de GH. Este problema actualmente se resuelve sólo con criterio clínico y experiencia.
2. Variantes estructurales del IGF-I: ciertas IGF (especialmente las rhIGF-I producidas en bacterias) presentan anomalías en su plegamiento terciario, lo cual puede alterar su afinidad por un determinado anticuerpo. En consecuencia, es imprescindible que el IGF-I utilizado como trazador y como estándar se encuentre correctamente plegado y altamente purificado.
3. Interferencia de las IGFBP en el dosaje de IGF. Este problema es complejo:
  - La constante de afinidad del complejo IGFBP-IGF es similar al que poseen los anticuerpos específicos para IGF ( $10^{10}$ - $10^{11}$  M<sup>-1</sup>).
  - La velocidad de disociación del com-

plejo IGFBP-IGF es relativamente baja: a pH neutro, el complejo con IGFBP-3 tiene 17 h de vida media a 37°C, y 3 días a 4°C. Sin embargo, al acidificar el medio (pH < 3,4) la disociación es rápida.

- No existe en la actualidad un anticuerpo específico y sensible que reconozca al IGF mientras está unido a las IGFBP.

Así, según los niveles de IGF, pueden encontrarse dos situaciones extremas:

- A bajas concentraciones de IGF en la muestra, las IGFBP secuestran trazador. Esto llevará a una sobre-estimación del nivel de IGF en la muestra.
- A elevadas concentraciones de IGF en la muestra, las IGFBP estarán saturadas con IGF endógeno no marcado, produciendo una subestimación del nivel de IGF.

En conclusión, es preciso disociar el complejo y separar las IGFBP antes de realizar el inmunoensayo para IGF-I, para lo cual han sido propuestos diversos métodos.



- a. Cromatografía de exclusión molecular en condiciones ácidas (pH < 3,4). Éste es el método de referencia contra el cual se evalúa la eficiencia de los demás. Sin embargo, es muy laborioso.
- b. HPLC con columna de exclusión molecular y eluyente ácido. Es un método de performance similar al anterior.
- c. Etanol/Ácido clorhídrico: es el método más usado para muestras de suero humano, ya que es muy eficiente para la proteína mayoritaria IGFBP-3. En una primera etapa, el medio ácido disocia rápidamente al complejo; luego, el etanol precipita las IGFBP (fundamentalmente la -3) pero no el IGF, separándose las IGFBPs por centrifugación. Finalmente se neutraliza el sobrenadante para el dosaje de IGF-I.
- d. Etanol/Ácido clorhídrico/Crioprecipitación: luego de la etapa de neutralización del método anterior, se procede a una reprecipitación por enfriamiento a -20°C durante 1 h, con posterior centrifugación. Este método ha sido utilizado para muestras de suero de rata.
- e. Ácido fórmico/Acetona: en este caso, la precipitación selectiva de las IGFBP se logra con el agregado de acetona.
- f. Incubación con exceso de IGF-II: se acidifica la muestra para disociar el complejo, y luego se agrega un exceso de IGF-II disuelto en una solución alcalina para volver a neutralizar la muestra (la concentración final de IGF-II debe ser dos órdenes de magnitud mayor que la esperada para IGF-I). De esta manera, las IGFBP se saturarán con IGF-II, quedando libre para su dosaje el IGF-I. Este método, aunque relativamente sencillo, resulta oneroso debido al elevado costo del IGF-II.

En muchos casos, el dosaje de IGF-I se desea realizar en muestras de composición cuali/cuantitativa desconocida. Debe entonces evaluarse la aceptabilidad de cada uno de estos métodos extractivos para poder así elegir el que resulte más adecuado (119). Esta evaluación puede realizarse por medio del Binding Capacity y/o Western Ligand Blot (véase más abajo).

Una vez que se elimina la interferencia de las IGFBP de la muestra, se puede proceder al dosaje de IGF-I, ya sea por métodos de desplazamiento competitivo (RIA) o

de detección directa del analito (IRMA, ELISA no competitivo).

*Dosaje inmunológico de IGF-II:* Aunque este péptido es principalmente de interés científico, en determinadas circunstancias ayuda a completar el cuadro clínico del paciente (118):

- En los déficit de GH, IGF-II está disminuido.
- En pacientes con acromegalia: GH, IGF-I e IGFBP-3 están elevados, pero IGF-II se encuentra dentro de los límites normales.

Se ha encontrado que la concentración de IGF-II tiene escasa variación con la edad luego del período neonatal.

Este factor de crecimiento tiene para su dosaje los mismos problemas metodológicos que IGF-I, con ciertas cuestiones adicionales:

- Es difícil obtener un anticuerpo específico que no cruce con IGF-I.
- En las muestras que contienen concentraciones significativas de IGFBP-2, -5 ó -6 (que tienen mucho mayor afinidad por IGF-II que por IGF-I), es complicado el bloqueo de las IGFBP con un exceso de IGF-I.

*Dosaje inmunológico de IGFBP específicas:* Existen anticuerpos específicos contra todas las IGFBP. Sin embargo, y debido a que la mayoría sólo tiene interés científico, no todos son comercializados en forma de equipos para diagnóstico. Para asegurar la especificidad del método inmunológico en cuestión, deben considerarse algunos aspectos generales para todas las IGFBP (118)

1. Es necesario evitar que el anticuerpo específico reconozca el sitio de unión de IGF (y también el de ALS en el caso de IGFBP-3). De esta manera, no hará falta una preparación previa de la muestra.
2. Debido a la gran homología que existe entre las diferentes IGFBPs, es difícil hallar anticuerpos específicos que no presenten reacciones cruzadas. Sin embargo, si la IGFBP que se intenta dosar es la mayoritaria en una muestra determinada, una discreta interferencia por otras IGFBPs no modificará sustancialmente los resultados.
3. La modificación post-transduccional de las

IGFBP (fosforilación, glicosilación y proteólisis) produce una mezcla heterogénea de péptidos, los cuales no reaccionan todos de forma idéntica con un mismo anticuerpo. Además, diferentes anticuerpos (por ejemplo, dos policlonales diferentes) pueden comportarse de manera variable con la misma forma de una IGFBP. En conclusión, es preciso especificar muy bien el sistema que se utiliza en el inmunoensayo.

