

**UNIVERSIDAD CEU-SAN PABLO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Mecanismos de las acciones neuroprotectoras  
inducidas por *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1)  
en animales con deficiencia de esta hormona.  
Efectos de la administración exógena de IGF-1.**

**JUAN ENRIQUE PUCHE GARCÍA**

**MADRID, 2013**

*A Marta*

*“Nunca una noche ha vencido a un amanecer,  
ni un problema ha ganado a la esperanza” (Bern Williams)*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral:

En primer lugar, a mi madre, Esperanza, por todo su amor y sacrificio para que llegara a ser quien ahora soy. Sigues siendo mi modelo. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí, pero seguiré intentándolo día a día.

A Inma Castilla de Cortázar, directora de esta Tesis, piedra angular de multitud de proyectos, sin cuyo buen hacer, espíritu de trabajo y constancia hubiera sido imposible que hubiera llegado hasta aquí. Muchas gracias por tu cercanía, confianza y generosidad, ahora y siempre.

A Úrsula Muñoz, todo un ejemplo de profesionalidad investigadora y humildad. Uno de los mejores descubrimientos de Nueva York, y sin la que este trabajo no hubiera salido adelante con tanta calidad y celeridad. Para mí es un orgullo poder presumir de amiga andaluza.

A mis compañeros de investigación, M<sup>a</sup> Cruz Sádaba, María Olleros, Elena Ávila, Mariano García-Magariño, Irene Martín, Cristina Sebal y Laura Valls, por su desinteresada ayuda y esfuerzo, tanto en el tratamiento de los animales como en su posterior sacrificio. Además, en especial, me gustaría destacar a Susana Arahetes, nuestra ATL, por su disponibilidad y dedicación, y a Raquel Romero, fuente inagotable de conocimientos histológicos. Me siento muy afortunado de pertenecer a este equipazo.

A mis compañeros de departamento, Esther Escudero, Coronación Rodríguez, Isabel Sánchez, José Luis Lavandera, Lucía Guerra, Judith Cacho, María José Borrego y María Muñoz, por su cariño y por facilitarme en todo momento la realización de esta Tesis. En especial, agradezco a Rima Barhoum sus valores, simpatía y por ser la pareja perfecta para nuestros viajes de cooperación internacional: ¿para cuándo el próximo?

A la Facultad de Medicina de la Universidad CEU San Pablo, por haber posibilitado que compatibilizara mi labor docente con mi actividad investigadora, aunque eso significara salir de la Facultad a altas horas de la noche. En especial, al Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA), donde se han llevado a cabo la práctica totalidad de los procedimientos aquí descritos, y a su director, Fernando Vidal, un investigador ejemplar, cuyos consejos y forma de ser quedarán en mí para siempre. Del mismo modo, a Paloma Fernández, Ricardo Arroyo, Daniel Masana, investigadores del IMMA sin los que los microarrays no hubieran abierto tantas puertas... valéis mucho y espero seguir viéndoos por aquí.

Al centro de resonancia magnética del Instituto Alberto Sols del CSIC, en concreto a Sebastián Cerdán y Teresa Navarro por su valiosa ayuda en el análisis de los datos.

Al servicio de animalario por su dedicado trabajo que ha facilitado en todo momento la realización de este proyecto.

A mis amigos, por estar siempre ahí a pesar de la distancia, por vuestras sonrisas, confianzas, horas de diversión... ¡no los hay mejores!

Y dejando lo mejor para el final, a Marta, por su enorme amor, comprensión y respeto, por ser mi apoyo para todo, mi compañera de viaje y destino. Espero que esto no acabe nunca.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I.1. FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA TIPO 1 (IGF-1)</b> .....	3
I.1.1. Estructura, expresión génica y regulación .....	3
I.1.2. Proteínas transportadoras de IGF-1 (IGFBPs).....	8
I.1.3. Receptores de membrana y vías de señalización.....	12
I.1.4. Funciones fisiológicas de IGF-1.....	17
I.1.4.1 Crecimiento y desarrollo corporales .....	18
I.1.4.2. Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) .....	20
I.1.4.3. Desarrollo y regeneración hepáticos .....	23
I.1.4.4. Desarrollo y protección cardiovascular .....	24
I.1.4.5. Otras funciones .....	25
I.1.4.5.1. Gametogénesis.....	25
I.1.4.5.2. Desarrollo y función renales .....	28
I.1.4.5.3. Modulación inmunológica .....	29
I.1.4.5.4. Efecto semejante a la insulina .....	31
<b>I.2. CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE IGF-1</b> .....	32
I.2.1. Crecimiento intrauterino retardado (CIR) .....	32
I.2.2. Síndrome de Laron (SL) .....	35
I.2.3. Enfermedad hepática crónica .....	37
I.2.4. Envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad.....	39
I.2.4.1. Enfermedades neurodegenerativas .....	45
I.2.4.2. Enfermedades cardiovasculares (ECV) .....	49
I.2.4.3. Síndrome metabólico.....	52
I.2.5. Otras condiciones de deficiencia de IGF-1 .....	55
I.2.5.2. Trastornos musculoesqueléticos.....	55
I.2.5.3. Enfermedades renales .....	56

I.3. DAÑO OXIDATIVO CELULAR Y ENFERMEDAD .....	58
I.3.1. Radicales libres y daño oxidativo celular y tisular.....	58
I.3.2. Mecanismos del daño oxidativo abocados a la muerte celular.....	60
I.3.3. Estrés oxidativo e inflamación.....	63
I.3.4. Proteínas de choque térmico y estrés oxidativo .....	65
<b>II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>67</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>73</b>
III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. ....	75
III.1.1. Procedencia y generalidades .....	75
III.1.2. Caracterización del genotipo de los animales.....	76
III. 2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	77
III.2.1. Distribución de los animales en grupos experimentales y pautas de tratamiento. ....	77
III.2.2. Extracción de sangre, administración del tratamiento y sacrificio de los animales.....	78
III.3. EXTRACCIÓN DE ARN Y TÉCNICAS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	79
III.3.1. Extracción de ARN de tejido cerebral .....	79
III.3.2. Análisis del transcriptoma mediante microarray .....	80
III.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real.....	81
III.4. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE IGF-1 .....	84
III.5. HISTOLOGÍA.....	84
III.6. DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO (PEROXIDACIÓN LIPÍDICA) .....	86
III.7. IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA (MRI) .....	88
III.7.1. Obtención de las imágenes .....	88
III.7.1.1. Mapas de ADC (Coeficiente de Difusión Aparente).....	88
III.7.1.2. Mapas de imagen por transferencia de campo magnético (MTI) .....	88
III.7.2. Procesamiento de las imágenes .....	90
III.7.3. Resonancia magnética de espectroscopia .....	92

III.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	93
III.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	94
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
IV.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MODELO EXPERIMENTAL Y EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE DOSIS BAJAS DE IGF-1 SOBRE LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE IGF-1, PESO CORPORAL Y PESO CEREBRAL. ....	97
IV.1.1. Concentraciones circulantes de IGF-1.....	97
IV.1.2. Peso corporal en los tres grupos experimentales y correlación directa entre el peso corporal y las concentraciones sistémicas de IGF-1.....	98
IV.1.3. Peso cerebral y relación con el peso corporal.....	99
IV.1.4. Estudio de celularidad por histología convencional.....	100
IV.1.5. Estudio de de los mapas de Coeficiente de Difusión Aparente (ADC) y de Transferencia de campo Magnético (MT) obtenidos por resonancia magnética. ....	102
IV.1.6. Estudio de espectroscopía de resonancia magnética.....	104
IV.1.7. Determinación de la peroxidación lipídica (malondialdehído, MDA).....	105
IV.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CEREBRO DE IGF-1 Y OTROS GENES RELACIONADOS.....	105
IV.2.1. Expresión cerebral del gen de IGF-1 y su receptor.....	107
IV.2.2. Expresión cerebral del receptor de la GH (Ghr).....	107
IV.2.3. Expresión génica cerebral de IGF-2.....	108
IV.2.4. Expresión de los genes de las principales proteínas transportadoras de IGFs (IGFBPs).....	109
IV.3. ESTUDIO EN CEREBRO DE GENES RELACIONADOS CON EL DAÑO OXIDATIVO, INFLAMACIÓN Y MUERTE CELULAR. ....	110
IV.3.1. Expresión génica de las principales enzimas anti-oxidantes.....	110
IV.3.2. Expresión génica de enzimas pro-oxidantes, interleucinas y factores pro-inflamatorios y angiogénicos.....	112
IV.3.3. Expresión de genes que codifican para las chaperonas " <i>heat shock proteins</i> " (HSPs).....	114
IV.3.4. Expresión de otros genes implicados en las rutas de señalización del receptor de IGF-1 que se relacionan con la protección mitocondrial, autofagia y apoptosis.....	116

---

IV.3.4.1. Genes implicados en las rutas de señalización de IGF-1 .....	116
IV.3.4.2. Genes relacionados con la protección mitocondrial y la supervivencia celular. ....	117
IV.3.4.3. Estudio de la expresión de genes relacionados con la muerte celular y la respuesta a la hipoxia .....	119
IV.4. ANÁLISIS IN SILICO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	122
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>125</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>147</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** *Estructura de IGF-1, IGF-2 y pro-insulina.*

**Figura 2.** *Número de artículos publicados en PubMed sobre IGF-1 desde su descubrimiento.*

**Figura 3.** *Evolución de las concentraciones plasmáticas de IGF-1 con la edad.*

**Figura 4.** *Eje GH/IGF-1 y algunos de sus órganos diana.*

**Figura 5.** *Proteínas de unión a IGF-1 (IGFBPs) de alta afinidad.*

**Figura 6.** *Regulación del promotor del gen de la IGFBP-8 (CTGF) (adaptado de Oliver N. et al., 2010).*

**Figura 7.** *Dominios estructurales de CTGF y su potencial papel en la modulación y coordinación de señales relacionadas con el remodelado de matriz extracelular, angiogénesis y permeabilidad vascular, adhesión y migración celular. (HSPG, heparan sulfate proteoglycan; LRP, lipoprotein receptor-related).*

**Figura 8.** *Esquema de los receptores de IGFs e insulina y sus actividades cruzadas.*

**Figura 9.** *Vías de señalización intracelulares de IGF-1.*

**Figura 10.** *Paciente con Síndrome de Laron.*

**Figura 11.** *Paciente con cirrosis avanzada, ascitis y desnutrición grave.*

**Figura 12.** *Propiedades fisiológicas de IGF-1 a lo largo de la vida en relación con los procesos implicados en la longevidad.*

**Figura 13.** *Diferencias morfológicas entre un cerebro sano y uno con Enfermedad de Alzheimer.*

**Figura 14.** *Mecanismos celulares del daño oxidativo que promueven la muerte celular. Principales enzimas antioxidantes.*

**Figura 15.** *Interacción celular (astrocitos, microglía, neuronas, etc) en la inflamación a través de citoquinas, NO y prostaglandinas (PGE2). Las neuronas sufren un procesamiento anormal del ARN, que junto con la producción de las EROs, contribuye al plegamiento inadecuado de proteínas. Las proteínas mal plegadas producen agregados que llevan al mal funcionamiento del proteasoma y a la generación de más estrés oxidativo en el retículo endoplásmico, lo que activa vías de disfunción mitocondrial, disregulación del calcio, autofagia y apoptosis.*

**Figura 16.** *Papel citoprotector de la respuesta mediada por las HSPs.*

**Figura 17.** *Ratones de los distintos grupos experimentales. WT: wild type, Hz: heterocigotos. KO: Knock out.*

**Figura 18.** *Diseño experimental.*

**Figura 19.** *Análisis del transcriptoma mediante microarray.*

**Figura 20.** *Esquema del proceso de las muestras y equipamientos empleados para la realización de PCR tiempo real.*

**Figura 21.** *Áreas de cuantificación del número de células (corteza cerebral peri-hipocampal).*

**Figura 22.** *Superposición de la imagen del anatómica del atlas sobre la imagen pesada en T2 para la determinación de las áreas cerebrales de interés.*

**Figura 23.** *Ejemplos de mapa de ADC (arriba) y MT (abajo) en un ratón control. En ambos casos se representa el mismo corte anatómico. En el caso de los mapas de ADC, las zonas con más difusión de agua se muestran rojas mientras que en los mapas de MTI, las zonas de mayor contenido acuoso aparecen azules.*

**Figura 24.** *Ejemplo de espectroscopía por resonancia magnética.*

**Figura 25.** *Concentraciones circulantes de IGF-1 a lo largo de la vida de animales WT y Hz. \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT.*

**Figura 26.** *Peso corporal en los tres grupos. \*\* $p < 0,01$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz.*

**Figura 27.** *Correlación entre el peso corporal y las concentraciones sistémicas de IGF-1.  $r = 0,76$ ,  $p < 0,05$ .*

**Figura 28.** *(A) Peso cerebral y (B) cociente peso cerebral/peso corporal en los tres grupos experimentales. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.*

**Figura 29.** (A) Imagen histológica con H&E y (B) contaje del número de células en un área de 50 cm<sup>2</sup> a 8x. \*\*\* $p < 0,001$  vs WT; &&& $p < 0,001$  vs Hz.

**Figura 30.** Tinción de Nissl en los tres grupos experimentales.

**Figura 31.** Imágenes obtenidas de los mapas de ADC y MT en cerebro procedente de los tres grupos experimentales.

**Figura 32.** Cuantificación de los mapas de ADC. \*\*\* $p < 0,001$  vs WT; \*\* $p < 0,01$  vs WT \* $p < 0,05$  vs WT; &&& $p < 0,001$  vs Hz; && $p < 0,01$  vs Hz; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 33.** Espectroscopía de resonancia magnética. Incremento significativo del lactato en animales Hz. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 34.** Peroxidación lipídica (MDA) en ratones procedentes de los tres grupos experimentales. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 35.** Expresión cerebral del gen *igf1* y su receptor (*Igf1r*). \*\*\* $p < 0,001$  vs WT; \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 36.** Expresión cerebral del gen del receptor de GH (*Ghr*). \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 37.** Expresión cerebral del gen *Igf2*. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 38.** Expresión génica de IGFBP-4 y IGFBP-6 en cerebro de WT, Hz y Hz+IGF. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 39.** Expresión génica de IGFBP-7 y IGFBP-8 en tejido cerebral procedente de los tres grupos experimentales. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 40.** Expresión génica genes anti-oxidantes modulados con la deficiencia de IGF-1 y el tratamiento sustitutivo. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 41.** Genes hipo-expresados en cerebros de animales con deficiencia parcial de IGF-1. \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz; & $p < 0,05$  vs Hz.

**Figura 42.** Genes inflamatorios hiper-expresados en cerebros de animales con deficiencia parcial de IGF-1. \*\* $p < 0,01$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz.

**Figura 43.** *Expresión cerebral de genes que codifican para proteínas de choque térmico (HSPs). \*\*\* $p < 0,001$  vs WT; \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz; & $p < 0,05$  vs Hz.*

**Figura 44.** *Expresión génica de Hspbp1 (CHIP) en los tres grupos experimentales. \* $p < 0,05$  vs WT.*

**Figura 45.** *Expresión de genes implicados en rutas de señalización activadas por IGF-1. \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.*

**Figura 46.** *Expresión génica de factores implicados en la protección mitocondrial y la supervivencia celular. \*\*\* $p < 0,001$  vs WT; \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz; & $p < 0,05$  vs Hz.*

**Figura 47.** *Expresión génica de Bcl2. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.*

**Figura 48.** *Expresión génica de factores implicados en la autofagia y la respuesta a la hipoxia. \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.*

**Figura 49.** *Expresión de genes pro-apoptóticos (Apaf1 y Bid). \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz; & $p < 0,05$  vs Hz.*

**Figura 50.** *Expresión de genes relacionados con necrosis. \*\*\* $p < 0,001$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz.*

**Figura 51.** *Genes modulados por la sola deficiencia de IGF-1 (Hz vs WT) agrupados por funciones en tejidos y órganos, y el efecto de la administración exógena de IGF-1 (Hz+IGF vs Hz).*

**Figura 52.** *Genes implicados en la fisiología celular y el metabolismo que se modulan con la deficiencia de IGF-1 (Hz vs WT) y el efecto de la terapia sustitutiva con IGF-1 (Hz+IGF vs Hz).*

**Figura 53.** *Niveles de la actividad neuroprotectora de IGF-1 mediada por HSPs.*

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** *Enzimas pro-oxidantes que se liberan en la activación de la inflamación y fagocitosis, produciendo daño oxidativo.*

**Tabla 2.** *Genes implicados en la respuesta antioxidante enzimática y los mecanismos dependientes de HSPs en la inflamación tisular, estrés oxidativo y muerte celular.*

**Tabla 3.** *Sondas TaqMan empleadas para la PCR cuantitativa*

**Tabla 4.** *Principales estructuras encefálicas representadas en los cortes (1-6) de ADC.*

**Tabla 5.** *Expresión relativa de genes relacionados con IGF-1 en cerebro.*

**Tabla 6.** *Expresión relativa de enzimas anti-oxidantes en cerebro.*

**Tabla 7.** *Expresión relativa de enzimas y factores pro-inflamatorios y angiogénicos.*

**Tabla 8.** *Expresión relativa de genes de la familia de las HSPs.*

**Tabla 9.** *Genes implicados en las rutas de señalización de IGF-1.*

**Tabla 10.** *Genes relacionados con la protección mitocondrial y supervivencia.*

**Tabla 11.** *Genes relacionados con la muerte celular.*

## ABREVIATURAS

**ACV**, *Accidente cerebrovascular*

**ADC**, *Apparent Diffusion Coefficient (coeficiente de difusión aparente)*

**ADNc**, *Ácido desoxirribonucleico complementario*

**ALS**, *Acid labile subunit (subunidad ácido-lábil)*

**ALT**, *Alanina aminotransferasa*

**ARN**, *Ácido ribonucleico*

**ARNm**, *ARN mensajero*

**AST**, *Aspartato aminotransferasa*

**BHE**, *Barrera hemato-encefálica*

**CIR**, *Crecimiento intrauterino retardado*

**COX-2**, *Ciclooxigenasa-2*

**DEPC**, *Dietil piro **carbonato***

**DM**, *Diabetes mellitus*

**ECV**, *Enfermedades cardiovasculares*

**eNOS**, *Óxido nítrico sintasa endotelial*

**EROs**, *Especies reactivas del oxígeno*

**FSH**, *Hormona estimulante del folículo*

**GH**, *Growth Hormone*

**GHI**, *Growth Hormone Insensitivity (insensibilidad a la GH)*

**GSK-3**, *Glucógeno sintasa kinasa-3*

**HGF**, *Factor de crecimiento de los hepatocitos*

**HPA**, *Hipotálamo-pituitario-adrenal*

**HSPG**, *Heparan sulfate proteoglycan*

**HZ**, *Heterocigoto*

**IGF-1**, *Insulin-like growth factor 1*

- IGF-1R**, *Receptor de Insulin-like growth factor 1*
- IL-6**, *Interleucina 6*
- iNOS**, *Inducible nitric oxide synthase (óxido nítrico sintasa inducible)*
- IRS**, *Insulin receptor substrate (substrato del receptor de insulina)*
- LH**, *Hormona luteinizante*
- LRP**, *Lipoprotein receptor-related*
- MDA**, *Malondialdehído*
- MTI**, *magnetization transfer imaging (imagen por transferencia de campo magnético)*
- NO**, *Óxido nítrico*
- PCC**, *Protein carbonyl content (contenido en proteínas carboxiladas)*
- PCR**, *Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)*
- PGE2**, *Prostaglandina E2*
- PK**, *Proteín-kinasa*
- PFA**, *Paraformaldehído*
- RI**, *Receptor de insulina*
- RLO**, *Radicales libres del oxígeno*
- SL**, *Síndrome de Laron*
- TGF- $\alpha$** , *Transforming Growth Factor  $\alpha$  (Factor transformador del crecimiento  $\alpha$ )*
- TFG**, *Tasa de filtrado glomerular*
- Tk**, *Tirosin-kinasa*
- VEGF**, *Vascular Endotelial Growth Factor (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular)*
- VSMC**, *Células del músculo liso vascular*
- WT**, *Wild type*

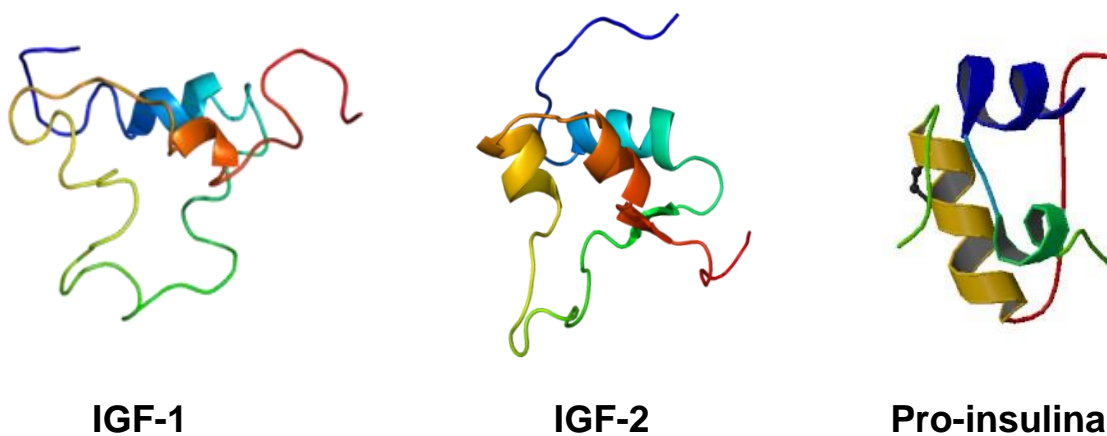
# **I. INTRODUCCIÓN**



## I.1. FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA TIPO 1 (IGF-1)

### I.1.1. Estructura, expresión génica y regulación.

El factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1, *Insulin-like growth factor-1*) es una hormona polipeptídica de 70 aminoácidos, con un peso molecular de ~7,6 KDa, y con efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos. Comparte más de un 60% de homología con IGF-2 y un 50% con la estructura de la proinsulina (Le Roith D., 1997).



**Figura 1.** Estructura de IGF-1, IGF-2 y pro-insulina.

Es sintetizado como producto de un solo gen localizado en el brazo largo del cromosoma 12, con al menos 5 exones. Su organización génica presenta gran complejidad y los aspectos transcripcionales del gen en relación con las implicaciones funcionales del IGF-1 aún no se conocen bien (Langford K.S. *et al.*, 1993; Lonergan P. *et al.*, 2000). El gen codifica dos precursores distintos de IGF-I mediante dos mARN con regiones 3' distintas (originados en exones distintos) de tal forma que los precursores resultantes, IGF-1a e IGF-1b, tienen idénticos péptidos aminoterminals y difieren en la región carboxiterminal (dominio E). El procesamiento posterior puede dar lugar a IGF-1 y des(1-3)IGF-1 por acción de una proteasa, o solo a IGF-1, que posteriormente podría ser modificada por la proteasa para formar des(1-3)IGF-1 (Sara V.R. *et al.*, 1990).

El IGF-1 fue descrito por primera vez en 1957 por Salmon y Daughaday (Salmon W.D. Jr y Daughaday W.H., 1957) al advertir que la simple adición *in vitro* de la hormona del crecimiento (GH, *growth hormone*) a un cartílago costal procedente de ratas hipofisectomizadas no logró estimular significativamente su crecimiento (determinado mediante la incorporación de sulfato radioactivo). De forma complementaria, el suero procedente de estas mismas ratas resultó ser también inefectivo. Sin embargo, observaron que cuando empleaban suero de ratas normales, éste sí estimulaba la incorporación *in vitro* de sulfato en el cartílago costal de ratas hipofisectomizadas. Estos resultados demostraron la existencia de un “factor sulfactante” (nombre que acuñaron a este factor) que estimulaba la incorporación de <sup>35</sup>Sulfato.

Paralelamente, Froesch E.R. y cols. describieron la actividad “semejante a la insulina” de dos componentes plasmáticos (NSILA I y II, *non-suppressible insulin-like activity*) que eran capaces de estimular la incorporación de glucosa en adipocitos aislados de rata, compartiendo así la actividad “*insulin-like*”, mientras que los anticuerpos anti-insulina no eran capaces de disminuir el efecto hipoglucemiante (Froesch E.R. *et al.*, 1963)

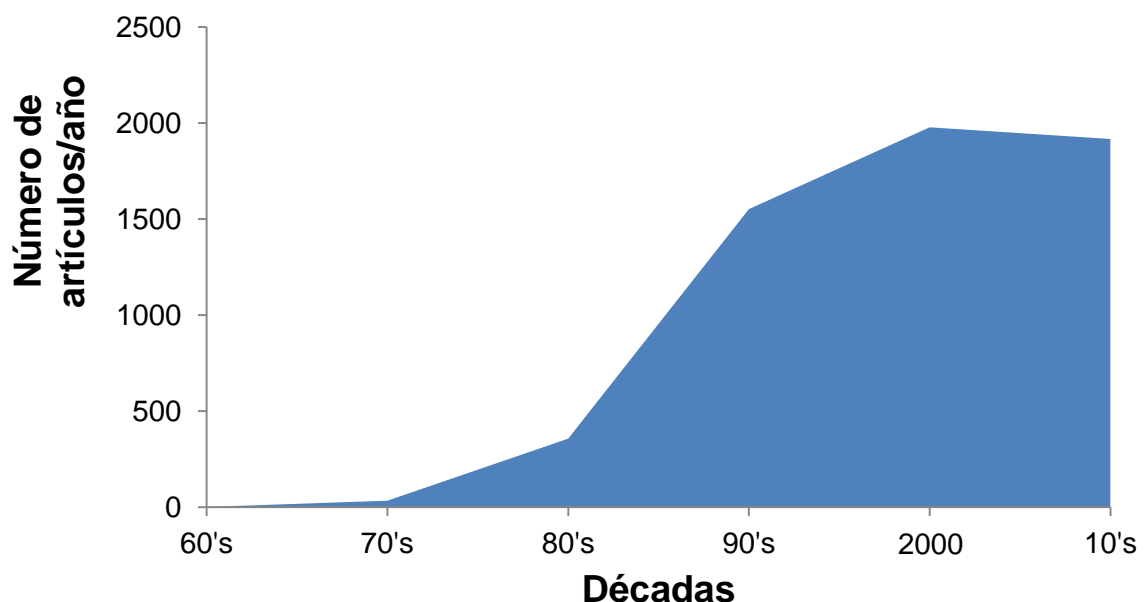
Al mismo tiempo, otros investigadores descubrieron otras acciones de unos polipéptidos similares. Entre otros, su capacidad mitogénica, lo que les movió a proponer el término “fracción con actividad estimulante de la multiplicación” (Pierson R.W. Jr y Temin H.M., 1972)

Sólo cuando Daughaday *et al.* descubrieron que los factores sulfactantes eran “idénticos o muy similares al componente de menor peso molecular de los NSILAs” en 1972, se planteó una nueva nomenclatura para estas dos moléculas: somatomedinas A y C, lo que denotaba que eran sustancias bajo el control de la GH y que mediaban sus efectos (Daughaday W.H. *et al.*, 1972).

Finalmente, un estudio más exhaustivo llevado a cabo por Rinderknecht and Humbel (Rinderknecht E. y Humbel R.E., 1978a y 1978b) culminó con el descubrimiento de que aquellas moléculas tenían idénticas secuencias aminoacídicas a “dos formas de una hormona semejante a la insulina, cuyos efectos sobre el crecimiento celular y tisular predominan sobre otros

parámetros metabólicos” (Klapper D.G. *et al.*, 1983). Por tanto, de acuerdo con su parecido estructural a la proinsulina, renombraron definitivamente estos péptidos como “factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 y tipo 2 (IGF-1 e IGF-2), moléculas que igualmente cumplen todos los criterios de las somatomedinas: 1) poseen actividad semejante a la insulina en presencia de anticuerpos anti-insulina (Froesch E.R. *et al.*, 1963; Zapf J. *et al.*, 1978); 2) son factores de sulfatación (Froesch E.R. *et al.*, 1976; Zapf J. *et al.*, 1978); 3) pueden actuar como mitógenos (Rinderknecht E. *et al.*, 1976; Zapf J. *et al.*, 1978); y 4) al menos IGF-1 es dependiente de GH (Daughaday W.H. *et al.*, 1972).

Podemos afirmar que fue el consenso sobre su nomenclatura (Daughaday W.H. *et al.*, 1987), junto con el hito del descubrimiento de sus secuencias aminoacídicas (y nucleotídicas), lo que hizo posible la consiguiente síntesis recombinante (Klapper D.G. *et al.*, 1983) y así abrir la puerta a multitud de nuevas áreas de investigación, incrementando exponencialmente el número de artículos científicos destinados a las IGFs hasta alcanzar actualmente los ~45.000 trabajos indexados en PubMed (a 30/4/2013).



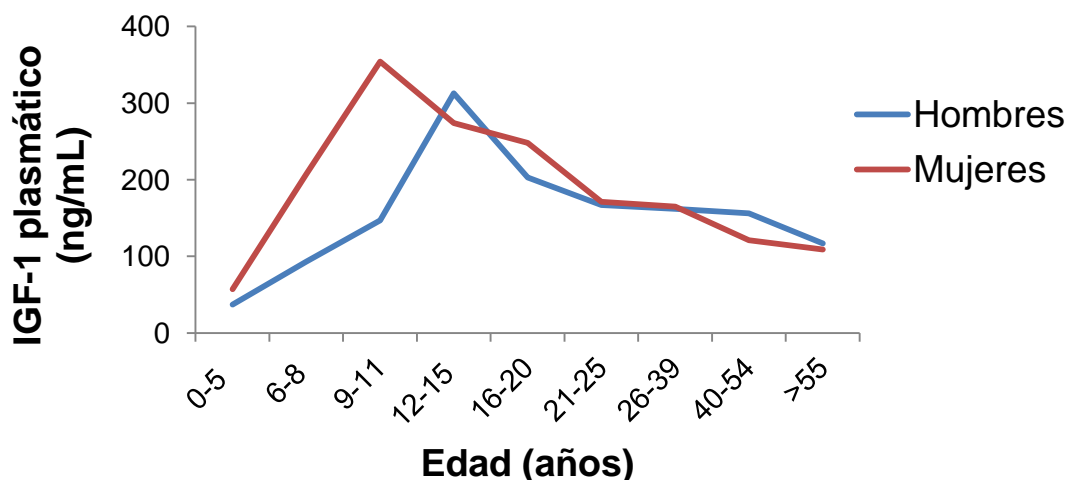
**Figura 2.** Número de artículos publicados en PubMed sobre IGF-1 desde su descubrimiento.

Esta perspectiva histórica nos proporciona una lista de acciones desempeñadas por IGF-1; entre otras: crecimiento tisular y desarrollo, actividad semejante a la insulina, proliferativa/anabolizante, anti-apoptótica, anti-envejecimiento, anti-oxidante, etc.

Como toda hormona con un amplio rango de funciones fisiológicas, las concentraciones de IGF-1 deben estar estrictamente controladas, como se ha extraído de resultados *in vivo*:

- Seis formas de proteínas de unión a IGF-1 de alta afinidad (IGFBP-1 a IGFBP-6), capaces tanto de promover como de inhibir las acciones de IGF-1, así como controlar su biodisponibilidad, (Hwa V. *et al.*, 1999)
- Nueve proteínas relacionadas de unión a IGF-1 de baja afinidad (de IGFBP-rP1 a IGFBP-rP9) (Hwa V. *et al.*, 1999)
- Una lista cada vez más larga de proteasas de IGFBPs, (Bunn R.C. y Fowlkes J.L., 2003)
- Variaciones alélicas, (Barton E.R., 2006).
- *Splicing* alternativo, etc. (Rotwein P. *et al.*, 1993).
- Otros mecanismos de regulación periférica (Reindl K.M. *et al.*, 2012).

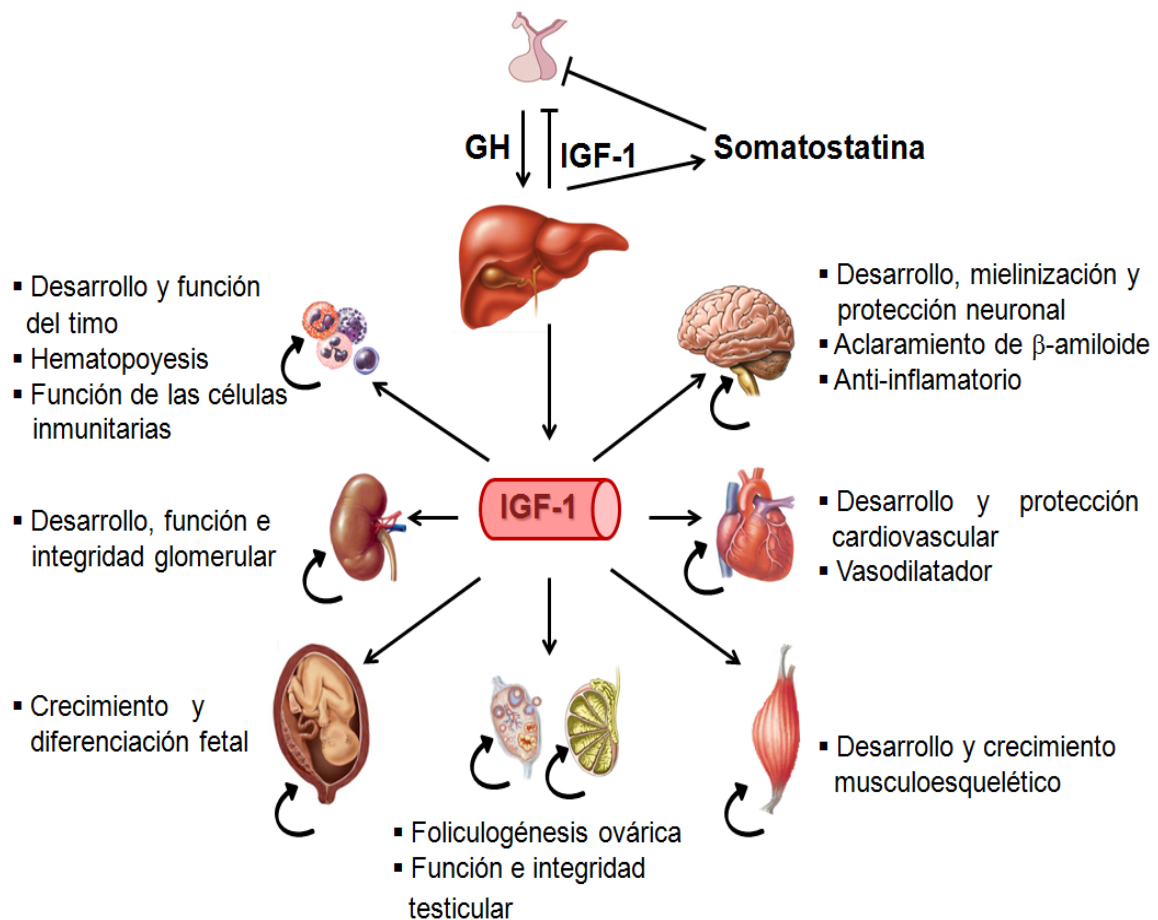
Éstos son algunos de los mecanismos por los que IGF-1 es mantenido en un estrecho rango fisiológico, que va declinando a lo largo de la vida (Clemmons D.R., 1998): cfr. Figura 3.



**Figura 3.** Evolución de las concentraciones plasmáticas de IGF-1 con la edad.

Además de estos factores implicados en el control de la biodisponibilidad de IGF-1, la hormona del crecimiento es la principal estimulante de su síntesis en prácticamente todos los órganos, aunque principalmente en el hígado, donde es producido más del 75% del IGF-1 circulante (Sjogren K. *et al.*, 1999; Ohlsson C. *et al.*, 2009), conformando el eje GH/IGF-1, por el cual la secreción de GH de las células de la hipófisis anterior está bajo un doble control del Sistema Nervioso Central: estimulado por la Hormona Liberadora de GH (GHRH, *Growth Hormone Release Hormone*) e inhibido por la somatostatina. A este control se suma el efecto de retroalimentación o “feedback” negativo provocado por el IGF-1, que inhibe así la producción de GH por mediación de la somatostatina (Ceda G.P. *et al.*, 1985; Castilla-Cortázar I. *et al.*, 2001).

Hoy en día sabemos que, aunque GH tiene acciones directas en los tejidos periféricos, sus efectos indirectos sobre multitud de órganos están mediados sobre todo por IGF-1: Figura 4.



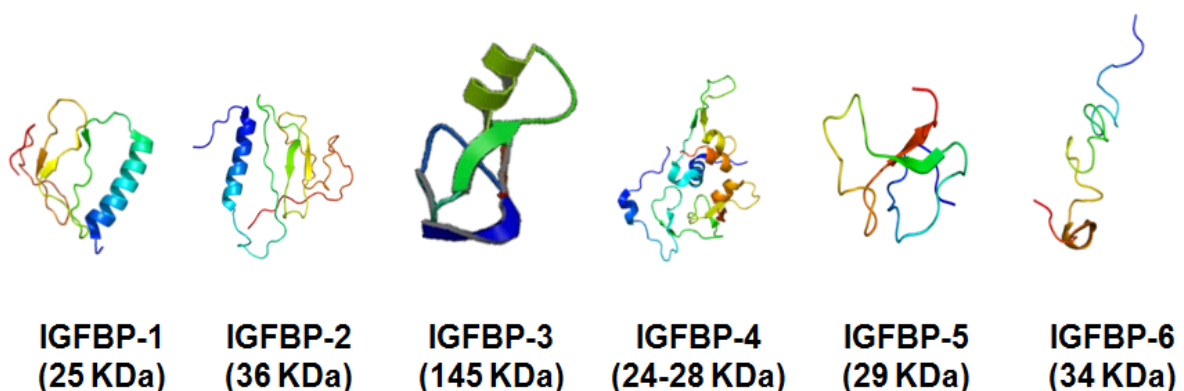
**Figura 4.** Eje GH/IGF-1 y algunos de sus órganos diana.

### I.1.2. Proteínas transportadoras de IGF-1 (IGFBPs).

Las proteínas de unión a IGF-1 (IGFBPs) son péptidos con un tamaño comprendido entre 200 y 300 aminoácidos, con puentes disulfuro y carbohidratos en su interior que resultan de vital importancia para poderse unir a IGF-1 y la superficie celular, respectivamente (Cohick W.S. *et al.*, 1993), hasta tal punto que, aproximadamente, el 90% de IGF-1 en sangre se encuentra ligado a las IGFBPs (Yamamoto H. *et al.*, 1995), lo que determinará su posterior biodisponibilidad.

Las IGFBPs se encuentran presentes en prácticamente todos los fluidos biológicos: líquido folicular, líquido amniótico, humor vítreo, linfa, plasma, líquido seminal, líquido cefalorraquídeo y en todas las secreciones gastrointestinales. Se expresan en prácticamente todos los tejidos y son secretadas por células normales y células transformadas en cultivo, sugiriendo un papel modulador de IGF-1 en las acciones locales y sistémicas (Zapf J. *et al.*, 1995; Duan C. *et al.*, 2005). No obstante, la principal fuente de IGFBPs en la circulación es el hígado (Nedic O. *et al.*, 2004).

Las proteínas de unión a IGF-1 de alta afinidad son las comprendidas entre IGFBP-1 y IGFBP-6, representadas en la Figura 5.



**Figura 5.** Proteínas de unión a IGF-1 (IGFBPs) de alta afinidad.

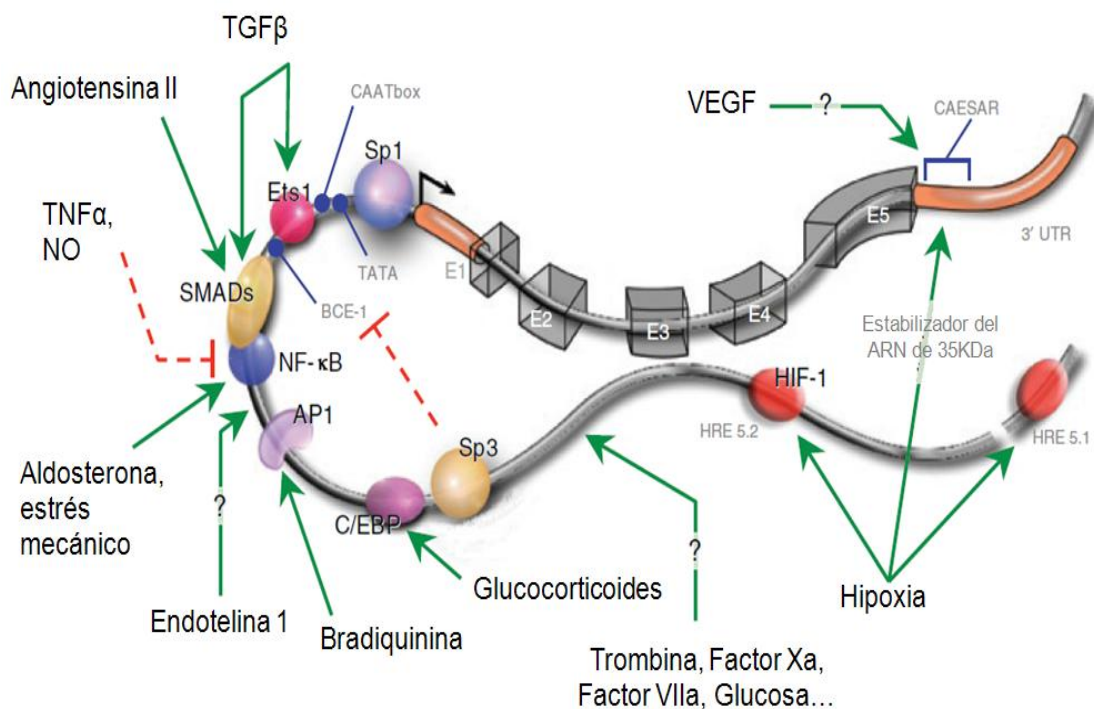
En concreto, IGFBP-3 es una de las proteínas de unión más importante por ser la de mayor afinidad y concentración plasmática (Langford K.S. *et al.*, 1993; Baxter R.C., 1994). Al formar un complejo ternario con una glicoproteína (ALS, *Acid-labile subunit*) que le da estabilidad, es capaz de actuar como reservorio de IGF-1, prolongando su vida media en la circulación (Clemmons D.R. *et al.*, 1992; Thissen J.P. *et al.*, 1994; Smith W.J. *et al.*, 1995), reduciendo su velocidad de depuración y manteniendo una concentración plasmática total superior a la de la insulina. Es decir, modula la acción de IGF a nivel tisular, bien impidiendo su acceso a los receptores, con lo que se inhibiría el crecimiento y sus efectos anabólicos relacionados, o bien facilitando el crecimiento al aumentar su interacción con los receptores (Clemmons D.R. *et al.*, 1992). Pero esto no explica totalmente por qué debería existir una familia de formas diferentes de la IGFbps, y podría ser que la distinta afinidad de los IGFs para las diversas IGFbps representase un nivel adicional en el complejo control de la capacidad de los IGFs para desarrollar su acción en los múltiples órganos y tejidos (Duan C. *et al.*, 2005).

Otras IGFbps directamente relacionadas con la función de las IGFs son las formas IGFBP-4 y -6. Ambas han sido descritas recientemente como inhibidoras de estos factores de crecimiento, aunque, mientras que IGFBP-4 es una proteína con funciones inhibidoras sobre ambos IGFs (Gu F. *et al.*, 2010; Contois L.W. *et al.*, 2012), IGFBP-6 ha sido más específicamente relacionada con IGF-2 en cerebro (Roghani M. *et al.*, 1989; Martin J.L. *et al.*, 1990; Bach L.A. *et al.*, 2013).

Respecto otras proteínas de unión a IGFs (de menor afinidad), destacamos a dos miembros de esta superfamilia: IGFBP-rP1 (también conocida como IGFBP-7 o Mac-25) (Oh Y. *et al.*, 1996) e IGFBP-rP2 (equivalente a la IGFBP-8 o CTGF) (Kim H.S. *et al.*, 1997), las cuales, además de unirse a las IGFs, pueden tener acciones independientes. Aunque IGFBP-7 está regulada por otros factores de crecimiento (además de los propios IGFs), parece estar implicada en diversas funciones biológicas, incluyendo desde la regulación del crecimiento epitelial y fibroblástico, la estimulación de la producción de prostaciclina por células endoteliales, angiogénesis, apoptosis

(Inoguchi T. *et al.*, 1986; Hwa V. *et al.*, 1999; Gommans W.M. *et al.*, 2008), hasta regulación de la memoria vía neuronas hipocampales (Agis-Balboa R.C. *et al.*, 2011).

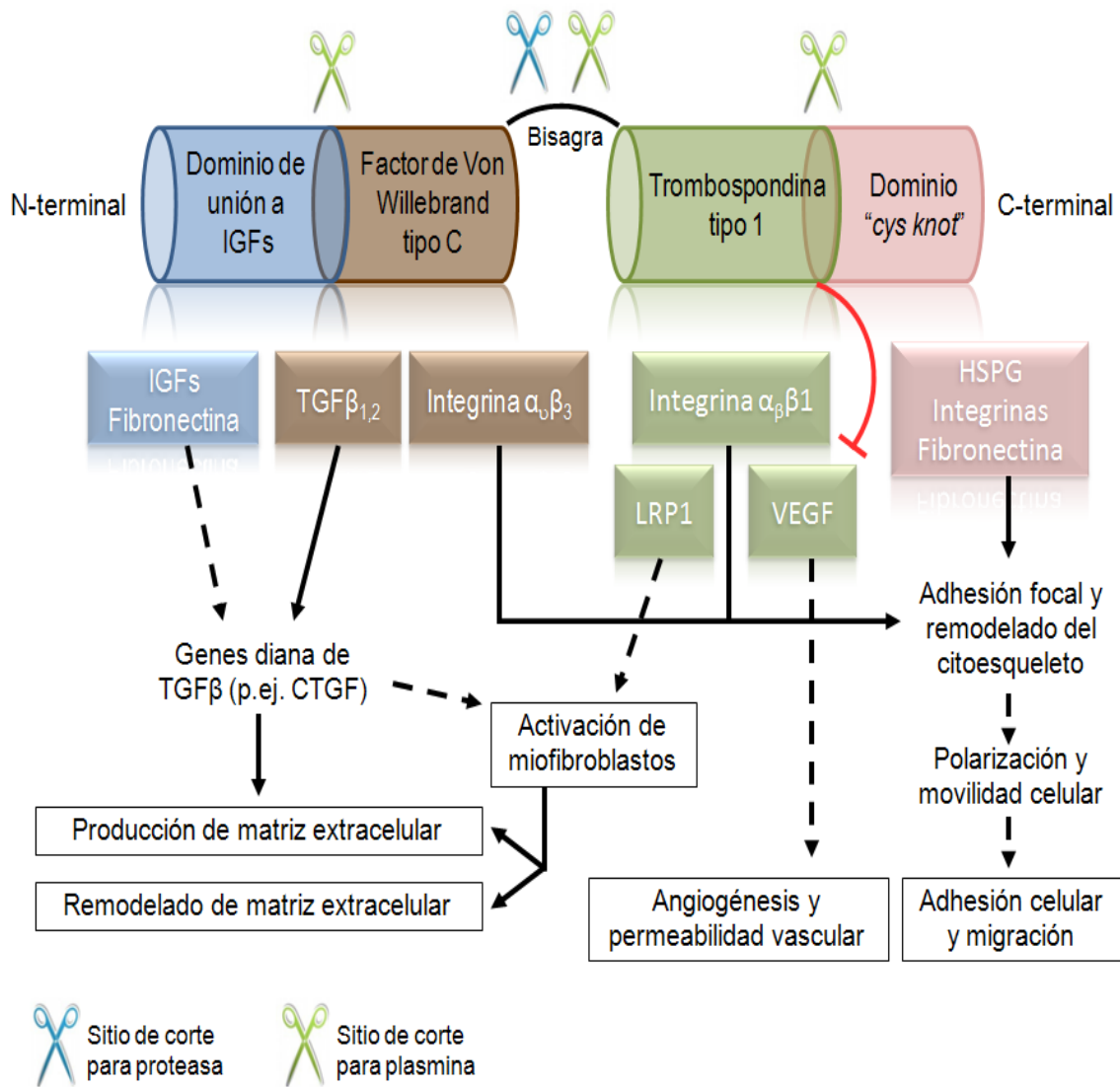
En lo referente a IGFBP-rP2 (IGFBP-8), su nomenclatura como CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) aporta más información sobre su principal función: regular la formación de tejido conectivo. Por ello, es de gran importancia tanto en condiciones fisiológicas (homeostasis tisular) como patológicas (fibrosis) (Nguyen T.Q. *et al.*, 2008). Así, en condiciones de hiperexpresión de esta proteína, encontraremos acúmulos de matriz extracelular que pueden llevar a fibrosis hepática, renal, pulmonar... (Oemar B.S. y Luscher T.F., 1997), mientras que su ausencia puede originar desestructuración tisular e incapacidad para cicatrización (Oliver N. *et al.*, 2010). El control de su expresión génica está regulado de forma compleja por una multitud de factores, entre los que se incluye TGF $\beta$ , angiotensina II, aldosterona, glucocorticoides, VEGF... Un esquema de estas interacciones es representado en la Figura 6.



**Figura 6.** Regulación del promotor del gen de la IGFBP-8 (CTGF) (adaptado de Oliver N. *et al.*, 2010).



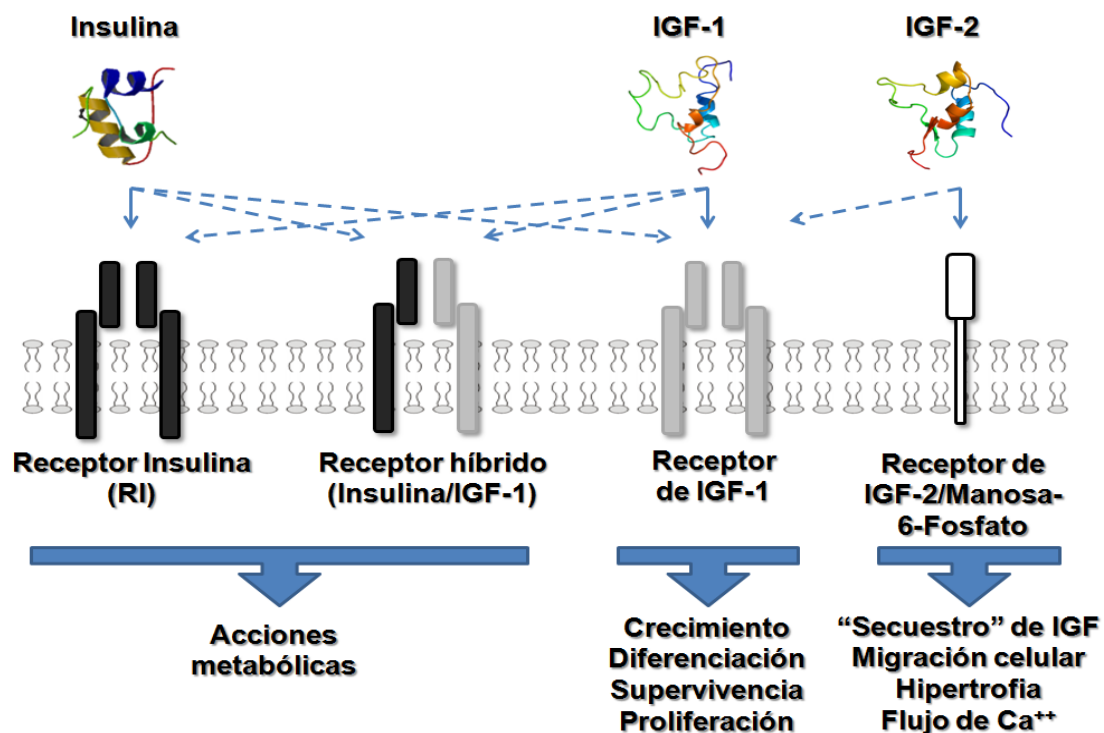
Finalmente, esta proteína es capaz de interactuar con una gran variedad de moléculas implicadas en el remodelado de matriz extracelular (TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  y fibronectina), permeabilidad vascular y angiogénesis (VEGF), adhesión celular y migración (integrinas), entre otras (Oliver N. *et al.*, 2010).



**Figura 7.** Dominios estructurales de CTGF y su potencial papel en la modulación y coordinación de señales relacionadas con el remodelado de matriz extracelular, angiogénesis y permeabilidad vascular, adhesión y migración celular. (HSPG, heparan sulfate proteoglycan; LRP, lipoprotein receptor-related).

### I.1.3. Receptores de membrana y vías de señalización.

Por otro lado, la mayoría de las acciones de IGF-1 son mediadas a través de la unión a su receptor, IGF-1R: una tirosin-kinasa (Tk) que es una de los activadores naturales más potentes de la ruta de Akt, implicando entre otros a las rutas de: mTOR, MAPK, GSK3 $\beta$ , FOXO, HDM2, Grb2 y Shc, todos ellos directamente relacionados con la supervivencia celular y la proliferación (LeRoith D. *et al.*, 1995; Chitnis M.M. *et al.*, 2008; Annenkov A., 2009). Sin embargo, gracias a su gran homología, IGF-1 también puede unirse al receptor de la insulina (RI), con menor afinidad, como una segunda vía por la que esta hormona puede mediar algunas de sus funciones metabólicas (Sara V.R. *et al.*, 1990; Cohick W.S. *et al.*, 1993; Rubin R. *et al.*, 1995), y a un tercer tipo de receptor, híbrido entre el IGF-1R y el IR (al compartir una cadena  $\beta$ - $\alpha$  de cada uno de ellos), cuyos niveles en los distintos tejidos presenta grandes diferencias (Soos M.A. *et al.*, 1993; Bailyes E.M., *et al.*, 1997). De forma complementaria, la insulina también puede unirse al receptor de IGF-1, con menor afinidad que al suyo propio, y a un tercer tipo de receptor, híbrido entre el IGF-1R y el IR, al compartir una cadena  $\beta$ - $\alpha$  de cada uno de ellos:



**Figura 8.** Esquema de los receptores de IGFs e insulina y sus actividades cruzadas.

Por otro lado, aunque IGF-1 e insulina difieren en sus principales efectos, parece que sus respectivos receptores median efectos biológicos muy similares dentro de una célula en particular en condiciones *in vitro*. Esto viene a subrayar el hecho de que la especificidad de acción de estos receptores es dada en parte por el grado de expresión en los diferentes tejidos (Siddle K. *et al.*, 2001).

El receptor IGF-1R posee, al igual que RI, una subunidad extracelular y otra intracelular. En la subunidad  $\alpha$ , extracelular, es donde se encuentra el dominio de unión a IGF-1. La subunidad  $\beta$  posee un extremo extracelular (extremo aminoterminal) y otro intracelular, el cual tiene actividad Tk sobre distintos sustratos celulares endógenos, mecanismo que pone en marcha y en definitiva determina las acciones biológicas de IGF-1 (Cohick W.S. *et al.*, 1993, Rubin R. *et al.*, 1995). Los dominios tirosina-kinasa son las regiones más altamente conservadas de los receptores, con un 84% de similitud aminoacídica. La activación inducida por ligando ocurre vía trans- o autofosforilación intramolecular entre las subunidades  $\beta$ . Los dominios juxtamembrana (JM) contienen un sitio de autofosforilación en una secuencia Asn-Pro-Glu-Tyr que participa en la unión al sustrato. La función de los dominios CT no está bien definida, y la funcionalidad del receptor no se ve gravemente afectada por la delección o sobreexpresión de las secuencias CT (Paz K. *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayor divergencia de secuencia de CT comparada con los dominios Tk y JM es consistente con un papel en la especificidad en las vías de señalización o en la regulación específica del receptor.

Un signo distintivo de la familia RI/IGF-1R es la dependencia de la fosforilación de sustratos intracelulares como oposición a la autofosforilación, para el reclutamiento de componentes de la cascada molecular “vía abajo” (Bernal D. *et al.*, 1998). Tanto IR como IGF1-R fosforilan proteínas IRS (*insulin receptor substrate*) (principalmente, de IRS-1 a IRS-4) y proteínas Shc con homología Src/colágeno (p46/p52/p66), disparando las dos principales cascadas moleculares (Rakatzi I. *et al.*, 2006).

