



CEU

*Universidad
San Pablo*

Facultad de Medicina

“Estudio de la expresión de genes relacionados con mecanismos de hepatoprotección, polaridad e uniones estrechas entre hepatocitos y matriz extracelular, responsables de la normal arquitectura hepática, en animales con deficiencia parcial de Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)”

Tesis Doctoral

D. Víctor Javier Lara Díaz

Madrid, 2013

DEDICATORIA

A Dios, Principio y Fin de todo el Universo, por permitirme ser.

A mi amada Esposa, Gloria Cecilia, fidelísima compañera idónea, pilar incondicional y apoyo sin quien no hubiera logrado mis metas en la vida.

A mis hijos, Víctor Alejandro, Javier Arturo y Héctor Samuel, por ser mi inspiración cotidiana y la esperanza viva en un futuro mejor.

A mis Padres, por haberme traído a este mundo, y haberme dado las bases para una vida plena y fructífera.

A mis hermanos, Elsa Georgina, Heberto y Rolando Arturo, por haberme tolerado siempre, y animado muy frecuentemente.

“Y todo lo que hagáis, hacedlo de corazón, como para el Señor, y no para los hombres...” Colosenses 3:23

Agradecimientos

Mi agradecimiento a las dos instituciones académicas que han hecho posible esta tesis doctoral: las Facultades de Medicina de la Universidad CEU-San Pablo y del Tecnológico de Monterrey.

A la Doctora Doña Inma Castilla de Cortázar Larrea, formidable ejemplo de calidad humana, por haber tenido la visión y ser la perfecta promotora para establecer el convenio de colaboración académica entre CEU-Universidad San Pablo y el Tecnológico de Monterrey, fruto del cual es este trabajo, y especialmente porque tuvo la gentileza de ser mi Directora de Tesis Doctoral, guiando mi camino y corrigiendo mis fallos, hasta la culminación exitosa del trabajo que aquí se expone.

A la Doctora Doña Úrsula Muñoz Morón, Co-Directora de Tesis Doctoral, por su gentil temperamento y experta ayuda en todo este proceso.

Al Doctor Don Juan Enrique Puche García, joven y talentoso colega, brillante investigador, por su atinado ejemplo y guía.

A todo el equipo del Departamento de Fisiología de Ciencias Médicas Básicas de la Facultad de Medicina de CEU-Universidad San Pablo, especialmente a Susana Arahuetes, María Cruz Sádaba Argáiz, Elena Ávila Gallego, Mariano García-Magariño Alonso y Raquel Romero.

A los distinguidos miembros del Tribunal de Tesis Doctoral, por su disposición y profesionalismo.

Al Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA) y a su Director Científico, el Doctor Don Fernando Vidal Vanaclocha, siempre amable y dispuesto. También del IMMA, a los investigadores Paloma Fernández, Ricardo Arroyo y Daniel Masana.

Al personal del animalario de la Facultad de Medicina de CEU-Universidad San Pablo. A todos a quienes en el devenir de esta aventura conocí en la Facultad de Medicina de CEU-Universidad San Pablo, quienes siempre me trataron con deferencia y respeto.

Al Doctor Don Jorge Valdez García, Director de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del Tecnológico de Monterrey, por haber confiado en mí en este proyecto, y por haber gestionado los recursos necesarios para mis estancias de investigación. Asimismo, al Doctor Don Daniel Méndez Lozano, mi jefe en la División de Investigación e Innovación, por haberme facilitado el camino para cumplir este sueño.

I. INTRODUCCIÓN	19
I.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL HÍGADO	21
I.1.1. Desarrollo y estructura hepáticos.	21
I.1.2. Arquitectura hepática y polaridad de los hepatocitos.	25
<i>I.1.2.1. Estructura de los hepatocitos.</i>	25
<i>I.1.2.2. Establecimiento de la polaridad en los hepatocitos.</i>	29
<i>I.1.2.3. Papel de las proteínas PAR.</i>	30
<i>I.1.2.4. Papel de las uniones celulares.</i>	31
<i>I.1.2.4.1. Uniones adherentes.</i>	32
<i>I.1.2.4.2. Uniones estrechas.</i>	35
I.1.2.4.3. Distribución espacio-temporal de proteínas presentes en uniones celulares.	39
I.1.3. Estructura hepática y principales proteínas de la matriz extracelular en el hígado sano.	40
I.1.4. Funciones hepáticas	43
<i>I.1.4.1. Principales funciones metabólicas.</i>	43
<i>I.1.4.2. El hígado como glándula endocrina.</i>	45
<i>I.1.3.3. El hígado como glándula exocrina.</i>	46
I.2. FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA TIPO 1 (IGF-1).	49
I.2.1. Estructura, expresión génica y regulación.	49
I.2.2. Proteínas transportadoras de IGF-1 (IGFBP's).	54

I.2.3. Receptores de membrana y vías de señalización.	57
I.2.4. Funciones fisiológicas de IGF-1.	60
<i>I.2.4.1. Crecimiento y desarrollo corporales.</i>	61
<i>I.2.4.2. Otras funciones.</i>	63
I.2.4.2.1. Modulación inmunológica.	63
I.2.4.2.2. Desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC).	64
I.2.4.2.3. Desarrollo y protección cardiovascular.	66
I.2.4.2.4. Gametogénesis.	67
I.2.4.2.5. Desarrollo y función renales.	69
I.2.4.2.6. Efecto semejante a la Insulina.	70
I.3. CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE IGF-1.	71
I.3.1. Crecimiento intrauterino retardado (CIR).	71
I.3.2. Síndrome de Laron.	73
I.3.3. Enfermedad hepática crónica.	75
I.3.4. Envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad.	76
<i>I.3.4.1. Enfermedades neurodegenerativas.</i>	81
<i>I.3.4.2. Enfermedades cardiovasculares (ECV).</i>	84
<i>I.3.4.3. Síndrome metabólico.</i>	86
I.3.5. Otras condiciones de deficiencia de IGF-1.	88
<i>I.3.5.1. Trastornos musculoesqueléticos.</i>	88
<i>I.3.5.2. Enfermedades renales.</i>	97
	90

I.4. DAÑO OXIDATIVO CELULAR, INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD CRÓNICA.	
I.4.1. Radicales libres y daño oxidativo celular y tisular.	90
I.4.2. Mecanismos del daño oxidativo avocados a la muerte celular.	92
I.4.3. Estrés oxidativo e inflamación.	95
I.4.4. Proteínas de choque térmico y estrés oxidativo.	96
II. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	101
II.1. ANTECEDENTES	103
II.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	104
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	103
III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	105
III.1.1. Procedencia y generalidades.	105
III.1.2. Caracterización del genotipo de los animales.	106
III.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.	107
III.2.1. Distribución de los animales en grupos experimentales y pautas de tratamiento.	107
III.2.2. Extracción de sangre, administración del tratamiento y sacrificio de los animales.	108
III.3. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE IGF-1.	109

III.4. EXTRACCIÓN DE ARN y TÉCNICAS DE EXPRESIÓN GÉNICA.	109
<i>III.4.1. Extracción de ARN de tejido hepático y obtención de ADNc.</i>	109
<i>III.4.2. Análisis del transcriptoma mediante microarrays.</i>	110
<i>III.4.3. PCR cuantitativa a tiempo real.</i>	111
III.5. HISTOLOGÍA CONVENCIONAL.	113
III.6. DETERMINACION EN TEJIDO HEPÁTICO: Malondialdehido	114
III.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	115
IV. RESULTADOS	117
IV.1. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO EXPERIMENTAL, CONCENTRACIONES DE IGF-1, PESO CORPORAL y PESO HEPÁTICO.	119
<i>IV.1.1. Concentraciones circulantes de IGF-1.</i>	119
<i>IV.1.2. Peso corporal en los tres grupos experimentales y correlación con las concentraciones circulantes de IGF-1.</i>	120
<i>IV.1.3. Peso hepático absoluto y relativo.</i>	120
IV.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO CONVENCIONAL.	121
IV.3 ESTUDIO DEL DAÑO HEPÁTICO OXIDATIVO Y DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA INFLAMACIÓN, EL DAÑO OXIDATIVO Y APOPTOSIS.	124

IV.3.1. Peroxidación lipídica en homogenizados hepáticos.	124
IV.3.2. Expresión relativa de genes relacionados con enzimas y factores implicados en la respuesta inflamatoria y proteínas de fase aguda, en hígado.	124
IV.3.3. Expresión relativa de genes relacionados con las defensas antioxidantes enzimáticas, en hígado.	129
IV.3.4. Expresión hepática de genes que codifican para proteínas implicadas en la apoptosis y heat shock proteins.	130
IV.4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENICA HEPÁTICA DE GENES RELACIONADOS CON IGF-1.	132
IV.4.1. Expresión hepática del gen de IGF-1 y su receptor.	133
IV.4.2. Expresión hepática de los genes que codifican para las proteínas transportadoras de IGF-1 (IGFBP's).	134
IV.5 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CITOESQUELETO, UNIONES ESTRECHAS, UNIONES ADHERENTES, DESMOSOMAS Y MATRIZ EXTRACELULAR.	137
V. DISCUSIÓN	151
VI. CONCLUSIONES	169
VII. BIBLIOGRAFÍA.	175

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título
1	Los cuatro estadios del desarrollo hepático.
2	Esquema de las acciones facilitadoras y promotoras de proteínas de homeodominios divergentes.
3	Organización de los hepatocitos.
4	Estructura de un hepatocito.
5	Esquema de la polarización de las membranas de hepatocitos.
6	Proteínas hepáticas de transporte basolateral en humanos.
7	Proteínas hepáticas de transporte canalicular en humanos.
8	Representación esquemática de los componentes estructurales básicos de las uniones adherentes.
9	Representación esquemática de la interacción entre dos cadherinas.
10	Vías de señalización en las que participa la catenina-p120.
11	Funciones de las uniones estrechas.
12	Estructura molecular de las uniones estrechas en hígado.
13	Mecanismo de manejo de la bilirrubina por el hepatocito.
14	Ciclo de Krebs-Henseleit, o Ciclo de la Urea.
15	Estructura secundaria general de la hormona IGF-1.
16	Estructura de IGF-1, con los residuos de AA correspondientes, y estructura en forma de “tubos y bolas.

-
- 17 Evolución de las concentraciones circulantes de IGF-1 con la edad.
 - 18 Eje GH/IGF-1 y algunos de sus órganos diana.
 - 19 Las seis proteínas principales de unión a IGF-1 (IGFBPs) de alta afinidad.
 - 20 Regulación del promotor del gen de la IGFBP-8 (CTGF).
 - 21 Dominios estructurales de CTGF (IGFBP8).
 - 22 Esquema de los receptores de IGFs e insulina.
 - 23 Vías de señalización intracelulares de IGF-1.
 - 24 Paciente con Síndrome de Laron.
 - 25 Paciente con cirrosis avanzada, ascitis y desnutrición grave.
 - 26 Mecanismos celulares del daño oxidativo.
 - 27 El hepatocito y el círculo vicioso de daño oxidativo-inflamatorio.
 - 28 Papel citoprotector de la respuesta mediada por las HSPs.
 - 29 Anatomía patológica de hígado con cirrosis.
 - 30 Microfotografías microscopía electrónica (16,000x),microvilli yeyunales.
 - 31 Ratones de los distintos fenotipos obtenidos en la colonia.
 - 32 Diseño experimental.
 - 33 Análisis del transcriptoma mediante microarray.
 - 34 Esquema del proceso de las muestras y equipamientos.

-
- 35 Concentraciones de IGF-1 en suero.
- 36 Peso corporal.
- 37 Peso hepático absoluto.
- 38 Aspecto histológico del hígado, Hematoxilina y Eosina (x10 y x15).
- 39 Aspecto histológico del hígado, Hematoxilina y Eosina (x30 y x40).
- 40 Malondialdehído en homogenizado hepático.
- 41-A Expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.
- 41-B Expresión de genes relacionados con proteínas del complemento.
- 41-C Expresión hepática de genes *lyz2* y *ly96*.
- 42 Expresión hepática del gen de la catalasa.
- 43 Expresión hepática de genes proapoptóticos.
- 44 Expresión hepática de genes antiapoptóticos y HSP.
- 45 Expresión hepática del gen *igf-1* (A) y su receptor en hígado (B).
- 46 Expresión de los genes codificantes de IGFBP1, 3, 5 y 8 3 en hígado.
- 47 Expresión hepática relativa de los genes *jun*, *fos* y *grb2*.
- 48 Expresión hepática del gen *nras*.
- 49 Expresión hepática de genes relacionados con citoesqueleto celular de tubulina, vinculina, *mark2*, y actina beta.
- 50 Expresión génica en hígado del gen *stk11*.

- 51 Expresión génica en hígado del gen de la espectrina alpha 2.
- 52 Hiperexpresión génica en hígado de los genes *myosin1B* y *vim*.
- 53 Hiperexpresión génica en hígado de los genes *cld 1, 7 y 14* y *jam2*.
- 54 Expresión hepática de los genes que codifican para proteínas implicadas en uniones adherentes y desmosomas.
- 55 Expresión del gen *itgb2* en los tres grupos experimentales.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título
1	Historia de los conceptos de la unidad funcional del hígado
2	Tipos celulares encontrados en el hígado normal
3	Distribución de diferentes componentes de la matriz extracelular
4	Principales funciones del hígado.
5	Enzimas que intervienen en los procesos oxidativos.
6	Sondas TaqMan empleadas para la PCR cuantitativa.
7	Expresión relativa de genes implicados en la respuesta inflamatoria, proteínas de fase aguda y del sistema del complemento.
8	Expresión relativa de genes que codifican enzimas antioxidantes en hígado.
9	Genes relacionados con apoptosis y genes que codifican para la HSP.
10	Expresión relativa de genes relacionados con IGF-1 en hígado.
11	Expresión relativa de genes de rutas de señalización de IGF-1 en hígado.
12	Genes relacionados con el citoesqueleto de los hepatocitos.
13	Genes relacionados con uniones estrechas
14	Genes relacionados con uniones adherentes y desmosomas.
15	Genes relacionados con uniones en hendidura
16	Genes relacionados con la matriz extracelular.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC: ATP-binding cassette, Caja de union al ATP.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- AMP: Adenosin-monofosfato.
- AMPK: Quinasa activada por AMP.
- AP-1: Activating protein 1, proteína activadora 1.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.
- ATP: Adenosine triphosphate, trifosfato de adenosina.
- BCRP: Breast cancer resistance protein, Proteína de Resistencia al cancer de mama.
- BP: Binding proteins, proteínas de unión.
- BSEP: Bile salt export pump, bomba exportadora de sales biliares..
- CAR: Coxsackievirus and Adenovirus receptor, receptor de Cx y Ad virus.
- C/EBP: CCAAT enhancer-binding protein, proteína facilitadora de union CCAAT.
- CO: Control.
- CTGF: Connective tissue growth factor, también conocido como IGFBP-8.
- Dpc: Días post-concepción.
- EGF: Epidermal growth factor, Factor de crecimiento epitelial.
- EMK1/MARK2: Homólogo de PAR-1 en mamíferos.
- ERK: Quinasas reguladas por señal extracelular.
- FGF: Fibroblast growth factor, Factor de crecimiento de fibroastos.
- FOXO: Forkhead transcription factor, factor de transcripción Forkhead.
- GATA: Zinc finger transcription factors, factores de transcripción de dedos de zinc.
- GF: Growth factor, Factor de crecimiento.
- GH: Growth hormone.
- Glu-6-Pasa: Glucosa-6-fosfatasa.
- Grb: Growth factor receptor bound protein, factor de crecimiento unido a receptor de proteínas.
- HDM: Oncogen ligado a p53.

Hex: Hematopoietically expressed homeobox, también conocido como PrH.

HGF: Hepatocyte growth factor.

HLx: Homeobox transcription factor.

HNF: Proteínas de homeodominios divergentes.

Hx: Heterocigoto.

IGF-1: Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I.

IGF-2: Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo II.

IGFBP: IGF binding protein.

IKK β : I κ B kinasa 3.

IL: Interleuquina.

IL-6: Interleuquina 6.

IL-7: Interleuquina 7.

JAK: Janus kinase.

JAM: Junction adhesion molecule.

kDa: Kilodalton.

LKB1: Homólogo de PAR-4 en mamíferos.

MAPK: Proteína Quinasa activada por mitógenos.

MEC: Matriz extracelular.

MDCK: Madin-Darby canine kidney.

MDRP: Multidrug resistance protein.

MKK4: Mitogen-activated kinase-kinase.

mRNA: ARN mensajero.

mTOR: mitochondrial Target of Rapamycin, blanco mitochondrial de Rapamicina.

MUPP: Multiple PDZ domain protein.

NF- κ B: Factor nuclear kappa B.

NO: Óxido nítrico.

NTCP: Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide.

OATP: Organic anion transporter.

OCT: Organic cation transporter.

PAR: Protease activated receptor proteins.

pb: Pares de bases.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PDK: Quinasas fosfatidil-inositol-dependientes.

PK: Piruvatoquinasa.
PKC: Proteína quinasa C.
PLC γ : Fosfolipasa C- γ .
PS6K: Proteína quinasa ribosomal S6.
PXR: Receptor de Pregnano X.
REL: Retículo endoplásmico liso.
RER: Retículo endoplásmico rugoso.
RET: Receptor de GLF con actividad TK.
RNAPol: ARN polimerasa.
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
SNC: Sistema nervioso central.
SRC: Proteína tirosina quinasa similar a la de sarcoma.
TFG: Tasa de filtración glomerular.
TGF β : Factor de crecimiento transformante beta.
TJ: Tight junction.
TK: Tirosina quinasa.
TNF: Factor de necrosis tumoral.
TTR: Transthyretin, transtiretina, prealbúmina.
UDPG: UDP-glucuroniltransferasa.
UF: Ubiquitous factor, factor ubicuo.
VEGF: Vascular endothelial growth factor, factor de crecimiento endothelial vascular.
vs: Versus.
WT: Wild type.
XBP-1: X box binding protein 1.
ZO: Zonula occludens.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL HÍGADO.

I.1.1. Desarrollo y estructura hepáticos.

La hepatogénesis tiene cuatro estadios de desarrollo claramente definidos: Competencia, Compromiso, Diferenciación y Morfogénesis. El primer estadio, Competencia, está en relación con la capacidad inherente de un tejido para progresar hacia un destino definido una vez que recibe la inducción apropiada (Figura 1) (Zaret K. et al, 1999; Duncan S.A., 2000).

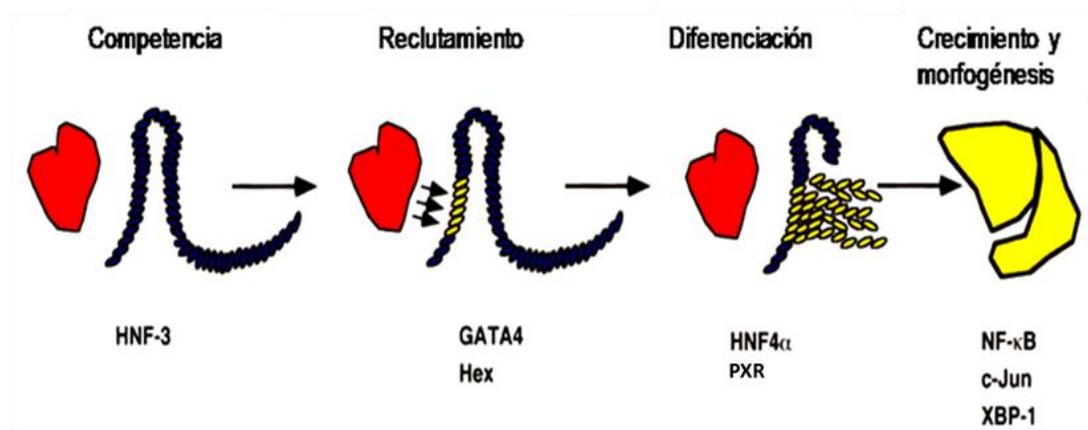


Figura 1. Los cuatro estadios del desarrollo hepático propuestos por Duncan son procesos interdependientes, estrechamente relacionados y solapados. Tomado y modificado de: Duncan SA, 2000.

En el embrión aviario, la inducción celular hacia el destino como hepatocito se origina del mesénquima pre-cardíaco, que induce al endodermo proveniente del intestino anterior para adoptar un fenotipo semejante al hepatocito, otros tejidos mesenquimales de origen no pre-cardíaco no tienen capacidad de inducir esta competencia (LeDouarin N.M., 1975; Fukuda-Taira S., 1981).

Este concepto ha sido confirmado también en mamíferos, el mesodermo cardíaco ejerce un rol instructivo para que el endodermo ventral murino muestre una especificación de destino hepático (campo hepático) alrededor del día 8,5 de la gestación murina. Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF1 o FGF2) han demostrado la capacidad de reproducir el efecto inductivo del mesodermo cardíaco (Gualdi R. et al, 1996; Jung J. et al, 1999).

Si se cultiva endodermo dorsal, no proveniente de la región hepática, en ausencia de mesodermo (un inhibidor aparente) también puede iniciar espontáneamente la expresión de genes característica de los hepatocitos. Esto implica que el endodermo dorsal también es competente para sufrir la transformación hacia tejido hepático. Se ha sugerido como un modelo probable de competencia el que los factores de transcripción de la familia HNF-3, más recientemente conocidos como Foxa1, Foxa2 y Foxa3, marquen regiones regulatorias de los “genes hepáticos silenciados”, desatando el potencial de

que sean expresados si las condiciones ambientales favorables son encontradas. Otros factores implicados, ahora en el proceso de diferenciación, son las proteínas *leucine-zipper* C/EBP a y b, el receptor nuclear huérfano HNF-4-a y la proteína onecut HNF6 (Gualdi R. *et al*, 1996; Jung J. *et al*, 1999; Duncan S.A., 2000; Costa R.H. *et al*, 2003; Zhao R., Duncan S.A., 2005).

Estudios ultraestructurales, sin embargo, han demostrado que una serie de cambios dinámicos en morfología celular y estructura acompañan la transición de una célula endodérmica pluripotencial a un hepatocito diferenciado. A lo largo de varias etapas gestacionales del desarrollo hepático los pre-hepatocitos adoptan una apariencia estrellada, contienen un núcleo grande e irregular y poseen relativamente pocos organelos distinguibles. En la gestación murina, entre el día 12 y el 17 los pre-hepatocitos adoptan una morfología más cuboidal (Medlock E.S., Haar J.L., 1983; Vassy J. *et al*, 1998).

Análisis funcionales de las proteínas HNF-3 permiten proponer que ejercen control sobre la competencia hepática modulando las estructuras de cromatina alrededor de facilitadores de genes expresados en el hígado en desarrollo (Zaret K., 1998). Esta unidad estructural básica de cromatina es el nucleosoma, que consiste en 146 bp de ADN envueltos alrededor de un octámero de proteínas histonas. La cromatina se condensa más aún por la adición de proteínas histonas que unen varios nucleosomas, resultando en una estructura de cromatina más compacta.

En este estado, esta cromatina sería transcripcionalmente inactiva, ya que los sitios de unión para los factores de transcripción están bloqueados. Para recobrar la capacidad de acceso de los factores de transcripción al ADN, un mecanismo eficiente es la acetilación de las histonas (Gregory P.D., Horz W., 1998; Mannervik M. *et al*, 1999), requiere de coactivadores. Recientemente se ha demostrado que las proteínas HNF-3 tienen esta capacidad, e interactúan mejor con el ADN nucleosómico que con el ADN libre.

El siguiente paso, muy estrechamente entrelazado, es el que lleva a la célula a mantener el linaje comprometido. Uno de los principales mecanismos es el efecto del reposicionamiento del nucleosoma para facilitar la unión con un segundo factor de transcripción, GATA-4, al facilitador de albúmina (Cirillo L.A., y Zaret K.S., 1999). El ARNm de Gata-4 se expresa en el interior del portal intestinal anterior, que recubre al endodermo del campo hepático (Molkentin J.D. *et al*, 1997). Esto ha sugerido que tanto HNF-3 como GATA-4 cooperan para controlar el potencial del endodermo para adoptar de expresión génica hepática. Con esto en mente, es interesante notar que en ratones que carecen de HNF-3 β o GATA-4 se presenta una disrupción grave de la morfogénesis del intestino anterior hacia el día postconcepcional (dpc) 8.5 (Ang S.L., Rossant J., 1994; Weinstein D.C. *et al*, 1994; Kuo C.T. *et al*, 1997 y Molkentin J.D. *et al*, 1997).

Otro de los factores de transcripción implicados en el estadio del compromiso de linaje, y esencial para que se progrese al siguiente estadio, el de diferenciación, es el Hex (Hematopoietically expressed homeobox, también conocido como PrH), de la familia de genes divergentes homeobox (Bedford F.K., 1993).

Análisis de los patrones de expresión génica de hex ARNm revelaron que es uno de los marcadores más tempranos del endodermo embrionario anterior (Thomas P.K., 1998). De hecho, la expresión de Hex es detectable en el endodermo definitivo cuando migra fuera del surco primitivo, para enseguida ser detectable en el endodermo pre-hepático ventral que es rodeado por el portal intestinal anterior.

En este respecto, la expresión de Hex es similar a la de gata-4 y recientemente se ha demostrado definitivamente que Hex es esencial para los estadios más tempranos del desarrollo hepático.

Ratones Hex $-/-$ mueren en estadios intermedios de la gestación, y en el examen postmortem al dpc 13.5 se demostró ausencia completa del hígado, mientras que el resto de los órganos gastrointestinales aparecen normales (Molkentin J.D. *et al*, 1997; Thomas P.K., 1998; Martínez-Barbera J.P., 2000).

El siguiente estadio es la diferenciación, esto es, la transición gradual hacia un tipo celular altamente especializado que expresa toda la gama de proteínas necesaria para la morfología y función celular madura.

En el caso de la diferenciación del hepatocito, se requiere la expresión de diversos grupos de genes que controlan múltiples aspectos del metabolismo, detoxificación y secreción de factores séricos (Arias I.M. *et al*, 1987).

Aún más, los hepatocitos en diferenciación deben formar un epitelio polarizado, e interactuar con las células vecinas para generar la arquitectura hepática funcional.

El análisis de regiones reguladoras de la transcripción de genes en células de hepatoma ha permitido identificar algunos factores hepatocitarios de transcripción nuclear activos en el hígado adulto.

Entre ellos se incluye a las proteínas de homeodominios divergentes HNF-1 α y HNF-1 β (vHNF-1); las proteínas aladas helicoidales Foxa1, Foxa2 y Foxa3, previamente conocidas como HNF-3 α , HNF-3 β y HNF-3 γ ; la familia de proteínas zipper de leucina C/EBP α y β ; el receptor nuclear huérfano HNF-4 α y la proteína onecut HNF-6, algunas se ilustran en la Figura 2. (Tronche F., Yaniv M., 1994; Cereghini S., 1996; Lemaigre F.P. *et al*, 1996; Samadani U., Costa R.H., 1996; Kaestner KH, 2005).

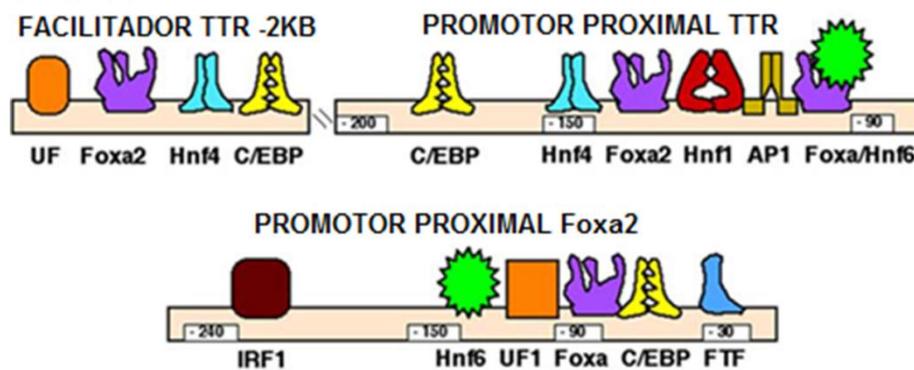


Figura 2. Esquema de las acciones facilitadoras y promotoras que involucran a las proteínas de homeodominios divergentes Hnf1, las proteínas aladas helicoidales Foxa2, el receptor nuclear huérfano Hnf4 y la proteína onecut Hnf6. UF Ubiquitous factor, TTR Transtiretina.

Esto hace suponer que la diferenciación se protege mediante mecanismos de redundancia, ya que la ausencia de uno de los factores de transcripción parece ser compensada por la presencia de factores de transcripción no relacionados que son capaces de unirse a las mismas regiones de regulación transcripcional (Duncan S.A., 2000). Por otro lado, recientemente se reportó la disrupción de la expresión de un gran grupo de genes característicos del hepatocito diferenciado en embriones que carecían del factor de transcripción HNF-4 α (Li J., *et al*, 2000). HNF-4 α es miembro de una familia de receptores hormonales nucleares originalmente identificados a través de su unión al promotor de la apolipoproteína CIII (Sladek F.M., 1994), además, se han identificado sitios de unión para este factor dentro del promotor de HNF-1 α , y se ha demostrado que HNF-4 α es capaz de activar la transcripción a partir de esta región regulatoria. También se demostró por hibridación *in situ* que desde el dpc 8.5 se expresa HNF-4 α en el divertículo hepático en desarrollo, su efecto principal parece ser corriente arriba, junto con el gen de receptor de pregnano-x (PXR); tanto HNF-4 α como PXR son requisito esencial para la completa diferenciación del hepatoblasto a hepatocito (Bulla G.A., 1997; Spath G.F., Weiss M.C., 1997; Tian J.M., Schibler U., 1991; Kuo C.J. *et al*, 1992; Duncan S.A. *et al*, 1994; Taraviras S. *et al*, 1994).

Aún más, en un sistema celular de hepatoma desdiferenciado, se ha establecido una conexión directa entre la expresión de HNF-4 α y la generación del epitelio hepático polarizado, ya que induce la expresión de genes de citoqueratina y E-cadherin. Basados en ello, HNF-4 α y PXR son esenciales también para la polarización del hepatocito.

El último estadio, el de la morfogénesis, va aparejado con el crecimiento del hígado, refleja tasas elevadas de división celular de los pre-hepatocitos, en la rata, entre los dpc 13 y 20 ocurren al menos ocho doblajes del número celular, y 84 tantos de aumento de volumen. Estudios de inactivación génica en ratones

han delineado una vía que enlaza las propiedades del mesénquima del septum transversal a la regulación del ciclo celular hepático, a través de la activación del factor de transcripción AP-1.

La disrupción dirigida de varios factores, que incluyen c-Jun, HGF (Hepatocyte growth factor), el receptor cMet, HLx (homeobox transcription factor) expresados en el mesénquima del hígado en desarrollo, así como SEK1 (mitogen-activated kinase-kinase 4, MKK4) y XBP-1 (X box binding protein), todos resultan en hipoplasia hepática (Greengard O., 1972; Vassy J. *et al*, 1988; Zaret K., 1998; Hilberg F., 1993; Johnson R.S. *et al*, 1993; Bladt F. *et al*, 1995; Schmidt C. *et al*, 1995; Uehara Y., 1995; Hentsch B., 1996 y Reimold A.M. *et al*, 2000).

Asimismo, mutaciones en la sub-unidad p65 de NF- κ B (RelA), I κ B kinasa 2 (IKK β) y el modulador esencial NF- κ B (NEMO, IKK γ) todos componentes de la vía de señalización NF- κ B, resultan en disrupción grave de la hepatogénesis (Beg A.A., 1995; Li Q. *et al*, 1999; Li Z.W., 1999 y Rudolph D. *et al*, 2000) por apoptosis acelerada alrededor del dpc 12.5 lo que provoca la muerte del embrión. En el humano, el desarrollo embriológico del hígado inicia alrededor de la cuarta semana de gestación, con la formación de una yema endodérmica, evaginación entre el intestino anterior y el saco vitelino. Esta yema hepática se divide en una porción craneal, la más grande, y una porción caudal, más pequeña. La porción craneal dará lugar a la pars hepática, y se dividirá posteriormente en los lóbulos derecho e izquierdo del hígado, eventualmente, darán lugar a la formación de los hepatocitos así como a los conductos biliares intralobulares, los lobulillos hepáticos, y las tríadas portales (Figura 3): la porción caudal dará lugar a la pars cística, que a su vez resultará en la formación de la vesícula biliar y el conducto cístico. Estos son ejemplos de la morfogénesis (Tejada E. *et al*, 1989; Hamdani S.D. *et al*, 1994).

1.1.2. Arquitectura hepática y polaridad de los hepatocitos.

1.1.2.1. Estructura de los hepatocitos.

Los hepatocitos son las células principales que constituyen el hígado (constituyen alrededor de un 80% de la población), poseen una vida media de unos 5 meses y tienen una gran capacidad de regeneración cuando su parénquima hepática se ve afectado por diversos procesos hepatotóxicos, enfermedad o cirugía.

Al ser células poliédricas, poseen seis caras, dos de las cuales se enfrentan al espacio perisinusoidal, otras dos se encuentran en contacto con los hepatocitos vecinos e intervienen en la formación de los canalículos biliares, y las otras dos

caras restantes también entrarían en contacto con hepatocitos vecinos formando canalículos biliares (Ross, Romrell y Kaye, 1995).