La IGFBP-3 es la de mayor interés clínico por su dependencia de GH. En rigor, los niveles circulantes de IGFBP-3 se corresponden con los de IGF total (IGF-I + IGF-II), y éstos se correlacionan a su vez con el sistema de la GH. Se encuentra también una variación etaria de la concentración sérica de IGFBP-3, aunque menor que en el caso de IGF-I.

El dosaje de IGFBP-3 tiene importancia diagnóstica fundamentalmente en dos situaciones:

- En el déficit de GH de origen hipofisario o hipotalámico, los niveles de IGFBP-3 son muy bajos.
- Cuando existe déficit funcional del receptor de GH (síndrome de Laron, anticuerpos anti-GH, enfermedad hepática, desnutrición), se encuentran valores muy bajos de IGFBP-3 aún en presencia de concentraciones elevadas de GH.

Sin embargo, hay que tener precaución al evaluar los resultados de un inmunoanálisis: en muestras con actividades elevadas de la proteasa de IGFBP-3, o con disminución del *clearance* renal de la IGFBP-3 (por ej., embarazo o insuficiencia renal crónica), fragmentos de degradación inmunorreactivos pueden dar valores de IGFBP-3 séricos falsamente elevados. En caso de sospechar este tipo de situaciones, para medir la IGFBP-3 intacta hay que eliminar previamente los fragmentos de degradación por cromatografía de exclusión molecular (118).

*Dosaje cuali / cuantitativo de IGFBP: SDS-PAGE.* Este es un método ampliamente utilizado para la detección y caracterización de las IGFBP. El SDS-PAGE más usado como método de separación electroforético, es el desarrollado por Laemmli (120) con concentraciones de acrilamida de entre 10 y 15%. Sin embargo, existen básicamente tres variaciones sobre esta técnica (121):

En la primera variante, las IGFBP séri-

cas se entrecruzan por "affinity crosslinking" con  $^{125}\text{I}$ -IGF-I. La muestra se somete luego a SDS-PAGE y posterior autorradiografía del gel. Para que este método sea semicuantitativo, antes de realizar el entrecruzamiento con trazador debe desplazarse el IGF endógeno unido a las IGFBPs.

Otra variante, que ha crecido enormemente en popularidad, fue descrita originalmente por Hossenlopp y col. (122): la muestra se somete a SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes (que desplaza la unión de los IGF endógenos de sus IGFBPs). Posteriormente se realiza una transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente a un papel de nitrocelulosa, el cual se incuba con  $^{125}\text{I}$ -IGF-I. Este trazador se unirá a sus IGFBPs, inmovilizados sobre la nitrocelulosa, ya que el proceso de electroforesis/transferencia no altera sustancialmente la afinidad de las IGFBP por su ligando. Finalmente se realiza una autorradiografía del papel. Esta técnica se ha llamado *Western ligand blot*.

En los dos métodos descriptos, las IGFBP se separarán electroforéticamente según su peso molecular (detección cualitativa de las diferentes IGFBP de la muestra). Además, una cuantificación densitométrica de la autorradiografía permitirá estimar la abundancia relativa de cada IGFBP en la muestra. Sin embargo, en la interpretación de los resultados es preciso tener en cuenta lo siguiente (121):

- Como se ha dicho, las IGFBP se separan según su peso molecular, por lo cual este método no permite diferenciar IGFBP (o fragmentos proteolíticos de ellas que mantengan afinidad por el IGF-I) con pesos moleculares muy similares.
- La proteólisis de determinadas IGFBP (por ej., la que ocurre fisiológicamente con IGFBP-3 en suero de embarazadas) puede generar fragmentos proteicos con muy baja afinidad por el IGF. En este caso, serán indetectables por estos métodos.
- La afinidad de las diferentes IGFBP por el IGF-I es dependiente de varios factores: la IGFBP en cuestión, y su grado de glicosilación o fosforilación. En consecuencia, el análisis densitométrico de la autorradiografía deberá tomarse como un dato semicuantitativo que sólo da una estimación de la abundancia relativa de las IGFBP de la muestra.

La tercera variante sobre esta técnica, consiste en incubar el papel de nitrocelulosa transferido (obtenido de la misma manera que para el caso del Ligand Blot) con un anticuerpo marcado radioactivamente, específico para alguna de las IGFBP. El papel de nitrocelulosa se revela luego por autorradiografía y se analiza densitométricamente. Este método ha sido llamado *Western Blot*, y tiene la ventaja de permitir la detección específica de formas inmunológicamente relacionadas, tales como las variantes proteolíticas, glicosiladas o fosforiladas de una misma IGFBP. La cuantificación de estas variantes es así independiente de la afinidad que tengan por el IGF-I. Sin embargo, esta técnica tiene el inconveniente de no poder lograr la detección simultánea de más de una IGFBP (121).

*IGF Binding Capacity:* Éste es un ensayo cuantitativo, que evalúa en forma global la capacidad que tiene una muestra de unir  $^{125}\text{I}$ -IGF-I.

Consiste en la acidificación de la muestra (para desplazar la unión de los IGF endógenos de sus IGFBP), y posterior neutralización/incubación con el ligando (IGF-I o -II marcado). Luego se procede a separar el trazador libre del unido, ya sea con carbón activado (adsorción del trazador libre), o por precipitación selectiva del complejo IGFBP-IGF (con anticuerpos específicos para las IGFBP, concanavalina A, aglutinina de germen de trigo, o polietilenglicol). Finalmente se mide la radioactividad asociada al complejo IGFBP-IGF, y se refiere a la cantidad de marca agregada inicialmente a la muestra (121).

Con la excepción de los inmunoensayos específicos para IGFBP, el Binding Capacity es el mejor método para el análisis cuantitativo global de las IGFBP de una muestra. Además, es importante para el estudio de la interacción IGF-IGFBP, y de las variaciones que puedan producir en esta interacción, las modificaciones post-traduccionales de las IGFBP (glicosilación, fosforilación o proteólisis).