Los IRSs fosforilados reclutan y activan la fosfoinositol 3-quinasa de clase 1a (PI3-Kinasa) vía los dominios SH2 de la proteína adaptador p85, consiguiéndose así la síntesis de la Ptd Ins(3,4,5)P3. Esta proteína, eventualmente, capta y activa kinasas fosfatidilinositol-dependientes (PDKs), quienes más tarde fosforilan y activan otras proteínas-kinasa incluyendo la proteína-kinasa B (PKB), la p70rsk y la proteína kinasa Cζ (PKC ζ) (Vanhaesebroeck B. *et al.*, 2000).

Hay evidencias sustanciales de que la actividad de la PI3-Kinasa media un amplio rango de efectos insulina/IGF dependientes, incluyendo el transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno, síntesis proteica y mitogénesis, inhibición de la apoptosis y regulación de la transcripción génica (Kulik G. *et al.*, 1997; Shepherd P.R. *et al.*, 1998; Kermer P. *et al.*, 2000).

Una segunda vía de acción implicaría el reclutamiento de IRS-1 y Shc del factor Sos de intercambio-nucleotido-guanina, vía el dominio SH2 del adaptador Grb2. Esto implica la activación de la pequeña proteína-G Ras, que a su vez activa la proteína serin-kinasa Raf y la cascada de la kinasa regulada-vía señal extracelular/protein-kinasa activada por mitógeno (ERK/MAPK). El papel de esta cascada en la acción de la insulina/IGF es limitado, aunque ha sido implicado en las vías anti-apoptóticas y la regulación transcripcional (Denton R.M. *et al.*, 1995; Kulik G. *et al.*, 1997; Kermer P. *et al.*, 2000).

Sin embargo, a pesar de que hay evidencias de cruce entre las vías de señalización de RI/IGF-1R, especialmente en relación a las interacciones entre PI3-Kinasa y Ras (Shepherd P.R. *et al.*, 1998), todavía no está claramente definida la contribución a las vías de señalización de otras proteínas que interaccionan con las IRSs fosforiladas como son la fosfotirosina fosfatasa SHP-2, la Fyn Tk y la SH3, que contiene el adaptador Nck.

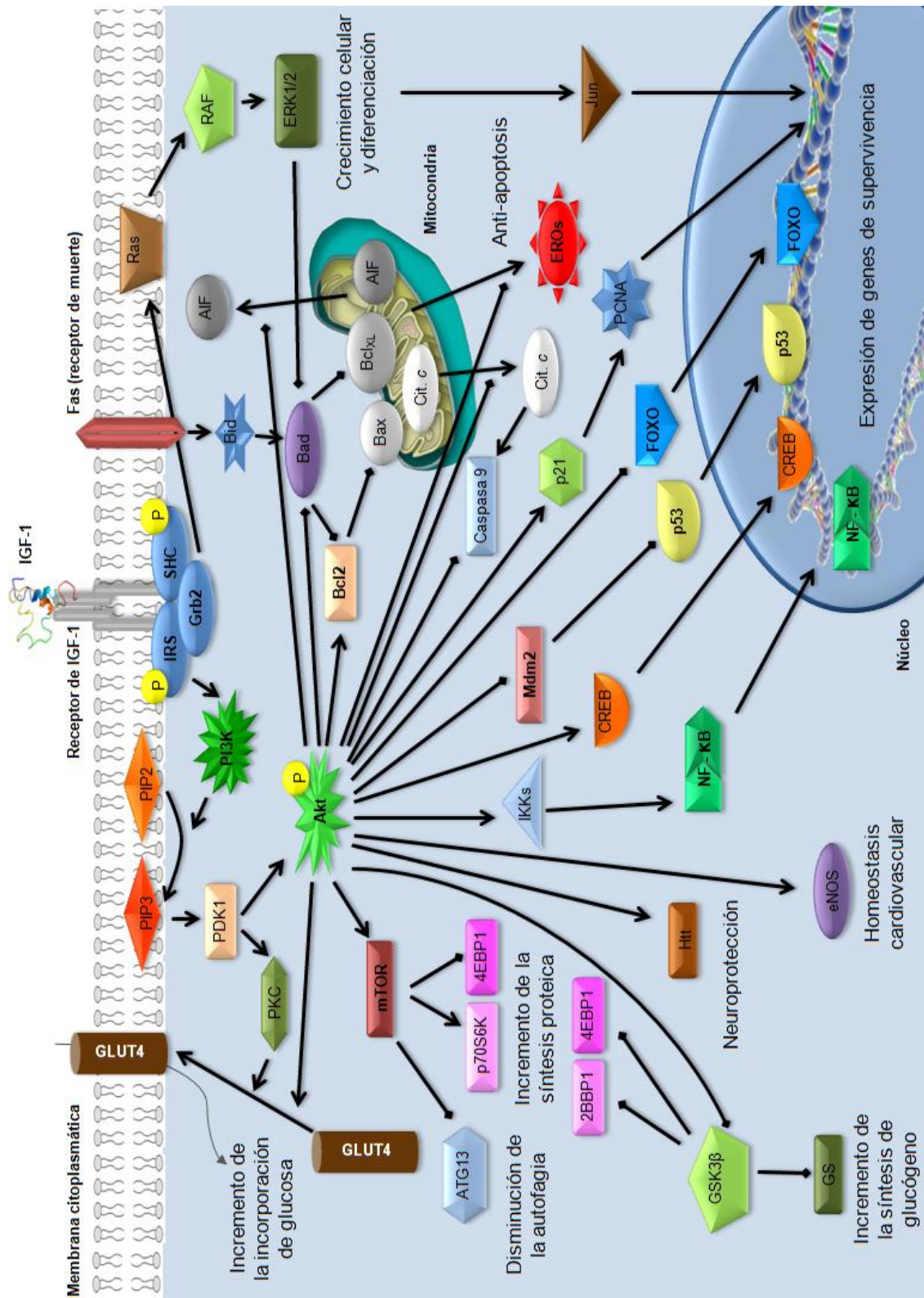
Por otro lado, aunque las principales vías de señalización de IR/IGFR implican la captación de efectores por los IRS y/o Shc tirosina-fosforilados, podría existir también un papel para proteínas que interactúan directamente con los receptores. En principio estas proteínas podrían iniciar distintas vías de señalización actuando independientemente o en sinergia con aquellas

mediadas por IRS y Shc. Alternativamente, podrían modular la actividad Tk y actuar vía estos sustratos establecidos, o participar en otros aspectos de la función del receptor como la endocitosis o la degradación. Es una posibilidad obvia que la interacción diferencial de las proteínas con IR e IGF1-R podría contribuir a la especificidad de las vías de actuación.

Por otro lado, el receptor de IGF-1 es capaz de interactuar y fosforilar proteínas adaptador c-Crk que contienen SH2/SH3, ruta mediada predominantemente vía tirosinas JM (Karas M. *et al.*, 2001). La insulina también estimula la fosforilación de estas proteínas, pero con una menor eficiencia que IGF-1. La tirosin-fosforilación de Crk puede modular su interacción con factores de intercambio-nucleótido-guanina, y así influyen la actividad de las pequeñas proteínas-G que a su vez actúan con la Raf-Kinasa. Esta vía tiene el potencial de activar las acciones mitogénicas dependientes del IGF-1R.

*In vitro*, una gran variedad de proteínas que contienen un dominio SH2 son capaces de unirse al lugar de autofosforilación CT, altamente conservado en las distintas especies animales, perteneciente a los receptores de insulina e IGF-1, incluyendo la subunidad p85 de la PI3-Kinasa, la proteína de activación GTP-asa (GAP), la fosfatasa específica-fosfotirosina SHP2 y la CT Src kinasa (CSK) (Arbet-Engels C. *et al.*, 1999). Sin embargo no hay evidencia de que esas interacciones jueguen un papel *in vivo*. Algunos componentes de las vías de acción de la citoquina también interactúan con los RI/IGF-1R. Asimismo, las kinasas Janus JAK-1 y JAK-2 se unen y son fosforilados por los RI e IGF-1R activados, para después fosforilar IRS-1 en lugares distintos que RI/IGF-1R (Gual P. *et al.*, 1998).

Un esquema representando las más importantes rutas intracelulares mediadas por IGF-1 (tras la unión a su receptor de membrana) y su interacción con otras de gran relevancia para la supervivencia celular es expuesto en la Figura 9.



**Figura 9.** Vías de señalización intracelulares de IGF-1 (adaptado de SABiosciences: [http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IGF1R\\_Signaling](http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IGF1R_Signaling); Biologend: [http://www.biologend.com/pop\\_pathway.php?id=21](http://www.biologend.com/pop_pathway.php?id=21) y Kulik G. et al., 1997)

#### **I.1.4. Funciones fisiológicas de IGF-1.**

IGF-1 es una hormona crucial tanto para el desarrollo embrionario como para los estadios postnatales. Como hemos detallado anteriormente, aunque es principalmente producida por el hígado, prácticamente todos los órganos tienen capacidad para secretarla con propósitos auto- y paracrinós (D'Ercole A.J. *et al.*, 1980). La hipófisis y el hígado establecen unos mecanismos de "feedback" negativo similares a los de cualquier otra glándula endocrina, donde, como quedó reflejado en la Figura 4, donde, por su lado, la GH, que puede encontrarse libre en plasma o unida a proteínas específicas GHBP (el segundo dominio del receptor de GH) (Rosenbloom A.L. *et al.*, 1994) se unirá eventualmente a su receptor, promoviendo la síntesis y liberación de IGF-1 que es capaz de inhibir directa o indirectamente (vía somatostatina) la producción y liberación de GH (Berelowitz M. *et al.*, 1981; Bertherat J. *et al.*, 1995; Ghigo M.C. *et al.*, 1997).

El papel de IGF-1 en condiciones fisiológicas está siendo aún descubierto y continuamente liberado de las acciones de GH como un péptido independiente y autosuficiente. Por ejemplo, se sabe que tanto la GH como la alimentación son los principales factores encargados de la regulación de la expresión hepática de IGF-1 (al igual que en otros órganos) (Daughaday W.H. y Rotwein P., 1989; Clemmons D.R. y Underwood L.E., 1991); sin embargo, en otros tejidos, la expresión de IGF-1 parece ser regulada por otros factores tróficos específicos, como por ejemplo en el útero, donde son los estrógenos (y no la GH) quienes estimulan la expresión de IGF-1 (Murphy L.J. y Friesen H.G., 1988), o la hormona estimulante del folículo (FSH) en el ovario (Adashi E.Y. *et al.*, 1991).

A continuación, pasamos a detallar algunas de las funciones de IGF-1 en condiciones fisiológicas.

#### **I.1.4.1. Crecimiento y desarrollo corporales.**

Hace más de 20 años que se demostró que tanto IGF-1 como, sobre todo, IGF-2 juegan un papel principal durante la diferenciación y desarrollo fetales (Daughaday W.H. y Rotwein P., 1989; Adamo M. *et al.*, 1989; Cohick W.S. y Clemmons D.R. 1993), aunque sus patrones de expresión y concentraciones varían entre los distintos órganos. Por ejemplo, los niveles de IGF-1 en el hígado, riñón y corazón fetales son más bajos que los de IGF-2 (si bien los niveles de IGF-2 incrementarán progresivamente hasta hacerse predominantes tras el nacimiento). Sin embargo, la expresión de IGF-1 en pulmón, músculo y estómago fetales es mayor que la encontrada postnatalmente (Adamo M. *et al.*, 1989). Curiosamente, mientras que las acciones de IGF-1 tras el nacimiento están siendo reconocidas año tras año, el papel fisiológico de IGF-2 es aún pobremente descrito hoy en día (Le Roith D., 1997; Wolf E. *et al.*, 1998).

Nos parece interesante subrayar que, como ha sido ampliamente descrito (Wit J.M. y van Unen H., 1992; Savage M.O. *et al.*, 1993; Zhou Y. *et al.*, 1997; Laron Z., 1999; Savage M.O. *et al.*, 2001), GH no es requerido para un normal crecimiento intrauterino, un descubrimiento apoyado por la evidencia de que la deficiencia o insensibilidad a GH no se asoció a una significativamente reducida talla corporal al nacimiento. Por el contrario, mutaciones que inactivan el gen de *Igf-1* o su receptor, han sido capaces de establecer el papel crucial que IGF-1 juega como regulador del crecimiento intrauterino (Baker J. *et al.*, 1993; Liu J.P. *et al.*, 1993; Woods K.A. *et al.*, 1996; Lupu F. *et al.*, 2001; Abuzzahab M.J. *et al.*, 2003; Leal Ade C. *et al.*, 2011). Por ello, estos descubrimientos sugieren que el papel estimulador de IGF-1 durante el desarrollo intrauterino es independiente de GH.

Con esta perspectiva, Daughaday y cols. (Daughaday W.H. *et al.*, 1972; Daughaday W.H., 1981) propusieron la “hipótesis de la somatomedina” para explicar el crecimiento postnatal, donde la GH estimulaba el crecimiento esquelético al inducir la producción de IGF-1 hepático, lo que, a su vez, promovería el crecimiento longitudinal del hueso de forma endocrina.



Sin embargo, posteriormente se encontró que GH también poseía acciones directas sobre el crecimiento óseo (Backeljauw P.F. *et al.*, 2001; Savage M.O. *et al.*, 2006). Esto, junto con el detalle que pasó desapercibido sobre la producción extra-hepática de IGF-1 (D'Ercole A.J. *et al.*, 1980 y 1984), hizo necesario expandir el concepto del eje GH/IGF-1 hasta lo que hoy aceptamos: la GH hipofisaria es capaz de inducir la síntesis de IGF-1 en hígado (principalmente) y otros tejidos, que consiguientemente actúa de forma endocrina, paracrina y autocrina (Ohlsson C. *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta todos estos datos, podemos concluir que tanto GH como IGF-1 tienen efectos independientes y sinérgicos en cuanto a la promoción del crecimiento corporal postnatal se refiere. Esta idea fue confirmada al comparar los pesos de ratones transgénicos con inactivación del receptor de GH, delección del gen de IGF-1 y el doble *knockout* (Lupu F. *et al.*, 2001). Como era de esperar, el modelo de doble inactivación presentó una reducción más drástica del crecimiento (~20%) en comparación con los otros dos grupos experimentales.

Finalmente, el papel de otras moléculas en el control del crecimiento corporal puede ser también de gran importancia, y podría en consecuencia incrementar la complejidad del conocimiento de estos mecanismos. El complejo IGFBP-3 y ALS, descrito con anterioridad como el principal mecanismo para transportar y aumentar la vida media de IGF-1 en suero, es uno de estos factores. A pesar de ser sintetizados principalmente por el hígado, también se ha encontrado una producción extra-hepática (Chin E. *et al.*, 1994; Yakar S. *et al.*, 2009). Su importancia radica en que, además de modular la biodisponibilidad de IGF-1, IGFBP-3 es capaz de actuar independientemente de IGF-1, regulando tanto el crecimiento, como la apoptosis y el metabolismo celulares (Jaques G. *et al.*, 1997; Schedlich L.J. *et al.*, 2000; Lee K.W. *et al.*, 2005). Una detallada revisión sobre los principales efectos de IGFBP-3 fue publicada por Ohlsson y cols. (Ohlsson C. *et al.*, 2009).

#### **I.1.4.2. Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC).**

Aunque los mecanismos de acción de IGF-1 en las neuronas no han sido dilucidados por completo, se ha observado que IGF-1 estimula la autofosforilación de su receptor (Kenner K.A. y Heidenreich K.A., 1991) de forma diferente a la insulina (Begum N. *et al.*, 1993). Además, como será discutido más adelante, nuestro grupo de investigación ya publicó el efecto neuroprotector de IGF-1 asociado a la protección mitocondrial y la mejora de las defensas antioxidantes en animales de edad avanzada (García-Fernández M. *et al.*, 2008; Puche J.E. *et al.*, 2008; García-Fernández M. *et al.*, 2011; Castilla-Cortazar I. *et al.*, 2011). Ambas vías, que podrían estar interconectadas, están siendo estudiadas con más en detalle en la actualidad.

IGF-1 es producido en picos sincrónicos con periodos de proliferación y diferenciación de progenitores neuronales, crecimiento neural (incrementando el número de dendritas, del cono axonal, del número de sinapsis...) o con periodos post-agresión (D'Ercole A.J. y Ye P., 2008). Sin embargo, la posibilidad de que IGF-1 pudiera actuar sobre las células madre neurales (NSC) está aún en debate a pesar del hecho de que tanto IGF-1 como IGF-1R son expresados por las NSC en cultivo (Drago J. *et al.*, 1991; Popken G.J. *et al.*, 2005) y que, en respuesta a IGF-1, las NSC se diferenciaban hacia linajes específicos como neuronas (Brooker G.J. *et al.*, 2000) u oligodendrocitos (Hsieh J. *et al.*, 2004).

Pero, no es sólo el IGF-1 local el que está implicado en este proceso. Hace casi 20 años desde que se publicara que el IGF-1 sistémico podía cruzar la barrera hemato-encefálica (BEH), en un experimento donde se inyectó IGF-1 marcado en carótida de ratas adultas, siendo éste detectado posteriormente en el plexo coroideo, eminencia media, arteriolas cerebrales y parénquima (Reinhardt R.R. y Bondy C.A., 1994b). De hecho, este trabajo se basó en datos previos que confirmaron la presencia de receptores de IGF-1 en células endoteliales de capilares cerebrales (que constituían la BEH), y su papel en internalizar el IGF-1 desde la circulación sistémica al SNC (Rosenfeld R.G. *et al.*, 1987; Duffy K.R. *et al.*, 1988).

Un artículo más reciente del grupo de trabajo de Torres Aleman (2010), demostró que este proceso es iniciado por la liberación de glutamato en regiones activas, induciendo dos procesos: 1) una vasodilatación para fomentar la biodisponibilidad de IGF-1 local, y 2) un aumento de la actividad de la metaloproteasa 9, con un incremento de la liberación de IGF-1 de su complejo ternario (IGFBP-3 y ALS). La acción combinada de estos eventos resultó en un incremento de la disponibilidad local de IGF-1 libre, que fue a continuación transportado vía transcitosis gracias a un mecanismo dependiente de un transportador endotelial (*lipoprotein related receptor 1*) (Nishijima T. *et al.*, 2010). Este descubrimiento debería arrojar algo de luz a datos previos en los que se identificó al IGF-1 hepático como uno de los factores principales encargados de la regulación del aclaramiento de los niveles de  $\beta$ -amiloide cerebral (Carro E. *et al.*, 2002) y sus potenciales implicaciones en la enfermedad de Alzheimer (que será discutida en mayor profundidad en el apartado I.2.4.1). Sin embargo, merece la pena adelantar que no existe una correlación significativa entre los niveles de IGF-1 plasmáticos y las concentraciones en líquido cefalorraquídeo (Backstrom M. *et al.*, 1984) y, por consiguiente, parece que el IGF-1 sistémico no es la fuente principal de IGF-1 en el SNC.

Por otro lado, se sabe poco acerca de los factores y mecanismos que regulan la expresión de IGF-1 en cerebro. Ciertas evidencias apuntan a algunos factores que pueden modular su expresión en cerebro *in vivo*, tales como factores de crecimiento (GH, *Transforming Growth Factor  $\alpha$* , *basic Fibroblast Growth Factor*, etc) (Hynes M.A. *et al.*, 1987; Chernausek S.D., 1993; Pons S. y Torres-Aleman I., 1992), la nutrición (Lowe W.L. Jr. *et al.*, 1989; Hall K.S. *et al.*, 1989) y el daño (ya sea hipóxico/isquémico, estereotáctico, electrolítico o criogénico, al igual que la desmielinización inducida y la encefalomiелitis autoinmune experimental (Yamaguchi F. *et al.*, 1991; Lee W.H. *et al.*, 1992; Garcia-Estrada J. *et al.*, 1992; Komoly S. *et al.*, 1992; Liu X. *et al.*, 1995; Yao D.L. *et al.*, 1995a y 1995b). Además, los niveles del ARNm de IGF-1 se encuentran reducidos en cerebros de ratas hipofisectomizadas, y la perfusión intracerebral de GH restaura (~80%) los

niveles de IGF-1 (Hynes M.A. *et al.*, 1987), lo que apunta al papel que GH tiene en el control del IGF-1 cerebral.

Adicionalmente, IGF-1 podría promover la proliferación y/o supervivencia de los oligodendrocitos y sus precursores, lo que también podría estar implicado en la modulación de la permeabilidad de la BHE (Liu X. *et al.*, 1995). Esto último limitaría la accesibilidad de los linfocitos T y los factores solubles inmunes en el cerebro. Otras posibilidades son también plausibles, como por ejemplo, la posibilidad de que IGF-1 influyera en la reacción inmune periférica, lo que a su vez podría reducir la inflamación del SNC, su desmielinización y la permeabilidad de la BHE (D'Ercole A.J. *et al.*, 1996). Estos resultados, tomados en conjunto con las acciones neuroprotectoras de IGF-1 (García-Fernández M. *et al.* 2008; Puche J.E. *et al.*, 2008), sugieren que los astrocitos son relevantes en la mejora de la lesión cerebral.

La posibilidad de trabajar con ratones transgénicos ha aclarado algunos aspectos sobre el tema. Un modelo animal de ratones que sobreexpresan IGF-1 en el cerebro mostró un crecimiento postnatal excesivo del cerebro (hasta un 85%) sin que se acompañara de anomalías anatómicas mediante un mero aumento en el número de células (Behringer R.R. *et al.*, 1990) y de la mielinización (Carson M.J. *et al.*, 1993). Un experimento complementario (Behringer R.R. *et al.*, 1990) excluyó la posibilidad de que fuera GH quien promoviera directamente estos efectos, ya que ratones transgénicos que sobreexpresan GH no mostraron estos cambios. Sin embargo, como se dijo anteriormente, el papel de la GH en el crecimiento del cerebro no puede ser subestimado, dado que los ratones deficientes en GH tienen cerebros mucho más pequeños que los ratones normales (Ohlsson C. *et al.*, 2009). Consistentemente, ratones transgénicos con delección génica de IGF-1 apenas sobreviven después del nacimiento. Los supervivientes tienen cerebros muy pequeños (-60% del tamaño normal), pero siguen siendo morfológicamente normales (Beck K.D. *et al.*, 1995). Estos cerebros se caracterizan por una escasez de la materia blanca debido a una marcada reducción de la mielinización (Ye P. *et al.*, 2002) y una aparente disminución en el número de axones (Beck K.D. *et al.*, 1995).

Estas acciones de IGF-1, junto con sus efectos neuroprotectores secundarios a la lesión del SNC y/o de nervios periféricos, sugieren que podría ser una terapia beneficiosa en una amplia variedad de trastornos que afecten al sistema nervioso.

#### **I.1.4.3. Desarrollo y regeneración hepáticos.**

El hígado es la principal fuente del IGF-1 circulante (~75%) tras la estimulación de los hepatocitos por parte de la GH (Froesch E.R. *et al.*, 1985; Sjogren K. *et al.*, 1999; Ohlsson C. *et al.*, 2009). Sin embargo, es interesante que aunque este IGF-1 tiene efectos endocrinos sobre otros muchos órganos, tan sólo una mínima cantidad de artículos refieren el papel de IGF-1 sobre el propio hígado en condiciones normales (Skrtic S. *et al.*, 1997a), quizás debido a la baja cantidad de receptores de IGF-1 en la membrana de los hepatocitos (Froesch E.R. *et al.*, 1985; Caro J.F. *et al.*, 1988; Skrtic S. *et al.*, 1997b). En cambio, sí se han encontrado IGF-1R en la membrana de células no parenquimatosas hepáticas (Brenzel A. *et al.*, 1996; Skrtic S. *et al.*, 1997) y que IGF-1 es capaz de estimular la síntesis de DNA (Pinzani M. *et al.*, 1990; Gressner A.M. *et al.*, 1993) y la producción del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*) en células estrelladas hepáticas en cultivo (Skrtic S. *et al.*, 1997a).

La falta de receptores para IGF-1 en los hepatocitos podría significar también que el IGF-1 hepático sería incapaz de estimular el crecimiento del hígado durante la edad adulta. De acuerdo con esta afirmación, ratones con una deficiencia específica de IGF-1 hepático, en vez de experimentar una disminución del tamaño hepático, mostraron hígados desproporcionadamente grandes, probablemente debido a la directa estimulación vía GH (que no se encontraría suprimida por el “*feedback*” negativo de IGF-1) (Yakar S. *et al.*, 1999, Sjogren K. *et al.*, 1999).

En relación con este descubrimiento, ratones deficientes del receptor de GH mostraron un menor peso hepático relativo (Sjogren K. *et al.*, 2000), y ratones transgénicos que sobreexpresaban GH, presentaron un crecimiento

desproporcionado del hígado (Shea B.T. *et al.*, 1987), mientras que éste es menos aparente en ratones que sobre-expresan IGF-1 (Quaife C.J. *et al.*, 1989).

En otro escenario, como es el caso del daño hepático, donde se requiere una rápida explosión de renovación de hepatocitos (por ejemplo, tras una hepatectomía parcial), IGF-1 puede jugar un papel importante al promover la proliferación de hepatocitos y acelerar de la síntesis de ADN (Pennisi P.A. *et al.*, 2004; Desbois-Mouthon C. *et al.*, 2006), junto con la liberación de interleucina 6 (IL-6), Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), HGF y *Transforming Growth Factor  $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ) (Fausto N. *et al.*, 1995; Cressman D.E. *et al.*, 1996). Esta notable diferencia podría deberse al incremento de receptores de IGF-1 que acontece durante el daño hepático (Stefano J.T. *et al.*, 2006).

#### **I.1.4.4. Desarrollo y protección cardiovascular.**

El sistema cardiovascular es una diana importante para las acciones de GH e IGF-1. Existen evidencias de que tanto IGF-1 como su receptor son expresados en el miocardio, el músculo liso aórtico tanto y las células endoteliales (D'Ercole A.J. *et al.*, 1984; Guler H.P. *et al.*, 1988; Delafontaine P. *et al.*, 1991; Wickman A. *et al.*, 1997), siendo todos éstos más sensibles a IGF-1 que a la insulina (Johansson G.S. *et al.*, 2008; Chisalita S.I. *et al.*, 2009). Además, la producción de IGF-1 cardíaco aumenta en respuesta a la GH (D'Ercole A.J. *et al.*, 1984). Por consiguiente, hay diferentes posibilidades tanto de acciones directas de GH, así como de efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos de IGF-1 sobre el sistema cardiovascular.

Estudios previos indican que el IGF-1 es un potente vasodilatador (Pete G. *et al.*, 1996), y que este efecto puede ser en parte mediada por el aumento de la liberación de óxido nítrico (NO) por el endotelio (Copeland K.C. y Nair K.S., 1994; Walsh M.F. *et al.*, 1996). La acumulación de pruebas también sugieren que niveles insuficientes de IGF-1 podrían desempeñar un papel en las enfermedades vasculares como la arteriosclerosis y reestenosis

(Delafontaine P. *et al.*, 2004), lo que se discutirá en las secciones posteriores (apartado I.2.4.2). En línea con estos descubrimientos, se ha comprobado en un modelo experimental de insuficiencia cardíaca, que IGF-1 induce el crecimiento de los cardiomiocitos (Duerr R.L. *et al.*, 1996) y que tanto GH como IGF-1 aumentan la masa cardíaca en pacientes con miocardiopatía dilatada, mejorando el estado clínico y hemodinámico (Fazio S. *et al.*, 2000).

#### **I.1.4.5. Otras funciones.**

##### I.1.4.5.1. Gametogénesis

IGF-1 ha sido relacionado tanto con la foliculogénesis ovárica como con la espermatogénesis y función testiculares. A continuación, resumimos algunos de sus efectos:

##### A) Foliculogénesis ovárica:

El proceso de la foliculogénesis se puede dividir en tres fases de desarrollo: 1) Crecimiento del folículo preantral: transición del folículo primordial al folículo primario, y formación y crecimiento de folículos secundarios; 2) Crecimiento del folículo antral basal: desde la formación del antro y desarrollo del folículo antral temprano hasta la etapa dependiente de gonadotropina, y 3) Crecimiento del folículo antral terminal: desde el desarrollo del folículo antral hasta el folículo preovulatorio (Silva J.R. *et al.*, 2009).

En los primates, los patrones de expresión de ARNm de IGF-1 y su receptor se han estudiado a fondo durante la foliculogénesis. IGF-1 se expresa en los folículos primordiales, folículos primarios, secundarios y folículos antrales en crecimiento (tanto en los oocitos como en la teca), pero no en los folículos preovulatorios (granulosa mural y teca) (Silva J.R. *et al.*, 2009). Interesantemente, la expresión de ARNm de IGF-1R es temporalmente coincidente con la expresión de IGF-1, con la excepción de las células de la granulosa mural, donde sólo se preserva la producción de IGF-1R, sugiriendo una dependencia paracrina/endocrina para los efectos de IGF-1 a este nivel (Silva J.R. *et al.*, 2009).

La falta de información sobre el papel de los IGFs en un punto específico de la foliculogénesis humana, obstaculiza su correlación con los patrones de expresión de IGF-1. Afortunadamente, los modelos de roedores nos proporcionan una herramienta útil para dilucidar sus posibles implicaciones. Este enfoque sugiere que IGF-1 puede jugar un papel en diferentes etapas de desarrollo folicular: a) iniciación del crecimiento del folículo primordial; b) en la etapa de folículo secundario, IGF-1 podría estar implicado en la inducción de la expresión del receptor de FSH en las células de la granulosa y su diferenciación, al igual que en la supervivencia de las células de la teca y la formación de gránulos corticales en los oocitos (Zhou J, *et al.*, 1997; Zhao J. *et al.*, 2001 y 2002; Demeestere I. *et al.*, 2004), y c) en la etapa folicular antral, IGF-1 podría aumentar la sensibilidad del folículo a la gonadotropina, la maduración de los ovocitos y la expresión del receptor de la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa y la teca, mejorando su proliferación y la actividad esteroideogénica (Giudice L.C., 1992; Magoffin D.A. y Weitsman S.R., 1994; Tsuchiya M. *et al.*, 1999; Monget P. *et al.*, 2002; Yu Y. *et al.*, 2012). En los seres humanos, IGF-1 estimula también la producción del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) en células de la granulosa (Stanek M.B. *et al.*, 2007).

A pesar de los recientes avances, los precisos mecanismos que subyacen durante el crecimiento folicular ovárico no están completamente dilucidados. En la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas, aunque GH e IGF-1 no parecen ser necesarios para la transición de folículos primordiales a folículos primarios, sí son responsables de promover el crecimiento del folículo secundario y la formación de antro (Silva J.R. *et al.*, 2009).

## B) Función testicular:

Aunque está bien establecido que la función testicular es controlada principalmente por las gonadotropinas LH y FSH (Hall P., 1994; Rouiller-Fabre V. *et al.*, 1998), se están empezando a acumular considerables evidencias que apuntan a factores producidos localmente como importantes reguladores que



serían clave para la función testicular (Saez J. y Lejeune H., 1996). Entre ellos, el IGF-1, presente en testículos de humanos adultos (Vannelli B.G., 1988), se ha postulado como un potente candidato debido a sus funciones para- y autocrinas. IGF-1. En cultivos de células de Sertoli y de Leydig procedentes de ratas adultas y cerdos inmaduros, se ha demostrado que son capaces secretar IGF-1 al medio, y que esta secreción se ve reforzada por FSH (células de Sertoli) o LH (células de Leydig) (Cailleau J. *et al.*, 1990; Naville D. *et al.*, 1990).

IGF-1R también ha sido descrito en células de Leydig de humanos, cerdos y ratas (Lin T. *et al.*, 1986; Perrard-Sapori M.H. *et al.*, 1987; Spiteri-Grech J. *et al.*, 1991), donde mejora las funciones de las células de Leydig (Saez J.M., 1994; Lin T., 1996).

El papel crucial de IGF-1 en el desarrollo y la función de las células de Leydig se obtuvo a partir de estudios en ratones *knockout* para IGF-1 (Baker J. *et al.*, 1996). Los testículos de estos animales eran de menor tamaño y, aunque los epidídimos eran por lo general casi alométricos para la reducción de peso corporal, las regiones distales del conducto, conductos deferentes, las vesículas seminales y la próstata eran simples vestigios. Estos ratones transgénicos mostraron una reducción significativa de los niveles plasmáticos de testosterona (18% de lo normal) (Baker J. *et al.*, 1996) y la deficiencia de IGF-1 se correlacionó con la presencia de células de Leydig mutantes a nivel ultraestructural, lo que reveló un significativo retraso en el desarrollo, con un menor número de células de Leydig y de menor tamaño de lo normal. Es importante destacar que aquellos reducidos niveles de testosterona en suero eran inadecuados para la androgenización perinatal. Y, en segundo lugar, la deficiencia de andrógenos en los mutantes pudo ser correlacionada con una diferenciación aparentemente retrasada de las células de Leydig (en concreto, su segunda fase) (Baker J. *et al.*, 1996).

Estudios *in vitro* también sugirieron una relación entre IGF-1 y la producción de andrógenos mediada por LH en roedores (Gelber S.J. *et al.*, 1992), a través de un efecto directo sobre las células de Leydig.

Del mismo modo, se observó que gónadas masculinas cultivadas en presencia de IGF-1 aumentaban la producción de testosterona durante el

desarrollo testicular (Tapanainen J. *et al.*, 1984). Tras del nacimiento, estudios *in vitro* también han demostrado que IGF-1 regula la tasa de expresión de genes que codifican enzimas esteroidogénicas implicadas en la biotransformación de hormonas esteroideas en los testículos (Lin T. *et al.*, 1987; Moore A. y Morris I.D., 1993; Chuzel F. *et al.*, 1996). En segundo lugar, se evaluó el papel de IGF-1 sobre el número de espermatozoides, encontrándose que en ratones deficientes de IGF-1 acontecía una dramática reducción del número de espermatozoides (Baker J. *et al.*, 1996). Además, la gran mayoría de estos machos que fueron enjaulados con hembras normales no mostró ningún tipo de comportamiento de apareamiento.

Por otro lado, cabe destacar que el papel de la GH sobre la regulación del IGF-1 intratesticular, en caso de existir, no debe ser significativo, ya que parece ser que el gen del receptor de GH no se expresa en testículo (Lobie P.E. *et al.*, 1990; Tiong T.S. y Herington A.C., 1991) y animales con insensibilidad a la GH (GHI) son fértiles (con una normal esteroidogénesis y espermatogénesis) (Chubb C., 1987; Godfrey P. *et al.*, 1993). Curiosamente, a pesar de la deficiencia de GH y de los bajos niveles séricos de IGF-1, presentan niveles normales de IGF-1 intratesticular (Spiteri-Grech J. *et al.*, 1991). Así, además de ser aparentemente independiente de GH, las funciones testiculares de IGF-1 parecen ser debidas a una producción local (con acción autocrina/paracrina), sin necesidad de una importante contribución endocrina de su forma circulante.

#### I.1.4.5.2. Desarrollo y función renales.

Ciertas evidencias apoyan la función del eje GH/IGF-1 en el normal desarrollo y función renales. Tanto los IGFs, como las IGFBPs y los receptores de IGF (junto con los receptores de GH) se expresan en lugares específicos a lo largo de la nefrona, lo que sugiere que IGF-1 tiene acciones para- y autocrinas en estos puntos (Rabkin R. y Schaefer F., 2004; Bach L.A., 2012).

Tanto IGF-I y el IGF-1R se expresan durante el desarrollo glomerular. Cuando estos patrones de expresión se encuentran alterados, acontecen

enfermedades renales, lo que se demostró en modelos animales transgénicos (Bridgewater D.J. *et al.*, 2008). De hecho, se ha confirmado el papel de la señalización de IGF en el mantenimiento de la integridad glomerular, al proteger del daño a los podocitos y la membrana basal glomerular. Consistentemente, la administración de IGF-1 a roedores fomenta el crecimiento de los riñones, el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular (TFG) (Martin A.A. *et al.*, 1991; Hirschberg R., 1996; Bach L.A., 2012). De manera similar, la GH y el IGF-1 también aumentan el flujo sanguíneo renal y la TFG en los seres humanos (Kumar P.A. *et al.*, 2011), lo que sugiere que IGF -1 puede ser un regulador fisiológico de la función renal.

Por otra parte, se propuso un posible papel para IGF-1 en el crecimiento renal compensatorio, dado que los niveles de IGF-1 están aumentados en el riñón restante tras una nefrectomía unilateral y el crecimiento renal compensatorio subsiguiente (Yildiz B. *et al.*, 2008), siendo este proceso dependiente de la edad (Mulrone S.E. *et al.*, 1992). Sin embargo, mediante el uso de ratones deficientes de IGF-1, se ha publicado recientemente que la nefrectomía unilateral en estos ratones induce un aumento significativo y proporcional de la masa renal, en comparación con ratones normales, a pesar de una marcada disminución de los niveles de IGF-1 en el riñón y sin objetivarse cambios significativos en la fosforilación de los receptores (Landau D. *et al.*, 2011). Por lo tanto, las implicaciones de IGF-I en este proceso deberán ser dilucidadas en los próximos años.

#### I.1.4.5.3. Modulación inmunológica.

La posible relación entre la función inmune y los factores de crecimiento tales como el IGF-1 se ha mantenido pobremente caracterizada hasta hace poco. Sin embargo, la comprensión de que diversas vías de regulación a menudo convergen, motivó una serie de estudios que finalmente demostraron la importancia de la GH, IGF-1 e IGF-1R en una gran variedad procesos inmunológicos (Smith T.J., 2010).

Las complejas interacciones entre citoquinas y factores de crecimiento, incluyendo IGF-1, fueron revisadas por O'Connor y cols. (O'Connor J.C. *et al.*, 2008). En resumen, teniendo en cuenta que muchas citoquinas comparten los mismos componentes de señalización, tales como Erk1/2 MAPK, las citoquinas pro-inflamatorias parecen silenciar varios componentes de la vía de IGF-1.

El papel de IGF-1 en el desarrollo y la función del timo, la hematopoyesis y la constitución del sistema inmunitario sí ha sido bien documentada (Murphy W.J. *et al.*, 1992a y 1992b; de Mello-Coelho V. *et al.*, 1997). En resumen, IGF-1 desempeña funciones importantes tanto en el desarrollo de linfocitos T y como en su función, aumentando el número de células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> inmaduras en timo y bazo de ratas (Hinton P.S. *et al.*, 1998), promoviendo la supervivencia de las células T (Walsh P.T. *et al.*, 2002), así como su proliferación, quimiotaxis y maduración, y bloqueando la muerte celular programada, tanto espontánea como inducida (Tu W. *et al.*, 2000; Walsh P.T. *et al.*, 2002).

Respecto a otras estirpes celulares, se ha demostrado que IGF-1 es capaz de promover la diferenciación de células B, mejorar la proliferación de células B dependiente de IL-7 (en paralelo con c-kit ligando) (Landreth K.S. *et al.*, 1992), así como potenciar la expansión de células pro-B inducida por IL-7 (Gibson L.F. *et al.*, 1993). Cuando se administra *in vivo*, IGF-1 también incrementa la población de células B intraesplénicas al aumentar la proliferación de células maduras (Jardieu P. *et al.*, 1994; Clark R., 1997) y mediar la expresión de anticuerpos y el cambio de clase de las células plasmáticas (Robbins K. *et al.*, 1994).

Por otro lado, macrófagos y granulocitos humanos también son sensibles a IGF-1 atenuando su apoptosis (Rom W.N. y Paakko P., 1991; Smith T.J. *et al.*, 2010). Finalmente, los neutrófilos parecen ser un potencial objetivo para las acciones de IGF-1, ya que es capaz de retrasar la apoptosis mediada por Fas a través de la vía PI3-Kinasa. Además, este efecto se conservó incluso en la presencia de citoquinas pro-apotóticas, lo que sugiere que puede jugar un papel dominante, incluso en el contexto de una inflamación activa (Smith T.J. *et al.*, 2010).

#### I.2.5.4. Efecto semejante a la insulina.

La similitud estructural y funcional entre IGF-1 e insulina explica algunos de los efectos metabólicos e hipoglucemiantes descritos como respuesta a la administración aguda de IGF-1, tanto en el animal de experimentación como en el hombre. La administración intravenosa de un bolus de IGF-1 en dosis que superen la capacidad de unión de las proteínas transportadoras (IGFBPs) induce hipoglucemia. Por tanto, el efecto hipoglucemiante de IGF-1 es debido a la presencia de IGF-1 libre, mientras que el unido a IGFBPs no produce tal efecto (Bondy C.A. *et al.*, 1994b; Binoux M., 1995; Bang P. *et al.*, 2001). Como en el organismo más del 90% de IGF-1 circulante se encuentra ligado a IGFBPs, en condiciones fisiológicas se evita el efecto hipoglucemiante. En cuanto a la administración exógena de IGF-1, se considera que la vía subcutánea amortigua el efecto hipoglucemiante, ya que el paso gradual de IGF-1 al torrente circulatorio permite una unión progresiva a sus proteínas transportadoras (Bondy C.A. *et al.*, 1994b; Binoux M., 1995; Tomas F.M. *et al.*, 1996). Por la misma razón, también puede evitarse la hipoglucemia con tratamientos con IGF-1 a largo plazo, puesto que, al parecer, el propio IGF-1 induce la síntesis de IGFBP-3 (Cohick W.S. y Clemmons D.R., 1993).

Por otra parte, mientras que la insulina disminuye en mayor medida que IGF-1 las concentraciones de glicerol y ácidos grasos libres en sangre, IGF-1 induce una mayor utilización de glucosa y lactato. Estos efectos parecen sugerir que, a diferencia de la insulina, ni el hígado ni el tejido adiposo son los principales órganos diana de IGF-1. Además, la elevación del lactato por efecto de IGF-1 sugiere que este factor de crecimiento actúa sobre el tejido muscular con más especificidad que sobre el tejido adiposo (Bang P. *et al.*, 2001).

Además, tras la administración de IGF-1, la secreción de insulina se ve desacoplada de la glucemia. Esta supresión de la secreción puede producirse por un aumento de la utilización de glucosa y probablemente por un aumento de la sensibilidad a la insulina (Binoux M., 1995).

## **I.2. CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE IGF-1.**

El desarrollo de modelos animales transgénicos ha permitido destacar el papel de IGF-1 en multitud de diferentes órganos y sistemas, así como su relación causal con distintas patologías. En la introducción de este trabajo doctoral, nos centraremos en aquellos modelos de deficiencia de IGF-1 mejor caracterizados, en los que la terapia sustitutiva podría ser una estrategia eficaz.

### **I.2.1. Crecimiento intrauterino retardado (CIR).**

El crecimiento fetal es un complejo proceso que involucra tanto a factores maternos, como placentarios y fetales, y desde una naturaleza genética, a nutricional y/o ambiental. La restricción del crecimiento intrauterino es una importante complicación obstétrica que afecta ~ 5% de los embarazos y se refiere a un feto que no ha alcanzado su crecimiento potencial (Resnik R., 2002). El feto o recién nacido con restricción de crecimiento se caracteriza por un aumento de la mortalidad y morbilidad (fetal y neonatal) (Kramer M.S. *et al.*, 1990; Low J.A. *et al.*, 1992) y un aumento del riesgo de trastornos clínicos en la vida adulta, como enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad (Hattersley A.T. y Tooke J.E., 1999; Barker D.J., 2004).

En el período prenatal, las diferencias entre GH e IGF-1 se muestran claramente. Mientras que la insensibilidad a la GH (GHI), tanto en humanos como en ratones transgénicos, presenta sólo un leve retraso del crecimiento al nacimiento (como se indicó anteriormente) (Wit J.M. y van Unen H., 1992; Savage M.O. *et al.*, 1993; Zhou Y. *et al.*, 1997; Laron Z., 1999; Savage M.O. *et al.*, 2001), la deficiencia de IGF-1 en el estado gestacional supone un grave retraso del crecimiento postnatal, como se ha descrito tanto en seres humanos como en modelos de animales transgénicos con deficiencia de IGF-1 (Baker J. *et al.*, 1993; Liu J.P. *et al.*, 1993; Woods K.A. *et al.*, 1996; Lupu F. *et al.*, 2001; Abuzzahab M.J. *et al.*, 2003; Leal Ade C. *et al.*, 2011). Curiosamente, en contraste a GHI, los animales deficientes en IGF-1 presentan daño neurológico, lo que también fue publicado en un paciente con un defecto en el gen de IGF-1 (Woods K.A. *et al.*, 1996). Por tanto, parece que IGF-1 es necesario para el

desarrollo normal del cerebro en el útero, mientras que la insensibilidad a la GH puede ser paliada por una producción intrauterina de IGF-1 independiente de GH (Rosenfeld R.G. *et al.*, 1994; Randhawa R. y Cohen P., 2005).

El progreso del desarrollo fetal está en gran parte controlado por la sangre oxigenada que alcanza la circulación uterina, la integridad y la función placentaria y la capacidad del feto para obtener los nutrientes necesarios (Gluckman P.D. y Hanson M.A., 2004). Se ha estimado que los genes de los progenitores sólo repercuten en un 20% de la variación del peso al nacimiento. Sin embargo, la mayoría de la variación (~62%) se debe al medio intrauterino (Penrose L.S., 1952). Se ha observado que las placentas de embarazos con CIR presentan una pobre invasión de células trofoblásticas en los tejidos de la decidua materna, especialmente, en las arterias espirales maternas (Brosens J.J. *et al.*, 2002; Setia S. y Sridhar M.G., 2009). Los estudios sobre el proceso patológico del crecimiento intrauterino retardado han apuntado a una función anormal de la placenta como mecanismo común (Miller H.C., 1985). Sin embargo, se sabe que la disfunción de la placenta a menudo es gradual y puede ocurrir mucho antes que cualquier CIR demostrable (Voigt H.J. y Becker V., 1992), lo que dificulta la resolución de esta hipótesis.

Por otro lado, los IGFs controlan el crecimiento directamente, y los niveles de IGF-1 circulante parecen ser prácticamente independientes de la secreción de GH fetal (Randhawa R. y Cohen P., 2005). Sin embargo, en estas condiciones, la hormona de crecimiento placentaria puede tomar el papel de principal regulador del materno IGF-1 en suero durante el embarazo (Verhaeghe J. *et al.*, 2000), siendo de particular interés la expresión de IGF-1R en la placenta (Reece E.A. *et al.*, 1994) y la menor expresión de IGF-1 de origen placentario durante el CIR (Koutsaki M. *et al.*, 2011). En general, el ambiente endocrino del feto humano con retraso del crecimiento también se caracteriza por bajos niveles circulantes de insulina, IGF-1, IGF-2 e IGFBP-3, y por altos niveles de GH e IGFBP-1 (Giudice L.C. *et al.*, 1995; de Zegher F. *et al.*, 1997; Setia S. y Sridhar M.G., 2009). En este punto, un elegante estudio en el pez cebra demostró que la disminución de la expresión de IGFBP-1 aliviaba significativamente el retraso en el crecimiento y el desarrollo inducidos por hipoxia. Complementariamente, la sobreexpresión de IGFBP-1 causó un

significativo retraso del desarrollo y el crecimiento en condiciones de normoxia (Kajimura S. *et al.*, 2005).

En lo referente a las respuestas fetales al CIR por hipoxia, incluyen la menor expresión de insulina, IGF-1, IGF-2 y una mayor expresión de IGFBPs inhibitorias. La hipoxia también activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), aumentando los niveles plasmáticos de hormona adrenocorticotropa y cortisol, otro mecanismo que regula la expresión de IGFBPs (Han V.K. y Carter A.M., 2001). Además, como se comentó anteriormente, el crecimiento de riñón está bajo el control de IGF-1, y una reducida acción de los IGFs, paralela a unos niveles de cortisol elevados, da como resultado un menor número de glomérulos (Vehaskari V.M. *et al.*, 2001). Las alteraciones en el sistema renina-angiotensina son también frecuentes, probablemente motivadas por la activación del eje HPA. Estos cambios, junto con las respuestas compensatorias debidas a la reducción de la función renal pueden ser el origen de la predisposición a la hipertensión en la edad adulta.

En los últimos años, se ha propuesto un papel para la “programación fetal” debida a una alteración del eje GH/IGF-1 en el CIR, constituyendo así la denominada “hipótesis del fenotipo ahorrativo” (Setia S. y Sridhar M.G., 2009), con una ya probada correlación inversa entre los niveles de IGF-1 a los 9 meses y a los 17 años. Con esta perspectiva, el eje GH/IGF-1 podría ser programado desde una temprana edad. Esta programación fetal podría estar implicada en, al menos, dos patologías en la edad adulta, como la resistencia a la insulina y la hipertensión. En primer lugar, los niños con retraso del crecimiento intrauterino muestran una alteración del eje GH/IGF-1, que podría estar contribuyendo a la reducida sensibilidad a la insulina y la resistencia al IGF-1, ya que se requieren unos mayores niveles basales (e inducidos por GH) de IGF-1 para lograr una velocidad de crecimiento similar a la de otros niños, lo que secundariamente conduciría a una hiperinsulinemia compensatoria para contrarrestar los efectos de contra-insulares de la GH (Woods K.A. *et al.*, 2002) y a una alterada regulación (mediada por insulina) de la expresión del transportador de glucosa-4 en músculo y tejido adiposo (Jaquet D. *et al.*, 2001).



## **I.2.2. Síndrome de Laron (SL).**

En 1966, Zvi Laron y cols. (Laron Z. *et al.*, 1966) describe la primera condición de deficiencia de IGF-1 como un nuevo tipo de enanismo, indistinguible de la deficiencia genética aislada de GH, pero con inesperados altos niveles de GH en suero (Laron Z. *et al.*, 1966; Laron Z., 2004) y la incapacidad para sintetizar IGF-1 y otras moléculas relacionadas, como IGFBP-3 (Laron Z. y Parks J.S., 1993; Laron Z., 1999; Savage M.O. *et al.*, 2001). Esta heterogénea condición finalmente fue denominada “síndrome de Laron” o insensibilidad primaria a la hormona de crecimiento (GHI), e incluye: la deficiencia del receptor de GH (el más común), defectos en la unión de GH a su receptor o en su posterior transducción de señales, alteraciones en la síntesis de IGF-1 y deficiencia de receptores de IGF-1 o de su transducción de señales.

Epidemiológicamente, esta entidad patológica está estrechamente relacionada con un origen étnico (> 90% de los casos) (Rosenbloom A.L. *et al.*, 1994). Desde el punto de vista clínico, el crecimiento global intraútero es ligeramente más corto al nacimiento en los neonatos con SL (42-47 cm) que en niños sanos (49-52 cm), lo que sugiere un papel potencial de IGF-1 en el control del crecimiento lineal intrauterino (Laron Z., 1999). Esta situación es más dramática a lo largo de la infancia, donde la maduración esquelética y crecimiento de los órganos sufre un significativo retraso (Rosenbloom A.L. *et al.*, 1994; Laron Z., 1999; Rosenbloom A.L., 1999), probablemente debido a un menor impacto de la GH en el crecimiento gestacional, en comparación con IGF-1 (Wit J.M. y van Unen H., 1992; Baker J. *et al.*, 1993; Savage M.O. *et al.*, 1993; Liu J.P. *et al.*, 1993; Woods K.A. *et al.*, 1996; Zhou Y. *et al.*, 1997; Laron Z., 1999; Savage M.O. *et al.*, 2001; Lupu F. *et al.*, 2001; Abuzzahab M.J. *et al.*, 2003).

Estas anomalías en el crecimiento de pacientes con SL que no se acogen al tratamiento sustitutivo con IGF-1 incluyen al nacer: tasas de crecimiento promedio de la mitad de lo esperado durante los primeros años de vida (Rosenbloom A.L. *et al.*, 1994), un cerebro pequeño (con frente prominente, dimensión vertical de la cara reducida e hipoplasia del puente

nasal), un corazón pequeño y acromicria (Feinberg M.S. *et al.*, 2000), subdesarrollo del sistema muscular que retrasa el inicio de caminar en tres de cada cuatro pacientes (Guevara-Aguirre J. *et al.*, 1991; Brat O. *et al.*, 1997), osteopenia en todas las etapas, con mayor incidencia de necrosis avascular de la cabeza femoral (Laron Z., 1984), deterioro y debilitamiento de la piel, el pelo y las uñas (Lurie R. *et al.*, 2004), esclera azul debido a la disminución del espesor de su tejido conectivo, lo que permite la visualización de la coroides subyacente (Guevara-Aguirre J. *et al.*, 1991), retraso de la pubertad desde 3 a 7 años (Laron Z., 1984), retraso en la maduración de la dentición (Laron Z., 1984) y voz aguda (Johnston L.B. *et al.*, 1998). Curiosamente, las funciones y conductas reproductivas normales son ampliamente conservadas (Rosenbloom A.L., 1999).

Los modelos animales de GHI están disponibles desde 1997 (Zhou Y. *et al.*, 1997), ayudándonos a mejorar la comprensión de los cambios fisiopatológicos subyacentes y a idear mejores estrategias para el tratamiento de estos pacientes. Hoy en día, esta es la única condición de deficiencia de IGF-1 en donde rhIGF-1 ha sido aprobado.

Esta condición de deficiencia de IGF-1 destaca el papel fundamental de IGF-1 en el desarrollo y función cerebrales, como se detallará más ampliamente en la sección "1.2.4.1. Enfermedades neurodegenerativas".



**Figura 10.** *Paciente con Síndrome de Laron.*

### **I.2.3. Enfermedad hepática crónica.**

La cirrosis es el resultado de la enfermedad hepática crónica y difusa, caracterizada por el reemplazo del tejido hepatocitario por nódulos de regeneración, fibrosis y necrosis, lo que conduce a la pérdida de la masa hepática funcional. La cirrosis es causada principalmente por el alcoholismo, los virus de tropismo hepático (especialmente hepatitis B y C) y la esteatohepatitis (Quiroga J. *et al.*, 1992).

Las complicaciones más frecuentes de la cirrosis avanzada incluyen la ictericia por la colestasis, la coagulopatía de la insuficiencia hepatocelular, hemorragias digestivas por varices esofágicas, ascitis, síndrome hepatorenal, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía hepática y malnutrición (Quiroga J. *et al.*, 1992). Aunque la supervivencia en pacientes con cirrosis compensada es relativamente alta (90% a los 5 años del diagnóstico), la aparición de complicaciones empeora este escenario al 30% a los 3 años (Gines P. *et al.*, 1987; Bruguera-Cortada M. y Rodes-Teixidor J., 1997).

La cirrosis hepática se asoció por primera vez con IGF-1 a mediados de los años 70 (Wu A. *et al.*, 1974), para luego proponerse esta hormona como un buen indicador de la capacidad funcional hepatocelular (Sheppard M.S. *et al.*, 1987; Caufriez A. *et al.*, 1991; Assy N. *et al.*, 1997) con una marcada disminución desde las primeras etapas de la cirrosis (Child-Pugh A) (Caregaro L. *et al.*, 1997). Desde entonces, la idea de la cirrosis hepática como una condición de deficiencia de IGF-1 durante la edad adulta ha sido anualmente consolidada a partir de una serie de publicaciones que establecen el origen de este déficit a una disminución de los receptores de GH en hígados cirróticos (Chang T.C. *et al.*, 1990) y a una progresiva reducción de la capacidad de biosintética de masa hepatocelular en los estadios avanzados (Quiroga J. *et al.*, 1992). Por otra parte, una marcada disminución de las concentraciones de IGF-1 también ha sido correlacionada con una mayor probabilidad de aparición de hepatocarcinoma (Inaba T. *et al.*, 1999) y un peor pronóstico en pacientes que requieren cirugía hepática (Moller S. *et al.*, 1996). Como resultado de los niveles de IGF-1 se consideran de valor pronóstico en cuanto a supervivencia en pacientes cirróticos (Moller S. *et al.*, 1996; Caregaro L. *et al.*, 1997).