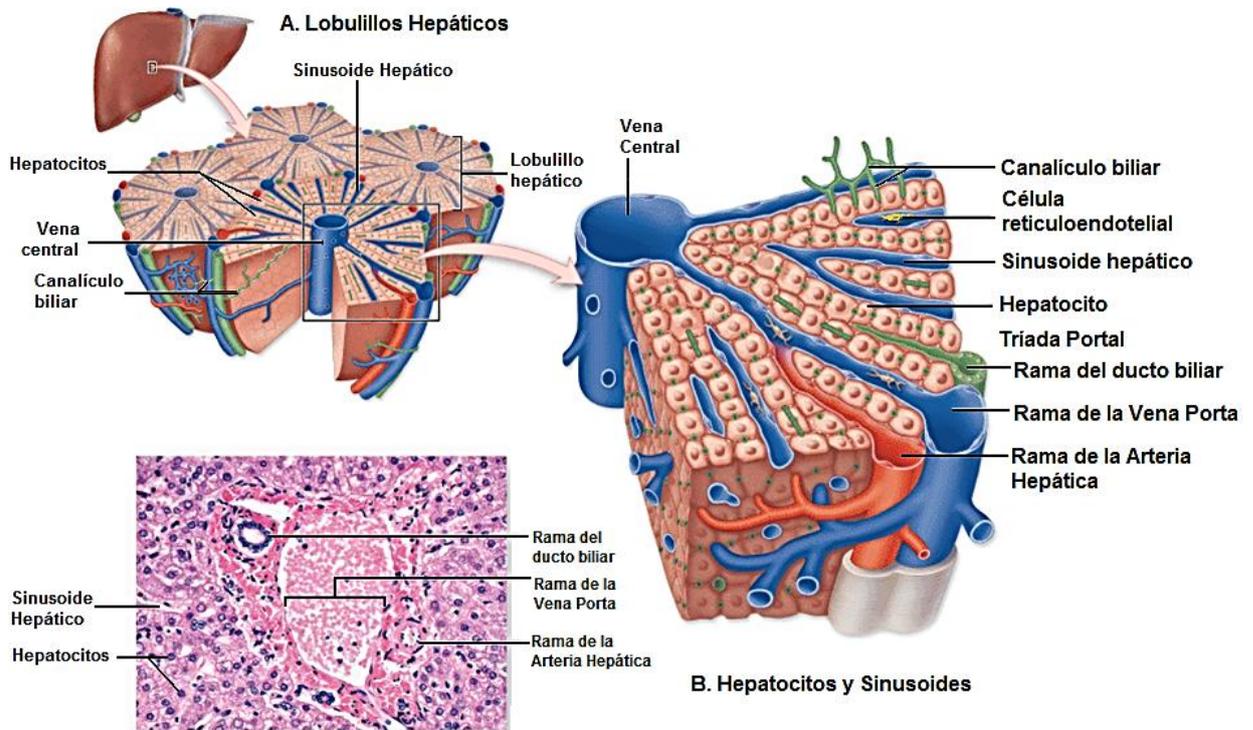


Figura 3. Organización de los hepatocitos, en lobulillos alrededor de la vena centro lobulillar. A. Estructura del lobulillo hepático. B. Hepatocitos y sinusoides. En el recuadro abajo a la izquierda se muestra el aspecto microscópico de la tríada portal, los cordones de hepatocitos normales y los sinusoides hepáticos. Modificado de: Mescher AL, Junqueira's Basic Histology, 12th ed, 2010.

Los hepatocitos son células poliédricas con uno o dos núcleos esféricos que ocupan el centro de la célula, siendo la mayor parte de ellas tetraploides. En su citoplasma acidófilo se encuentran diversos orgánulos citoplásmicos, como el retículo endoplasmático rugoso (RER), el retículo endoplasmático liso (REL) y las mitocondrias, además de vesículas de inclusión y diversas inclusiones de glucógeno y grasa (Figura 4) (Ross, Romrell y Kaye, 1995). La membrana plasmática de los hepatocitos presenta un dominio sinusoidal orientado hacia el espacio de Disse (contiene fibrillas de colágeno), en donde se produce el intercambio metabólico entre los hepatocitos y el plasma sanguíneo. En este espacio también se encuentran las células de Ito (conocidas también como células estrelladas), encargadas de almacenar vitamina A. Además, la membrana plasmática de los hepatocitos presenta un dominio lateral que posee diversos complejos de unión (comprenden los desmosomas, uniones intermedias, uniones estrechas y uniones gap) que permiten la comunicación entre hepatocitos adyacentes para formar una lámina hepatocitaria. Dentro de los sinusoides se encuentran las células de Kupffer (macrófagos). Las membranas plasmáticas de dos hepatocitos contiguos delimitan un canalículo biliar.

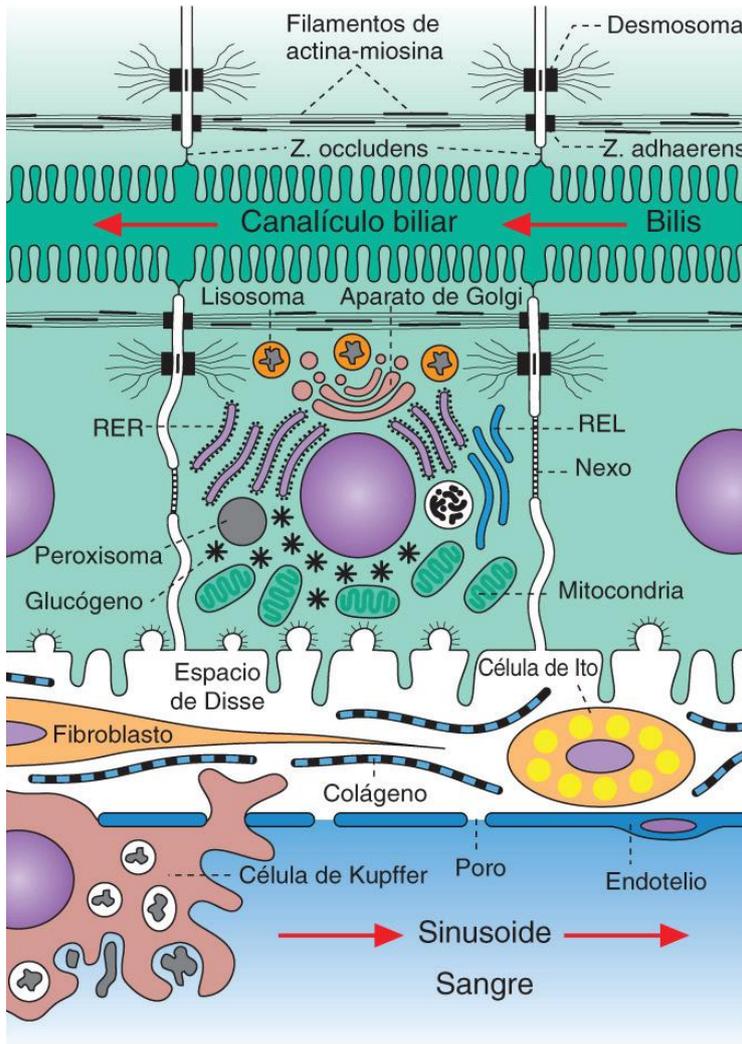


Figura 4. Estructura de un hepatocito. (Tomado de: Welsch y Sobotta, 2006). Son células polarizadas, es decir, en su membrana plasmática podemos distinguir dos zonas bien diferenciadas: la membrana apical, en donde se generan los canalículos biliares en los que se va a secretar la bilis (que será conducida hacia los ductos biliares), y la membrana basolateral o sinusoidal, en la que se va a producir el intercambio metabólico entre los hepatocitos y el plasma sanguíneo (sustancias que proceden de la circulación entero-hepática y la arteria hepática).

La superficie de ambas se encuentra amplificada debido a la presencia de microvellosidades. Además, los canalículos biliares se encuentran impermeabilizados por uniones estrechas entre los hepatocitos que los forman (Figura 5).

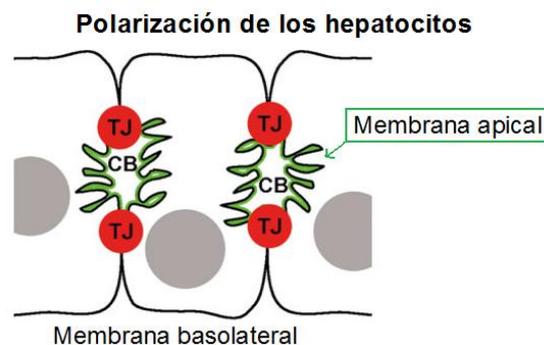


Figura 5. Esquema de la polarización de las membranas de hepatocitos (Tomado de: Benedicto et al, 2012). Las TJ (tight junctions o uniones estrechas) constituyen una barrera entre el dominio apical (en verde) y el dominio basolateral de la membrana plasmática. CB: canalículo biliar.

La polaridad de estas membranas está asegurada por la distinta composición lipídica y proteica, que es responsable de las diferentes funciones de cada una de ellas, además de su orientación hacia ambientes extracelulares distintos. De esta forma, se distinguen diferentes tipos de transportadores según la membrana en cuestión:

La membrana basolateral presenta el transportador de ácidos biliares acoplado al transporte de sodio NTCP (Na^+ -taurocholate cotransporting polypeptide), en un proceso dependiente de energía; los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos OATP1 (transporta sales biliares, numerosos aniones orgánicos y péptidos aniónicos) y OATP2 (no transporta sales biliares) (Chandra y Brouwer, 2004); los transportadores de aniones orgánicos (Oats, codificados por la familia del gen Slc22); los transportadores de cationes orgánicos OCT1; los novedosos transportadores de cationes orgánicos con un sitio de unión a un nucleótido OCTN1 y OCTN2 (Yabuuchi *et al*, 1999; Wu *et al*, 1998); y el producto del gen Oatp1 (Figura 6) (Treyer A, Müsch A, 2013).

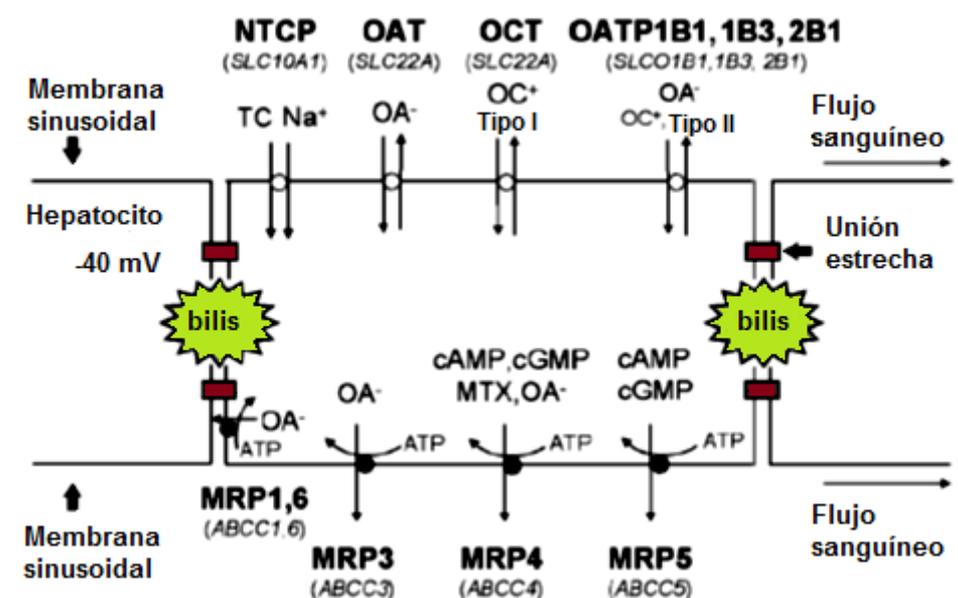


Figura 6. Proteínas hepáticas de transporte basolateral en humanos (Tomado de: Chandra y Brouwer, 2004). Representación esquemática de tres hepatocitos con espacios canaliculares sellados por uniones estrechas, en los que se señalan las importantes proteínas de transporte basolateral (NTCP, OAT, OCT, OATP1, OATP2), de las que MRP1, MRP3, MRP4, MRP5 y MRP6 pertenecen a la subfamilia MRP (ATP-dependent multidrug resistance-associated protein) encargada de la excreción de aniones orgánicos desde el hepatocito hacia el sinusoides hepático. Algunos de los sustratos típicos aparecen representados (OA^- , aniones orgánicos; OC^+ , cationes orgánicos; MTX, metotrexato; cAMP, adenosin 3,5-monofosfato cíclico; cGMP, guanosina 3,5-monofosfato cíclico). **Nota:** Debajo de los nombres de los transportadores aparece el nombre del gen.

La membrana apical presenta un transportador de sales biliares dependiente de ATP denominado BSEP (bile-salt export pump, perteneciente a la familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette), es responsable de la excreción de sales biliares conjugadas y no conjugadas en el canalículo biliar); el transportador MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2, responsable de la excreción de aniones orgánicos); los transportadores MDRP1 y MDRP3 (multidrug resistance protein 1 y 3, pertenecientes también a la familia de las proteínas ABC, encargados de transportar cationes hidrofóbicos y fosfolípidos, respectivamente); y el transportador BCRP (breast cancer resistance protein, encargada de la excreción biliar de conjugados sulfatados de esteroides y xenobióticos) (Figura 7) (Chandra y Brouwer, 2004; Treyer A, Müsch A, 2013).

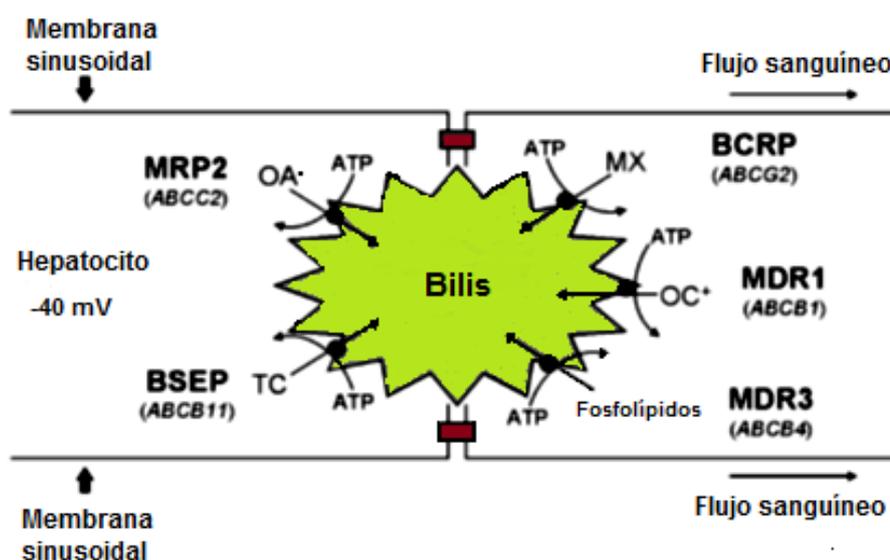


Figura 7. Proteínas hepáticas de transporte canalicular en humanos. (Tomado y modificado de: Chandra y Brouwer, 2004). Representación esquemática de dos hepatocitos adyacentes en la que se detallan las proteínas de transporte canalicular (MRP2, BSEP, BCRP, MDR1 y MDR3). Algunos de los sustratos típicos aparecen representados (OA⁻, aniones orgánicos; OC⁺, cationes orgánicos; TC, taurocolato; MX, mitoxantona). **Nota:** Debajo de los nombres de los transportadores aparece el nombre del gen.

1.1.2.2. Establecimiento de la polaridad en los hepatocitos.

El establecimiento de la polaridad en los hepatocitos, como en muchas otras células que comparte esta característica, es un proceso complejo que implica una rotura de la simetría celular y una reestructuración del citoesqueleto, de la membrana (va a tener una composición lipídica y proteica diferente según el dominio membranoso en cuestión) y de los orgánulos citoplásmicos. Está regulado por numerosas señales tanto internas como externas (procedentes del medio extracelular o del contacto célula-célula y célula-matriz), que son

reconocidas por proteínas y/o complejos proteicos que transmiten y ejecutan su información (Treyer A, Müsch A, 2013).

Algunos de los procesos que intervienen en el establecimiento y/o mantenimiento de la polaridad en estas células se detallan a continuación.

1.1.2.3. Papel de las proteínas PAR.

Las proteínas PAR (Protease activated receptor proteins) fueron descubiertas e identificadas por Ken Kemphues y Jim Priess en 1983 en embriones tempranos de *C. elegans* en los que se observaba un reparto anormal de importantes componentes citoplasmáticos durante el desarrollo temprano. De esta forma, se descubrió que estas proteínas regulan la polarización celular no solo en *C. elegans*, sino también en una gran variedad de organismos (Goldstein y Macara. 2007).

Se conocen seis proteínas PAR, de las cuales PAR-5 es un miembro de la familia de proteínas 14-3-3; PAR-3 y PAR-6 poseen dominios PDZ, pudiendo actuar en vías de señalización celulares; PAR-2 posee un dominio en anillo que puede actuar en la vía de ubiquitinación; y PAR-1 y PAR-4 son proteínas serina/treonina quinasas, siendo los homólogos en humanos de estas dos últimas los que tienen efectos en la polaridad de los hepatocitos (Goldstein y Macara, 2007; Treyer A, Müsch A, 2013).

El homólogo de PAR-1 en mamíferos, conocido como EMK1/MARK2, juega un importante papel en el desarrollo de o bien un epitelio columnar (típico de órganos como riñón e intestino) o bien un epitelio hepático. En función de sus diferentes niveles de expresión, puede modular la formación de distintos tipos de lúmenes. Si sus niveles de expresión son bajos, se formará un lumen típico de un epitelio columnar con una orientación vertical de los microtúbulos. Por el contrario, si sus niveles de expresión son altos, se produce la formación de un lumen en puntos de contacto célula-célula (canalículo biliar) típico de los hepatocitos, con una disposición horizontal de los microtúbulos (Cohen *et al*, 2004a). Además, produce la reorganización del tráfico proteico, tal y como se ha observado en células de riñón MDCK (Madin-Darby canine kidney), en las cuales cambia el modo directo de transporte de proteínas de nueva síntesis (desde el aparato de Golgi hacia el lumen) por la ruta de transocitosis (en donde las proteínas pasan primero por los endosomas basolaterales antes de llegar al lumen apical) típica de los hepatocitos, cuando sus niveles de expresión son altos (Cohen *et al*, 2004b; Treyer A, Müsch A, 2013).

El homólogo de PAR-4 en mamíferos, LKB1, y su sustrato, la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), participan en el mantenimiento de la polaridad celular y en la formación y mantenimiento de los canalículos biliares, tal y como

se ha observado en cultivos de hepatocitos primarios de rata. Ambas proteínas se activan por fosforilación y su actividad es regulada durante el proceso de formación de canalículos biliares, en donde se detecta un aumento de su expresión. La inhibición de ambas produce una pérdida de canalículos biliares, con la consecuente pérdida de polaridad de los hepatocitos, lo que se traduce en un fallo en la secreción biliar (colestasis) que produce un daño hepático (Fu D. *et al*, 2010).

De esta forma, un aumento en los niveles de expresión de estas proteínas, además de promover la polaridad de los hepatocitos, produce un aumento de la concentración de los ácidos biliares, produciendo como consecuencia un aumento del número de canalículos biliares (Fu D. Wakabayashi Y *et al*, 2011). Estudios con ratones en los que se ha delecionado LKB1 (LLKB1KO) muestran una alteración en la formación de los conductos biliares, en la localización del transportador BSEP y en el transporte de ácidos biliares, resultando en una acumulación de éstos en el hígado y suero (debido a sus fuertes propiedades detergentes pueden producir daños en tejidos), produciéndose como consecuencia coleostasis. Por esta razón estos ratones LLKB1KO mueren a las cuatro semanas del nacimiento. Estos estudios indican, de nuevo, la importancia de la proteína LKB1 en la formación de estructuras polarizadas (Woods *et al*, 2011).

1.1.2.4. Papel de las uniones celulares.

Las uniones celulares son las responsables del mantenimiento de la polaridad de los hepatocitos (necesaria para el correcto desarrollo de su función), así como de la distribución asimétrica de proteínas, enzimas, lípidos y canales iónicos en las membranas apical y basolateral. Ambas membranas poseen diferentes complejos implicados en la unión célula-célula o en la unión célula-sustrato. La membrana lateral posee un complejo de unión intercelular especializada compuesto por zonula occludens (unión estrecha), que regula la permeabilidad de las membranas, manteniendo las diferencias de composición lipídica y proteica entre ellas; uniones gap, que permiten la comunicación intercelular; proteínas de adhesión celular, que regulan el reconocimiento inicial y la adhesión célula-célula; zonula adherens (unión intermedia) y desmosomas, que mantienen la integridad estructural del epitelio hepático (Molitoris y Nelson, 1990).

Por otra parte, la membrana basal posee proteínas especializadas que regulan la interacción célula-sustrato, como por ejemplo receptores de colágeno tipo IV, proteoglicanos y laminina, que son específicos de tejido y están implicados en la adhesión celular del sustrato (Molitoris y Nelson, 1990).

Las uniones adherentes y las uniones estrechas, aunque comprenden proteínas diferentes, proveen importantes contactos adhesivos entre células epiteliales adyacentes, regulando su formación y maduración, que implica una reorganización del citoesqueleto de actina (Hartsock y Nelson, 2008).

1.1.2.4.1. Uniones adherentes.

Estas uniones poseen múltiples funciones, entre las que destacan la iniciación y estabilización de la adhesión celular, la regulación del citoesqueleto de actina, la señalización intracelular y la regulación transcripcional (Hartsock y Nelson, 2008). Estas uniones consisten en dos unidades adhesivas básicas: el complejo nectina-afadina y el complejo cadherina-catenina (Figura 8). La expresión específica de cadherinas y nectinas parece ser la que determina la fortaleza y especificidad adhesiva de las uniones adherentes (Niessen, 2007).

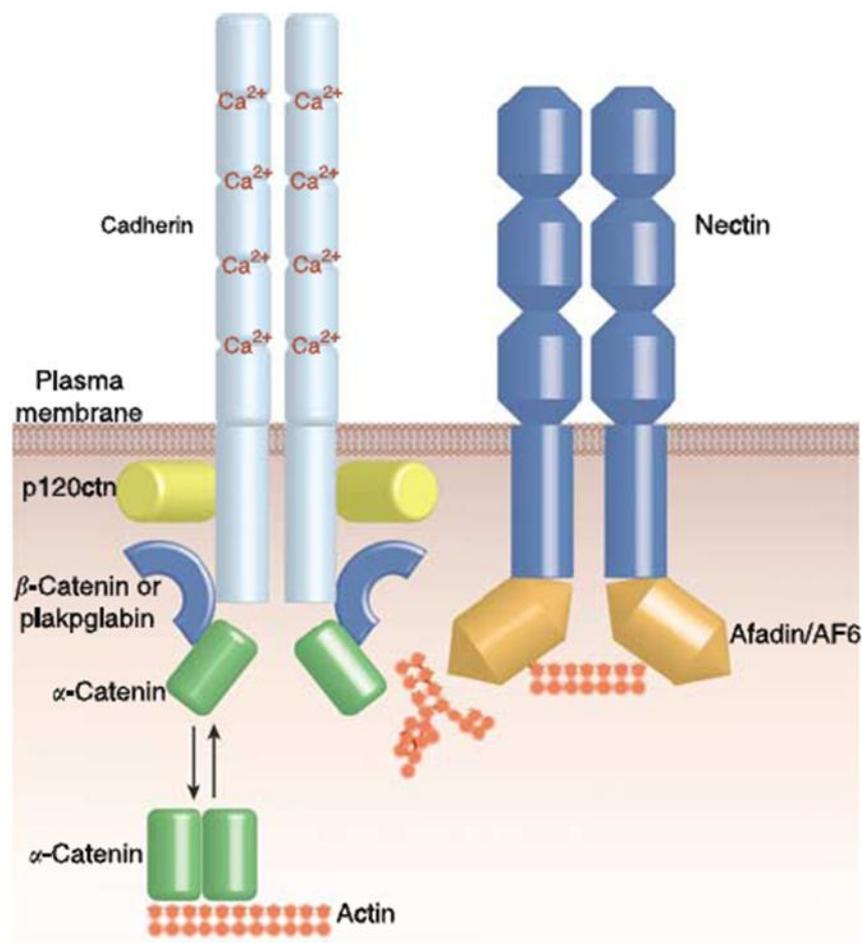


Figura 8. Representación esquemática de los componentes estructurales básicos de las uniones adherentes. Ambos complejos (cadherina-catenina y nectina-afadina) interactúan con el esqueleto de actina. Tomado de: Niessen, 2007

La familia nectina pertenece al grupo de receptores de adhesión similares a IgG consistente en cuatro miembros, nectinas-1, 2, 3 y 4, las cuales forman una unidad estructural adhesiva con la proteína afadina-6 (en mamíferos, con dos dominios de unión a Ras/Rap), ambas con un dominio PDZ, la cual a su vez se une a la actina, proporcionando de esta forma una unión directa con el citoesqueleto. Estudios en embriones de ratones demuestran que una delección de la afadina-6 causa letalidad debido a la alteración de las uniones intercelulares y, consecuentemente, de la polaridad celular y de la asimetría membranar (Niessen, 2007; Zhadanov *et al*, 1999).

Las cadherinas forman parte de una gran familia de más de 350 proteínas adhesivas dependientes de Ca^{2+} (en la que se encuentran las cadherinas no neurales E y P, las cadherinas neurales N y R, y las cadherinas desmosomales) en la que la gran característica son los cinco dominios cadherina extracelulares (EC) repetidos, los cuales forman interacciones trans-cadherina entre células adyacentes iniciando una débil adhesión célula-célula (Figura 9). La unión de Ca^{2+} a cada repetición EC es necesaria para la correcta organización extracelular del dominio cadherina (Hartsock y Nelson, 2008; Saito M. *et al*, 2012). La desmocolina 2, glicoproteína desmosomal perteneciente a la familia cadherina, también interviene en la formación de uniones adherentes intercelulares dependientes de Ca^{2+} . Además de su reconocido papel en las adhesiones celulares, las cadherinas intervienen en otras funciones, tales como el reconocimiento célula-célula, la organización del citoesqueleto, la transducción de señales y el control del crecimiento (Angst *et al*, 2001).

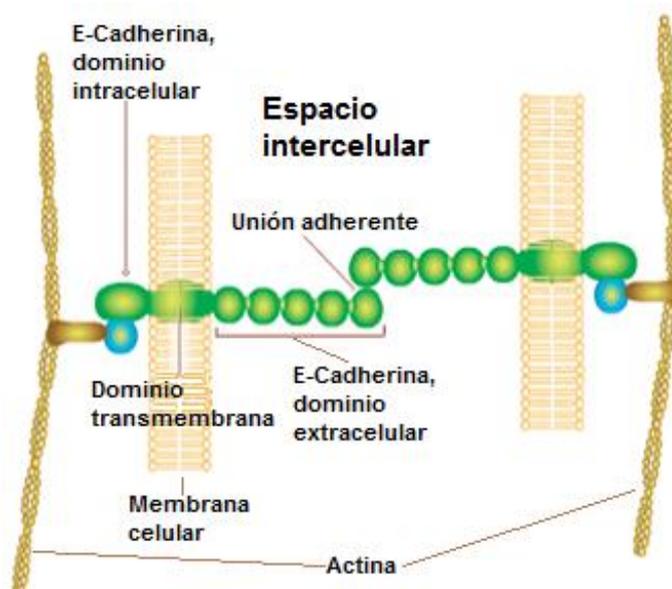


Figura 9. Representación esquemática de la interacción entre dos cadherinas en células adyacentes (Tomado y modificado de: Sigma-Aldrich).

Una disminución de su expresión promueve la proliferación celular permitiendo el crecimiento de tumores colorectales, debido a la activación de la vía de señalización Akt/ β -catenina (Kolegraff *et al*, 2010).

E-cadherina (caderina-1 ó uvomorulina) es una glicoproteína de membrana de un solo paso perteneciente a esta familia, que es requerida para la unión y localización de un gran número de proteínas citoplásmicas que conectan el complejo cadherina con el citoesqueleto de actina y diversas vías de señalización. Estas proteínas son las cateninas, entre las que destacan catenina-p120 (subfamilia en la que se encuentra la catenina- δ (Carrnham *et al*, 2010) y las placofilinas, encontradas fundamentalmente en desmosomas (Niessen, 2007), catenina- β y catenina- α . Otra cadherina, la cadherina-5 o VE-cadherina (vascular-endotelial cadherin) es expresada en hendiduras intercelulares en el endotelio y, además de unirse a cateninas para formar las uniones adherentes entre células, es necesaria para la proliferación de las células endoteliales, proceso dependiente de la correcta formación de contactos célula-célula (Caveda *et al*, 1996; Lampugnani *et al*, 1992).

Las cateninas-p120 y β se unen directamente a la cadherina gracias a sus repeticiones armadillo, mientras que la catenina- α es el nexo de unión entre el complejo cadherina/catenina- β y los filamentos de actina del citoesqueleto, hecho crucial para una completa función adhesiva (Niessen, 2007). La catenina- α se une tanto directa como indirectamente a los filamentos de actina del citoesqueleto, en este último caso con el concurso de proteínas como vinculina y filamina (Yonemura *et al*, 1995; Takahashi *et al*, 1999).

La catenina- β también se puede unir directamente a diversas proteínas de señalización, como el receptor EGF o tirosina fosfatasas, además de jugar un papel central en la vía de señalización Wnt (Niessen, 2007) (Figura 10). Se ha demostrado que la delección de E-cadherina y catenina- β de la superficie celular de hepatocitos cultivados impide la formación de uniones adherentes por parte de estas células (Théard *et al*, 2007), causando la muerte de los mismos mediante un mecanismo independiente de caspasas (Luebke-Wheeler *et al*, 2009).

La catenina-p120 además es un regulador e integrador de la señalización mediada por la familia de proteínas Rho (pequeñas GTPasas), cuya función depende principalmente de su interacción con la cadherina, y está asociada con la metilación del represor transcripcional Kaiso: Figura 10, parte inferior (Hu, 2012).

Además de estas proteínas, la placoglobina o catenina- γ , aunque en un principio se la relacionó con las cadherinas desmosomales, está relacionada con la catenina- β y puede sustituir a esta última en el complejo cadherina/catenina (Niessen, 2007).

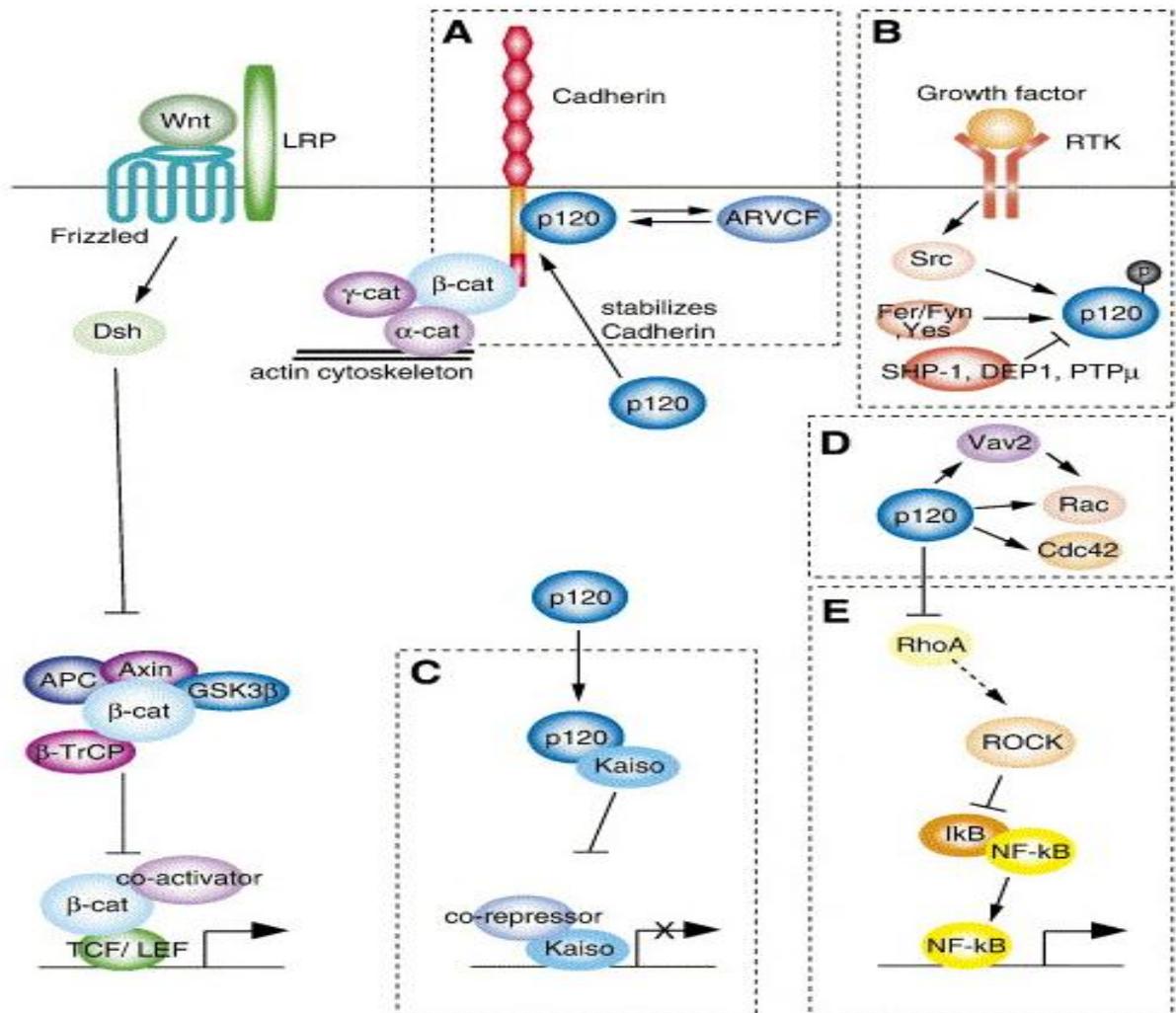


Figura 10. Vías de señalización en las que participa la catenina-p120 (Modificado de; McCrea P.E. y Park J., 2007). A. La asociación de catenina-p 120 estabiliza el complejo cadherina-catenina. B. La catenina p-120 es modificada por protein-quinasas y fosfatasas, eventos de fosforilación-defosforilación modulan interacciones con otras proteínas. C. Catenina-p 120 modula funciones de pequeñas GTPasas, activa directamente a Rac1 y Cdc42a través de Vav2, e inhibe a RhoA. D. Es un regulador corriente arriba del represor transcripcional Kaiso, interacciona con éste e impide la represión del ADN. E. Participa en transducción de señales vía NF-κβ. Al inhibir actividad de RhoA, inactiva esta vía de señalización en tejidos epiteliales.