*Análisis de Receptores para IGF:* Como ya se ha visto, existen por lo menos dos tipos de receptores específicos para IGF (fig. 2). El receptor de tipo I tiene estructura similar a la del receptor de insulina. El receptor de tipo II une mayoritariamente IGF-

II. Su estructura es muy diferente a la del receptor de tipo I, y su función es poco conocida. De hecho, se cree que el efecto de los IGF sobre el crecimiento sería mediado fundamentalmente por el receptor de tipo I. En consecuencia, éste es el receptor que interesa ser estudiado con fines diagnósticos, y es posible evaluarlo desde dos puntos de vista (123):

1. Estudios de unión de sus ligandos específicos (IGF-I, IGF-II) por medio de un ensayo de receptores de superficie celular. Este método permite estimar la presencia de uno o más tipos de receptores específicos, así como su densidad y afinidad por el ligando, sobre diferentes tipos de células (fibroblastos de piel en cultivo, eritrocitos o linfocitos de los pacientes). Para realizarlo, se estudia el desplazamiento de unión de una cantidad fija de trazador (por ej.,  $^{125}\text{I}$ -IGF-I) con concentraciones crecientes de ligando no marcado (por ej., IGF-I), ambos compitiendo por un número finito de sitios. El análisis de Scatchard de los datos obtenidos permite así calcular los parámetros antes mencionados:  $R_0$  (número de cada tipo de receptor por célula) y  $K_{af}$  (constante de afinidad de cada tipo de receptor por el ligando). Sin embargo, la existencia de receptores *per se* no implica que su ocupación por un ligando conduzca a la respuesta biológica esperada.
2. Se puede estudiar entonces algún efecto biológico (inducción del crecimiento celular) o investigar *in vitro* algunas de las señales post-receptor involucradas en la bioactividad del receptor de IGF. Por ejemplo, la capacidad del receptor ocupado de inducir la fosforilación en residuos de tirosina de varias proteínas endógenas (por ej., IRS-I), o el aumento de la actividad de Tirosina-quinasa celular en respuesta al agregado exógeno de IGF-I.

*Ensayos de proteasas específicas para IGFBP:* Dado que las IGFBP podrían ser claves en la modulación de la acción de los IGFs, el metabolismo de las IGFBP debería ser importante en la regulación de esta modulación. Se han identificado, en sangre y otros tejidos, proteasas específicas para IGFBP (124), algunas de las cuales han sido caracterizadas: plasmina, metaloproteasas de la matriz extracelular, catepsinas, y calicreí-

nas como el antígeno prostático específico (PSA).

En el medio condicionado de varios tipos celulares se han descrito proteasas específicas para IGFBP-2, -4, -5 y -6. Sin embargo, las mejor identificadas son las proteasas que clivan IGFBP-3 (125):

- La actividad proteolítica de IGFBP-3 se describió inicialmente en el suero de embarazadas, y posteriormente se ha encontrado en el suero de pacientes post-quirúrgicos, o con sepsis, desnutrición, déficit del receptor de GH (Síndrome de Laron), cáncer de próstata, leucemia juvenil y tumores cerebrales.
- En pacientes con insuficiencia renal crónica, se ha identificado una proteasa órgano-específica que cliva IGFBP-3, cuya sobreexpresión tisular produce una proteólisis local de la IGFBP-3 en el parénquima del riñón enfermo.
- El líquido seminal normal contiene una proteasa para IGFBP-3, que ha sido identificada como el antígeno prostático específico (PSA). Esta calicreína tiene un patrón de clivaje de IGFBP-3 diferente que el de la proteasa del suero de embarazadas. De esta manera, el PSA puede jugar un rol fisiológico en la reproducción normal, y un rol patológico en enfermedades prostáticas.

La acción de las proteasas sobre las IGFBP alteraría tanto la biodisponibilidad como la bioactividad de los IGFs. Esta proteólisis puede disminuir la afinidad de las IGFBP por su ligando, aumentando así la concentración plasmática del IGF libre.

La mayoría de los métodos utilizados para el estudio de estas proteasas se basa en la separación de IGFBP intacta y proteolizada por medio de SDS-PAGE, seguido de secado o transferencia y detección. Los métodos pueden dividirse en tres categorías (121):

1. Detección de la actividad de proteasa de una muestra.
2. Detección de fragmentos proteolíticos en una muestra.
3. Detección de la actividad de unión a IGF de una muestra (Ligand Blot).

La modificación proteolítica de las IGFBP se demostró inicialmente por medio de la desaparición de bandas específicas de ciertas IGFBP en un Ligand Blot. Este efec-

to podía inhibirse con el agregado de quelantes de iones metálicos, o inhibidores de proteasas como la aprotinina y el PMSF. En determinados sistemas (por ej., suero de embarazadas, pero no en líquido seminal), esta desaparición de las bandas de IGFBP no se correlacionaba con la aparición de bandas de menor peso molecular (es decir, los fragmentos proteolíticos de las IGFBP), ya que la proteólisis en estos casos disminuye o anula la afinidad de la IGFBP por el  $^{125}\text{I}$ -IGF-I.

Estos estudios involucraban la preincubación de la muestra con suero normal (como fuente de IGFBP sustrato) previo al Ligand Blot. El grado de proteólisis de las IGFBP sustrato se correlacionaba entonces con la actividad global de proteasa de la muestra. Este método tiene la ventaja de identificar la modificación de varias IGFBP en un solo experimento, pero es poco sensible. Además, existen normalmente en circulación concentraciones elevadas de inhibidores de proteasas inespecíficas. Por lo tanto, si la proteólisis en una muestra se debe a una disminución en los niveles de estos inhibidores fisiológicos, tal efecto podría enmascarse con el agregado de suero normal (como fuente de IGFBP), ya que de por sí es rico en inhibidores.

Este método se ha reemplazado en gran medida por el uso de IGFBP purificado o recombinante como sustrato (cada vez de mayor disponibilidad). Si la IGFBP se encuentra marcada radioactivamente, la fragmentación resultante de su incubación con la muestra puede visualizarse por separación electroforética y autorradiografía. En cambio, si la IGFBP no se encuentra marcada, dicha fragmentación se puede detectar con SDS-PAGE, transferencia y posterior revelado con un anticuerpo específico para esa IGFBP, ya sea radioactivo o biotinilado.

Estos últimos procedimientos sólo pueden aplicarse a una IGFBP por vez, y no dan información acerca de potenciales cambios funcionales que aparezcan como consecuencia de la proteólisis. Sin embargo, son mucho más sensibles que los anteriores y dan idea del patrón de fragmentación inducido por las proteasas de la muestra. Por otro lado, debe tenerse presente que para el caso de  $^{125}\text{I}$ -IGFBPs, sólo se visualizarán los fragmentos proteolíticos que posean residuos de tirosina en su estructura; y en el caso de IGFBPs no marcadas, se detectarán solamen-



te los fragmentos que posean epitopes reconocidos por el antisuero utilizado.