La disponibilidad de modelos animales de cirrosis hepática experimental (por tetracloruro de carbono, tioacetamida, ligadura del conducto biliar, D-galactosamina, etc.) han permitido aclarar el papel de IGF-1 en la fisiopatología asociada a la cirrosis. En concreto, nuestro grupo de demostró que el tratamiento con rhIGF-1 en cirrosis experimental inducía: un aumento de la eficacia de la dieta, con una mayor absorción de nitrógeno y mejor balance nitrogenado (Picardi A. *et al.*, 1997), la normalización de la absorción intestinal de aminoácidos y azúcares (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 1997b; Castilla-Cortazar I. *et al.*, 1999; Pascual M. *et al.*, 2000) incluyendo animales con cirrosis descompensada y ascitis (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 2004b), mejorando el metabolismo de la glucosa (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 1997a), disminuyendo la hipertensión portal, endotoxemia y translocación bacteriana (Lorenzo-Zuniga V. *et al.*, 2006), mejorando la osteopenia tanto en cirrosis compensada como ascítica (Cemborain A. *et al.*, 1998 y 2000) y la morfología y función testicular (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 2000 y 2004a), recuperando el tono somatostatinérgico (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 2001) con una mejora de la función hepática (aumento de la albuminemia y factores de coagulación) y disminuyendo el daño oxidativo y la fibrosis hepática (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 1997a; Mugerza B. *et al.*, 2001).

Esta mejoría de la función hepática mediada por IGF-1 se asoció con efectos hepatoprotectores, anti-apoptóticos y con una recuperación de la disfunción mitocondrial (Mugerza B. *et al.*, 2001; Mirpuri E. *et al.*, 2002; Garcia-Fernandez M. *et al.*, 2005; Perez R. *et al.*, 2008; Tutau F. *et al.*, 2009).



**Figura 11.** *Paciente con cirrosis avanzada, ascitis y desnutrición grave.*

#### **I.2.4. Envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad.**

El envejecimiento es un proceso universal, intrínseco, irreversible, heterogéneo y multidimensional de una progresiva involución que se caracteriza por una paulatina pérdida de las funciones fisiológicas, aumentando la probabilidad de muerte. Aunque relacionada, la longevidad se diferencia del envejecimiento, ya que la primera resulta de la simple consideración de la duración de la vida independientemente del proceso de envejecimiento biológico. La esperanza de vida promedio ha ido (afortunadamente) en un continuo aumento: de ~27 años en la época greco-romana, a ~47 años en 1900, y ~77 años a finales del siglo 20 (Futtermann L.G. y Lemberg L., 2000). Sin embargo, es muy interesante que la esperanza de vida máxima (longevidad) no ha cambiado llamativamente y parece rondar alrededor de los 120 años, a pesar del aumento en el número de centenarios (Fries J.F., 1980).

Estos cambios relacionados con el envejecimiento, comienzan a aparecer en el segundo tercio de la vida, como la aparición de la menopausia y la osteoporosis en la mujer, la frecuente aparición de cáncer, el aumento del almacenamiento de grasa y cierto grado de aterosclerosis. En el tercio final de la vida, desciende la capacidad funcional del corazón, pulmón y riñón, hay pérdida de la masa muscular y ósea, disminuye la capacidad para adaptarse a cambios ambientales, declina la capacidad del organismo para combatir la infección y aumentan las respuestas autoinmunitarias, desciende la fertilidad, hay una pérdida en la capacidad cognitiva, se observa una lentitud de la respuesta física y/o mental ante estímulos específicos, hay aterosclerosis diseminada y aparecen alteraciones artríticas (Semsei I., 2000; Kirkwood T.B., 2002; Kirkwood T.B. y Finch C.E., 2002; Troen B.R., 2003).

Bajo el concepto de “edad cronológica” se dice que el proceso de envejecer comienza entre los 60-65 años. Sin embargo, e muchas ocasiones, el declinar vital no se acompaña de un decremento objetivable en las funciones cerebrales, que permanecen intactas hasta la muerte. Por ello parece lícito pensar que los diferentes sistemas del organismo no envejecen paralelamente, y que no podemos hablar de envejecimiento cerebral desde un punto de vista meramente cronológico.

Las concentraciones circulantes de GH e IGF-1 son máximas durante el crecimiento peripuberal y la temprana edad adulta; sin embargo, van disminuyendo progresivamente con la edad (Lamberts S.W. *et al.*, 1997) (cfr. Figura 3). Esta reducción durante el envejecimiento humano es referida a veces como somatopausia, en analogía con la menopausia y la andropausia. Estos bajos niveles de secreción de GH e IGF-1 en los ancianos parecen ser causa o concausa de muchos síntomas del envejecimiento, incluyendo la pérdida de masa muscular, aumento de la adiposidad, reducción de la densidad mineral ósea, disminución de los niveles energéticos, junto con alteraciones en los indicadores psicológicos de la calidad de vida (Bartke A. *et al.*, 2003).

Numerosas teorías han sido propuestas para explicar los mecanismos biológicos del envejecimiento, pero todas ellas presentan dificultades inherentes a la parcialidad de los fenómenos que proponen. Al mismo tiempo, la mayoría no se excluyen mutuamente y, hasta el presente, no hay evidencia de un único mecanismo responsable de la senectud. Por otro lado, el envejecimiento tiene posiblemente múltiples causas interactivas, que son probablemente diferentes en células de órganos "postmitóticos" (como las neuronas y las células musculares esqueléticas y cardíacas) en comparación con aquellos con tejidos renovables (como la médula ósea, piel y mucosa gastrointestinal). Así, el daño causado por radicales libres podría ser mayor en un órgano con baja tasa de renovación, como el sistema nervioso, que en otro con una alta tasa de recambio celular, como la médula ósea.

De las diferentes teorías sobre envejecimiento, aquellas más plausibles son las basadas en el envejecimiento celular, que demostraron, entre otras cosas, la dificultad de las células viejas para replicarse en presencia de factores de crecimiento se asocia con un fallo de la inducción del gen c-fos y con un bloqueo en la fase G<sub>1</sub> tardía del ciclo celular. Tal bloqueo puede ser evitado mediante la fusión de las "células seniles" con líneas celulares inmortales (Kim S.H. *et al.*, 2002).

Otro factor implicado en envejecimiento celular es el producto del gen del retinoblastoma, un inhibidor de la proliferación celular, que únicamente se

inactiva por fosforilación. El déficit de inducción de quinasas puede ser un hecho generalizado en las células viejas, llevando a alteraciones de la fosforilación tales que la célula sea incapaz de desactivar proteínas celulares que inhiben la proliferación celular. Además, secuencias de ADN no-codificadoras, las cuales pueden ser importantes para la división celular o regulación de procesos de transcripción, también podrían estar afectadas (Kirkwood T.B. y Finch C.E., 2002).

Entre las principales hipótesis propuestas para el proceso de envejecimiento están la del daño celular mediado por radicales libres (que estudiaremos más en detalle), las alteraciones en la metilación de ADN y el agotamiento telomérico, que siguen siendo objeto de una intensa investigación.

Antes de entrar más en detalle, es importante distinguir entre envejecimiento fisiológico y enfermedades relacionadas al envejecimiento. A medida que envejecemos ocurren dos fenómenos paralelos, una declinación fisiológica normal y un aumento en la prevalencia de ciertas enfermedades. Aunque estos procesos se influyen entre sí, existe una declinación fisiológica que es independiente del desarrollo de enfermedades.

Hay varias entidades patológicas que son mucho más frecuentes en el adulto mayor, y que tiempo atrás se pensaba que eran propias del envejecimiento, pero en la actualidad se sabe que son enfermedades. Este es el caso de la osteoporosis, enfermedad de Alzheimer y otros. Afortunadamente, algunas de estas entidades pueden prevenirse o manejarse de modo que no determinen tan tempranamente alguna discapacidad. Por ello, sólo los cambios que están presentes en todos los individuos que envejecen, y que aumentan en magnitud con la edad, representan envejecimiento *per se*.

En lo referente a las teorías del envejecimiento, se han propuesto muchas hipótesis para explicar este proceso. Goldstein y colaboradores (Goldstein S. *et al.*, 1989) las han revisado extensamente y finalmente las han dividido en dos grandes categorías: las que afirman que el proceso de envejecimiento sería el resultado de la suma de alteraciones que ocurren en forma aleatoria y se acumulan a lo largo del tiempo: teorías estocásticas, entre las que se incluye la que reúne mayor aceptación: la teoría de los radicales

libres, junto con otras tales como la del desgaste, del entrecruzamiento y del error catastrófico; y las que suponen que el envejecimiento estaría predeterminado: teorías no estocásticas, englobando a la teoría genética y a la teoría del marcapasos. En el presente trabajo prestaremos más atención a la acaecida por la acumulación de radicales libres (sección I.3. Daño oxidativo celular y enfermedad).

En resumen, todas ellas apuntan básicamente a la implicación de amplios procesos fisiológicos importantes para la longevidad: la estabilidad genética, el acortamiento de los telómeros, la resistencia al estrés y el control metabólico (Weinert B.T. y Timiras P.S., 2003). Curiosamente, IGF-1 está de alguna manera relacionado con todos ellos (cfr. Figura 12).



Propiedades fisiológicas de IGF-1 a lo largo de la vida	Crecimiento Neurogénesis y sinaptogénesis Desarrollo genital	Anabolizante Metabolismo óseo Proliferativo	Metabolismos lipídico y glucosado Anti-oxidante y anti-inflamatorio Hepato- y cardioprotección	Neuroprotection Protección mitocondrial Anti-apoptótico
Procesos implicados en la longevidad	Estabilidad genética	Resistencia al estrés	Control metabólico	Acortamiento de los telómeros

**Figura 12.** *Propiedades fisiológicas de IGF-1 a lo largo de la vida en relación con los procesos implicados en la longevidad.*



En primer lugar, partiendo de la base de que las mitocondrias son la principal fuente de radicales libres endógenos (Boveris A. *et al.*, 1972; Giulivi C. *et al.*, 1999), se demostró recientemente cómo las especies con mayores tasas metabólicas tienen menores esperanzas de vida máxima debido a la acumulación de anión radical superóxido, lo que aboca al daño celular y a un envejecimiento acelerado (Van Raamsdonk J.M. *et al.*, 2010). En este punto, nuestro grupo de investigación ha demostrado que IGF-1 es uno de los factores principales encargados de la restauración de la disfunción mitocondrial durante el envejecimiento, al aumentar el potencial de membrana mitocondrial, reducir en consecuencia el consumo de oxígeno, aumentar la síntesis de ATP (por un mejor acople de la cadena de transporte de electrones), y minimizar la salida del citocromo c hacia el citoplasma, lo que secundariamente promovería la supervivencia neuronal al evitar la apoptosis inducida por caspasas (Garcia-Fernandez M. *et al.*, 2008; Puche J.E. *et al.*, 2008). Estos datos concuerdan con experimentos *in vitro* de otros grupos (Ye P. *et al.*, 1996; Chrysis D. *et al.*, 2001; Hodge R.D. *et al.*, 2007).

Por otra parte, la administración de dosis bajas de IGF-1 en animales de edad avanzada disminuyó el daño oxidativo cerebral (malondialdehído –MDA– y contenido en proteínas carboxiladas –PCC–) y mejoró la actividad de las principales enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) (Garcia-Fernandez M. *et al.*, 2008; Puche J.E. *et al.*, 2008).

En segundo lugar, IGF-1 ha sido propuesto como un índice de envejecimiento saludable, debido a que se correlaciona directamente con la longitud de los telómeros de leucocitos (Moverare-Skrtic S. *et al.*, 2009; Barbieri M. *et al.*, 2009), un biomarcador de envejecimiento humano asociado al riesgo de desarrollo de enfermedades vasculares, trastornos metabólicos, y otras patologías asociadas a la edad (Fitzpatrick A.L. *et al.*, 2007; Vasan R.S. *et al.*, 2008).

Y en tercer lugar, otra vía por la que IGF-1 puede jugar un papel importante en el retraso de los síntomas del envejecimiento es gracias a sus efectos metabólicos, junto con la insulina (Blakesley V.A. *et al.*, 1999). Como se comentó anteriormente, los sustratos intracelulares mejor caracterizados para

los receptores de insulina e IGF-1 son las proteínas IRS (*insulin receptor substrate*) de la 1 a la 4 (White M.F., 1998). Tras la fosforilación de la tirosina, cada uno de estos sustratos se asocia dominios intracelulares de moléculas con homología Src 2 (SH2), generando así señales “corriente-abajo” (cfr. figura 9). Las dos moléculas SH2 más importantes en este punto son la molécula adaptadora Grb2 y la enzima PI3-Kinasa (Skolnik E.Y. *et al.*, 1993; Cheatham B. *et al.*, 1994). Grb2 es el encargado de vincular la acción de la insulina a la vía Ras-MAPK, estimulando el crecimiento y la diferenciación celular.

PI3-Kinasa, por su lado, es responsable de las acciones similares a la insulina de diversas hormonas, mediante la activación de Akt/proteín-kinasa B (PKB) y proteín-kinasa C (PKC), lo que posteriormente conduce a la activación de p70S6K y glucógeno sintasa kinasa-3 (GSK-3) (Cheatham B. *et al.*, 1994). Esto, termina eventualmente con la estimulación de la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas, así como en la translocación del transportador de glucosa a la membrana plasmática con un aumento en el transporte de glucosa (Kohn A.D. *et al.*, 1996). Es importante destacar que, Akt/PKB también fosforila factores de transcripción de la subfamilia FOXO, y esto conduce a su inactivación y la retención en el citoplasma (Zhang X. *et al.*, 2002; Van Der Heide L.P. *et al.*, 2004), resultando en una reducción de la actividad transcripcional (Hribal M.L. *et al.*, 2003). Como paso final, dependiendo de la naturaleza de la señal de activación, FOXO puede regular la apoptosis (Gilley J. *et al.*, 2003), el ciclo celular (Martinez-Gac L. *et al.*, 2004), la diferenciación (Hribal M.L. *et al.*, 2003), la expresión de genes implicados en la reparación del ADN (Tran H. *et al.*, 2002) y la resistencia al estrés oxidativo (Brunet A. *et al.*, 2004).

Además, la sensibilidad a la insulina disminuye normalmente durante el envejecimiento, y la resistencia a la insulina es un factor de riesgo bien establecido para una gran variedad de enfermedades que afectan a la morbilidad y la mortalidad en la ancianidad, incluyendo la hipertensión, la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas (Reaven G.M., 1988; DeFronzo R.A. y Ferrannini E., 1991; Facchini F.S. *et al.*, 2001; Umegaki H., 2012; Bosco D. *et al.*, 2012). En nuestro grupo, hemos demostrado que la administración subcutánea de dosis bajas de IGF-1

restauraban los niveles circulantes de IGF-1, lo que mejora la resistencia a la insulina y el metabolismo de los lípidos en ratas de edad avanzada (García-Fernández M. *et al.*, 2008), convirtiéndose así en un potencial agente beneficioso para prevenir la aparición de patologías relacionadas con la resistencia insulínica.

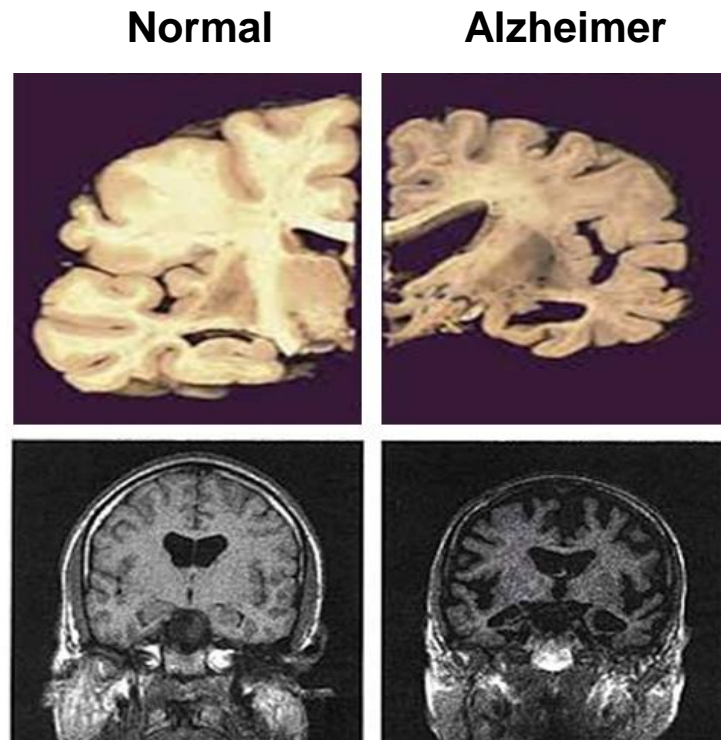
Como se comentó anteriormente, envejecimiento y longevidad son conceptos diferentes. Y esto es también evidente lo que se refiere a la función de IGF-1. A pesar de todos los efectos beneficiosos de IGF-1 descritos hasta ahora y los que serán expuestos a continuación (en relación con patologías derivadas del envejecimiento, como musculoesqueléticas, neurodegenerativas, cardiovasculares, etc.), IGF-1 ha sido paradójicamente relacionado de forma negativa con la esperanza de vida (Rincon M. *et al.*, 2004; Longo V.D., 2009), probablemente debido, al menos en parte, a Akt y sus interacciones con FOXO, mTOR y SIRT-1, entre otros (Tang B.L., 2006; Barzilai N. *et al.*, 2012). Estos resultados exigen mucho más trabajo para aclarar las acciones aparentemente contradictorias de IGF-1 sobre el envejecimiento y la longevidad.

#### **I.2.4.1. Enfermedades neurodegenerativas.**

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de trastornos de etiología prácticamente desconocida, que finalmente conducen a la degeneración y la disfunción neuronales. Como se comentó anteriormente, puesto que el eje GH/IGF-1 está implicado en muchos aspectos del desarrollo crecimiento y función cerebrales, su disminución progresiva durante el envejecimiento podría estar implicada en una variedad de enfermedades humanas cerebrovasculares, comprendiendo tanto a la enfermedad de Alzheimer (EA), la demencia vascular (DV), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y el accidente cerebrovascular (ACV).

La enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular son las formas más comunes de demencia en personas de edad avanzada (Gasperi M. y Castellano A.E., 2010). Una disminución en los niveles de IGF-1 en EA y DV ha sido ampliamente documentada, hecho que podría estar relacionado con el desarrollo de los ovillos neurofibrilares, metabolismo anormal de  $\beta$ -amiloide,

fosforilación aberrante de Tau, pérdida cognitiva, inflamación neural, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Carro E. *et al.*, 2002; Torres-Aleman I., 2007).



**Figura 13.** *Diferencias macroscópicas entre un cerebro normal y uno con Enfermedad de Alzheimer.*

Específicamente, IGF-1 ha sido propuesto como un regulador fisiológico de los niveles de amiloide del cerebro (Carro E. *et al.*, 2002) por la producción/entrada a través de la barrera hemato-encefálica de diferentes proteínas implicadas en el transporte de  $\beta$ -amiloide, que finalmente mejoran su flujo de salida de cerebro (Carro E. *et al.*, 2002 y 2006). De hecho, el bloqueo de la acción del IGF-1 sistémico en el plexo coroideo fue suficiente para inducir amiloidosis cerebral (Carro E. *et al.*, 2006).

Otra característica neuropatológico bien reconocido en la EA es la anormal acumulación de Tau en su forma hiperfosforilada en neuronas que se están degenerando (Torres-Aleman I., 2007). Basándonos en la conocida función de la insulina y el IGF-1 como inhibidores de la fosforilación de Tau mediante la inhibición de una Tau-kinasa principal, como es la glucógeno

sintasa kinasa-3 $\beta$ , numerosas investigaciones demostraron que IGF-1 controla los niveles de Tau hiperfosforilada en el cerebro (Cheng C.M. *et al.*, 2005; Carro E. *et al.*, 2006).

Otros dos procesos patológicos subyacentes en el deterioro neuronal en la enfermedad de Alzheimer están ganando protagonismo: el estrés oxidativo y la inflamación (Akiyama H. *et al.*, 2000; Miranda S. *et al.*, 2000). Una vez más, los efectos anti-inflamatorios y anti-oxidantes de IGF-1, junto con su capacidad anti-apoptótica, respaldan a IGF-1 como un candidato adecuado para el tratamiento de la EA. Así, aunque son necesarios más trabajos en modelos animales, la evidencia disponible indica claramente que la terapia con IGF-1 en de la enfermedad de Alzheimer podría combatir los procesos etiopatogénicos y ser un potencial candidato para ensayos clínicos.

Por otro lado, la esclerosis lateral amiotrófica es el trastorno de la motoneurona más común en adultos. En esta patología, los niveles de IGF-1 divergen entre los distintos estudios, desde mayores a menores concentraciones (Kerkhoff H. *et al.*, 1994; Corbo M. *et al.*, 2010; Lunetta C. *et al.*, 2012), probablemente debido a las diferencias en cuanto al origen muestras (suero, líquido cefalorraquídeo, médula espinal, musculoesquelético) y podría explicarse como un mecanismo de defensa fisiológico promovido en respuesta a la degeneración neuronal y/o la atrofia muscular. Los efectos beneficiosos de IGF-1 en el tratamiento de la ELA se han demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, postulando a IGF-1 como un factor importante para el mantenimiento y la supervivencia de las neuronas motoras en la médula espinal mediante la activación de vías clave como Akt/PI3-Kinasa y MAPK p44/42 (Ozdinler P.H. y Macklis J.D., 2006), y la disminución del efecto superóxido (Xiao Q. *et al.*, 2007). Basándose en la solidez de las pruebas pre-clínicas, se realizaron dos ensayos aleatorios, doble ciego, controlados con placebo, de fase III para examinar la eficacia de rhIGF-1 en el tratamiento de la ELA (Lai E.C. *et al.*, 1997; Borasio G.D. *et al.*, 1998); sin embargo, los resultados de estos dos ensayos son conflictivos, concluyéndose que se requieren estudios más complejos para dilucidar el potencial papel de IGF-1 en la esclerosis lateral amiotrófica.

El accidente cerebrovascular es actualmente la segunda causa de muerte en el mundo occidental, situándose después de las enfermedades cardíacas y delante del cáncer (Donnan G.A. *et al.*, 2008), y los expertos predicen que es probable que sea pronto la causa más común de muerte en todo el mundo (Murray C.J. *et al.*, 1997). Los estudios sobre pacientes con accidente cerebrovascular isquémico sugieren que altos niveles circulantes de IGF-1 se asocian con una recuperación neurológica y un mejor resultado funcional (De Smedt A. *et al.*, 2011), probablemente debido a sus efectos neuroprotectores y pro-angiogénicos. De hecho, el aumento de la mortalidad cerebrovascular en pacientes con hipopituitarismo fue documentado a finales del siglo pasado (Bulow B. *et al.*, 1997).

Es importante destacar que, a medida que el sistema nervioso envejece, se acompaña de una rarefacción de la microvasculatura (definida como un reducido número y una corta longitud de los vasos en un determinado volumen de tejido) en diferentes regiones del cerebro, así como alteraciones en la estructura de los vasos restantes, que han sido causalmente vinculados a la disfunción cognitiva en los ancianos (Sonntag W.E. *et al.*, 1997 y 2000). Esta rarefacción microvascular relacionada con la edad contribuye a una disminución en el flujo sanguíneo cerebral regional que reduce el aporte metabólico requerido para la señalización neuronal, especialmente cuando la actividad neuronal es alta.

Es de gran interés el resultado que Lopez-Lopez C. y cols. publicaron acerca de la infusión de IGF-1, que logró promover un aumento significativo (~40%) de la densidad microvascular en el cerebro del ratón adulto, a través de la estimulación de HIF-1 $\alpha$  y su efector VEGF (Lopez-Lopez C. *et al.*, 2004).

Por otro lado, tanto la menopausia como la resistencia a la insulina han sido independientemente implicadas en la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Gonzalez C. *et al.*, 2008). Varios estudios han apuntado a la activación de PI3-Kinasa como un evento crucial para mediar los efectos del estradiol, una vía común para IGF-1 e insulina (Gonzalez C. *et al.*, 2008). Por lo tanto, parece posible que los receptores de estrógenos alfa pudieran

interactuar con las vías de señalización de IGF-1/insulina, para promover efectos neuroprotectores en el cerebro.

Las investigaciones actuales también ponen de manifiesto la función ejercida por otras moléculas de señalización clave, tales como la glucógeno sintasa quinasa-3 y la  $\beta$ -catenina, en la interrelación existente entre los receptores de estrógenos y de IGF-1 en las células neuronales (García-Segura L.M. *et al.*, 2010).

Tanto la cognición como la memoria también decaen con la edad, y ambas se han correlacionado con bajas concentraciones de IGF-1 (Ozdemir D. *et al.*, 2012; Fernández A.M. y Torres-Aleman I., 2012; Müller A.P. *et al.*, 2012; Gong X. *et al.*, 2012), a través de un mecanismo propuesto que podría incluir su papel en la angiogénesis y la neurogénesis en el hipocampo. Curiosamente, el cilostazol, un inhibidor de la fosfodiesterasa utilizado en el tratamiento de la enfermedad vascular periférica, es capaz de mejorar la función cognitiva en ratones al incrementar la producción de IGF-1 en el hipocampo a través de la estimulación de neuronas sensitivas (Zhao J. *et al.*, 2010).

#### **1.2.4.2. Enfermedades cardiovasculares (ECV).**

Las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la principal causa de muerte en el mundo desarrollado, aunque en las últimas dos décadas, las tasas de mortalidad cardiovascular han disminuido en países de altos ingresos. Al mismo tiempo, la evolución de las enfermedades y muertes cardiovasculares han aumentado a un ritmo sorprendentemente rápido en los países de bajos y medios ingresos, debido al aumento de la obesidad, el sedentarismo y los hábitos poco saludables (DeFronzo R.A. y Ferrannini E., 1991).

En los últimos años, se han correlacionado bajos niveles circulantes de IGF-1 con un mayor riesgo de ECV en los seres humanos (Rosen T. y Bengtsson B.A., 1990; Laughlin G.A. *et al.*, 2004; Conti E. *et al.*, 2004; Sesti G. *et al.*, 2005; Ungvari Z. y Csiszar A., 2012). En estudios transversales, la deficiencia de IGF-1 circulante se asoció con la enfermedad coronaria, documentada angiográficamente (Spallarossa P. *et al.*, 1996), así como con la

capacidad de predecir la cardiopatía isquémica fatal (Laughlin G.A. *et al.*, 2004), con un aumento significativo del riesgo de padecer insuficiencia cardiaca isquémica y apoplejía congestiva en pacientes de edad avanzada (Vasan R.S. *et al.*, 2003; Johnsen S.P. *et al.*, 2005), así como con un peor pronóstico en la recuperación tras un infarto agudo de miocardio (Conti E. *et al.*, 2001). Además, se encontró una correlación positiva entre los niveles circulantes de IGF-1 y, tanto el flujo de reserva coronaria (Galderisi M. *et al.*, 2002), como las puntuaciones de buen envejecimiento cardiovascular entre los centenarios sanos (Paolisso G. *et al.*, 1997).

Los datos disponibles procedentes de ratones transgénicos con deficiencia de IGF-1 hepático, aclararon que la deficiencia de IGF-1 *per se* puede promover el desarrollo de un fenotipo de envejecimiento cardiovascular acelerado. En concreto, la contractilidad de los miocitos cardíacos se ve significativamente afectada (Li Q. *et al.*, 2008; Bailey-Downs L.C. *et al.*, 2012), junto con una respuesta hipertrófica compensatoria deficiente tras una constricción aórtica experimental (Bailey-Downs L.C. *et al.*, 2012). Este modelo animal también mostró una desregulación de las respuestas antioxidantes dependientes de Nrf2 en el sistema vascular, lo que promovió el desarrollo de marcada disfunción endotelial y apoptosis endotelial en presencia de un elevado estrés oxidativo (Bailey-Downs L.C. *et al.*, 2012), imitando el fenotipo que acontece durante el envejecimiento.

Del mismo modo, una estrategia complementaria mostró que en ratones de edad avanzada, donde los niveles de IGF-1 están disminuidos, la sobreexpresión cardíaca de IGF-1 mejoró significativamente la función contráctil de los miocardiocitos (Li Q. *et al.*, 2007b), atenuando el estrés oxidativo mediado por el daño a la proteínas, normalizando la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , revirtiendo las alteraciones en la expresión de proteínas pro-apoptóticas relacionadas con la edad y disminuyendo la tasa de apoptosis (Li Q. *et al.*, 2007a).

Asimismo, se ha publicado recientemente la importancia que la producción local de IGF-1 también tiene, al demostrarse su papel paracrino en la vasoprotección y cardioprotección (Vinciguerra M. *et al.*, 2010), y su



contribución para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la microvasculatura. Sin embargo, la producción vascular paracrina de IGF-1 no es capaz de compensar la deficiencia de IGF-1 circulante (Ungvari Z. *et al.*, 2010a).

Los efectos beneficiosos del sistema IGF-1/IGF-1R en las células progenitoras cardíacas también están comenzando a ser documentadas. Debido a su gran potencial, este es un nuevo campo que merece más reconocimiento y estudio. La reciente identificación de una subpoblación de células madre cardíacas que expresan IGF-1R y secretan IGF-1 de forma autocrina con un potencial terapéutico para la regeneración miocárdica (Torella D. *et al.*, 2004; Urbanek K. *et al.*, 2005), puede ser un paso importante en esta dirección. Entre otras, las acciones de IGF-1 sobre las células madre cardíacas incluyen efectos antioxidantes, un incremento de actividad de la telomerasa con retraso de la senescencia replicativa (Torella D. *et al.*, 2004), y la modulación de la migración y el hospedaje de las células madre cardíacas, facilitando la neovascularización en corazones con daño (Urbanek K. *et al.*, 2005).

El envejecimiento está asociado con alteraciones funcionales y fenotípicas de la microcirculación, incluyendo la disfunción endotelial, estrés oxidativo, la inflamación crónica de bajo grado y la rarefacción microvascular (Ungvari Z. *et al.*, 2010b). Nuestra comprensión actual es que ambos, tanto los niveles circulantes de IGF-1 como los de producción local, contribuyen al mantenimiento de la integridad funcional y estructural de la microcirculación, aumentando la biodisponibilidad de óxido nítrico, disminuyendo las especies reactivas de oxígeno (EROs), y ejerciendo efectos anti-apoptóticos, anti-inflamatorios y pro-angiogénicos. Los mecanismos por los que IGF-1 revierte y/o impide la rarefacción microvascular y mejora el suministro sanguíneo tisular son probablemente multifactoriales, y pueden implicar, entre otros: 1) Apoptosis, ya que el IGF-1 inhibe el estrés oxidativo inducido la apoptosis por preservar la integridad funcional de los la mitocondria (Puche J.E. *et al.*, 2008; Li Y. *et al.*, 2009), 2) Angiogénesis, debido al conocido efecto pro-angiogénicos de IGF-1, induciendo la proliferación de las células endoteliales microvasculares en cultivo a través de HIF-1 $\alpha$  y VEGF (Rivard A. *et al.*, 1999), 3) Renovación de células endoteliales, ya que se observó que el deterioro de

las células progenitoras endoteliales dependiente de la edad se restauraba mediante el aumento de los niveles circulantes de IGF-1 (mediada por la GH) (Thum T. *et al.*, 2007), y 4) Estrés oxidativo y biodisponibilidad de NO, puesto que el estrés oxidativo relacionado con la edad y la inactivación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) pueden alterar la biodisponibilidad de NO (Csiszar A. *et al.*, 2002), es probable que esto contribuya a la disminución de la densidad microvascular. Estos hechos se han confirmado en modelos animales de deficiencia de IGF-1, quienes presentan a menudo un aumento de la producción de EROs y una disminución de la biodisponibilidad de NO, imitando el fenotipo de envejecimiento vascular (Csiszar A. *et al.*, 2008). Merece la pena subrayar que el tratamiento de ratas de edad avanzada con IGF-1 propició una mayor actividad eNOS y una mejora de la biodisponibilidad de NO (Cittadini A. *et al.*, 2009). Por otro lado, experimentos *in vitro* con cultivos de células endoteliales demostraron que el tratamiento con IGF-1 redujo la producción de EROs al mismo tiempo que incrementaba la actividad de eNOS (Csiszar A. *et al.*, 2008).

Desde diversos ámbitos se ha postulado que la mayoría de estos eventos cardiovasculares relacionados con bajos niveles de IGF-1 pueden ser debidos a una posible resistencia a la insulina y la aterosclerosis acelerada (Clemmons D.R. *et al.*, 2007). Además, la disfunción endotelial y deposición de lipoproteínas subintimal son, con frecuencia, consecuencia del estrés oxidativo (Higashi Y. *et al.*, 2010) y de la actividad de las células inflamatorias (Ross R., 1999). En este contexto, los efectos anti-oxidantes y anti-inflamatorios de IGF-1 han demostrado ser capaces de reducir la carga aterosclerótica, regulando principalmente tanto la respuesta de citoquinas (atenuando las respuestas pro-inflamatorias de IL-6 y TNF- $\alpha$ ) (Jeschke M.G. *et al.*, 2000) como la actividad de eNOS (Cittadini A. *et al.*, 2009).

#### **I.2.4.3. Síndrome metabólico.**

El síndrome metabólico se define como una combinación de características clínicas que predisponen a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, morbilidad y mortalidad (*National Cholesterol Education*

*Program*, 2002). En algunas poblaciones, está presente en aproximadamente el 50% de los adultos (Akanji A.O. y Smith R.J., 2012). Se piensa que un factor importante para su etiología es la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria acompañante (Akanji A.O. y Smith R.J., 2012).

Aunque sin consenso total, se han propuesto seis componentes clave para constituir el síndrome metabólico (*National Cholesterol Education Program*, 2002): obesidad abdominal (o perímetro abdominal), dislipemia aterogénica (hipertrigliceridemia y bajas concentraciones de colesterol de lipoproteínas de alta densidad), aumento de la presión arterial, resistencia a la insulina con intolerancia a la glucosa, estado pro-inflamatorio (elevada proteína C reactiva) y pro-trombótico (con aumento del activador del plasminógeno-1 y fibrinógeno).

Por otro lado, las similitudes entre insulina e IGF-1 (homología molecular, receptores compartidos, etc.) apuntan a la posibilidad de que IGF-1 pudiera participar en la expresión fenotípica de este trastorno (Akanji A.O. y Smith R.J., 2012). Los altos niveles de insulina podrían probablemente inducir una supresión de la producción de IGF-1 (tanto hepático como de otros tejidos), como un mecanismo homeostático de compensación, inducida posiblemente a través de una modulación diferencial de la producción de IGFBPs. Esto podría ser la causa de los bajos niveles de IGF-1 encontrados en asociación con estados de resistencia a la insulina, como el síndrome metabólico (Akanji A.O. y Smith R.J., 2012).

La capacidad de IGF-1 para suprimir la liberación de insulina (a través de la somatostatina) (Le Roith D., 1997), ha sido probada en la *diabetes mellitus* (DM). En la DM tipo 1, donde los niveles de IGF-1 e IGFBP-3 están reducidos (Bideci A. *et al.*, 2005), la terapia sustitutiva con rhIGF-1/IGFBP-3 mejora el metabolismo proteico (Simpson H.L. *et al.*, 2004) e hidrocabonado mediante el control de la producción endógena de glucosa y la captación de glucosa periférica (Saukkonen T. *et al.*, 2006). En pacientes diabéticos tipo 2, el tratamiento combinado con rhIGF-1 puede reducir significativamente los niveles de glucosa y los requerimientos de insulina (Clemmons D.R. *et al.*, 2000) al tiempo que mejora la tolerancia a la glucosa, la hiperinsulinemia y la

hipertrigliceridemia (Kolaczynski J.W. y Caro J.F., 1994). Incluso en sujetos no diabéticos, rhIGF-1 mejora la sensibilidad a la insulina, inhibe la lipólisis, aclara la lipemia postprandial y aumenta el metabolismo oxidativo y no oxidativo de la glucosa (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 1997a; Paolisso G. *et al.*, 1999; Schini-Kerth V.B., 1999).

La mayor prevalencia de resistencia a la insulina y síndrome metabólico en personas de edad avanzada (en comparación con poblaciones jóvenes), también puede ser atribuible, al menos en parte, a la disminución de las concentraciones (tisulares y plasmáticas) de IGF-1 (Paolisso G. *et al.*, 1999; Garcia-Fernandez M. *et al.*, 2008). Esta reducción de los niveles de IGF-1 se asociaron con la intolerancia a la glucosa, diabetes, obesidad abdominal (Conti E. *et al.*, 2002; Gomez J.M. *et al.*, 2003) y dislipidemia aterogénica (Rasmussen M.H. *et al.*, 1995; Twickler M.T. *et al.*, 2003).

En general, estos datos sugerirían un papel importante e independiente para IGF-1 en la protección contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. De hecho, muchos de los factores de riesgo tradicionales de ECV, incluyendo las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (Scheidegger K.J. *et al.*, 2000), la hiperlipidemia (hipercolesterolemia o dislipidemia mixta) (Malik J. *et al.*, 2008), la resistencia a la insulina (Conti E. *et al.*, 2002; Gomez J.M. *et al.*, 2003; Twickler M.T. *et al.*, 2003), la diabetes (Sandhu M.S. *et al.*, 2002), la obesidad (Rasmussen M.H. *et al.*, 1995; Gomez J.M. *et al.*, 2003), la elevación de la proteína C reactiva (Efstratiadis G. *et al.*, 2006), la relación cintura-cadera (Gomez J.M. *et al.*, 2003), la reducción del flujo coronario de reserva (Galderisi M. *et al.*, 2002), el tabaquismo (Teramukai S. *et al.*, 2002), la vida sedentaria (Trejo J.L. *et al.*, 2002) y el estrés psicológico (Uden A.L. *et al.*, 2002), quienes actúan al propiciar disfunción endotelial, apoptosis y deterioro de la reactividad vascular, se han asociado con bajos niveles séricos de IGF-1 y de la expresión génica y proteica de IGF-1 e IGF-1R por las células del músculo liso vascular (VSMC) (Scheidegger K.J. *et al.*, 2000). Inicialmente descrito como una molécula pro-aterogénica debido a su papel en la proliferación de las VSMC, posteriormente se demostró que el efecto de IGF-1 en las VSMC era una estrategia para compensar la apoptosis local, y que, en general, IGF-1 no es pro-aterogénico, sino anti-aterogénico (Dandona P. *et al.*, 2003), principalmente

gracias a una mayor producción de óxido nítrico (Schini-Kerth V.B., 1999). Además, IGF-1 induce vasodilatación (Gillespie C.M. *et al.*, 1997; Izhar U. *et al.*, 2000; Galderisi M. *et al.*, 2002), lo que influye en la regulación del tono vascular y la presión sanguínea arterial y la conservación de la reserva coronaria (Gillespie C.M. *et al.*, 1997; Galderisi M. *et al.*, 2002), la función plaquetaria y la absorción de glucosa (Utriainen T. *et al.*, 1997).

Por último, se sugirió recientemente que IGF-1 tiene características importantes para ser un buen marcador de la resistencia a la insulina y el riesgo de enfermedad cardiovascular, ya que los análisis mostraron que cada unidad de aumento de las concentraciones de IGF-1 (en formato logarítmico) se asoció con una reducción del 90,5% del riesgo de padecer síndrome metabólico (Sesti G. *et al.*, 2005).

## **I.2.5. Otras condiciones de deficiencia de IGF-1.**

### **I.2.5.1. Trastornos musculoesqueléticos.**

El envejecimiento se asocia con una disminución de la masa muscular esquelética, a veces referido como "sarcopenia de la vejez". Hay varios mecanismos subyacentes que han sido implicados en esta pérdida muscular relacionada con la edad: disminución de la síntesis de proteínas, reducción de la actividad enzimática (en especial, de las vías glicolítica y glucogenolítica), agotamiento de las reservas de energía, aumento del daño oxidativo y cambios en el contenido de iones (Carmeli E. *et al.*, 2002), entre otros. GH e IGF-1 tienen efectos anabólicos significativos en el músculo esquelético por lo que su disminución con el envejecimiento probablemente contribuye a la disminución de la masa muscular. Por ejemplo, pueden promover mitosis, síntesis de proteínas, proliferación de células satélite y gemación de nervios, al mismo tiempo que previenen de la apoptosis (Florini J.R. *et al.*, 1996; Le Roith D. *et al.*, 2001). Sin embargo, en general, la capacidad de respuesta del tejido a IGF-1 se altera con el envejecimiento. En consecuencia, se publicó que la mediana de los niveles de ARNm de IGF-1 e IGFBP-5 en músculo joven era más de dos veces más alta que la del músculo de personas de edad avanzada

(Dennis R.A. *et al.*, 2008). Además, el envejecimiento está asociado con una disminución del número de receptores de IGF-1 (y de su fosforilación) en el músculo (Li M. *et al.*, 2003).

La salud ósea también puede verse comprometida en los vertebrados con una menor señalización del eje GH/IGF-1. Al igual que los músculos, el envejecimiento normal se asocia con cambios cuantitativos y cualitativos en los huesos, incluyendo alteraciones en la arquitectura trabecular, mineralización, contenido proteico y acumulación de microfracturas (Berryman D.E. *et al.*, 2008). IGF-1, que media en la mayoría de los efectos de GH sobre el metabolismo óseo, promueve la condrogénesis y aumenta la formación ósea mediante la regulación de las funciones de los osteoblastos (Bex M. y Bouillon R., 2003; Giustina A. *et al.*, 2008). Además, en los fibroblastos, la síntesis de ADN y la proliferación celular en respuesta a IGF-1 disminuyen con la edad (Sell C. *et al.*, 1993).

La respuesta ósea a IGF-1 también disminuye con la edad, lo que requiere dosis más altas para alcanzar el mismo efecto anabólico (Pfeilschifter J. *et al.*, 1993). Estos estudios sugieren que los bajos niveles circulantes de IGF-1 y/o las anomalías de la señalización de IGF-1 en sujetos de edad avanzada, pueden jugar un papel importante en la sarcopenia relacionada con la edad y la osteopenia, donde el tratamiento sustitutivo con IGF-1 puede ser una estrategia terapéutica adecuada (aunque esta aparente resistencia a IGF-1 puede amortiguar su función).

### **I.2.5.2. Enfermedades renales.**

Como se comentara anteriormente, IGF-1 está involucrado en el desarrollo del riñón normal, y la desregulación de este sistema relacionado con la edad y puede jugar un papel crucial en las enfermedades renales y vasculares, incluyendo hipertensión (Bach L.A., 2012). Además, en condiciones de disfunción renal acontecen profundos cambios en lo referente a las respuestas renales al eje GH/IGF-1, así como en las concentraciones circulantes de estas hormonas, a pesar de que el complejo ternario IGFBP-

3/ALS/IGF-1 apenas atraviesa la barrera glomerular en individuos sanos, por lo que no contribuye a su eliminación (Hirschberg R. y Adler S., 1998).

En ratones con inactivación global del gen *Igf-1*, el proporcional reducido tamaño renal se asocia con un menor tamaño glomerular y una disminución del número de nefronas (Rogers S.A. *et al.*, 1999). Además, IGF-1 tiene efectos rápidos sobre la hemodinámica renal, incluyendo un aumento del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular (Martin A.A. *et al.*, 1991; Hirschberg R., 1996; Bach L.A., 2012). Por otro lado, tanto IGF-1 como IGF-1R se expresan en los glomérulos en desarrollo y sus patrones de expresión se ven alterados en modelos animales y ejemplos humanos de enfermedad renal (Bridgewater D.J. *et al.*, 2008). De hecho, se demostró el papel de la señalización de IGF-1 para mantener la integridad glomerular, restaurando las anomalías de los podocitos e inhibiendo su apoptosis, y recuperando las alteraciones en la membrana basal glomerular y la capa adyacente de células endoteliales (Bridgewater D.J. *et al.*, 2005 y 2008).

En los seres humanos, IGF-1 también aumenta el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtrado glomerular un ~25%, y propicia expansión de volumen y retención de sodio por una acción directa sobre los túbulos renales, estimulando la liberación de renina y la supresión de la secreción del péptido natriurético auricular (Flyvbjerg A., 2000). Cuando se administra IGF-1 a ratas con deficiencia de GH (o a los pacientes con defectos del receptor de GH), normaliza la baja tasa de filtrado glomerular como lo hace la terapia sustitutiva con hormona de crecimiento en la deficiencia de GH. Curiosamente, los efectos de la GH sobre la función renal son similares a los observados con IGF-1, con la excepción de que la respuesta funcional a GH se retrasa durante varios días, correlacionándose con un aumento secundario de IGF-1 en suero, indicando por tanto que los efectos de GH están mediados por IGF-1. Sin embargo, es de destacar la existencia de receptores de GH en el túbulo proximal, un sitio donde el ARNm de IGF-1 no se expresa normalmente, lo que sugiere que la GH también pueden tener acciones directas sobre la función tubular (Flyvbjerg A., 2000).

### **I.3. DAÑO OXIDATIVO CELULAR Y ENFERMEDAD.**

#### **I.3.1. Radicales libres y daño oxidativo celular y tisular.**

La relación entre radicales libres y el daño oxidativo celular y tisular fue descrita por primera vez por Denham Harman hace casi 50 años, al proponer el envejecimiento sería el resultado de una inadecuada protección contra el daño producido en los tejidos por los radicales libres (Harman D., 1956, 1973, 1992 y 2006). Vivimos en una atmósfera oxigenada, y por lo tanto oxidante. El oxígeno ambiental promueve el metabolismo celular, produciendo energía a través de la cadena respiratoria (enzimas mitocondriales). La mayor parte de los radicales libres son producidos por la mitocondria puesto que la utilización y manejo del O<sub>2</sub> no es perfecto. Los radicales libres se forman pues, cuando la maquinaria productora de energía de las mitocondrias usa el oxígeno y los nutrientes para sintetizar ATP, la molécula que aporta el combustible para la mayoría de las actividades celulares. Esos radicales atacan, y quizás lesionan para siempre, la propia maquinaria y el ADN mitocondrial que es necesario para construir partes de dicho mecanismo, pudiendo dañar también otros componentes mitocondriales y celulares (Gadaleta M.N. *et al.*, 1998; Wei Y.H. y Lee H.C., 2002; Troen B.R., 2003).

La teoría sugiere que, con el tiempo, el daño acumulado en las mitocondrias comporta la caída de síntesis de ATP e insta a una mayor producción de radicales libres, acelerando así la destrucción de los componentes celulares. A medida que se les va privando de energía y dañando, las células se desenvuelven peor. En consecuencia, los tejidos que forman y el organismo entero empiezan a fallar. A pesar de la existencia de sistemas antioxidantes en el organismo capaces de hacer frente a los radicales libres, numerosos estudios demuestran que existe un desbalance entre prooxidantes y defensas antioxidantes que aumenta con la edad (Beckman K.B. y Ames B.N., 1998; Liu J. y Mori A., 1999). Sin embargo, estos estudios llevan a cuestiones tales como si existe correlación entre el declive en estas defensas y el incremento en el daño oxidativo (Beckman K.B. y Ames B.N., 1998; Albano E., 2006).



La evidencia del importante papel que tienen los radicales libres y los sistemas antioxidantes en el envejecimiento ha llevado a estudiar el posible control sistémico de estas enzimas y, quizás, del envejecimiento. Un posible modulador de la actividad de los sistemas antioxidantes es el cerebro, que consume un 20% del oxígeno total captado, pero tiene la menor protección frente los radicales libres, altas concentraciones de ácidos grasos insaturados fácilmente oxidables y un limitado potencial de regeneración (Halliwell B., 2001; Toescu E.C., 2005). Aunque estudios realizados en cerebro completo de ratón demuestran una clara disminución en la actividad de algunas enzimas antioxidantes (Cardozo-Pelaez F. *et al.*, 2000; Grandjean V. *et al.*, 2000; Leutner S. *et al.*, 2001), los resultados de otros estudios realizados en núcleos de cerebro de rata -plexos coroideos y capilares- muestran que no hay tal disminución de actividad en estas regiones, sino que la actividad de las enzimas se mantiene o incluso es mayor, sobre todo en los plexos coroideos, mientras que en cerebelo y el resto de tejido cerebral sí se observa una disminución (Tayarani I. *et al.*, 1989). La interpretación de estos resultados sugiere que estos tejidos formadores podrían tener una mayor capacidad de protección al daño por radicales libres que los tejidos de formación posterior (Tayarani I. *et al.*, 1989).

Por otro lado, dado que los radicales libres son moléculas inestables y altamente reactivas (con uno o más electrones no apareados), que producen daño a su alrededor a través de reacciones oxidativas, se cree que podrían causar alteraciones en los cromosomas y en ciertas macromoléculas como colágeno, elastina, mucopolisacáridos, lípidos, lipofucsina ("pigmento del envejecimiento"), etc. Además, se ha encontrado una buena correlación entre los niveles celulares de superóxido dismutasa (enzima de acción antioxidante) y la longevidad de diferentes primates (Tolmasoff J.M. *et al.*, 1980).

En relación con los estudios sobre restricción calórica, existe gran controversia entre ellos, y en cuanto a las vías intracelulares implicadas. Aquellos que han mostrado un aumento en la longevidad de ratas, postulan que sería debido a una menor producción de radicales libres. Pero, por otro lado, no hay estudios que hayan demostrado que animales sometidos a dietas ricas en antioxidantes logren aumentar su sobrevivencia. Desgraciadamente, faltan

más estudios para lograr comprender más a fondo el rol de los radicales libres en el proceso de envejecimiento.

Lo que sí está claro, es el importante papel que juega el daño producido por la liberación de radicales libres en ciertas patologías relacionadas con el envejecimiento, tales como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, cataratas, enfermedad de Alzheimer, entre otras. Según la evidencia con la que contamos hasta el momento, si logramos disminuir la generación de radicales libres o neutralizamos su daño, lograríamos disminuir estas enfermedades y, por lo tanto, seríamos capaces de prevenir una muerte precoz.

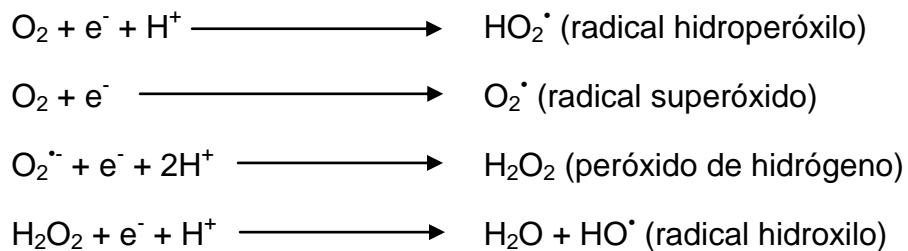
### **I.3.2. Mecanismos del daño oxidativo abocados a la muerte celular.**

Los radicales libres son por definición moléculas o fragmentos moleculares, con existencia independiente, que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo (Halliwell B., 2001; Toescu E.C., 2005). Por tanto, puede tener características catiónicas, aniónicas o neutras. Esta ambigua definición incluye conceptualmente a la mayoría de los iones de metales. De esta forma, se comprende mejor la estrecha relación entre el oxígeno y los iones reactivos. Estos se forman por la pérdida o captación de un electrón o por fisión homolítica de un enlace covalente.

El metabolismo (reducción) del oxígeno genera reactivos intermedios o radicales libres. La completa reducción del oxígeno consiste en la recepción de cuatro electrones que rompen los enlaces que mantienen unidos los dos núcleos; a continuación, capta protones del medio formando dos moléculas de agua. El oxígeno molecular, posee dos átomos con sus electrones formando un enlace covalente, que tiene una afinidad electrónica elevada, pero que está limitada por la restricción del espín. Por esto, es una molécula poco reactiva. Sin embargo, por la acción de algunas enzimas, en reacciones químicas o por agresiones externas, puede reducirse incompletamente en formas intermedias, altamente reactivas y tóxicas (especies reactivas del oxígeno –EROs-) con una semivida biológica del orden de segundos (Sies H, 1993).

En la mitocondria mientras que la mayoría del oxígeno consumido es convertido a agua en el complejo IV, un 1-2% del oxígeno reducido capta electrones directamente y genera iones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (a nivel de la NADH deshidrogenasa o de la coenzima Q) que se pueden convertir en hidroperoxil ( $HO_2^{\cdot}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el altamente reactivo anión hidróxilo ( $HO^{\cdot}$ ). Estos oxidantes químicos son productos derivados del proceso oxidativo (Nohl H., 1994; Kowaltowski A.J. *et al.*, 1999; Liu Y. *et al.*, 2002).

Dentro del término EROs se incluyen además otras moléculas derivadas del oxígeno que no son radicales libres pero sí son altamente reactivas como es el singlete de oxígeno ( $^1\Delta_g O_2$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Halliwell B., 2001).

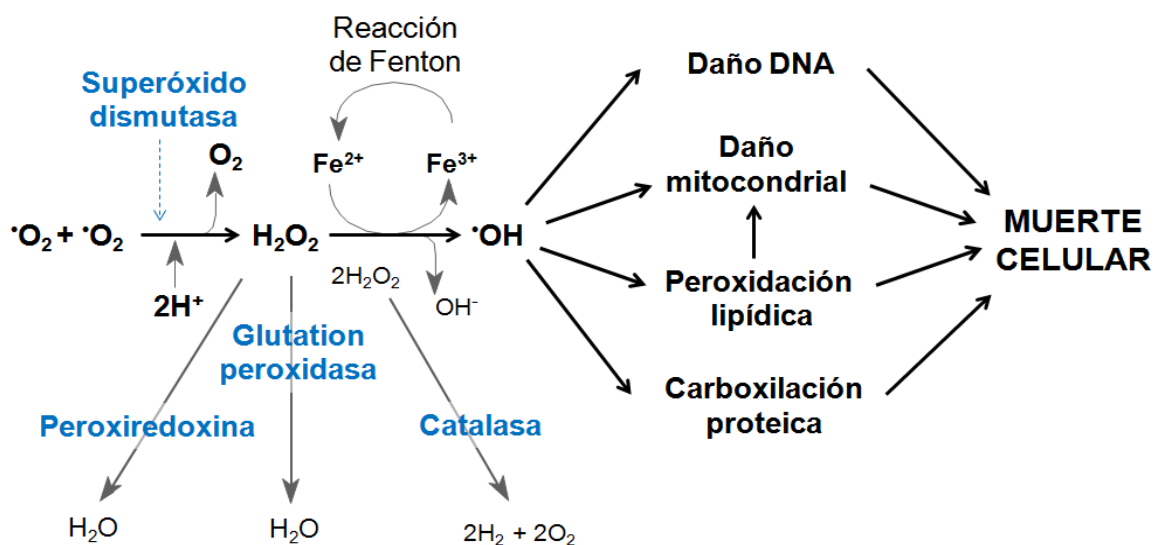


Las especies reactivas del oxígeno y los radicales libres del oxígeno (RLO) se producen también como consecuencia de múltiples procesos fisiológicos (actividad fagocítica, oxidaciones biológicas, actividad de la xantina-oxidasa, envejecimiento, alimentación) y patológicos (hipoxia-reoxigenación, exposición a productos químicos tóxicos, humo, radiaciones ionizantes y solares, aspiración de meconio, etc.). El estrés oxidativo conduce a muchos cambios bioquímicos y es un factor muy importante en enfermedades crónicas humanas como aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares, mutagénesis y cáncer, desordenes neurodegenerativos y envejecimiento (Beckman K.B. y Ames B.N., 1998; Frei B., 1999; Lenaz G., *et al.*, 2002; Melov S., 2002; Wei Y.H. y Lee H.C., 2002). Además, estos radicales libres están relacionados con la inducción de la apoptosis celular (Tatla S. *et al.*, 1999), existiendo un gran número de estudios que asocian la disfunción mitocondrial provocada por las EROs con la necrosis y la apoptosis a través de la activación de proteasas (Kowaltowski AJ *et al.*, 1999; Kowald A., 2001).

Cuando se da un equilibrio entre los RLO y los sistemas antioxidantes, los sistemas celulares no resultan en absoluto dañados. El problema aparece cuando los sistemas antioxidantes no logran eliminar RLO, produciéndose un desequilibrio que desemboca en graves daños a las células y la producción de nuevos radicales libres. Por todo ello, el estrés oxidativo será consecuencia de las relaciones e interacciones entre los tres componentes: generación de oxidantes, protección por los antioxidantes y reparación del daño oxidativo. Los sistemas antioxidantes y los reparadores están inducidos por la oxidación y a su vez pueden ser oxidados. Además la generación de oxidantes puede ser aumentada por las moléculas dañadas.

El daño oxidativo por los radicales libres se produce en las tres principales clases de macromoléculas biológicas: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Beckman K.B. y Ames B.N., 1998; Cardoso S.M. *et al.*, 1999). Además tiene consecuencias letales como son la inducción del estado de transición de la permeabilidad mitocondrial, que participa en los mecanismos de necrosis y apoptosis (Kowaltowski A.J. *et al.*, 1999; Melov S., 2002).