I.1.2.4.2. Uniones estrechas

Las uniones estrechas, más conocidas como “Tight junctions” o TJ, por sus siglas en Inglés, poseen dos funciones diferentes: funcionan como una barrera que previene la mezcla de proteínas de membrana entre los dominios apical y basolateral, y como una puerta que controla el pasaje paracelular de iones y solutos entre las células (Figura 11) (Hartsock y Nelson, 2008; Ichikawa-Tomikawa N., et al, 2011).

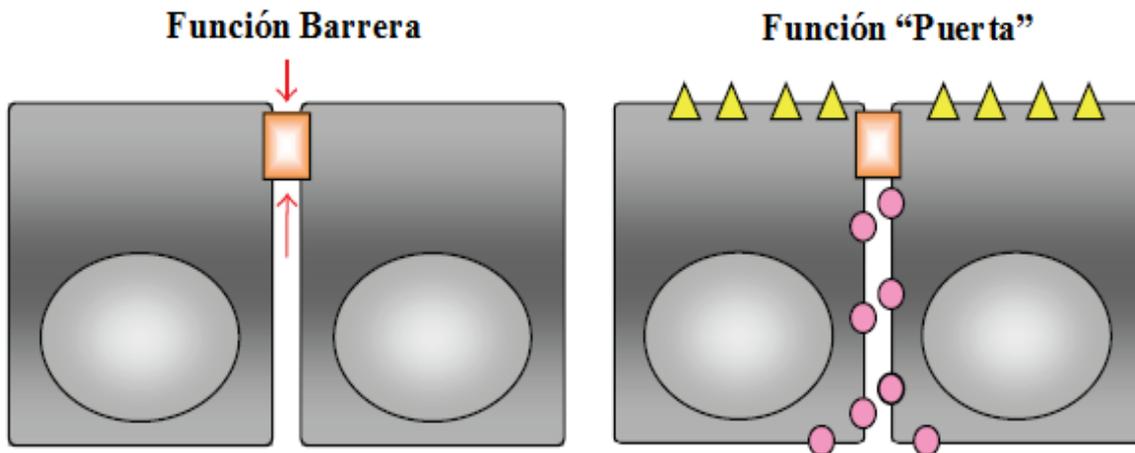


Figura 11. Funciones de las uniones estrechas. A la izquierda, función barrera: Las uniones estrechas limitan la penetración de material intercelular, mediante un fenómeno de permeabilidad selectiva. A la derecha, función puerta: Las uniones estrechas restringen la difusión de proteínas y lípidos en la membrana celular. (Tomado de: Ichikawa-Tomikawa N. et al, 2011).

Comprenden cuatro tipos de proteínas transmembrana, ocludina, claudinas, JAMs (junctional adhesion molecules) y tricelulina, además de numerosas proteínas citosólicas, entre las que destacan las proteínas ZO (zonula occludens), que son las responsables de unir las uniones estrechas al citoesqueleto de actina y a las uniones adherentes (Figura 12) (Hartsock y Nelson, 2008; Ichikawa-Tomikawa N., et al, 2011).

Ocludina fue el primer componente descubierto de las uniones estrechas. Es una proteína de 65 kDa con dos dominios extracelulares (EC1 y EC2), mientras que los dominios N- y C-terminales son citoplasmáticos. El dominio C-terminal se une directamente a la proteína ZO-1 y es susceptible de fosforilación en sus residuos serina, treonina y tirosina por diversas quinasas (src quinasas y CK2), siendo la proteína fosforilada la que se localiza en las uniones estrechas.

La fosforilación de algunos residuos de tirosina previene la unión con ZO-1, impidiendo de esta forma el establecimiento de las uniones estrechas, mientras que la fosforilación de determinados residuos de serina y treonina aumentan el tráfico de ocludina a las uniones estrechas y, por tanto, la función de barrera celular.

Se ha visto que la delección de ocludina en células madre embrionarias y en ratones no interfiere en la correcta formación de las uniones estrechas (estos últimos exhiben diversos fenotipos como retraso del crecimiento, hiperplasia de la mucosa gástrica, atrofia testicular, etc), indicando que esta proteína no está implicada en la diferenciación epitelial o en la función de barrera de las uniones estrechas.

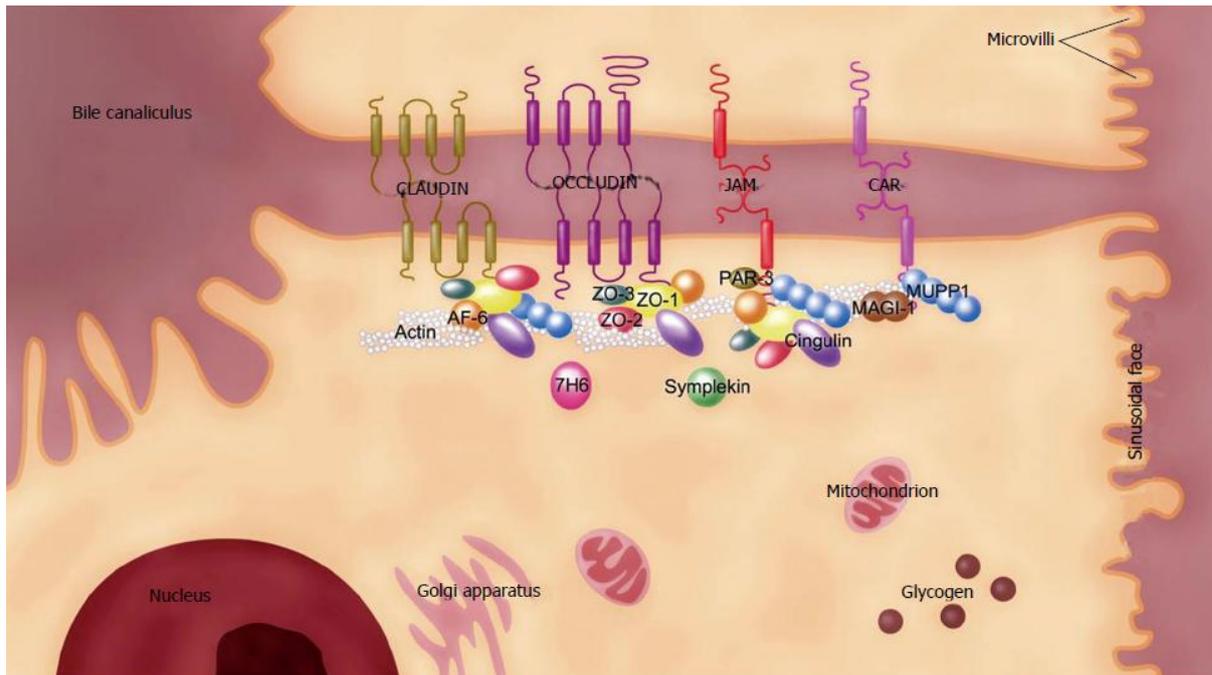


Figura 12. Estructura molecular de las uniones estrechas en hígado de mamíferos entre dos hepatocitos (Tomado de: Lee y Luk, 2010). Las uniones estrechas en el hígado están asociadas con los hepatocitos y las células del canalículo biliar, en las que se distingue una unidad central, compuesta por claudinas, ocludinas, JAMs y/o CAR, que se asocia a proteínas periféricas como ZO-1 para formar complejos multiproteicos. Todas estas moléculas poseen diferentes localizaciones: algunas están asociadas con hepatocitos y células del canalículo biliar, como CAR-2 de ratón, y otras solo se encuentran en las células del canalículo biliar, como CAR-1 de ratón.

CAR: Coxsackievirus and adenovirus receptor; JAM: Junctional adhesion molecule; MAGI-1: Membrane-associated guanylate kinase inverted-1; MUPP1: Multiple PDZ domain protein-1; PAR-3: Partitioning defective-3 homolog; TJ: Tight junction; ZO: Zonula occludens.

Además, la ocludina participa en la transducción de señales, ya que interacciona con diversas moléculas señalizadoras como el receptor tipo 1 de TGF, proteínas fosfatasa 2A, PI3 quinasa, etc. (Ichikawa-Tomikawa N., *et al*, 2011; Soini, 2012; Lee y Luk, 2010; Harstock y Nelson, 2008; Niessen *et al*, 2007).

Tricelulina es una proteína similar a la ocludina encontrada en las uniones estrechas (independientemente de su unión a ZO-1), en donde refuerza la función barrera de las mismas. Mutaciones en esta proteína están asociadas con la sordera en humanos (Niessen *et al*, 2007; Soini, 2012; Ichikawa-Tomikawa *et al*, 2011).

Las claudinas son una familia de 24 miembros con distinta distribución tisular, ya que son los responsables de la permeabilidad a solutos y electrolitos de las

uniones estrechas. Están compuestas por dos dominios extracelulares (EL1, influye en la selectividad de carga, y EL2, implicado en la unión entre claudinas vecinas), cuatro dominios transmembrana y los dominios citoplásmicos N- y C-terminales, este último es el que se une a la proteína ZO-1. Mutaciones en ciertas claudinas pueden producir diversas enfermedades, como por ejemplo, una mutación en la Claudina-14 puede causar sordera, por estar asociada con la barrera restrictiva a cationes en las células pilosas externas de la cóclea del oído. Asimismo, una delección de la Claudina-7 en ratones provoca su muerte 12 días después del nacimiento debido a un gran gasto de sal, una deshidratación crónica y un retardo del crecimiento provocado por la ruptura de la homeostasis del NaCl (Niessen *et al*, 2007; Soini, 2012; Ichikawa-Tomikawa *et al*, 2011).

Las JAMs (junctional adhesion molecules) son glicoproteínas transmembrana pertenecientes a la familia IgG, con dos dominios extracelulares tipo-Ig, una región transmembrana y un dominio C-terminal con un sitio de unión de dominios PDZ. Esta familia está compuesta por las moléculas estrechamente relacionadas JAM-A, JAM-B y JAM-C (estas tres encontradas en hígado de ratón), y las más lejanamente relacionadas CAR (Coxsackie and adenovirus receptor), ESAM (endotelial cell-selective adhesion molecule) y JAM-4. Como componentes de la barrera que previene la mezcla de proteínas entre los dominios apical y basolateral de la membrana de hepatocitos en las uniones estrechas, una molécula JAM tiene que unirse con otra vecina para formar dobles. Estas moléculas se encuentran en otros tipos celulares tales como leucocitos, en donde contribuyen a su migración transendotelial (Ichikawa-Tomikawa *et al*, 2011; Lee y Luk, 2010; Niessen *et al*, 2007).

Las proteínas CARs, además de ser un receptor viral, son encontradas en las uniones estrechas, en donde interactúan con proteínas armazón (como ZO-1) para proporcionar integridad estructural. Existen tres isoformas (CAR-1, CAR-2 y CAR-3) de las cuales, solo CAR-2 se ha encontrado en hepatocitos (Lee y Luk, 2010; Cohen *et al*, 2001).

Son necesarias una serie de proteínas armazón que unan las claudinas, ocludinas, JAMs y CARs al filamento de actina subyacente. El grupo más importante es el de las proteínas zonula occludens ZO-1, ZO-2 y ZO-3 que pertenecen a la familia de homólogos guanilados similares a quinasas asociadas a la membrana. Se caracterizan por sus dominios PDZ N-terminales, los cuales pueden interactuar con claudinas y ocludinas directamente para dar firmeza a las uniones estrechas. Existen otras proteínas armazón con dominios PDZ como cingulina, MUPP1 y MAGI que también interactúan con los componentes transmembrana de las uniones estrechas (Lee y Luk, 2010; Niessen *et al*, 2007).

I.1.2.4.3. Distribución espacio-temporal de proteínas presentes en uniones celulares

Parece existir una jerarquía en la maduración de la membrana apical en hepatocitos, ya que la ausencia y/o presencia de determinadas proteínas de las uniones estrechas influyen en dicho proceso (Treyer A, Müsk A, 2013).

Estudios realizados por Decaens y Cassio en el año 2001 demostraron que, en un modelo de células hepáticas en cultivo (células WIF-B9), la distribución espacio-temporal de las proteínas presentes en las uniones celulares es necesaria para el desarrollo de la polaridad en células epiteliales, como por ejemplo en los hepatocitos. Los resultados observados fueron los siguientes: cuando las células se encuentran aisladas, tanto las proteínas de uniones adherentes (E-cadherina y cateninas α , β y γ) como las de uniones estrechas (occludina y ZO-1) se localizan en el citoplasma. Este hecho también fue observado en los estudios de Bacallao *et al.* en cultivos de células MDCK. Sin embargo, cuando las células forman dobletes, esta distribución cambia: tanto E-cadherina como las cateninas se localizan en las zonas de unión de membranas entre dos células, ZO-1 tanto en el citoplasma como en las zonas de unión de membranas (indicando que llegan a la membrana después de los complejos catenina/cadherina), y ocludina en el citoplasma (indicando que la completa formación de las uniones estrechas aún no ha ocurrido). Cuando las células expresan un fenotipo de epitelio simple, E-cadherina y las cateninas siguen localizándose en las zonas de unión de membranas, mientras que ZO-1 y ocludina se encuentran en el ápice de la célula, a pesar de que una fracción de ocludina permanece en el citoplasma. Tras 10 días en cultivo, las células pasan a expresar un fenotipo hepático con canalículos biliares entre ellas, en donde en la membrana basolateral se localizan E-cadherina y las cateninas, y en la zona apico-lateral (donde se encuentran los canalículos biliares) se sitúan las cateninas, ZO-1 y ocludina (Decaens y Cassio, 2001; Bacallao *et al.*, 1989; Treyer A, Müsk A, 2013).

Estudios posteriores de Konopka *et al.*, en el año 2007 demostraron una dependencia entre la localización de proteínas de las uniones estrechas y la correcta formación de los canalículos biliares. De esta forma, una disminución en la expresión de JAM-A (proteína de las uniones estrechas que está relacionada con las cascadas de señalización) causa un cambio drástico en la morfología celular, una deslocalización de proteínas de uniones celulares y una reducción en la formación de canalículos biliares, alteraciones debidas a un aumento en la expresión de proteínas de uniones adherentes tales como E-cadherina (Konopka *et al.*, 2007; Treyer A, Müsk A, 2013). Sin embargo, no todas las proteínas que constituyen las uniones estrechas producen estos efectos adversos sobre la formación de los canalículos biliares. Por ejemplo, ratones deficientes en ocludina no presentan ninguna alteración en la morfología de los canalículos biliares, ya que poseen una sobreexpresión de claudina-2 en sus hepatocitos que compensa la pérdida de esta proteína

(Saitou *et al*, 2000; Furuse *et al*, 1998). Por el contrario, una inhibición de la expresión de claudina-2 impide la formación de canalículos biliares y, además, se produce un cambio en el fenotipo, de fenotipo hepático polarizado a un fenotipo polarizado simple (Son *et al*, 2009).

I.1.3. Estructura hepática y principales proteínas de la matriz extracelular en el hígado sano

El hígado es estructural y funcionalmente heterogéneo, y ha sido considerado sólo después del cerebro en cuanto a su complejidad. Su unidad funcional es el lóbulo, y ha intrigado a los morfologistas por más de 300 años. Tiene dos sistemas distintos de aporte sanguíneo y contiene al menos una docena de diferentes tipos celulares (Malarkey DE, *et al* 2005). Es sorprendente que, sin importar el ángulo en que sea seccionado, tiene básicamente la misma apariencia histológica: múltiples unidades con una vénula hepática (también llamada vena central) en el centro, rodeada por 4 a 6 espacios portales. Este fenómeno es la base del concepto de que el hígado tiene un parénquima isotrópico (MacSween, 2002; Matsumoto y Kawakami, 1982).

Los ratones y las ratas tiene cuatro lóbulos hepáticos: mediano o medio, izquierdo, derecho y caudal; todos, excepto el izquierdo, se subdividen a su vez en dos o más partes. Los humanos y los ratones, pero no las ratas, tienen una vesícula biliar (MacSween 2002). En cualquier momento dado, el hígado contiene un volumen de sangre equivalente al 25% del gasto cardíaco. La vena portal y la arteria hepática son los dos principales sistemas de aporte sanguíneo al hígado, la vena portal aporta alrededor del 70% del flujo y 40% del oxígeno, mientras que la arteria hepática supe 30% del flujo y 60% del oxígeno (Burt y Day, 2002). Los vasos portales entregan sangre a los vasos parenquimales llamados vénulas portales preterminales y terminales, que drenan a los sinusoides; la arteria hepática generalmente acompaña a las venas portales en las tríadas portales, y sus ramas menores alimentan los sinusoides a varios niveles y a las vías biliares (MacSween, 2002).

El flujo sinusoidal es regulado estrechamente, y drena a las vénulas hepáticas terminales (también llamadas venas centrales) antes de drenar a las venas hepáticas mayores y eventualmente a la vena cava (McCuskey, 2000). La linfa se acumula en los espacios de Disse y el tejido periportal de Mall antes de drenar a los vasos linfáticos en el canal portal y/o a los canales linfáticos hiliares, para finalmente vaciarse al conducto torácico. Las tríadas portales se definen por contener una vena portal, uno o dos conductos biliares, una o dos arterias, linfáticos y nervios, en una matriz de tejido conectivo compuesta principalmente de colágeno tipo I (MacSween *et al*, 2002).

En la Tabla 1 se resume la historia de las diferentes definiciones acerca de cuál es la unidad funcional del hígado (Malarkey DE, *et al* 2005).

Tabla 1. Historia de los conceptos de la unidad funcional del hígado

Año	Unidad	Propuesta por
1665	Arquitectura lobular	Weppler
1833	Lóbulo hexagonal clásico	Kiernan
1906	Lóbulo portal	Mall
1954	Acino hepático	Rappaport
1979	Lóbulo primario	Matsumoto
1988	Sinusoide aislado	Bloch y McKuskey
1989	Metabólica	Lamers et al
1989	Circulación zonal	Quistorff y Romert
1993	Coleón	Hofman
1997	Coleohepatón y subunidad microcirculatoria	Ekataksin y Wake

El lóbulo primario, propuesto por Matsumoto et al en 1979 ha ganado aceptación creciente como la unidad funcional del hígado porque está basado en la arquitectura vascular e incluye el lóbulo clásico como una característica secundaria (Matsumoto et al, 1979; Matsumoto y Kawakami, 1982). Se fundamenta en la porción de conductos y parénquima del árbol venoso portal. El aspecto tridimensional de los lóbulos individuales no es cilíndrico ni prismático sino tortuoso y ramificado, y el hígado tiene a creer por división del lóbulo clásico. Respecto a los tipos celulares, al menos 15 de ellos pueden encontrarse en el hígado normal, se describen en la Tabla 2 (Malarkey DE, et al 2005).

Tabla 2. Tipo celulares encontrados en el hígado normal.

Hepatocitos
Epitelio biliar
Endotelio (Sinusoides, arterias y venas, linfáticos)
Células de Kupffer
Células hepáticas estrelladas o de Ito.
Linfocitos (Células Pit)
Células progenitoras (Células ovals en roedores)
Fibroblastos
Células musculares lisas (vasos sanguíneos)
Mesotelio
Nervios (No mielinizados)
Células neuroendocrinas
Células hematopoyéticas
Células sanguíneas (eritrocitos, leucocitos)

Los hepatocitos son los más numerosos, comprenden 60% del total de células y aportan 80% del volumen del hígado. Las células endoteliales sinusoidales son la barrera primaria entre la sangre y los hepatocitos, tienen fenestras o hendiduras y carecen de lámina basal, actúan filtrando solutos, líquidos y partículas entre la sangre y el espacio de Disse, y pueden transferir moléculas y partículas por endocitosis, representan alrededor del 20% de las células del hígado; las células de Kupffer representan 6% de las células del hígado, se derivan de monocitos circulantes, proliferan localmente, son fagocíticas y son las mayores productoras de citoquinas y mediadores inflamatorios; las células hepáticas estrelladas o de Ito comprenden alrededor del 5% del órgano, almacenan lípidos y vitamina A, son jugadores principales en la regeneración hepática, la fibrogénesis y la cirrosis, producen matriz extracelular, controlan el tono microvascular y pueden “transformarse” en miofibroblastos, estado en el que expresan desmina y filamentos de actina de músculo liso; junto con el epitelio biliar, comprenden el resto de las células importantes en este órgano.

La matriz extracelular (MEC) juega un papel muy importante en el hígado, aunque contribuye con menos del 3% del peso del mismo. Además de funcionar como un marco estructural, aporta señales que facilitan la supervivencia celular, apoya la diferenciación celular y modula la adhesión celular, la migración y la respuesta a estímulos (Lin et al, 1998, Meredith et al, 1993). Consiste de varios tipos de colágena, glicoproteínas no-colágenas y proteoglicanos.

La distribución de los componentes principales de la MEC se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Distribución de diferentes componentes de la matriz extracelular				
	Cápsula	Triada portal	Vena central	Espacio de Disse
Colágeno I	✓	✓	✓	✓ fibras delgadas
Colágeno III	✓	✓	✓	✓ filamentos
Colágeno IV		✓		✓ discontinuo
Colágeno V	✓	✓	✓	✓ componente menor
Colágeno VI		✓	✓	✓ abundante
Colágeno VII		✓		✓ fibras anclaje
Entactina		En todas las membrana basales		
Fibronectina	✓	✓	✓	✓ la más abundante
Laminina		En todas las membrana basales		
Perlecan				✓
Tenascina	✓	✓	✓	✓ escasa

Modificado de: Zhu C et al. J Tissue Eng Regen Med 2012.

De los más de 25 tipos de Colágeno caracterizados hasta hoy, solamente los tipos I, III, IV, V, VI, VII y XVIII se encuentran en el hígado. Los tipos I, III, V, VI y VII, que son colágenos fibrilares mayores, sirven principalmente como andamio para dar soporte al parénquima hepático. Colágeno IV es un constituyente importante de la membrana basal, mientras que Colágeno XVIII es precursor de la endostatina.

Las principales glicoproteína no colágenas en la MEC hepática incluyen laminina, entactina, fibronectina y tenascina. Laminina y entactina también son componentes de la membrana basal, laminina y fibronectina están involucradas en la adhesión celular. Los proteoglicanos, con sus cadenas glicosaminoglicano adheridas, son responsables de la rigidez de la MEC hepática, por su capacidad de retener agua. Además, las cadenas glicosaminoglicano de la subfamilia de heparan-sulfato son importantes por la capacidad de fijación de factores de crecimiento y su posterior presentación a los receptores de alta afinidad de las superficies celulares. Los glicosaminoglicanos encontrados en el hígado son heparan-sulfatos, dermatan-sulfatos, condroitin-sulfatos, keratin-sulfatos, ácido hialurónico y heparina. Las glicoproteínas no colágenas y los proteoglicanos se interconectan con el andamio de colágenas para formar una delicada red cuya estructura tridimensional actúa como unidad funcional integral.

Conceptualmente conviene dividir al hígado en cuanto hace a la distribución de las moléculas en la MEC en cuatro unidades funcionales, la cápsula, el espacio portal, el espacio central y el espacio de Disse. Este último es el espacio entre las células del parénquima y las células endoteliales, la MEC en este sitio es única, comparada con la existente en otros sitios, está esparcida y carece de una membrana basal integrada, además, su composición es variable durante la ontogénesis. En el hígado fetal y neonatal la laminina y la fibronectina son más prominentes que los Colágenos I, III y IV, además contienen hialuronan y proteoglicanos pobremente sulfatados. En el hígado adulto, esta región consiste principalmente de fibronectina, más Colágeno I y III, menos Colágeno IV, proteoglicanos ricamente sulfatados, mientras que la laminina y hialuronan están ausentes. La desaparición de laminina y hialuronan que acompaña a la transición del estadio fetal-neonatal al adulto indica su posible papel en la organización de los lóbulos hepáticos. En el resto de la MEC del hígado hay Colágenos I, III, V y VI así como fibronectina (Martínez-Hernández et al, 1993 a y b; Zhu C, 2012).

Especialmente interesantes son los mecanismos de interacción de la MEC con las células progenitoras hepáticas (células ovales), que se resumen en los siguientes conceptos:

1. Moléculas en la superficie de las células ovas sirven como receptores a ligandos de la MEC, cuya activación inicia cascadas de señalización intracelular corriente abajo.
2. La MEC retiene y presenta factores de crecimiento, citoquinas y quimoquinas que modulan el comportamiento de las células ovas.
3. Las células ovas per se modifican la composición y remodelación de la MEC produciendo proteínas o enzimas degradadoras de la MEC, y juegan así un papel homeostático. (Zhu

I.1.4. Funciones hepáticas.

I.1.4.1. Principales funciones metabólicas:

El hígado tiene muchas funciones complejas, algunas de las cuales se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales funciones del Hígado	
Metabolismo de nutrientes y vitaminas	Glucosa y otros azúcares Aminoácidos Lípidos Ácidos grasos Colesterol Lipoproteínas Vitaminas hidrosolubles Vitaminas liposolubles
Síntesis de factores de crecimiento	IGF-1
Formación y secreción de bilis	Síntesis de ácidos biliares Glucuronidación de bilirrubina Excreción de bilirrubina
Inactivación de sustancias tóxicas	Toxinas Esteroides Otras hormonas
Síntesis de proteínas del plasma	Proteínas de fase aguda Albúmina Factores de la coagulación Proteínas de unión a hormonas Proteínas de unión a esteroides
Inmunidad	Células de Kupffer

Está más allá del alcance de este trabajo considerar todas las funciones del hígado, por el contrario, haremos solamente una revisión general de las más importantes. Como son objeto de nuestro trabajo, primero consideraremos el papel del hígado como glándula endocrina, y al final de esta sección, describiremos su papel como glándula exocrina.

1.1.4.2. El hígado como glándula endocrina.

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 α (TNF- α), HGF y *Transforming Growth Factor* α (TGF- α) (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).

1.1.4.3. El hígado como glándula exocrina

Como ya se ha descrito, la formación de la bilis que contribuye a la emulsión de las grasas en el duodeno, es la función más relevante del hígado como glándula exocrina aneja al tubo digestivo. En cuanto a la formación y secreción de bilis, ésta se compone de los ácidos biliares (0.7%), los pigmentos biliares (0.2%) y otras sustancias como colesterol (0.06%), algunas sales inorgánicas (0.7%), ácidos grasos (0.15%), fosfatidilcolina (0.2%), grasa (0.1%) y trazas de fosfatasa alcalina, en una emulsión electrolítica alcalina en agua (97%).

En un día promedio, se producen alrededor de 500 mL. Algunos de los componentes de la bilis son reabsorbidos en el intestino y luego excretados de nuevo por el hígado, en un proceso que se denomina recirculación enterohepática.

En adición a su papel en la digestión y absorción de grasas, la bilis, por la vía fecal, es la ruta de eliminación más importante para los productos de desecho del organismo solubles en lípidos. Los glucurónidos de pigmentos biliares, bilirrubina y biliverdina, son los responsables del color amarillo dorado de la bilis.

La formación de estos productos de degradación de la hemoglobina es una parte esencial para el metabolismo de este pigmento transportador de oxígeno. En circulación, la bilirrubina está unida a la albúmina,

Una vez llega al hígado, la mayor parte es disociada de la albúmina y entra al hepatocito como bilirrubina libre, vía un miembro de la familia de los transportadores polipeptídicos de aniones orgánicos (OATP), y se une en el citosol a proteínas.

En seguida es conjugada con dos moléculas de ácido glucurónico, en una reacción catalizada por la enzima UDP-glucuronil-transferasa (UDPG), que se localiza principalmente en el retículo endoplásmico liso, y forma di-glucurónido de bilirrubina.

Como tal, éste es más soluble en agua, y es transportado en contra de gradiente de concentración por un mecanismo de transporte activo conocido como proteína-2 de resistencia multidrogas (MRP-2), hacia los canalículos biliares.

Una pequeña cantidad de glucurónido de bilirrubina pasa como tal a la sangre, donde se une a la albúmina con menor afinidad que la bilirrubina libre. El resto, la mayor parte, pasa a los ductos biliares y posteriormente al intestino: Figura 13.

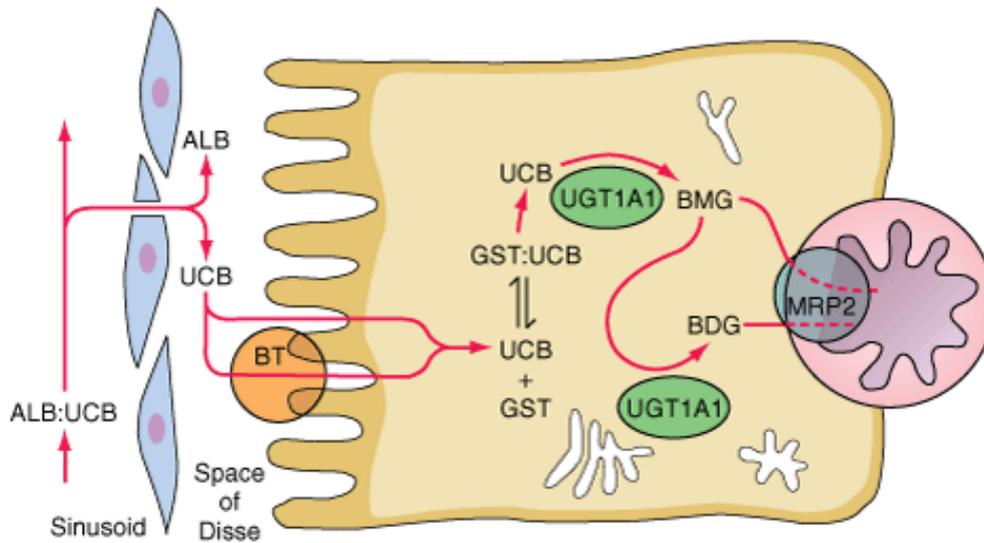


Figura 13. Manejo de la bilirrubina por el hepatocito. La Albúmina (ALB) unida a la bilirrubina unida a proteína (B) entra al espacio de Disse, adyacente a la membrana basolateral del hepatocito, y la bilirrubina disociada (UCB) es transportada selectivamente al citosol. Allí se conjuga con el ácido glucurónico, Una vez conjugada es secretada a la bilis vía la proteína de resistencia a multidrogas 2 (MRP-2). Tomado de: Fauci A.S. et al, *Harrison's Internal Medicine*, 17th ed.

La mucosa intestinal es relativamente impermeable a la bilirrubina conjugada, pero es permeable a la bilirrubina no conjugada y a los urobilinógenos, una serie de derivados incoloros de la bilirrubina, formados por la acción de las bacterias en el intestino.

Consecuentemente, algunos de los pigmentos biliares y del urobilinógeno se reabsorben a la circulación portal, y son de nuevo excretados por el hígado, como ya se anotó arriba. Un pequeño remanente de urobilinógenos permanece en la circulación, y es filtrado y excretado en la orina.

Respecto a la inactivación de sustancias tóxicas, el hígado es crítico para el manejo del amonio en el cuerpo.

Los niveles de amonio deben permanecer dentro de un estrecho margen, ya que son extremadamente tóxicos para el sistema nervioso central, cuya barrera hemato-encefálica es libremente permeable al amonio.

El hígado es el único órgano en el que se expresa el ciclo metabólico de la urea completo (Conocido como ciclo de Krebs-Henseleit).

Este ciclo convierte el amonio en urea, que luego es excretada en la orina, figura 14.

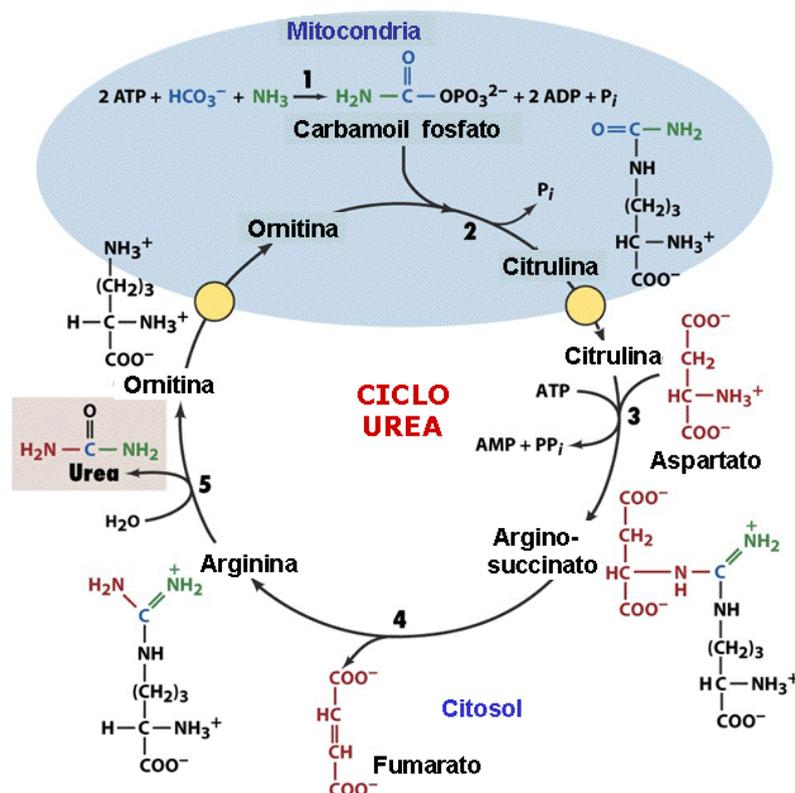


Figura 14. Ciclo de Krebs-Henseleit, o Ciclo de la Urea. Este ciclo ocurre en la mitocondria y en el citosol del hepatocito.

El amonio en la circulación proviene principalmente del colon y del riñón, con una pequeña contribución proveniente de la destrucción fisiológica eritrocitaria y del metabolismo muscular. Conforme pasa por el hígado, la mayor parte del amonio es capturado por los hepatocitos. Allí, en la mitocondrias, es convertido a carbamoilfosfato, que a su vez reacciona con la ornitina para generar citrulina. Una serie de reacciones citoplásmicas eventualmente produce arginina, que puede ser deshidratada a urea y ornitina. Ésta regresa a la mitocondria para otro ciclo, y la urea, como molécula pequeña, difunde a la sangre en el sinusoides, pasa a la circulación y luego es filtrada en los riñones y eliminada en la orina.