Estos métodos de detección inmunológica recién descritos (Western Immuno-blot) pueden usarse directamente sobre las muestras para la detección de fragmentos de una determinada IGFBP, o pueden utilizarse previa incubación con el IGFBP sustrato para cuantificar la actividad enzimática responsable de la proteólisis.

Es necesario tener cuidado con los niveles de IGF presentes en la muestra para la interpretación de las medidas de actividad proteolítica: la unión de IGF a la IGFBP-3 e IGFBP-5 disminuye la susceptibilidad de éstas a la proteólisis; dicha unión específica tiene efecto contrario sobre la proteólisis de la IGFBP-4.

#### CORRESPONDENCIA

Prof. Dra. Ana M. Cortizo  
Cátedra de Bioquímica Patológica  
Facultad de Ciencias Exactas  
Universidad Nacional de La Plata  
47 y 115 (1900) La Plata  
Fax: (021) 530189  
e-mail: cortizo@nahuel.biol.unlp.ed.ar

#### AGRADECIMIENTOS

Los trabajos desarrollados por los autores fueron parcialmente financiados por la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata y la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). AMC es miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológicos de la CICPBA.

#### Referencias bibliográficas

1. RECHLER, M. M. and NISSLEY, S. P., "Insulin-like growth factors", en Sporn, M. H. and Roberts, A. B., editores, *Peptide growth factors and their receptors*, 263-282, Springer-Verlag, Berlin 1990.
2. DAUGHADAY, W. H. and ROTWEIN, P., "Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations", *Endocrinol. Rev.*, **10**, 68-91, 1989.
3. LEROITH, D.; ADAMO, M.; WERNER, H. and ROBERTS, C. T., JR., "Molecular and cellular biology of the insulin-like growth factors", en Weintraub, B. D., editor, *Molecular Endocrinology: basic concepts and clinical correlations*, 181-193, Raven Press, Ltd., New York, 1995.
4. SALMON, W. D., JR. and DAUGHADAY, W. H., "A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*", *J. Lab. Clin. Med.*, **49**, 825-836, 1957.
5. JONES, J. I. and CLEMMONS, D. R., "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions", *Endocrin. Rev.*, **16**, 3-34, 1995.
6. BACH, L. A. and RECHLER, M. M., "Insulin-like growth factor binding proteins", *Diabetes Rev.*, **3**, 38-61, 1995.
7. BAXTER, R. C., "The somatomedins: insulin-like growth factors", *Adv. Clin. Chem.*, **25**, 49-115, 1986.
8. WERNER, H.; ADAMO, M.; ROBERTS, C. T., JR. and LEROITH, D., "Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action", *Vitam. Horm.*, **48**, 1-58, 1994.
9. DAUGHADAY, W. H. and ROTWEIN, P., "Insulin-like growth factor I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations", *Endocrine Rev.*, **10**, 68-91, 1989.
10. SUSSENBACH, J. S., "The gene structure of the insuline-like growth factor family", *Prog. Growth Factor Res.*, **1**, 33-48, 1989.
11. SARA, V. R.; CARLSSON-SKWIRUT, C.; ANDERSON, C.; HALL, E.; SJOGREN, B.; HOLLMGREN, A. and JORNVAL, H., "Characterization of somatomedins from human fetal brain: identification of a variant form of insulin-like growth factor I", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4.904-4.907, 1986.
12. BRISSENDEN, J. E.; ULLRICH, A. and FRANCIS, U., "Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor", *Nature*, **310**, 310-313, 1984.
13. TAYLOR, B. A. and GRIECO, D., "Localization of the gene encoding insulin-like growth factor I on mouse chromosome 10", *Cytogenet. Cell. Genet.*, **56**, 57-58, 1991.
14. TRICOLO, J. V.; RALL, L. B.; SCOTT, J.; BELL, G. I. and SHOWS, T. B., "Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12", *Nature (London)*, **310**, 784-786, 1984.
15. RECHLER, M. M., "Insulin-like growth factor II: gene structure and expression into messenger RNA and protein", en LeRoith, D., editor, *Insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects*, 87-110, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991.
16. CZECH, M. P., "Signal transmission by the insulin-like growth factors", *Cell*, **59**, 235-238, 1989.