En resumen, el metabolismo del oxígeno puede generar, aún en presencia de enzimas antioxidantes (tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), RLO y EROs que, eventualmente, abocarán a una muerte celular por diversas vías, esquematizadas en la Figura 14.

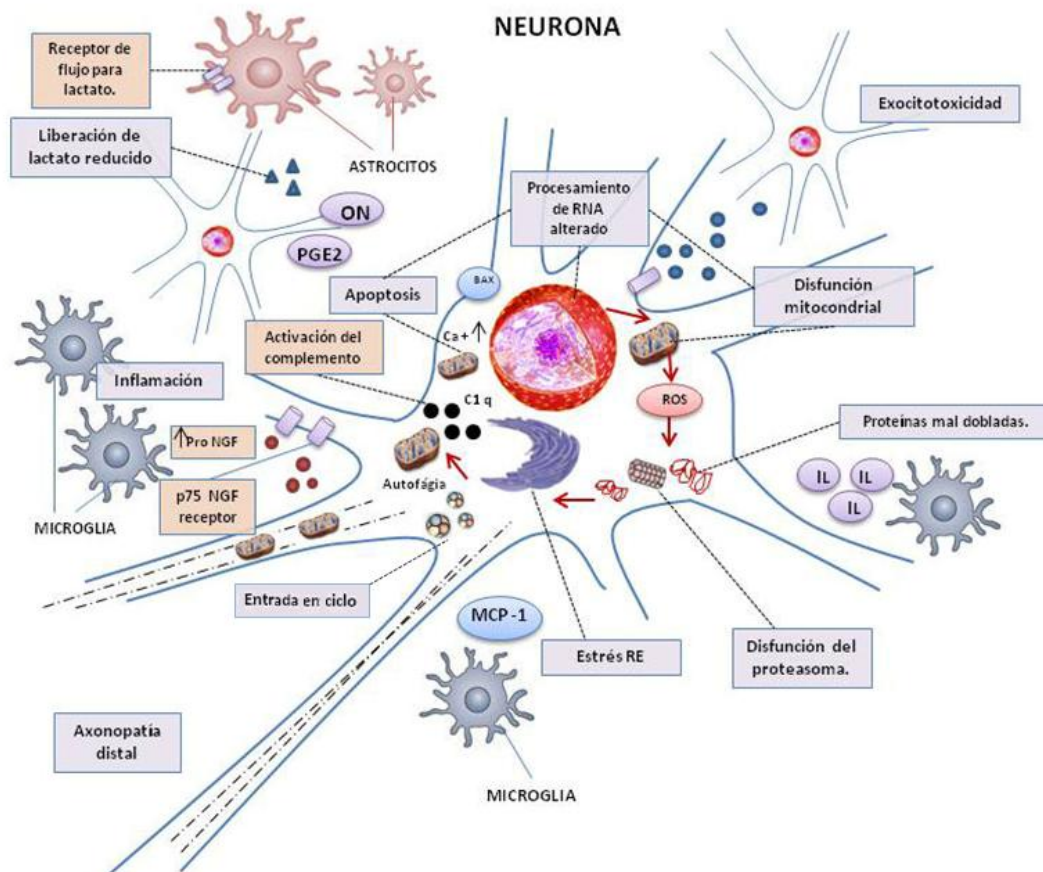


**Figura 14.** Mecanismos celulares del daño oxidativo que promueven la muerte celular. Principales enzimas antioxidantes.

### I.4.3. Estrés oxidativo e inflamación.

El estrés oxidativo y la inflamación son dos eslabones comunes que subyacen en la fisiopatología de prácticamente todas las enfermedades (desde el síndrome metabólico, obesidad, esteatosis, neurodegeneración, necrosis y apoptosis, cáncer), incluido el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 1997; Hotamisligil G.S., 2006; Pérez R. *et al.*, 2008; Puche J.E. *et al.*, 2008; García-Fernández M. *et al.*, 2008).

La inflamación genera estrés oxidativo y el estrés oxidativo promueve la inflamación, estableciendo rutas que se retroalimentan positivamente promoviendo mecanismos fisiopatológicos que son sintetizados en la Figura 15.



**Figura 15.** Interacción celular (astrocitos, microglía, neuronas, etc) en la inflamación a través de citoquinas, NO y prostaglandinas (PGE2). Las neuronas sufren un procesamiento anormal del ARN, que junto con la producción de las EROs, contribuye al plegamiento inadecuado de proteínas. Éstas producen agregados que llevan a la disfunción proteasoma y a la generación de más EROs en el retículo endoplásmico, lo que activa vías de alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, desregulación del calcio, autofagia y apoptosis.

Tras la agresión tisular, los macrófagos y monocitos circulantes, las células endoteliales, plaquetas... sintetizan innumerables moléculas pro- y anti-inflamatorias, pro-fibrogénicas y angiogénicas (IL1, IL6, NO, PDGF, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , EGF, VEGF, etc.) que promueven la reconstrucción del tejido, su regeneración, la apoptosis o la supervivencia celular.

Además de las enzimas anti-oxidantes previamente descritas en la Figura 14, un número importante de enzimas pro-oxidantes median procesos oxidativos. Entre ellas, las más destacadas se sintetizan en la Tabla 1.

Nombre de la enzima	Función	
Mieloperoxidasa (MPO) (EC 1.11.2.2)	Presente en los fagosomas de los neutrófilos y de los monocitos. Es responsable de la actividad microbicida contra un amplio espectro de organismos.	
Peroxidasas (EC 1.11.1.1.7)	Lactoperoxidasa (LPO)	Oxidoreductasa secretada desde diversas glándulas cuya función principal es antibacteriana.
	Eosinofil peroxidasa (EPX)	Presente en los eosinófilos, posee una capacidad oxidante empleada para combatir parásitos.
	Peroxidasa vascular 1 (PXDN)	Cataliza la formación de peróxido de hidrógeno. También está implicada en la consolidación de la matriz extracelular, la fagocitosis y la defensa inmune.
Monoamina oxidasa (MAO) (EC 1.4.3.4)	Catalizan la oxidación de monoaminas y la degradación de neurotransmisores -aminas (serotonina, noradrenalina), con formación de de hidroperóxido. Se encuentran unidas a la membrana externa de la mitocondria en la mayoría de las células del organismo.	
Xantina deshidrogenasa (XDH) (EC 1.17.3.2)	Forma de xantina oxidoreductasa que produce especies reactivas del oxígeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) al catalizar la oxidación de hipoxantina a xantina y, de ésta, a ácido úrico.	

**Tabla 1.** *Enzimas pro-oxidantes que se liberan en la activación de la inflamación y fagocitosis, produciendo daño oxidativo.*

#### **I.4.4. Proteínas de choque térmico y estrés oxidativo.**

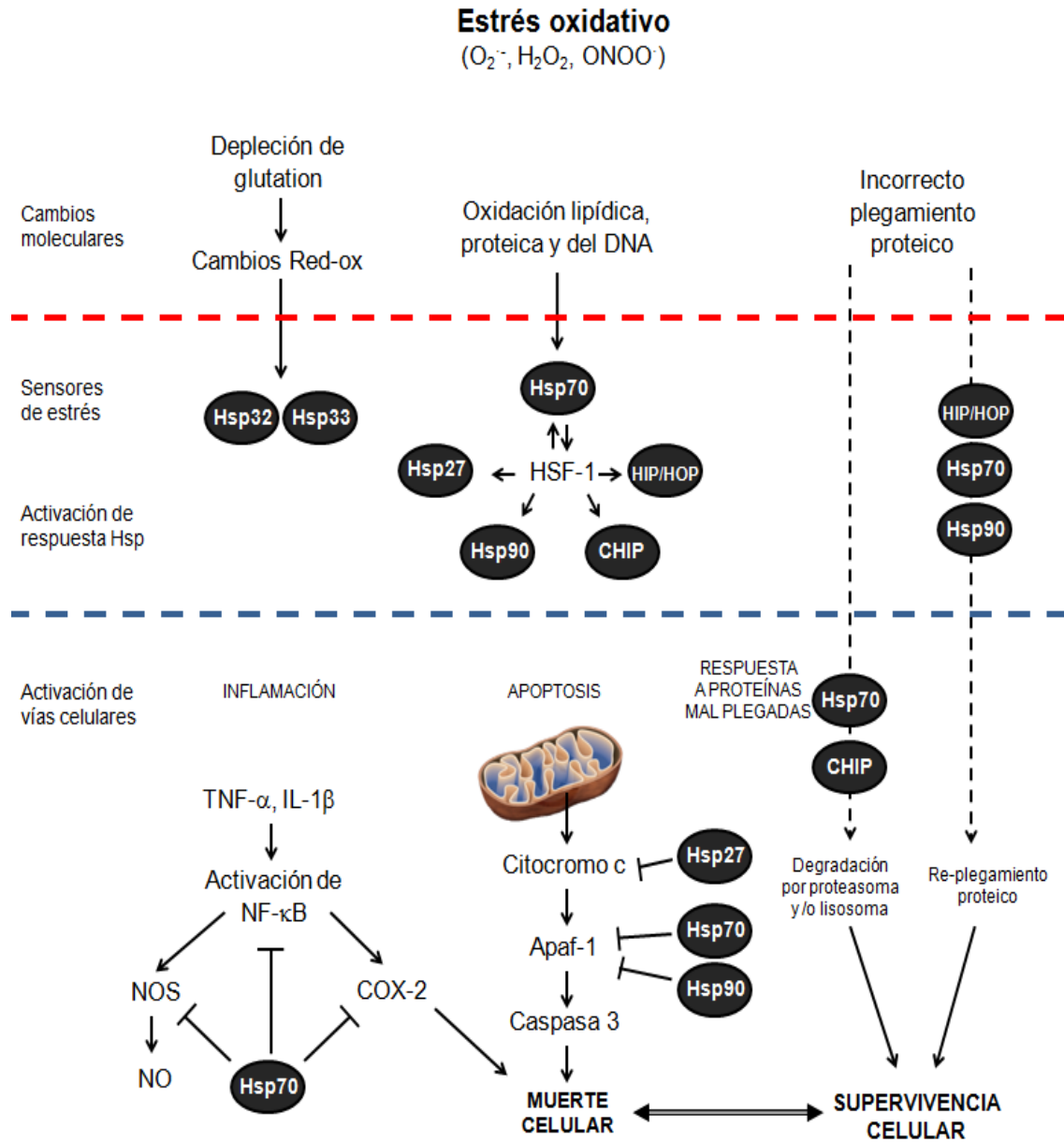
Las proteínas de choque térmico (HSPs), se han estudiado durante muchos años conformando hoy día una gran cantidad de pruebas que demuestran su hiperexpresión en relación con la protección celular y tisular, en una amplia variedad de condiciones de estrés (Kalmar B. y Greensmith L., 2009). En consecuencia, dado que el estrés oxidativo se ha relacionado con un importante número de condiciones patológicas, incluyendo la neurodegeneración, la enfermedad cardiovascular y el accidente cerebrovascular, e incluso juega un papel en el envejecimiento natural, la función de estas chaperonas se antoja crucial para su prevención.

Estas HSPs son proteínas chaperonas altamente conservadas, clasificadas según su peso molecular (Hsp27, Hsp70, Hsp90, etc.) y expresadas en todos los tejidos. Gracias a sus versátiles funciones, las chaperonas pueden intervenir en respuesta a un estrés oxidativo, detectando cambios red-ox intracelulares, en varios niveles. En primer lugar, algunas de las HSPs, en su mayoría miembros de la familia Hsp70, desempeñan un papel crucial en el control de la calidad proteica, previniendo la agregación proteica y dirigiendo proteínas aberrantes al proteasoma o a los lisosomas para su degradación (Mayer M.P. y Bukau B., 2005), mediando así el aclaramiento de estas proteínas dañadas. En los casos en que las proteínas mal plegadas pueden ser rescatadas, la misma maquinaria puede lograr su replegamiento.

Por otra parte, algunas chaperonas, tales como Hsp27, Hsp70 y Hsp90, pueden tener actividad anti-apoptótica al unirse o inhibir componentes de la cascada de la apoptosis (citocromo c, Apaf-1 y caspasa 3), incluso si las vías de muerte celular han sido activadas (Kalmar B. y Greensmith L., 2009).

Por último, algunas HSPs tienen acciones anti-inflamatorias. La respuesta inflamatoria está regulada principalmente por NF- $\kappa$ B (Barnes P.J. y Karin M., 1997). Tras aparecer el estrés oxidativo, NF- $\kappa$ B es translocado al núcleo y activa la transcripción de mediadores inflamatorios tales como iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), interleuquinas inflamatorias y ciclooxigenasa-2 (COX-2).

Sobre todos estos efectores, la chaperona Hsp70 ejerce una inhibición que, eventualmente, conlleva efectos anti-inflamatorios y citoprotectores (Kalmar B. y Greensmith L., 2009). Un resumen de estas acciones protectoras de las chaperonas se muestra en la Figura 16.



**Figura 16.** Papel citoprotector de la respuesta mediada por las HSPs.



Estos mecanismos descritos son relevantes en la fisiología y/o progresión de ciertas enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Por ejemplo, aunque la causa de la mayoría de los trastornos neurodegenerativos es muy específica (afectándose determinadas poblaciones neuronales, lo que resulta en un fenotipo clínico característico), es probable que la mayoría de estos trastornos compartan algunas rutas patogénicas comunes. En concreto, la excitotoxicidad del glutamato, el exceso de producción de especies reactivas del oxígeno que conduce al daño oxidativo, la alteración del transporte axonal, el mal plegamiento de proteínas, la neuroinflamación y la activación de la cascada de la apoptosis han sido implicados en una serie de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. Para algunos de estos trastornos, la generación de modelos transgénicos de ratón ha sido una herramienta experimental útil, no sólo para la investigación de la patogénesis de la enfermedad, sino también para los ensayos preclínicos, en los que se han descrito efectos beneficiosos de las HSPs (Kalmar B. y Greensmith L., 2009).

## **II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

## II.1. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron que la cirrosis hepática es "una condición de deficiencia de IGF-1" y que dosis bajas de esta hormona pueden constituir una verdadera terapia sustitutiva induciendo múltiples efectos beneficiosos en ratas con cirrosis inducida por tetracloruro de carbono, entre los que cabe destacar: mejora del balance nitrogenado (Picardi A. *et al.*, 1997), de la absorción intestinal de azúcares y aminoácidos (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 1999; Pascual M. *et al.*, 2000), de la osteopenia (Cemborain A. *et al.*, 1998), atrofia testicular y recuperación de la barrera hematotesticular (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 2000 y 2004), tono somatostatinérgico (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 2001), además de inducir un efecto hepatoprotector (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 1997), antifibrogénico (Muguerza B. *et al.*, 2001) y con mejoría de la función mitocondrial (Perez R. *et al.*, 2008).

Así mismo, estudios posteriores demostraron que dosis similares de IGF-1 inducían en ratas de edad avanzada (otra condición de deficiencia de IGF-1) un efecto neuro- y hepatoprotector (García-Fernández M. *et al.*, 2008), normalizando la disfunción mitocondrial y disminuyendo la activación de la cascada de las caspasas que presentaban estos animales (Puche J.E. *et al.*, 2008).

Además, las mismas dosis de IGF-2 indujeron efectos neuroprotectores y metabólicos similares a IGF-1 (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 2011), así como sobre la función mitocondrial (García-Fernández M. *et al.*, 2011).

Con el fin de profundizar en los efectos beneficiosos inducidos por la terapia sustitutiva en condiciones de deficiencia de IGF-1, recurrimos a un modelo experimental de "deficiencia parcial de IGF-1", previamente caracterizado por nuestro equipo (Guerra L., 2012; Gago A., 2012; Iturrieta I., 2013) a partir de un modelo de ratones con una deficiencia sistémica de IGF-1 (Igf1tm1Arge) (Liu J.P. *et al.*, 1993).

La hipótesis de nuestro trabajo supone que la sola deficiencia “parcial” de IGF-1 puede ser un factor causal relevante en la fisiopatología de los diversos **síndromes que se asocian con estrés oxidativo e inflamación en el sistema nerviosos central**, que podrían relacionarse con la deficiencia local o sistémica de esta hormona. La disminución de IGF-1 podría alterar la expresión cerebral de genes implicados en el daño oxidativo celular y la respuesta inflamatoria, y podría -quizá- ser normalizada por la administración exógena de IGF-1.

## II.2. OBJETIVOS.

A la luz de los datos previos, el objetivo específico del presente trabajo es ahondar en el estudio de los **mecanismos de neuroprotección**, analizando los siguientes parámetros en encéfalo procedente de ratones controles (WT), con deficiencia parcial de IGF-1 (Hz) y con deficiencia parcial de IGF-1 tratados con dosis bajas de IGF-1 (Hz+IGF-1):

1. Expresión cerebral del gen *Igf1* y su receptor, así como de otros relacionados con el eje GH-IGF-1.
2. Expresión cerebral de IGF-2.
3. Expresión de genes relacionados con el daño oxidativo y las defensas enzimáticas antioxidantes.
4. Expresión de genes relacionados con la protección mitocondrial.
5. Expresión de genes pro- y anti-inflamatorios.
6. Expresión de genes relacionados con la fragmentación del DNA y la muerte celular (necrosis, apoptosis) y la autofagia.
7. Posibles mecanismos neuroprotectores mediados por las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSPs).
8. Análisis *in silico* de ontología génica y rutas funcionales, relacionando los genes modulados por la deficiencia “parcial” de IGF-1 con los implicados en diversas enfermedades neurológicas, inflamatorias e incluso psiquiátricas.

9. Estudio histológico, evaluando la celularidad, y estudio de imagen por resonancia magnética para la obtención de mapas con el Coeficiente de Difusión Aparente (ADC) y la transferencia de campo magnético (MTI)

Para facilitar la esquematización del estudio de la expresión génica que se afronta en el presente trabajo, se resumen en la Tabla 2 los genes y factores implicados en los principales mecanismos.

Enzimas antioxidantes	HSPs	Citoquinas	Marcadores de daño oxidativo	Marcadores de muerte celular
Catalasa	Hspb1(27)	IL1b	Ptgs2 (Cox-2)	Bid
Superóxido dismutasa	Hspbp1 (CHIP)	IL6	Foxo1	Mcl1
Hemo-oxigenasa	Hspa13(70)	IL10	Gadd45	Gab1
Peroxiredoxinas	Hsp90b1	IL10rb	MDA	Fas
Glutation peroxidasa	Hspa2	Tgf $\alpha$		Grb2
	Hspa4	Tgf $\beta$		Parp1
	Hspa5	Cr1f1		Txnl4b
			lfn $\gamma$	XIAP
		Tnfrsf1a		Ulk1

**Tabla 2.** Genes implicados en la respuesta antioxidante enzimática y los mecanismos dependientes de HSPs en la inflamación tisular, estrés oxidativo y muerte celular.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

#### III.1.1. Procedencia y generalidades.

Los animales de experimentación empleados en este estudio (*igf1tm1Arge*) fueron donados por el Prof. Dr. Argiris Efstratiadis (Columbia University, New York, EE.UU.). En resumen, estos ratones transgénicos (*Mus musculus*, fondo genético mixto MF1 y 129sv) constan de una delección selectiva del exón 4 del gen de *Igf1* a nivel sistémico, logrado mediante un sistema Cre-lox con Neomicina (Liu J.P., *et al.*, 1993).

El mantenimiento de las colonias y el desarrollo de los ensayos tuvieron lugar en el Animalario de la Universidad CEU-San Pablo, cuyo número de registro por la Comunidad de Madrid es EX029-UC.

Tras un periodo de adaptación, se iniciaron cruces entre ratones heterocigotos para la delección de *Igf1*, tanto para el mantenimiento de la colonia como para la obtención de animales para experimentación. La frecuencia de aparición de las distintas modalidades genéticas fue: ~55 % de *wild type* (WT, *Igf1<sup>+/+</sup>*), ~43 % de heterocigotos (Hz, *Igf1<sup>+/-</sup>*) y ~2 % de animales *knock out* (KO, *Igf1<sup>-/-</sup>*).



**Figura 17.** Ratones de los distintos grupos experimentales.

WT: *wild type*, Hz: heterocigotos. KO: *Knock out*.

Las condiciones de mantenimiento y la realización de los ensayos en los animales se desempeñó, según la normativa nacional y europea (RD 1201/2005, ley 32/2007 y la directiva europea 86/609/CEE) y con el consentimiento del comité bioético de la Universidad CEU-San Pablo: temperatura de  $22\pm 2$  °C, humedad relativa de  $55\pm 10$  % y ciclos lumínicos de 12 horas de luz artificial y 12 horas de oscuridad. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con agua y dieta irradiada (Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet, Harlan Laboratories, España).

### III.1.2. Caracterización del genotipo de los animales.

La caracterización del genotipo fue llevada a cabo por PCR. El DNA fue extraído de una porción de la cola del ratón como fuera previamente descrito (Hankenson FC, *et al.*, 2008), empleando el kit Extract- N- Amp TM Tissue PCR KIT (Sigma Aldrich, España) y los siguientes cebadores para el termociclador (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler, España):

*Igf1* sense: 5'- GTG TGG ACC GAG GGG CTT TTA - 3',

*Igf1* anti-sense: 5'- TTG GTA GGT GTT TCG ATG TTT TGC - 3',

*Neomicina* sense: 5'- CCA GCT CAG CAA TAT CAC GGG - 3',

*Neomicina* anti-sense: 5'- CCT GTC CGG TGC CCT GAA TGA ACT - 3'.

Y con el siguiente programa de amplificación:

Etapa	Tiempo	Temperatura
Iniciación	6 minutos	94 °C
Separación	1 minuto	94 °C
Anillamiento	1 minuto	60 °C
Alargamiento	1 minuto	72 °C
Alargamiento final	7 minutos	72 °C
Conservación	∞	4 °C

} X30



El ADN amplificado se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón Tris 0,1 M, Ácido bórico 0.09 M y EDTA 0,001 M a pH 8,4, teñido con el intercalante nuclear Gel Red (*Nucleic Acid Gel Stain*, Biogen Científica, España), y se visualizó por UV empleando el colorante trazador Orange G al 1 % (Sigma Co, EE.UU.). Se incluyó un marcador de 100 pb (Sigma) con un rango de 100 a 2.072 pb. La electroforesis se realizó a Voltaje constante (100-110 V) en una cubeta de Bio-Rad.

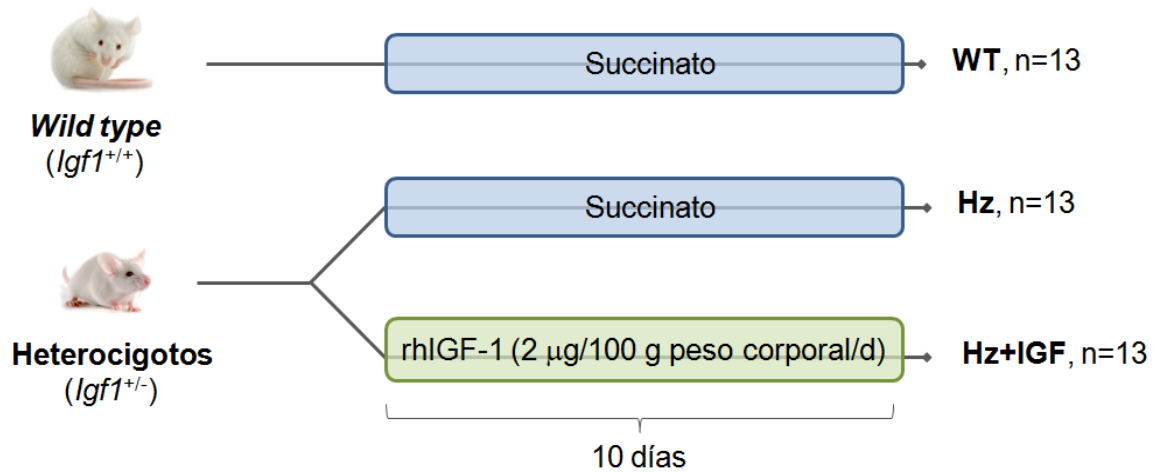
Posteriormente, se procesó la imagen en el transiluminador GelDoc XR de *Bio-Rad Molecular Imager*, con el programa informático *Quantity One 1-D analysis Software* y *PDQvest 2-D Analysis Software*, de Bio-Rad.

### III. 2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

#### III.2.1. Distribución de los animales en grupos experimentales y pautas de tratamiento.

Tras la caracterización de ratones machos de  $5\pm 1$  meses de edad, se distribuyeron en tres grupos homogéneos (cfr. Figura 18):

1. Grupo de controles *Wild type* (WT, *Igf1<sup>+/+</sup>*, n=13), que recibieron subcutáneamente Succinato (vehículo) durante los diez días de tratamiento.
2. Grupo de ratones heterocigotos con deficiencia parcial en IGF-1 (Hz, *Igf1<sup>+/-</sup>*, n=13), que recibieron Succinato (vehículo) por vía subcutánea durante diez días.
3. Grupo de animales heterocigotos deficientes en IGF-I (Hz+IGF, *Igf1<sup>+/-</sup>*, n=13), a los que se administró, subcutáneamente, el tratamiento con rhIGF-1 (2  $\mu\text{g}/100$  g peso corporal y día, en dos dosis), durante diez días.



**Figura 18.** *Diseño experimental.*

Adicionalmente, para la realización de una curva de evolución temporal de las concentraciones circulantes de IGF-1, se extrajo sangre de animales (WT y Hz, n=5 por grupo) de edades comprendidas entre los 15 días y los 23 meses.

### III.2.2. Extracción de sangre, administración del tratamiento y sacrificio de los animales.

El día anterior al inicio del tratamiento detallado en el apartado anterior (día 0) se pesó a todos los animales y se les extrajo sangre (150-200 µL) mediante punción de la vena mandibular. El suero obtenido tras la centrifugación de las muestras (2.600 rpm, 20 minutos, 4 °C) se conservó a -20 °C hasta su posterior utilización.

El factor de crecimiento rhIGF-1 fue proporcionado por el laboratorio farmacéutico *Chiron Corporation* (EE.UU.) y disuelto en el tampón Succinato (10 mM Succinato sódico, 140 mM Cloruro sódico) a pH 6,0. Las dosis administradas fueron de 2 µg/100 g de peso corporal y día, durante 10 días, subcutáneamente, en volúmenes no superiores a 0,5 mL, y dividida en dos inyecciones al día (matutina y vespertina), a los animales del grupo Hz+IGF. Los animales de los grupos experimentales sin tratamiento con IGF-1 (WT y Hz) recibieron el vehículo Succinato subcutáneamente durante el mismo periodo de tratamiento.

Las jeringuillas empleadas (Omnican, 0,5 mL, 0,3 x 8 mm, Biotech, España) se prepararon en campana de flujo laminar, utilizando un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millex-GS, España).

Al finalizar el diseño experimental (día 11), se llevó a cabo la determinación del peso corporal post-tratamiento en una balanza de precisión (Denver Instrument, España) y se extrajo una nueva muestra de sangre, que fue centrifugada (2.600 rpm, 20 minutos, 4 °C) para obtener el suero, que fue almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

Inmediatamente después, los animales fueron sacrificados por decapitación y se procedió a la disección de los distintos órganos y a la recogida de muestras. Para este estudio, el cerebro fue cuidadosamente extraído y dividido en 3 porciones:

- Medio hemisferio izquierdo para RNA, inmerso en RNAlater (Qiagen-Izasa, España).
- Medio hemisferio izquierdo para proteínas, congelado a -80°C en criotubos tras la inmersión en N<sub>2</sub> líquido.
- Hemisferio derecho: para histología, fijado en paraformaldehído (PFA) 4% y posteriormente pasado a etanol 70% (para ser procesado e incluido en parafina).

### **III.3. EXTRACCIÓN DE ARN Y TÉCNICAS DE EXPRESIÓN GÉNICA.**

#### **III.3.1. Extracción de ARN de tejido cerebral.**

Entre 30-50 mg de tejido cerebral conservado en RNAlater fueron homogeneizados por un TISSUELYSER LT (Qiagen-Izasa, España) utilizando como buffer de extracción QIAzol (Qiagen-Izasa, España).

A continuación, se utilizó el kit de extracción de RNA de Qiagen-Izasa *RNeasy* siguiendo las indicaciones del productor y empleando el robot QIACUBE (Qiagen-Izasa, España) para optimizar el procesado.

La concentración y pureza del ARN se cuantificaron con el espectrofotómetro NANODROP 2000 (Thermo-Fisher Scientific, España). La integridad del ARN se determinó utilizando el equipo EXPERION (*Automated Electrophoresis Station*, Bio-Rad, España).

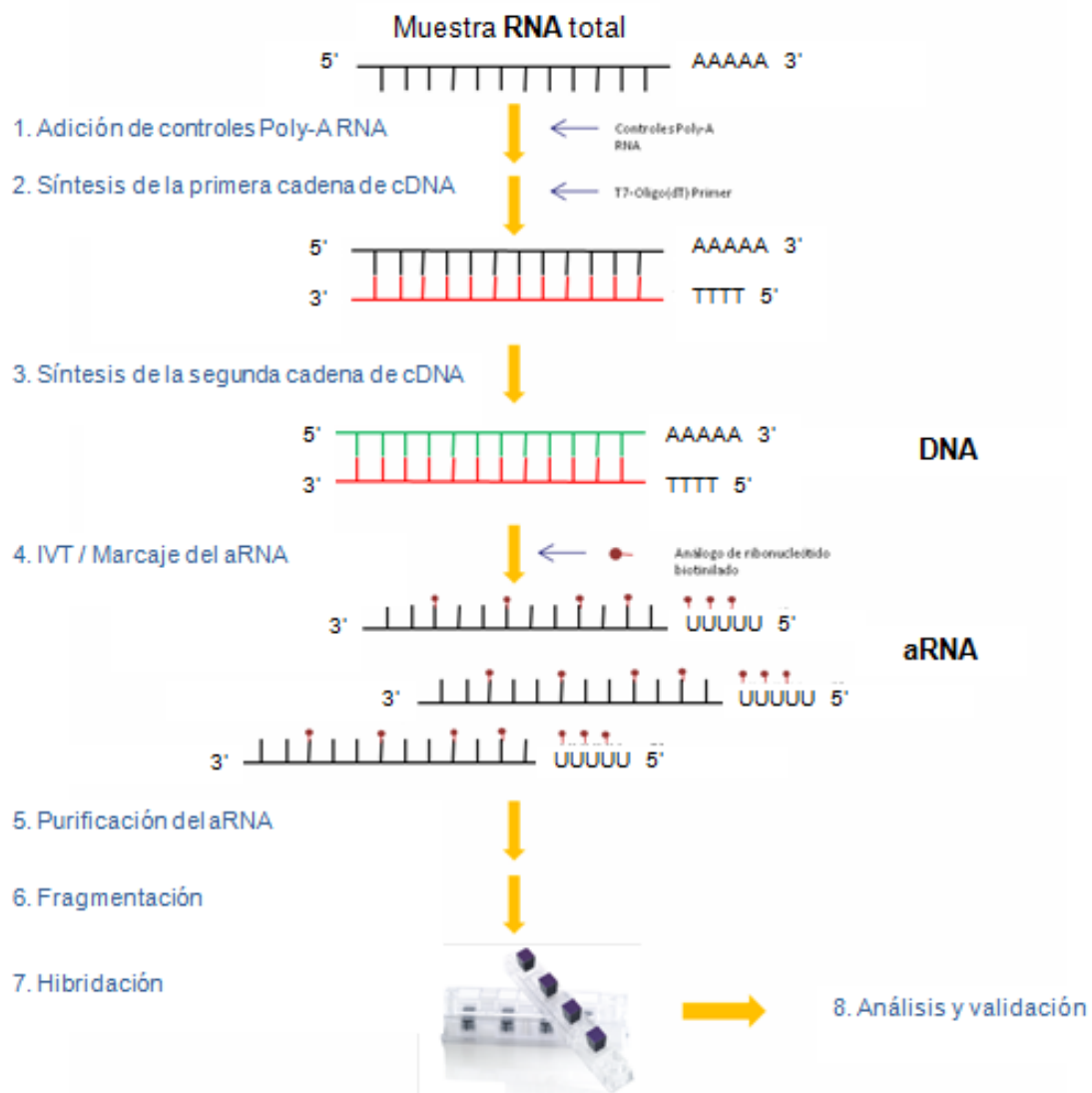
La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando mediante transcripción inversa, utilizando el kit comercial High Capacity ARN to ADNc Kit (Applied Biosystems, España) y un termociclador MASTERCYCLER (Eppendorf-Durviz, España). El ADNc obtenido se diluyó en H<sub>2</sub>O-DEPC hasta una concentración final de 15-20 ng/μL.

### **III.3.2. Análisis del transcriptoma mediante microarray.**

Las técnicas para la realización y análisis del microarray, incluyendo el control de calidad del ARNm, marcaje, hibridación y escaneo de los arrays fueron desarrolladas en el Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) de la Facultad de Medicina de la Universidad CEU-San Pablo, de acuerdo con los procedimientos estándares dictados por los protocolos de Affymetrix (GeneChipH Expression Analysis manual, Affymetrix, EE.UU.).

Los ARNm fueron perfilados seleccionados usando los microarrays de Affymetrix HT MG-430 PM. Las señales de los arrays fueron normalizadas usando un Robust Multichip Average (Irizarry R.A. *et al.*, 2003) y los posibles efectos debidos a la diferencia entre lotes fueron corregidos por ComBat (Johnson W.E. *et al.*, 2007). Los datos procesados fueron analizados empleando modelos logarítmicos lineales con Limma, como fuera previamente descrito (Smyth G.K. *et al.*, 2004).

Valores superiores a 1,5 de variación entre grupos, con  $p < 0,01$ , fueron seleccionados para su posterior confirmación por PCR. El proceso completo, de forma esquemática, queda resumido en la Figura 19.



**Figura 19.** Análisis del transcriptoma mediante microarray.

### III.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real.

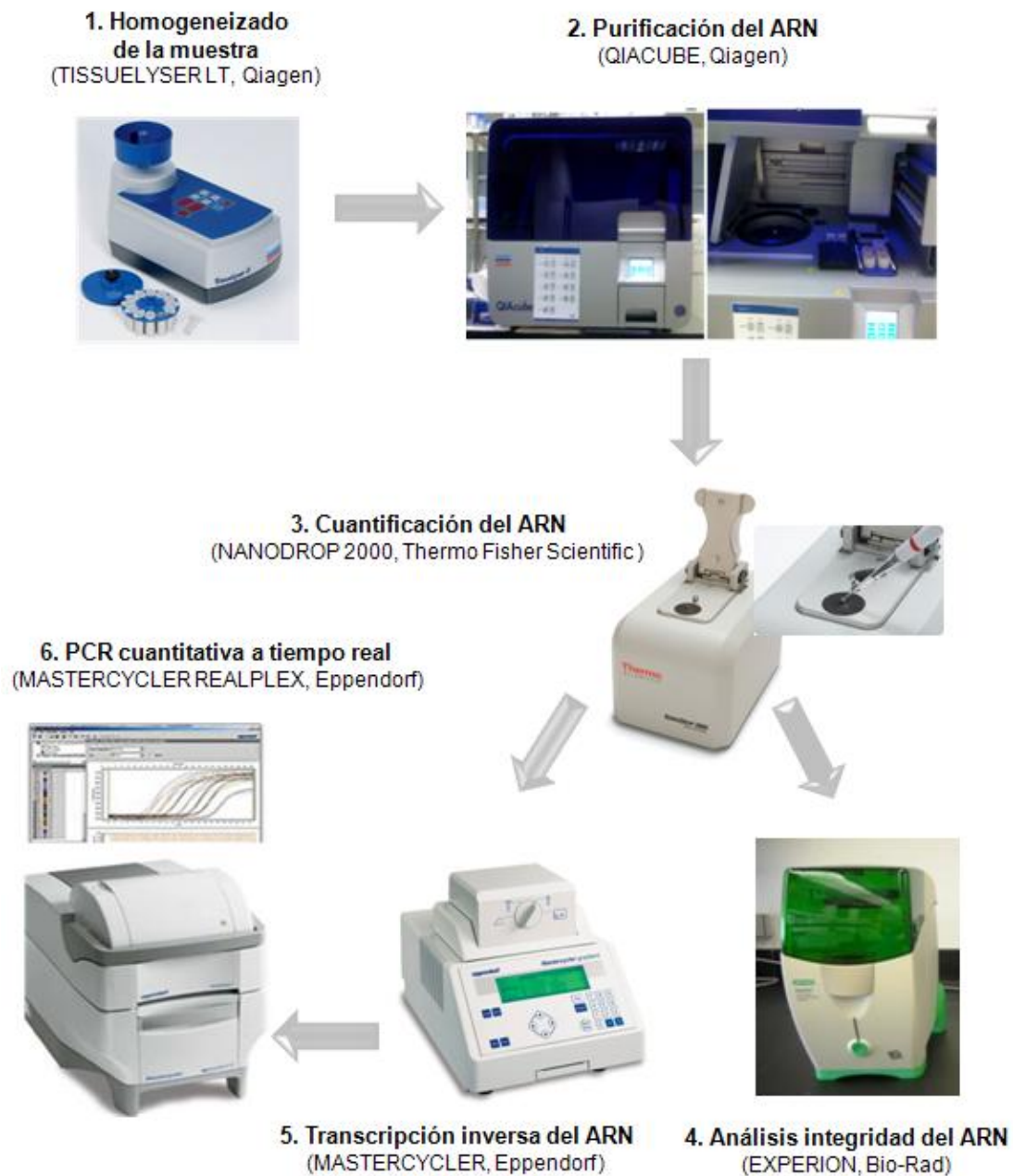
La PCR cuantitativa se realizó en el equipo MASTERCYCLER REALPLEX (Eppendorf, España), utilizando una polimerasa activada por calor TaqDNA (Amplitaq Gold, Applied Biosystems, España), Master Mix (TaqMan GenEx Master Mix, Applied Biosystems, España) y sondas específicas TaqMan MGB (Assay-by-Design<sup>SM</sup>; Applied Biosystems, España) para los siguientes genes:

<b>SONDA</b>	<b>REFERENCIA</b>
Igf1	Mm00439560_m1
Igf2	Mm00439564_m1
Igf1r	Mm00802831_m1
Igfbp4	Mm00494922_m1
Igfbp6	Mm00599696_m1
Igfbp7	Mm03807886_m1
Igfbp8	Mm01192933_g1
Ghr	Mm00439093_m1
Gpx1	Mm00656767_g1
Gpx8	Mm00510514_m1
Cat	Mm00504340_m1
Il10rb	Mm00434157_m1
Il1b	Mm00434228_m1
Il6	Mm00446190_m1
Tnfrsf1a	Mm00441883_g1
Crif1	Mm00517026_m1
Ptgs2	Mm00478374_m1
Nos1	Mm00435175_m1
Tgfb2	Mm00436955_m1
Hspb1	Mm00834384_g1
Hspa13	Mm00712869_m1
Hsp90b1	Mm00441926_m1
Hspa1b	Mm03038954_s1
Hspa2	Mm00434069_s1
Hspa5	Mm00517690_g1
Hspbp1	Mm00481069_m1
Foxo1	Mm00490672_m1
Akt1	Mm01331626_m1
Mcl1	Mm00725832_s1
Gab1	Mm00491216_m1
Cntf	Mm00446373_m1
Cntfr	Mm00516693_m1
Srp1	Mm00435860_m1
Srpb1b	Mm00655696_m1
Gadd45a	Mm00432802_m1
Ulk1	Mm00437238_m1
Parp1	Mm01321084_m1
Grb2	Mm03023989_g1
Bid	Mm00432073_m1
Tgfa	Mm00446232_m1
Bid	Mm00432073_m1
Bcl2	Mm00477631_m1
Apaf1	Mm01223702_m1

**Tabla 3.** Sondas TaqMan empleadas para la PCR cuantitativa

Los resultados obtenidos fueron normalizados usando como control endógeno el gen de la actina. Los datos fueron calculados como  $2^{\Delta CT}$  y posteriormente expresados como “veces sobre el control”, siendo considerado el grupo WT como control.

El proceso para la realización de qPCR se esquematiza en la Figura 20.



**Figura 20.** Esquema del proceso de las muestras y equipamientos empleados para la realización de PCR tiempo real.

### **III.4. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE IGF-1.**

Para determinar las concentraciones plasmáticas de IGF-1 se utilizó un kit de ELISA (Mediagnos, Alemania). La sensibilidad de la técnica es <0,029 ng/mL.

La lectura fue llevada a cabo en el equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, España), donde se midió la absorbancia a 450 nm. Para la obtención de la curva de calibrado y resultados, se utilizó el programa *Skant<sup>TM</sup> Software* (Fisher Scientific, España) adaptado al equipo.

### **III.5. HISTOLOGÍA.**

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, el cerebro fue extraído y, tras ser pesado, se seccionó por la línea media sagital, sumergiendo el hemisferio derecho en paraformaldehído al 4 % (24 horas a temperatura ambiente, en agitación) para su fijación. Posteriormente las muestras fueron introducidas en etanol al 70% para su conservación y análisis histológico. En resumen, los cerebros se incluyeron en parafina tras la deshidratación en una serie creciente de alcoholes realizada con un procesador automático de tejidos (Leica TP 1020, Suiza). Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

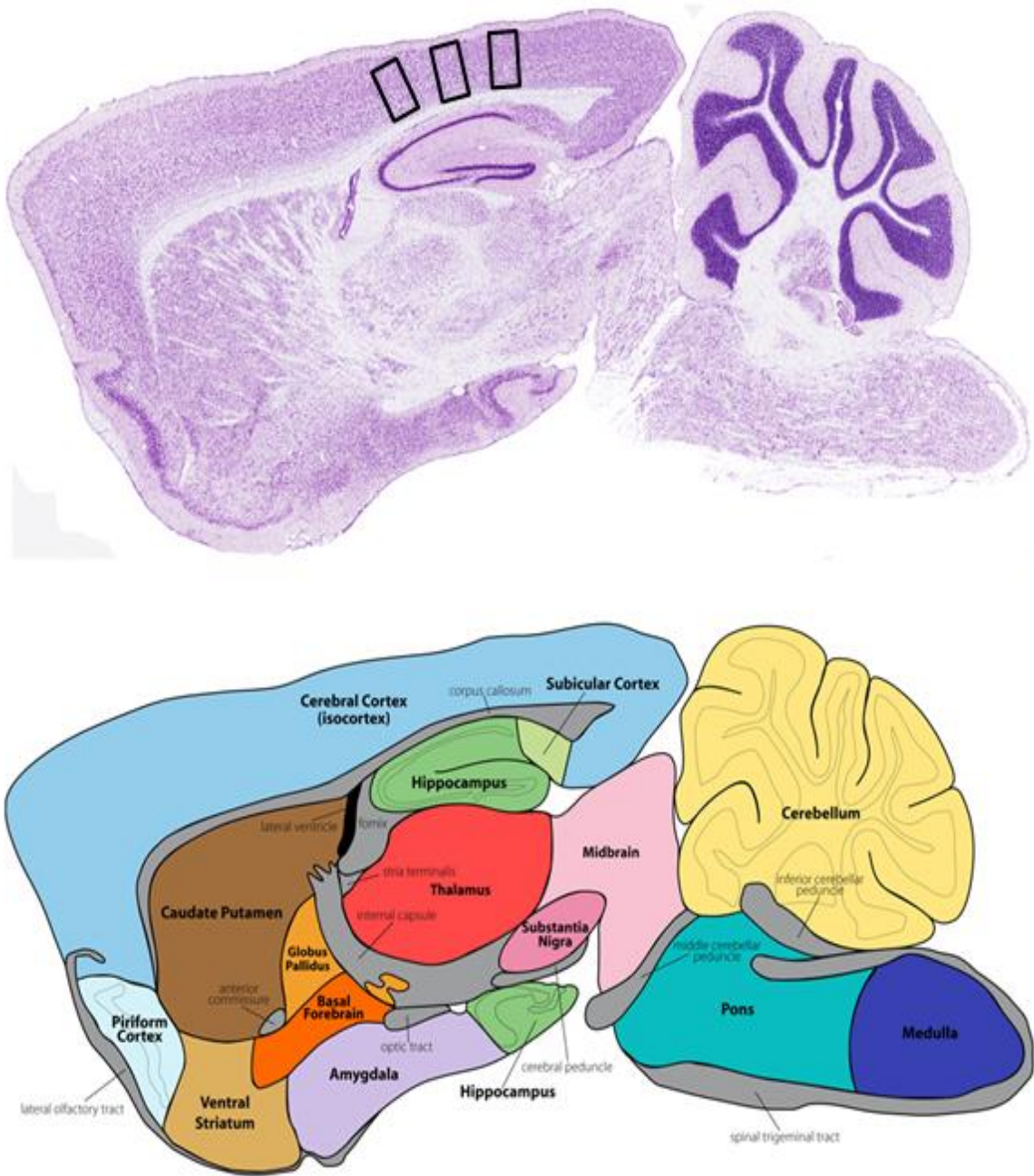
Los cortes se realizaron en un micrótopo Reichert-Jung 2030 Biocut (Leica, Suiza) seleccionando un grosor de ~4 µm. Todos los cortes se recogieron en portaobjetos previamente tratados con poly-L-lisina (Sigma Diagnostics, EE.UU.).

En primer lugar se realizó la tinción del tejido cerebral con hematoxilina-eosina (Merck, España) para evaluar la morfología general e identificar los núcleos celulares.

A continuación, se realizó el escaneado de las imágenes en el dispositivo LEICA SCN400 (Leica, Suiza). Éstas, fueron analizadas a distintos aumentos y se llevó a cabo una cuantificación de la celularidad en la región



peri-hipocampal de la corteza cerebral, respetada para todas las preparaciones (3 zonas adyacentes, a doble ciego), con un área de 10x5 cm, en imágenes a 8x aumentos (cfr. Figura 21).



**Figura 21.** Áreas de cuantificación del número de células (corteza cerebral peri-hipocampal).

Para la tinción del tejido nervioso, se eligió la técnica no argéntica de Nissl modificada. En su versión clásica no se emplea en la actualidad porque es de realización muy lenta y requiere necesariamente material fijado en alcohol. En su lugar, se utiliza la modificación de este método, de mayor rapidez y estabilidad de los resultados, que se expone a continuación:

- 1) Desparafinar e hidratar.
- 2) Solución de violeta de cresilo: 0,5 g de violeta de cresilo extra en tampón acetato (acetato sódico en ácido acético, a pH 4), 10 minutos.
- 3) Lavar en solución tampón acetato.
- 4) Deshidratar, aclarar en xilol (muy corto tiempo) y montar.

Los resultados de esta tinción muestran en violeta los grumos de Nissl y núcleos y en azul tenue las células nerviosas (las estructuras restantes no se tiñen).

### **III.6. DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN TEJIDO CEREBRAL (PEROXIDACIÓN LIPÍDICA).**

La peroxidación lipídica es un mecanismo de daño celular y es utilizado como indicador de estrés oxidativo celular y tisular. Los peróxidos lipídicos son inestables y se descomponen formando diferentes compuestos complejos. Los peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados generan en su descomposición Malondialdehido (MDA) y 4-hidroxi-alquenos, y su cuantificación se utiliza como indicador de peroxidación lipídica.

Se realizó mediante un análisis cromogénico según el método descrito en la bibliografía (Gerard-Monnier D. *et al.*, 1998). Este método está basado en la reacción de un sustrato cromogénico (N-metil-2-fenilindol) con el MDA a 45 °C. Una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de sustrato produciendo un cromóforo estable con un máximo de absorbancia a 586 nm.

**Procedimiento:**

1. Los tejidos cerebrales fueron homogeneizados (~50 mg) en una solución de HCl con un pH de 1,5. Inmediatamente después, los homogeneizados se hidrolizaron en un baño a 60 °C durante 80 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 4.000 g durante 10 minutos a 4 °C, recogiendo el sobrenadante.
2. Se añadieron 200 µL de muestra -o de solución estándar de MDA para la curva de calibración- a 650 µL de una solución de reactivo (N-metil-2-fenilindol) diluido en una mezcla de acetonitrilo/metanol (3:1).
3. Para iniciar la reacción, se añadieron 150 µL de HCl al 37 %, se incubaron y se agitaron a 45 °C durante 45 minutos en un baño.
5. Se centrifugó para eliminar la turbidez de las muestras a 10.000 g durante 10 minutos y finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 600 nm.

Se utilizaron cubetas de 0,1 cm y volumen de 1,5 mL para la lectura de las absorbancias. La concentración de MDA en la muestra se calculó como se expone a continuación:

$$[\text{MDA}] (\mu\text{M}) = (A - A_0) \times 5 / \epsilon$$

Donde:

A = Absorbancia de la muestra

A<sub>0</sub> = Absorbancia del blanco

5 = Factor de dilución de la muestra en la cubeta (200 µL muestra en un total de 1 mL)

ε = Coeficiente de extinción molar aparente (pendiente de la curva de calibración)

## **III.7. IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA (MRI).**

### **III.7.1. Obtención de las imágenes.**

#### **III.7.1.1. Mapas de ADC (Coeficiente de Difusión Aparente).**

Los mapas de ADC se obtuvieron a partir de imágenes potenciadas en difusión de agua. Las secuencias de difusión se basan en la secuencia convencional de eco de espín pesada en T2 de Stejskal-Tanner en la que se aplican gradientes de difusión. En los estudios de difusión se aplican varios valores de b (factor gradiente de secuencia de pulso) con los que se quiere ponderar la imagen, incluyendo un valor b = 0, es decir, sin ponderación y se obtiene un grupo de imágenes para cada uno. Los parámetros empleados fueron TR = 3.000 ms, TE = 51 ms, duración del gradiente de difusión = 16 ms, dirección del gradiente de difusión: izquierda-derecha, FOV = 38 mm, matriz de adquisición = 128 x 128, valores de b = 100, 200, 300, 500, 800 y 1.200 s/mm<sup>2</sup>. Después se obtienen los mapas de ADC, calculando el valor de ADC (expresado en mm<sup>2</sup>/s) para cada vóxel, por medio de un ajuste lineal de la función  $I_b = I_0 e^{-ADC \cdot b}$ , donde  $I_b$  es la intensidad de la señal para un valor b dado e  $I_0$  la intensidad de la señal cuando b = 0.

El mapa de ADC se representa como una imagen en una escala de colores que refleja la difusión de las moléculas de agua. Obtuvimos un total de 6 cortes para cada ratón, que contenían las estructuras anatómicas descritas en la Tabla 4.

#### **III.7.1.2. Mapas de imagen por transferencia de campo magnético (MTI).**

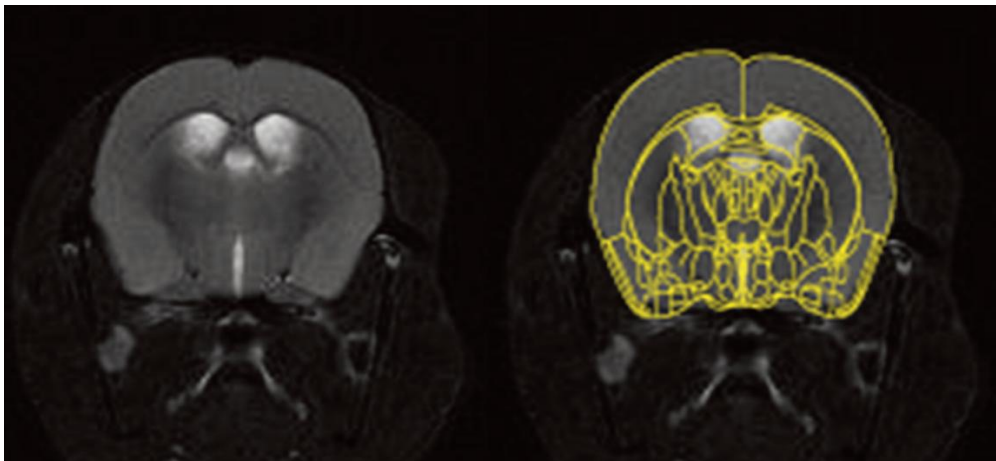
Los mapas de MTI se obtuvieron a partir de dos secuencias idénticas de eco de espín, en las que se aplicaba,  $M_t$ , o no,  $M_0$ , un pulso de presaturación MT de 8.0 ppm. Los parámetros empleados fueron los siguientes: TR = 2.500 ms, TE = 9,8 ms, FOV = 20mm, matriz de adquisición 128x128. Los mapas  $M_t/M_0$  se prepararon dividiendo pixel a pixel las intensidades de las imágenes saturadas y no saturadas. Obtuvimos un total de 6 cortes para cada ratón.

Corte	Principales estructuras anatómicas
1	Mesencéfalo: 37 % Corteza cerebral: 35 % Hipocampo: 25 % Tálamo: 3 %
2	Hipocampo: 15 % Ventrículos: 15 % Hipotálamo: 12 % Mesencéfalo: 6 %
3	Corteza cerebral: 45 % Núcleos cerebrales (Estriado, Pálido): 25 % Ventrículos: 10 % Hipotálamo: 9 % Hipocampo: 2 %
4	Corteza cerebral: 45 % Núcleos cerebrales: 35 % Ventrículos: 10 % Hipotálamo: 5 % Tálamo: 5 %
5	Corteza cerebral: 50 % Núcleos cerebrales: 37 % Ventrículos: 5 % Hipotálamo: 4 % Tálamo: 2 %
6	Corteza cerebral: 54 % Núcleos cerebrales: 40 % Hipotálamo: 3 % Ventrículos: 3 %

**Tabla 4.** Principales estructuras encefálicas representadas en los cortes (1-6) de ADC.

### III.7.2. Procesamiento de las imágenes.

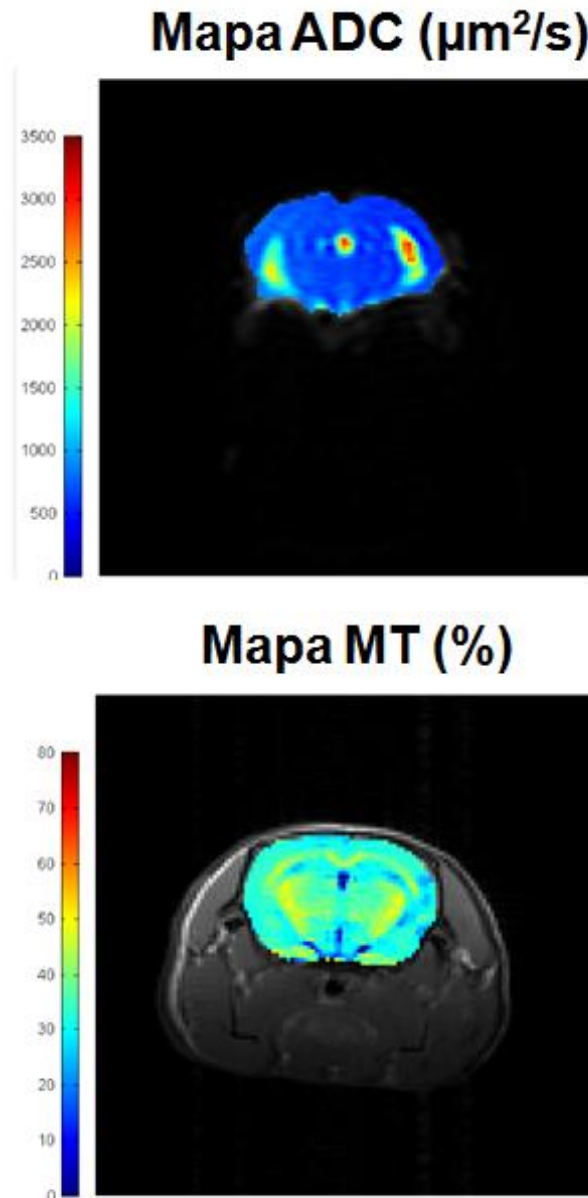
Las imágenes pesadas en T2 se emplearon para examinar las diferentes estructuras cerebrales y realizar estudios volumétricos. Las regiones de interés se delinearon superponiendo sobre la imagen pesada en T2 la imagen anatómica correspondiente obtenida del atlas del cerebro del ratón "*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*" (Franklin K.B. y Paxinos G., 1997). Como referencia común entre el atlas y la imagen en T2, se seleccionó la marca anatómica del tercer ventrículo dorsal (Bregma -1,46 mm, Interaural 2,34 mm). En la Figura 22 se puede ver un ejemplo del proceso. Una vez delimitadas las áreas de interés, se calculó para cada una de ellas su área y la intensidad de la señal de T2 correspondiente empleando el programa Image J (NIH, Bethesda, Maryland, EE.UU.).