En lo relativo a la síntesis de proteínas del plasma, se resumen en la Tabla 1. La albúmina es cuantitativamente la más significativa, y es la responsable de la mayor parte de la presión oncótica del plasma. Muchos de los productos son los llamados proteínas de fase aguda, las que se sintetizan y secretan al plasma cuando ocurre algún estímulo estresante. Otras son proteínas transportadoras, ya sea de esteroides o de otras hormonas en el plasma, y otras son los factores de la coagulación. Cuando ocurren pérdidas, el hígado es capaz de reponerlas en semanas o meses. La única clase mayor de proteínas que no se sintetiza en el hígado es la de las Inmunoglobulinas. En la subsección I.1.2., más adelante, se extiende la exposición sobre las proteínas transportadoras de factores de crecimiento, específicamente IGF-1.

I.2. FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA TIPO 1 (IGF-1).

I.2.1. Estructura, expresión génica y regulación.

El factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1, *Insulin-like growth factor-1*) en el humano es una hormona polipeptídica de 71 aminoácidos, con peso molecular de ~7,6 KDa, y con efectos endocrinos, paracrinos y autocrinos. Comparte más de 60% de homología con IGF-2 y por lo menos 50% con la estructura de la proinsulina (Le Roith D., 1997). La estructura secundaria general de IGF-1 humana se muestra en la Figura 15 (Wolf E. et al, 1996)

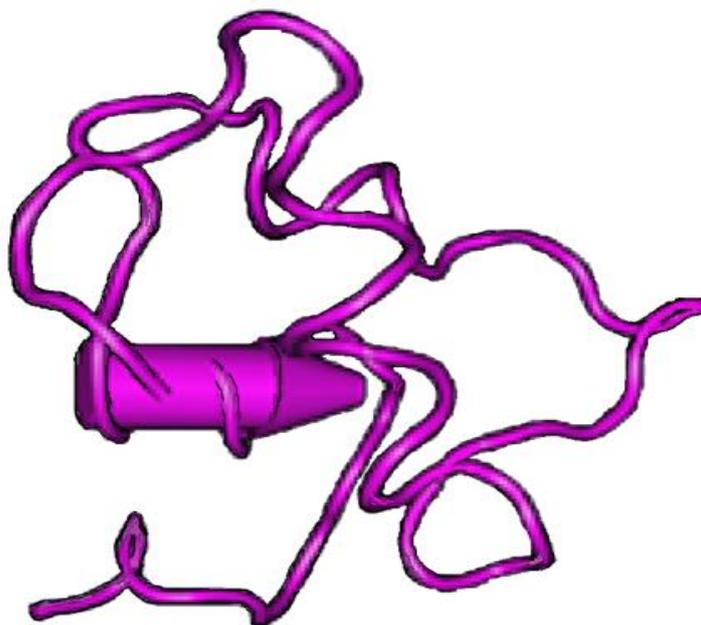


Figura 15. Estructura secundaria general de la hormona IGF-1, obtenida mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR), en solución.

Recientemente, se han publicado imágenes que ofrecen la posibilidad de ser vistas en tres dimensiones y en todos los ángulos posibles, mediante el programa MMDB (Brzozowski A.M. et al, 2002; Madej T. et al, 2012), algunos ejemplos se muestran en la Figura 16.

El gen que codifica para la síntesis de IGF-1 es único, y se localiza en el brazo largo del cromosoma 12, con al menos 5 exones. El gen humano está identificado como **IGF-1 [Homo sapiens]** GenBank: CAA01954.1, el mRNA tiene el número de acceso A29117, con longitud de 216 pares de bases (bp), y corresponde a la patente GB2241703, PAT 15-JUN-1995.

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).

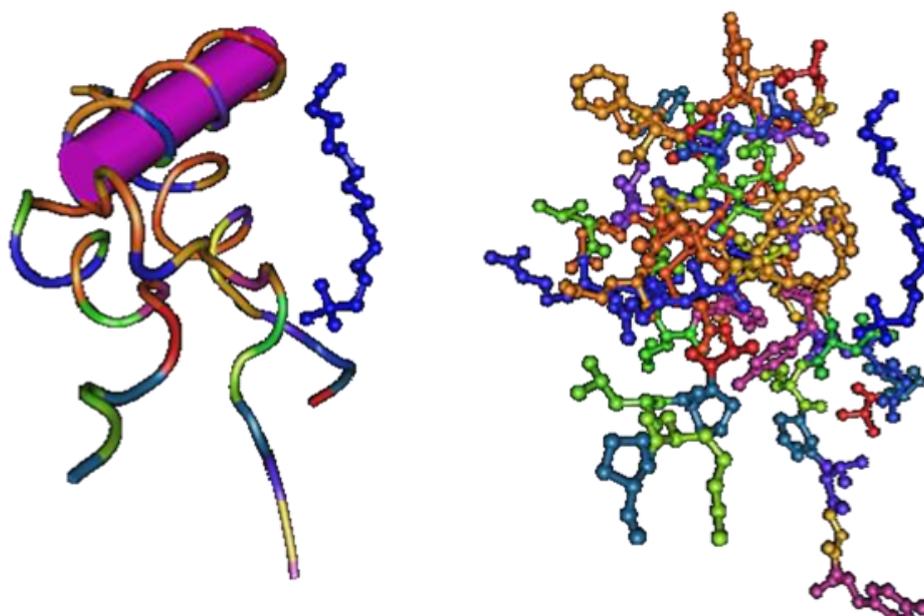


Figura 16. Estructura de IGF-1, según lo descrito por Brzozowski AM y colaboradores. A la izquierda se muestra la imagen de estructura secundaria con los residuos de AA correspondientes, a la derecha se muestra la misma estructura en forma de “tubos y bolas”. Ambas son manipulables mediante el programa MMDB para observar su estructura en 3D.

El gen codifica dos precursores distintos de IGF-1, que se denominan IGF-1a e IGF-1b, mediante dos mRNA con regiones 3' distintas (originados en exones distintos) de tal forma que los péptidos aminoterminales de ambos precursores resultantes son idénticos, mientras que 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).

En 1957, Salmon y Daughaday (Salmon W.D. Jr y Daughaday W.H., 1957) describieron el IGF-1 por primera vez, después de haber observado que la simple adición *in vitro* de la hormona del crecimiento (GH, *growth hormone*) a un cultivo de cartílago costal procedente de ratas hipofisectomizadas no fue suficiente para estimular su crecimiento (medido mediante la incorporación de sulfato radioactivo). Igual resultado se tuvo cuando usaron el suero procedente de estas mismas ratas como inductor de crecimiento. Por el contrario, cuando emplearon suero de ratas normales, éste sí estimulaba la incorporación *in vitro* de sulfato en el cartílago costal de las ratas hipofisectomizadas. Estos resultados demostraron la existencia de un “factor sulfatante” (nombre que se le dio entonces a este factor) que estimulaba la incorporación de ³⁵Sulfato.

Al mismo tiempo, Froesch E.R. y colaboradores describieron la actividad “semejante a la insulina” de dos moléculas aisladas en el plasma (NSILA I y II, *non-suppressible insulin-like activity*) que demostraron la capacidad de

favorecer que adipocitos aislados de rata incorporaran glucosa del suero en que se suspendieron. Esta capacidad se definió como “*insulin-like*”, y demostró ser independiente de la insulina, dado que los anticuerpos anti-insulina no eran capaces de evitar el descenso de la concentración de glucosa en el suero en el que se suspendieron los adipocitos (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 y colaboradores descubrieron que los factores sulfatantes 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 y 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, debido a 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), ambas moléculas cumplen con los criterios que caracterizan a 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).

Una vez que se llegó al consenso sobre su nomenclatura (Daughaday W.H. *et al*, 1987), y se describieron sus secuencias aminoacídicas (y nucleotídicas), fue posible hacer las síntesis recombinante (Klapper D.G. *et al*, 1983), esto ha abierto muchísimos nuevos caminos de investigación, como el que ahora nos ocupa.

Entre las acciones desempeñadas por IGF-1 están: crecimiento tisular y desarrollo, actividad semejante a la insulina, acción proliferativa/anabolizante,

acción anti-apoptótica, acción anti-envejecimiento y acción anti-oxidante, entre otras.

Como sucede con otras hormonas con un amplio rango de funciones fisiológicas, las concentraciones de IGF-1 deben estar estrictamente controladas, y esto se ha comprobado en estudios *in vivo*:

1. Hasta 10 formas de proteínas de unión a IGF-1 de alta afinidad (IGFBP-1 a IGFBP-6 son las más citadas, recientemente se han descrito otras cuatro), que participan tanto en promover como en inhibir las acciones de IGF-1, controlando de este modo su biodisponibilidad, (Hwa V. *et al*, 1999).
2. Nueve proteínas de unión relacionadas a IGF-1 de baja afinidad (de IGFBP-rP1 a IGFBP-rP9) (Hwa V. *et al*, 1999).
3. Una lista cada vez más larga de proteasas de IGFBPs, (Bunn R.C. y Fowlkes J.L., 2003).
4. Variaciones alélicas, (Barton E.R., 2006).
5. *Splicing* alternativo, etc. (Rotwein P. *et al*, 1993).
6. Otros mecanismos de regulación periférica (Reindl K.M. *et al*, 2012).

Éstos son algunos de los mecanismos por los que IGF-1 es mantenido dentro de un estrecho rango fisiológico, que va declinando a lo largo de la vida (Clemmons D.R., 1998), Figura 17.

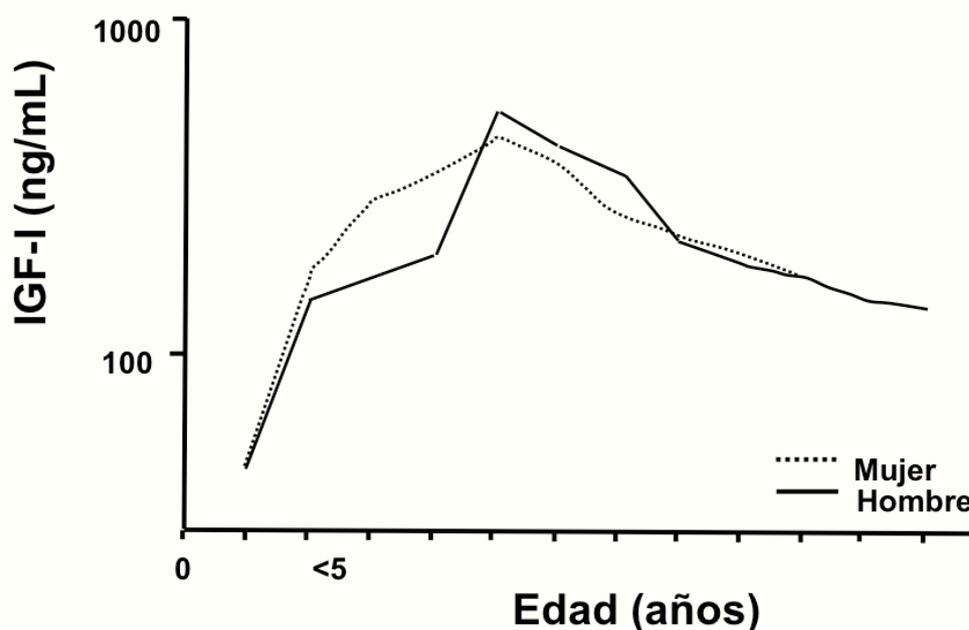


Figura 17. Evolución de las concentraciones plasmáticas de IGF-1 con la edad.

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 18.

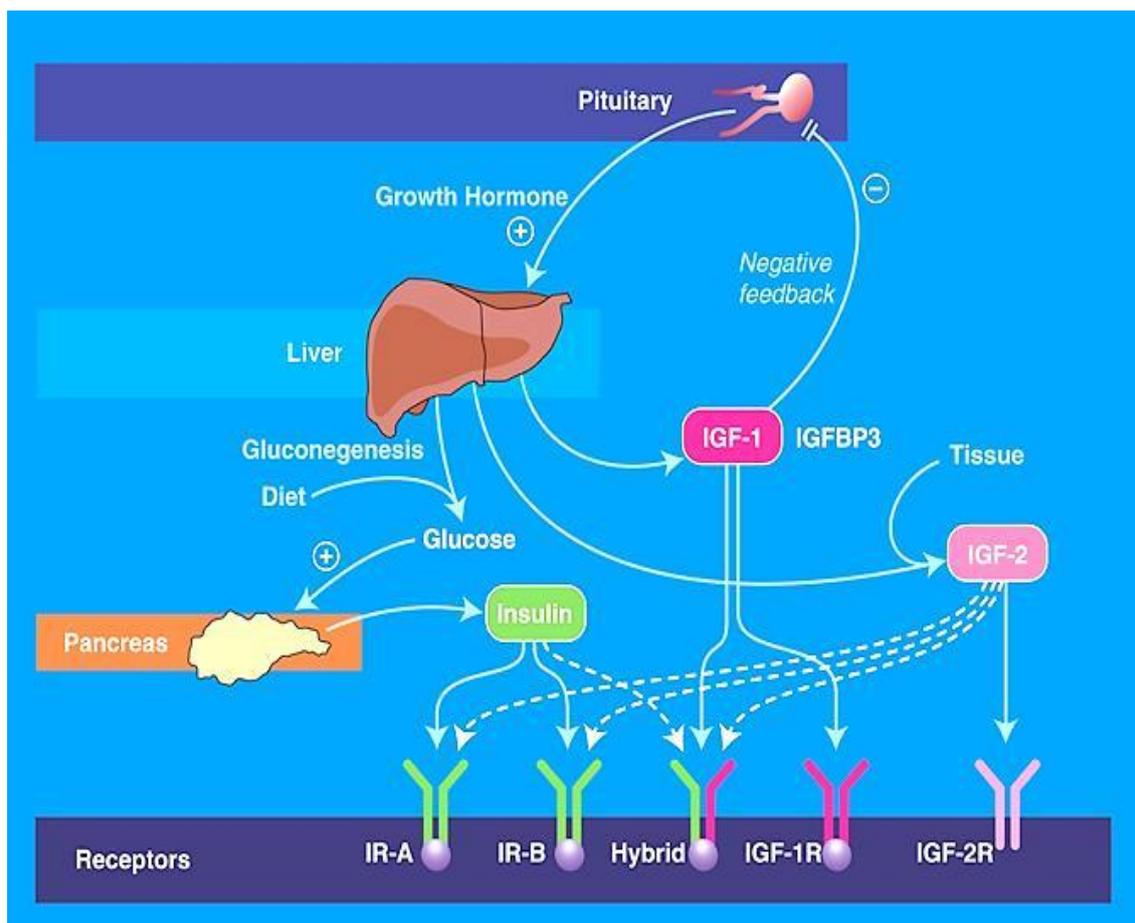


Figura 18. Eje GH/IGF-1 y algunos de sus órganos diana y receptores conocidos.

I.2.2. 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 a 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 prácticamente en 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 19.

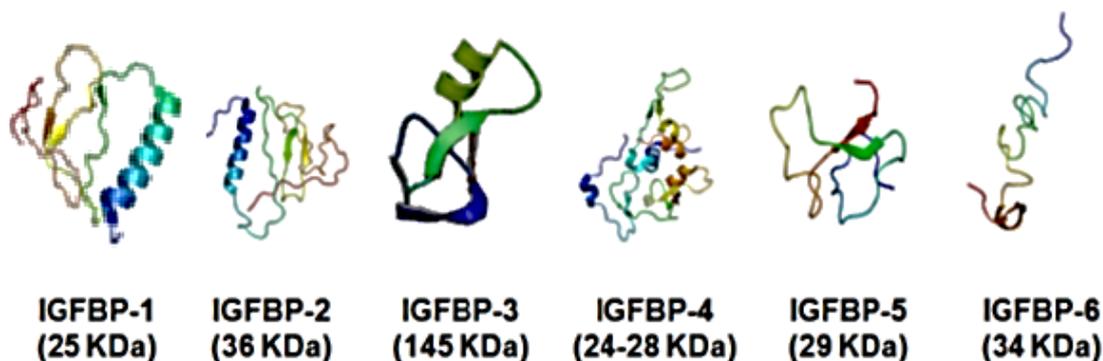


Figura 19. Las seis proteínas principales de unión a IGF-1 (IGFBPs) de alta afinidad. Además de las ilustradas se han descrito al menos otras cuatro.

De éstas, IGFBP-3 es la proteína de unión más importante, la de mayor afinidad y también mayor concentración plasmática (Langford K.S. *et al*, 1993; Baxter R.C., 1994). Forma un complejo ternario con una glicoproteína (ALS, *Acid-labile subunit*) que le da estabilidad, y actúa como reservorio de IGF-1, prolongando la vida media de éste en la circulación (Clemmons D.R. *et al*, 1992; Thissen J.P. *et al*, 1994; Smith W.J. *et al*, 1995), reduce la velocidad de depuración y mantiene una concentración plasmática total superior a la de la insulina. Es decir, modula la acción de IGF a nivel tisular, al impedir su acceso a los receptores, con lo que se inhibiría el crecimiento y sus efectos anabólicos

relacionados, o al facilitar el crecimiento a través de aumentar su interacción con los receptores (Clemmons D.R. *et al*, 1992). Sin embargo, esto no explica totalmente por qué debería existir toda una familia de formas diferentes de las IGFbps, y podría ser que la distinta afinidad de los IGFs para las diversas IGFbps constituya un nivel adicional en el complejo control de cómo se ejerce el efecto de los IGFs en los diferentes órganos y tejidos (Duan C. *et al*, 2005).

Otras IGFbps directamente relacionadas con la función de las IGFs son las formas IGFBP-4 e IGFBP-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 a 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, la angiogénesis, la apoptosis (Inoguchi T. *et al*, 1986; Hwa V. *et al*, 1999; Gommans W.M. *et al*, 2008), hasta la regulación de la memoria vía neuronas hipocámpales (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, cuando esta proteína se hiperexpresa, se aprecian acúmulos de matriz extracelular, que en los diferentes órganos pueden manifestarse como fibrosis hepática, renal ó pulmonar (Oemar B.S. y Luscher T.F., 1997), mientras que cuando esta proteína es deficiente o ausente, se observan 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 β , angiotensina II, aldosterona, glucocorticoides y VEGF, entre otros. Un esquema de estas interacciones es representado en las Figuras 20 y 21.

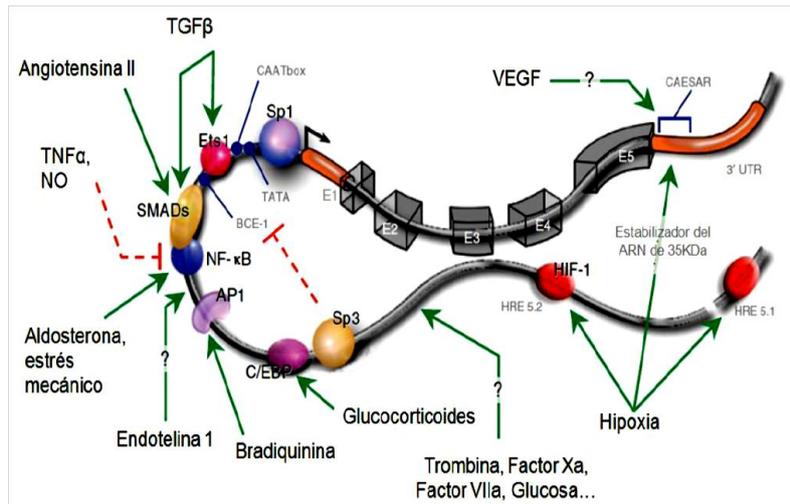


Figura 20. Regulación del promotor del gen de la IGFBP-8 (CTGF) (adaptado de Oliver N. et al, 2010).

Finalmente, esta proteína tiene interacción con una gran variedad de moléculas implicadas en el remodelado de matriz extracelular (TGF-β1, TGF-β2 y fibronectina), permeabilidad vascular y angiogénesis (VEGF), adhesión celular y migración (integrinas), entre otras (Oliver N. et al, 2010).

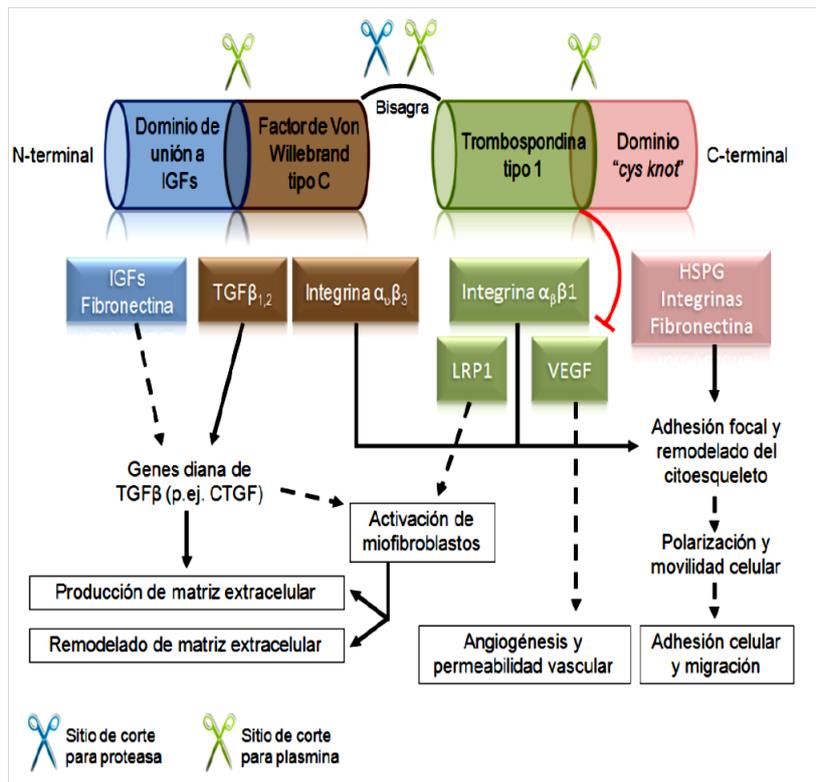


Figura 21. Dominios estructurales de CTGF (IGFBP8) y su potencial papel en la modulación y coordinación de señales relacionadas con el remodelado de la matriz extracelular, la angiogénesis y permeabilidad vascular, la adhesión y migración celular. (HSPG, heparan sulfate proteoglycan; LRP1, lipoprotein receptor-related).

I.2.3. 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: un receptor tipo tirosin-kinasa (Tk) que es de los activadores naturales más potentes de la ruta de Akt, implicando entre otros a las rutas de: mTOR, MAPK, GSK3 β , 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 β - α de cada uno de ellos), cuyos niveles en los distintos tejidos presentan grandes diferencias (Soos M.A. *et al*, 1993; Baillyes 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 aún a un tercer tipo de receptor, híbrido entre el IGF-1R y el IR, dado que comparte una cadena β - α de cada uno de ellos; esto se esquematiza en la Figura 22.

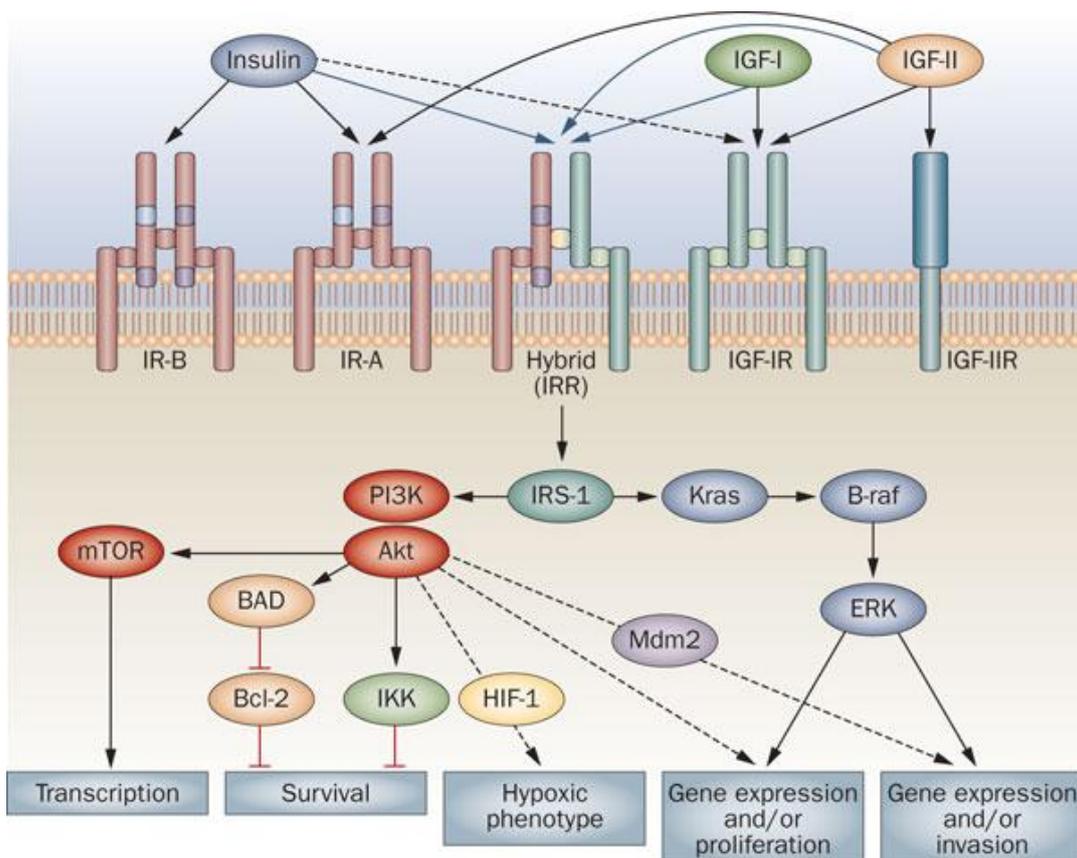


Figura 22. Esquema de los receptores de IGFs e insulina y sus afinidades cruzadas.

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 subraya el concepto de que la especificidad de acción de estos receptores está 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 α , extracelular, es donde se encuentra el dominio de unión a IGF-1. La subunidad β 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 84% de similaridad aminoacídica. La activación inducida por ligando ocurre vía trans- o autofosforilación intramolecular entre las subunidades β . Los dominios yuxtamembrana (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 “corriente 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-kinasa de clase 1a (PI3-Kinasa) vía los dominios SH2 de la proteína adaptadora p85, permitiendo de este modo la síntesis de la PtdIns(3,4,5)P₃. Esta proteína, eventualmente, capta y activa las kinasas fosfatidilinositol-dependientes (PDKs), las que a su vez fosforilan y activan otras proteínas-kinasa incluyendo la proteín-kinasa B (PKB), la p70rsk y la proteína kinasa C ζ (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, la síntesis proteica y la mitogénesis, así como la 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-nucleótido-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 IGFR1-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 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).

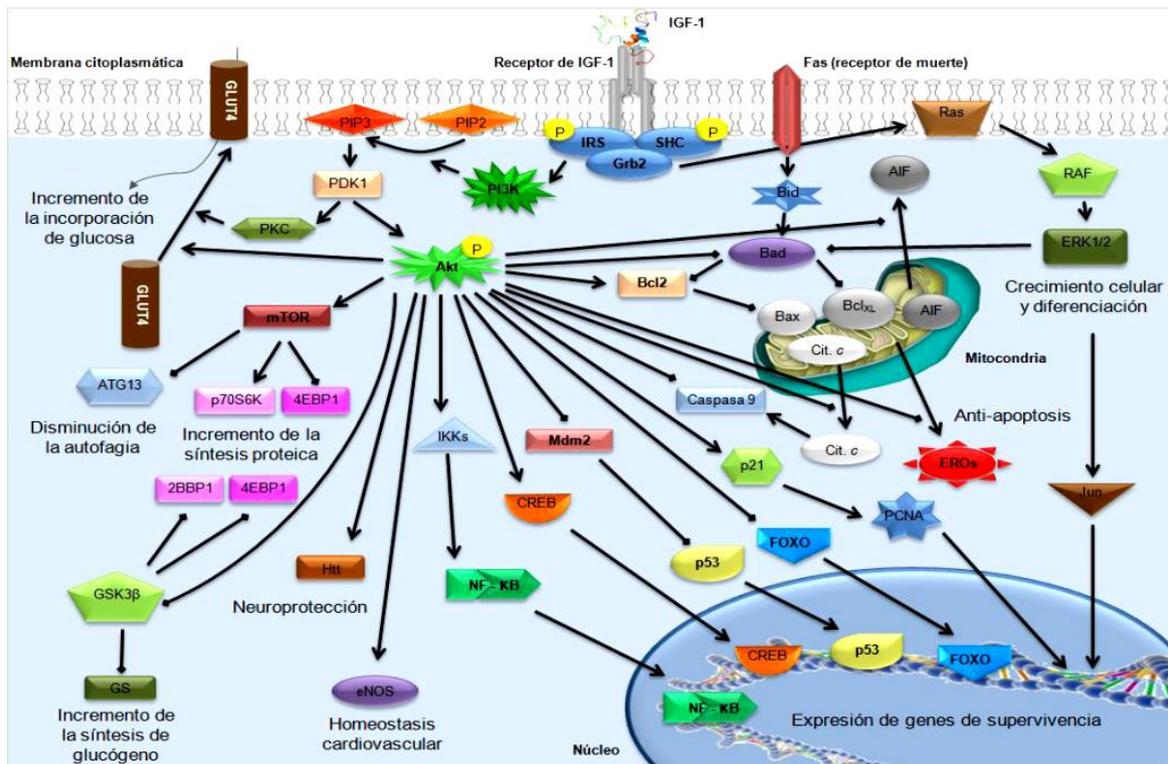


Figura 23. Vías de señalización intracelulares de IGF-1. (Adaptado de SABiosciences:Biologend http://www.biologend.com/pop_pathway.php?id=21 y Kulik G. et al, 1997).

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 fosforiladas 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 23, arriba.

I.2.4. 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 paracrinos (D’Ercole A.J. et al, 1980). En hipófisis y en hígado se han descrito mecanismos de “feedback” negativo similares a los de otras glándulas endocrinas, donde, como se aprecia en la Figura 3, 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 puede 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.

1.2.4.1. 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 post-natalmente (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 todavía pobremente descrito (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 que suceda el crecimiento intrauterino normal, un descubrimiento apoyado por la evidencia de que la deficiencia o insensibilidad a GH no se asoció a reducción significativa de la 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).

1.2.4.2. Otras funciones

1.2.4.2.1. 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 de 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 y 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 ha sido bien documentado (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+CD8+ inmaduras en timo y bazo de ratas (Hinton P.S. *et al*, 1998), promoviendo la supervivencia, la proliferación, la quimiotaxis y la maduración de las células T (Walsh P.T. *et al*, 2002), y bloqueando la apoptosis, 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 es capaz de 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 objetivo potencial 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 la inflamación activa (Smith T.J. *et al*, 2010).

I.2.4.2.2. 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 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., 1996). 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 diferencian 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 se publicó que el IGF-1 sistémico podía cruzar la barrera hematoencefálica (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., 1994).

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).

Recientemente, el 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 β -amiloide cerebral (Carro E. *et al*, 2002) y sus potenciales implicaciones en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, merece la pena adelantar que no existe 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 α* , *basic Fibroblast Growth Factor*, etc) (Hynes M.A. *et al*, 1987; Chernausek S.D., 1993; Pons S. *et al* 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.

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 y de la mielinización. Un experimento complementario (Behringer R.R. *et al*, 1990; Carson M.J. *et al*, 1993) 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 escasez de la materia blanca debido a marcada reducción de la mielinización (Ye P. *et al*, 2002) y aparente disminución en el número de axones (Beck K.D. *et al*, 1995).

I.2.4.2.3. 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 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 mediado 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 sugiere que niveles insuficientes de IGF-1 podrían desempeñar un papel en las enfermedades vasculares como la arteriosclerosis y re-estenosis (Delafontaine P. *et al*, 2004).

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.2.4.2.4. 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:

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 en los 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 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. 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 mecanismos que subyacen al 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).

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 evidencias que apuntan a factores producidos localmente como importantes reguladores 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. 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 conoció 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 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 menor número y menor tamaño de lo normal de células de Leydig. 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 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 esteroideogénicas 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 en ratones deficientes de IGF-1 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 esteroideogénesis y espermatogénesis normal) (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 importante contribución endocrina de su forma circulante.

I.2.4.2.5. Desarrollo y función renales.

Ciertas evidencias apoyan la función del eje GH/IGF-1 en el desarrollo y función renales normales. 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-1 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 para IGF-1 un posible papel 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 (Mulroney 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 comprobarse 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.2.4.2.6. 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.3. CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE IGF-1.

I.3.1. 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.3.2. 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, figura 24.

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 fisiopato-lógicos 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 como tratamiento sustitutivo. Esta condición de deficiencia de IGF-1 destaca el papel fundamental de IGF-1 en el desarrollo y función cerebrales.

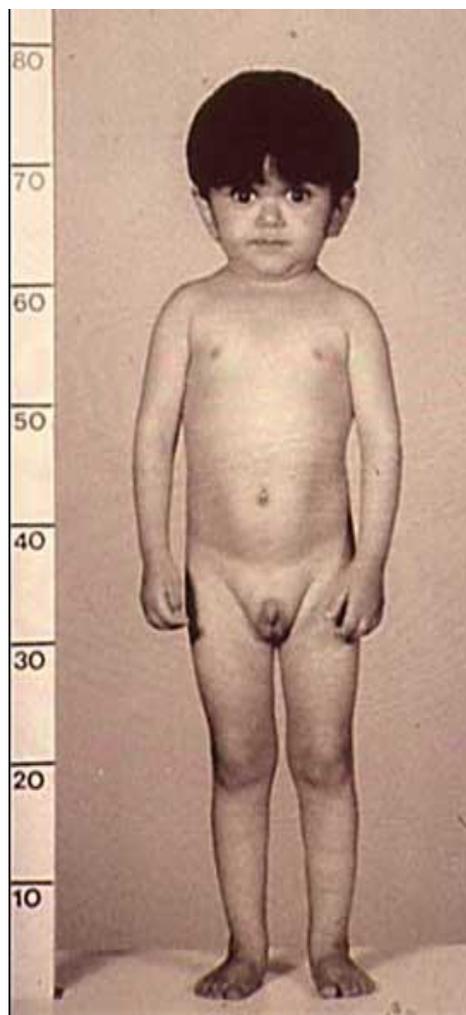


Figura 24. *Paciente con Síndrome de Laron.*

I.3.3. 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), figura 25.