17. CHEATHAM, B. and KAHN, C. R., "Insulin action and the insulin signaling network", *Endocrine Rev.*, **16** 117-142, 1995.
18. WHITE, M. F.; SHOELSON, S. E.; KEUTMANN, H. and KAHN, C. R., "A cascade of tyrosine autophosphorylation in the  $\beta$ -subunit activates the insulin receptor", *J. Biol. Chem.*, **263**, 2.969-2.980, 1988.
19. BURGESS, S. K.; JACOBS, S.; CUATRECASAS, P. and SAHYOUN, N., "Characterization of a neuronal subtype of insulin-like growth factor I receptor", *J. Biol. Chem.*, **262**, 1.618-1.622, 1987.
20. CORTIZO, A. M.; VAN ARNOLD, J.; BURGESS, S. K. and ESPINAL, J., "Insulin and IGF-I stimulated RNA synthesis in primary cultures of neuronal cells: involvement of cyclic AMP and protein kinase-C", *APPTLA*, **41**, 295-307, 1991.
21. BASKIN, D. G.; WILCOX, B. J.; FIGLEWICZ, D. P. and DORSA, D. M., "Insulin and insulin-like growth factors in the CNS", *TINS*, **11**, 107-111, 1988.
22. RECHLER, M. M. and NISSLEY, S. P., "The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors", *Annu. Rev. Physiol.*, **47**, 425-442, 1985.
23. ABBOTT, A. M.; BUENO, R.; PEDRINI, M. T.; MURRAY, J. M. and SMITH, R. J., "Insulin-like growth factor I receptor gene structure", *J. Biol. Chem.*, **267**, 10.759-10.763, 1992.
24. WERNER, H.; STANNARD, B.; BACH, M. A.; LE ROITH, D. and ROBERTS, C. T., JR., "Cloning and characterization of the proximal promoter region of the rat insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 1.021-1.027, 1990.
25. BLAKESLEY, V. A.; SCRIMGEOUR, A.; ESPOSITO, D. and LE ROITH, D., "Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor does it differ from insulin receptor signaling?", *Cytokine & Growth Factor Rev.*, **7**, 153-159, 1996.
26. JACOBS, S. and CUATRECASAS, P., "Phosphorylation of receptor for insulin and insulin-like growth factor I", *J. Biol. Chem.*, **261**, 934-939, 1986.
27. BONDY, C. A.; WERNER, H.; ROBERTS, C. T., JR. and LEROITH, D., "Comparative pattern of gene expression for IGF-I and IGF-II peptides and IGF-I receptor during rat embryogenesis", *Mol. Endocrinol.*, **4**, 1.386-1.398, 1990.
28. WERNER, H.; WOLOSCHAK, M.; ADAMO, M.; SHEN-ORR, Z.; ROBERTS, C. T., JR. and LE ROITH, D., "Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene", *Proc. Natl. Acad. SCI. USA*, **86**, 7.451-7.455, 1989.
29. ISAKSSON, O. G. P.; LINDALL, A.; ISQAARD, J.; NELSON, A.; TARNELL, J. and CARLSSON, B., "Dual regulation of cartilage growth", en Spencer, E. M., editor, *Modern concepts of insulin-like growth factors*, 121-127, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1991.
30. LOWE, W. L., JR.; ADAMO, M.; WERNER, H.; ROBERTS, C. T., JR. and LE ROITH, D., "Regulation by fasting of rat insulin-like growth factor I and its receptor: effects on gene expression and binding", *J. Clin. Invest.*, **84**, 619-626, 1991.
31. WERNER, H.; SHEN-ORR, Z.; STANNARD, B.; BURGUERA, B.; ROBERTS, C. T., JR. and LE ROITH, D., "Experimental diabetes increases insulin-like growth factor I and II receptor concentration and gene expression in the kidney", *Diabetes*, **39**, 1.490-1.497, 1990.
32. PESSIN, J. E., "Molecular properties of insulin/IGF-I hybrid receptors. 4th international symposium on insulin, IGFs and their receptors", Le Roith, D., Raizada, M., editores, *Current directions in insulin-like growth factor research*, 133-144, Plenum Press, New York, 1994.
33. NILSEN, F. C., "The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II", *Prog. Growth Factor Res.*, **4**, 257-290, 1992.
34. NISSLEY, S. P. and KIESS, W., "Binding of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and lysosomal enzymes to the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor", en Spencer, E. M., editor, *Modern concepts of insulin-like growth factors*, 419-430, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, 1991.
35. PURCHIO, A. F.; COOPER, J. A.; BRUNNER, A. M.; LIIOUBIN, M. N.; GENTRY, L. E.; KOVACINA, K. S.; ROTH, R. A. and MARQUARDT, H., "Identification of mannose 6-phosphate in two asparagine-linked sugar chains of recombinant transforming growth factor- $\beta$ 1 precursor", *J. Biol. Chem.*, **263**, 14.211-14.215, 1988.
36. CLEMMONS, D. R., "Multiple hormones stimulate the production of somatomedin by cultured human fibroblasts", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **58**, 850-856, 1984.
37. YOSHINOCHI, M.; MIURA, M.; GAOZZA, E.; SHIWEI, L. and BASERGA, R., "Basic fibroblast growth factor stimulates DNA synthesis in cells overexpressing the insulin-like growth factor-I receptor", *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1.161-1.168, 1993.
38. LOWE, W. L., "Biologic actions of the insulin-like growth factors", en Le Roith, D., editor, *Insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects*, 49-85, CRC Press, Boca Raton, 1991.
39. SARA, V. R. and HALL, K., "Insulin-like growth factors and their binding proteins", *Physiol. Rev.*, **70**, 591-614, 1990.
40. COHICK, W. S. and CLEMMONS, D. R., "The insulin-like growth factors", *Annu. Rev. Physiol.*, **55**, 131-153, 1993.