**Figura 22.** Superposición de la imagen del anatómica del atlas sobre la imagen pesada en T2 para la determinación de las áreas cerebrales de interés.

El mismo proceso se siguió con los mapas paramétricos ADC y MT. En este caso, se emplearon las imágenes pesadas en T2 con la misma geometría que los mapas ADC y MT para determinar la imagen correspondiente del atlas Paxinos, y posteriormente ésta se superpuso en los mapas ADC y MT para calcular los valores de ADC y % MT en cada región de interés. Se puede observar una imagen de ambos mapas en la Figura 23. Como se explicó en la introducción, los mapas de ADC representan la difusión del agua en el tejido cerebral.

Una mayor difusión de agua aparece en tonos más rojos. Por su parte, en los mapas de MT se estudia la relación entre los protones libres y los unidos a macromoléculas. El % MT se usa como parámetro de medida del fenómeno y depende del entorno químico y biofísico que rodea las macromoléculas y sirve por lo tanto para detectar y cuantificar cambios histológicos que acompañan la enfermedad (Ridha B.H. *et al.*, 2007). En este caso, el agua aparece en tono azul.



**Figura 23.** Ejemplos de mapa de ADC (arriba) y MT (abajo) en un ratón control. En ambos casos se representa el mismo corte anatómico. En el caso de los mapas de ADC, las zonas con más difusión de agua se muestran rojas mientras que en los mapas de MTI, las zonas de mayor contenido acuoso aparecen azules.

### III.7.3. Resonancia magnética de espectroscopia.

Los ensayos de espectroscopía de hidrógeno en vivo se realizaron en el mismo aparato que la MRI y bajo las mismas condiciones. Se adquirieron en todos los casos espectros empleando una secuencia PRESS (Point Resolved Spectroscopy) con una secuencia VAPOR para suprimir la señal de agua y se emplearon los siguientes parámetros de adquisición: TR = 3.000 ms, TE = 35 ms, 128 adquisiciones, tamaño del vóxel = 3 mm<sup>3</sup>. Las regiones estudiadas fueron el área cortical y el área subcortical, y en cada una de ellas se analizaron distintos metabolitos: Lactato, Tau, N-Acetil-Aspartato, Creatina, Fosfocreatina, Glutamato, Glutamina, Mioinositol y Colina. Sus concentraciones se cuantificaron usando el programa LCModel (Provencher S.W., 1993). En todos los casos, los valores de dichos metabolitos se encontraban por debajo del 20 % de la cota inferior de Cramér-Rao, un estimador de la desviación estándar del ajuste de cada metabolito.

Para las comparaciones entre ratones del grupo control (WT), deficientes de IGF-1 (Hz) y tratados con IGF-1 (Hz+IGF-1), las concentraciones de estos metabolitos se normalizaron respecto al cómputo Creatina-Fosfocreatina, por ser el de referencia al no sufrir alteraciones.

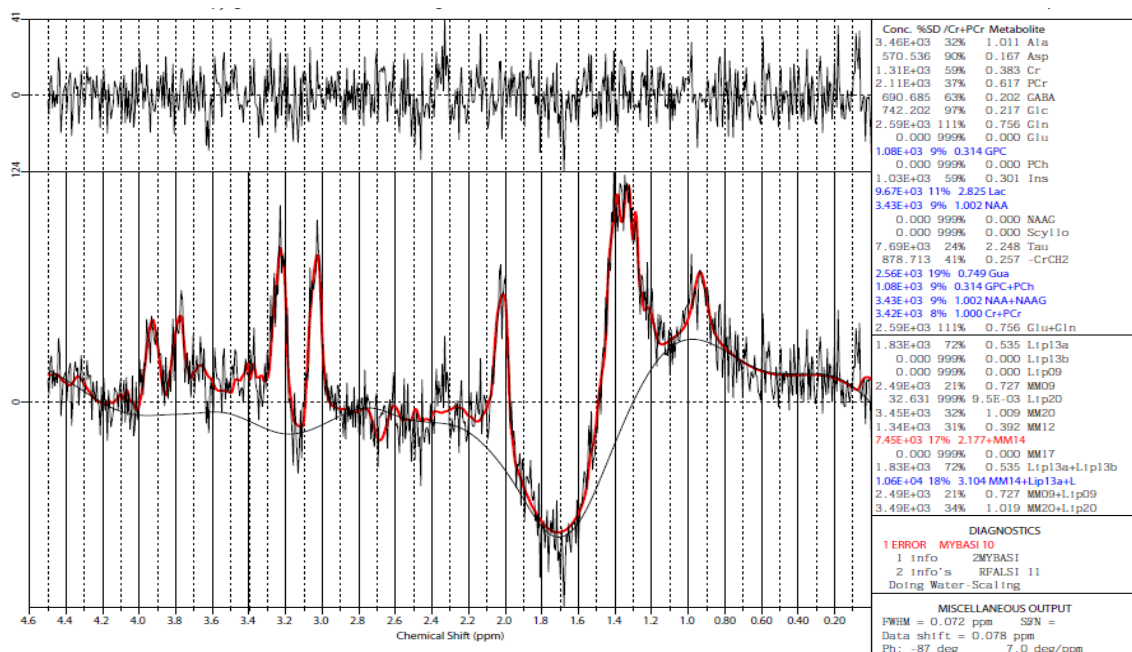


Figura 24. Ejemplo de espectroscopía por resonancia magnética.



### III.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. ESTUDIO DE ONTOLOGÍA GÉNICA Y RUTAS FUNCIONALES.

La realización de los análisis bioinformáticos se basó en la versión NCBI37/mm9 del genoma de ratón, al ser ésta la utilizada por la empresa Affymetrix para el diseño de las sondas del microarray.

Una vez fueron calculados y normalizados los datos de expresión génica obtenidos con el microarray, comenzamos su análisis funcional mediante el uso de diferentes herramientas bioinformáticas, con la intención de identificar los principales procesos biológicos que se ven afectados en las condiciones de deficiencia parcial de IGF-1 y aquellos que se normalizan con el tratamiento sustitutivo con dosis bajas de esta hormona.

En primer lugar, se generaron unos listados de los genes cuyos niveles de expresión variaban en las diferentes condiciones experimentales, ordenados según el valor de su *Fold change*. Para el análisis se tuvieron en cuenta los genes que presentaron un cambio significativo en sus niveles de expresión en las diferentes condiciones experimentales del estudio, cuyos valores de *Fold Change* fueran  $\leq 1,5$  ó  $\geq 1,5$ , respecto a los controles.

Los programas bioinformáticos utilizados para el análisis de ontología génica (OG) y de rutas funcionales fueron los siguientes:

- PANTHER (Mi H. *et al.*, 2005 y 2007) (<http://www.pantherdb.org>).
- Ingenuity Pathways Analysis (IPA) 5.0 ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)).

El estudio se centró el análisis en los procesos biológicos más representativos en las diferentes condiciones experimentales, atendiendo a las categorías del proyecto de OG. También se analizaron las posibles rutas asociadas a los perfiles de expresión génica de cada condición experimental, al igual que las posibles patologías más representadas en cada listado de genes.

### III.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media ( $X \pm EEM$ ). Se descartó la distribución normal de la mayoría de las determinaciones estudiadas con la prueba de Kolmogorof-Smirnov. Por eso se aplicó análisis estadístico no paramétrico.

Para la comparación entre los tres grupos experimentales se realizó con Bonferroni, y para la comparación entre dos grupos se aplicó la U de Mann–Whitney–Wilcoxon. Se realizaron correlaciones de Spearman y análisis de la varianza. Se hicieron comparaciones ANOVA no paramétrico entre varias muestras no pareadas por la prueba de Mann-Whitney y ANOVA no paramétrico entre varias muestras (Kruskal-Wallis y Bonferroni) seguido de una prueba post-hoc (Dunn).

En todos los casos la significación estadística se consideró cuando la probabilidad asociada era inferior al 5 % ( $p < 0,05$ ).

El análisis se realizó con el programa SPSS Win v.20.0 para PC. Las figuras se realizaron utilizando el programa Excell de Microsoft Office 2007 para PC.

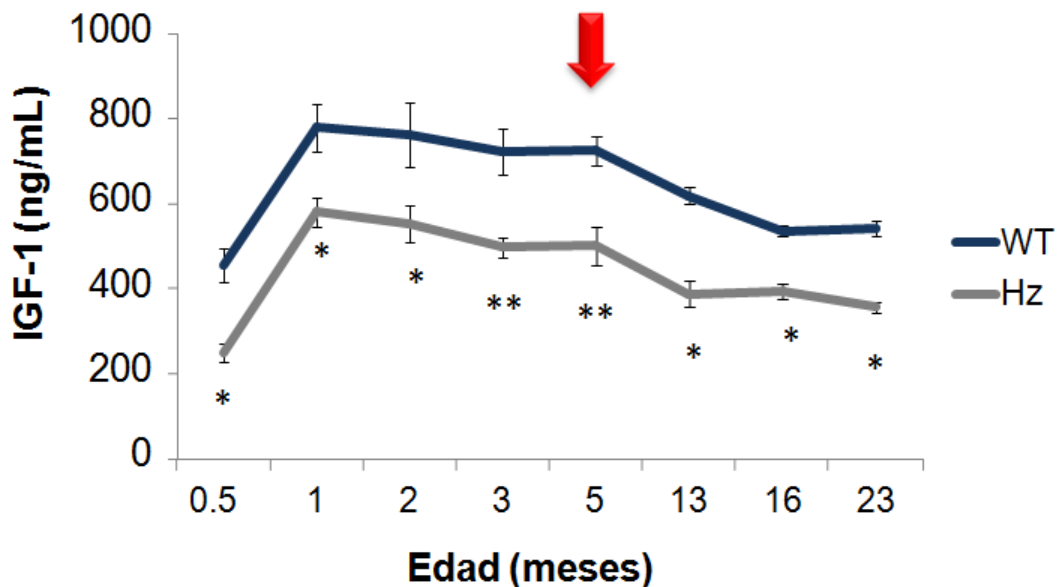
## **IV. RESULTADOS**

## IV.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MODELO EXPERIMENTAL Y EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE DOSIS BAJAS DE IGF-1 SOBRE LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE IGF-1, PESO CORPORAL Y PESO CEREBRAL.

### IV.1.1. Concentraciones circulantes de IGF-1.

El modelo experimental utilizado en este protocolo se estableció a partir de los ratones deficientes de IGF-1 aportados por el Dr. Argiris Efstratiadis (Universidad de Columbia, NY, EE.UU.) (cfr. apartado III.1.1. de Material y Métodos).

Para contribuir a la validación del modelo de deficiencia parcial de IGF-1 (ratones heterocigotos *Igf1<sup>+/-</sup>*) que reproduce la deficiencia de esta hormona observada en la patología humana (Guerra L., 2012; Gago A., 2012; Iturrieta I., 2013), en este estudio realizamos las determinaciones de IGF-1 circulante a diferentes edades en los animales controles (*Igf1<sup>+/+</sup>*, WT) y heterocigotos (*Igf1<sup>+/-</sup>*, Hz), encontrando diferencias significativas en todas los puntos (Figura 25).



**Figura 25.** Concentraciones circulantes de IGF-1 a lo largo de la vida de animales WT y Hz. \*\* $p < 0,01$  vs WT ; \* $p < 0,05$  vs WT.

En este protocolo con ratones machos de  $5\pm 1$  meses de edad, también se encontró que los ratones heterocigotos sufrían una reducción significativa de los niveles de IGF-1, con respecto al grupo control (Hz:  $508,83\pm 59,49$  vs WT:  $741,42\pm 72,41$  ng/mL,  $p<0,01$ ). De acuerdo con resultados de protocolos precedentes, la administración exógena de dosis bajas de IGF-1 normalizó las concentraciones circulantes, comportándose como una verdadera terapia sustitutiva (Hz+IGF:  $722,55\pm 62,67$  ng/mL,  $p<0,01$  vs Hz y  $p=ns$  vs WT).

#### IV.1.2. Peso corporal en los tres grupos experimentales y correlación directa entre el peso corporal y las concentraciones sistémicas de IGF-1.

La deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una disminución significativa del peso corporal con respecto a los controles (WT:  $40,83\pm 0,99$  vs Hz:  $35,35\pm 0,75$  g,  $p<0,01$ ) que el tratamiento sustitutivo con IGF-1 fue capaz de normalizar (Hz+IGF:  $39,52\pm 0,57$  g,  $p<0,01$  vs Hz y  $p=ns$  vs WT).

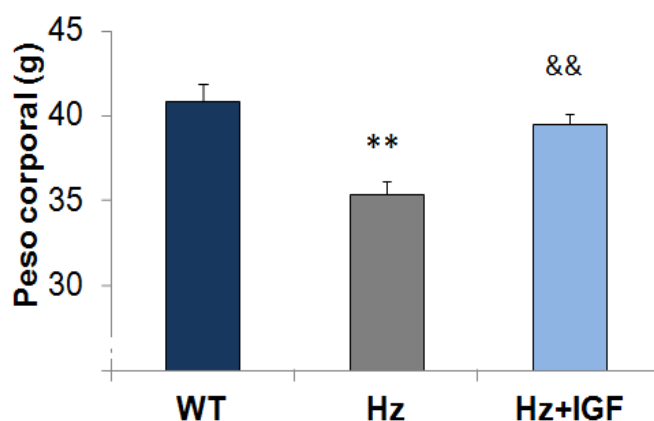
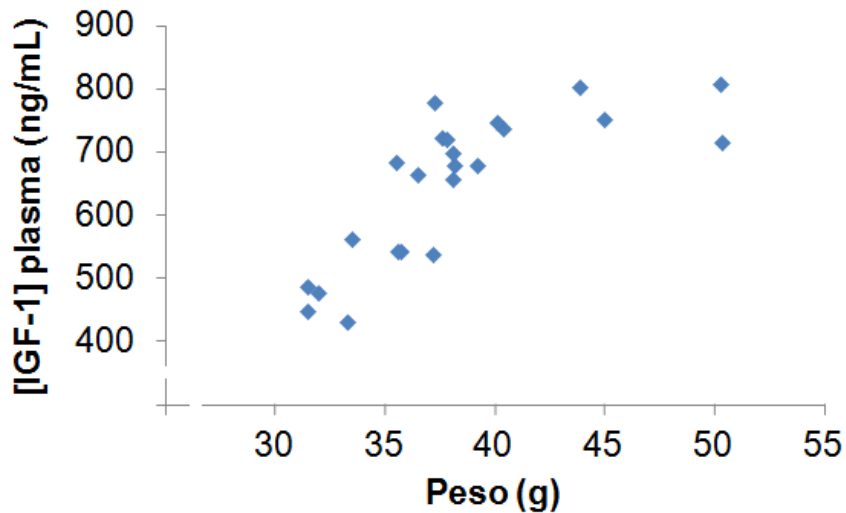


Figura 26. Peso corporal en los tres grupos. \*\* $p<0,01$  vs WT; && $p<0,01$  vs Hz.

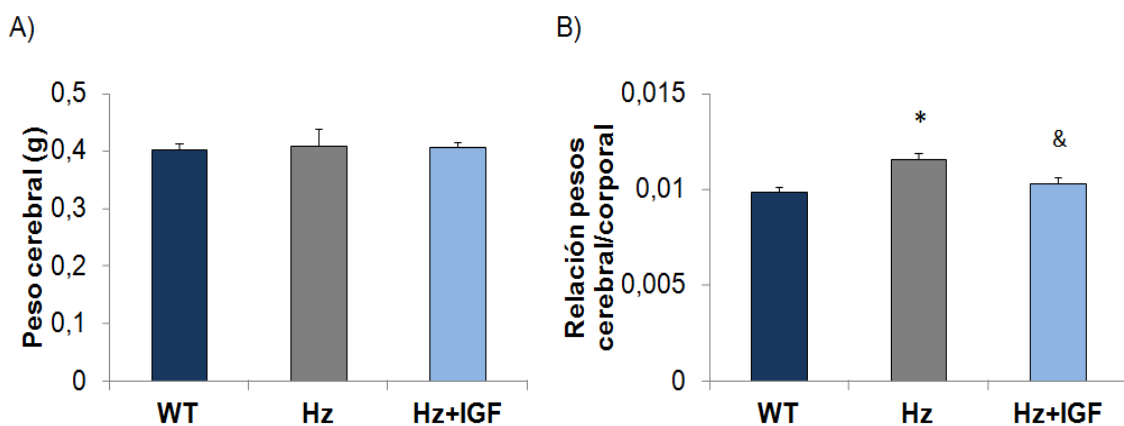
Además, se encontró una correlación directa y significativa entre el peso corporal y las concentraciones circulantes de IGF-1 en estos animales de  $5\pm 1$  meses de edad (cfr. Figura 27):



**Figura 27.** Correlación entre el peso corporal y las concentraciones sistémicas de IGF-1.  $r=0,76$ ,  $p<0,05$ .

#### IV.1.3. Peso cerebral y relación con el peso corporal.

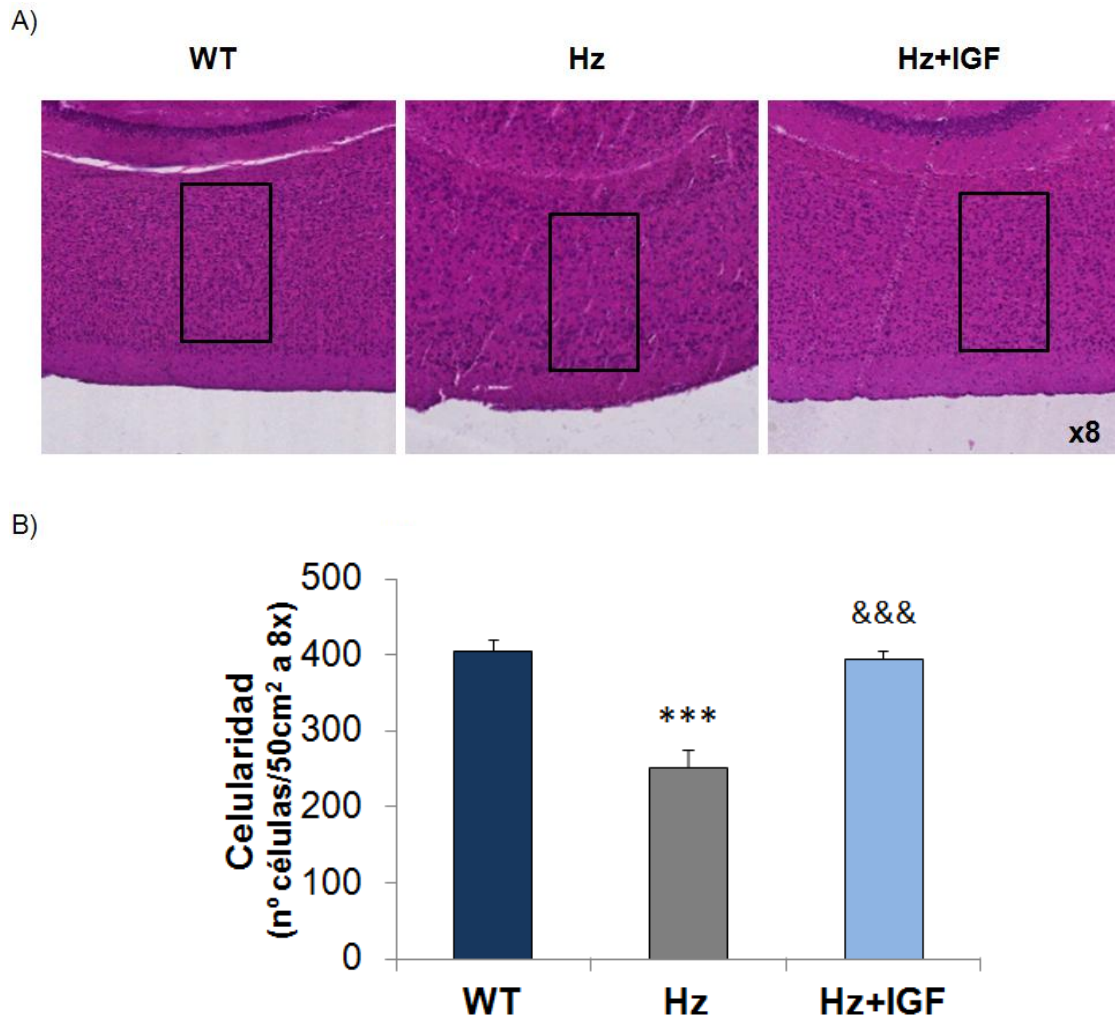
No se encontraron diferencias significativas en el peso cerebral entre los tres grupos experimentales (WT:  $0,40\pm 0,01$ , Hz:  $0,41\pm 0,01$ , Hz+IGF:  $0,41\pm 0,01$ ,  $p=ns$ ). Sin embargo, cuando se refirió el peso cerebral al peso corporal (ratio), se observó un significativo incremento en el grupo de animales deficientes de IGF-1 (Hz) con respecto a los animales controles (WT) y los Hz tratados con la terapia sustitutiva de IGF-1.



**Figura 28.** (A) Peso cerebral y (B) cociente peso cerebral/peso corporal en los tres grupos experimentales. \* $p<0,05$  vs WT; & $p<0,05$  vs Hz.

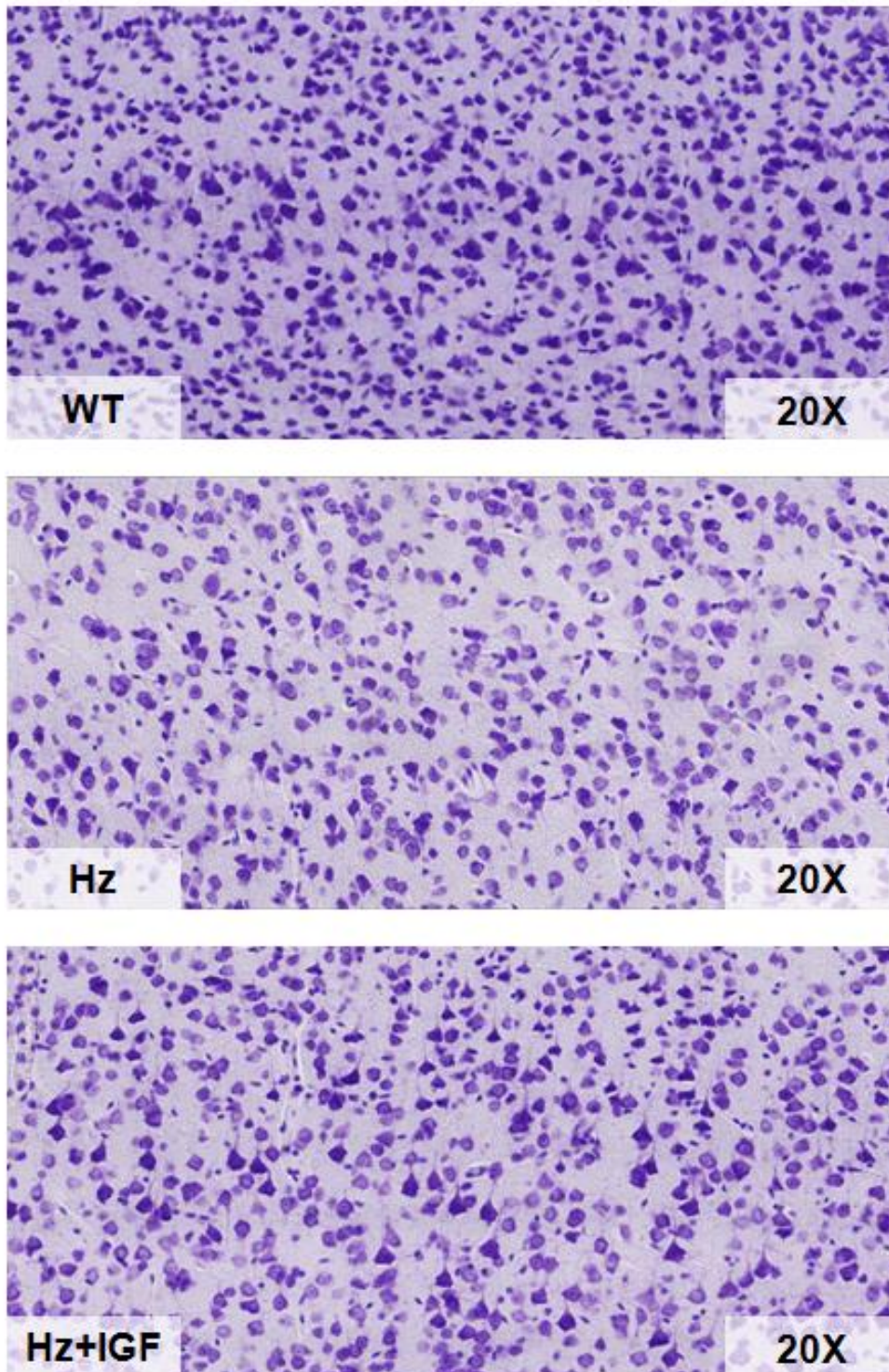
#### IV.1.4. Estudio de celularidad por histología convencional.

Se observaron diferencias claras en la histología convencional con H&E (Figura 29A) que requerirán un análisis específico con métodos estereológicos. En el presente trabajo, sólo se abordó el contaje celular en una superficie de 50 cm<sup>2</sup> a 8 aumentos en una zona localizada entre el cuerpo calloso y la corteza cerebral (plano sagital medio), que puso de manifiesto una disminución significativa del número de células –sin poder precisar la estirpe celular- en los animales deficientes de IGF-1 (Hz). En los animales tratados con IGF-1, la celularidad alcanzó valores semejantes a los controles (p=ns Hz+IGF-1 vs WT) (cfr. Figura 29B).



**Figura 29.** (A) Imagen histológica con H&E y (B) contaje del número de células en un área de 50 cm<sup>2</sup> a 8x. \*\*\*p<0,001 vs WT; &&&p<0,001 vs Hz.

Un estudio preliminar sobre el posible origen de este incremento del número de células en los animales heterocigotos tratados con IGF-1 puso de manifiesto un incremento del número de neuronas en el grupo Hz+IGF-1 en comparación con el grupo Hz.

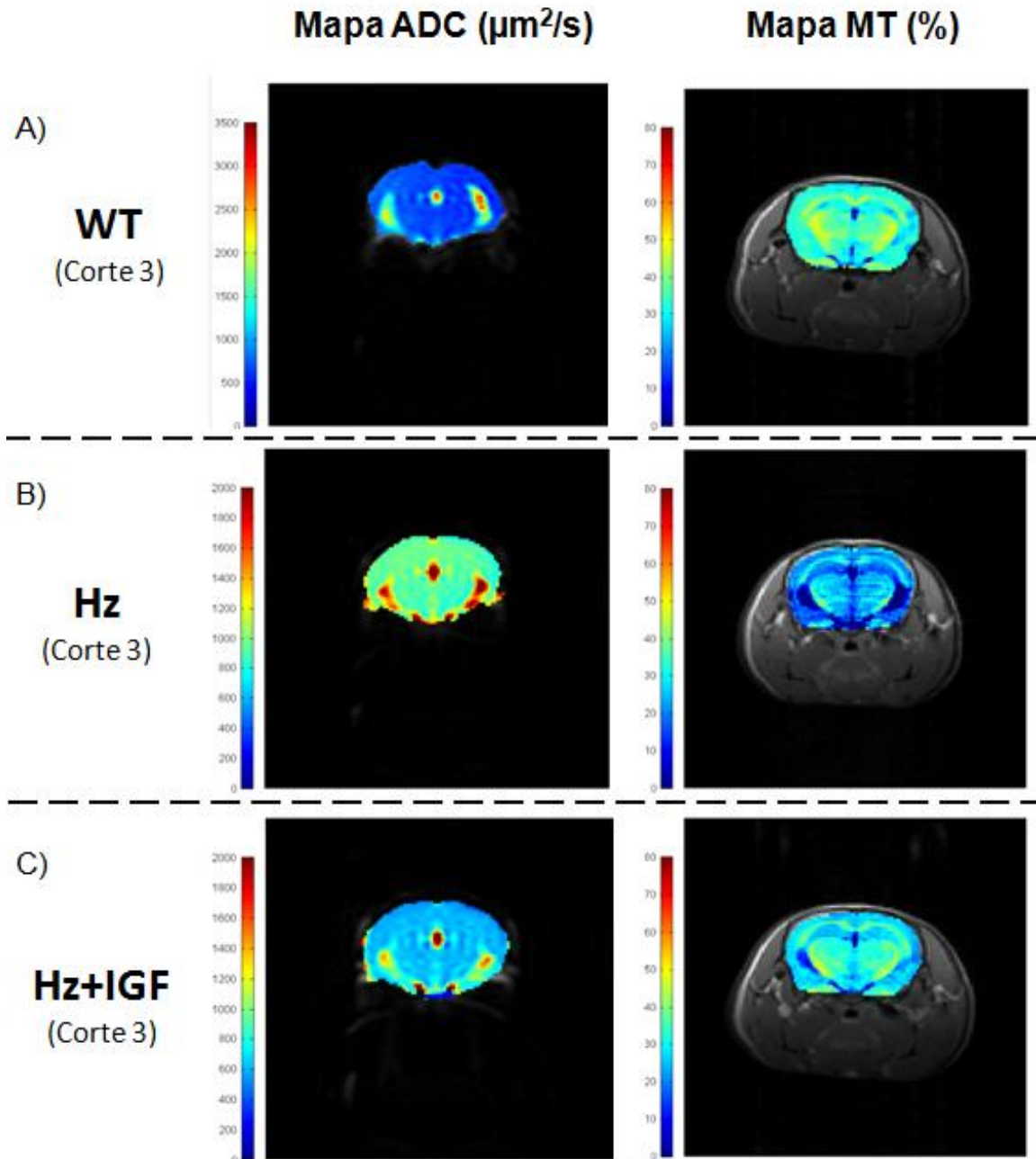


**Figura 30.** *Tinción de Nissl en los tres grupos experimentales.*



#### IV.1.5. Estudio de los mapas de Coeficiente de Difusión Aparente (ADC) y de Transferencia de campo Magnético (MT) obtenidos por resonancia magnética.

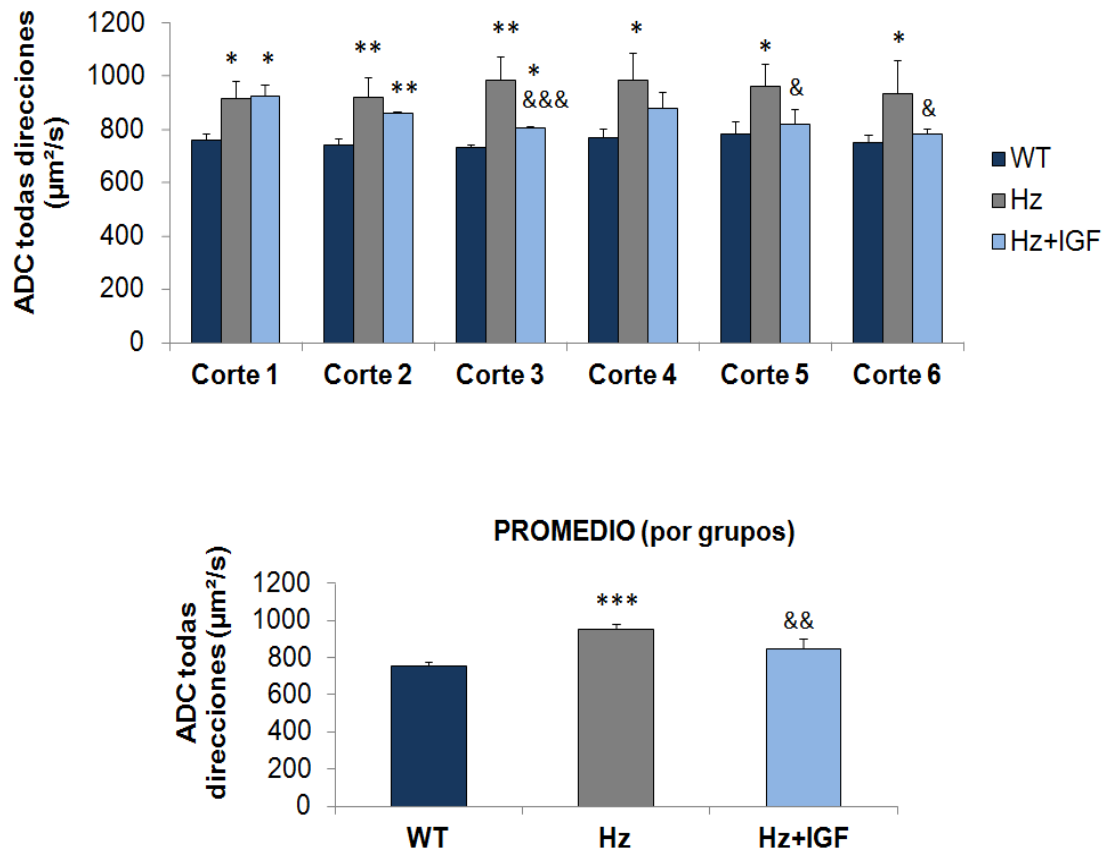
El estudio de imagen por mapas de ADC y MT puso de manifiesto claras diferencias en los patrones de distribución acuosa en el parénquima cerebral entre los tres grupos experimentales (Figura 31).



**Figura 31.** Imágenes obtenidas de los mapas de ADC y MT en cerebro procedente de los tres grupos experimentales.

Las imágenes sugerían un incremento del contenido de agua en el encéfalo de animales deficientes de IGF-1 (Figura 31B) con respecto a los controles (Figura 31A). Los mapas (ADC y MT) correspondientes a los animales Hz tratados con dosis bajas de IGF-1 (Figura 31C) mostraron un aspecto similar a los controles.

Estas aparentes diferencias fueron cuantificadas para cada corte coronal (1 a 6) de los mapas de ADC, confirmando que, efectivamente, existían diferencias significativas en el contenido acuoso entre los animales control y los deficientes de IGF-1, y que la administración exógena de IGF-1 fue capaz de inducir una reducción significativa (cfr. Figura 32).

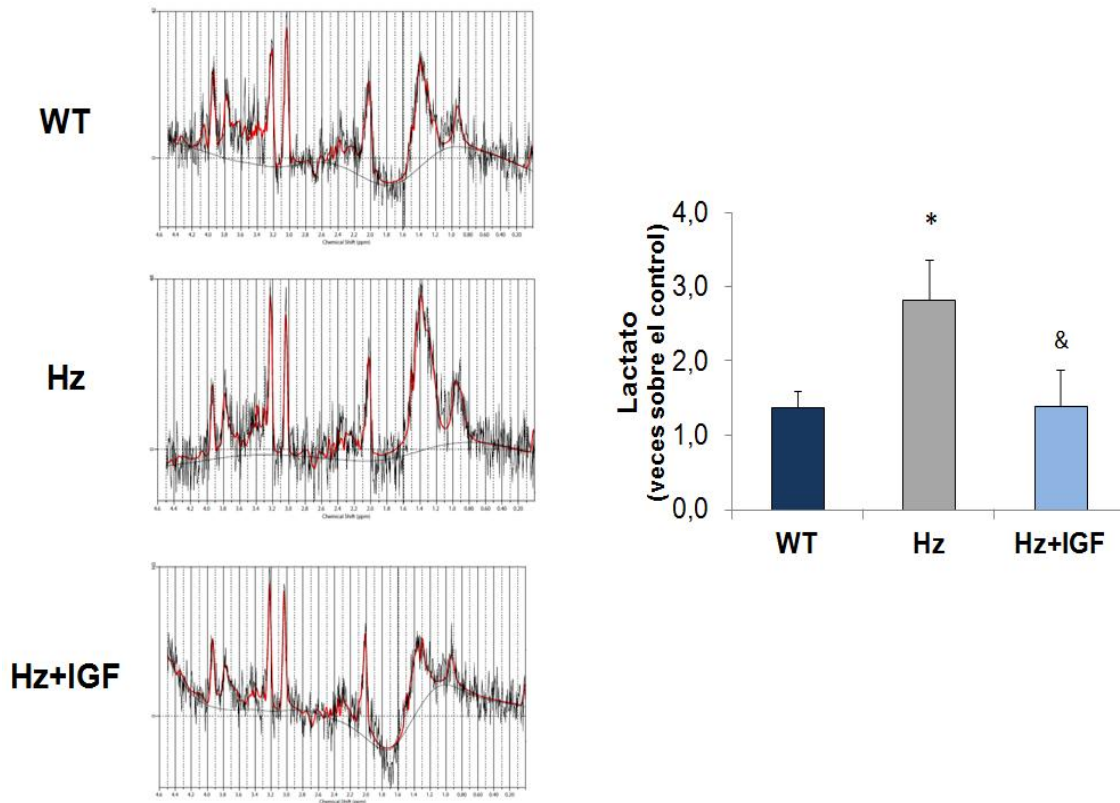


**Figura 32.** Cuantificación de los mapas de ADC. \*\*\* $p < 0,001$  vs WT; \*\* $p < 0,01$  vs WT  
\* $p < 0,05$  vs WT; &&& $p < 0,001$  vs Hz; && $p < 0,01$  vs Hz; & $p < 0,05$  vs Hz.

Estos hallazgos son compatibles con la existencia de edema o inflamación en los animales con deficiencia parcial de IGF-1, que la terapia sustitutiva con esta hormona revirtió.

#### IV.1.6. Estudio de espectroscopía de resonancia magnética.

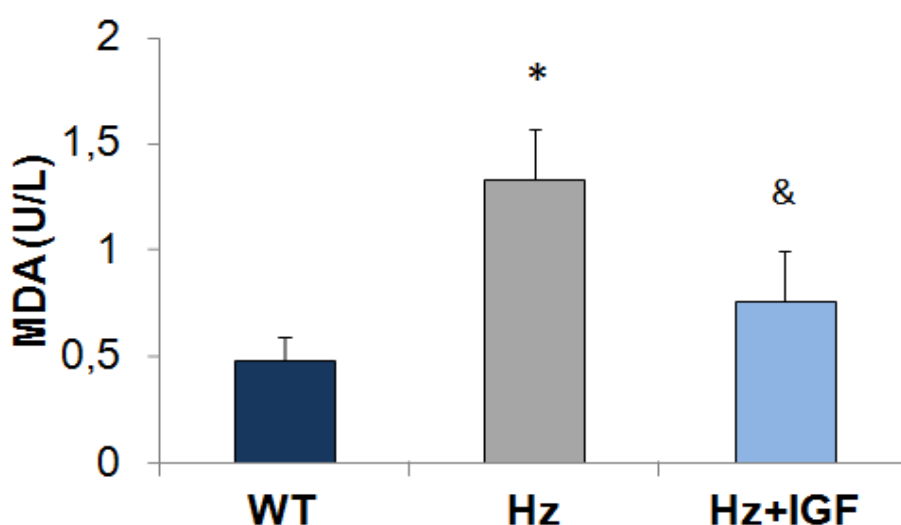
El análisis de los espectros de los metabolitos cerebrales más característicos reveló un incremento significativo de Lactato (un pico que aparece a 1,33 ppm, que se eleva en casos de necrosis) (Barker P.B., 2001) en los animales deficientes de IGF-1 en comparación con los ratones WT ( $p < 0,05$ ). El tratamiento sustitutivo con IGF-1 logró normalizar este parámetro.



**Figura 33.** Espectroscopía de resonancia magnética. Incremento significativo del lactato en animales Hz. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

#### IV.1.7. Determinación de la peroxidación lipídica (malondialdehído, MDA).

El estudio del marcador de peroxidación lipídica MDA demostró un incremento significativo en los animales con deficiencia de IGF-1 (WT:  $0,48 \pm 0,11$  vs Hz:  $1,33 \pm 0,23$ ,  $p < 0,05$ ), que el tratamiento sustitutivo con dicha hormona consiguió normalizar (Hz+IGF-I:  $0,76 \pm 0,24$ ,  $p < 0,05$  vs Hz).



**Figura 34.** Peroxidación lipídica (MDA) en ratones procedentes de los tres grupos experimentales. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

#### IV.2. ESTUDIO EN CEREBRO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE IGF-1 Y OTROS GENES RELACIONADOS.

El estudio de la expresión génica por microarray puso de manifiesto que la deficiencia parcial de IGF-1 se asocia con una alteración de la expresión del gen *Igf1* y otros genes relacionados, como muestra la Tabla 5.

Nombre del gen	Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
Insulin-like growth factor 1 (Igf1)	-1,93 (p<0,01)	1,06 (p=0,29)
Insulin-like growth factor 2 (Igf2)	-2,02 (p<0,001)	1,61 (p<0,001)
Insulin-like growth factor 1 receptor (Igf1r)	2,34 (p<0,01)	-1,04 (p=0,41)
Insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r)	1,12 (p=0,19)	-1,07 (p=0,37)
Insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1)	1,06 (p=0,45)	-1,05 (p=0,58)
Insulin-like growth factor binding protein 2 (Igfbp2)	-1,24 (p=0,30)	1,57 (p=0,06)
Insulin-like growth factor binding protein 3 (Igfbp3)	1,22 (p<0,05)	-2,28 (p<0,001)
Insulin-like growth factor binding protein 4 (Igfbp4)	2,08 (p<0,05)	-1,36 (p=0,76)
Insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5)	-1,38 (p=0,06)	1,50 (p<0,01)
Insulin-like growth factor binding protein 6 (Igfbp6)	1,84 (p<0,01)	-2,04 (p<0,001)
Insulin-like growth factor binding protein 7 (Mac25/Igfbp7)	-1,65 (p<0,001)	1,00 (p=0,98)
Connective tissue growth factor (Ctgf/Igfbp8)	-3,02 (p<0,001)	1,56 (p<0,01)
Nephroblastoma overexpressed gene (Nov/Igfbp9)	4,50 (p<0,001)	-1,37 (p<0,01)
Cysteine rich protein 61 (Cyr61/Igfbp10)	-1,30 (p<0,05)	1,03 (p=0,72)
WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (Wisp1)	-1,32 (p=0,05)	1,44 (p<0,05)
WNT1 inducible signaling pathway protein 2 (Wisp2)	-1,04 (p=0,16)	-1,01 (p=0,53)
WNT1 inducible signaling pathway protein 3 (Wisp3)	-1,00 (p=0,99)	-1,04 (p=0,17)
Insulin-like growth factor 2 binding protein 1 (Igf2bp1)	-1,06 (p=0,38)	1,10 (p=0,19)
Insulin-like growth factor 2 binding protein 2 (Igf2bp2)	-1,11 (p=0,33)	1,03 (p=0,65)
Insulin-like growth factor 2 binding protein 3 (Igf2bp3)	1,01 (p=0,43)	1,00 (p=0,95)
Insulin-like growth factor binding protein-like 1 (Igfbp1)	1,33 (p<0,05)	-1,06 (p=0,66)
Insulin I (Ins1)	1,09 (p=0,46)	1,04 (p=0,73)
Insulin II (Ins2)	1,00 (p=0,94)	-1,07 (p=0,32)
Insulin receptor (Insr)	-1,20 (p=0,27)	1,07 (p=0,56)
Insulin receptor substrate 1 (Irs1)	-1,25 (p=0,05)	1,40 (p<0,05)
Insulin receptor substrate 2 (Irs2)	2,78 (p<0,001)	-1,07 (p=0,57)
Insulin receptor substrate 3 (Irs3)	1,14 (p=0,06)	-1,07 (p=0,26)
Insulin receptor substrate 4 (Irs4)	-3,55 (p<0,01)	1,03 (p=0,89)
Insulin-like 3 (Insl3)	-1,01 (p=0,88)	-1,00 (p=0,97)
Insulin-like 5 (Insl5)	1,36 (p=0,07)	-1,22 (p=0,19)
Insulin-like 6 (Insl6)	1,02 (p=0,74)	-1,07 (p=0,35)
Growth hormone receptor (Ghr)	-1,57 (p<0,05)	1,32 (p=0,05)

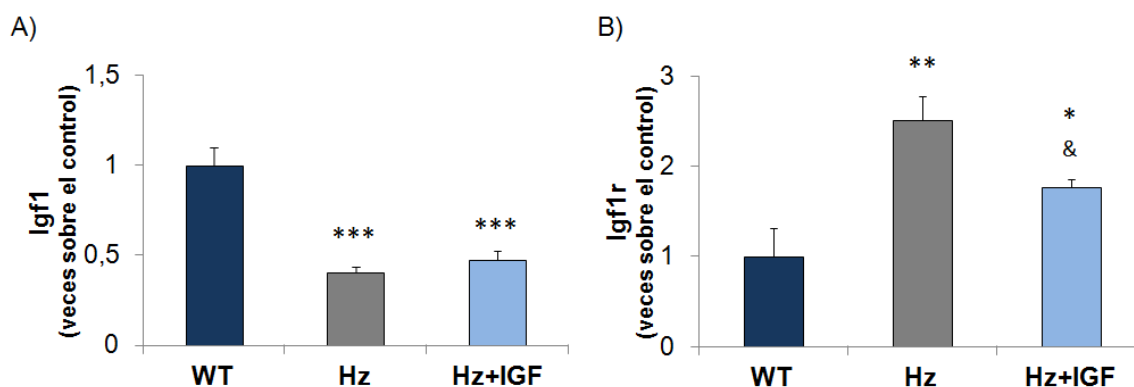
**Tabla 5.** *Expresión relativa de genes relacionados con IGF-1 en cerebro.*

La expresión de genes modulados y de más interés desde el punto de vista de los objetivos de este trabajo se confirmó por PCR cuantitativa, como se expone a continuación.

### IV.2.1. Expresión cerebral del gen de IGF-1 y su receptor.

Como era esperable, la PCR cuantitativa confirmó que, este modelo de delección sistémica del gen *Igf1* presenta una reducción significativa de su expresión en los animales Hz en comparación con los WT, que el tratamiento sustitutivo, lógicamente, no fue capaz de normalizar ( $p < 0,001$ ) (cfr. Figura 35A).

Además, es interesante destacar que se observó una hiper-expresión significativa del gen del receptor de IGF-1 ( $p < 0,01$  Hz vs WT) que la administración exógena de esta hormona redujo significativamente ( $p < 0,05$  vs Hz y  $p < 0,05$  vs WT): Figura 35B.



**Figura 35.** Expresión cerebral del gen *Igf1* y su receptor (*Igf1r*).

\*\*\* $p < 0,001$  vs WT; \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz

### IV.2.2. Expresión cerebral del receptor de la GH (Ghr).

Por otra parte, se confirmó que la deficiencia de IGF-1 se asocia con una hipo-expresión del gen del receptor de GH en el cerebro, que podría explicarse por el insuficiente mecanismo de retroacción negativa de las concentraciones circulantes de IGF-1, que se asociarían con un incremento de las concentraciones circulantes de GH y una consiguiente disminución de la expresión de su receptor de membrana. Congruentemente, la terapia sustitutiva indujo un incremento significativo del gen de *Ghr* en el cerebro (Figura 36).

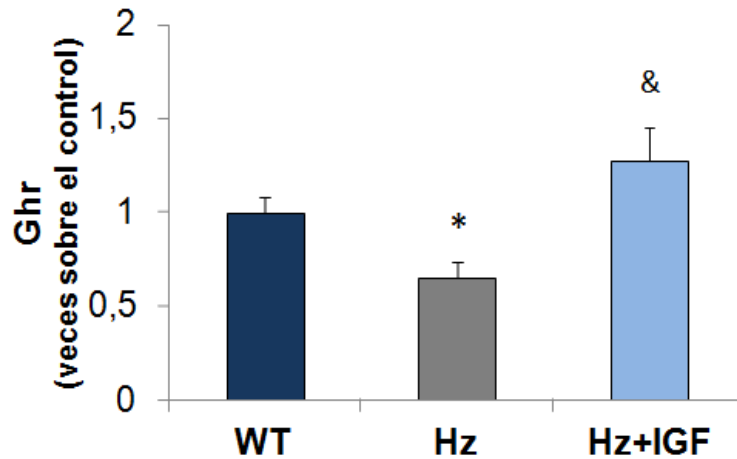


Figura 36. Expresión cerebral del gen del receptor de GH (*Ghr*).

\* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

#### IV.2.3. Expresión génica cerebral de IGF-2.

Otro aspecto que merece especial atención es que, la deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una significativa reducción del gen *Igf2* ( $P < 0,05$  Hz vs WT), que la terapia sustitutiva con IGF-1 incrementó significativamente ( $p = ns$  Hz+IGF vs WT).

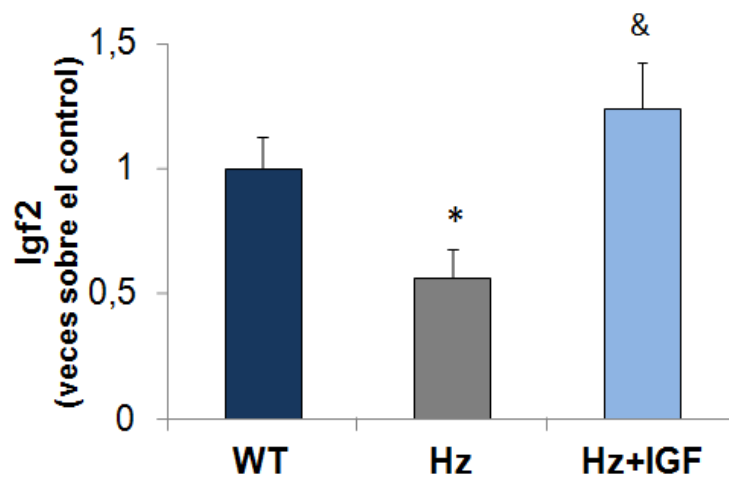
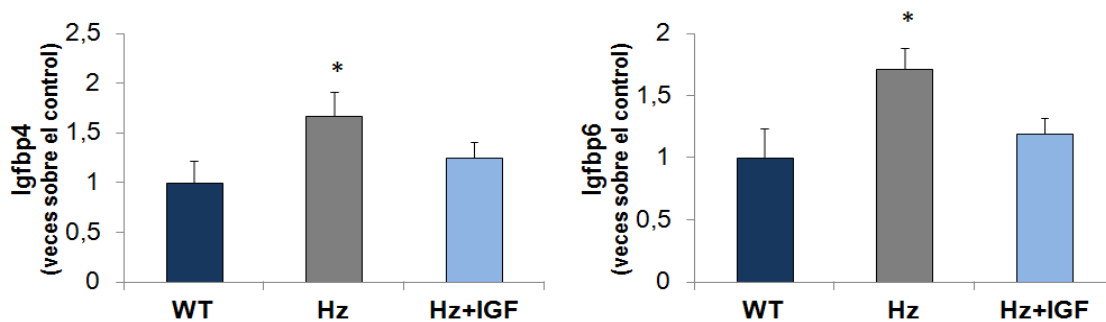


Figura 37. Expresión cerebral del gen *Igf2*. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

#### IV.2.4. Expresión de los genes de las principales proteínas transportadoras de IGFs (IGFBPs).

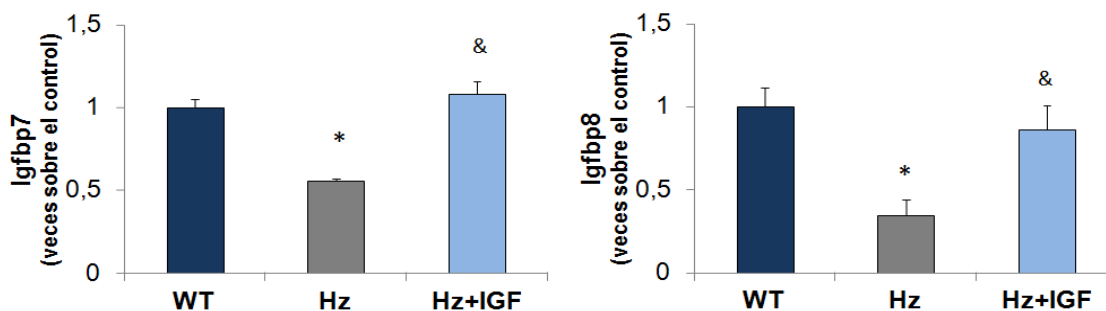
El estudio de expresión génica se centró en aquellas IGFBPs que alcanzaron significación estadística en el microarray ( $>1,5$  fold change y  $p < 0,05$ ) al comparar los grupos de tratamiento Hz vs WT. Estos datos preliminares fueron posteriormente confirmados por PCR cuantitativa.

La deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una hiper-expresión cerebral de las proteínas de unión a IGF-1 inhibitoras IGFBP-4 e IGFBP-6, que el tratamiento sustitutivo con IGF-1 fue capaz de normalizar (cfr. Figura 38).



**Figura 38.** Expresión génica de IGFBP-4 y IGFBP-6 en cerebro de animales WT, Hz y Hz+IGF. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

Por otro lado, la deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una hipopresión génica en cerebro de IGFBP-7 e IGFBP-8, que el tratamiento sustitutivo con dosis bajas de IGF-1 fue capaz de revertir (Figura 39).



**Figura 39.** Expresión génica de IGFBP-7 y IGFBP-8 en tejido cerebral procedente de los tres grupos experimentales. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.



### IV.3. ESTUDIO EN CEREBRO DE GENES RELACIONADOS CON EL DAÑO OXIDATIVO, INFLAMACIÓN Y MUERTE CELULAR.

#### IV.3.1. Expresión génica de las principales enzimas anti-oxidantes.

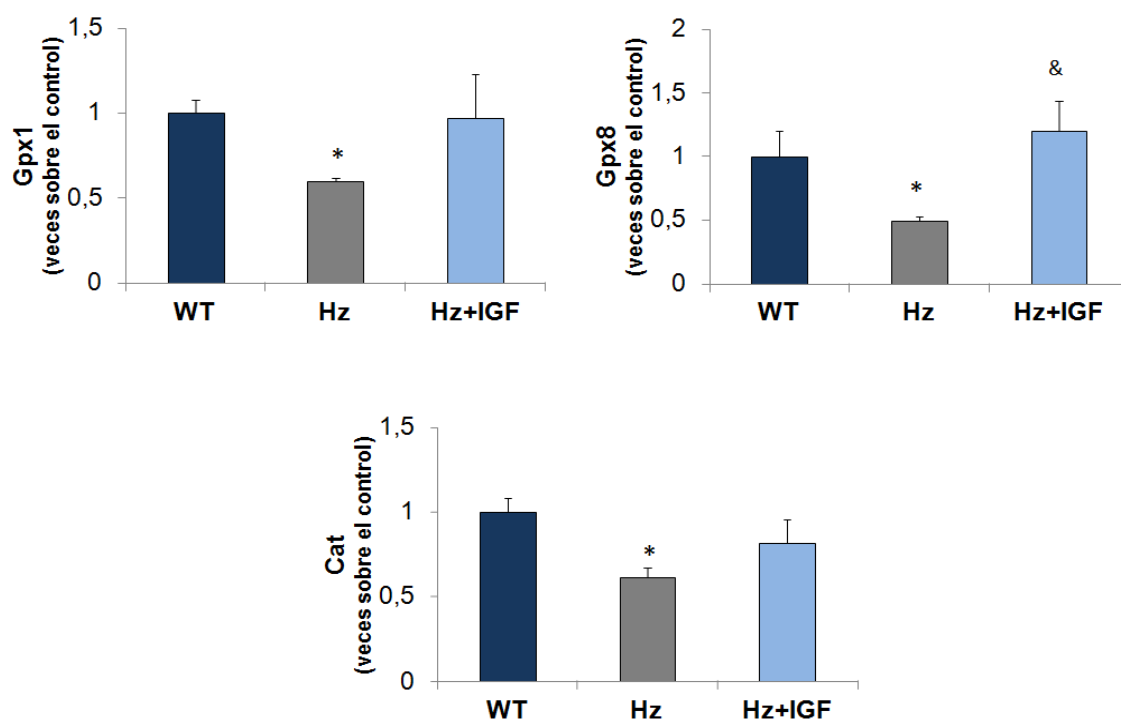
El estudio por microarray puso de manifiesto que la sola deficiencia de IGF-1 modula la expresión génica de relevantes enzimas anti-oxidantes, tales como la glutathion peroxidasa y la catalasa. La tabla 6 resume los hallazgos en la expresión de éstos y otros genes.