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 la 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-Cortázar I. *et al*, 1997b; Castilla-Cortázar I. *et al*, 1999; Pascual M. *et al*, 2000) incluyendo animales con cirrosis descompensada y ascitis (Castilla-Cortázar I. *et al*, 2004b), mejorando el metabolismo de la glucosa (Castilla-Cortázar 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-Cortázar I. *et al*, 2000 y 2004a), recuperando el tono somatostatinérgico (Castilla-Cortázar 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-Cortázar I. *et al*, 1997a; Muguerza 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 (Muguerza B. *et al*, 2001; Mirpuri E. *et al*, 2002; Garcia-Fernandez M. *et al*, 2005; Pérez R. *et al*, 2008; Tutau F. *et al*, 2009).

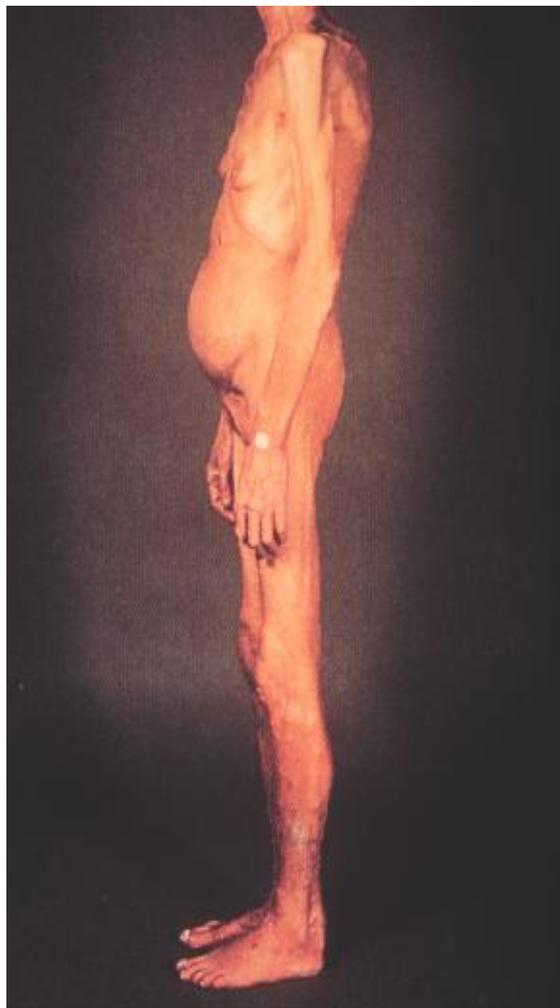


Figura 25. *Paciente con Cirrosis hepática ascítica y grave desnutrición.*

I.3.4. 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 haya 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 G1 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.4. Daño oxidativo celular y enfermedad hepática crónica).

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.

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 (García-Fernández 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) (García-Fernández 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; Vasani 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 quinasa-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.

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

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 β -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 neuropatológica 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 β , 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 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 (Kerckhoff 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 colaboradores publicaron (Lopez-Lopez C. *et al*, 2004) 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 α y su efector VEGF.

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 β -catenina, en la interrelación existente entre los receptores de estrógenos y de IGF-1 en las células neuronales (Garcia-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; Fernandez A.M. y Torres-Aleman I., 2012; Muller 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).

1.3.4.2. 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., 2022). 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 cardíaca 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 Ca²⁺, 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 α 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- α) (Jeschke M.G. *et al*, 2000) como la actividad de eNOS (Cittadini A. *et al*, 2009).

1.3.4.3. 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 IGF-BPs. 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 IGF-BP-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-Cortázar 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; Gómez 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 (Unden 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 (Schinik-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.3.5. Otras condiciones de deficiencia de IGF-1.

I.3.5.1. 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 bajo 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).

1.3.5.2. 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.4. DAÑO OXIDATIVO CELULAR, INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD CRÓNICA.

I.4.1. 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 O₂ 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 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.4.2. Mecanismos del daño oxidativo avocados 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 ($O_2^{\bullet-}$) (a nivel de la NADH deshidrogenasa o de la coenzima Q) que se pueden convertir en hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el altamente reactivo anión hidróxilo (HO^{\bullet}).

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).

- $O_2 + e^- + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$ (radical hidroperoxilo)
- $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ (radical superóxido)
- $O_2^{\bullet-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ (peróxido de hidrógeno)
- $H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + HO^{\bullet}$ (radical hidroxilo)

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 ERO's 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 26.

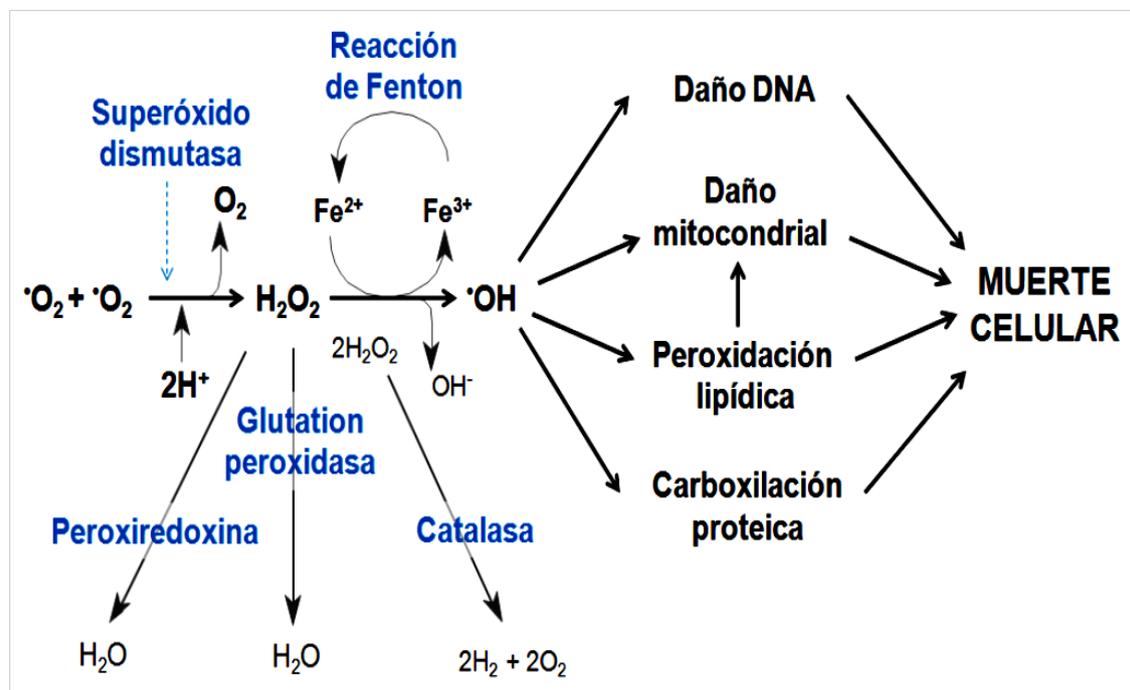


Figura 26. Mecanismos celulares del daño oxidativo que promueven la muerte celular. Principales enzimas antioxidantes.

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 27.

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

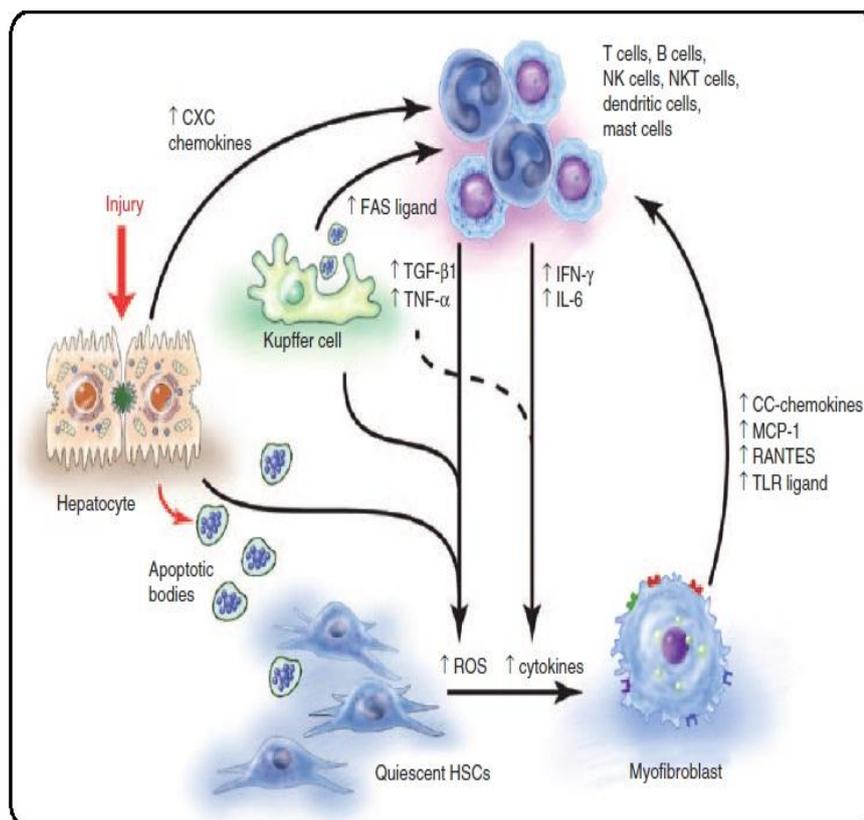


Figura 27. El hepatocito dañado libera cuerpos apoptóticos que son ingeridos por las células Kupffer residentes y las células hepáticas estrelladas o células de Ito quiescentes, éstas sufren activación y se convierten en miofibroblastos. La estimulación paracrina por las especies reactivas de oxígeno (EROs), quimosina y citosinas también promueve la activación de las células estrelladas. Esto estimula a su vez a las células inflamatorias que aumentan la cascada de lesión. Tomado de: Balian A., 2011.

Además de las enzimas anti-oxidantes previamente descritas un número importante de enzimas pro-oxidantes median procesos oxidativos (Tabla 5).

Tabla 5. Enzimas que intervienen en los procesos oxidativos		
ENZIMA		FUNCIÓN
Mieloperoxidasa (MPO) EC 1.11.2.2		Presente en los fagosomas de neutrófilos y monocitos. Es responsable de la actividad microbicida.
Peroxidasas EC 1.11.1.1.7	Lactoperoxidasa (LPO)	Oxireductasa secretada por diversas glándulas, su principal función es antibacteriana.
	Eosinofilperoxidasa (EPX)	Presente en los eosinófilos, su capacidad oxidante es empleada para combatir parásitos.
	Peroxidasa vascular 1 (PXDN)	Cataliza la formación de peróxido de hidrógeno. Activa en la consolidación de la matriz extracelular, la fagocitosis y la función inmunitaria.
Monoamino-oxidasas (MAO) EC 1.4.3.4		Catalizan la oxidación de monoaminas, y la degradación de neurotransmisores como serotonina y noradrenalina. Se encuentran unidas a la membrana interna de la mitocondria en la mayoría de las células del organismo.
Xantina deshidrogenasa (XDH) EC 1.17.3.2		Oxireductasa de xantina que produce especies reactivas del Oxígeno (H ₂ O ₂) al catalizar la oxidación de hipoxantina a xantina y de esta al ácido úrico.

Tabla 5. 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 plegamiento.

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- κ B (Barnes P.J. y Karin M., 1997). Tras aparecer el estrés oxidativo, NF- κ 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 28, en la página siguiente.

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).

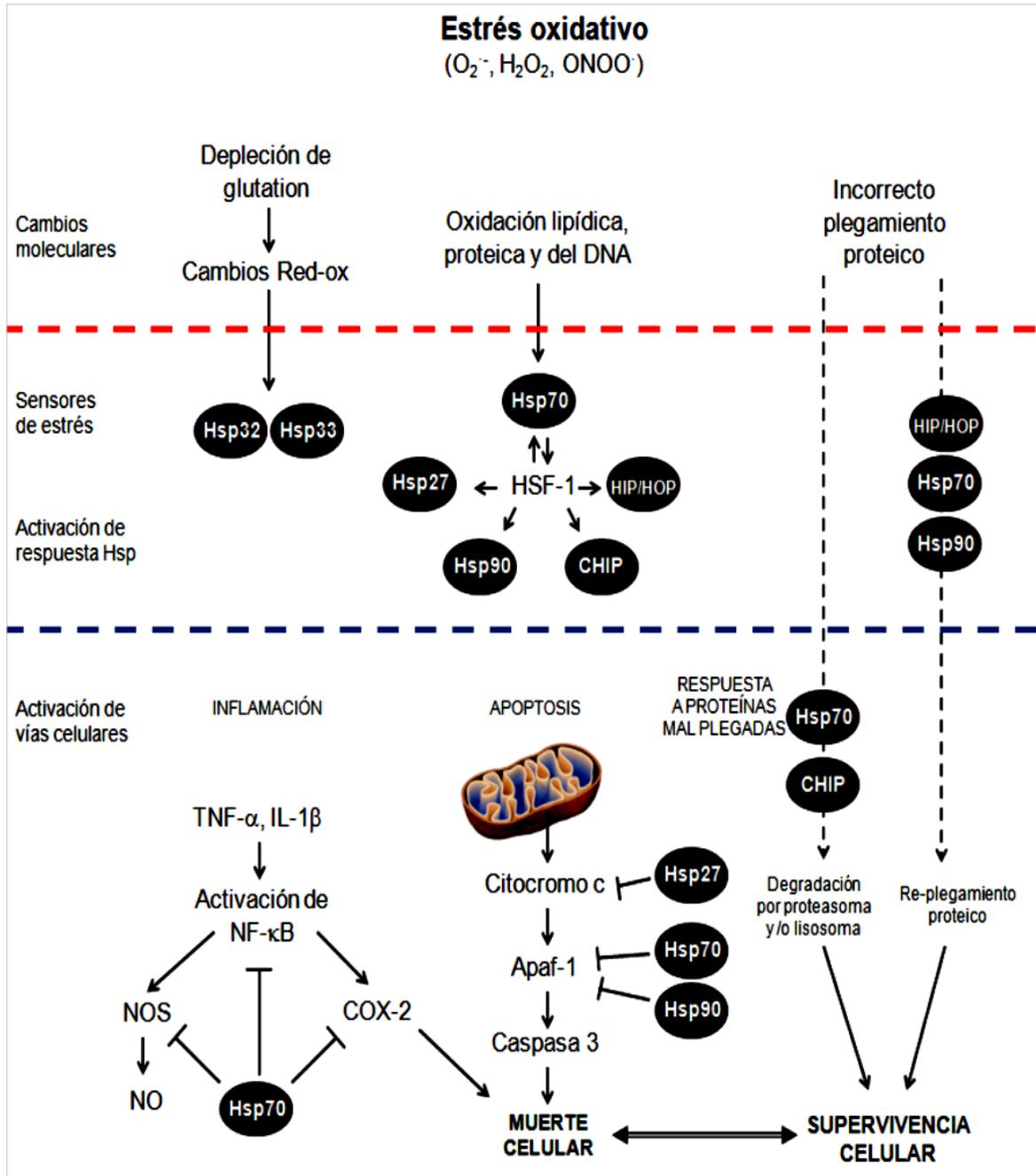


Figura 28. Papel citoprotector de la respuesta mediada por las HSPs. En el panel superior se resumen las acciones a nivel molecular; en el panel medio se muestran los elementos de la respuesta al choque por calor en relación a las vías de señalización celular activadas bajo condiciones de estrés oxidativo, algunas HSP, como HSP33, y HO-1 actúan como sensores moleculares de estrés oxidativo, mientras que otras tienen blancos moleculares corriente abajo en las vías de activación de inflamación o apoptosis; en el panel inferior se muestran los eventos celulares que ocurren como resultado de la activación de este sistema. Modificado de Kalmar B. y Greensmith L., 2009.

II. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. ANTECEDENTES.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado 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:

- Mejoría del balance nitrogenado (Picardi A. *et al.*, 1997);
- Incremento de la absorción intestinal de azúcares y aminoácidos (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 1999; Pascual M. *et al.*, 2000);
- Recuperación de la osteopenia (Cemborain A. *et al.*, 1998) y de la atrofia testicular, así como de la barrera hematotesticular (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 2000 y 2004);
- Restablecimiento del tono somatostatinérgico (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 2001);
- Además de inducir un efecto hepatoprotector (Castilla-Cortázar I. *et al.*, 1997) y antifibrogénico (Muguerza B. *et al.*, 2001), con recuperación de la disfunción mitocondrial (Perez R. *et al.*, 2008).

Así mismo, estudios posteriores demostraron que dosis similares de IGF-1, en ratas de edad avanzada (otra condición de deficiencia de IGF-1) inducían efectos hepatoprotectores y neuroprotectores (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).

Por otra parte, la observación de las imágenes anatomopatológicas en estudios previos de cirrosis experimental, sugirió que la administración de IGF-1 podría estar induciendo efectos beneficiosos sobre la polaridad de los hepatocitos y en las uniones intercelulares, contribuyendo a la recuperación de la arquitectura hepatocelular normal (Tutau F. *et al.*, 2009): Figura 29. Además, estudios precedentes habían mostrado evidencias de que IGF-1 ejercía acciones sobre el citoesqueleto y la correcta posición de los transportadores en los enterocitos: cfr. Figura 30. Estos antecedentes promovieron nuestro interés por el estudio de acciones similares en los hepatocitos.

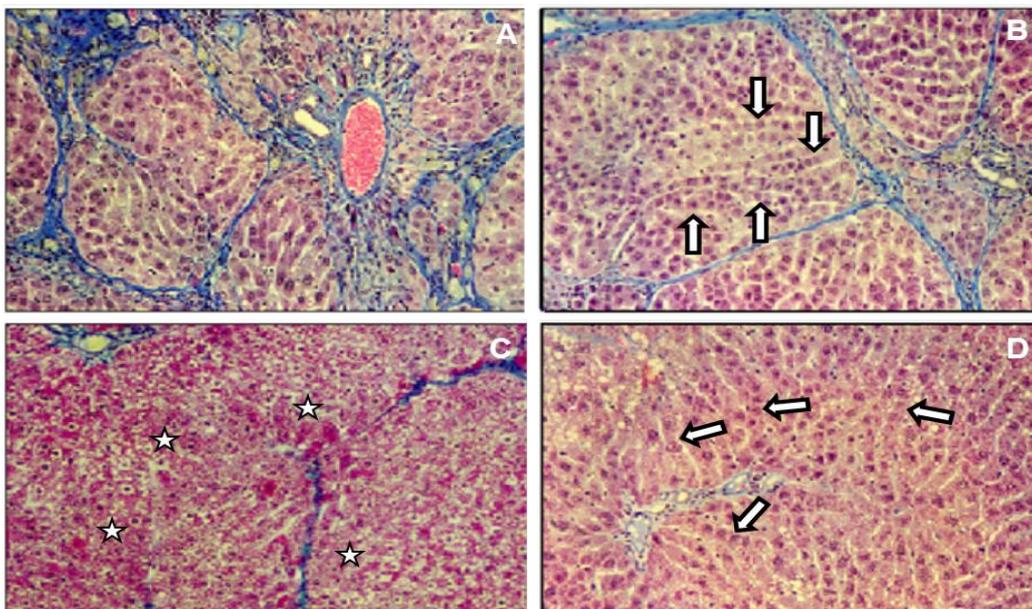


Figura 29. **A.** Anatomía patológica de hígado con cirrosis inducida por CCl_4 en rata Wistar macho, Tricrómico de Mason, 40x. **B.** Idem, sujetos tratados con dosis bajas de IGF-1 durante tres semanas, se aprecia la recuperación de los cordones hepáticos, se pueden apreciar bandas de fibrosis, aunque de menor intensidad, comparados con lo observado en A. **C.** Idem, tratados sólo con $\text{IFN}\alpha$, se aprecia importante disminución de la fibrosis tras tres semanas de tratamiento, asimismo, se aprecia desorganización de los elementos celulares hepáticos ✖. **D.** Idem tratados con $\text{IFN}\alpha$ y con dosis bajas de IGF-1, por tres semanas. Se aprecia importante disminución de la fibrosis, así como mejoría evidente en la arquitectura celular hepática, haciendo claramente distinguibles los cordones hepáticos \Rightarrow (Tutau F. et al, 2009).

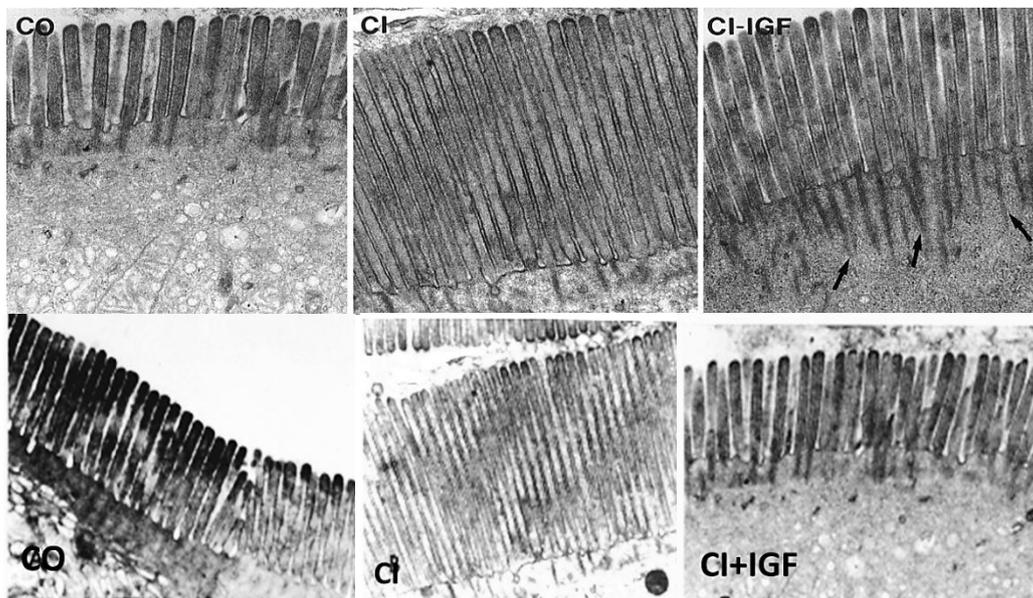


Figura 30. Arriba: Microfotografías, microscopía electrónica (16,000x) de microvilli yeyunales de ratas con cirrosis inducida por CCl_4 . Controles sanos (CO) a la izquierda, animales cirróticos que recibieron placebo (CI) al centro, y animales cirróticos que recibieron IGF-1 a dosis de $1\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso como bolo en 90 minutos (CI-IGF) a la derecha. En las ratas cirróticas no tratadas (CI) se observa marcada elongación de las microvilli. En las ratas tratadas (CI-IGF) se aprecia mayor densidad y prominencia de los haces de microfilamentos de actina (flechas) en la base de las microvilli, comparando contra los animales cirróticos no tratados (CI) (Castilla-Cortázar, I. et al, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276:G37-G42, 1999). Abajo: Microfotografías, microscopía electrónica (16,000x), preparación de anillos de yeyuno evertidos, ratas con cirrosis inducida por CCl_4 . Controles sanos (CO) a la izquierda, animales cirróticos que recibieron placebo (CI) al centro, y animales cirróticos que recibieron IGF-1 a dosis de $2\mu\text{g}/100\text{ g}$ peso/día, vía s.c. por 2 semanas, (CI-IGF) a la derecha. Se aprecia marcada elongación de microvilli en la preparación de animales no tratados (CI) al centro, mientras que del lado derecho, en animales tratados (CI+IGF) las microvilli se aprecian de tamaño normal (Castilla-Cortázar, I. et al, *Gastroenterology* 1997;113:1180–1187).

II.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

Con el fin de profundizar en los efectos beneficiosos inducidos por el tratamiento sustitutivo de IGF-1 en condiciones de deficiencia de esta hormona, 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, Puche E., 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 podría ser un factor causal relevante promoviendo una mayor vulnerabilidad del tejido

hepático al daño oxidativo y a la respuesta inflamatoria. La disminución de IGF-1 podría asimismo alterar la expresión hepática de genes implicados en la diferenciación de los hepatocitos en el desarrollo, y en la morfogénesis hepática (Duncan, 2000), contribuyendo a una inadecuada organización de la arquitectura hepática. Estos efectos podrían -quizá- ser normalizados por la administración exógena de IGF-1.

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

- Expresión hepática del gen *igf1* y su receptor, así como de otros genes relacionados con el eje GH-IGF-1.
- Expresión hepática de genes de proteínas del citoesqueleto y de genes involucrados en la formación de las uniones intercelulares.
- Expresión hepática de genes relacionados con el daño oxidativo y las defensas enzimáticas antioxidantes.
- Expresión hepática de genes pro- y anti-inflamatorios, y estado de posibles mecanismos hepatoprotectores mediados por las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSPs).
- Expresión hepática de genes relacionados con la fragmentación del DNA y la muerte celular (necrosis, apoptosis y autofagia).
- Expresión de genes que codifican para las principales proteínas de la matriz extracelular hepática.
- Estudio histológico convencional del hígado para el análisis de posibles alteraciones de la normal arquitectura hepática.
- Determinación de la concentración de malondiadehído en homogenizados hepáticos como marcador de estrés oxidativo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

III.1.1. Procedencia y generalidades.

Los animales de experimentación empleados en este estudio (*igf1^{tm1Arge}*) fueron donados por el Prof. Dr. Argiris Efstratiadis (Columbia University, New York, EE.UU.). En resumen, estos ratones genéticamente manipulados (*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 se realizaron 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* (CO, *Igf^{+/+}*), ~43 % de heterocigotos (Hz, *Igf^{+/-}*) y ~2 % de animales *knock out* (KO, *Igf^{-/-}*). Cfr Figura 31.



Figura 31. Ratones de los distintos fenotipos obtenidos en la colonia. CO: Control, Hz: heterocigotos. KO: Knock out.

Las condiciones de mantenimiento y la realización de los ensayos en los animales se desarrollaron 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 de Bioética de la Universidad CEU-San Pablo: temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 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 habitual (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 se utilizaron los siguientes cebadores y el programa de amplificación 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'.

Programa de amplificación		
Etapa	Tiempo min	Temperatura °C
Iniciación	6	94
Separación	1	94
Anillamiento	1	60
Alargamiento	1	72
Alargamiento final	7	72
Conservación	---	4

} X 30

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 25 semanas de edad, se distribuyeron en tres grupos homogéneos (cfr. Figura 32):

1. Grupo de controles ó *Wild type* (**CO**, *Igf+/+*, n=10), que recibieron subcutáneamente Succinato (vehículo) durante los diez días de tratamiento.
2. Grupo de ratones heterocigotos con deficiencia parcial en IGF-1 (**H_z**, *Igf+/-*, n=10), que recibieron Succinato (vehículo) por vía subcutánea durante diez días.
3. Grupo de animales heterocigotos deficientes en IGF-I (**H_z+IGF**, *Igf+/-*, n=10), a los que se administró, subcutáneamente, el tratamiento con rhIGF-1 (2 µg/100 g peso corporal y día, suspendido en el vehículo Succinato, en dos dosis), durante diez días.

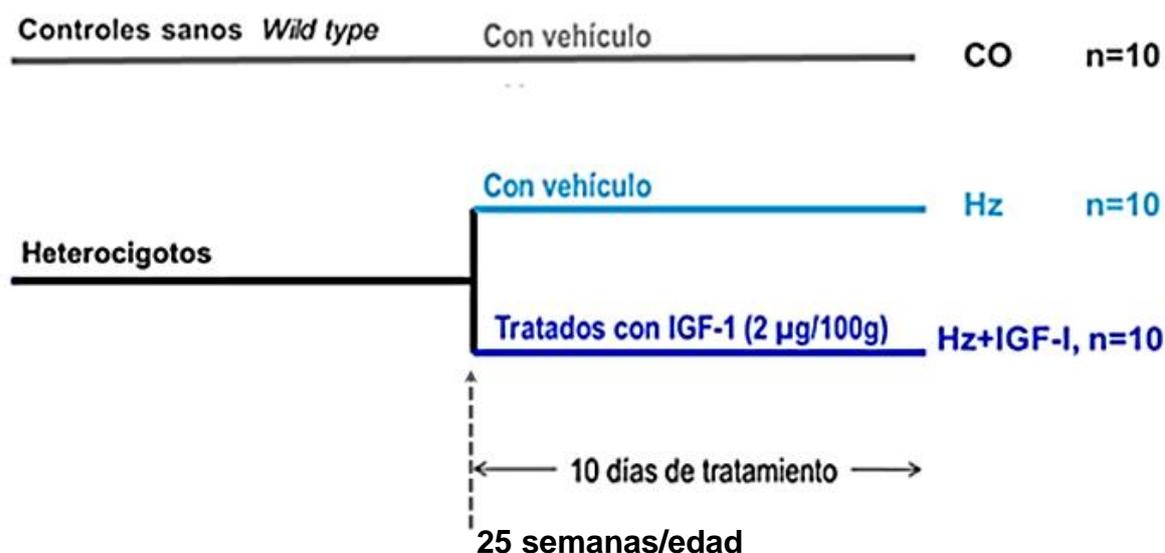


Figura 32. Diseño experimental.

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 comprado al laboratorio farmacéutico *Chiron Corporation* (EE.UU.) y suspendido 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, por vía subcutánea, 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) por vía subcutánea 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 μm (Millex-GS, España).

Al finalizar la intervención experimental (día 11), se llevó a cabo la determinación del peso corporal post-tratamiento en una balanza de precisión (Denver Instruments, 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 hígado fue cuidadosamente extraído y dividido en 3 porciones:

- a) Lóbulo izquierdo para RNA, inmerso en RNAlater (Qiagen-Izasa, España).
- b) Medio lóbulo derecho para proteínas, congelado a -80°C en criotubos tras la inmersión en N₂ líquido.
- c) Medio lóbulo derecho: para histología, fijado en paraformaldehído (PFA) 4% y posteriormente pasado a etanol 70% (para ser procesado e incluido en parafina).

III.3. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES CIRCULANTES 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™ Software* (Fisher Scientific, España) adaptado al equipo.

III.4. EXTRACCIÓN DE ARN Y TÉCNICAS DE EXPRESIÓN GÉNICA.

III.4.1. Extracción de ARN de tejido hepático y obtención de ADNc.

Entre 30-50 mg de tejido hepático 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 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 H₂O-DEPC hasta una concentración final de 15-20 ng/μL.

III.4.2. Análisis del transcriptoma mediante microarrays.

Las técnicas para la realización y análisis de los microarrays, 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 33.

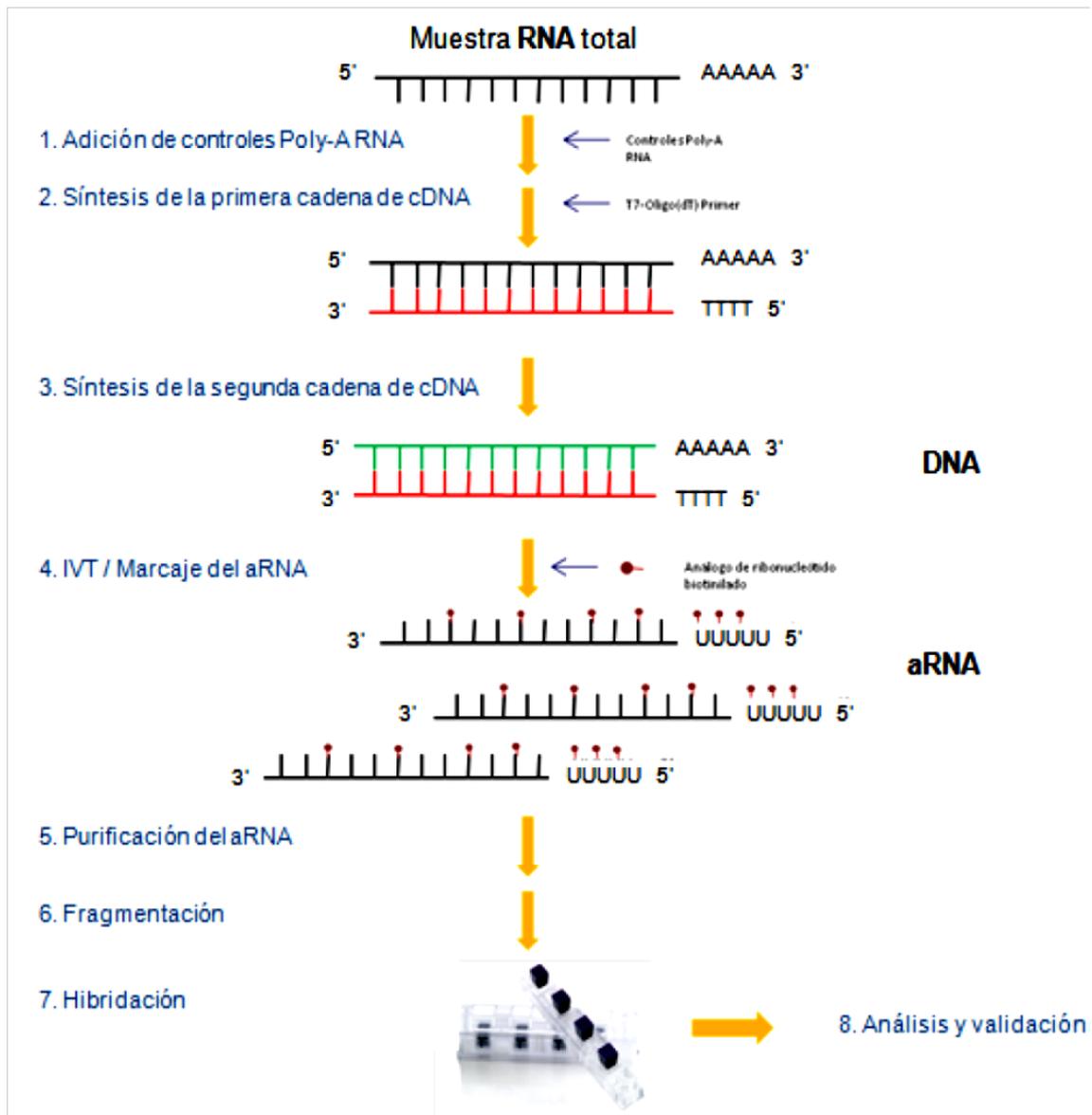


Figura 33. Análisis del transcriptoma mediante microarray.