41. WILLIAMS, G. T.; SMITH, C. A.; SPOONCEB, E.; DEXTER, T. M. and TAYLOR, D. R., "Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis", *Nature*, **343**, 76-79, 1990.
42. MUTA, K. and KRANTZ, S. B., "Apoptosis of human erythroid colony forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor I as well as erythropoietin", *J. Cell Physiol.*, **156**, 264-271, 1993.
43. RODRÍGUEZ TARDUCHY, G.; COLLINS, M. K.; GARCÍA, I. and LÓPEZ RIVAS, A., "Insulin-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells", *J. Immunol.*, **149**, 535-540, 1992.
44. FLORINI, J. R.; EWTON, D. Z. and MCWADE, F. J., "IGFs, muscle growth, and myogenesis", *Diabetes Rev.*, **3**, 73-92, 1995.
45. BAYLINK, D. J.; FINKELMAN, R. D. and MOHAN, S., "Growth factors to stimulate bone formation", *J. Bone Min. Res.*, **8**, S565-S572, 1993.
46. CANALIS, E.; PASH, J. and VARGHESE, S., "Skeletal growth factors", *Crit. Rev. Euk. Gene Exp.*, **3**, 155-166, 1993.
47. CANALIS, E. and AGNUSEI, D., "Insulin-like growth factors and their role in osteoporosis", *Calcif. Tissue Int.*, **58**, 133-134, 1996.
48. LUND, P. K.; MOATS-STAATS, B. M.; HYNES, M. A.; SIMMONS, J. G.; JANSEN, M.; D'ERRICOLE, A. J. and VAN WYK, J. J., "Somatomedin C/insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II mRNAs in rat fetal and adult tissues", *J. Biol. Chem.*, **261**, 14.539-14.544, 1986.
49. LARON, Z. and KLINGER, B., "Laron syndrome: clinical features, molecular pathology and treatment", *Horm. Res.*, **42**, 198-202, 1994.
50. AMSELEM, S.; DUQUESNOY, P. and GOOSSENS, M., "Molecular basis of Laron Dwarfism", *TEM*, **1**, 35-40, 1991.
51. GULER, H.-P.; ZAPF, J.; SCHIWILLER, E. and FROESCH, E. R., "Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **85**, 4.889-4.893, 1988.
52. SKOTTNER, A.; CLARK, R. G.; FRYKLUND, L. and ROBINSON, I. C. A. F., "Growth responses in mutant dwarf rat to human growth hormone and recombinant human insulin-like growth factor I", *Endocrinology*, **124**, 2.519-2.526, 1989.
53. ROSENBLUM, A. L. and GUEVARA-AGUIRRE, J., "Prismatic case: Bienvenidos a mi tierra de soledad: from poetry to molecular biology in southern Ecuador", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 695-702, 1994.
54. MERIMEE, T. J.; BAUMAN, G. and DAUGHADAY, W., "Growth hormone binding protein: II. Studies in Pygmies and normal statured subjects", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**, 1.183-1.188, 1990.
55. JUUL, A.; MAIN, K.; BLUM, W. F.; LINDHOLM, J.; RANKE, M. B. and SKAKKEBAEK, N. E., "The ratio between serum levels of insulin-like growth factor (IGF-I) and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decrease with age in health adults and is increased in acromegalic patients", *Clin. Endocrinol.*, **41**, 85-93, 1994.
56. ZENOBI, P. D.; GRAF, S.; URSPRUNG, H. and FROESCH, E. R., "Effects of insulin-like growth factor-I on glucose tolerance, insulin levels, and insulin secretion", *J. Clin. Invest.*, **89**, 1.908-1.913, 1992.
57. THISSEN, J.-P.; KETELSLEGERS, J.-M. and UNDERWOOD, L. E., "Nutritional regulation of the insulin-like growth factors", *Endocrine Rev.*, **15**, 80-101, 1994.
58. FRYBURG, D. A. and BARRETT, E. J., "Insulin, growth hormone, and IGF-I regulation of protein metabolism", *Diabetes Rev.*, **3**, 93-112, 1995.
59. BACH, L. A., and RECHLER, M. M., "Insulin-like growth factors and diabetes", *Diabetes/Metabolism Rev.*, **8**, 229-257, 1992.
60. FLYVBJERG, A. and ØRSKOV, H., "Insulin-like growth factors in the kidney", en Baxter, R. C.; Gluckman, P. D. and Rosenfeld, R. G., editores, *The insulin-like growth factors and their regulatory proteins*, 417-425, Elsevier Science B.V., 1994.
61. ANTONIADES, H. N., "Molecular basis of normal wound healing", *Diabetes Rev.*, **3**, 129-138, 1995.
62. DROP, S. L. S.; SCHULLER, A. G. P.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D. J.; GROFFEN, C.; BRIKKNEMAN and ZWARTHOFF, E. C., "Structural aspects of the IGFBP family", *Growth Regulation*, **2**, 69-79, 1992.
63. HYNES, R. O., "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion", *Cell*, **69**, 11-25, 1992.
64. ZAPF, J.; SCHOENLE, E.; JAGARS, G.; SAND, Y.; GRUNWALD, J. and FROESCH, E. P., "Inhibition of the activity of non-suppressible insulin-like activity on isolated rat fat cells by binding to its carrier protein", *J. Clin. Invest.*, **63**, 1.077-1.084, 1979.
65. RECHLER, M. M., "Insulin-like growth factor binding proteins", *Vitam. Horm.*, **47**, 1-114, 1993.
66. JONES, J. I.; GOCKERMAN, A.; BUSBY, W. H.; WRIGHT, G. and CLEMMONS, D. R., "Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10.553-10.557, 1993.
67. FROST, R. A. and TSENG, L., "Insulin-like growth factor binding protein-1 is phosphorylated by cultured human endometrial stro-

- mal cells and multiple protein kinases *in vitro*", *J. Biol. Chem.*, **266**, 18.082-18.088, 1991.
68. ZAPF, J.; KIEFER, M.; MERRYWEATHER, J.; MASIARZ, F.; BAUER, D.; BORN, W.; FISCHER, J. A. and FROESCH, E. R., "Isolation from adult human serum of four insulin-like growth factor (IGF) binding proteins and molecular cloning of one of them that is increased by IGF administration and in extrapancreatic tumor hypoglycemia", *J. Biol. Chem.*, **265**, 14.892-14.898, 1990.
69. OLSON, J. A., JR.; SHIVERICK, K. T.; OGILVIE, S.; BUHI, W. C. and RAIZADA, M. K., "Developmental expression of the rat insulin-like growth factor binding protein-2 by astrocytic glial cells in culture", *Endocrinology*, **129**, 1.066-1.074, 1991.
70. LASSARRE, C.; HARDOUIN, S.; DAFPOS, F.; FORESTIER, F.; FRANKENNE, F. and BINOUX, M., "Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation", *Pediatr. Res.*, **29**, 219-225, 1991.
71. OOI, G. T.; ORLOWSKI, C. C.; BROWN, A. L.; BECKER, R. E.; UNTERMAN, T. G. and RECHLER, M. M., "Different tissue distribution and hormonal regulation of mRNAs encoding rat insulin-like growth factor binding proteins rIGFBP-1 and rIGFBP-2", *Mol. Endocrinol.*, **4**, 321-328, 1990.
72. ZAPF, J.; SCHMID, C.; GULER, H. P.; WALDVOGEL, M.; HAURI, C.; FUTO, E.; HOSSENLOPP, P.; BINOUX, M. and FROESCH, E. R., "Regulation of binding proteins for insulin-like growth factor (IGF) in humans", *J. Clin. Invest.*, **86**, 952-961, 1990.
73. CLEMMONS, D. R.; SNYDER, D. K. and BUSBY, W. H., JR., "Variables controlling the secretion of insulin-like growth factor binding protein-2 in normal human subjects", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **73**, 727-733, 1991.
74. CHEN, T. L.; CHANG, L. Y.; BATES, R. L. and PERLMAN, A. J., "Dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> modulation of insulin-like growth factor-binding proteins in rat osteoblast-like cell cultures", *Endocrinology*, **128**, 73-80, 1991.
75. MCCUSKER, R. H. and CLEMMONS, D. R., "Insulin-like growth factor binding protein secretion by muscle cells: Effect of cellular differentiation and proliferation", *J. Cell. Physiol.*, **137**, 505-512, 1988.
76. ESPINAL, J. and CORTIZO, A. M., "Polarised secretion of IGF-I binding proteins from pancreatic  $\beta$ -cells", 50th Annual Meeting of American Diabetes Association, Atlanta, Georgia, EEUU, 1990.
77. MASSA, L.; CORTIZO, A. M. and GAGLIARDINO, J. J., "Insulin-like growth factor binding proteins from adult-hamster pancreatic islets: influence of glucose concentration", *Diabetes Metab.*, **23**, 417-423, 1997.
78. EHRENBORG, E.; LARSSON, C.; JANSON, M. and LUTHMAN, H., "The insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3 are contiguous on the short arm of chromosome 7", Int. Symp. Mol. Cell Biol. of Insulin/IGFs, 3rd, Oct. 12-14, Gainesville, Fl. 1990. Abstract.
79. BAXTER, R. C. and MARTIN, J. L., "Binding proteins for the insulin-like growth factors: Structure, regulation and function", *Prog. Growth Factor Res.*, **1**, 49-68, 1989.
80. MARTIN, J. L. and BAXTER, R. C., "Insulin-like growth factor binding protein-3: biochemistry and physiology", *Growth Regulation*, **2**, 88-99, 1992.
81. BLUM, W. F. and RANKE, M. B., "Plasma IGF-BP-3 levels as clinical indicators", en E. M. Spencer, editor, *Modern concepts of insulin-like growth factors*, 381-394, Elsevier, New York, 1991.
82. GIUDICE, L. C.; FARRELL, E. M.; PHAM, H.; LAMSON, G. and ROSENFELD, R. G., "Insulin-like growth factor binding proteins in the maternal serum throughout gestation and in the puerperium: Effects of a pregnancy-associated serum proteases activity", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**, 806-816, 1990.
83. HOSSENLOPP, P.; SEGOVIA, B.; LASSARRE, C.; ROGHANI, M.; BREDON, M. and BINOUX, M., "Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150K complex during pregnancy", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **71**, 797-805, 1990.
84. GARGOSKY, S. E.; OWENS, P. C.; WALTON, P. E.; OWENS, J. A.; ROBINSON, J. S.; WALLACE, J. C. and BALLARD, F. J., "Most of the circulating insulin-like growth factors-I and II are present in the 150 kDa complex during human pregnancy", *J. Endocrinol.*, **131**, 491-497, 1991.
85. CAMACHO-HUBNER, C.; CLEMMONS, D. R. and D'ERCOLE, A. J., "Regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in transgenic mice with altered expression of growth hormone and IGF-I", *Endocrinology*, **129**, 1.201-1.206, 1991.
86. BAXTER, R. C.; MARTIN, J. L. and BENIAC, V. A., "High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex", *J. Biol. Chem.*, **264**, 11.843-11.848, 1989.
87. BAXTER, R. C., "Glycosaminoglycans inhibit formation of the 140 kDa insulin-like growth factor-binding protein complex", *Biochem. J.*, **271**, 773-777, 1990.
88. BAXTER, R. C., "Circulating levels and molecular distribution of the acide-labile ( $\alpha$ ) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor-binding protein complex", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **70**, 1.347-1.353, 1990.