Nombre del gen	Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
Glutaredoxin (Glrx)	-1,76 (p<0,01)	-1,03 (p=0,85)
Glutathione peroxidase 1 (Gpx1)	-2,08 (p<0,001)	1,48 (p<0,001)
Glutathione peroxidase 2 (Gpx2)	-1,08 (p=0,32)	1,10 (p=0,23)
Glutathione peroxidase 3 (Gpx3)	-1,41 (p<0,05)	-1,05 (p=0,70)
Glutathione peroxidase 4 (Gpx4)	-1,06 (p=0,37)	1,13 (p=0,05)
Glutathione peroxidase 5 (Gpx5)	1,09 (p=0,49)	-1,06 (p=0,65)
Glutathione peroxidase 6 (Gpx6)	-1,11 (p=0,50)	-1,10 (p=0,55)
Glutathione peroxidase 7 (Gpx7)	-1,08 (p=0,58)	-1,29 (p=0,14)
Glutathione peroxidase 8 (Gpx8)	-2,67 (p<0,001)	1,83 (p<0,01)
Glutathione reductase (Gsr)	-1,21 (p=0,18)	1,16 (p=0,30)
Glutathione S-transferase kappa 1 (Gstk1)	-1,07 (p=0,38)	-1,01 (p=0,96)
Glutathione S-transferase, pi 1 (Gstp1)	1,08 (p=0,12)	-1,03 (p=0,41)
Catalase (Cat)	-1,64 (p<0,05)	1,27 (p=0,68)
Peroxiredoxin 1 (Prdx1)	-1,67 (p<0,05)	1,16 (p=0,22)
Peroxiredoxin 2 (Prdx2)	1,40 (p<0,01)	-1,60 (p<0,01)
Peroxiredoxin 3 (Prdx3)	-1,41 (p<0,01)	1,08 (p=0,22)
Peroxiredoxin 4 (Prdx4)	-1,57 (p<0,05)	1,05 (p=0,54)
Peroxiredoxin 5 (Prdx5)	1,03 (p=0,72)	-1,17 (p=0,10)
Peroxiredoxin 6 (Aass)	1,57 (p<0,01)	1,27 (p<0,05)
Peroxiredoxin 6, pseudogene 1 (Prdx6)	-1,17 (p=0,18)	1,17 (p=0,28)
Superoxide dismutase 1, soluble (Sod1)	-1,15 (p<0,01)	-1,05 (p=0,71)
Superoxide dismutase 2, mitocondrial (Sod2)	-1,36 (p<0,01)	1,22 (p=0,10)
Superoxide dismutase 3, extracelular (Sod3)	1,06 (p=0,67)	1,12 (p=0,43)
Thioredoxin 1 (Txn1)	-1,17 (p<0,05)	-1,09 (p=0,19)
Thioredoxin interacting protein (Txnip)	-1,97 (p<0,01)	1,17 (p=0,13)
Thioredoxin reductase 1 (Txnrd1)	1,18 (p=0,18)	1,06 (p=0,64)
Thioredoxin reductase 2 (Txnrd2)	1,11 (p=0,28)	1,23 (p=0,18)
Thioredoxin reductase 3 (Txnrd3)	-1,16 (p=0,10)	-1,07 (p=0,47)
Thioredoxin-like 4B (Txnl4b)	1,63 (p<0,01)	-1,19 (p=0,11)
Copper chaperone for superoxide dismutase (Ccs)	-1,01 (p=0,93)	-1,09 (p=0,24)

**Tabla 6.** Expresión relativa de enzimas anti-oxidantes en cerebro.

Además de los genes de la familia de la glutatión peroxidasa, destacó la reducción de la catalasa y de algunos miembros de la familia de las peroxirredoxinas.

El estudio por PCR cuantitativa confirmó que la deficiencia parcial de IGF-1 se asocia con la hipo-expresión significativa ( $p < 0,05$  vs WT) de los genes *Gpx1*, *Gpx8* y *Cat*. Todos ellos reducen el peróxido de hidrógeno a agua, evitando la producción del radical hidróperóxido ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), que peroxida los lípidos membrana, incluidas las mitocondriales, carboxila las proteínas y promueve la fragmentación del DNA (cfr. Figura 14). El tratamiento sustitutivo con dosis bajas de IGF-1 durante 10 días, fue capaz de elevar la expresión génica a valores similares a los controles ( $p = \text{ns}$  Hz+IGF vs WT): Figura 40.



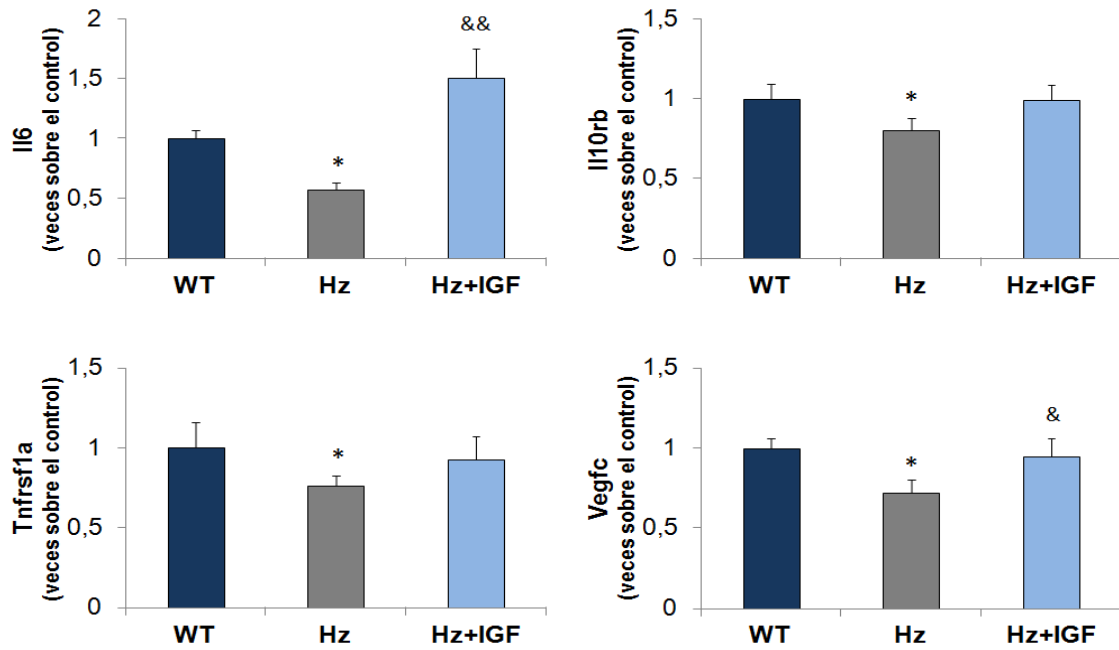
**Figura 40.** Expresión génica genes anti-oxidantes modulados con la deficiencia de IGF-1 y el tratamiento sustitutivo. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

### IV.3.2. Expresión génica de enzimas pro-oxidantes, interleuquinas y factores pro-inflamatorios y angiogénicos.

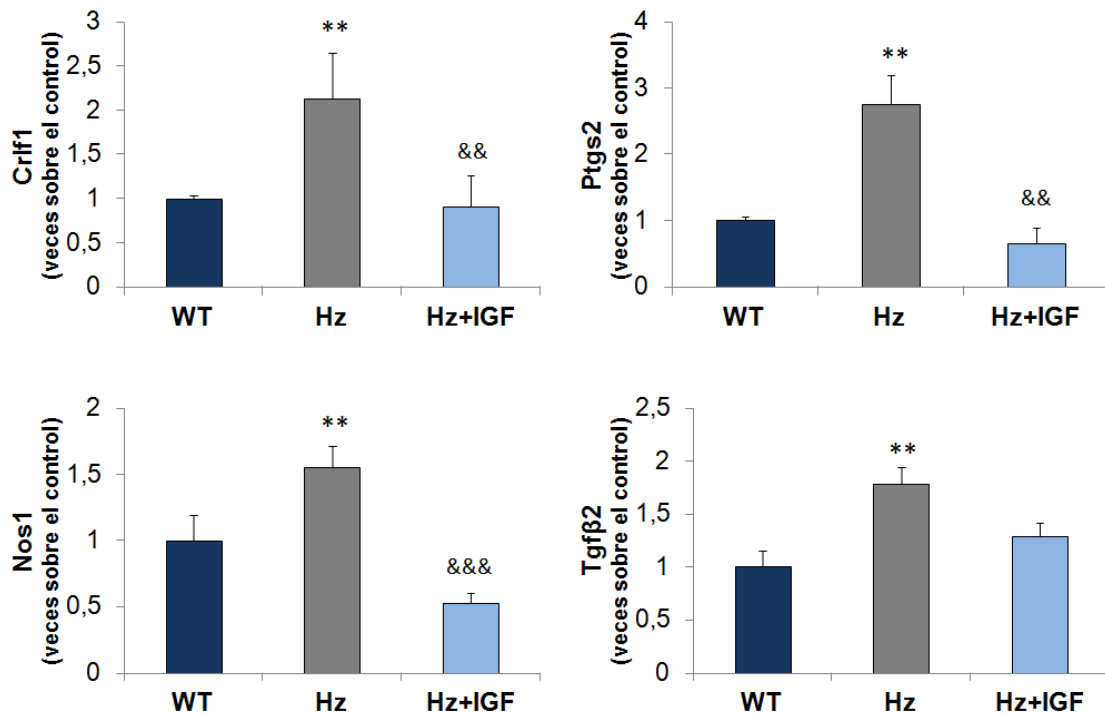
El estudio por microarray desveló que la mera deficiencia de IGF-1, se relacionaba con una alterada expresión de distintos factores pro-oxidantes, pro-inflamatorios y angiogénicos (cfr. Tabla 7).

Nombre del gen	Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
Eosinophil peroxidase (Epx)	-1,21 (p<0,05)	-1,05 (p=0,48)
Lactoperoxidase (Lpo)	-1,12 (p=0,30)	-1,03 (p=0,73)
Monoamine oxidase A (Maoa)	-2,82 (p<0,05)	1,29 (p=0,46)
Monoamine oxidase B (Maob)	1,14 (p=0,15)	1,26 (p<0,05)
Myeloperoxidase (Mpo)	-3,73 (p<0,01)	1,03 (p=0,87)
Peroxidasin homolog (Drosophila) (Pxdn)	2,49 (p<0,01)	1,01 (p=0,94)
Xanthine dehydrogenase (Xdh)	1,81 (p<0,01)	-1,22 (p=0,10)
Interferon gamma (Ifng)	1,09 (p=0,06)	-1,08 (p=0,07)
Interleukin 1 alpha (Il1a)	-1,01 (p=0,98)	-1,07 (p=0,17)
Interleukin 1 beta (Il1b)	-1,93 (p<0,001)	1,05 (p=0,48)
Interleukin 6 (Il6)	-3,06 (p<0,001)	1,58 (p<0,05)
Interleukin 10 (Il10)	-1,05 (p=0,42)	1,12 (p=0,09)
Interleukin 10 receptor, beta (Il10rb)	-1,93 (p<0,01)	1,34 (p=0,06)
Interleukin 22 (Il22)	-2,67 (p<0,001)	1,02 (p=0,81)
Cytokine receptor-like factor 1 (Crlf1)	1,60 (p<0,05)	-2,01 (p<0,05)
Nerve growth factor (Ngf)	1,37 (p<0,05)	-1,21 (p=0,10)
Nerve growth factor receptor (Ngfr)	-1,24 (p<0,05)	1,11 (p=0,37)
Neuroglobin (Ngb)	1,17 (p<0,05)	-1,35 (p<0,05)
Neutrophil cytosolic factor 2 (Ncf2)	-1,72 (p<0,05)	-1,16 (p=0,30)
Nitric oxide synthase 1, neuronal (Nos1)	2,57 (p<0,05)	-2,44 (p<0,05)
Nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2)	-1,08 (0,53)	-1,02 (0,89)
Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (Ptgs1)	-1,25 (p=0,15)	1,24 (p=0,05)
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2)	2,92 (p<0,001)	-2,81 (p<0,001)
Transforming growth factor, alpha (Tgfa)	-1,51 (p<0,01)	1,18 (p<0,05)
Transforming growth factor, beta 1 (Tgfb1)	1,07 (p=0,40)	-1,07 (p=0,43)
Transforming growth factor, beta 2 (Tgfb2)	2,26 (p<0,001)	-3,04 (p<0,001)
Transforming growth factor, beta receptor II (Tgfb2)	3,21 (p<0,001)	1,09 (p=0,18)
Tumor necrosis factor (Tnf)	-1,01 (p=0,95)	-1,03 (p=0,83)
Tumor necrosis factor receptor, member 10b (Tnfrsf10b)	-1,10 (p=0,25)	1,08 (p=0,47)
Tumor necrosis factor receptor, member 1a (Tnfrsf1a)	-1,50 (p<0,05)	1,21 (p=0,94)
Vascular endothelial growth factor A (Vegfa)	1,17 (p=0,09)	-1,15 (p=0,12)
Vascular endothelial growth factor B (Vegfb)	1,80 (p<0,05)	-1,06 (p=0,76)
Vascular endothelial growth factor C (Vegfc)	-1,51 (p=0,89)	1,63 (p=0,05)

**Tabla 7.** Expresión relativa de enzimas y factores pro-inflamatorios y angiogénicos.



**Figura 41.** Genes hipo-expresados en cerebros de animales con deficiencia parcial de IGF-1. \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz; & $p < 0,05$  vs Hz.



**Figura 42.** Genes inflamatorios hiper-expresados en cerebro procedente de animales con deficiencia parcial de IGF-1. \*\* $p < 0,01$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz.

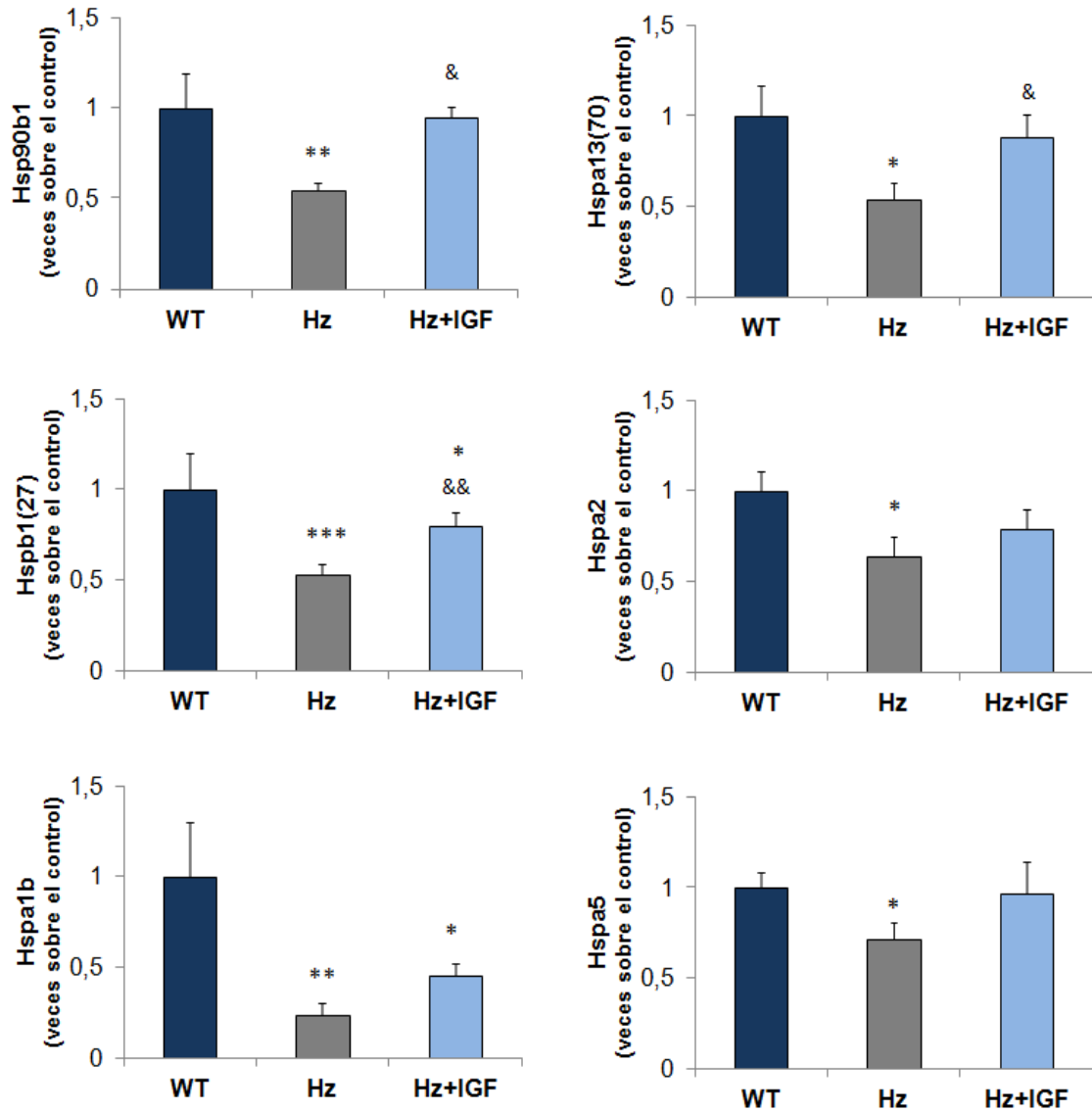
### IV.3.3. Expresión de genes que codifican para las chaperonas “*heat shock proteins*” (HSPs) implicadas en el equilibrio redox.

El estudio de la expresión de genes de la familia de HSPs, que como se mencionó previamente poseen, por lo general, propiedades bioprotectoras, sugirió que la sola deficiencia parcial de IGF-1 se asocia con una disminución significativa de su expresión génica.

Nombre del gen	Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
Heat shock factor 1 (Hsf1)	1,69 (p<0,05)	1,01 (p=0,91)
Heat shock protein 1 (Hspb1) (Hsp27)	-1,61 (p<0,01)	2,07 (p<0,001)
Heat shock protein 1B (Hspa1b)	-3,80 (p<0,001)	1,90 (p<0,01)
Heat shock protein 2 (Hspa2)	-2,80 (p<0,001)	2,29 (p<0,001)
Heat shock protein 4 (Hspa4)	-1,10 (p=0,23)	-1,03 (p=0,62)
Heat shock protein 4 like (Hspa4l)	-1,68 (p<0,05)	-1,19 (p=0,11)
Heat shock protein 5 (Hspa5)	-1,53 (p<0,01)	1,33 (p<0,05)
Heat shock protein 8 (Hspa8)	-2,53 (p<0,001)	-1,06 (p=0,36)
Heat shock protein 9 (Hspa9)	1,12 (p=0,21)	1,14 (p=0,20)
Heat shock protein 12A (Hspa12a)	1,78 (p<0,01)	-1,40 (p<0,05)
Heat shock protein 13 (Hspa13) (Hsp70)	-3,08 (p<0,001)	2,59 (p<0,001)
Heat shock protein 90, alpha, class A1 (Hsp90aa1)	-1,30 (p=0,38)	-1,02 (p=0,64)
Heat shock protein 90, beta (Grp94), memb. 1 (Hsp90b1)	-1,56 (p=0,41)	1,49 (p=0,46)
Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C 3 (Dnajc3)	-1,69 (p<0,01)	1,23 (p=0,19)
Hspb associated protein 1 (Hspbap1)	1,10 (p=0,35)	1,06 (p=0,34)
HSPA binding protein, cochaperone 1 (Hspbp1)	2,14 (p<0,05)	-1,05 (p=0,81)

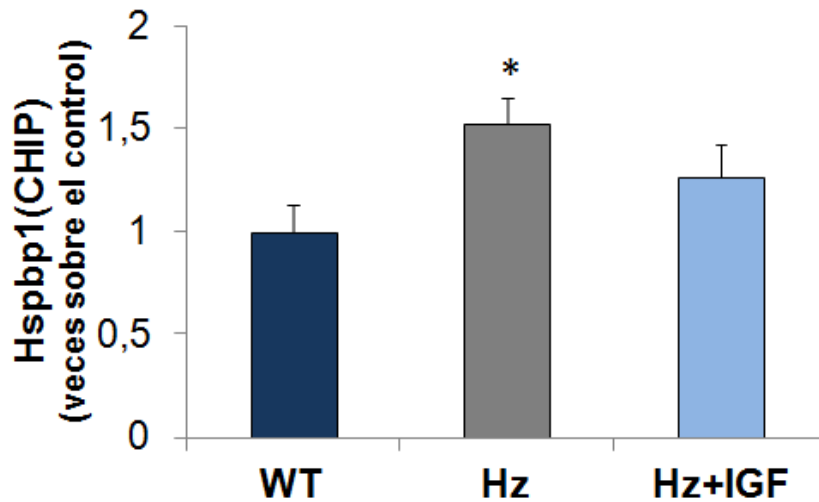
**Tabla 8.** Expresión relativa de genes de la familia de las HSPs.

En efecto, el estudio por PCR cuantitativa demostró que la deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una hipo-expresión de los genes que codifican para *Hspa13* (o *Hsp70*), *Hsp90b1*, *Hspb1* (o *Hsp27*), *Hspa1b* y *Hspa5*, que participan en las principales rutas para disminuir la agresión oxidativa y/o la cascada de las caspasas (cfr. Figura 16). La terapia sustitutiva incrementó la expresión de estos tres genes a valores próximos a los controles: Figura 43.



**Figura 43.** Expresión cerebral de genes que codifican para las llamadas “proteínas de choque térmico” (HSPs). \*\*\* $p < 0,001$  vs WT; \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz; & $p < 0,05$  vs Hz.

Por otra parte, se encontró que la deficiencia parcial de IGF-1 se asociaba con una significativa hiper-expresión del gen *Hspb1* (o CHIP), que interacciona con Hsp70 y Hsp90 inhibiendo el correcto plegamiento proteico dependiente de estas chaperonas. La terapia sustitutiva con IGF-1 revirtió su expresión génica hasta valores normales (Figura 44).



**Figura 44.** Expresión génica de *Hspbp1* (CHIP) en los tres grupos experimentales. \* $p < 0,05$  vs WT.

**IV.3.4. Expresión de otros genes implicados en las rutas de señalización del receptor de IGF-1 que se relacionan con la protección mitocondrial, supervivencia celular, autofagia y apoptosis.**

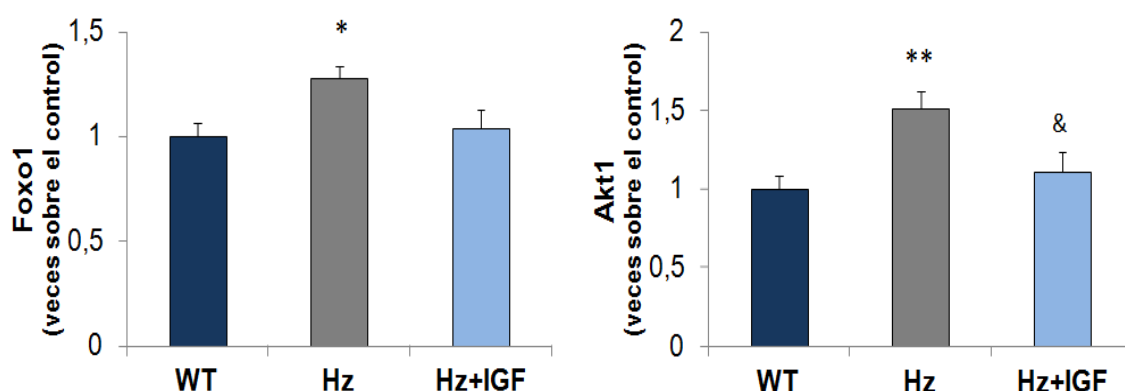
**IV.3.4.1. Genes implicados en las rutas de señalización de IGF-1.**

El análisis de expresión génica por microarray sugirió que la sola deficiencia de IGF-1 se acompaña con una congruente modulación de las principales vías de señalización dependientes del receptor de IGF-1 (Tabla 9).

Se confirmó por PCR cuantitativa que la deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una hipo-expresión de *Foxo1* y *Akt1*, que la terapia sustitutiva con IGF-1 normalizó (crf. Figura 45).

Nombre del gen	Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
Forkhead box O1 (Foxo1)	2,79 (p<0,01)	-2,16 (p=0,07)
Harvey rat sarcoma virus oncogene 1 (Hras1)	1,77 (p<0,05)	-1,09 (p=0,54)
Harvey rat sarcoma virus oncogene 1R (Rras1)	1,38 (p=0,24)	1,08 (p=0,76)
Mechanistic target of rapamycin (Mtor)	1,27 (p<0,05)	-1,14 (p=0,05)
Nuclear factor of kappa gene enhancer in B-cells (Nfkb)	-1,69 (p<0,01)	1,11 (p=0,30)
Proliferating cell nuclear antigen (Pcna)	-1,49 (p<0,05)	-1,12 (p=0,43)
Son of sevenless homolog 1 (Sos1)	-2,28 (p<0,001)	1,16 (p=0,19)
Son of sevenless homolog 2 (Sos2)	-1,60 (p<0,01)	1,26 (p<0,05)
Cyclin D2 (Ccnd2)	10,09 (p<0,001)	-1,92 (p<0,01)
Thymoma viral proto-oncogene 1 (Atk1)	2,11 (p<0,05)	-1,25 (p=0,05)
Thymoma viral proto-oncogene 2 (Atk2)	1,61 (p<0,05)	1,66 (p<0,05)
Thymoma viral proto-oncogene 3 (Atk3)	2,38 (p<0,001)	-1,26 (p=0,15)

**Tabla 9.** Genes implicados en las rutas de señalización de IGF-1.



**Figura 45.** Expresión de genes implicados en rutas de señalización del receptor de IGF-1 (Foxo1 y Akt1). \*\*p<0,01 vs WT; \*p<0,05 vs WT; &p<0,05 vs Hz.

#### IV.3.4.2. Genes relacionados con la protección mitocondrial y la supervivencia celular.

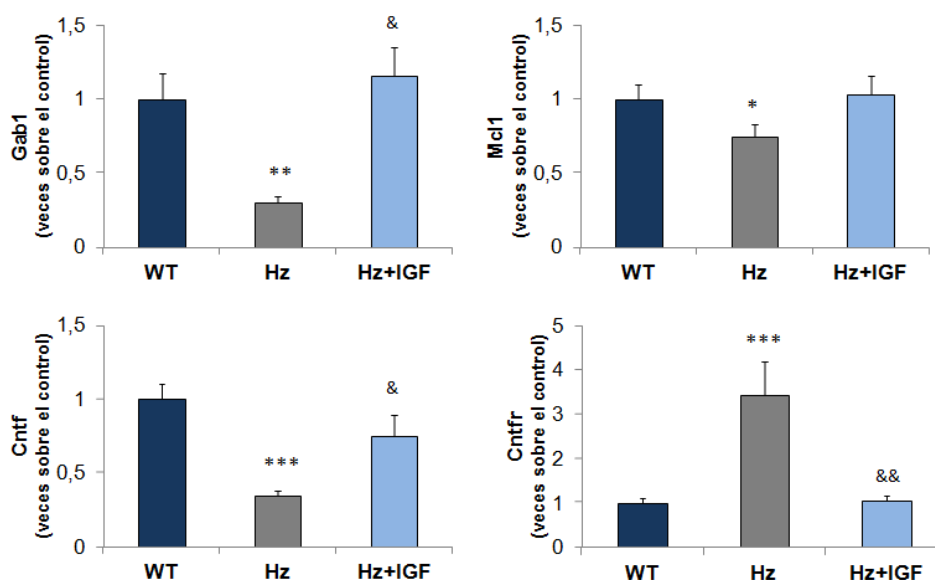
El análisis preliminar de la expresión génica se dirigió a investigar si la deficiencia de IGF-1 podría modular la expresión de genes relacionados con la protección mitocondrial (familia Bcl2) y la supervivencia celular (NADPH oxidasas, Gab1, Cntf,...).



Nombre del gen	Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)	-1,34 (p<0,05)	1,48 (p<0,01)
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like (Bnip3l)	-1,46 (p<0,01)	1,15 (p=0,22)
BCL2-associated agonist of cell death (Bad)	1,07 (p=0,31)	1,07 (p=0,27)
Ciliary neurotrophic factor (Cntf)	-2,79 (p<0,001)	1,32 (p=0,66)
Ciliary neurotrophic factor receptor (Cntfr)	1,45 (p<0,05)	-1,04 (p=0,59)
Growth factor receptor bound protein 2-ap1 (Gab1)	-2,52 (p<0,001)	1,58 (p<0,01)
Transmembrane BAX inhibitor motif cont. 1 (Tmbim1)	-2,08 (p<0,01)	1,16 (p=0,32)
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (Nqo1)	-1,55 (p<0,05)	-1,12 (p=0,44)
NADPH oxidase 4 (Nox4)	-1,13 (p=0,19)	1,09 (p=0,35)
NADPH oxidase organizer 1 (Noxo1)	-1,14 (p=0,45)	1,01 (p=0,95)
Myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl1)	-2,44 (p<0,001)	1,33 (p<0,01)

**Tabla 10.** Genes relacionados con la protección mitocondrial y supervivencia.

La deficiencia de IGF-1 presentó una hipo-expresión de genes relacionados con la protección mitocondrial y la supervivencia celular, cuya confirmación por PCR cuantitativa demostró que la deficiencia de IGF-1 se asoció con una hipo-expresión significativa de *Mcl1*, *Gab1* y *Cntf*. Asimismo, se encontró una hiper-expresión del receptor de CNTF (*Cntfr*), probablemente de naturaleza compensativa. La expresión de estos cuatro genes se normalizó por la terapia sustitutiva con IGF-1 (Figura 46).



**Figura 46.** Expresión génica de factores implicados en la protección mitocondrial y la supervivencia celular. \*\*\*p<0,001 vs WT; \*\*p<0,01 vs WT; \*p<0,05 vs WT; &&p<0,01 vs Hz; &p<0,05 vs Hz.

En el caso del Bcl2, no se confirmaron las diferencias en la expresión génica entre animales WT y Hz. Sin embargo, el tratamiento sustitutivo con IGF-1 indujo un incremento significativo de la expresión de este gen que codifica para una de las principales proteínas encargadas de la protección mitocondrial (cfr. Figura 47)

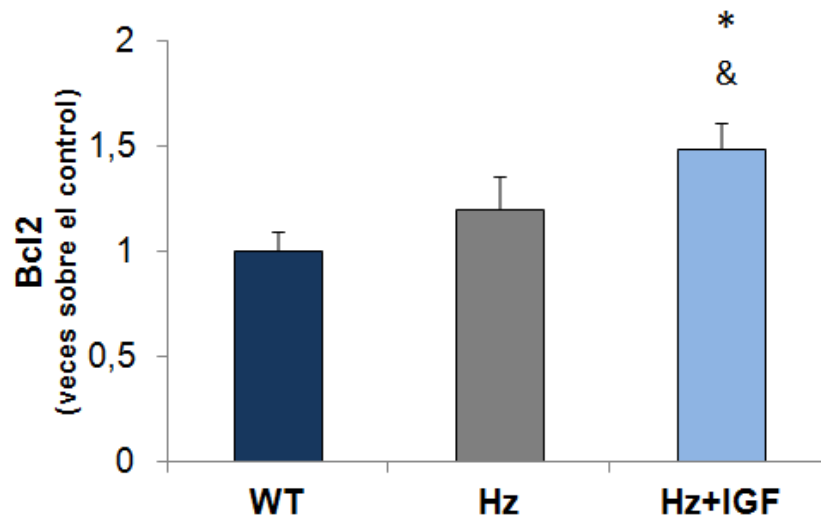


Figura 47. Expresión génica de Bcl2. \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

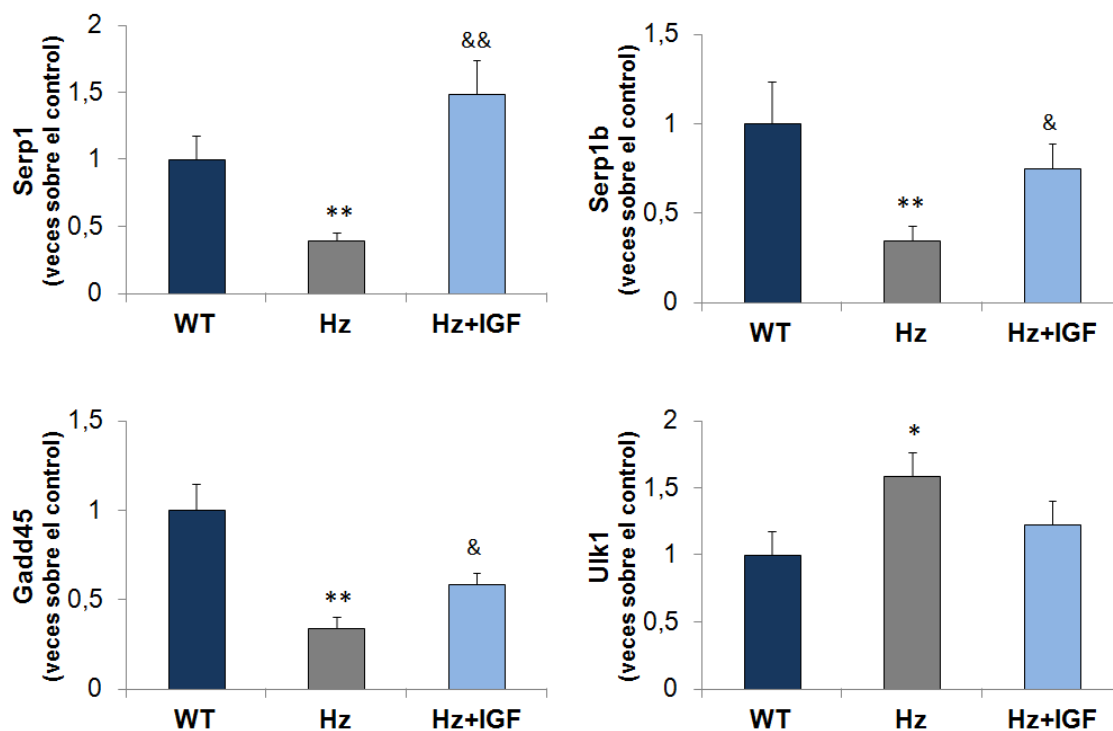
#### IV.3.4.4. Estudio de la expresión de genes relacionados con la muerte celular y la respuesta a la hipoxia.

A continuación, se llevó el análisis de genes involucrados en procesos relacionados con la autofagia (familia de las Atg, *Ulk1*), la respuesta a la hipoxia (familia de las serpinas, *Gadd45*) y la muerte celular, tanto por apoptosis (familia de las caspasas, *Fas*, *Bid*) como por necrosis (*Parp1*, *Grb2*).

Nombre del gen	Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
Serine peptidase inhibitor, clade B1b (Serp1b)	-3,68 (p<0,001)	1,36 (p=0,34)
Serine peptidase inhibitor, clade E1 (Serp1e)	-2,15 (p<0,001)	1,03 (p=0,69)
Growth arrest and DNA-damage-inducible 45a (Gadd45a)	-3,64 (p<0,001)	1,66 (p<0,05)
Growth arrest and DNA-damage-inducible 45g (Gadd45g)	-1,48 (p<0,05)	-1,48 (p<0,05)
Unc-51 like kinase 1 (Ulk1)	1,52 (p=0,05)	-1,11 (p=0,36)
Autophagy-related 3 (Atg3)	1,08 (p=0,31)	-1,02 (p=0,75)
Autophagy related 2 homolog A (Atg2a)	1,71 (p<0,05)	1,03 (p=0,88)
Autophagy-related 4b (Atg4b)	1,27 (p=0,14)	-1,19 (p=0,25)
Autophagy-related 5 (Atg5)	-2,01 (p<0,01)	1,23 (p=0,10)
Autophagy-related 7 (Atg7)	1,15 (p<0,05)	1,02 (p=0,80)
Autophagy-related 9A (Atg9a)	2,39 (p<0,05)	-1,01 (p=0,98)
Autophagy-related 12 (Atg12)	-1,03 (p=0,77)	-1,01 (p=0,99)
Autophagy-related 14 (Atg14)	1,20 (p=0,15)	-1,02 (p=0,88)
Autophagy related 13 homolog (Atg13)	1,49 (p<0,05)	-1,07 (p=0,40)
Autophagy-related 16-like1 (Atg16l1)	1,34 (p<0,05)	-1,02 (p=0,80)
Sestrin 3 (Sesn3)	-1,06 (p=0,18)	1,21 (p<0,01)
Apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf1)	3,34 (p<0,01)	-3,70 (p<0,001)
BH3 interacting domain death agonist (Bid)	1,74 (p<0,001)	-1,68 (p<0,001)
BCL2-associated X protein (Bax)	-1,09 (p=0,40)	-1,03 (p=0,74)
BCL2-antagonist/killer 1 (Bak1)	1,12 (p=0,16)	-1,03 (p=0,77)
Endonuclease G (Endog)	-1,12 (p=0,26)	-1,14 (p=0,14)
Caspase 1 (Casp1)	1,10 (p=0,40)	-1,37 (p<0,05)
Caspase 3 (Casp3)	1,12 (p=0,52)	1,03 (p=0,80)
Caspase 8 (Casp8)	-1,09 (p=0,64)	-1,00 (p=0,99)
Caspase 9 (Casp9)	1,80 (p<0,05)	-1,01 (p=0,93)
Growth factor receptor bound protein 2 (Grb2)	1,52 (p<0,01)	-1,47 (p=0,07)
Fas (TNF receptor superfamily member 6) (Fas)	-1,18 (p=0,21)	-1,02 (p=0,85)
Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 (Parp1)	1,76 (p<0,05)	-1,29 (p=0,22)

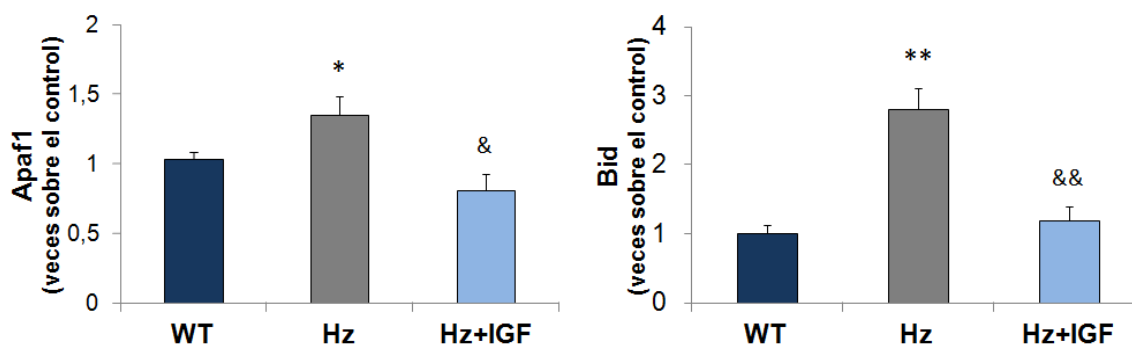
**Tabla 11.** Genes relacionados con la muerte celular.

Tras su confirmación por PCR cuantitativa, se encontró una alterada expresión génica de genes implicados en la autofagia (*Ulk1*) y la respuesta a la hipoxia (*Serp1*, *Serp1b*, y *Gadd45a*), que sugieren una mayor vulnerabilidad celular en los animales deficientes de IGF-1.



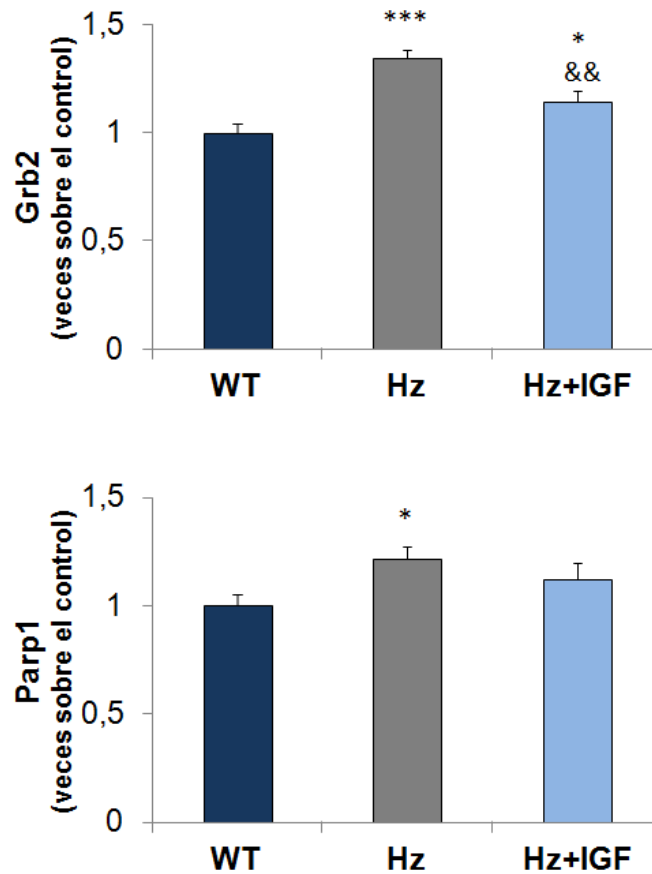
**Figura 48.** Expresión génica de factores implicados en la autofagia y la respuesta a la hipoxia. \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; & $p < 0,05$  vs Hz.

En cuanto a genes pro-apoptóticos, se demostró por PCR cuantitativa la hiper-expresión de *Bid* (un agonista capaz de interactuar con Bcl2, Mcl1 y algunas caspasas) y *Apaf1* (regulador clave de la vía apoptótica mitocondrial y elemento central del apoptosoma).



**Figura 49.** Expresión de genes pro-apoptóticos (*Apaf1* y *Bid*). \*\* $p < 0,01$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz; & $p < 0,05$  vs Hz.

En lo referente a los genes relacionados con muerte celular, se encontró una inadecuada expresión de *Parp1* y *Grb2*, marcadores de necrosis, que el tratamiento con IGF-1 fue capaz de normalizar (cfr. Figura 50).

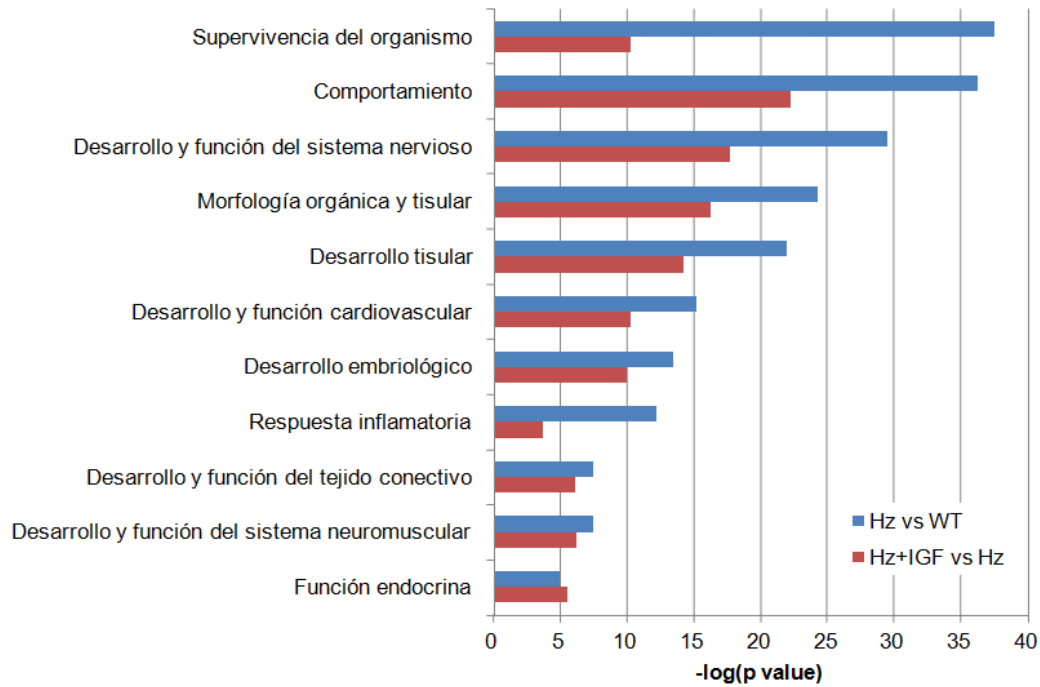


**Figura 50.** Expresión de genes relacionados con necrosis.

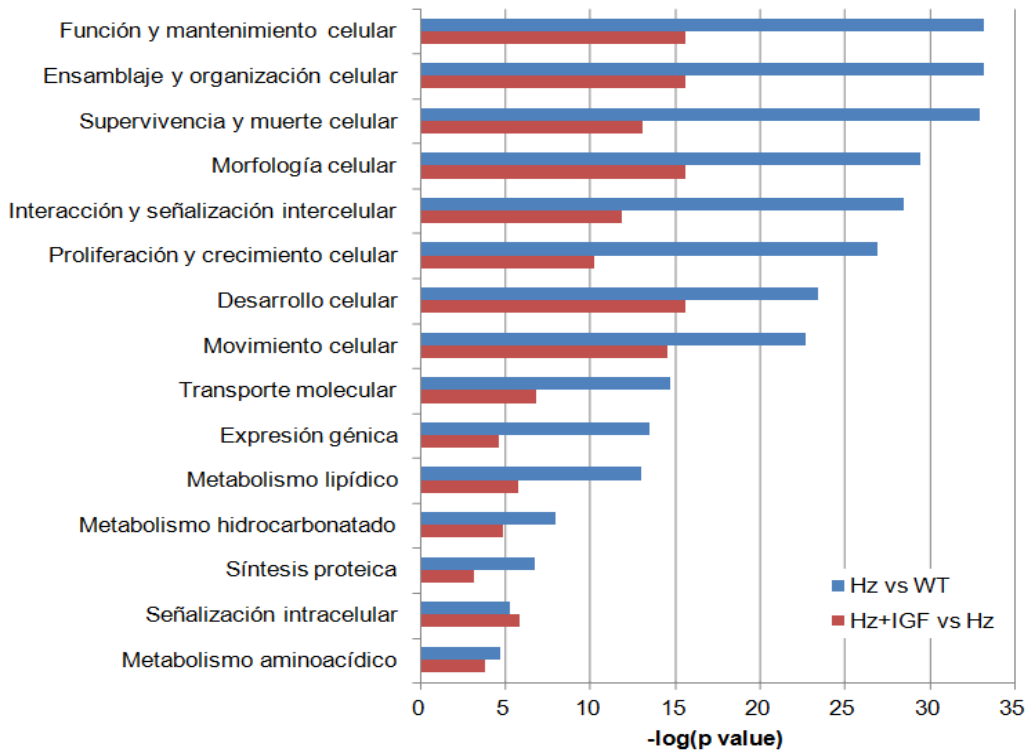
\*\*\* $p < 0,001$  vs WT; \* $p < 0,05$  vs WT; && $p < 0,01$  vs Hz.

#### IV.4. ANÁLISIS *IN SILICO* DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA.

La clasificación funcional del perfil de expresión génica en los tres grupos experimentales se resume en las Figuras 51 y 52.



**Figura 51.** Genes modulados por la sola deficiencia de IGF-1 (Hz vs WT) agrupados por funciones en tejidos y órganos, y el efecto de la administración exógena de IGF-1 (Hz+IGF vs Hz).



**Figura 52.** Genes implicados en la fisiología celular y el metabolismo que se modulan con la deficiencia de IGF-1 (Hz vs WT) y el efecto de la terapia sustitutiva con IGF-1 (Hz+IGF vs Hz).

## **V. DISCUSIÓN**

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la mera deficiencia parcial de IGF-1 se asocia con significativas alteraciones morfológicas y en la expresión de genes relacionados con el equilibrio redox, la inflamación, la activación de la cascada de las caspasas, la respuesta a la hipoxia y la muerte y supervivencia celular.

### **V.1. IDONEIDAD DEL MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA REPRODUCIR LA DEFICIENCIA PARCIAL DE IGF-1 OBSERVADA EN LA PATOLOGÍA HUMANA.**

En los últimos años se ha venido sugiriendo el papel de IGF-1 en el sistema nervioso central (Bondy C.A. *et al.*, 2004; Torres-Aleman I., 2010), incluyendo tanto su normal desarrollo como posibles patologías neurológicas, tales como la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y demencias vasculares (Carro E. *et al.*, 2002; Torres-Aleman I., 2007). En todos ellos se destaca la relevancia que IGF-1 posee en el control de la homeostasis cerebral (Bondy C.A. *et al.*, 2004; Torres-Aleman I., 2010), durante el neurodesarrollo (Netchine I. *et al.*, 2009), en la protección, proliferación y diferenciación neural (Brooker G.J. *et al.*, 2000; Trejo J.L. *et al.*, 2002), al igual que su participación en la sinaptogénesis (Ding Q. *et al.*, 2006) y mielinización (Cheng H.L. *et al.*, 1999).

El presente trabajo se encuadra en una amplia línea de investigación iniciada hace más de veinte años, centrada en la caracterización de "condiciones de deficiencia de IGF-1", en el que la administración exógena pudiera recuperar las concentraciones circulantes de esta hormona y contribuir a revertir el proceso fisiopatológico que se establece por la deficiencia de IGF-1 y la consiguiente disfunción del eje GH/IGF-1, que se manifiesta con diferentes síntomas según la edad del individuo y la progresión de la deficiencia –sea local o sistémica-. Asimismo, la coexistencia o preexistencia de otros procesos fisiopatológicos (como es el caso de la cirrosis hepática) hacen que los efectos de la sola deficiencia de IGF-1 sean menos evidentes o, incluso, costosamente reconocibles.



Las condiciones de deficiencia de IGF-1 mejor conocidas en la patología humana son: el síndrome de Laron, la cirrosis hepática y el envejecimiento (Laron Z. *et al.*, 1966, 1999 y 2004; Wu A. *et al.*, 1974; Chang T.C. *et al.*, 1990; Quiroga J. *et al.*, 1992; Castilla-Cortazar I. *et al.*, 1997; Garcia-Fernandez M. *et al.*, 2008; Puche J.E. *et al.*, 2008). Sin embargo, recientemente se han descrito otras condiciones que podrían estar también relacionadas con una deficiencia de IGF-1, como ciertas enfermedades neurodegenerativas o el crecimiento intrauterino retardado (Randhawa R. y Cohen P., 2005; Leal Ade C. *et al.*, 2011; Carro E. *et al.*, 2002; Torres-Aleman I., 2007). Por todo ello, el estudio de nuevas condiciones de deficiencia de IGF-1 y de sus potenciales implicaciones patológicas está adquiriendo un creciente interés.

En este contexto, el establecimiento de un modelo experimental en el que sólo se reproduzca la deficiencia parcial de IGF-1, entendemos que es un instrumento imprescindible para poder discernir todas aquellas disfunciones de las que es responsable el déficit de IGF-1, por lo que la terapia sustitutiva esperablemente induciría efectos beneficiosos.

Por lo tanto, en primer lugar se nos planteó la necesidad de utilizar un modelo experimental de "deficiencia parcial de IGF-1" que pudiera ser idóneo para investigar los mecanismos de acción específicos de esta hormona en el sistema nervioso, que pudieran estar comprometidos en las "condiciones de deficiencia" y ser revertidos con la terapia sustitutiva de este factor de crecimiento.

Aunque inicialmente pretendíamos utilizar los animales *Knockout* cedidos por el Prof. Efstratiadis (Liu J.P. *et al.*, 1993), enseguida comprendimos que eran los animales heterocigóticos los que reproducían una condición de "deficiencia parcial", compatible con la vida y con el desarrollo, como las descritas en la patología humana (Guerra L., 2012; Gago A., 2012).

En el presente trabajo, se ha contribuido a establecer las características del modelo experimental con ratones heterocigotos (*Igf1<sup>+/-</sup>*, Hz), estudiando las concentraciones circulantes de IGF-1 en animales de 0,5 a 23 meses de edad

(cfr. Figura 25), demostrando que la deficiencia es significativa desde edades tempranas hasta el envejecimiento.

Finalmente, resultados todavía recientes de nuestro grupo mostraron los efectos neuroprotectores de la administración de dosis bajas de IGF-1 en el envejecimiento (García-Fernandez M. *et al.*, 2008; Puche J.E. *et al.*, 2008), así como de similares dosis de IGF-2 (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 2011; García-Fernandez M. *et al.*, 2011).

En este estudio, se pone de manifiesto que estos animales heterocigotos, además de presentar una reducida expresión del gen *Igf1* en cerebro, muestran disminuidas concentraciones circulantes de IGF-1, por lo que entendemos que nuestro modelo experimental se acomoda adecuadamente a los objetivos del trabajo.

En este contexto, el objeto específico del estudio presentado consistió en indagar si la sola deficiencia parcial de IGF-1 modula la expresión de genes involucrados con el daño oxidativo, inflamación y muerte celular, con el intento de explicar la implicación de IGF-1 en la fisiopatología de estos procesos en el sistema nervioso, así como contribuir a la aproximación a potenciales estrategias terapéuticas.

## **V.2. ELECCIÓN DE DOSIS BAJAS DE IGF-1 COMO EN TRABAJOS PRECEDENTES**

Con respecto a la elección de la dosis de IGF-1, nos fundamentamos en estudios previos en los que habíamos comprobado que dosis bajas de IGF-1 (2 µg/100 g peso corporal/día) ejercían efectos beneficiosos sin consecuencia adversa alguna.

La efectividad y seguridad de dosis tan bajas de IGF-1 está ampliamente demostrada por nuestro grupo, tanto en estudios realizados en cirrosis hepática experimental, en estadios avanzados o en estadios incipientes de la enfermedad hepática crónica, como en envejecimiento, mostrando que estas

dosis son capaces de elevar las concentraciones circulantes de esta hormona hasta valores similares a los del grupo control (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 2000 y 2004; García-Fernández M. *et al.*, 2008), induciendo efectos beneficiosos tales como: mejora del estado nutricional, de la absorción intestinal de azúcares y aminoácidos, de la osteopenia, del hipogonadismo y de la fibrosis hepática (Picardi A. *et al.*, 1996; Castilla-Cortazar I. *et al.*, 1997, 1999, 2000, 2004; Cemborain A. *et al.*, 1997; Pascual M. *et al.*, 2000; Muguerza B. *et al.*, 2001). En estos trabajos, el tratamiento inducía efectos anabolizantes y antioxidantes, y en ningún caso estas pautas de tratamiento indujeron hipoglucemia, al contrario, se revirtió la hipoglucemia asociada a la cirrosis hepática, probablemente mejorando la absorción intestinal de azúcares (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 1997).

Sin embargo, en el ensayo clínico realizado con pacientes cirróticos como consecuencia directa de los estudios básicos de nuestro grupo, dosis de 20 mg/kg pc/día (con escalada de dosis hasta 50–100 mg/kg pc/día) durante un mes (Conchillo M. *et al.*, 2005) resultaron insuficientes para normalizar las concentraciones circulantes, aunque incrementaron la albuminemia y la disponibilidad energética, siendo bien tolerado en todos los pacientes.

Por otra parte, en los trabajos de envejecimiento, otra condición de deficiencia de IGF-1, se eligieron dosis similares (2,25 µg/100 g pc/día) que igualmente elevaron las concentraciones de IGF-1 aproximándolas a las del grupo de animales jóvenes, induciendo efectos anabolizantes y antioxidantes a la vez que inducían efectos beneficiosos en el metabolismo lipídico y de los carbohidratos al reducir la hiperlipidemia y la resistencia a la insulina que mostraban los animales de edad avanzada (García-Fernández M. *et al.*, 2008).

Dosis superiores (60-80 µg/kg pc/día) fueron eficaces en el tratamiento de la osteopenia en mujeres postmenopáusicas, aunque produjeron efectos secundarios. Dosis más bajas (30 µg/kg pc/día) estimularon la renovación ósea sin provocar efectos adversos (Ebeling P.R. *et al.*, 1993). En otros estudios con dosis de 24-32 µg/kg pc/día se han observado efectos secundarios como artralgias, mialgias, astenia, dolor mandibular y edema en cara y manos (Bondy C.A. *et al.*, 1994a).

Dos estudios más recientes, presentados en el Congreso Internacional de Endocrinología de 2008, mostraron la seguridad y eficacia de dosis individuales de 240  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  pc/día o 80-120  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  pc/día en dos dosis diarias, para el tratamiento de la deficiencia primaria de IGF-1 (Bright G.M. *et al.*, 2008; Midyett L.K. *et al.*, 2010).