III.4.3. 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-DesignSM; Applied Biosystems, España) para los siguientes genes:

SONDA	REFERENCIA	SONDA	REFERENCIA
<i>il10rb</i>	Mm00434157_m1	<i>tubb2a</i>	Mm00809562_s1
<i>saa1</i>	Mm00656927_g1	<i>vcl</i>	Mm00447745_m1
<i>cat</i>	Mm00437992_m1	<i>actb</i>	Mm00607939_s1
<i>ccl6</i>	Mm01963251_s1	<i>mark2</i>	Mm01220150_g1
<i>ccr5</i>	Mm01307326_m1	<i>stk11</i>	Mm00488470_m1
<i>gadd45a</i>	Mm00432802_m1	<i>spna2</i>	Mm01326617_m1
<i>tbp</i>	Mm01255158_m1	<i>vim</i>	Mm01333430_m1
<i>csf1r</i>	Mm00655763_m1	<i>jam2</i>	Mm00470197_m1
<i>lyz2</i>	Mm00443045_m1	<i>cdh1</i>	Mm01247357_m1
<i>ly96</i>	Mm00439211_m1	<i>cdh5</i>	Mm00486938_m1
<i>c1qa</i>	Mm00432142_m1	<i>dsc2</i>	Mm00516355_m1
<i>c1qb</i>	Mm01179619_m1	<i>itgb2</i>	Mm00434513_m1
<i>hspa8</i>	Mm01731394_gH	<i>nras</i>	Mm03053787_s1
<i>nras</i>	Mm03053787_s1	<i>hspa1b</i>	Mm03038954_s1
<i>aif1</i>	Mm00479862_g1	<i>hspa13</i>	Mm00712869_m1
<i>igf1</i>	Mm00439560_m1	<i>cldn1</i>	Mm00516701_m1
<i>igf1r</i>	Mm00802831_m1	<i>cldn14</i>	Mm00517109_s1
<i>igfbp3</i>	Mm01187817_m1	<i>cldn7</i>	Mm00516817_m1
<i>igfbp5</i>	Mm00516037_m1	<i>g6pc</i>	Mm00839363_m1
<i>ctgf (igfbp8)</i>	Mm01192933_g1	<i>acly</i>	Mm01302282_m1
<i>jun</i>	Mm00495062_s1	<i>pck1</i>	Mm01247058_m1
<i>fos</i>	Mm00487425_m1	<i>pdk4</i>	Mm01166879_m1
<i>grb2</i>	Mm03023989_g1		
<i>myo1b</i>	Mm01257265_m1		

Tabla 6. Sondas TaqMan empleadas para la PCR cuantitativa

Los resultados obtenidos representan los niveles de expresión de cada gen estudiado, normalizados usando como control endógeno el gen de la actina. Los datos fueron calculados como $2\Delta C_T$, donde C_T representa el ciclo umbral en el que se detectó por vez primera un incremento definido de la fluorescencia por encima de la señal basal; la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto amplificado. El dato obtenido de cada gen, comparado contra el obtenido para el mismo gen en el grupo CO, considerado como

referencia, se establece comparativamente como “número de veces por debajo o por encima del control”. Las determinaciones se realizaron por duplicado. El proceso para la realización de esta etapa, en cada uno de sus pasos, desde la homogeneización y lisado de las muestras hasta la qPCR en tiempo real se esquematiza en la Figura 34.

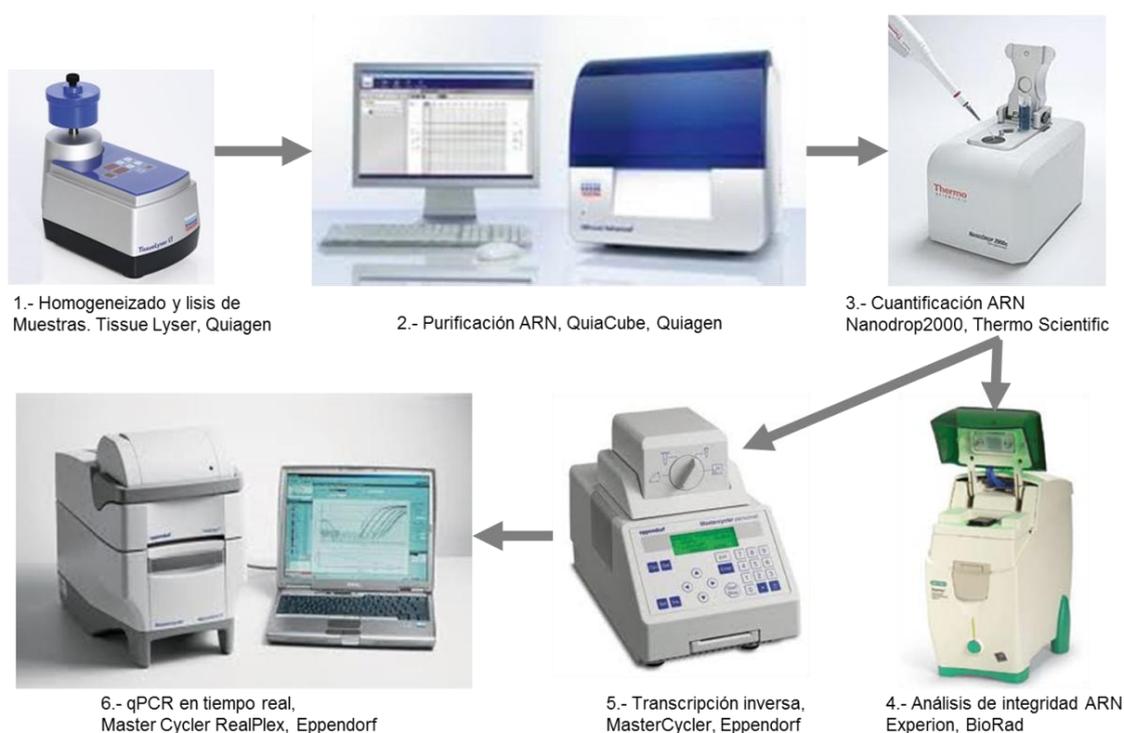


Figura 34. Esquema del proceso de las muestras y equipamientos empleados para la realización de PCR tiempo real.

III.5. HISTOLOGÍA CONVENCIONAL.

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, el hígado fue extraído y, tras ser pesado, se seccionó separando el lóbulo izquierdo y el lóbulo derecho, éste se dividió en dos porciones, y una de ellas se utilizó para el estudio histológico, se preparó sumergiéndola en paraformaldehído al 4 % (24 horas a temperatura ambiente, en agitación) para su fijación. Posteriormente las muestras fueron introducidas en etanol al 70% para completar su fijación. Posteriormente, los hígados se incluyeron en parafina tras la deshidratación en una serie creciente de alcoholes realizada con un procesador automático de

tejidos (Leica TP 1020, Suiza). Los bloques de parafina se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Los cortes se realizaron en un micrótomo 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.).

III.5.1. Tinción Histológica.

En primer lugar se realizó la tinción del tejido hepático 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 la identificación de lobulillos en cada laminilla. En seguida se identificaron los cordones hepáticos, las tríadas hepáticas, y los espacios sinusoidales. Se fotografiaron secciones representativas a diferentes aumentos.

III.6. DETERMINACIONES EN TEJIDO HEPÁTICO.

III.6.1. Malondialdehído (MDA).

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 Malondialdehído 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 hepáticos fueron homogeneizados (150 g/L) 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 2.000 g durante 10 minutos a 4 °C, recogiendo al finalizar 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 %.
4. 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 9.000 g durante 10 minutos.
6. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 586 nm.

Se utilizaron cubetas de 0,1 cm y volumen de 1,5 mL para la lectura de las absorbancias. Para la curva de calibración se utilizó estándar de 1 µM a 100 µM. La concentración de MDA en la muestra se calculó como se expone a continuación:

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

A = Absorbancia de la muestra

A_o = 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. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (X ± 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 significancia estadística se consideró cuando la probabilidad asociada era inferior al 5% (p<0,05).

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

IV. RESULTADOS

IV.1. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO EXPERIMENTAL, CONCENTRACIONES DE IGF-1, PESO CORPORAL y PESO HEPÁTICO.

IV.1.1. Concentraciones circulantes de IGF-1.

El modelo experimental utilizado en este protocolo se estableció a partir de los ratones deficientes en IGF-1 aportados por el Dr. Argiris Efstratiadis (Universidad de Columbia, NY, EE.UU.) incluyendo tres grupos:

Controles (CO), heterocigotos deficientes en IGF-1 (Hz) y heterocigotos deficientes en IGF-1 tratados con 2 µg/100 g peso/día por 10 días (Hz+IGF-1) cfr: Apartado III.1.1., de Material y métodos.

La validación del modelo de deficiencia parcial de IGF-1 (ratones heterocigotos *igf-1^{+/-}*), que reproduce el estado de deficiencia de esta hormona observada en la patología humana la hemos venido caracterizando en trabajos precedentes (Guerra L., 2012; Gago A., 2012; Iturrieta I, 2013, Puche E., 2013), a partir de un modelo de ratones con una deficiencia sistémica de IGF-1 (*Igf1tm1Arge*) (Liu J.P. *et al.*, 1993).

En este protocolo de ratones machos de 25 semanas de edad, se encontró -- como en series anteriores -- que los ratones Hz presentaban una reducción significativa de las concentraciones circulantes de IGF-1, con respecto al grupo CO (Hz= 534,14 ± 52,41 vs CO= 696,07 ± 59,20 ng/mL, $p < 0,01$).

La administración exógena de IGF-1, como en series precedentes, normalizó las concentraciones séricas, comportándose como una verdadera terapia sustitutiva (Hz+IGF-1= 681,29 ± 75,71 ng/mL, $p < 0,01$), alcanzando valores similares a los del grupo control, p NS, Figura 35.

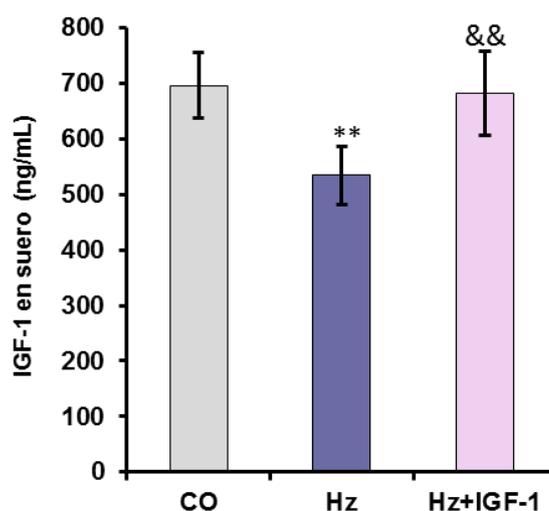


Figura 35. Concentraciones de IGF-1 en suero.
** $p < 0,01$ Hz vs CO; && $p < 0,01$ Hz+IGF-1 vs Hz.

IV.1.2. Peso corporal en los tres grupos experimentales y correlación con las concentraciones circulantes de IGF-1.

La deficiencia parcial de IGF-1 se encontró asociada con una disminución del peso corporal de los animales afectados cuando se compararon con los controles (CO= $39,76 \pm 2,45$ vs Hz= $33,59 \pm 1,06$ g, $p < 0,01$), el tratamiento substitutivo con IGF-1 normalizó el peso (Hz+IGF-1= $39,52 \pm 1,48$ vs CO, p NS), como ocurrió en protocolos anteriores. Comparando estos últimos con el grupo Hz, que no recibió tratamiento substitutivo, también se encontró diferencia significativa en el peso (Hz+IGF-1 vs Hz, $p < 0,01$), Figura 36.

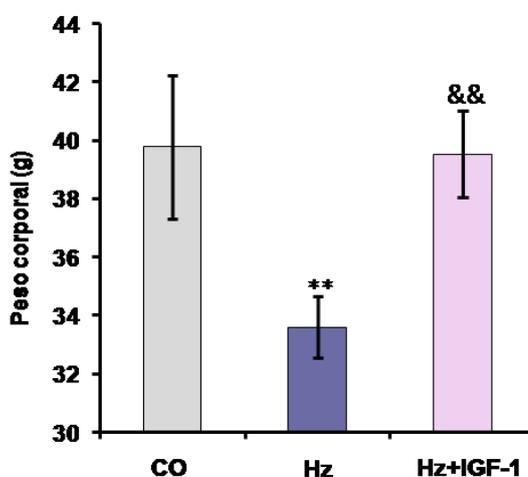


Figura 36. *Peso corporal.* ** $p < 0,01$ Hz vs CO; && $p < 0,01$ Hz+IGF-1 vs Hz.

Además, se encontró correlación directa y significativa entre el peso corporal y las concentraciones circulantes de IGF-1, con un coeficiente r de Pearson = 0,75, $p < 0,05$.

IV.1.3. Peso hepático absoluto y relativo.

El peso absoluto del hígado se encontró significativamente disminuido en los animales heterocigotos (Hz) comparados con los controles (CO), siendo (Hz= $1,63 \pm 0,09$ vs CO= $1,92 \pm 0,16$ g, $p < 0,05$), el grupo que recibió terapia substitutiva logró corregir estas diferencias (Hz+IGF-1= $1,93 \pm 0,19$ vs CO= $1,92 \pm 0,16$ g, p NS), y de nuevo, fue significativamente diferente del grupo heterocigoto, Figura 37.

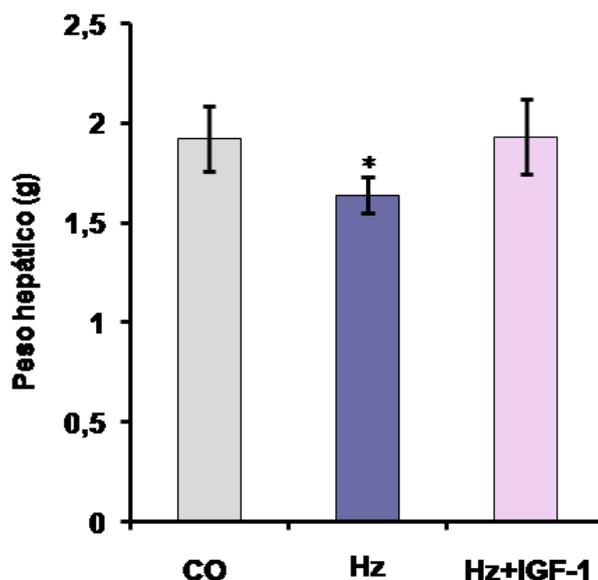


Figura 37. *Peso hepático absoluto.* ** $p < 0,05$ Hz vs CO; && $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

Sin embargo, cuando se compararon los pesos hepáticos relativos al peso corporal total, no se encontraron diferencias entre los grupos: CO= $0,0483 \pm 0,003$; Hz= $0,0487 \pm 0,001$; Hz+IGF-1= $0,0488 \pm 0,002$, p NS).

IV.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO CONVENCIONAL.

El estudio anatomopatológico del hígado teñido con Hematoxilina y Eosina (HyE) puso de manifiesto en los animales con deficiencia parcial de IGF-1 una desorganización en la arquitectura hepática.

Los hallazgos en este estudio preliminar, que no son el objeto específico de este trabajo, podrían resumirse en una disposición anormal ☆ de los hepatocitos en el grupo Hz, sin respetar el alineamiento normal ⇨ de los cordones hepatocitarios a partir de la vena centrolobulillar (cfr. grupo CO) como se aprecia en las figuras 38 y 39.

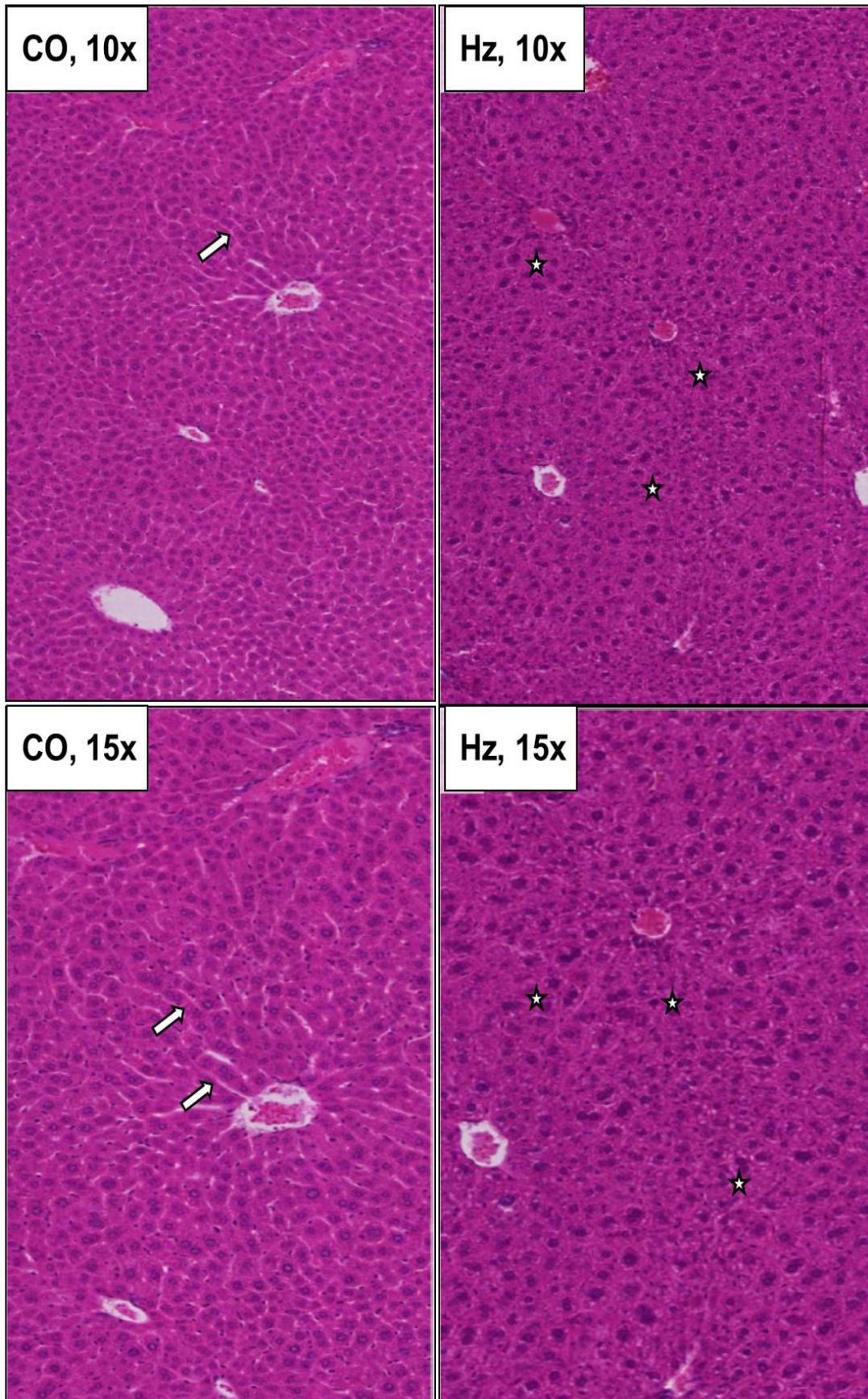


Figura 38. Aspecto histológico del hígado, Hematoxilina y Eosina (x10 y x15), en CO= controles y Hz= Animales deficientes de IGF-1.

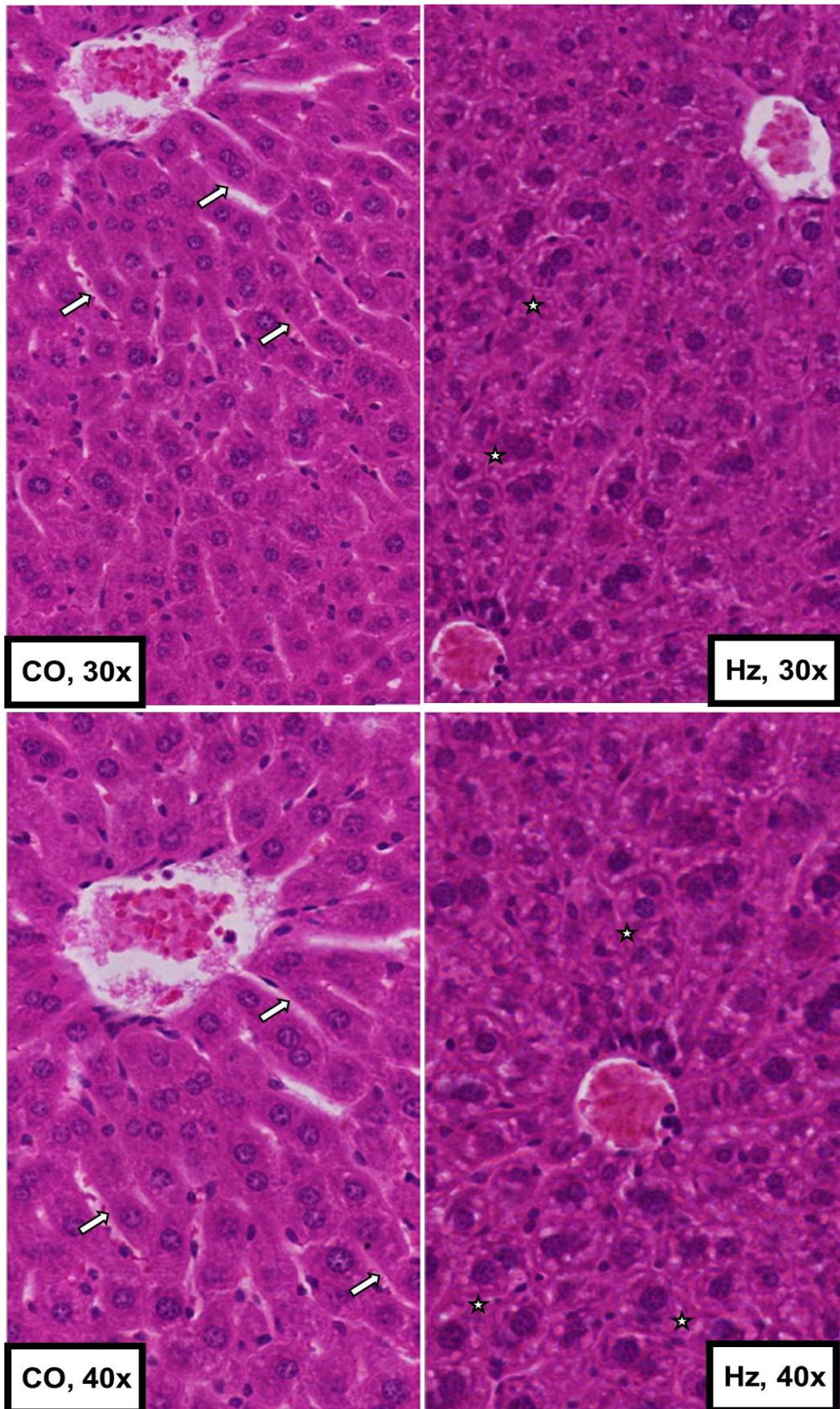


Figura 39. Aspecto histológico del hígado, Hematoxilina y Eosina (x30 y x40), en CO= controles y Hz= Animales deficientes de IGF-1.

IV.3 ESTUDIO DEL DAÑO HEPÁTICO OXIDATIVO Y DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA INFLAMACIÓN, EL DAÑO OXIDATIVO Y APOPTOSIS.

IV.3.1. Peroxidación lipídica en homogenizados hepáticos.

Los animales con deficiencia de IGF-1 (Hz) presentaron concentraciones significativamente elevadas de Malondialdehído (MDA), marcador de peroxidación lipídica (Hz $5,28 \pm 1,04$; CO $1,75 \pm 0,54$, U/L, $p < 0,05$), que la terapia sustitutiva normalizó (Hz+IGF-1 $0,96 \pm 0,55$ U/L; $p < 0,05$ vs Hz, p NS vs CO), Figura 40.

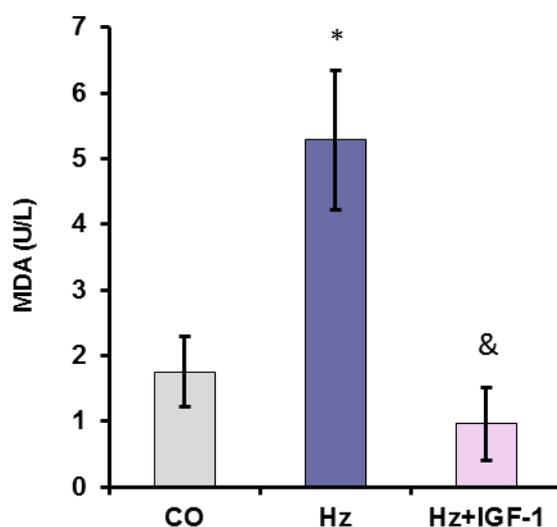


Figura 40. Malondialdehído en homogenizados hepáticos.
* $p < 0,05$; Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

IV.3.2. Expresión relativa de genes relacionados con enzimas y factores implicados en la respuesta inflamatoria y proteínas de fase aguda, en hígado.

En este protocolo, en el que los animales no recibieron ningún tipo de agresión oxidativa ni proinflamatoria, se observó que la sola deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una alterada expresión de numerosos genes que codifican para proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria y para proteínas de fase aguda: Tabla 7.

Nombre del gen		Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
colony stimulating factor 1 (macrophage)	Csf1	1,09	1,29
colony stimulating factor 1 receptor	Csf1r	2,49	-2,41
colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	Csf3r	1,04	1,08
colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Csf3	1,18	1,02
colony stimulating factor 2	Csf2	-1,03	1,16
colony stimulating factor 2 receptor, alpha	Csf2ra	1,35	-1,30
colony stimulating factor 2 receptor, beta 2	Csf2rb2	2,38	-2,39
interferon gamma receptor 1	Ifngr1	1,62	-1,34
chemokine (C-C motif) ligand 11	Ccl11	1,12	-1,01
chemokine (C-C motif) receptor 6	Ccr6	-1,10	1,00
chemokine (C-C motif) ligand 6	Ccl6	4,34	-4,02
chemokine (C-C motif) receptor 5	Ccr5	4,38	-4,87
chemokine (C-C motif) ligand 12	Ccl12	1,10	-1,02
chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	1,40	-1,06
chemokine (C-C motif) ligand 17	Ccl17	1,26	-1,20
chemokine (C-C motif) ligand 3	Ccl3	-1,28	-1,12
chemokine (C-C motif) ligand 4	Ccl4	1,06	1,07
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	1,66	-2,13
chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14	4,06	-1,11
chemokine (C-X-C motif) ligand 16	Cxcl16	1,43	-1,58
interferonalpha 2	Ifna2	1,06	-1,05
interleukin 12 ^a	Il12a	1,16	1,02
interleukin 12b	Il12b	1,23	1,09
interleukin 13	Il13	1,06	1,11
interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	1,43	-1,61
leukemia inhibitory factor	Lif	1,03	1,06
oncostatin M receptor	Osmr	1,54	-1,56
oncostatin M	Osm	1,15	1,00
secreted phosphoprotein 1	Spp1	2,44	-1,80
lysozyme 1	Lyz1	3,26	-2,79
lysozyme 2	Lyz2	2,99	-2,31
solute carrier family 11	Slc11a1	1,45	-1,50
toll-like receptor 1	Tlr1	1,52	-1,40
signal transducer and activator of transcription 1	Stat1	2,11	-1,65
lymphocyte antigen 96	Ly96	1,71	-1,38
complement component 3	C3	1,89	-1,57
complement component 1, q subcomponent, α p	C1qa	5,40	-3,43
complement component 1, q subcomponent, β p	C1qb	6,61	-2,43
complement component 1, q subcomponent, C	C1qc	3,32	-2,69
macrophage activation 2 like	Mpa2l	3,11	-2,62
orosomucoid 1	Orm1	3,51	-2,44
orosomucoid 2	Orm2	10,52	-6,49
S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	2,89	1,16

S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100a9	2,00	1,20
serumamyloid A 1	Saa1	3,74	-1,70
serumamyloid A 2	Saa2	4,52	-2,62
serumamyloid A 3	Saa3	1,72	-1,31
serumamyloid A 4	Saa4	1,29	-1,24
histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	H2-Aa	6,56	-4,22
histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	H2-Ab1	2,40	-4,22
histocompatibility 2, class II antigen E beta	H2-Eb1	3,17	-2,97
arginase, liver	Arg1	1,33	-1,37
proteoglycan 2, bonemarrow	Prg2	1,14	-1,12
eosinophilperoxidase	Epx	-1,01	1,35
lactoperoxidase	Lpo	-1,17	1,16
monoamine oxidase A	Maoa	1,06	-1,20
monoamine oxidase B	Maob	1,11	-1,24
peroxidasinhomolog (Drosophila)	Pxdn	1,03	-1,05
xanthinedehydrogenase	Xdh	1,42	-1,34
interferon gamma	Ifng	-1,13	1,12
interleukin 1 alpha	Il1a	-1,01	1,04
interleukin 1 beta	Il1b	1,35	-1,22
interleukin 6	Il6	1,27	-1,11
interleukin 10	Il10	-1,15	1,23
interleukin 10 receptor, alpha	Il10ra	1,23	1,13
interleukin 10 receptor, beta	Il10rb	1,75	-1,80
interleukin 22	Il22	-1,01	1,06
cytokine receptor-like factor 1	Crll1	1,06	1,03
nervgrowth factor	Ngf	1,04	1,11
nervgrowth factor receptor	Ngfr	1,02	-1,30
neuroglobin	Ngb	-1,19	1,03
neutrophilcytosolic factor 2	Ncf2	1,44	-1,54
nitric oxide synthase 1, neuronal	Nos1	1,09	1,06
nitric oxide synthase 2, inducible	Nos2	-1,09	1,15
prostaglandin-endoperoxidesynthase 1	Ptgs1	2,10	-1,60
prostaglandin-endoperoxidesynthase 2	Ptgs2	1,08	1,04
transforminggrowth factor alpha	Tgfa	-1,29	1,13
Transforminggrowth factor, beta 1	Tgfb1	1,04	1,19
Transforminggrowth factor, beta 2	Tgfb2	1,03	1,05
tumor necrosis factor	Tnf	-1,21	1,12
TNF receptor superfamily, member 10b	Tnfrsf10b	1,05	1,25
TNF receptor superfamily, member 1a	Tnfrsf1a	1,29	-1,41
vascular endothelial growth factor A	Vegfa	-1,41	-1,08
vascular endothelial growth factor B	Vegfb	1,12	-1,07
vascular endothelial growth factor C	Vegfc	-1,31	1,19

Tabla 7. Expresión relativa de genes implicados en la respuesta inflamatoria, proteínas de fase aguda y del sistema del complemento.

El estudio de la expresión génica se centró en algunos de aquellos que alcanzaron en el microarray valores de divergencia $\geq 1,5$ *fold change*, al comparar los grupos Hz vs CO.

El estudio por qRT-PCR puso de manifiesto que en los animales deficientes de IGF-1 existía una hiperexpresión significativa de los genes implicados en la respuesta inflamatoria.

La terapia sustitutiva fue capaz de revertir esta sobreexpresión, al menos para: *ccr5*, *ccl6*, *Il10rb*, *csf1r*, *saa1* y *spp1*, *ccr5* y *ccl6*, *lyz2* y *ly96*; si bien no se observó reversión en los genes de proteínas de complemento *c1qa* ni *c1qb*. Ver figuras 41A, 41B y 41C.

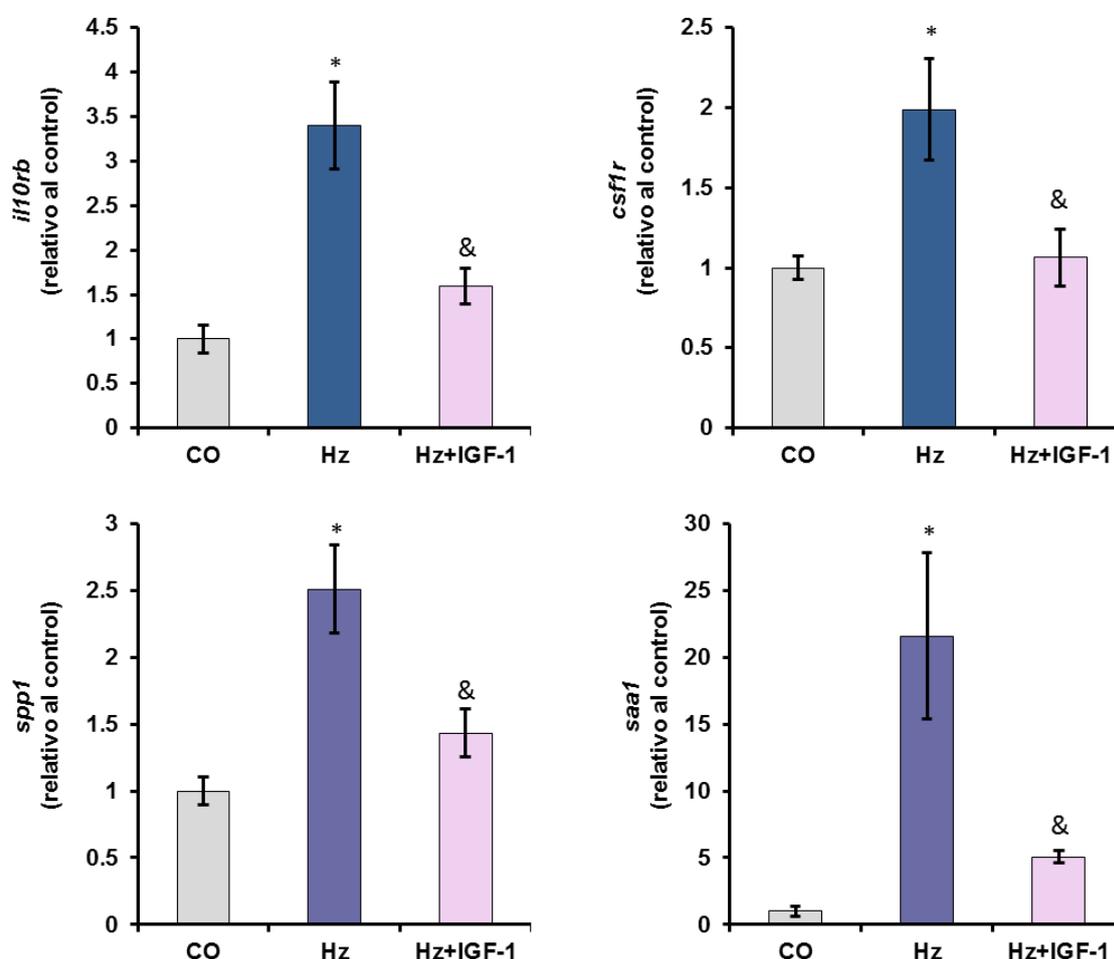


Figura 41A. Expresión hepática de genes (qRT-PCR) relacionados con la respuesta inflamatoria.