89. SHIMASAKI, S.; SHIMONAKA, M.; ZHANG, H.-P. and LING, N., "Identification of five different insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human", *J. Biol. Chem.*, **266**, 10.646-10.653, 1991.
90. BAUTISTA, C. M.; BAYLINK, D. J. and MOHAN, S., "Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: A potential candidate for fixing IGF-II in human bone", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 756-763, 1991.
91. CAMACHO-HUBNER, C.; BUSBY, W. H., JR.; MCCUSKER, R. H.; WRIGHT, G. and CLEMMONS, D. R., "Identification of the forms of insulin-like growth factor binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion", *J. Biol. Chem.*, **267**, 11.949-11.956, 1992.
92. JAMES, P. L.; JONES, S. B.; BUSBY, W. H., JR.; CLEMMONS, D. R. and ROTWEIN, P., "A highly conserved insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-5) is expressed during myoblast differentiation", *J. Biol. Chem.*, **268**, 22.305-22.312, 1993.
93. SCHARLA, S. H.; STRONG, D. D.; MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. and LINKHART, T. A., "1,25-Dihydroxyvitamin D3 differentially regulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-4 in mouse osteoblasts", *Endocrinology*, **129**, 3.139-3.146, 1991.
94. CLEMMONS, D. R., "IGF binding proteins: regulation of cellular actions", *Growth Regulation*, **2**, 80-87, 1992.
95. CONOVER, C. A., "Glycosylation of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) is not required for potentiation of IGF-I action: evidence for processing of cell-bound IGFBP-3", *Endocrinology*, **129**, 3.259-3.268, 1991.
96. RUTANEN, E.-M.; PEKONEN, F. and MAKINEN, T., "Soluble 34K binding protein inhibits the binding of insulin-like growth factor I to its own cell receptors in human secretory phase endometrium: evidence for autocrine/paracrine regulation of growth factor action", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **66**, 173-180, 1988.
97. ANGERVO, M.; KOISTINEN, R.; SUKKARI, A. M. and SEPPALA, M., "Insulin like growth factor binding protein-1 inhibits DNA amplification induced by insulin-like growth factor I in human granulosa-luteal cells", *Hum. Reprod.*, **6**, 770-773, 1991.
98. ELGIN, R. G.; BUSBY, W. H. and CLEMMONS, D. R., "An insulin-like growth factor binding protein enhances the biologic response to IGF-I", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3.254-3.258, 1987.
99. JONES, J. I.; D'ERCOLE, A. J.; CAMACHO-HUBNER, C. and CLEMMONS, D. R., "Phosphorylation of insulin-like growth factor binding protein in cell culture and in vivo: effects on affinity for IGF-I", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7.481-7.485, 1991.
100. DEMELLOW, J. S. M. and BAXTER, R. C., "Growth hormone dependent insulin-like growth factor binding protein both inhibits and potentiates IGF-I stimulated DNA synthesis in skin fibroblasts", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**, 199-204, 1988.
101. SCHMID, C.; RUTISHAUSER, J.; SCHLAPFER, Y.; FROESCH, E. R. and ZAPP, J., "Intact but not truncated insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) blocks IGF-I induced stimulation of osteoblasts: control of IGF signalling to bone cells by IGFBP-3 specific proteolysis?", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 579-585, 1991.
102. VILLAUDY, J.; DELBE, J.; BLAT, C.; DESAULTY, G.; GOLDE, A. and HAREL, L., "An IGF binding protein is an inhibitor of IGF stimulation", *J. Cell. Physiol.*, **149**, 492-496, 1991.
103. OH, Y.; MULLER, H. L.; LAMSON, G. and ROSENFELD, R. G., "Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells", *J. Biol. Chem.*, **268**, 14.964-14.971, 1993.
104. CONOVER, C. A.; RONK, M.; LOMBANA, F. and POWELL, D. R., "Structural and biological characterization of bovine insulin like growth factor binding protein-3", *Endocrinology*, **127**, 2.795-2.803, 1990.
105. ERNST, M. and RODAN, G. A., "Increased activity of insulin-like growth factor (IGF) in osteoblastic cells in the presence of growth hormone (GH): positive correlation with the presence of the GH-induced IGF-binding protein BP-3", *Endocrinology*, **127**, 807-814, 1990.
106. SOMMER, A.; MAACK, C. A.; SPRATT, S. K.; MASCARENHAS, D.; TRESSSEL, T. L. J.; RHODES, E. T.; LEE, R.; ROUMAS, M.; TATSUNO, G. P.; FLYNN, J. A.; GERBER, N.; TAYLOR, J.; CUDNY, H.; NANNEY, L.; HUNT, T. K. and SPENCER, E. M., "Molecular genetics and actions of recombinant insulin like growth factor binding protein-3", en Spencer, E. M., editor, *Modern concepts of insulin-like growth factors*, 715-728, Elsevier, New York, 1991.
107. CLARK, R. G.; MORTENSEN, D.; REIFSYNDER, D.; MOHLER, M.; ETCHEVERRY, T. and MUKKU, V., "Recombinant human insulin-like growth factor binding protein-3 (rhIGFBP-3): effects on the glycemic and growth promoting activities of rhIGF-I in the rat", *Growth Regul.*, **3**, 50-52, 1993.
108. STEWART, C. H.; BATES, D. C.; CALDER, T. A.; WOODALL, S. and PELL, J. M., "Potentiation on insulin like growth factor (IGF-I) activity by an antibody: supportive evidence for