En nuestro presente estudio, la administración exógena de dosis bajas de IGF-1 (2  $\mu\text{g}/100$  g pc/día), semejantes a la de anteriores trabajos, logró normalizar las concentraciones circulantes de esta hormona en animales deficientes en IGF-1 de  $5\pm 1$  meses de edad, de modo que estos resultados son congruentes con los estudios previos.

### **V.3. LOS ANIMALES CON DEFICIENCIA PARCIAL DE IGF-1 MOSTRARON UNA DISMINUCIÓN DE PESO CORPORAL QUE SE NORMALIZÓ CON LA TERAPIA SUSTITUTIVA Y SE CORRELACIONÓ DIRECTA Y SIGNIFICATIVAMENTE CON LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE IGF-1.**

La sola deficiencia parcial de IGF-1 en ratones de  $5\pm 1$  meses de edad se asoció, como en otros estudios, con una disminución significativa del peso corporal, que el tratamiento sustitutivo con IGF-1 fue capaz de revertir en sólo 10 días.

De acuerdo con los conocidos efectos anabolizantes de IGF-1 (Cohick W.S. y Clemmons D.R., 1993), con los resultados precedentes en cirrosis hepática (Picardi A. *et al.*, 1997; Cemborain A. *et al.*, 2000) y en este mismo modelo experimental (Guerra L., 2012; Gago A., 2012; Iturrieta I., 2013), se encontró una correlación directa y significativa entre el peso corporal y las concentraciones circulantes de IGF-1 (cfr. Figura 27).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el peso absoluto del encéfalo entre los tres grupos experimentales. Sin embargo, cuando éste fue referido al peso corporal, se encontró que los animales con

deficiencia parcial presentaban un aumento significativo del peso relativo del encéfalo, que la terapia sustitutiva fue capaz de revertir.

Este resultado incrementó nuestro interés por el estudio histológico del cerebro y los estudios de imagen por resonancia magnética, para intentar dilucidar este inesperado hallazgo que se discutirá en el siguiente apartado.

En los últimos años, las actividades de IGF-1 a nivel cerebral han cobrado un especial protagonismo debido al descubrimiento de su implicación en múltiples procesos durante el neurodesarrollo, en el mantenimiento de la homeostasis y en diversos mecanismos patológicos (Russo V.C. *et al.*, 2005). Su distribución por el SNC es prácticamente ubicua, y sus funciones afectan a todos los tipos celulares presentes en el sistema nervioso (neuronas, glía, epitelio, etc.) (Bondy C.A. *et al.*, 2004). Diferentes estudios han puesto de manifiesto que el IGF-1 sistémico, producido en el hígado, es capaz de atravesar la barrera hemato-encefálica y ejercer sus acciones a nivel del SNC, junto con el IGF-1 producido localmente (Reinhardt R.R. *et al.*, 2004; Nishijima T. *et al.*, 2010). Sin embargo, se continua debatiendo sobre la importancia particular de la expresión local o sistémica de IGF-1 (Torres-Aleman I., 2010).

Pues bien, los resultados del presente trabajo demuestran que estando reducida la expresión cerebral de IGF-1 (cfr. Figura 35A), las concentraciones circulantes normalizadas por la terapia sustitutiva son capaces de ejercer en el SNC efectos relevantes como se discutirán a continuación.

#### **V.4. LA DEFICIENCIA DE IGF-1 SE ASOCIÓ CON UN INCREMENTO DEL PESO ENCEFÁLICO RELATIVO, CON UNA DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS Y UN INCREMENTO DEL CONTENIDO ACUOSO.**

El estudio histológico se realizó en las muestras disponibles de cortes sagitales seriados de cerebro de ratones procedentes de los tres grupos experimentales. Las preparaciones, teñidas con H&E, permitieron seleccionar las mismas áreas entre el cuerpo calloso y la corteza, y llevar a cabo el contaje

de las células en esa región (Figura 29A). En los animales con deficiencia parcial de IGF-1 se encontró una significativa reducción del número de células –sin poder discernir con precisión la estirpe celular- que el tratamiento con dosis bajas de IGF-1 fue capaz de normalizar (Figura 29B), sugiriendo que podría estar incrementando la proliferación celular y/o revirtiendo los mecanismos tisulares fisiopatológicos desencadenados por la deficiencia de IGF-1.

Este estudio histológico, por diversas limitaciones técnicas, ha provocado un trabajo actualmente en curso, con cortes de encéfalo a diferentes niveles que permitirá esclarecer las alteraciones morfológicas encefálicas que se asocian a la sola deficiencia parcial de IGF-1, con menos células y mayor peso relativo.

Sin embargo, este hallazgo nos llevó a ahondar en los estudios de imagen, que podrían ayudar a discernir qué componentes predominaban en el tejido cerebral si la celularidad estaba significativamente disminuida. Para ello, promovimos el desarrollo de un estudio de imagen por resonancia magnética (mapas ADC y MT). Éstas, se basan en el intercambio de magnetización entre los protones libres (representados por el agua) y los inmóviles, es decir, ligados a macromoléculas, siendo las biomoléculas que más agua acoplan los fosfolípidos. El agua acoplada a biomoléculas se considera “invisible” ya que no transfiere magnetización a otras moléculas, mientras que el agua libre sí lo hace. La transferencia de magnetización entre ellos se produce al aplicar un pulso de pre-saturación (pulso MT) que hace que los protones del agua ligada intercambien su magnetización con la población de protones del agua libre, haciendo que la intensidad de la señal del agua libre descienda (Grossman R.I. *et al.*, 1994).

El porcentaje de transferencia de magnetización (% MT) se usa como parámetro de medida de este fenómeno. Las medidas de % MT dependen del entorno químico y biofísico que rodea las macromoléculas y sirven por lo tanto para medir indirectamente la estructura macro- y micromolecular del tejido en cuestión, indicando posibles cambios estructurales, por ejemplo, en el parénquima cerebral (Grossman R.I. *et al.*, 1994).

En nuestro estudio, los animales deficientes de IGF-1 mostraron una disminución en el porcentaje de transferencia de magnetización en el total del cerebro (Figuras 31 y 32), signo que se ha relacionado con situaciones de inflamación o edema, y que algunos autores han sugerido que pueda reflejar cambios relacionados con la pérdida neuronal, la gliosis y la acumulación de placas y ovillos (Ridha B.H. *et al.*, 2007), así como con el estado cognitivo en pacientes con demencia por cuerpos de Lewy o Alzheimer (van Buchem M.A. y Tofts P.S., 2000; van der Flier W.M. *et al.*, 2002). La terapia sustitutiva con IGF-1 durante sólo diez días fue capaz revertir este hecho, mostrando valores próximos a los del grupo control (Figura 32).

#### **IV.5. LA SOLA DEFICIENCIA PARCIAL DE IGF-1 COMPROMETE LA CORRECTA EXPRESIÓN CEREBRAL DEL GEN IGF-2 Y DE LAS PRINCIPALES PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE IGF (IGFBPs).**

Como era de esperar, los animales con deficiencia sistémica de IGF-1 (*Igf1<sup>+/-</sup>*, Hz) mostraron una reducción significativa del gen *Igf1* en cerebro, que razonablemente la terapia sustitutiva no modificó en modo alguno, disminuyendo sin embargo la expresión génica del receptor de IGF-1 (Figura 35).

Los niveles del RNAm de IGF-1 se encuentran reducidos en cerebros de ratas hipofisectomizadas, y la perfusión intracerebral de GH restaura (~80 %) los niveles de IGF-1 (Hynes M.A. *et al.*, 1987), lo que apunta al papel que GH tiene en el control del IGF-1 cerebral. En este estudio, se encontró una reducida expresión del receptor de GH, probablemente como respuesta a las incrementadas concentraciones circulantes de GH por el deficiente mecanismo de retroalimentación negativo de IGF-1 en ratones Hz. De hecho, la terapia sustitutiva incrementó significativamente la expresión génica del receptor (Figura 36). No obstante, son muchos los aspectos que aclarar. Por ejemplo, no existe una correlación significativa entre los niveles de IGF-1 plasmáticos y las concentraciones en líquido cefalorraquídeo (Backstrom M. *et al.*, 1984) y,

por consiguiente, parece que el IGF-1 sistémico no es la fuente principal de IGF-1 en el SNC.

Por otra parte, en un modelo animal de ratones que sobreexpresan IGF-1 en el cerebro mostró un crecimiento postnatal excesivo del cerebro (hasta un 85 %) sin que se acompañara de anomalías anatómicas mediante un mero aumento en el número de células (Behringer R.R. *et al.*, 1990) y de la mielinización (Carson M.J. *et al.*, 1993). Un experimento complementario (Behringer R.R. *et al.*, 1990) excluyó la posibilidad de que fuera GH quien promoviera directamente estos efectos, ya que ratones transgénicos que sobreexpresan GH no mostraron estos cambios. Sin embargo, como se dijo anteriormente, el papel de la GH en el crecimiento del cerebro no puede ser subestimado, dado que los ratones deficientes en GH tienen cerebros mucho más pequeños que los ratones normales (Ohlsson C. *et al.*, 2009). Consistentemente, ratones transgénicos con delección génica de IGF-1 apenas sobreviven después del nacimiento. Los supervivientes tienen cerebros muy pequeños (-60 % del tamaño normal), pero siguen siendo morfológicamente normales (Beck K.D. *et al.*, 1995). Estos cerebros se caracterizan por una escasez de la materia blanca debido a una marcada reducción de la mielinización (Ye P. *et al.*, 2002) y una aparente disminución en el número de axones (Beck K.D. *et al.*, 1995).

En este complejo contexto para comprender el eje GH/IGF-1, uno de los hallazgos más notables del presente trabajo es que la deficiencia de IGF-1 se asoció con una hipoexpresión significativa del gen *Igf2*, que el tratamiento revirtió. Las funciones fisiológicas de IGF-2 se desconocen en la edad adulta, aunque están bien descritas sus funciones durante el desarrollo embrionario (Wolf E. *et al.*, 1998). Resultados precedentes demostraron que IGF-2 a dosis bajas se comportaba como un “análogo” de IGF-1 en cuanto a las funciones neuroprotectoras y de protección mitocondrial (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 2011; García-Fernández M. *et al.*, 2011). Los resultados de este trabajo refuerzan sólidamente la hipótesis de que las funciones fisiológicas de IGF-2 en la edad adulta pueden estar circunscritas al SNC, actuando como un “*longa manus*” de IGF-1, que podría actuar como un relevante estimulador “local” de su expresión



génica. Próximos estudios se centrarán en confirmar estos resultados preliminares.

Otro resultado que merece especial atención es que la deficiencia parcial de IGF-1 se acompaña de una hiper-expresión significativa de IGFBP-4 e IGFBP-6, ambas con acciones inhibitoras (Roghani M. *et al.*, 1989; Martin J.L. *et al.*, 1990; Gu F. *et al.*, 2010; Contois L.W. *et al.*, 2012; Bach L.A. *et al.*, 2013). La función de IGFBP-4 en el tejido óseo es la de facilitar la captación de IGF-1 de la circulación (Miyakoshi N. *et al.*, 1999; Laursen L.S. *et al.*, 2007). Una función similar en cerebro podría explicar su hiper-expresión en condiciones de deficiencia, y que la administración exógena de IGF-1 normalizara su expresión génica, como ocurre en nuestros resultados.

Finalmente, uno de los resultados –que a nuestro juicio- podría aportar alguna explicación para entender el conjunto de hallazgos descritos en el presente protocolo es que la deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una hipo-expresión cerebral de los genes de la IGFBP-7 y la IGFBP-8, que el tratamiento sustitutivo normalizó. Ambas IGFBPs tienen propiedades en la formación de la matriz extracelular, tejido conectivo y angiogénesis (Kim H.S. *et al.*, 1997; Hwa V. *et al.*, 1999; Nguyen T.Q. *et al.*, 2008).

La IGFBP-7 (también conocida como Mac-25) (Oh Y. *et al.*, 1996) está implicada en la regulación del crecimiento epitelial y fibroblástico, la estimulación de la producción de prostaciclina por células endoteliales y la angiogénesis (Inoguchi T. *et al.*, 1986; Hwa V. *et al.*, 1999; Gommans W.M. *et al.*, 2008), con destacadas funciones en las neuronas hipocampales (Agis-Balboa R.C. *et al.*, 2011).

De modo particular, la IGFBP-8, conocida como el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (Kim H.S. *et al.*, 1997) es de gran relevancia tanto en condiciones fisiológicas para el mantenimiento de la homeostasis tisular, como en procesos fisiopatológicos (fibrosis) (Nguyen T.Q. *et al.*, 2008). En condiciones de hiper-expresión de esta proteína, se han descrito acúmulos de matriz extracelular que pueden llevar a fibrosis hepática, renal, pulmonar... (Oemar B.S. y Luscher T.F., 1997), mientras que su ausencia puede originar

desestructuración tisular e incapacidad para cicatrización (Oliver N. *et al.*, 2010). El control de su expresión génica está regulado de forma compleja por una multitud de factores, entre los que se incluye TGF $\beta$ , angiotensina II, TGF $\alpha$ , NO, aldosterona, glucocorticoides, VEGF, NF- $\kappa$ B, AP-1, etc. (Figura 6) (Oliver N. *et al.*, 2010). Por otra parte, posee dominios con los que se une al TGF $\beta$  activándolo, y al VEGF, factor con relevantes propiedades angiogénicas (Cfr. Figura 7). Los resultados aquí descritos en cuanto a la regulación de IGFBP-8 son congruentes con los recientemente descritos en testículo en este mismo modelo animal (Gago A., 2012).

## **V.6. LA DEFICIENCIA DE IGF-1 SE ASOCIÓ CON UN INCREMENTO DEL DAÑO OXIDATIVO Y CON UNA HIPO-EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES –ENZIMÁTICAS O DE PROTEÍNAS HSPs- Y CON PROTEÍNAS DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA A LA INFLAMACIÓN QUE LA TERAPIA SUSTITUTIVA REVIRTIÓ.**

En primer lugar, los animales deficientes de IGF-1 mostraron un incremento significativo del marcador de peroxidación lipídica MDA, que la terapia sustitutiva logró normalizar (cfr. Figura 34).

Por otro lado, los animales con deficiencia parcial de IGF-1 (*Igf1*<sup>+/-</sup>, Hz) presentaron una expresión significativamente reducida de los genes que codifican para enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa (*Gpx1* y *Gpx8*), catalasa, peroxiredoxinas (*Prdx1*, *Prdx3* y *Prdx4*) y tioredoxinas (*Txnip*). La administración exógena de IGF-1 recuperó la expresión génica de las principales enzimas antioxidantes.

Estos resultados son congruentes con los efectos descritos en animales cirróticos y en animales de edad avanzada en los que las mismas dosis de IGF-1 fueron capaces de modular significativamente la actividad de estas enzimas antioxidantes (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 1997; García-Fernández M. *et*

*al.*, 2005; Puche J.E. *et al.*, 2008). Resultados similares se encontraron en el envejecimiento con la administración de IGF-2 (Castilla-Cortazar I. *et al.*, 2011).

Los resultados de este trabajo permiten reconocer la acción de IGF-1 en la expresión génica de estas enzimas, que fue discutida en trabajos anteriores, considerando que podía ser un “epifenómeno” de la mejoría general observada en hígado o cerebro.

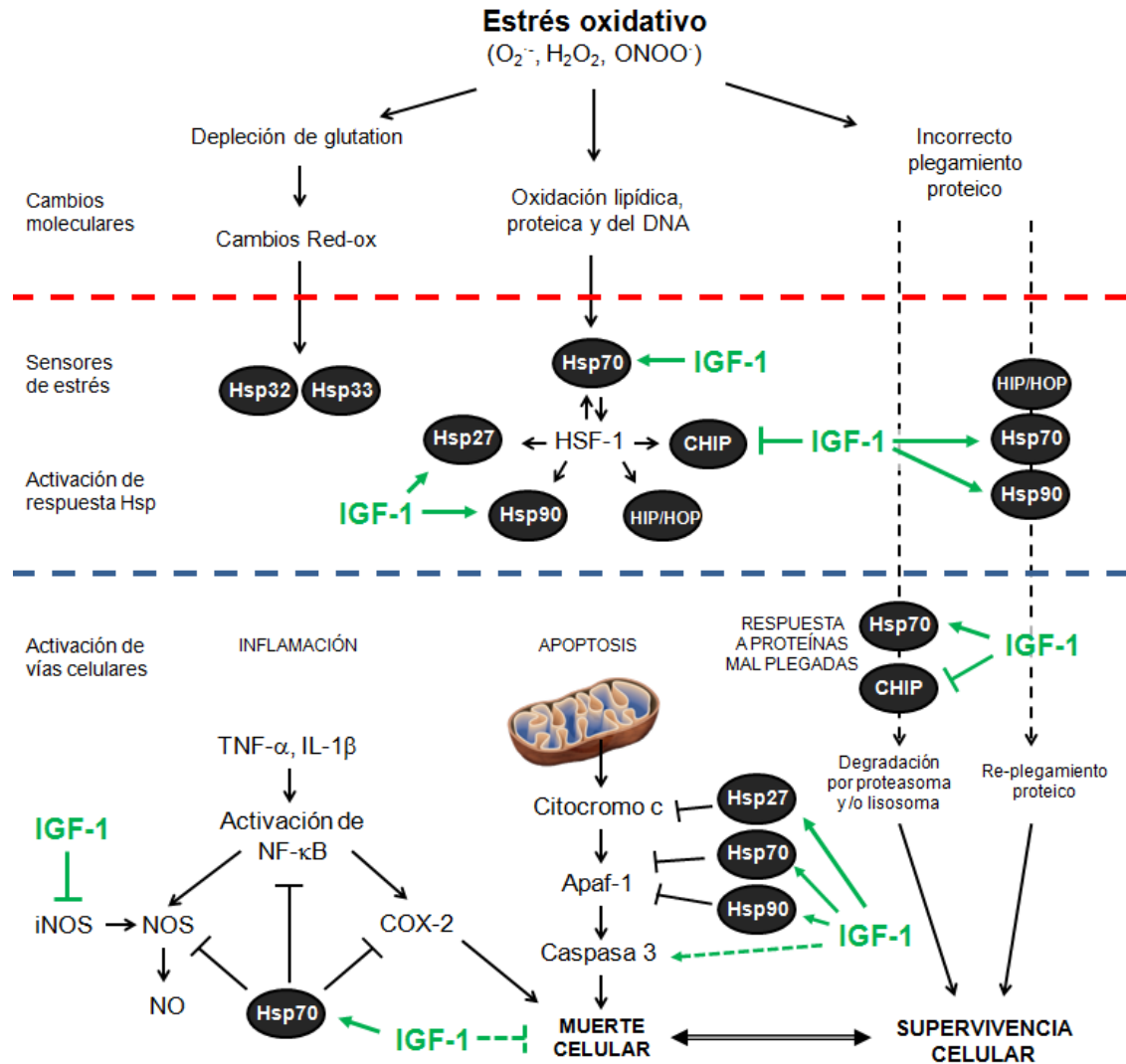
Asimismo, la deficiencia de IGF-1 se asoció con la hipo-expresión de los genes que codifican para las llamadas “proteínas de choque térmico” (HSPs), especialmente las Hsp70, Hsp90, Hsp27, Hspa1b, Hsp5... que la terapia sustitutiva normalizó.

Estas HSPs son proteínas altamente conservadas y expresadas en todos los tejidos. Gracias a sus versátiles funciones, las chaperonas pueden intervenir en respuesta a un estrés oxidativo, detectando cambios red-ox intracelulares, en varios niveles. En primer lugar, algunas de las HSPs, en su mayoría miembros de la familia Hsp70, desempeñan un papel crucial en el control de la calidad proteica, previniendo la agregación proteica y dirigiendo proteínas aberrantes al proteasoma o los lisosomas para su degradación (Mayer M.P. y Bukau B., 2005), mediando así el aclaramiento de estas proteínas dañadas. En los casos en que las proteínas mal plegadas pueden ser rescatadas, la misma maquinaria puede lograr su replegamiento.

Por otra parte, algunas chaperonas, tales como Hsp27, Hsp70 y Hsp90, pueden tener actividad anti-apoptótica al unirse o inhibir componentes de la cascada de la apoptosis (citocromo c, Apaf-1 y caspasa 3), incluso si las vías de muerte celular han sido activadas (Kalmar B. y Greensmith L., 2009).

Además, algunas HSPs tienen acciones anti-inflamatorias. La respuesta inflamatoria está regulada principalmente por NF- $\kappa$ B (Barnes P.J. y Karin M., 1997). Tras el estrés oxidativo, NF- $\kappa$ B es traslocado al núcleo y activa la transcripción de mediadores inflamatorios tales como iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), interleuquinas inflamatorias y ciclooxigenasa-2 (COX-2).

Sobre todos estos efectores, la chaperona Hsp70 ejerce una inhibición que, eventualmente, conlleva efectos anti-inflamatorios y citoprotectores (Kalmar B. y Greensmith L., 2009). Un resumen de estas acciones protectoras de las chaperonas, y del papel regulador que IGF-1 lleva a cabo en estas rutas, se resume en la Figura 53.



**Figura 53.** Niveles de la actividad neuroprotectora de IGF-1 mediada por HSPs.

Estas proteínas de choque térmico se han estudiado durante años, demostrando su hiper-expresión dirigida a la protección celular y tisular, en una amplia variedad de condiciones de estrés oxidativo (Kalmar B. y Greensmith L., 2009). Dicho estrés, junto con la consiguiente inflamación, es el eslabón común

que inicia los mecanismos fisiopatológicos en prácticamente todos los tejidos, incluyendo la neurodegeneración, la enfermedad cardiovascular y el accidente cerebrovascular, e incluso parece el fundamental factor causal del envejecimiento natural. Por todo esto, consideramos estos mecanismos de las acciones neuroprotectoras de IGF-1 mediadas por las chaperonas HSPs, uno de los hallazgos más interesantes del presente trabajo.

Finalmente, la deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una hipodexpresión de los genes que codifican para proteínas de la respuesta fisiológica a la inflamación (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10rb, IL-22, receptor del TNF $\alpha$ ...), mientras que se hiper-expresaron los genes del Tgf $\beta$ 2, Nos1, Ptgs2 (o Cox2) y Crlf1. Tanto en los casos de hipo- como de hiper-expresión, la terapia sustitutiva con IGF-1 moduló la expresión génica hasta niveles similares a los encontrados en los controles (Figuras 41 y 42).

Considerando todos estos hallazgos de forma conjunta, entendemos que la deficiencia parcial de IGF-1 se asocia con una deficiente expresión génica que hace al tejido más vulnerable a cualquier agresión, incluso fisiológica, que lleva a alteraciones morfológicas y disfunciones. Estos resultados son congruentes con los encontrados en testículo (Gago A., 2012) y hueso (Guerra L., 2012) en este mismo modelo experimental.

### **V.7. LA SOLA DEFICIENCIA PARCIAL DE IGF-1 PRESENTÓ, CON RESPECTO A LOS CONTROLES, UNA EXPRESIÓN ALTERADA DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA PROTECCIÓN MITOCONDRIAL, EL ESTRÉS OXIDATIVO SECUNDARIO A LA HIPOXIA Y LA MUERTE CELULAR.**

Los hallazgos presentados en el presente trabajo demuestran que la mera deficiencia parcial de IGF-1 compromete la expresión de genes implicados en la supervivencia y la protección mitocondrial e incrementa la expresión de otros relacionados con la muerte celular, tanto por necrosis como por la activación de la cascada apoptótica de las caspasas (cfr. Figuras 46, 47,

48, 49 y 50 y Tablas 10 y 11). Además, la espectroscopía de resonancia magnética reveló un incremento significativo de lactato, un marcador de necrosis celular, que la terapia sustitutiva con IGF-1 fue capaz de normalizar. Por esto mecanismos, se podrían justificar ampliamente los efectos neuroprotectores descritos en trabajos previos (García-Fernández M. *et al.*, 2008).

Por otra parte, estos resultados explican que la deficiencia de IGF-1 se acompañaba de una disminución del número de células en el encéfalo (Figuras 29 y 30 y apartado V.4.).

En este mismo sentido, un mecanismo insuficientemente estudiado en este trabajo es el mediado por la Ciclina D2, que se encontró hiper-expresada en ratones con deficiencia parcial de IGF-1 en el estudio por microarray (10,09 veces sobre el grupo WT,  $p < 0,001$ ), y que la terapia sustitutiva con IGF-1 logró reducir significativamente (-1,92 veces sobre el grupo Hz,  $p < 0,01$ ). Esta proteína del ciclo celular se ha sugerido que está implicada en las replications celulares neuronales que no se consuman, y termina provocando la muerte celular (Chen Y. *et al.*, 2000 y 2003; Arendt T., 2003). Estudios adicionales serán necesarios para clarificar este punto que sugiere un gran interés en cuanto a la implicación de IGF-1 en la correcta conclusión de la replicación celular.

Como decíamos, los resultados en este trabajo explican los efectos neuroprotectores de IGF-1, pero en absoluto resuelven por qué la deficiencia de IGF-1 propicia en cerebro un estado “edematoso”, que incrementa el peso relativo de un encéfalo desprovisto parcialmente de células (cfr. Figuras 29-32).

Estos hallazgos sugieren un incremento de la permeabilidad vascular e incluso una pérdida de la integridad de la barrera hemato-encefálica. Esta hipótesis, que está siendo afrontada incipientemente por nuestro grupo, es congruente con los resultados encontrados en testículo y la alteración de la barrera hemato-testicular asociada a la deficiencia de IGF-1, ampliamente descrita por nuestro grupo (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 2000 y 2004; Díez-Caballero F. *et al.*, 2006; Gago A., 2012)

## **V.8. EL ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS RUTAS FUNCIONALES Y EL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CEREBRO MUESTRAN EL DECISIVO PAPEL DE IGF-1 EN LOS PROCESOS QUE HAN SIDO OBJETO DE ESTE TRABAJO.**

El estudio de los mecanismos y procesos biológicos y su aplicación en Medicina Traslacional ha requerido la adopción de nuevas estrategias de investigación (Valor *et al*, 2010), incorporando las nuevas disciplinas de análisis masivo de datos moleculares y celulares, denominadas genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, epigenómica, etc. (Li Y. *et al.*, 2012). En la actualidad, es impensable realizar estudios que impliquen el análisis de entidades biológicas, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, sin que se tenga en cuenta las facilidades que brindan la biología de sistemas y sus aplicaciones bioinformáticas.

En este trabajo hemos utilizado la tecnología de microarray para analizar el transcriptoma del cerebro de ratones en diferentes situaciones fisiológicas, con la intención de estudiar la actividad reguladora de IGF-1 sobre los niveles de expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en los diversos mecanismos de neuroprotección: enzimas antioxidantes, proteínas responsables de la respuesta inflamatoria o a la hipoxia, moléculas involucradas en la apoptosis y en la supervivencia celular y tisular, etc.

El resultado del estudio por microarray resulta en una ingente cantidad de información que requiere de un posterior análisis bioinformático, de modo que se pueda inferir una significación biológica y funcional cognoscible. Para nuestro análisis nos hemos centrado en el análisis de rutas funcionales.

## **VI. CONCLUSIONES**



Los resultados descritos en el presente estudio permiten inferir las siguientes conclusiones:

1. El modelo experimental de ratones heterocigotos (*Igf1<sup>+/-</sup>*, Hz) presentó concentraciones circulantes de IGF-1 significativamente disminuidas a lo largo de la vida. En este protocolo de 5±1 meses de edad, la administración de dosis bajas de IGF-1 normalizó, como ocurriera en estudios precedentes, las concentraciones de IGF-1.
2. Este modelo experimental que hipo-expresa sistémicamente IGF-1, y por tanto también en cerebro, permite discernir el papel del IGF-1 circulante que atraviesa la barrera hemato-encefálica y promueve en cerebro la expresión de genes que codifican para otras proteínas relacionadas, como el IGF-2, que comparte acciones neuroprotectoras, y las IGFBP-7 y -8, que contribuyen al mantenimiento de la matriz extracelular y la morfología tisular.
3. Efectivamente, la deficiencia de IGF-1 se asoció con una reducida expresión génica de IGF-2, que el tratamiento exógeno promovió sorprendentemente, sugiriendo que IGF-2 puede actuar fisiológicamente en la vida adulta como un “*longa manus*” de IGF-1 en el SNC.
4. La deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una significativa alteración en la expresión génica en cerebro de los receptores de IGF-1 y GH, que la terapia sustitutiva mejoró en tan solo diez días de tratamiento. Asimismo, la deficiencia de IGF-1 promovió una hiper-expresión de los genes de las proteínas transportadoras de IGF-1 (IGFBP-4 e IGFBP-6, ambas inhibidoras), que la terapia sustitutiva normalizó.
5. La deficiencia parcial de IGF-1 se acompañó de un incremento significativo del peso relativo del encéfalo (peso encéfalo/peso corporal) a expensas de un incremento del contenido acuoso que fue verificado por el análisis de resonancia magnética, mientras que el número de células (en áreas perihipocampales de la corteza cerebral) estaba significativamente disminuido. La terapia sustitutiva con IGF-1 normalizó el peso relativo del encéfalo, el número de células y disminuyó significativamente el contenido de agua.

6. La deficiencia de IGF-1 incrementó los marcadores de peroxidación lipídica (MDA) y necrosis (lactato) con respecto al grupo control, y el tratamiento con IGF-1 normalizó ambos parámetros.

7. La deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una expresión significativamente reducida de los genes que codifican para relevantes enzimas antioxidantes, que la administración exógena de IGF-1 normalizó. Del mismo modo, los animales con deficiencia de IGF-1 presentaron una hipo-expresión de los genes que codifican para las proteínas de choque térmico (HSPs) Hsp70, Hsp90 y Hsp27, chaperonas con reconocidas propiedades de protección celular contra el daño oxidativo. La terapia sustitutiva normalizó la expresión de estos genes.

8. La sola deficiencia parcial de IGF-1 se asoció, respecto a los controles sanos, con una alteración de genes implicados en la muerte celular, en la respuesta al estrés oxidativo en condiciones de hipoxia y en la protección mitocondrial, que el tratamiento con dosis bajas de IGF-1 normalizó o mejoró significativamente.

9. Los resultados presentados explican los efectos neuroprotectores de IGF-1, objeto específico del presente trabajo, junto con posibles efectos en la configuración de la matriz extracelular dependientes del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF o IGFBP-8). Asimismo, los mecanismos expuestos explican que los animales deficientes de IGF-1 muestren una disminución significativa del número de células, y que ésta sea normalizada por la terapia sustitutiva con IGF-1.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, et al: IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Eng J Med* 2003, 349(23):2211–22.
2. Adamo M, Lowe WL Jr, LeRoith D, Roberts CT Jr: Insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids with alternative 5'-untranslated regions are differentially expressed during development of the rat. *Endocrinology* 1989, 124(6):2737–44.
3. Adashi EY, Resnick CE, Hurwitz A, Ricciardelli E, Hernandez ER, Roberts CT, LeRoith D, Rosenfeld R: The ovarian and testicular IGF-I system: a comparative analysis. In *Spermatogenesis-Fertilization-Contraception: Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction*. Edited by Nieschlag E, Habenicht UF. Berlin: Springer-Verlag; 1992:143–68.
4. Adashi EY, Resnick CE, Hurwitz A, Ricciarelli E, Hernandez ER, Roberts CT, Leroith D, Rosenfeld R: Insulin-like growth factors: the ovarian connection. *Hum Reprod* 1991, 6(9):1213–19.
5. Adashi EY: The IGF family and folliculogenesis. *J Reprod Immunol* 1998, 39(1–2):13–9.
6. Agis-Balboa RC, Arcos-Diaz D, Wittnam J, Govindarajan N, Blom K, Burkhardt S, et al.: A hippocampal insulin-growth factor 2 pathway regulates the extinction of fear memories. *EMBO J* 2011, 30(19):4071–83.
7. Akanji AO, Smith RJ: The insulin-like growth factor system, metabolic syndrome, and cardiovascular disease risk. *Metab Syndr Relat Disord* 2012, 10(1):3–13.
8. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, et al: Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000, 21(3):383–421.
9. Albano E: Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 2006, 65(3):278–90.
10. Annenkov A: The insulin-like growth factor (IGF) receptor type 1 (IGF1R) as an essential component of the signalling network regulating neurogenesis. *Mol Neurobiol* 2009, 40(3):195–215.
11. Arbet-Engels C., Tartare-Deckert S. and Eckhart W. C-terminal Src kinase associates with ligand-stimulated insulin-like growth factor-I receptor. *J Biol Chem* 1999;274(9): 5422–8.
12. Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog Neurobiol.* 2003 Oct; 71(2-3):83–248.
13. Assy N, Hochberg Z, Amit T, Shen-Orr Z, Enat R, Baruch Y: Growth hormone-stimulated insulin-like growth factor (IGF) I and IGF-binding protein-3 in liver cirrhosis. *J Hepatol* 1997, 27(5):796–802.
14. Bach LA, Fu P, Yang Z: Insulin-like growth factor-binding protein-6 and cancer. *Clin Sci (Lond).* 2013, 124(4):215–29.
15. Bach LA: The insulin-like growth factor system in kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012, 21(1):86–91.
16. Backeljauw PF, Underwood LE, syndrome GCGGhi: Therapy for 6.5–7.5 years with recombinant insulin-like growth factor I in children with growth hormone insensitivity syndrome: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(4):1504–10.
17. Backstrom M, Hall K, Sara V: Somatomedin levels in cerebrospinal fluid from adults with pituitary disorders. *Acta Endocrinol* 1984, 107(2):171–78.
18. Bailey-Downs LC, Mitschelen M, Sosnowska D, Toth P, Pinto JT, Ballabh P, Valcarcel-Ares MN, Farley J, Koller A, Henthorn JC, et al: Liver-specific knockdown of IGF-1 decreases vascular oxidative stress resistance by impairing the Nrf2-dependent antioxidant response: a novel model of vascular aging. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2012, 67(4):313–29.

19. Bailyes EM, Nave BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J* 1997;327 (Pt 1):209-15
20. Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A: Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 1996, 10(7):903–18.
21. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A: Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993, 75(1):73–82.
22. Bang P, Ahlsen M, Berg U, Carlsson-Skwirut C. Free insulin-like growth factor I: are we hunting a ghost? *Horm Res* 2001;55 Suppl 2: 84-93.
23. Barbieri M, Paolisso G, Kimura M, Gardner JP, Boccardi V, Papa M, Hjelmberg JV, Christensen K, Brimacombe M, Nawrot TS, et al: Higher circulating levels of IGF-1 are associated with longer leukocyte telomere length in healthy subjects. *Mech Ageing Dev* 2009, 130(11–12):771–6.
24. Barker DJ: The developmental origins of well-being. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004, 359(1449):1359–66.
25. Barker PB. Magnetic resonance spectroscopy in cerebral ischemia and infarction. *Semin Cereb rovasc Dis Stroke* 2001;1(4):331-342.
26. Barnes PJ and Karin M: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997, 336:1066–71.
27. Barreca A., Ponzani P., Arvigo M., Giordano G. and Minuto F. Effect of the acid-labile subunit on the binding of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 to [125I]IGF-I. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(4): 1318-24.
28. Bartke A, Chandrashekar V, Dominici F, Turyn D, Kinney B, Steger R, Kopchick JJ: Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and aging: controversies and new insights. *Biogerontology* 2003, 4(1):1–8.
29. Barton ER. The ABCs of IGF-I isoforms: impact on muscle hypertrophy and implications for repair. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2006 Dec;31(6):791-7.
30. Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A: The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 2012, 61(6):1315–22.
31. Baxter R. C. Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res* 1994;42(4-5): 140-4.
32. Beck KD, Powell-Braxton L, Widmer HR, Valverde J, Hefti F: Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* 1995, 14(4):717–30.
33. Beckman KB and Ames BN: The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998, 78(2):547-81.
34. Begum N, Robinson LJ, Draznin B, Heidenreich KA: Protein phosphatase-1 and -2a activities in cultured fetal chick neurons: differential regulation by insulin and insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 1993, 133(5):2085–90.
35. Behringer RR, Lewin TM, Quaife CJ, Palmiter RD, Brinster RL, D'Ercole AJ: Expression of insulin-like growth factor I stimulates normal somatic growth in growth hormone-deficient transgenic mice. *Endocrinology* 1990, 127(3):1033–40.
36. Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL: Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 1981, 212(4500):1279–81.
37. Berryman DE, Christiansen JS, Johannsson G, Thorner MO, Kopchick JJ: Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: lessons from animal models. *Growth Horm IGF Res* 2008, 18(6):455–71.
38. Bertherat J, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J: Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur J Endocrinol* 1995, 132(1):12–24.
39. Bex M, Bouillon R: Growth hormone and bone health. *Horm Res* 2003, 60(Suppl 3):80–6.

40. Bideci A, Camurdan MO, Cinaz P, Dursun H, Demirel F: Serum zinc, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 levels in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005, 18(10):1007–11.
41. Binoux M. The IGF system in metabolism regulation. *Diabete Metab* 1995;21(5): 330-7.
42. Blakesley VA, Butler AA, Koval AP, Okubo Y, LeRoith D: IGF-1 receptor function: transducing the igf-1 signal into intracellular events. In *The IGF system*. Edited by Rosenfeld R, Roberts C. New Jersey: Humana Press; 1999:143–64.
43. Bondy CA, Cheng CM. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol*. 2004 Apr 19;490(1-3):25-31.
44. Bondy CA, Underwood LE, Clemmons DR, Guler HP, Bach MA, Skarulis M. Clinical uses of insulin-like growth factor I. *Ann Intern Med* 1994a, 120(7):593–601.
45. Bondy CA, Zhou J, Chin E, Reinhardt RR, Ding L, Roth RA. Cellular distribution of insulin-degrading enzyme gene expression. Comparison with insulin and insulin-like growth factor receptors. *J Clin Invest* 1994b;93(3): 966-73.
46. Borasio GD, Robberecht W, Leigh PN, Emile J, Guilloff RJ, Jerusalem F, Silani V, Vos PE, Wokke JH, Dobbins T: A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I study group. *Neurology* 1998, 51(2):583–6.
47. Bosco D, Plastino M, Cristiano D, Colica C, Ermio C, De Bartolo M, Mungari P, Fonte G, Consoli D, Consoli A, et al: Dementia is associated with insulin resistance in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2012, 315(1–2):39–43.
48. Boveris A, Oshino N, Chance B: The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972, 128(3):617–30.
49. Brat O, Ziv I, Klinger B, Avraham M, Laron Z: Muscle force and endurance in untreated and human growth hormone or insulin-like growth factor-I-treated patients with growth hormone deficiency or laron syndrome. *Horm Res* 1997, 47(2):45–8.
50. Brenzel A, Gressner AM: Characterization of insulin-like growth factor (IGF)-I-receptor binding sites during in vitro transformation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 1996, 34(5):401–9.
51. Bridgewater DJ, Dionne JM, Butt MJ, Pin CL, Matsell DG: The role of the type I insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) in glomerular integrity. *Growth Horm IGF Res* 2008, 18(1):26–37.
52. Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG: Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int* 2005, 67(4):1308–14.
53. Bright GM, Rogers D, Gonzalez-Mendoza LJF. Safety and efficacy of oncedaily rhIGF-1 treatment in prepubertal children with primary IGF-1 deficiency: results from a clinical trial, ICE 2008 meeting: 2008. Rio de Janeiro (Brazil): 2008.
54. Brooker GJ, Kalloniatis M, Russo VC, Murphy M, Werther GA, Bartlett PF: Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J Neurosci Res* 2000, 59(3):332–41.
55. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA: The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 2002, 187(5):1416–23.
56. Bruguera-Cortada M, Rodes-Teixidor J: Cirrosis hepática compensada. In *Tratamiento de las enfermedades hepáticas*. Edited by Bruguera-Cortada M, Mino-Fugarolas G, Pons-Romero F, Moreno-Otero R.: Asociación Española para el Estudio del Hígado; 1997:45–50.
57. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, et al: Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004, 303(5666):2011–15.

58. Bulow B, Hagmar L, Mikoczy Z, Nordstrom CH, Erfurth EM: Increased cerebrovascular mortality in patients with hypopituitarism. *Clin Endocrinol* 1997, 46(1):75–81.
59. Bunn RC and Fowlkes JL. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol Metab.* 2003 May-Jun;14(4):176-81
60. Cailleau J, Vermeire S, Verhoeven G: Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990, 69(1):79–89.
61. Cardoso SM, Pereira C, Oliveira R. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;26(1-2): 3-13.
62. Cardozo-Pelaez F, Brooks PJ, Stederford T, Strong S, Sanchez-Ramos J: DNA damage, repair, and antioxidant systems in brain regions: a correlative study. *Free Radic Biol Med* 2000, 28(5):779-85.
63. Caregaro L, Alberino F, Amodio P, Merkel C, Angeli P, Plebani M, Bolognesi M, Gatta A: Nutritional and prognostic significance of insulin-like growth factor 1 in patients with liver cirrhosis. *Nutrition* 1997, 13(3):185–90.
64. Carmeli E, Coleman R, Reznick AZ: The biochemistry of aging muscle. *Exp Gerontol* 2002, 37(4):477–89.
65. Caro JF, Poulos J, Ittoop O, Pories WJ, Flickinger EG, Sinha MK: Insulin-like growth factor I binding in hepatocytes from human liver, human hepatoma, and normal, regenerating, and fetal rat liver. *J Clin Invest* 1988, 81(4):976–81.
66. Carro E, Trejo JL, Gerber A, Loetscher H, Torrado J, Metzger F, Torres-Aleman I: Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 2006, 27(9):1250–7.
67. Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I: Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 2002, 8(12):1390–7.
68. Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA: Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* 1993, 10(4):729–740.
69. Castilla-Cortazar I, Aliaga-Montilla MA, Salvador J, Garcia M, Delgado G, Gonzalez-Baron S, Quiroga J, Prieto J: Insulin-like growth factor-I restores the reduced somatostatinergic tone controlling growth hormone secretion in cirrhotic rats. *Liver* 2001, 21(6):405–409.
70. Castilla-Cortázar I, Aliaga-Montilla MA, Salvador J, García M, Delgado G, González-Barón S, et al. Insulin-like growth factor-I restores the reduced somatostatinergic tone controlling growth hormone secretion in cirrhotic rats. *Liver.* 2001 Dec;21(6):405-9.
71. Castilla-Cortazar I, Diez N, Garcia-Fernandez M, Puche JE, Diez-Caballero F, Quiroga J, Diaz-Sanchez M, Castilla A, Casares AD, Varela-Nieto I, et al: Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: effect of insulin-like growth factor 1. *World journal of gastroenterology: WJG* 2004, 10(17):2529–2534.
72. Castilla-Cortazar I, Garcia M, Muguera B, Quiroga J, Perez R, Santidrian S, Prieto J: Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Gastroenterology* 1997, 113(5):1682–1691.
73. Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Diez N, Diez-Caballero F, Calvo A, Diaz M, Prieto J: Insulin-like growth factor-I reverts testicular atrophy in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology* 2000, 31(3):592–600.
74. Castilla-Cortazar I, Garcia-Fernandez M, Delgado G, Puche JE, Sierra I, Barhoum R, Gonzalez-Baron S: Hepatoprotection and neuroprotection induced by low doses of IGF-II in aging rats. *J Transl Med* 2011, 9:103.
75. Castilla-Cortazar I, Pascual M, Urdaneta E, Pardo J, Puche JE, Vivas B, Diaz-Casares A, Garcia M, Diaz-Sanchez M, Varela-Nieto I, et al: Jejunal microvilli atrophy and reduced nutrient transport in rats with advanced liver cirrhosis: improvement by insulin-like growth factor I. *BMC Gastroenterol* 2004, 4:12.

76. Castilla-Cortázar I, Picardi A, Tosar A, Ainzúa J, Urdaneta E, García M, Pascual M, Quiroga J, Prieto J. Effect of insulin-like growth factor I on in vivo intestinal absorption of D-galactose in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1999, 276(1 Pt 1):G37-42.
77. Castilla-Cortazar I, Prieto J, Urdaneta E, Pascual M, Nunez M, Zudaire E, Garcia M, Quiroga J, Santidrian S: Impaired intestinal sugar transport in cirrhotic rats: correction by low doses of insulin-like growth factor I. *Gastroenterology* 1997, 113(4):1180–1187.
78. Caufriez A, Reding P, Urbain D, Golstein J, Copinschi G: Insulin-like growth factor I: a good indicator of functional hepatocellular capacity in alcoholic liver cirrhosis. *J Endocrinol Invest* 1991, 14(4):317–321.
79. Ceda GP, Hoffman AR, Silverberg GD, Wilson DM, Rosenfeld RG. Regulation of growth hormone release from cultured human pituitary adenomas by somatomedins and insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985 Jun;60(6):1204-9.
80. Cemborain A, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Muguerza B, Delgado G, Diaz-Sanchez M, Picardi A: Effects of IGF-I treatment on osteopenia in rats with advanced liver cirrhosis. *J Physiol Biochem* 2000, 56(2):91–9.
81. Cemborain A, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Muguerza B, Picardi A, Santidrian S, Prieto J: Osteopenia in rats with liver cirrhosis: beneficial effects of IGF-I treatment. *J Hepatol* 1998, 28(1):122–131.
82. Chang TC, Lin JJ, Yu SC, Chang TJ: Absence of growth-hormone receptor in hepatocellular carcinoma and cirrhotic liver. *Hepatology* 1990, 11(1):123–126.
83. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR: Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp 70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994, 14(7):4902–4911.
84. Chen Y, Liu W, McPhie DL, Hassinger L, Neve RL. APP-BP1 mediates APP-induced apoptosis and DNA synthesis and is increased in Alzheimer's disease brain. *J Cell Biol.* 2003 Oct 13; 163(1):27-33.
85. Chen Y, McPhie DL, Hirschberg J, Neve RL .The amyloid precursor protein-binding protein APP-BP1 drives the cell cycle through the S-M checkpoint and causes apoptosis in neurons. *J Biol Chem.* 2000 Mar 24; 275(12):8929-35.
86. Cheng CM, Tseng V, Wang J, Wang D, Matyakhina L, Bondy CA: Tau is hyperphosphorylated in the insulin-like growth factor-I null brain. *Endocrinology* 2005, 146(12):5086–5091.
87. Cheng HL, Russell JW, Feldman EL. IGF-I promotes peripheral nervous system myelination. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Sep 14;883:124-30.
88. Chernauskas SD: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by astroglial cells: regulation and importance for epidermal growth factor-induced cell replication. *J Neurosci Res* 1993, 34(2):189–197.
89. Chin E, Zhou J, Dai J, Baxter RC, Bondy CA: Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex. *Endocrinology* 1994, 134(6):2498–2504.
90. Chisalita SI, Johansson GS, Liefvendahl E, Back K, Arnqvist HJ: Human aortic smooth muscle cells are insulin resistant at the receptor level but sensitive to IGF1 and IGF2. *J Mol Endocrinol* 2009, 43(6):231–239.
91. Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM: The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res* 2008, 14(20):6364–6370.
92. Chrysis D, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ: Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci* 2001, 21(5):1481–1489.
93. Chubb C: Sexual behavior and fertility of little mice. *Biol Reprod* 1987, 37(3):564–569.
94. Chuzel F, Clark AM, Avallet O, Saez JM: Transcriptional regulation of the lutropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis



- by growth factors in cultured pig leydig cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 1996, 239(1):8–16.
95. Cittadini A, Monti MG, Castiello MC, D'Arco E, Galasso G, Sorriento D, Saldamarco L, De Paulis A, Napoli R, Iaccarino G, et al: Insulin-like growth factor-1 protects from vascular stenosis and accelerates re-endothelialization in a rat model of carotid artery injury. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* 2009, 7(11):1920–1928.
  96. Clark R: The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 1997, 18(2):157–179.
  97. Clemmons DR and Underwood LE. Role of insulin-like growth factors and growth hormone in reversing catabolic states. *Horm Res* 1992;38 Suppl 2: 37-40.
  98. Clemmons DR, Moses AC, McKay MJ, Sommer A, Rosen DM, Ruckle J: The combination of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-3 reduces insulin requirements in insulin-dependent type 1 diabetes: evidence for in vivo biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85(4):1518–1524.
  99. Clemmons DR, Underwood LE: Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annu Rev Nutr* 1991, 11:393–412.
  100. Clemmons DR: Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2007, 6(10):821–833.
  101. Clemmons DR: Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 1998, 140(1–2):19–24.
  102. Cohick W. S. and Clemmons D. R. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993;55: 131-53.
  103. Conchillo M, de Knecht RJ, Payeras M, Quiroga J, Sangro B, Herrero JI, Castilla-Cortazar I, Frystyk J, Flyvbjerg A, Yoshizawa C, et al: Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol* 2005, 43(4):630–6.
  104. Conti E, Andreotti F, Sciahbasi A, Riccardi P, Marra G, Menini E, Ghirlanda G, Maseri A: Markedly reduced insulin-like growth factor-1 in the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001, 38(1):26–32.
  105. Conti E, Andreotti F, Sestito A, Riccardi P, Menini E, Crea F, Maseri A, Lanza GA: Reduced levels of insulin-like growth factor-1 in patients with angina pectoris, positive exercise stress test, and angiographically normal epicardial coronary arteries. *Am J Cardiol* 2002, 89(8):973–975.
  106. Conti E, Carrozza C, Capoluongo E, Volpe M, Crea F, Zuppi C, Andreotti F: Insulin-like growth factor-1 as a vascular protective factor. *Circulation* 2004, 110(15):2260–2265.
  107. Contois LW, Nugent DP, Caron JM, Cretu A, Tweedie E, Akalu A, Liebes L, Friesel R, Rosen C, Vary C, Brooks PC. Insulin-like growth factor binding protein-4 differentially inhibits growth factor-induced angiogenesis. *J Biol Chem* 2012, 287(3):1779-89.
  108. Copeland KC, Nair KS: Recombinant human insulin-like growth factor-I increases forearm blood flow. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79(1):230–232.
  109. Corbo M, Lunetta C, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Adobbati L, Silani V: Free insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding proteins-2 and -3 in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2010, 17(3):398–404.
  110. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R: Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996, 274(5291):1379–1383.
  111. Csiszar A, Labinskyy N, Perez V, Recchia FA, Podlutzky A, Mukhopadhyay P, Losonczy G, Pacher P, Austad SN, Bartke A, et al: Endothelial function and

- vascular oxidative stress in long-lived GH/IGF-deficient Ames dwarf mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, 295(5):H1882–1894.
112. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G: Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res* 2002, 90(11):1159–1166.
  113. D'Ercole AJ, Applewhite GT, Underwood LE: Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol* 1980, 75(2):315–328.
  114. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE: Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, 81(3):935–939.
  115. D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez-Ospina G: The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 1996, 13(3):227–255.
  116. Dandona P, Aljada A, Dhindsa S, Garg R: Insulin as an anti-inflammatory and antiatherosclerotic hormone. *Clin Cornerstone* 2003, (Suppl 4):S13–20.
  117. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD Jr, van den Brande JL, van Wyk JJ: Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 1972, 235(5333):107.
  118. Daughaday WH, Hall K, Salmon WD Jr, Van den Brande JL, Van Wyk JJ: On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 1987, 65(5):1075–1076.
  119. Daughaday WH, Rotwein P: Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989, 10(1):68–91.
  120. Daughaday WH: Growth hormone and the somatomedins. In *Endocrine control of growth*. Edited by Daughaday WH. New York: Elsevier; 1981:1–24.
  121. de Mello-Coelho V, Villa-Verde DM, Dardenne M, Savino W: Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* 1997, 76(1–2):39–49.
  122. de Smedt A, Brouns R, Uyttenboogaart M, De Raedt S, Moens M, Wilczak N, Luijckx GJ, De Keyser J: Insulin-like growth factor I serum levels influence ischemic stroke outcome. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2011, 42(8):2180–2185.
  123. de Zegher F, Francois I, van Helvoirt M, Van den Berghe G: Clinical review 89: Small as fetus and short as child: from endogenous to exogenous growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(7):2021–2026.
  124. DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991, 14(3):173–194.
  125. Delafontaine P, Bernstein KE, Alexander RW: Insulin-like growth factor I gene expression in vascular cells. *Hypertension* 1991, 17(5):693–699.
  126. Delafontaine P, Song YH, Li Y: Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24(3):435–444.
  127. Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, Englert Y, Delbaere A: Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol Reprod* 2004, 70(6):1664–1669.
  128. Dennis RA, Przybyla B, Gurley C, Kortebein PM, Simpson P, Sullivan DH, Peterson CA: Aging alters gene expression of growth and remodeling factors in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. *Physiol Genomics* 2008, 32(3):393–400.
  129. Denton RM and Tavare JM. Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. *Eur J Biochem* 1995;227(3): 597-611.
  130. Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, Rey C, Leneuve P, Blaise A, Housset C, Tronche F, Le Bouc Y, Holzenberger M: Hepatocyte proliferation during

- liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout. *FASEB J* 2006, 20(6):773–775.
131. Diez-Caballero F, Castilla-Cortázar I, Garcia-Fernandez M, Puche JE, Diaz-Sanchez M, Casares AD, Aliaga-Montilla MA, Rodriguez-Borrajo C, Gonzalez-Barón S. Little effects of insulin-like Growth Factor-I on testicular atrophy induced by hypoxia. *BMC Urol.* 2006 Feb 21;6:4.
  132. Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience.* 2006 Jul 7;140(3):823-33.
  133. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM: Stroke. *Lancet* 2008, 371(9624):1612–1623.
  134. Drago J, Murphy M, Carroll SM, Harvey RP, Bartlett PF: Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(6):2199–2203.
  135. Duan C and Xu Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol* 2005;142(1-2): 44-52.
  136. Duerr RL, McKirnan MD, Gim RD, Clark RG, Chien KR, Ross J. Jr. Cardiovascular effects of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in chronic left ventricular failure in the rat. *Circulation* 1996;93(12): 2188-96.
  137. Duffy KR, Pardridge WM, Rosenfeld RG: Human blood–brain barrier insulin-like growth factor receptor. *Metab Clin Exp* 1988, 37(2):136–140.
  138. Ebeling PR, Jones JD, O’Fallon WM, Janes CH, Riggs BL. Short-term effects of recombinant human insulin-like growth factor I on bone turnover in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77(5):1384–1387
  139. Efstratiadis G, Tsiaousis G, Athyros VG, Karagianni D, Pavlitou-Tsiontsi A, Giannakou-Darda A, Manes C: Total serum insulin-like growth factor-1 and C-reactive protein in metabolic syndrome with or without diabetes. *Angiology* 2006, 57(3):303–311.
  140. Facchini FS, Hua N, Abbasi F, Reaven GM: Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(8):3574–3578.
  141. Fausto N, Laird AD, Webber EM: Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995, 9(15):1527–1536.
  142. Fazio S, Palmieri EA, Biondi B, Cittadini A, Sacca L. The role of the GH-IGF-I axis in the regulation of myocardial growth: from experimental models to human evidence. *Eur J Endocrinol* 2000;142(3): 211-6.
  143. Feinberg MS, Scheinowitz M, Laron Z: Echocardiographic dimensions and function in adults with primary growth hormone resistance (laron syndrome). *Am J Cardiol* 2000, 85(2):209–213.
  144. Fernandez AM, Torres-Aleman I: The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2012, 13(4):225–239.
  145. Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Walston J, Kimura M, Aviv A: Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol* 2007, 165(1):14–21.
  146. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA: Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 1996, 17(5):481–517.
  147. Flyvbjerg A: Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia* 2000, 43(10):1205–1223.
  148. Franklin KB, Paxinos G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Ed: Academic Press, USA. 2008.
  149. Frei B. Molecular & biological mechanisms of antioxidant action. *Faseb J* 1999;13(9): 963-4.
  150. Fries JF: Aging, natural death, and the compression of morbidity. *N Eng J Med* 1980, 303(3):130–135.