* $p < 0,05$; Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

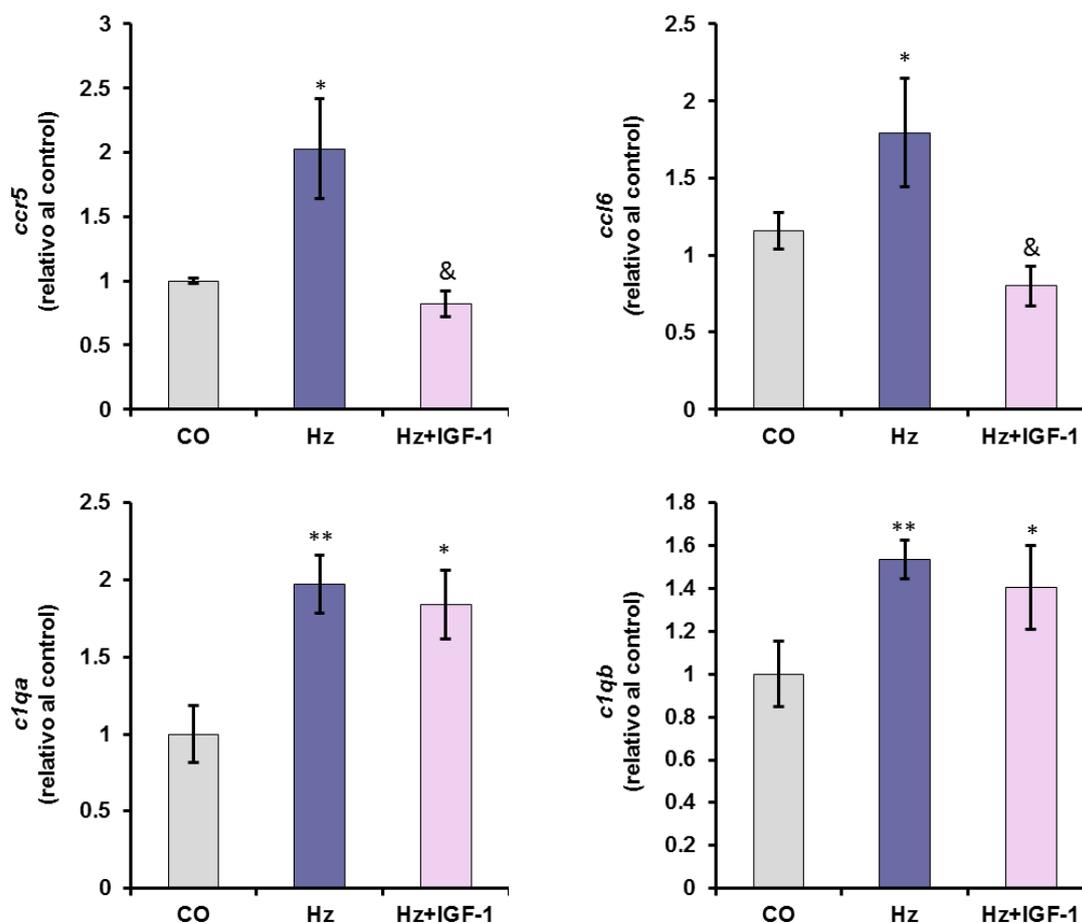


Figura 41B. Expresión hepática, qRT-PCR, de genes de proteínas del complemento.
 * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

Además, se confirmó por qRT-PCR la hipoexpresión en animales Hz de los genes de la lisozima 2 y del antígeno linfocítico 96 (*lyz2* y *ly96*) que la administración exógena de IGF-1 normalizó: Figura 41C.

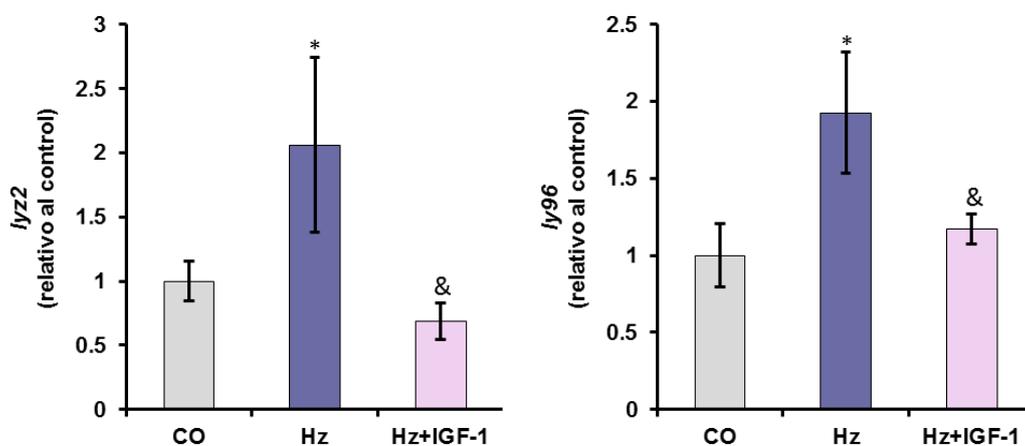


Figura 41C. Expresión hepática, qRT-PCR, de los genes de *lyz2* y *ly96* en los tres grupos experimentales.
 * $p < 0,05$; Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

IV.3.3. Expresión relativa de genes relacionados con las defensas antioxidantes enzimáticas, en hígado.

La Tabla 8 nos resume los hallazgos en este protocolo – en el que los animales no habían recibido daño oxidativo exógeno – en cuanto la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes.

Nombre del gen		Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGFvs Hz (Fold change)
glutathioneperoxidase 1	Gpx1	-1,02	1,04
glutathioneperoxidase 2	Gpx2	-1,35	1,48
glutathioneperoxidase 3	Gpx3	1,23	-1,02
glutathioneperoxidase 4	Gpx4	-1,45	1,22
glutathioneperoxidase 5	Gpx5	1,11	1,11
glutathioneperoxidase 6	Gpx6	-1,29	1,24
glutathioneperoxidase 7	Gpx7	1,12	-1,06
glutathioneperoxidase 8 (putative)	Gpx8	1,09	-1,15
glutathionereductase	Gsr	1,04	1,10
glutathione S-transferase kappa 1	Gstk1	1,00	1,02
glutathione S-transferase, pi 1	Gstp1	1,92	1,18
catalase	Cat	-1,25	1,26
peroxiredoxin 1	Prdx1	-1,23	1,05
peroxiredoxin 2	Prdx2	1,22	-1,03
peroxiredoxin 3	Prdx3	1,14	-1,11
peroxiredoxin 4	Prdx4	1,08	-1,15
peroxiredoxin 5	Prdx5	1,04	1,10
peroxiredoxin 6	Prdx6	1,07	-1,16
superoxidedismutase 1, soluble	Sod1	-1,33	-1,33
superoxidedismutase 2, mitochondrial	Sod2	-1,49	1,33
superoxidedismutase 3, extracelular	Sod3	-1,10	1,03
thioredoxin 1	Txn1	-1,17	-1,04
thioredoxininteractingprotein	Txnip	1,58	-1,12
thioredoxinreductase 1	Txnrd1	-1,05	1,04
thioredoxinreductase 2	Txnrd2	1,05	1,23
thioredoxinreductase 3	Txnrd3	1,12	-1,37

Tabla 8. Expresión relativa de genes que codifican enzimas antioxidantes en hígado

Se encontró que la deficiencia de IGF-1 se asociaba con una hipoexpresión de los genes que codifican para Gpx4 y Sod2, mientras que se encontraron hiperexpresados los genes de la Gstp1 y Txnip: cfr. Tabla 5.

El estudio por qRT-PCR confirmó, además, una hipoexpresión significativa del gen de la catalasa, que el tratamiento sustitutivo con IGF-1 revertía a valores similares a los controles: cfr. Figura 42.

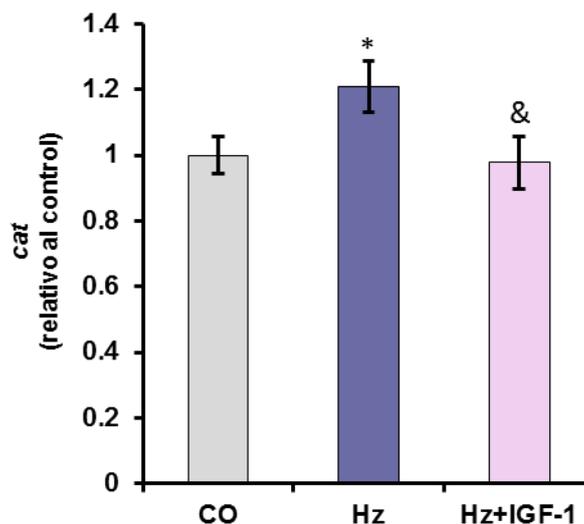


Figura 42. Expresión hepática del gen de la catalasa en los tres grupos experimentales.
* $p < 0,05$; Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

IV.3.4. Expresión hepática de genes que codifican para proteínas implicadas en la apoptosis y heat shock proteins.

La Tabla 9 resume la expresión relativa de los genes relacionados con la apoptosis y los que codifican para las HSP (*heath shock proteins*).

Nombre del gen		Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGFvs Hz (Fold change)
BH3 interacting domain death agonist	Bid	1,18	-1,04
BCL2-associated X protein	Bax	1,05	-1,05
BCL2-antagonist/killer 1	Bak1	-1,08	1,07
BH3 interacting domain death agonist	Bid	-1,20	1,09
apoptoticpeptidaseactivating factor 1	Apaf1	1,44	-1,51
Fas (TNF receptor superfamily member 6)	Fas	1,14	1,01
Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Fadd	1,08	-1,18
endonuclease G	Endog	-1,04	1,47
allograftinflammatory factor 1	Aif1	1,95	-2,82
carbamoyl-phosphatesynthetase	Cad	1,02	1,35
voltage-dependentanionchannel 1	Vdac1	-1,15	-1,08
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 a	Gadd45a	1,44	-1,21
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 g	Gadd45g	1,02	-1,06
diablo homolog (Drosophila)	Diablo	1,08	1,04
caspase 1	Casp1	1,12	-1,08
caspase 3	Casp3	1,01	-1,23
caspase 8	Casp8	1,04	-1,15
caspase 9	Casp9	-1,16	1,00

<i>heat shock protein 1B</i>	<i>Hspa1b</i>	-1,30	1,82
<i>heat shock protein 8</i>	<i>Hspa8</i>	-2,23	1,05
<i>heat shock protein 70 family, member 13</i>	<i>Hspa13</i>	-1,91	1,82

Tabla 9. Genes relacionados con apoptosis y genes que codifican para la HSP.

La confirmación por qRT-PCR puso de manifiesto que la deficiencia de IGF-1 se asoció con hiperexpresión significativa de *apaf1* y *aif1*, considerados ambos moléculas pro-apoptóticas, y que el tratamiento sustitutivo con IGF-1 fue capaz de revertirla hasta valores de expresión similares a los controles.

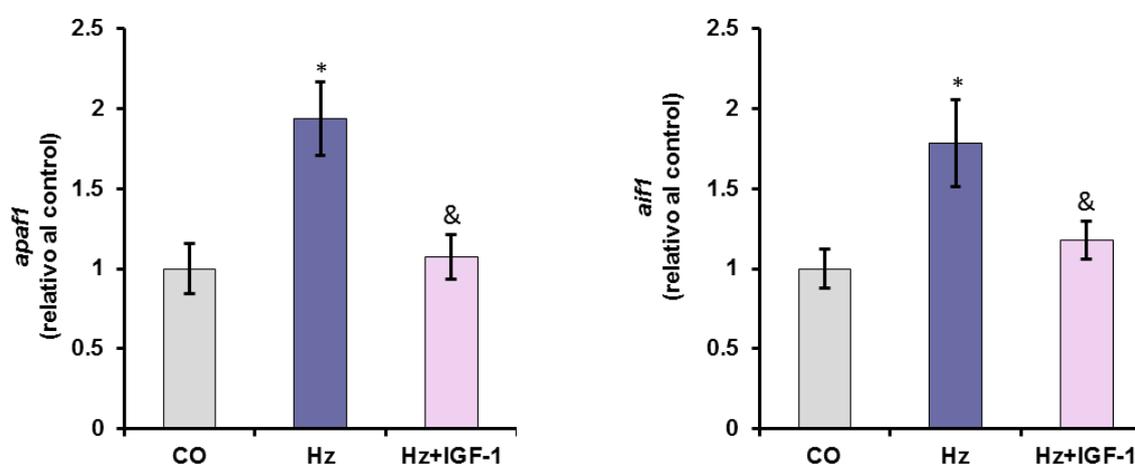


Figura 43. Expresión hepática por qRT-PCR de genes proapoptóticos.

* $p < 0,05$ Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

Por otra parte, se encontró que la sola deficiencia parcial de IGF-1 se acompañaba de una reducción significativa del gen *gadd45a* (growth arrest and DNA damage inducible 45 alpha), con conocidas propiedades inhibitorias de la apoptosis.

Asimismo, se hipoexpresó el gen de *hspa1b*, que codifica para la proteína Heat shock protein 70kD (HSP70). Del mismo modo se comportaron los genes *hspa8* y *hspa13*, también codificantes para proteínas de la familia de HSP70, que también inhibe la apoptosis.

En ambos casos, el tratamiento sustitutivo normalizó la expresión de ambos genes: Figura 44.

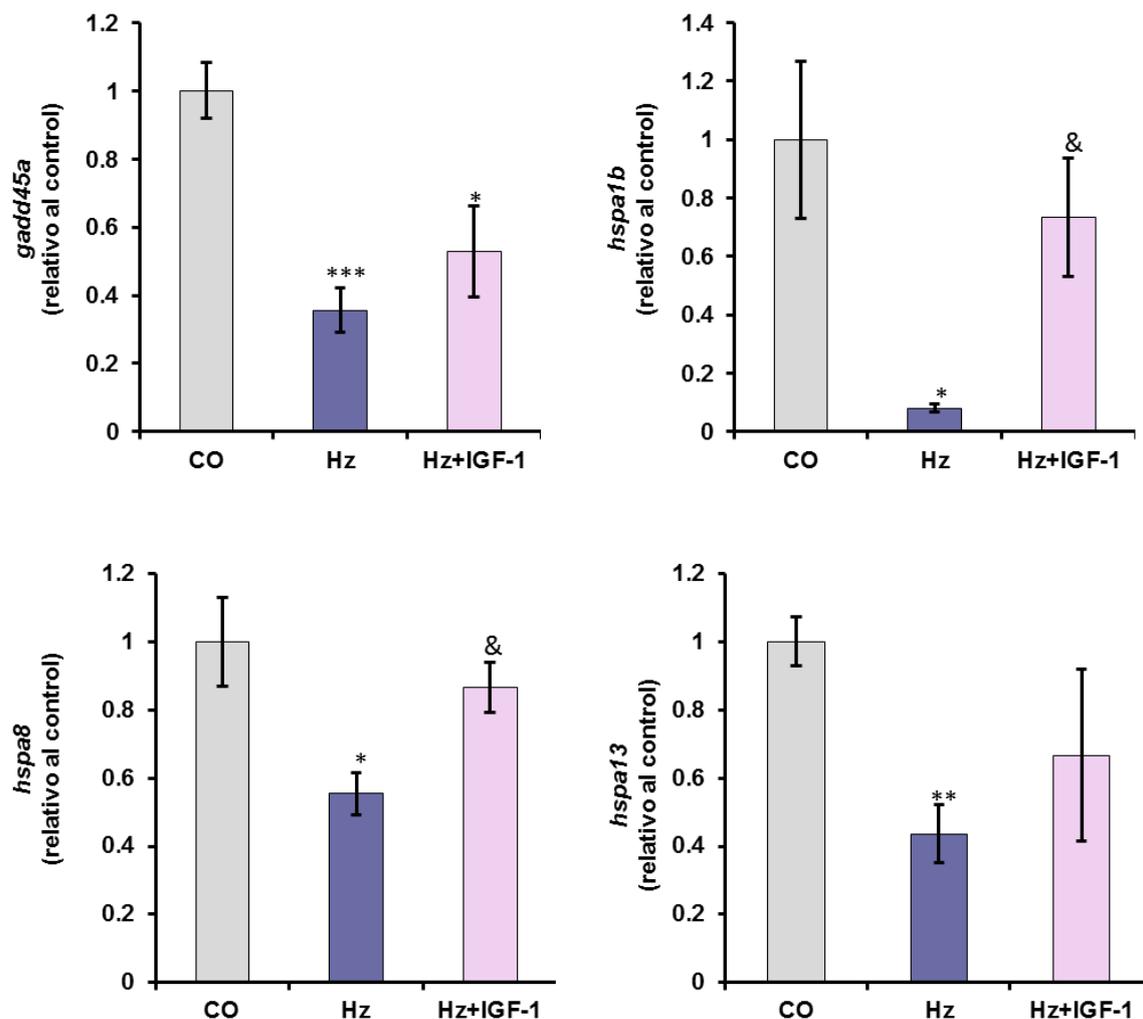


Figura 44. Expresión hepática de genes antiapoptóticos y HSP (heath shock proteins)

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

IV.4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENICA HEPÁTICA DE GENES RELACIONADOS CON IGF-1.

El estudio por microarrays de la expresión génica en hígado puso de manifiesto que la deficiencia parcial de IGF-1 se asocia con una hipoexpresión de la mayoría de los genes relacionados con esta hormona; Tabla 10.

Nombre del gen		Hz vsCO (Fold change)	Hz+IGF-1vs Hz (Fold change)
<i>insulin-like growth factor 1</i>	<i>Igf1</i>	-2,48	1,63
insulin-like growth factor binding protein-like 1	<i>Igfbp1</i>	-1,4	-2,17
<i>insulin-like growth factor binding protein 1</i>	<i>Igfbp1</i>	-4,53	-2,17
insulin-like growth factor binding protein 2	<i>Igfbp2</i>	-1,03	-1,02

insulin-like growth factor binding protein 3	lgfbp3	-1,77	1,33
insulin-like growth factor binding protein 4	lgfbp4	-1,16	1,12
insulin-like growth factor binding protein 5	lgfbp5	-1,47	1,38
insulin-like growth factor binding protein 6	lgfbp6	1,00	1,19
insulin-like growth factor binding protein 7	lgfbp7	-1,20	1,14
connectivetissuegrowth factor	Ctgf	-1,60	-1,57
insulin-like growth factor I receptor	lgf1r	-1,44	1,29
insulin-like growth factor 2	lgf2	-1,35	1,48
Insulin-like growth factor 2 receptor	lgf2r	-1,23	1,27
insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	lgf2bp1	-1,22	1,18
insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	lgf2bp2	-1,37	1,03
insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	lgf2bp3	1,01	1,25
insulin I	Ins1	1,04	1,01
insulin II	Ins2	-1,15	-1,09
insulin-like 3 /// Januskinase 3	Ins13	-1,01	1,05
insulin-like 5	Ins15	1,05	1,12
insulin-like 6	Ins16	-1,01	1,10
growth hormone receptor	Ghr	-1,37	1,35

Tabla 10. *Expresión relativa de genes relacionados con IGF-1 en hígado.*

Es destacable la hipoexpresión del gen que codifica para la IGFBP1, proteína transportadora de bajo peso molecular que atraviesa los capilares y facilita la biodisponibilidad de IGF-1 a los tejidos.

IV.4.1. Expresión hepática del gen de IGF-1 y su receptor.

La qRT-PCR a tiempo real confirmó que este modelo de delección sistémica del gen *Igf1* presenta una reducción significativa de su expresión en los animales heterocigotos en comparación con los controles (Figura 45, gráfico A, a la izquierda).

Al contrario que lo observado en otros órganos (Guerra L, 2012; Gago A, 2012; Iturrieta I, 2013; Puche IE, 2013) el tratamiento con IGF-1 normalizó en el hígado la expresión del gen *Igf1* (Figura 45, gráfico A, a la izquierda, grupo Hz+IGF-1).

Razonablemente, la expresión hepática del receptor de IGF-1 se encontró aumentada en los animales heterocigotos, comparados contra los controles y los heterocigotos tratados (Figura 45, gráfico B, a la derecha).

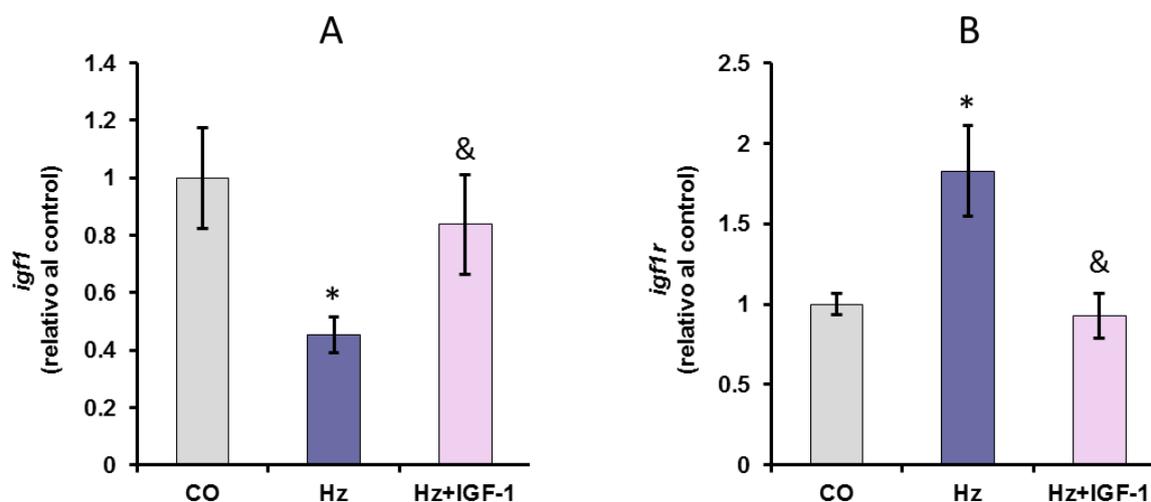


Figura 45. Expresión hepática del gen *igf-1* (A) y su receptor en hígado (B).

* $p < 0,05$ Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

Al contrario que lo observado en otros órganos (Guerra L, 2012; Gago A, 2012; Iturrieta I, 2013; Puche IE, 2013) el tratamiento con IGF-1 normalizó en el hígado la expresión del gen *igf1* (Figura 45, A, a la izquierda, grupo Hz+IGF-1).

Razonablemente, la expresión hepática del receptor de IGF-1 se encontró aumentada en los animales heterocigotos, comparados contra los controles y los heterocigotos tratados (Figura 45, B, a la derecha).

IV.4.2. Expresión hepática de los genes que codifican para las proteínas transportadoras de IGF-1 (IGFBPs).

Es destacable la hipoxpresión del gen que codifica para la IGFBP1, proteína transportadora de bajo peso molecular que atraviesa los capilares y facilita la biodisponibilidad de IGF-1 a los tejidos.

Además del gen de la IGFBP1, también se encontró hipoxpresión de los genes de la IGFBP3 e IGFBP5.

El tratamiento substitutivo no incrementó la expresión de ninguna de las proteínas transportadoras, según se muestra en la figura 46.

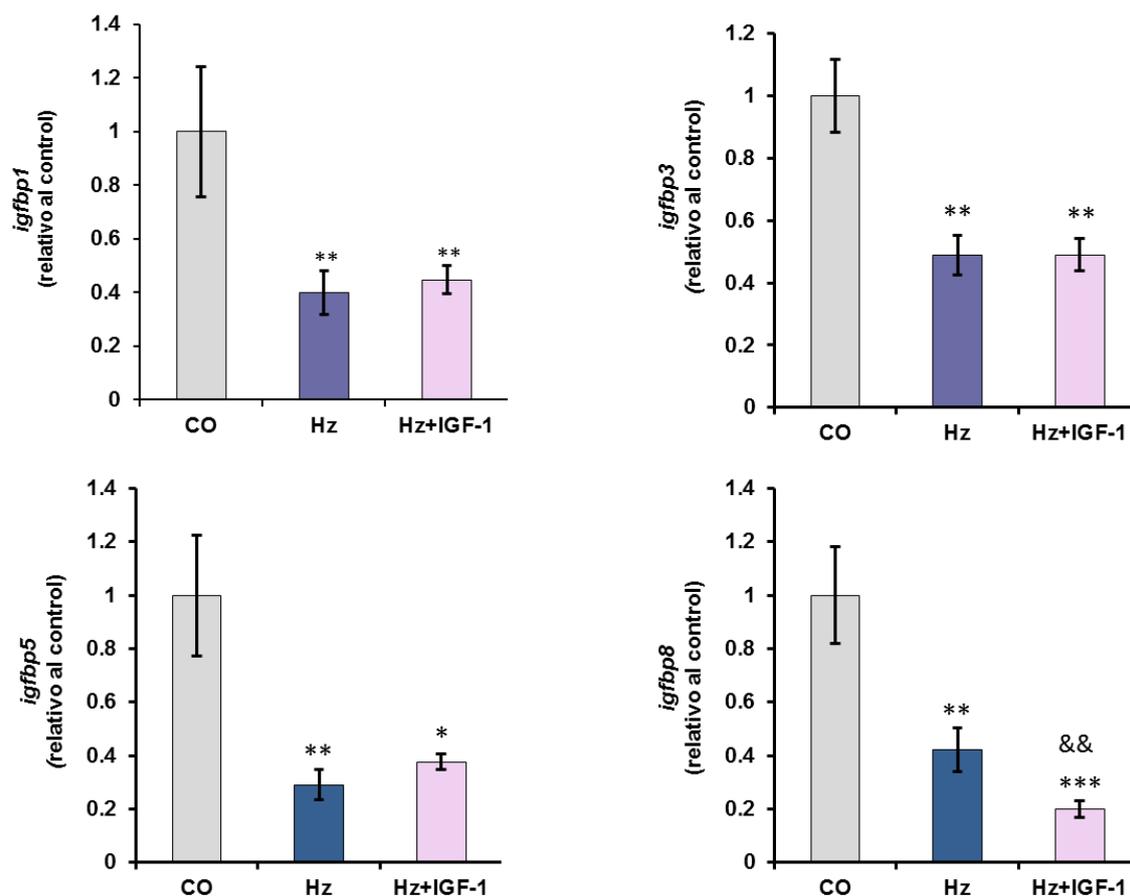


Figura 46. Expresión de los genes codificantes para las proteínas transportadoras IGFBP1, 3, 5 y 8 en hígado.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Hz vs CO; && $p < 0,01$ Hz+IGF-1 vs Hz

En cuanto a la IGFBP8, conocida también como CTGF (Connective Tissue Growth Factor) la terapia exógena con IGF-1 sorprendentemente acentuó aún más la hipoxpresión de este gen, Figura 46.

En la tabla 11 se resumen los resultados de la expresión génica relativa, por microarrays, de 37 genes que están involucrados en las rutas de señalización intracelular del receptor de IGF-1.

Nombre del gen		Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGFvs Hz (Fold change)
<i>insulin-like growth factor I receptor</i>	<i>Igf1r</i>	-1,44	1,29
insulin receptor	<i>Insr</i>	-1,07	1,31
insulin receptor substrate 1	<i>Irs1</i>	-1,17	1,17
insulin receptor substrate 2	<i>Irs2</i>	-1,22	1,12
insulin receptor substrate 3	<i>Irs3</i>	-1,12	1,12
insulin receptor substrate 4	<i>Irs4</i>	-1,01	1,13
phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	<i>Pik3ca</i>	-1,08	1,28

phosphatidylinositol 3-kinase (p85 alpha)	Pik3r1	-1,20	1,42
phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	Pik3cg	-1,35	1,42
phosphatidylinositol 3-kinase, (p85 beta)	Pik3r2	-1,43	1,29
thymoma viral proto-oncogene 1	Akt1	1,08	-1,09
thymoma viral proto-oncogene 2	Akt2	-1,08	-1,11
thymoma viral proto-oncogene 3	Akt3	-1,36	1,21
growth factor receptor bound protein 2	Grb2	1,54	-1,17
son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	Sos1	1,08	-1,38
Harvey rat sarcoma virus oncogene 1	Hras1	1,30	1,13
v-Ki-ras2 Kirstenrat sarcoma viral oncogenehomolog	Kras	1,00	1,00
neuroblastoma ras oncogene	Nras	1,53	-1,08
V-raf-leukemia viral oncogene 1	Raf1	-1,26	1,09
mitogen-activated protein kinase kinase 1	Map2k1	1,21	-1,33
mitogen-activatedproteinkinase 3	Mapk3	1,01	-1,01
mitogen-activatedproteinkinase 1	Mapk1	1,41	-1,23
mitogen-activatedproteinkinase 8	Mapk8	1,09	-1,25
Jun oncogene	Jun	-2,03	1,05
FBJ osteosarcomaoncogene	Fos	-1,44	-1,16
cyclin D2	Ccnd2	-1,16	1,04
cyclin B1	Ccnb1	1,00	-1,18
cyclin D1	Ccnd1	-1,19	-1,12
cyclin E1	Ccne1	1,96	-1,57
cyclin-dependentkinase 2	Cdk2	1,31	-1,34
cyclin-dependentkinase 4	Cdk4	1,02	1,01
cyclin-dependentkinase 6	Cdk6	1,21	-1,39
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	Cdkn1a	-1,52	1,22
cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	Cdkn1b	1,08	-1,05
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Cdkn2a	1,22	-1,16
E2F transcription factor 1	E2f1	-1,04	1,14
retinoblastoma 1	Rb1	1,17	-1,31
forkhead box O1	Foxo1	-1,23	1,18
mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	Mtor	1,15	1,15
NFk light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	Nfkb1	1,09	-1,19
NFk light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	Nfkb2	-1,19	1,31
proliferatingcell nuclear antigen	Pcna	1,35	-1,35

Tabla 11, *Expresión relativa de genes de rutas de señalización de IGF-1 en hígado.*

El estudio por qPCR a tiempo real confirmó que los animales con deficiencia parcial de IGF-1 presentaban una reducción significativa de la expresión de los genes involucrados con las rutas de señalización intracelular de IGF-1, de ellos, cabe destacar que *jun*, *fos* y *grb2* se recuperan con la terapia sustitutiva, y en el caso del último, alcanza los valores normales de expresión: Figura 47.

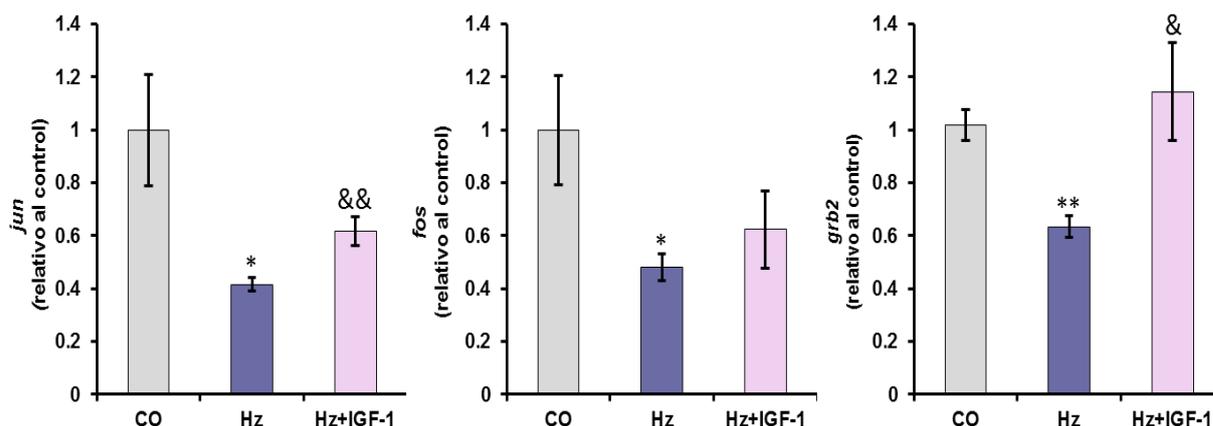


Figura 47. Expresión hepática relativa de los genes *jun*, *fos* y *grb2*.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ Hz vs CO; & $p < 0,05$; && $p < 0,01$ Hz+IGF-1 vs Hz.

Por otra parte, y sorprendentemente, la deficiencia de IGF-1 incrementó la expresión de *nras*, aunque sin alcanzar significancia estadística con respecto a los controles; la terapia sustitutiva redujo sensiblemente la expresión de este gen, por debajo incluso del rango de expresión en los controles: Figura 48.