- enhancement of IGF-I bioactivity *in vivo* by IGF binding proteins", *Endocrinology*, **133**, 1.462-1.465, 1993.
109. MOHAN, S.; BAUTISTA, C. M.; WERGEDAL, J. and BAYLINK, D. J., "Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium: a potential local regulator of IGF action", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8.338-8.342, 1989.
110. CONOVER, C. A. M.; KIEFER, M. C. and ZAPP, J., "Posttranslational regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and transformed human fibroblasts. Insulin-like growth factor dependence and biological studies", *J. Clin. Invest.*, **91**, 1.129-1.137, 1993.
111. JONES, J. I.; GOCKERMAN, A.; BUSBY, W. H. J.; CAMACHO HUBNER, C. and CLEMMONS, D. R., "Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I", *J. Cell. Biol.*, **121**, 679-687, 1993.
112. BAUTISTA, C. M.; BAYLINK, D. J. and MOHAN, S., "Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone: a potential candidate for fixing IGF-II in human bone", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 756-763, 1991.
113. CLEMMONS, D. R., "Role of post translational modifications in modifying the biologic activity of insulin like growth factor binding proteins", en Le Roith, D. and Raizada, M. K., editores, *Current Directions in insulin-like growth factor receptor*, 245-253, Plenum Press, New York, 1994.
114. DURHAM, S. K.; KIEFER, M. C.; RIGGS, B. L. and CONOVER, C. A., "Regulation of insulin-like growth factor binding protein 4 by a specific insulin-like growth factor binding protein 4 proteinase in normal human osteoblast-like cells: implications in bone cell physiology", *J. Bone Miner. Res.*, **9**, 111-117, 1994.
115. ROSENFELD, R. G.; WILSON, D. M. and LEE, P. D. K., "Insulin-like growth factors I and II in the evaluation of growth retardation", *J. Pediatr.*, **109**, 428-433, 1986.
116. RAPPAPORT, R. and SOUBERBIELLE, J. C., "Growth disorders", en Soldin, S. J.; Rifai, N. and Hicks, J. M. B. (eds.), *Biochemical basis of pediatric disease*, pp. 141-164, AACCPress, 1992.
117. ROSENFELD, R. G.; ALBERTSSON-WIKLAND, K.; CASSORLA, F.; FRASIER, S. D.; HASEGAWA, Y.; HINTZ, R. L.; LAFRANCHI, S.; LIPPE, B.; LORIAUX, L.; MELMED, S.; PREECE, M. A.; RANKE, M. B.; REITER, E. O.; ROGOL, A. D.; UNDERWOOD, L. E. and WERTHER, G. A., "Diagnostic controversy: The diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **80**, 1.532-1.540, 1995.
118. BLUM, W. F. and BREIER, B. H., "Radioimmunoassays for IGFs and IGF-BPs", proceedings of the Third International Symposium on Insulin-like Growth Factors, *Growth Regul.*, **4**, 11-19, 1994.
119. CRAWFORD, B. A.; MARTIN, J. L.; HOWE, C. J.; HANDELSMAN, D. J. and BAXTER, R. C., "Comparison of extraction methods for insulin-like growth factor-I in rat serum", *J. Endocrinol.*, **134**, 169-176, 1992.
120. LAEMMLI, U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature (London)*, **227**, 680-685, 1970.
121. HOLLY, J. M. P. and MARTIN, J. L., "Insulin-like growth factor binding proteins: a review of methodological aspects of their purification, analysis and regulation", proceedings of the Third International Symposium on Insulin-like Growth Factors, *Growth Regul.*, **4**, 20-30, 1994.
122. HOSSENLOPP, P.; SEURIN, D.; SEGOVIA-QUINSON, B.; HARDOUIN, S. and BINOUX, M., "Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using Western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies", *Anal. Biochem.*, **154**, 138-143, 1986.
123. ROTH, R. A. and KIESS, W., "Insulin-like growth factor receptors: recent developments and new methodologies", proceedings of the Third International Symposium on Insulin-like Growth Factors, *Growth Regul.*, **4**, 31-38, 1994.
124. HOLLY, J. M. P.; CLAFFEY, D. C. P.; HUGHES, S. C. C.; FROST, V. J. and YATEMAN, M. E., "Proteases acting on the IGF-BPs: their occurrence and biological significance", *Growth Regul.*, **3**, 91-95, 1993.
125. LAMSON, G.; GIUDICE, L. C. and ROSENFELD, R. G., "A simple assay for proteolysis of IGF-BP-3", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **72**, 1.391-1.393, 1991.