151. Froesch ER, Buergi H, Ramseier EB, Bally P, Labhart A: Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J Clin Invest* 1963, 42:1816–1834.
152. Froesch ER, Zapf J, Audhya TK, Ben-Porath E, Segen BJ, Gibson KD: Nonsuppressible insulin-like activity and thyroid hormones: major pituitary-dependent sulfation factors for chick embryo cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976, 73(8):2904–2908.
153. Futterman LG, Lemberg L: The framingham heart study: a pivotal legacy of the last millennium. *American journal of critical care: an official publication, American Association of Critical-Care Nurses* 2000, 9(2):147–151.
154. Gadaleta MN, Cormio A, Pesce V, Lezza AM, Cantatore P: Aging and mitochondria. *Biochimie* 1998, 80(10):863-870.
155. Gago, A. Disfunción testicular asociada a la deficiencia de “insulin-like growth factor I” (IGF-I) en ratones puberales. Efectos de la terapia sustitutiva. 2012. Tesis Doctoral.
156. Galderisi M, Caso P, Cicala S, De Simone L, Barbieri M, Vitale G, de Divitiis O, Paolisso G: Positive association between circulating free insulin-like growth factor-1 levels and coronary flow reserve in arterial systemic hypertension. *Am J Hypertens* 2002, 15(9):766–772.
157. Garcia-Estrada J, Garcia-Segura LM, Torres-Aleman I: Expression of insulin-like growth factor I by astrocytes in response to injury. *Brain Res* 1992, 592(1–2):343–347.
158. Garcia-Fernandez M, Castilla-Cortazar I, Diaz-Sanchez M, Navarro I, Puche JE, Castilla A, Casares AD, Clavijo E, Gonzalez-Baron S: Antioxidant effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in rats with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol* 2005, 5:7.
159. Garcia-Fernandez M, Delgado G, Puche JE, Gonzalez-Baron S, Castilla Cortazar I: Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. *Endocrinology* 2008, 149(5):2433–2442.
160. Garcia-Fernandez M, Sierra I, Puche JE, Guerra L, Castilla-Cortazar I: Liver mitochondrial dysfunction is reverted by insulin-like growth factor II (IGF-II) in aging rats. *J Transl Med* 2011, 9:123.
161. Garcia-Segura LM, Arevalo MA, Azcoitia I: Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signalling in the nervous system: new advances. *Prog Brain Res* 2010, 181:251–272.
162. Gasperi M, Castellano AE: Growth hormone/insulin-like growth factor I axis in neurodegenerative diseases. *J Endocrinol Invest* 2010, 33(8):587–591.
163. Gelber SJ, Hardy MP, Mendis-Handagama SM, Casella SJ: Effects of insulin-like growth factor-I on androgen production by highly purified pubertal and adult rat Leydig cells. *J Androl* 1992, 13(2):125–130.
164. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998;11(10): 1176-83.
165. Ghigo MC, Torsello A, Grilli R, Luoni M, Guidi M, Cella SG, Locatelli V, Muller EE: Effects of GH and IGF-I administration on GHRH and somatostatin mRNA levels: I. A study on ad libitum fed and starved adult male rats. *J Endocrinol Invest* 1997, 20(3):144–150.
166. Gibson LF, Piktel D, Landreth KS: Insulin-like growth factor-1 potentiates expansion of interleukin-7-dependent pro-B cells. *Blood* 1993, 82(10):3005–3011.
167. Gillespie CM, Merkel AL, Martin AA: Effects of insulin-like growth factor-I and LR3IGF-I on regional blood flow in normal rats. *J Endocrinol* 1997, 155(2):351–358.

168. Gilley J, Coffey PJ, Ham J: FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol* 2003, 162(4):613–622.
169. Gines P, Quintero E, Arroyo V, Teres J, Bruguera M, Rimola A, Caballeria J, Rodes J, Rozman C: Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* 1987, 7(1):122–128.
170. Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG: Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80(5):1548–1555.
171. Giudice LC, Saleh W: Growth factors in reproduction. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 1995, 6(2):60–69.
172. Giudice LC: Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 1992, 13(4):641–669.
173. Giulivi C, Boveris A, Cadenas E: Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach. In Edited by Gilbert D, Colton C. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 1999:77–102.
174. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E: Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 2008, 29(5):535–559.
175. Gluckman PD, Hanson MA: Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin Fetal Neonatal Med* 2004, 9(5):419–425.
176. Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE: GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat Genet* 1993, 4(3):227–232.
177. Goldstein S, Gallo JJ, Reichel W: Biologic theories of aging. *Am Fam Physician* 1989, 40(3):195–200
178. Gomez JM, Maravall FJ, Gomez N, Navarro MA, Casamitjana R, Soler J: Interactions between serum leptin, the insulin-like growth factor-I system, and sex, age, anthropometric and body composition variables in a healthy population randomly selected. *Clin Endocrinol* 2003, 58(2):213–219.
179. Gommans WM, Tatalias NE, Sie CP, Dupuis D, Vendetti N, Smith L, Kaushal R, Maas S: Screening of human SNP database identifies recoding sites of A-to-I RNA editing. *RNA* 2008, 14(10):2074–2085.
180. Gong X, Ma M, Fan X, Li M, Liu Q, Liu X, Xu G: Down-regulation of IGF-1/IGF-1R in hippocampus of rats with vascular dementia. *Neurosci Lett* 2012, 513(1):20–24.
181. Gonzalez C, Diaz F, Alonso A: Neuroprotective effects of estrogens: cross-talk between estrogen and intracellular insulin signalling. *Infect Disord Drug Targets* 2008, 8(1):65–67.
182. Grandjean V, Smith J, Schofield PN, Ferguson-Smith AC: Increased IGF-II protein affects p57kip2 expression in vivo and in vitro: implications for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97(10):5279–5284.
183. Gressner AM, Brenzel A, Vossmeier T: Hepatocyte-conditioned medium potentiates insulin-like growth factor (IGF) 1 and 2 stimulated DNA synthesis of cultured fat storing cells. *Liver* 1993, 13(2):86–94.
184. Grossman RI, Gomori JM, Ramer KN, Lexa FJ, Schnall MD. Magnetization transfer: theory and clinical applications in neuroradiology. *Radiographics* 1994, 14(2): 279–290.
185. Gu F, Schumacher FR, Canzian F, Allen NE, Albanes D, Berg CD, et al.: Eighteen insulin-like growth factor pathway genes, circulating levels of IGF-I and its binding protein, and risk of prostate and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010, 19(11):2877–87.
186. Gual P, Baron V, Lequoy V, van Obberghen E. Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology* 1998;139(3): 884–93.

187. Guerra L. Mecanismos de los efectos beneficiosos en tejido óseo inducidos por la terapia sustitutiva con Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I). Caracterización del modelo experimental en ratones con deficiencia parcial de IGF-I. 2012. Tesis doctoral.
188. Guevara-Aguirre J, Rosenbloom AL, Vaccarello MA, Fielder PJ, de la Vega A, Diamond FB Jr, Rosenfeld RG: Growth hormone receptor deficiency (Iaron syndrome): clinical and genetic characteristics. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1991, 377:96–103.
189. Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch ER: Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85(13):4889–4893.
190. Hall KS, Lien B, Paulsen JE, Clausen OP, Bergan A, Rugstad HE: Effect of preoperative 4'-epidoxorubicin (epi-adriamycin) treatment on the regeneration and function of the liver in partially hepatectomized rats. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes* 1989, 21(3–4):196–204.
191. Hall P: Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In *The physiology of reproduction*. Edited by Knobil E, Neill J. New York: Raven Press; 1994:1335–1362. vol. 1.
192. Halliwell B: Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001, 18(9):685–716.
193. Han VK, Carter AM: Control of growth and development of the feto-placental unit. *Curr Opin Pharmacol* 2001, 1(6):632–640.
194. Hankenson FC, Garzel LM, Fischer DD, Nolan B, Hankenson KD. Evaluation of Tail Biopsy Collection in Laboratory Mice (*Mus Musculus*): Vertebral Ossification, DNA Quantity, and Acute Behavioral Responses, *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2008, 47:10-8.
195. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956 Jul; 11(3):298-300.
196. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992, 275(3-6):257-266.
197. Harman D. Free radical theory of aging. *Triangle* 1973, 12(4):153-158.
198. Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1067:10-21.
199. Hattersley AT, Tooke JE: The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. *Lancet* 1999, 353(9166):1789–1792.
200. Higashi Y, Sukhanov S, Anwar A, Shai SY, Delafontaine P: IGF-1, oxidative stress and atheroprotection. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2010, 21(4):245–254.
201. Hinton PS, Peterson CA, Dahly EM, Ney DM: IGF-I alters lymphocyte survival and regeneration in thymus and spleen after dexamethasone treatment. *Am J Physiol* 1998, 274(4 Pt 2):R912–R920.
202. Hirschberg R, Adler S: Insulin-like growth factor system and the kidney: physiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 1998, 31(6):901–919.
203. Hirschberg R: Insulin-like growth factor I in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 1996, 22(1–3):128–132.
204. Hodge RD, D'Ercole AJ, O'Kusky JR: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) inhibits neuronal apoptosis in the developing cerebral cortex in vivo. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2007, 25(4):233–241.
205. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7.

206. Hribal ML, Nakae J, Kitamura T, Shutter JR, Accili D: Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol* 2003, 162(4):535–541.
207. Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH: IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol* 2004, 164(1):111–122.
208. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999 Dec;20(6):761-87.
209. Hynes MA, Van Wyk JJ, Brooks PJ, D'Ercole AJ, Jansen M, Lund PK: Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol* 1987, 1(3):233–242.
210. Inaba T, Saito H, Inoue T, Han I, Furukawa S, Matsuda T, Ikeda S, Muto T: Growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis alterations contribute to disturbed protein metabolism in cirrhosis patients after hepatectomy. *J Hepatol* 1999, 31(2):271–276.
211. Inoguchi T, Umeda F, Watanabe J, Ibayashi H: Reduced serum stimulatory activity on prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells in diabetes mellitus. *Haemostasis* 1986, 16:447–452.
212. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31:e15.
213. Iturrieta I. Estudio de la expresión génica de proteínas neurotróficas en animales con deficiencia parcial de IGF-1: efecto del tratamiento sustitutivo. 2013. Tesis Doctoral.
214. Izhar U, Hasdai D, Richardson DM, Cohen P, Lerman A: Insulin and insulin-like growth factor-I cause vasorelaxation in human vessels in vitro. *Coron Artery Dis* 2000, 11(1):69–76.
215. Jaques G, Noll K, Wegmann B, Witten S, Kogan E, Radulescu RT, Havemann K: Nuclear localization of insulin-like growth factor binding protein 3 in a lung cancer cell line. *Endocrinology* 1997, 138(4):1767–1770.
216. Jaquet D, Vidal H, Hankard R, Czernichow P, Levy-Marchal C: Impaired regulation of glucose transporter 4 gene expression in insulin resistance associated with in utero undernutrition. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(7):3266–3271.
217. Jeschke MG, Barrow RE, Herndon DN: Insulinlike growth factor I plus insulinlike growth factor binding protein 3 attenuates the proinflammatory acute phase response in severely burned children. *Ann Surg* 2000, 231(2):246–252.
218. Johansson GS, Chisalita SI, Arnqvist HJ: Human microvascular endothelial cells are sensitive to IGF-I but resistant to insulin at the receptor level. *Mol Cell Endocrinol* 2008, 296(1–2):58–63.
219. Johnsen SP, Hundborg HH, Sorensen HT, Orskov H, Tjonneland A, Overvad K, Jorgensen JO: Insulin-like growth factor (IGF) I, -II, and IGF binding protein-3 and risk of ischemic stroke. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(11):5937–5941.
220. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*, 2007, 8:118–127.
221. Johnston LB, Woods KA, Rose SJ, Clark AJ, Savage MO: The broad spectrum of inherited growth hormone insensitivity syndrome. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 1998, 9(6):228–232.
222. Joseph D'Ercole A, Ye P: Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology* 2008, 149(12):5958–5962.
223. Kajimura S, Aida K, Duan C: Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mediates hypoxia-induced embryonic growth and developmental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(4):1240–1245.
224. Kalmar B and Greensmith L: Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61(4):310-318.

225. Karas M, Koval AP, Zick Y, LeRoith D. The insulin-like growth factor I receptor-induced interaction of insulin receptor substrate-4 and Crk-II. *Endocrinology* 2001;142(5): 1835-40.
226. Kenner KA, Heidenreich KA: Insulin and insulin-like growth factors stimulate in vivo receptor autophosphorylation and tyrosine phosphorylation of a 70K substrate in cultured fetal chick neurons. *Endocrinology* 1991, 129(1):301-311.
227. Kerkhoff H, Hassan SM, Troost D, Van Etten RW, Veldman H, Jennekens FG: Insulin-like and fibroblast growth factors in spinal cords, nerve roots and skeletal muscle of human controls and patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 1994, 87(4):411-421.
228. Kermer P, Klöcker N, Labes M, Bähr M. Insulin-Like Growth Factor-I Protects Axotomized Rat Retinal Ganglion Cells from Secondary Death via PI3-K-dependent Akt Phosphorylation and Inhibition of Caspase-3 In Vivo. *The Journal of Neuroscience* 2000;20(2): 722-8.
229. Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts Jr CT, Rosenfeld RG: Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:12981-6.
230. Kim SH, Kaminker P, Campisi J: Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene* 2002, 21(4):503-511.
231. Kirkwood TB, Finch CE: Ageing: the old worm turns more slowly. *Nature* 2002;419(6909): 794-5.
232. Kirkwood TB: Evolution of ageing. *Mech Ageing Dev* 2002;123(7): 737-45.
233. Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ: Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1983, 112(6):2215-2217.
234. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA: Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 1996, 271(49):31372-31378.
235. Kolaczynski JW, Caro JF: Insulin-like growth factor-1 therapy in diabetes: physiologic basis, clinical benefits, and risks. *Ann Intern Med* 1994, 120(1):47-55.
236. Komoly S, Hudson LD, Webster HD, Bondy CA: Insulin-like growth factor I gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(5):1894-1898.
237. Koutsaki M, Sifakis S, Zaravinos A, Koutroulakis D, Koukoura O, Spandidos DA: Decreased placental expression of hPGH, IGF-I and IGFBP-1 in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Growth Horm IGF Res* 2011, 21(1):31-36.
238. Kowald A. The mitochondrial theory of aging. *Biol Signals Recept* 2001;10(3-4): 162-75.
239. Kowaltowski AJ and Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;26(3-4): 463-71.
240. Kramer MS, Olivier M, McLean FH, Willis DM, Usher RH: Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality on fetal and neonatal outcome. *Pediatrics* 1990, 86(5):707-713.
241. Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic Signalling By The Insulin-Like Growth Factor I Receptor, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Akt. *Molecular And Cellular Biology* 1997; p. 1595-1606.
242. Kumar PA, Brosius FC III, Menon RK: The glomerular podocyte as a target of growth hormone action: implications for the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Curr Diabetes Rev* 2011, 7(1):50-55.
243. Lai EC, Felice KJ, Festoff BW, Gawel MJ, Gelinis DF, Kratz R, Murphy MF, Natter HM, Norris FH, Rudnicki SA: Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The north america ALS/IGF-I study group. *Neurology* 1997, 49(6):1621-1630.



244. Lamberts SW, van den Beld AW, van der Lely AJ: The endocrinology of aging. *Science* 1997, 278(5337):419–424.
245. Landau D, Biada J, Chen Y, Sood S, Yakar S, Leroith D, Segev Y, Rabkin R: A marked deficiency in circulating and renal IGF-I peptide does not inhibit compensatory renal enlargement in uninephrectomized mice. *Growth Horm IGF Res* 2011, 21(5):279–284.
246. Landreth KS, Narayanan R, Dorshkind K: Insulin-like growth factor-I regulates pro-B cell differentiation. *Blood* 1992, 80(5):1207–1212.
247. Langford KS and Miell JP. The insulin-like growth factor-I/binding protein axis: physiology, pathophysiology and therapeutic manipulation. *Eur J Clin Invest* 1993;23(9): 503-16.
248. Langford KS and Miell JP. The insulin-like growth factor-I/binding protein axis: physiology, pathophysiology and therapeutic manipulation. *Eur J Clin Invest* 1993;23(9): 503-16.
249. Laron Z, Parks JS: Lessons from Laron syndrome (LS) 1966–1992. A model of GH and IGF-I action and interaction. *Pediatric and Adolescent Endocrinology* 1993, 24.
250. Laron Z, Pertzalan A, Mannheimer S: Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone—a new inborn error of metabolism? *Israel journal of medical sciences* 1966, 2(2):152–155.
251. Laron Z: Laron syndrome (primary growth hormone resistance or insensitivity): the personal experience 1958–2003. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(3):1031–1044.
252. Laron Z: Laron syndrome—primary growth hormone resistance. In *Hormone resistance syndromes contemporary endocrinology*. Edited by Jameson JL. NJ: Humana Press; 1999:17–37. vol. 2.
253. Laron Z: Laron-type dwarfism (hereditary somatomedin deficiency): a review. In *Advances in internal medicine and pediatrics*. Edited by Frick P, von Harnack GA, Kochsieck K, Martini GA, Prader A. Berlin: Springer; 1984:117–150.
254. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Criqui MH, Kritz-Silverstein D: The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(1):114–120.
255. Laursen LS, Kjaer-Sorensen K, Andersen MH, Oxvig C. Regulation of insulin-like growth factor (IGF) bioactivity by sequential proteolytic cleavage of IGF binding protein-4 and -5. *Mol Endocrinol*. 2007 May;21(5):1246-57.
256. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A: The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001, 22(1):53–74.
257. Le Roith D: Seminars in medicine of the beth israel deaconess medical center. Insulin-like growth factors. *The New England journal of medicine* 1997, 336(9):633–640.
258. Leal Ade C, Canton AP, Montenegro LR, Coutinho DC, Arnhold IJ, Jorge AA: Mutations in insulin-like growth factor receptor 1 gene (IGF1R) resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2011, 55(8):541–549.
259. Lee KW, Ma L, Yan X, Liu B, Zhang XK, Cohen P: Rapid apoptosis induction by IGFBP-3 involves an insulin-like growth factor-independent nucleomitochondrial translocation of RXRalpha/Nur77. *J Biol Chem* 2005, 280(17):16942–16948.
260. Lee WH, Clemens JA, Bondy CA: Insulin-like growth factors in the response to cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* 1992, 3(1):36–43.
261. Lenaz G, Bovina C, D’Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, et al. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 2002;959: 199-213.

262. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr: Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995, 16(2):143–163.
263. Leutner S, Eckerf A, Muller WE: ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm* 2001, 108(8-9):955-967.
264. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186: 464-78
265. Li M, Li C, Parkhouse WS: Age-related differences in the des IGF-I-mediated activation of Akt-1 and p70 S6K in mouse skeletal muscle. *Mech Ageing Dev* 2003, 124(7):771–778.
266. Li Q, Ceylan-Isik AF, Li J, Ren J: Deficiency of insulin-like growth factor 1 reduces sensitivity to aging-associated cardiomyocyte dysfunction. *Rejuvenation Res* 2008, 11(4):725–733.
267. Li Q, Ren J: Influence of cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor 1 on lifespan and aging-associated changes in cardiac intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis, protein damage and apoptotic protein expression. *Aging Cell* 2007, 6(6):799–806.
268. Li Q, Wu S, Li SY, Lopez FL, Du M, Kajstura J, Anversa P, Ren J: Cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor 1 attenuates aging-associated cardiac diastolic contractile dysfunction and protein damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 292(3):H1398–1403.
269. Li Y, Wu H, Khardori R, Song YH, Lu YW, Geng YJ: Insulin-like growth factor-1 receptor activation prevents high glucose-induced mitochondrial dysfunction, cytochrome-c release and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 384(2):259–264.
270. Li Y, Yui D, Luikart BW, McKay RM, Li Y, Rubenstein JL, Parada LF. Conditional ablation of brain-derived neurotrophic factor-TrkB signaling impairs striatal neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 18;109(38):15491-6.
271. Lin T, Blaisdell J, Haskell JF: Type I IGF receptors of leydig cells are upregulated by human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 149(3):852–858.
272. Lin T, Haskell J, Vinson N, Terracio L: Characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors of purified Leydig cells and their role in steroidogenesis in primary culture: a comparative study. *Endocrinology* 1986, 119(4):1641–1647.
273. Lin T: Insulin-like growth factor-I regulation of the leydig cell. In *The leydig cell*. Edited by Payne A, Hardy M, Russell L. Vienna: Cache River Press; 1996:477–49. vol. 1.
274. Liu J and Mori A: Stress, aging, and brain oxidative damage. *Neurochem Res* 1999, 24(11):1479-1497.
275. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A: Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993, 75(1):59–72.
276. Liu X, Yao DL, Webster H: Insulin-like growth factor I treatment reduces clinical deficits and lesion severity in acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult Scler* 1995, 1(1):2–9.
277. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002;80(5): 780-7.
278. Lobie PE, Breipohl W, Aragon JG, Waters MJ: Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology* 1990, 126(4):2214–2221.

279. Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, Fuente JD, et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 2000;57(2): 146-52.
280. Longo VD: Linking sirtuins, IGF-I signaling, and starvation. *Exp Gerontol* 2009, 44(1-2):70-74.
281. Lopez-Lopez C, LeRoith D, Torres-Aleman I: Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(26):9833-9838.
282. Lorenzo-Zuniga V, Rodriguez-Ortigosa CM, Bartoli R, Martinez-Chantar ML, Martinez-Peralta L, Pardo A, Ojanguren I, Quiroga J, Planas R, Prieto J: Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut* 2006, 55(9):1306-1312.
283. Low JA, Handley-Derry MH, Burke SO, Peters RD, Pater EA, Killen HL, Derrick EJ: Association of intrauterine fetal growth retardation and learning deficits at age 9 to 11 years. *Am J Obstet Gynecol* 1992, 167(6):1499-1505.
284. Lowe WL Jr, Adamo M, Werner H, Roberts CT Jr, LeRoith D: Regulation by fasting of rat insulin-like growth factor I and its receptor. Effects on gene expression and binding. *J Clin Invest* 1989, 84(2):619-626.
285. Lunetta C, Serafini M, Prella A, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Sassone J, Colciago C, Moggio M, Corbo M, et al: Impaired expression of insulin-like growth factor-1 system in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle Nerve* 2012, 45(2):200-208.
286. Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A: Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol* 2001, 229(1):141-162.
287. Lurie R, Ben-Amitai D, Laron Z: Laron syndrome (primary growth hormone insensitivity): a unique model to explore the effect of insulin-like growth factor 1 deficiency on human hair. *Dermatology* 2004, 208(4):314-318.
288. Magoffin DA, Weitsman SR: Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 1994, 51(4):766-775.
289. Malik J, Stulc T, Wichterle D, Melenovsky V, Chytilova E, Lacinova Z, Marek J, Ceska R: Hyperlipidemia is associated with altered levels of insulin-like growth factor-I. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2008, 57(6):919-925.
290. Martin AA, Tomas FM, Owens PC, Knowles SE, Ballard FJ, Read LC: IGF-I and its variant, des-(1-3)IGF-I, enhance growth in rats with reduced renal mass. *Am J Physiol* 1991, 261(4 Pt 2):F626-F633.
291. Martin JL, Willetts KE, Baxter RC: Purification and properties of a novel insulin-like growth factor-II binding protein from transformed human fibroblasts. *J Biol Chem* 1990, 265(7):4124-30.
292. Martinez-Gac L, Marques M, Garcia Z, Campanero MR, Carrera AC: Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors: novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide 3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol* 2004, 24(5):2181-2189.
293. Mayer MP and Bukau B: Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62: 670-684.
294. Melov S. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(11): 1395.
295. Mi H, Guo N, Kejariwal A, Thomas PD. PANTHER version 6: protein sequence and function evolution data with expanded representation of biological pathways. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D247-52.

296. Mi H, Lazareva-Ulitsky B, Loo R, Kejariwal A, Vandergriff J, Rabkin S, Guo N, Muruganujan A, Doremieux O, Campbell MJ, Kitano H, Thomas PD. The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D284-8.
297. Midyett LK, Rogol AD, Van Meter QL, Frane J, Bright GM, Group MSS. Recombinant insulin-like growth factor (IGF)-I treatment in short children with low IGF-I levels: first-year results from a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, 95(2):611–619.
298. Miller HC: Prenatal factors affecting intrauterine growth retardation. *Clin Perinatol* 1985, 12(2):307–318.
299. Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Munoz FJ, Ruiz F, Leighton F, Inestrosa NC: The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2000, 62(6):633–648.
300. Mirpuri E, Garcia-Trevijano ER, Castilla-Cortazar I, Berasain C, Quiroga J, Rodriguez-Ortigosa C, Mato JM, Prieto J, Avila MA: Altered liver gene expression in CCl4-cirrhotic rats is partially normalized by insulin-like growth factor-I. *Int J Biochem Cell Biol* 2002, 34(3):242–252.
301. Miyakoshi N, Richman C, Qin X, Baylink DJ, Mohan S. Effects of recombinant insulin-like growth factor-binding protein-4 on bone formation parameters in mice. *Endocrinology.* 1999 Dec;140(12):5719-28.
302. Moller S, Becker U, Juul A, Skakkebaek NE, Christensen E: Prognostic value of insulinlike growth factor I and its binding protein in patients with alcohol-induced liver disease. EMALD group. *Hepatology* 1996, 23(5):1073–1078.
303. Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D: Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 2002, 23(1–2):139–154.
304. Moore A, Morris ID: The involvement of insulin-like growth factor-I in local control of steroidogenesis and DNA synthesis of leydig and non-leydig cells in the rat testicular interstitium. *J Endocrinol* 1993, 138(1):107–114.
305. Moverare-Skrtic S, Svensson J, Karlsson MK, Orwoll E, Ljunggren O, Mellstrom D, Ohlsson C: Serum insulin-like growth factor-I concentration is associated with leukocyte telomere length in a population-based cohort of elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(12):5078–5084.
306. Mugerza B, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Santidrian S, Prieto J: Antifibrogenic effect in vivo of low doses of insulin-like growth factor-I in cirrhotic rats. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1536(2–3):185–195.
307. Muller AP, Fernandez AM, Haas C, Zimmer E, Portela LV, Torres-Aleman I: Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Mol Cell Neurosci* 2012, 49(1):9–12.
308. Mulrone SE, Haramati A, Werner H, Bondy C, Roberts CT Jr, LeRoith D: Altered expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF receptor genes after unilateral nephrectomy in immature rats. *Endocrinology* 1992, 130(1):249–256.
309. Murphy LJ, Friesen HG: Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology* 1988, 122(1):325–332.
310. Murphy WJ, Durum SK, Longo DL: Human growth hormone promotes engraftment of murine or human T cells in severe combined immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(10):4481–4485.
311. Murphy WJ, Durum SK, Longo DL: Role of neuroendocrine hormones in murine T cell development. Growth hormone exerts thymopoietic effects in vivo. *Journal of immunology* 1992, 149(12):3851–3857.
312. Murray CJ, Lopez AD: Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997, 349(9061):1269–1276.

313. National Cholesterol Education Program: Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) final report. *Circulation* 2002, 106(25):3143–3421.
314. Naville D, Chatelain PG, Avallet O, Saez JM: Control of production of insulin-like growth factor I by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. *Cell-cell interactions. Mol Cell Endocrinol* 1990, 70(3):217–224.
315. Nedic O., Nikolic J. A., Baricevic I., Jovanovic B. and Ilic N. Insulin-like growth factors in patients with liver cysts. *J Clin Lab Anal* 2004;18(6): 299-304
316. Netchine I, Azzi S, Houang M, Seurin D, Perin L, Ricort JM, et al. Partial primary deficiency of insulin-like growth factor (IGF)-I activity associated with IGF1 mutation demonstrates its critical role in growth and brain development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Oct;94(10):3913-21.
317. Nguyen TQ, Roestenberg P, van Nieuwenhoven FA, Bovenschen N, Li Z, Xu L, et al.: CTGF inhibits BMP-7 signaling in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2008, 19(11):2098-107.
318. Nishijima T, Piriz J, Duflot S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, Verdugo JM, Leroy F, Soya H, Nunez A, et al: Neuronal activity drives localized blood–brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron* 2010, 67(5):834–846.
319. Nohl H. Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994;52(3): 199-204.
320. O'Connor JC, McCusker RH, Strle K, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW: Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology. *Cell Immunol* 2008, 252(1–2):91–110.
321. Oemar BS and Luscher TF: Connective tissue growth factor, friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, 17:1483–1489.
322. Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim H-S, Wilson E, Rosenfeld RG: Synthesis and characterization of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-7). *J Biol Chem* 1996, 271:30322–30325.
323. Ohlsson C, Mohan S, Sjogren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, Jansson JO, Svensson J: The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev* 2009, 30(5):494–535.
324. Oliver N, Sternlicht M, Gerritsen K, Goldschmeding R. Could aging human skin use a connective tissue growth factor boost to increase collagen content? *J Invest Dermatol* 2010, 130(2):338-41.
325. Ozdemir D, Baykara B, Aksu I, Kiray M, Sisman AR, Cetin F, Dayi A, Gurpinar T, Uysal N, Arda MN: Relationship between circulating IGF-1 levels and traumatic brain injury-induced hippocampal damage and cognitive dysfunction in immature rats. *Neurosci Lett* 2012, 507(1):84–89.
326. Ozdinler PH, Macklis JD: IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci* 2006, 9(11):1371–1381.
327. Paolisso G, Ammendola S, Del Buono A, Gambardella A, Riondino M, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Carella C, Varricchio M: Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy centenarians: relationship with plasma leptin and lipid concentrations, insulin action, and cognitive function. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(7):2204–2209.
328. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Giugliano D: Advancing age and insulin resistance: new facts about an ancient history. *Eur J Clin Invest* 1999, 29(9):758–769.
329. Pascual M, Castilla-Cortazar I, Urdaneta E, Quiroga J, Garcia M, Picardi A, Prieto J: Altered intestinal transport of amino acids in cirrhotic rats: the effect of insulin-like growth factor-I. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, 279(2):G319–324.

330. Paz K, Boura-Halfon S, Wyatt LS, LeRoith D, Zick Y. The juxtamembrane but not the carboxyl-terminal domain of the insulin receptor mediates insulin's metabolic functions in primary adipocytes and cultured hepatoma cells. *J Mol Endocrinol* 2000;24(3): 419-32.
331. Pennisi PA, Kopchick JJ, Thorgeirsson S, LeRoith D, Yakar S: Role of growth hormone (GH) in liver regeneration. *Endocrinology* 2004, 145(10):4748–4755.
332. Penrose LS: Data on the genetics of birth weight. *Ann Eugen* 1952, 16(4):378–381.
333. Perez R, Garcia-Fernandez M, Diaz-Sanchez M, Puche JE, Delgado G, Conchillo M, Muntane J, Castilla-Cortazar I: Mitochondrial protection by low doses of insulin-like growth factor- I in experimental cirrhosis. *World journal of gastroenterology: WJG* 2008, 14(17):2731–2739.
334. Perrard-Sapori MH, Chatelain PG, Jaillard C, Saez JM: Characterization and regulation of somatomedin-C/insulin-like growth factor I (Sm-C/IGF-I) receptors on cultured pig Leydig cells. Effects of Sm-C/IGF-I on luteotropin receptors and steroidogenesis. *European journal of biochemistry / FEBS* 1987, 165(1):209–214.
335. Pete G, Hu Y, Walsh M, Sowers J, Dunbar JC: Insulin-like growth factor-I decreases mean blood pressure and selectively increases regional blood flow in normal rats. *Exp Biol Med* 1996, 213(2):187–192.
336. Pfeilschifter J, Diel I, Pilz U, Brunotte K, Naumann A, Ziegler R: Mitogenic responsiveness of human bone cells in vitro to hormones and growth factors decreases with age. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1993, 8(6):707–17.
337. Picardi A, de Oliveira AC, Muguerza B, Tosar A, Quiroga J, Castilla-Cortazar I, Santidrian S, Prieto J: Low doses of insulin-like growth factor-I improve nitrogen retention and food efficiency in rats with early cirrhosis. *J Hepatol* 1997, 26(1):191–202.
338. Pierson RW Jr, Temin HM: The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. *J Cell Physiol* 1972, 79(3):319–330.
339. Pinzani M, Abboud HE, Aron DC: Secretion of insulin-like growth factor-I and binding proteins by rat liver fat-storing cells: regulatory role of platelet-derived growth factor. *Endocrinology* 1990, 127(5):2343–2349.
340. Pons S, Torres-Aleman I: Basic fibroblast growth factor modulates insulin-like growth factor-I, its receptor, and its binding proteins in hypothalamic cell cultures. *Endocrinology* 1992, 131(5):2271–2278.
341. Popken GJ, Dechert-Zeger M, Ye P, D'Ercole AJ: Brain development. *Adv Exp Med Biol* 2005, 567:187–220.
342. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 1993, 30(6):672-679.
343. Puche JE, Garcia-Fernandez M, Muntane J, Rioja J, Gonzalez-Baron S, Castilla Cortazar I: Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology* 2008, 149(5):2620–2627.
344. Quaife CJ, Mathews LS, Pinkert CA, Hammer RE, Brinster RL, Palmiter RD: Histopathology associated with elevated levels of growth hormone and insulin-like growth factor I in transgenic mice. *Endocrinology* 1989, 124(1):40–48.
345. Quiroga J, Beloqui O, Castilla A: Cirrhosis. In *Hepatobiliary diseases*. Edited by Prieto J, Rodes J, Shafritz DA. Berlin: Springer-Verlag; 1992:323–415.
346. Rabkin R, Schaefer F: New concepts: growth hormone, insulin-like growth factor-I and the kidney. *Growth Horm IGF Res* 2004, 14(4):270–276.
347. Rakatzi I, Stosik M, Gromke T, Siddle K, Eckel J. Differential phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 by insulin and IGF-I receptors. *Arch Physiol Biochem* 2006;112(1): 37-47.
348. Randhawa R, Cohen P: The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Mol Genet Metab* 2005, 86(1–2):84–90.

349. Rasmussen MH, Hvidberg A, Juul A, Main KM, Gotfredsen A, Skakkebaek NE, Hilsted J, Skakkebae NE: Massive weight loss restores 24-hour growth hormone release profiles and serum insulin-like growth factor-I levels in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80(4):1407–1415.
350. Reaven GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988, 37(12):1595–1607.
351. Reece EA, Wiznitzer A, Le E, Homko CJ, Behrman H, Spencer EM: The relation between human fetal growth and fetal blood levels of insulin-like growth factors I and II, their binding proteins, and receptors. *Obstet Gynecol* 1994, 84(1):88–95.
352. Reindl KM, Sheridan MA. Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2012 Nov;163(3-4):231-45.
353. Reinhardt RR, Bondy CA: Insulin-like growth factors cross the blood–brain barrier. *Endocrinology* 1994, 135(5):1753–1761.
354. Resnik R: Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* 2002, 99(3):490–496.
355. Ridha, BH, Symms, MR, Tozer, DJ, Stockton, KC, Frost, C, Siddique, MM et al. “Magnetization transfer ratio in Alzheimer disease: comparison with volumetric measurements.” *AJNR Am J Neuroradiol*, 2007, 28(5):965-970
356. Rincon M, Muzumdar R, Atzmon G, Barzilai N: The paradox of the insulin/IGF-1 signaling pathway in longevity. *Mech Ageing Dev* 2004, 125(6):397–403.
357. Rinderknecht E, Humbel RE: Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976, 73(7):2365–2369.
358. Rinderknecht E, Humbel RE: Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 1978, 89(2):283–286.
359. Rinderknecht E, Humbel RE: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978, 253(8):2769–2776.
360. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM: Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1999, 99(1):111–120.
361. Robbins K, McCabe S, Scheiner T, Strasser J, Clark R, Jardieu P: Immunological effects of insulin-like growth factor-I–enhancement of immunoglobulin synthesis. *Clin Exp Immunol* 1994, 95(2):337–342.
362. Rogers SA, Powell-Braxton L, Hammerman MR: Insulin-like growth factor I regulates renal development in rodents. *Dev Genet* 1999, 24(3–4):293–298.
363. Roghani M, Hossenlopp P, Lepage P, Balland A, Binoux M: Isolation from human cerebrospinal fluid of a new insulin-like growth factor-binding protein with a selective affinity for IGF-II. *FEBS Lett* 1989, 255(2):253-8.
364. Rom WN, Paakko P: Activated alveolar macrophages express the insulin-like growth factor-I receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991, 4(5):432–439.
365. Rosen T, Bengtsson BA: Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 1990, 336(8710):285–288.
366. Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J, Rosenfeld RG, Pollock BH: Growth in growth hormone insensitivity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 1994, 5(7):296–303.
367. Rosenbloom AL: Growth hormone insensitivity: physiologic and genetic basis, phenotype, and treatment. *J Pediatr* 1999, 135(3):280–289.
368. Rosenfeld RG, Pham H, Keller BT, Borchardt RT, Pardridge WM: Demonstration and structural comparison of receptors for insulin-like growth factor-I and -II (IGF-I and -II) in brain and blood–brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 149(1):159–166.

369. Rosenfeld RG, Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J: Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocr Rev* 1994, 15(3):369–390.
370. Ross R: Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999, 340(2):115–126.
371. Rotwein P, Bichell DP, Kikuchi K. Multifactorial regulation of IGF-I gene expression. *Mol Reprod Dev.* 1993 Aug;35(4):358-63; discussion 363-4.
372. Rouiller-Fabre V, Lecref L, Gautier C, Saez JM, Habert R: Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 1998, 139(6):2926–2934.
373. Rubin R. and Baserga R. Insulin-like growth factor-1 receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. *Lab Invest* 1995;73(3): 311-31.
374. Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev.* 2005 Dec;26(7):916-43.
375. Saez J, Lejeune H: Regulation of Leydig cell function by hormones and growth factors other than LH and IGF-I. In *The leydig cell*. Edited by Payne A, Hardy M, Russell L. Vienna: Cache River Press; 1996:383–406. vol. 1.
376. Saez JM: Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 1994, 15(5):574–626.
377. Salmon WD Jr, Daughaday WH: A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 1957, 49(6):825–836.
378. Sandhu MS, Heald AH, Gibson JM, Cruickshank JK, Dunger DB, Wareham NJ: Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study. *Lancet* 2002, 359(9319):1740–1745.
379. Sara VR and Hall K. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 1990;70(3): 591-614
380. Saukkonen T, Shojaee-Moradie F, Williams RM, Amin R, Yuen KC, Watts A, Acerini CL, Umpleby AM, Dunger DB: Effects of recombinant human IGF-I/IGF-binding protein-3 complex on glucose and glycerol metabolism in type 1 diabetes. *Diabetes* 2006, 55(8):2365–2370.
381. Savage MO, Attie KM, David A, Metherell LA, Clark AJ, Camacho-Hubner C: Endocrine assessment, molecular characterization and treatment of growth hormone insensitivity disorders. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006, 2(7):395–407.
382. Savage MO, Blum WF, Ranke MB, Postel-Vinay MC, Cotterill AM, Hall K, Chatelain PG, Preece MA, Rosenfeld RG: Clinical features and endocrine status in patients with growth hormone insensitivity (Iaron syndrome). *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77(6):1465–1471.
383. Savage MO, Burren CP, Blair JC, Woods KA, Metherell L, Clark AJ, Camacho-Hubner C: Growth hormone insensitivity: pathophysiology, diagnosis, clinical variation and future perspectives. *Horm Res* 2001, 55(Suppl 2):32–35.
384. Schedlich LJ, Le Page SL, Firth SM, Briggs LJ, Jans DA, Baxter RC: Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. *J Biol Chem* 2000, 275(31):23462–23470.
385. Scheidegger KJ, James RW, Delafontaine P: Differential effects of low density lipoproteins on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000, 275(35):26864–26869.
386. Schini-Kerth VB: Dual effects of insulin-like growth factor-I on the constitutive and inducible nitric oxide (NO) synthase-dependent formation of NO in vascular cells. *J Endocrinol Invest* 1999, 22(5 Suppl):82–88.



387. Sell C, Ptasznik A, Chang CD, Swantek J, Cristofalo VJ, Baserga R: IGF-1 receptor levels and the proliferation of young and senescent human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 194(1):259–265.
388. Semsei I: On the nature of aging. *Mech Ageing Dev* 2000;117(1-3): 93-108.
389. Sesti G, Sciacqua A, Cardellini M, Marini MA, Maio R, Vatrano M, Succurro E, Lauro R, Federici M, Perticone F: Plasma concentration of IGF-I is independently associated with insulin sensitivity in subjects with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes Care* 2005, 28(1):120–125.
390. Setia S, Sridhar MG: Changes in GH/IGF-1 axis in intrauterine growth retardation: consequences of fetal programming? Hormone and metabolic research Hormon- und Stoffwechselforschung. *Hormones et métabolisme* 2009, 41(11):791–798.
391. Shea BT, Hammer RE, Brinster RL: Growth allometry of the organs in giant transgenic mice. *Endocrinology* 1987, 121(6):1924–1930.
392. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 1998;333 ( Pt 3): 471-90.
393. Sheppard MS, Minuk GY, Bhaumick B, Bala RM: Insulin-like growth factors (IGF) in liver disease: differential changes of IGF-I and IGF-II. *Clinical and investigative medicine Médecine clinique et expérimentale* 1987, 10(2):49–53.
394. Siddle K, Urso B, Niesler CA, Cope DL, Molina L, Surinya KH, et al. Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* 2001;29(Pt 4): 513-25.
395. Sies H: Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res* 1993, 299(3-4):183-191.
396. Silva JR, Figueiredo JR, van den Hurk R: Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 2009, 71(8):1193–1208.
397. Simpson HL, Jackson NC, Shojaee-Moradie F, Jones RH, Russell-Jones DL, Sonksen PH, Dunger DB, Umpleby AM: Insulin-like growth factor I has a direct effect on glucose and protein metabolism, but no effect on lipid metabolism in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(1):425–432.
398. Sjogren K, Bohlooly YM, Olsson B, Coschigano K, Tornell J, Mohan S, Isaksson OG, Baumann G, Kopchick J, Ohlsson C: Disproportional skeletal growth and markedly decreased bone mineral content in growth hormone receptor  $-/-$  mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 267(2):603–608.
399. Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, LeRoith D, Tornell J, Isaksson OG, Jansson JO, et al: Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(12):7088–7092.
400. Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, Margolis B, Schlessinger J: The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 1993, 260(5116):1953–1955.
401. Skrtic S, Wallenius V, Ekberg S, Brenzel A, Gressner AM, Jansson JO: Insulin-like growth factors stimulate expression of hepatocyte growth factor but not transforming growth factor beta1 in cultured hepatic stellate cells. *Endocrinology* 1997, 138(11):4683–4689.
402. Skrtic S, Waññenius V, Ekberg S, Brenzel A, Gressner AJOJ: Expression pattern of growth hormone/insulin-like growth factor associated genes in rat liver. In *Cells of the hepatic sinusoid*. Edited by Wisse E, Knook D, Balabaud C. The Netherlands: The Kupffer Foundation; 1997:131–133.
403. Smith TJ: Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases? *Pharmacol Rev* 2010, 62(2):199–236.
404. Smith WJ, Underwood LE, Clemmons DR. Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(2): 443-9.

405. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004, 3:Article3.
406. Sonntag WE, Lynch C, Thornton P, Khan A, Bennett S, Ingram R: The effects of growth hormone and IGF-1 deficiency on cerebrovascular and brain ageing. *J Anat* 2000, 197(Pt 4):575–585.
407. Sonntag WE, Lynch CD, Cooney PT, Hutchins PM: Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology* 1997, 138(8):3515–3520.
408. Soos M. A., Field C. E. and Siddle K. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *Biochem J* 1993;290 ( Pt 2): 419-26.
409. Spallarossa P, Brunelli C, Minuto F, Caruso D, Battistini M, Caponnetto S, Cordera R: Insulin-like growth factor-I and angiographically documented coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996, 77(2):200–202.
410. Spiteri-Grech J, Bartlett JM, Nieschlag E: Regulation of testicular insulin-like growth factor-I in pubertal growth hormone-deficient male rats. *J Endocrinol* 1991, 131(2):279–285.
411. Stanek MB, Borman SM, Molskness TA, Larson JM, Stouffer RL, Patton PE: Insulin and insulin-like growth factor stimulation of vascular endothelial growth factor production by luteinized granulosa cells: comparison between polycystic ovarian syndrome (PCOS) and non-PCOS women. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92(7):2726–2733.
412. Stefano JT, Correa-Giannella ML, Ribeiro CM, Alves VA, Massarollo PC, Machado MC, Giannella-Neto D. Increased hepatic expression of insulin-like growth factor-I receptor in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2006, 28;12(24):3821-8.
413. Tang BL: SIRT1, neuronal cell survival and the insulin/IGF-1 aging paradox. *Neurobiol Aging* 2006, 27(3):501–505.
414. Tapanainen J, Kuopio T, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I: Rat testicular endogenous steroids and number of leydig cells between the fetal period and sexual maturity. *Biol Reprod* 1984, 31(5):1027–1035.
415. Tatla S., Woodhead V., Foreman J. C. and Chain B. M. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(1-2): 14-24.
416. Tayarani I, Cloez I, Clement M, Bourre JM: Antioxidant enzymes and related trace elements in aging brain capillaries and choroid plexus. *J Neurochem* 1989, 53(3):817-824.
417. Teramukai S, Rohan T, Eguchi H, Oda T, Shinci K, Kono S: Anthropometric and behavioral correlates of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 in middle-aged Japanese men. *Am J Epidemiol* 2002, 156(4):344–348.
418. Thissen JP, Pucilowska JB, Underwood LE. Differential regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 messenger ribonucleic acids by amino acid availability and growth hormone in rat hepatocyte primary culture. *Endocrinology* 1994;134(3): 1570-6.
419. Thum T, Hoeber S, Froese S, Klink I, Stichtenoth DO, Galuppo P, Jakob M, Tsikas D, Anker SD, Poole-Wilson PA, et al: Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ Res* 2007, 100(3):434–443.
420. Tiong TS, Herington AC: Tissue distribution, characterization, and regulation of messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor and serum binding protein in the rat. *Endocrinology* 1991, 129(3):1628–1634.
421. Toescu EC: Normal brain ageing: models and mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005, 29(1464):2347-2354.

422. Tolmasoff JM, Ono T, Cutler RG: Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, 77(5):2777-2781.
423. Tomas FM, Knowles SE, Owens PC, Burgoyne JL, Chandler CS, Ballard FJ. Conjoint IGF-I and insulin infusion shows diverse interactive effects in diabetic rats. *Diabetes* 1996;45(2): 170-7.
424. Torella D, Rota M, Nurzynska D, Musso E, Monsen A, Shiraishi I, Zias E, Walsh K, Rosenzweig A, Sussman MA, et al: Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* 2004, 94(4):514–524.
425. Torres Aleman I. Homeostasis Cerebral e IGF-I. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2010.
426. Torres-Aleman I: Targeting insulin-like growth factor-1 to treat Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets* 2007, 11(12):1535–1542.
427. Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME: DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 2002, 296(5567):530–534.
428. Trejo JL, Carro E, Nunez A, Torres-Aleman I: Sedentary life impairs self-reparative processes in the brain: the role of serum insulin-like growth factor-I. *Rev Neurosci* 2002, 13(4):365–374.
429. Troen BR: The biology of aging. *Mt Sinai J Med* 2003, 70(1):3-22.
430. Tsuchiya M, Minegishi T, Kishi H, Tano M, Kameda T, Hirakawa T, Ibuki Y, Mizutani T, Miyamoto K: Control of the expression of luteinizing hormone receptor by local factors in rat granulosa cells. *Arch Biochem Biophys* 1999, 367(2):185–192.
431. Tu W, Cheung PT, Lau YL: Insulin-like growth factor 1 promotes cord blood T cell maturation and inhibits its spontaneous and phytohemagglutinin-induced apoptosis through different mechanisms. *J Immunol* 2000, 165(3):1331–1336.
432. Tutau F, Rodriguez-Ortigosa C, Puche JE, Juanarena N, Monreal I, Garcia Fernandez M, Clavijo E, Castilla A, Castilla-Cortazar I: Enhanced actions of insulin-like growth factor-I and interferon-alpha co-administration in experimental cirrhosis. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2009, 29(1):37–46.
433. Twickler MT, Cramer MJ, Koppeschaar HP: Unraveling Reaven's syndrome X: serum insulin-like growth factor-I and cardiovascular disease. *Circulation* 2003, 107(20):e190–2.
434. Umegaki H: Neurodegeneration in diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol* 2012, 724:258–265.
435. Uden AL, Elofsson S, Knox S, Lewitt MS, Brismar K: IGF-I in a normal population: relation to psychosocial factors. *Clin Endocrinol* 2002, 57(6):793–803.
436. Ungvari Z, Csiszar A: The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2012, 67(6):599–610.
437. Ungvari Z, Gautam T, Koncz P, Henthorn JC, Pinto JT, Ballabh P, Yan H, Mitschelen M, Farley J, Sonntag WE, et al: Vasoprotective effects of life span-extending peripubertal GH replacement in Lewis dwarf rats. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2010, 65(11):1145–56.
438. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A: Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2010, 65(10):1028–41.
439. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Chimenti S, Baker M, Limana F, et al: Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted

- myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 2005, 97(7):663–73.
440. Utriainen T, Nuutila P, Takala T, Vicini P, Ruotsalainen U, Ronnema T, Tolvanen T, Raitakari M, Haaparanta M, Kirvela O, et al: Intact insulin stimulation of skeletal muscle blood flow, its heterogeneity and redistribution, but not of glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1997, 100(4):777–85.
441. van Buchem MA and Tofts PS. Magnetization transfer imaging. *Neuroimaging Clin N Am* 2000, 10(4):771-88 ,ix.
442. van der Flier WM, van den Heuvel DM, Weverling-Rijnsburger AW, Bollen EL, Westendorp RG, van Buchem M, et al. Magnetization transfer imaging in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002, 52(1): 62-7.
443. van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP: The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 2004, 380(Pt 2):297–309.
444. van Raamsdonk JM, Meng Y, Camp D, Yang W, Jia X, Benard C, Hekimi S: Decreased energy metabolism extends life span in *Caenorhabditis elegans* without reducing oxidative damage. *Genetics* 2010, 185(2):559–71.
445. Vanhaesebroeck B and Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000;346 Pt 3:561-76.
446. Vannelli BG, Barni T, Orlando C, Natali A, Serio M, Balboni GC: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertil Steril* 1988, 49(4):666–9.
447. Vasan RS, Demissie S, Kimura M, Cupples LA, Rifai N, White C, Wang TJ, Gardner JP, Cao X, Benjamin EJ, et al: Association of leukocyte telomere length with circulating biomarkers of the renin-angiotensin-aldosterone system: the framingham heart study. *Circulation* 2008, 117(9):1138–44.
448. Vasan RS, Sullivan LM, D'Agostino RB, Roubenoff R, Harris T, Sawyer DB, Levy D, Wilson PW: Serum insulin-like growth factor I and risk for heart failure in elderly individuals without a previous myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 2003, 139(8):642–8.
449. Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J: Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* 2001, 59(1):238–45.
450. Verhaeghe J, Bougoussa M, Van Herck E, de Zegher F, Hennen G, Igout A: Placental growth hormone and IGF-I in a pregnant woman with Pit-1 deficiency. *Clin Endocrinol* 2000, 53(5):645–7.
451. Vinciguerra M, Santini MP, Claycomb WC, Ladurner AG, Rosenthal N: Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. *Aging* 2010, 2(1):43–62.
452. Voigt HJ, Becker V: Doppler flow measurements and histomorphology of the placental bed in uteroplacental insufficiency. *J Perinat Med* 1992, 20(2):139–47.
453. Walsh MF, Barazi M, Pete G, Muniyappa R, Dunbar JC, Sowers JR: Insulin-like growth factor I diminishes in vivo and in vitro vascular contractility: role of vascular nitric oxide. *Endocrinology* 1996, 137(5):1798–803.
454. Walsh PT, Smith LM, O'Connor R: Insulin-like growth factor-1 activates Akt and Jun N-terminal kinases (JNKs) in promoting the survival of T lymphocytes. *Immunology* 2002, 107(4):461–71.
455. Wei YH and Lee HC: Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002, 227(9):671-82.
456. Weinert BT, Timiras PS: Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 2003, 95(4):1706–16.
457. White MF: The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998, 182(1–2):3–11.

458. Wickman A, Isgaard J, Adams MA, Friberg P: Inhibition of nitric oxide in rats. Regulation of cardiovascular structure and expression of insulin-like growth factor I and its receptor messenger RNA. *J Hypertens* 1997, 15(7):751–9.
459. Wit JM, van Unen H: Growth of infants with neonatal growth hormone deficiency. *Arch Dis Child* 1992, 67(7):920–4.
460. Wolf E, Hoeflich A, Lahm H: What is the function of IGF-II in postnatal life? Answers from transgenic mouse models. *Growth Horm IGF Res* 1998, 8(3):185–93.
461. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ: Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Eng J Med* 1996, 335(18):1363–7.
462. Woods KA, van Helvoirt M, Ong KK, Mohn A, Levy J, de Zegher F, Dunger DB: The somatotrophic axis in short children born small for gestational age: relation to insulin resistance. *Pediatr Res* 2002, 51(1):76–80.
463. Wu A., Grant D. B., Hambley J. and Levi A. J. Reduced serum somatomedin activity in patients with chronic liver disease. *Clin Sci Mol Med* 1974;47(4): 359-66.
464. Xiao Q, Zhao W, Beers DR, Yen AA, Xie W, Henkel JS, Appel SH: Mutant SOD1(G93A) microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *J Neurochem* 2007, 102(6):2008–19.
465. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D: Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(13):7324–9.
466. Yakar S, Rosen CJ, Bouxsein ML, Sun H, Mejia W, Kawashima Y, Wu Y, Emerton K, Williams V, Jepsen K, et al: Serum complexes of insulin-like growth factor-1 modulate skeletal integrity and carbohydrate metabolism. *FASEB J* 2009, 23(3):709–19.
467. Yamaguchi F, Itano T, Miyamoto O, Janjua NA, Ohmoto T, Hosokawa K, Hatase O: Increase of extracellular insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration following electrolytical lesion in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1991, 128(2):273–6.
468. Yamamoto H and Murphy LJ. Enzymatic conversion of IGF-I to des(1-3)IGF-I in rat serum and tissues: a further potential site of growth hormone regulation of IGF-I action. *J Endocrinol* 1995;146(1): 141-8.
469. Yao DL, Liu X, Hudson LD, Webster HD: Insulin-like growth factor I treatment reduces demyelination and up-regulates gene expression of myelin-related proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92(13):6190–4.
470. Yao DL, West NR, Bondy CA, Brenner M, Hudson LD, Zhou J, Collins GH, Webster HD: Cryogenic spinal cord injury induces astrocytic gene expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 2 during myelin regeneration. *J Neurosci Res* 1995, 40(5):647–59.
471. Ye P, Li L, Richards RG, DiAugustine RP, D'Ercole AJ: Myelination is altered in insulin-like growth factor-I null mutant mice. *J Neurosci* 2002, 22(14):6041–51.
472. Ye P, Xing Y, Dai Z, D'Ercole AJ: In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res* 1996, 95(1):44–54.
473. Yildiz B, Kural N, Colak O, Ak I, Akcar N: IGF-1, IGFBP-3, VEGF and MMP-9 levels and their potential relationship with renal functions in patients with compensatory renal growth. *Clin Physiol Funct Imaging* 2008, 28(2):107–12.
474. Yu Y, Yan J, Li M, Yan L, Zhao Y, Lian Y, Li R, Liu P, Qiao J: Effects of combined epidermal growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 on human oocyte maturation and early fertilized and cloned embryo development. *Hum Reprod* 2012, 27(7):2146–59.
475. Zapf J, Schoenle E, Froesch ER: Insulin-like growth factors I and II: some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of

- nonsuppressible insulin-like activity of human serum. *European journal of biochemistry / FEBS* 1978, 87(2):285–96.
476. Zapf J, Walter H, Froesch ER. Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest* 1995;68(5): 1321-30.
477. Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST, Mesecar A, Adam S, Unterman TG: Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FOXO1 (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem* 2002, 277(47):45276–84.
478. Zhao J, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K: Cilostazol improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2010, 58(4–5):774–83.
479. Zhao J, Taverne MA, Van Der Weijden GC, Bevers MM, Van Den Hurk R: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Mol Reprod Dev* 2001, 58(3):287–96.
480. Zhao J, Taverne MA, van der Weijden GC, Bevers MM, van den Hurk R: Immunohistochemical localisation of growth hormone (GH), GH receptor (GHR), insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF-I receptor, and gene expression of GH and GHR in rat pre-antral follicles. *Zygote* 2002, 10(1):85–94.
481. Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C: Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol* 1997, 11(13):1924–33.
482. Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, et al: A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(24):13215–20.