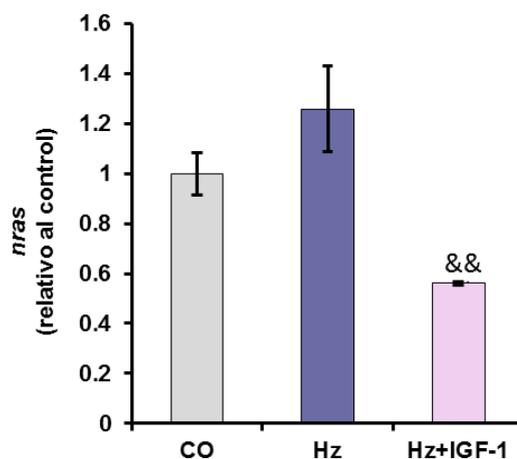


Figura 48. Expresión hepática del gen *nras*, en los tres grupos experimentales.
** $p < 0,01$ Hz vs CO; && $p < 0,01$ Hz+IGF-1 vs Hz.

IV.5 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON CITOESQUELETO, UNIONES ESTRECHAS, UNIONES ADHERENTES Y DESMOSOMAS DE LOS HEPATOCITOS.

En la tabla 12 se resumen los hallazgos de la expresión de genes relacionados con el citoesqueleto de los hepatocitos.

Nombre del gen		Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
desmin	Des	-1,11	1,15
glial fibrillary acidic protein	Gfap	-1,29	1,06
lamin A	Lmna	-1,15	1,06
nestin	Nes	-1,02	1,28
pleckstrin 2	Plek2	1,01	1,08
keratin 7	Krt7	1,05	1,07
caveolin 2	Cav2	-1,29	1,22
vinculin	Vcl	-1,49	1,31
filamin, alpha	Flna	1,45	-1,33
Filamin, beta	Flnb	-1,61	1,10
transgelin	Tagln	-1,28	1,14
ras homolog gene family, member A	Rhoa	1,41	-1,61
RAS-related C3 botulinum substrate 1	Rac1	1,30	-1,21
spectrin alpha 1	Spna1	-1,13	1,21
spectrin alpha 2	Spna2	-1,98	1,42
spectrin beta 1	Spnb1	1,26	-1,46
talin 1	Tln1	1,16	1,37
talin 2	Tln2	-1,06	1,32
cortactin	Cttn	1,38	1,05
microtubule-associated protein 1B	Mtap1b	1,05	1,10
microtubule-associated protein, RP/EB family, 1	Mapre1	1,10	1,22
microtubule-associated protein, RP/EB family, 2	Mapre2	1,33	-1,66
MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	Mark2	-1,52	1,34
serine/threonine kinase 11	Stk11	-1,38	1,36
myosin IA	Myo1a	-1,04	1,44
myosin IB	Myo1b	1,43	-1,37
myosin IC	Myo1c	1,09	-1,00
myosin ID	Myo1d	-1,33	1,08
myosin IE	Myo1e	1,00	-1,09
myosin IF	Myo1f	1,03	-1,41
myosin IG	Myo1g	1,18	-1,14
myosin IIIA	Myo3a	-1,20	1,18
myosin IIIB	Myo3b	-1,03	-1,07
myosin VB	Myo5b	1,58	-1,27
myosin VC	Myo5c	-1,15	1,15
myosin VI	Myo6	1,14	-1,25
myosin VIIA	Myo7a	1,13	-1,50
myosin VIIB	Myo7b	1,21	-1,20
myosin IXa	Myo9a	-1,31	1,40
Myosin IXb	Myo9b	1,05	1,02
myosin X	Myo10	1,28	-1,23
myosin XV	Myo15	-1,18	1,08
myosin XVB	Myo15b	1,11	-1,16

myosin XVI	Myo16	1,03	1,09
myosin XVIIIa	Myo18a	-1,10	1,08
myosin XVIIIb	Myo18b	1,22	-1,05
actin, alpha, cardiac muscle 1	Actc1	1,02	-1,09
actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	Acta2(a-SMA)	1,08	1,04
actin, beta	Actb	1,65	-1,58
actinin, alpha 1	Actn1	1,27	-1,09
actinin alpha 2	Actn2	-1,18	1,14
actinin alpha 3	Actn3	-1,09	1,03
actinin alpha 4	Actn4	-1,20	-1,03
tubulin, alpha 1A	Tuba1a	-1,20	1,02
tubulin, alpha 1B	Tuba1b	1,02	-1,24
tubulin, alpha 1C	Tuba1c	-1,28	1,15
tubulin, alpha 3A	Tuba3a	-1,08	1,06
tubulin, alpha 4A	Tuba4a	-1,56	1,30
tubulin, alpha 8	Tuba8	-1,23	1,48
tubulin, beta 1	Tubb1	-1,21	1,34
tubulin, beta 2A	Tubb2a	-2,49	1,56
tubulin, beta 2B	Tubb2b	-1,04	1,07
tubulin, beta 2C	Tubb2c	-1,36	1,24
tubulin, beta 3	Tubb3	-1,01	1,36
tubulin, beta 4	Tubb4	-1,25	1,09
tubulin, beta 5	Tubb5	-1,10	1,02
tubulin, beta 6	Tubb6	-1,09	-1,20
tubulin, delta 1	Tubd1	1,02	-1,05
epsilon-tubulin 1	Tube1	1,01	1,05
tubulin, gamma 1	Tubg1	1,23	1,26
vimentin	Vim	1,25	-1,76
keratin 8	Krt8	-1,07	-1,10

Tabla 12, *Genes relacionados con el citoesqueleto de los hepatocitos.*

En las correspondientes qRT-PCR se observó que los animales con deficiencia de IGF-1 presentaban una disminución significativa de los genes de la tubulina beta 2A, mark2 (conocida como PAR1), vinculina y actina, entre otros, que el tratamiento fue capaz de normalizar, como se ilustra en la figura 49.

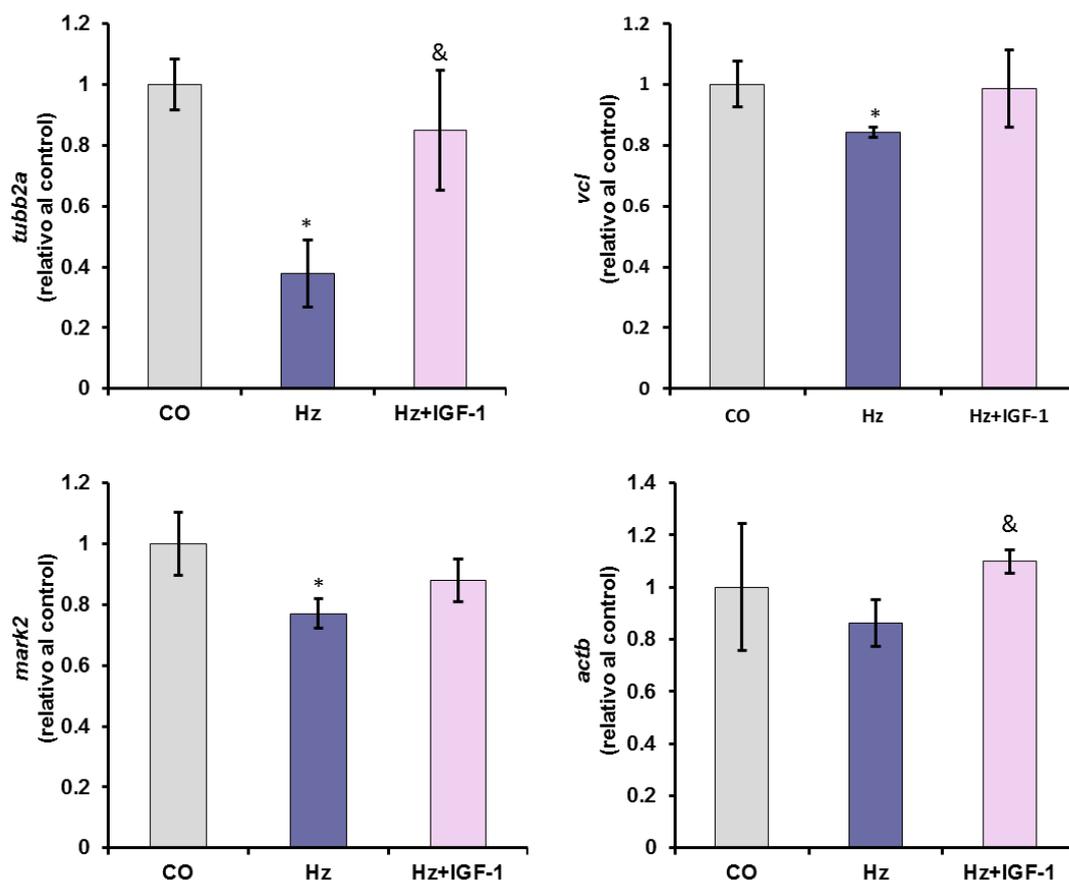


Figura 49. Expresión hepática de los genes de la tubulina, vinculina, mark2, y actina beta.
* $p < 0,05$ Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

Asimismo, del gen de la serin/treonina quinasa 11, conocida como PARII, del que también se hipoexpresó en los animales heterocigotos, el tratamiento sustitutivo permitió la recuperación de su expresión normal, según puede verse en la figura 50.

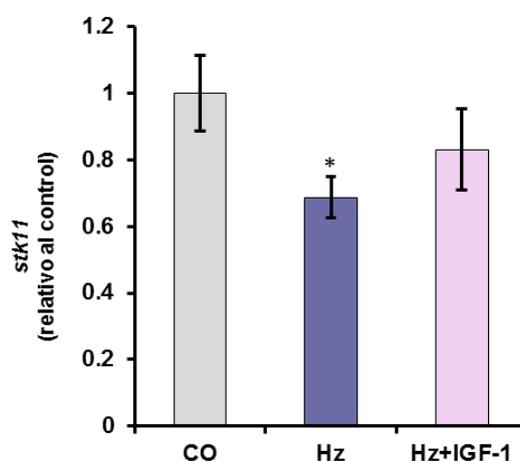


Figura 50. Expresión génica en hígado del gen *stk11*.
* $p < 0,05$ Hz vs CO.

En la tabla 12 se puede observar que el gen de la espectrina $\alpha 2$, *spna2*, se hipoexpresaba en los animales heterocigotos y presentaba normalización en los tratados, sin embargo, en la qRT-PCR se aprecia que el tratamiento substitutivo no ejerció efecto alguno: Figura 51.

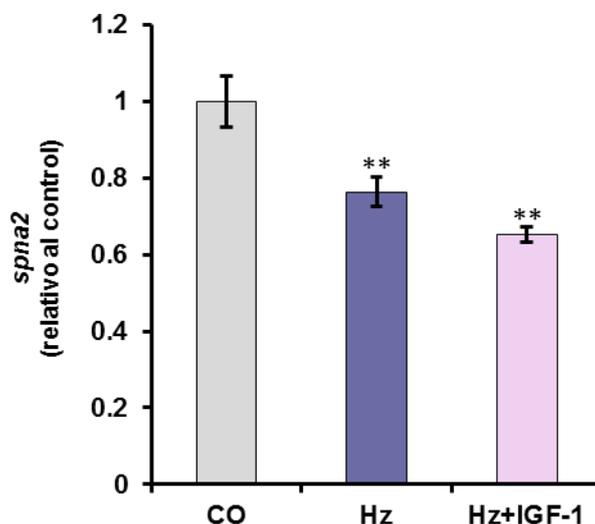


Figura 51. Expresión en hígado del gen de la espectrina alpha 2.
** $p < 0,01$ Hz vs CO.

Sin embargo, la deficiencia parcial de IGF-1 se asoció también con hiperexpresión de los genes de la miosina y de la vimentina, relevantes proteínas del citoesqueleto del hepatocito que el tratamiento sustitutivo con IGF-1 logró normalizar en 10 días: Figura 52.

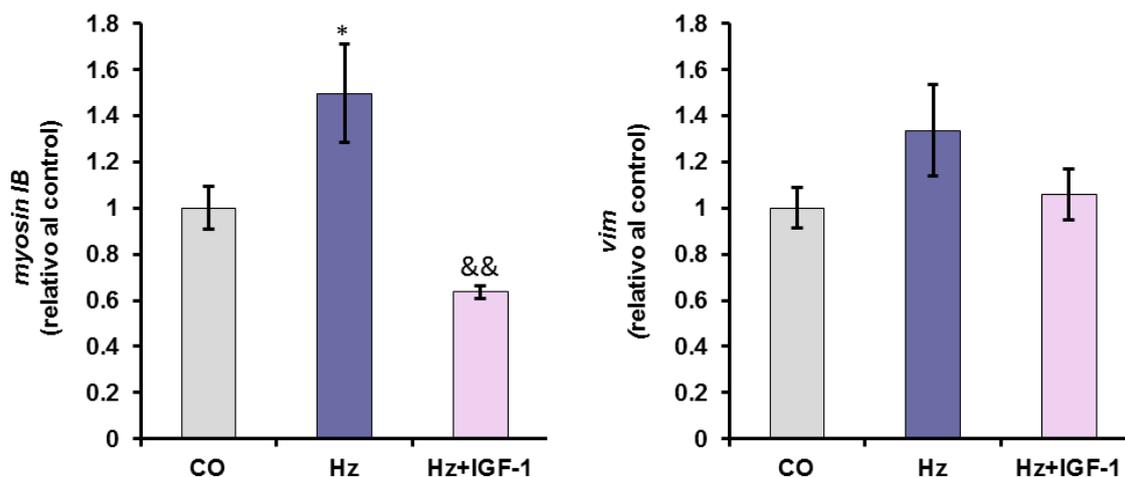


Figura 52. Hiperexpresión hepática de los genes *myosinB* y *vimentin*:
* $p < 0,05$ Hz vs CO; && $p < 0,01$ Hz+IGF-1 vs Hz.

En la Tabla 13 se resume lo encontrado respecto a la expresión relativa en los microarray, de los genes codificantes de proteínas en las uniones estrechas entre hepatocitos.

Nombre del gen		Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
claudin 1	Cldn1	-1,04	-1,23
claudin 10	Cldn10	1,06	-1,03
claudin 11	Cldn11	1,02	1,00
claudin 12	Cldn12	-1,13	1,29
claudin 14	Cldn14	2,37	-1,78
claudin 15	Cldn15	-1,10	1,14
claudin 16	Cldn16	-1,12	1,11
claudin 18	Cldn18	1,12	-1,01
claudin 19	Cldn19	-1,26	1,05
claudin 2	Cldn2	-1,17	-1,06
claudin 3	Cldn3	-1,22	1,11
claudin 4	Cldn4	-1,23	1,13
claudin 5	Cldn5	1,20	-1,02
claudin 6	Cldn6	-1,07	1,14
claudin 7	Cldn7	1,48	-1,15
claudin 8	Cldn8	-1,15	1,22
claudin 9	Cldn9	-1,14	1,00
occludin	Ocln	-1,07	1,01
endothelial cell-specific adhesion molecule	Esam	1,08	-1,23
intercellular adhesion molecule 1	Icam1	1,29	-1,33
intercellular adhesion molecule 2	Icam2	1,01	-1,12
platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	Pecam1	1,15	-1,07
F11 receptor	F11r	-1,12	-1,12
immunoglobulin superfamily, member 5	Igsf5	1,32	-1,22
junction adhesion molecule 2	Jam2	1,23	-1,60
junction adhesion molecule 3	Jam3	1,05	1,04

Tabla 13, Genes relacionados con uniones estrechas

En el estudio por qRT-PCR se confirmó la hiperexpresión de los genes de *claudina 7*, *14* y *jam2*, asimismo, se encontró hiperexpresión de *claudina 1*, que no fue detectada en el microarray; de nuevo, la terapia sustitutiva con IGF-1 fue capaz de normalizarlos logrando llegar a valores de expresión próximos a los controles (p NS Hz+IGF-1 vs CO): Figura 53.

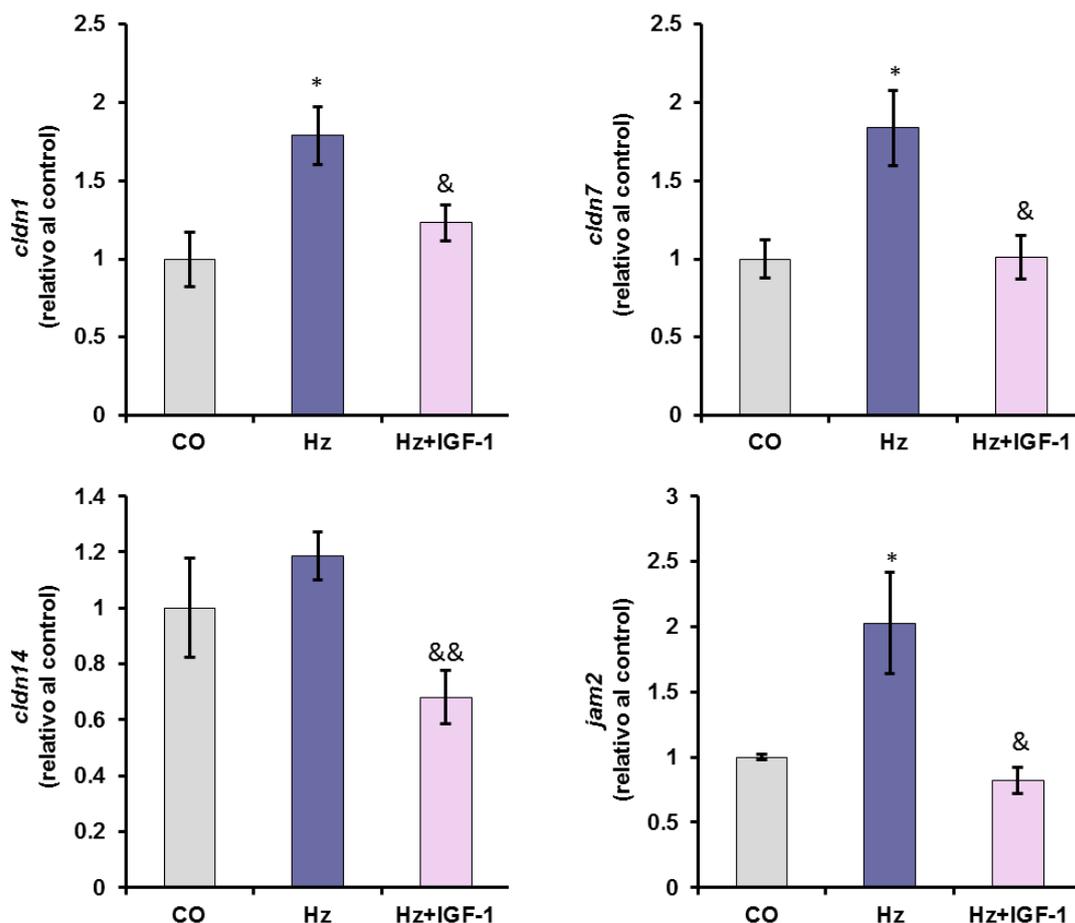


Figura 53. Hiperexpresión en hígado de los genes claudina 1, 7 y 14 y *jam2*.
* $p < 0,05$ Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz; && $p < 0,01$ Hz+IGF-1 vs Hz.

En la Tabla 14 se sintetiza la información obtenida acerca de la expresión relativa de proteínas implicadas en las uniones adherentes y desmosomas.

Nombre del gen		Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
<i>cadherin 1</i>	<i>Cdh1</i>	-1,04	2,04
cadherin 2	<i>Cdh2</i>	-1,01	1,01
cadherin 3	<i>Cdh3</i>	1,02	-1,29
cadherin 4	<i>Cdh4</i>	-1,16	1,09
<i>cadherin 5</i>	<i>Cdh5</i>	1,70	-1,80
desmocollin 1	<i>Dsc1</i>	1,01	1,09
<i>desmocollin 2</i>	<i>Dsc2</i>	1,46	-1,46
desmocollin 3	<i>Dsc3</i>	1,17	1,01
desmoglein 1 alpha	<i>Dsg1a</i>	-1,16	-1,00
desmoglein 1 beta	<i>Dsg1b</i>	1,01	-1,03
Desmoglein 2	<i>Dsg2</i>	-1,27	-1,28
poliovirus receptor-related 1	<i>Pvrl1</i>	1,04	-1,20
poliovirus receptor-related 2	<i>Pvrl2</i>	-1,19	1,44

poliovirus receptor-related 4	Pvrl4	1,08	1,17
catenin (cadherin associated protein), alpha 1	Ctnna1	-1,12	-1,16
catenin (cadherin associated protein), alpha 2	Ctnna2	-1,02	-1,02
catenin (cadherin associated protein), alpha 3	Ctnna3	-1,23	1,14
catenin (cadherin associated protein), beta 1	Ctnnb1	1,25	-1,33
catenin (cadherin associated protein), delta 1	Ctnnd1	-1,20	1,07
desmoplakin	Dsp	1,53	1,04
junction plakoglobin	Jup	1,03	-1,05
plakophilin 1	Pkp1	-1,24	1,21
plakophilin 2	Pkp2	-1,06	1,15
plakophilin 3	Pkp3	1,16	1,08
plakophilin 4	Pkp4	-1,31	1,10
pinin	Pnn	-1,09	-1,15
periplakin	Ppl	1,20	-1,20

Tabla 14: Genes de proteínas implicadas en uniones adherentes y desmosomas

Cuando las muestras se procesaron por qRT-PCR se confirmó que los ratones con deficiencia parcial de IGF-1 mostraban hiperexpresión de cadherina-1, cadherina-5 y desmocolina-2, y que la terapia sustitutiva con IGF-1 sólo normalizó la expresión génica en el caso de las cadherinas-1 y 5: Figura 54.

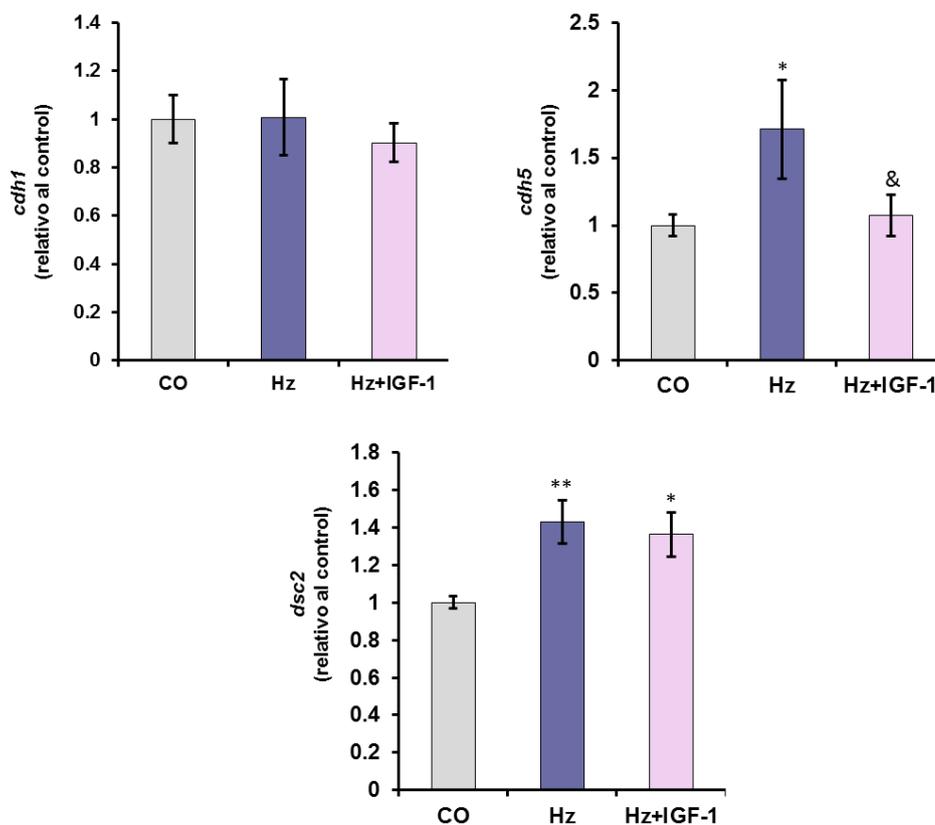


Figura 54. Expresión en hígado de los genes que codifican para proteínas implicadas en uniones adherentes y desmosomas.

* $p < 0,05$ Hz vs CO; ** $p < 0,01$ Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz.

Dentro de este apartado se estudió también la expresión génica de las proteínas involucradas en las uniones de hendidura, y no se encontraron hallazgos relevantes entre los tres grupos de experimentación, como se deja ver en la Tabla 15.

Nombre del gen		Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
gap junction protein, alpha 1	Gja1	-1,23	1,17
gap junction protein, alpha 3	Gja3	1,04	1,15
gap junction protein, alpha 4	Gja4	1,11	-1,10
gap junction protein, alpha 5	Gja5	1,07	-1,05
gap junction protein, alpha 8	Gja8	-1,01	1,20
gap junction protein, beta 1	Gjb1	1,11	1,15
gap junction protein, beta 2	Gjb2	1,18	-1,37
gap junction protein, beta 3	Gjb3	1,07	-1,02
gap junction protein, beta 4	Gjb4	1,11	-1,03
gap junction protein, beta 5	Gjb5	1,02	1,14
gap junction protein, beta 6	Gjb6	-1,11	1,00
gap junction protein, gamma 2	Gjc2	-1,24	1,20
gap junction protein, gamma 3	Gjc3	-1,04	-1,11
gap junction protein, delta 2	Gjd2	1,19	-1,00
gap junction protein, epsilon 1	Gje1	1,09	-1,04
pannexin 1	Panx1	-1,12	-1,09
pannexin 2	Panx2	1,19	1,12
pannexin 3	Panx3	-1,15	1,12

Tabla 15, *Genes relacionados con uniones en hendidura*

Dado que encontramos alteraciones significativas en la organización del parénquima hepático, se estudió también la expresión de genes que codifican para proteína de la matriz extracelular: cfr. Tabla 16.

Nombre del gen		Hz vs WT (Fold change)	Hz+IGF vs Hz (Fold change)
proteoglycan 2	Prg2	1,14	-1,12
perlecan	Hspg2	1,14	1,14
proteoglycan 3	Prg3	1,11	-1,10
proteoglycan 4	Prg4	2,21	-2,24
chondroitin sulfate proteoglycan 4	Cspg4	-1,01	1,07
chondroitin sulfate proteoglycan 5	Cspg5	1,11	1,04
hyaluronan 1	Hapln1	1,18	-1,15
hyaluronan 2	Hapln2	1,55	-1,12

elastin	Eln	-1,22	1,14
collagen, type I, alpha 1	Col1a1	-1,10	-1,07
collagen, type I, alpha 2	Col1a2	-1,58	1,13
collagen, type III, alpha 1	Col3a1	-1,71	1,08
collagen, type IV, alpha 1	Col4a1	1,28	-1,13
collagen, type IV, alpha 2	Col4a2	1,17	-1,05
collagen, type IV, alpha 3	Col4a3	-1,34	1,10
collagen, type IV, alpha 4	Col4a4	-1,21	-1,01
collagen, type V, alpha 2	Col5a2	1,66	-3,99
fibronectin 1	Fn1	1,50	-1,45
matrix metalloproteinase 2	Mmp2	-1,06	1,05
matrix metalloproteinase 3	Mmp3	1,34	-1,15
matrix metalloproteinase 9	Mmp9	1,10	1,15
integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Itga5	-1,03	1,02
integrin alpha V	Itgav	-1,19	1,02
integrin beta 2	Itgb2	2,46	-2,03

Tabla 16. Genes que codifican para proteínas de la matriz extracelular

Se observó que los animales con deficiencia parcial de IGF-1 presentaban una hipoexpresión de los genes que codifican para el Colágeno $\alpha 2$ tipo I y $\alpha 1$ tipo III, mientras que hiperexpresaban el gen del proteoglicano 4, del colágeno $\alpha 2$ -tipo V, de la fibronectina 1 y de la integrina $\beta 2$. Aunque por razones presupuestales no fue posible confirmar o descartar estos últimos resultados, pudo establecerse por qRT-PCR la significativa hipoexpresión del gen *itgb2* (contrario a lo sugerido por el microarray) en los animales Hz y su normalización tras el tratamiento sustitutivo con IGF-1.

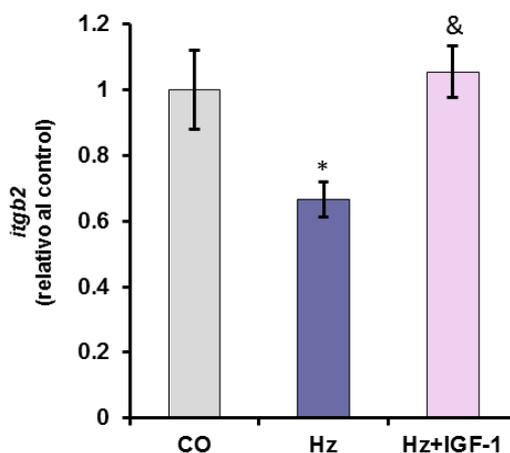


Figura 55. Expresión del gen (qRT-PCR) de la integrina $\beta 2$ en los tres grupos experimentales.

* $p < 0,05$ Hz vs CO; & $p < 0,05$ Hz+IGF-1 vs Hz; $p = NS$ Hz+IGF1 vs CO.

V. DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la mera deficiencia parcial de IGF-1 se asocia con claras alteraciones en la arquitectura hepática, que se acompañan de una expresión alterada de genes que codifican para proteínas del citoesqueleto, implicadas en la polaridad de los hepatocitos y en las uniones intercelulares, así como en las principales proteínas de la matriz extracelular (Colágenas tipo I y III), proteoglicanos, fibronectina, integrina- β 2 y el CTGF (IGFBP-8).

Además, los animales deficientes hiperexpresaban el gen del receptor de IGF-1 en hígado, que no se expresa en condiciones normales, sugiriendo que la sola deficiencia de IGF-1 convierte al hígado en un órgano “más vulnerable” al daño oxidativo.

En este sentido, se encontró que los animales deficientes mostraban también una hiperexpresión de genes que codifican para proteínas de fase aguda, del complemento y proapoptóticas, y que la administración exógena de IGF-1 lograba disminuir a valores de expresión similares a los controles.

V.1. EL MODELO EXPERIMENTAL DE ANIMALES HZ (IGF^{+/-}) REPRODUCE CON APROXIMACIÓN LA DEFICIENCIA “PARCIAL” DE IGF-1, Y RESULTA IDÓNEO PARA ESTUDIAR LOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS QUE ACOMPAÑAN A LA SOLA DEFICIENCIA DE IGF-1.

El presente trabajo se enmarca en una extensa serie de estudios centrados en la caracterización de “condiciones de deficiencia de IGF-1”, y en el estudio de los efectos de la administración exógena de dosis bajas de esta hormona. Las condiciones de deficiencia de IGF-1 mejor conocidas en la patología humana son: La cirrosis hepática, el envejecimiento y el Síndrome de Laron. Recientemente otras enfermedades, como las neurodegenerativas, el crecimiento intrauterino retardado y el síndrome de ovario poliquístico, parecen relacionarse con la deficiencia local o sistémica de IGF-1 (Picardi et al., 1996; Castilla-Cortázar 1997; Castilla-Cortázar 2000; Wang et al., 2003; Le Roith et al., 2008; Torres-Alemán, 2008; D’Ercole, 2008; Koutsaki et al., 2011), por lo

que la deficiencia de IGF-1 y sus implicaciones patológicas adquieren un creciente interés.

En nuestra línea de investigación, después de estudiar los efectos de la administración exógena de IGF-1 en la cirrosis experimental y en el envejecimiento, sobre múltiples órganos y tejidos (hígado, SNC, hueso, testículo, tubo digestivo, músculo entre otros), se nos planteó la necesidad de descubrir los mecanismos fisiopatológicos que respondían, exclusivamente, a la deficiencia de IGF-1.

Por este motivo, nos planteamos como prioridad disponer de un modelo experimental de “deficiencia parcial de IGF-1” que pudiera ser idóneo para investigar los mecanismos de acción específicos de esta hormona, es decir, que constituyeran un factor causal en la fisiopatología del síndrome estudiado, y que pudieran ser revertidos por la terapia sustitutiva con este factor de crecimiento.

Aunque inicialmente pretendimos utilizar para esta fin los animales *Knockout* cedidos por el Prof. Efstratiadis (Liu et al., 1993), en seguida comprendimos (Guerra et al., 2012; Gago, 2012; Iturriate I., 2013; Puche I.E., 2013) que eran más bien los animales heterocigotos los que reproducían una condición de “deficiencia parcial” compatible con la vida y con el desarrollo, y que reproducía las descritas en la patología humana.

En este estudio, como en los cuatro precedentes con este modelo, se pone de manifiesto que estos animales heterocigotos, además de presentar disminuidas las concentraciones circulantes de IGF-1, expresaban niveles reducidos del gen de IGF-1 en hígado (además de en hueso, cerebro y testículo) por lo que entendemos que este modelo experimental se acomoda adecuadamente a los objetivos del trabajo.

V.2. ELECCIÓN DE DOSIS BAJAS ($2\mu\text{G}\cdot 100\text{G}^{-1}\cdot \text{DÍA}^{-1}$) DE IGF-1 COMO TERAPIA SUSTITUTIVA.

Con respecto a la elección de la dosis de IGF-I a utilizar nos fundamentamos en estudios previos en los que se comprobó que dosis bajas de IGF-1 ($2\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\cdot \text{día}^{-1}$) mostraban efectos beneficiosos sin efecto adverso alguno.

La elección de esta dosis, inicialmente, respondió al intento de aportar una terapia sustitutiva, evitando posibles efectos secundarios como la hipoglucemia.

La eficacia de dosis tan bajas de IGF-1 está ampliamente demostrada por nuestro grupo, en estudios realizados en cirrosis hepática experimental, en estadios avanzados o en estadios incipientes de la enfermedad hepática crónica y en envejecimiento, demostrando que estas dosis son capaces de elevar las concentraciones circulantes de la hormona hasta valores similares a los del grupo control (Castilla-Cortázar I, et al., 2000 y 2004; Jaraiz et al., 2008).

Por otra parte, encontramos que en estadios incipientes de la cirrosis hepática, la administración de dosis bajas de IGF-1 tenía efectos beneficiosos, a pesar de que no se detectaron concentraciones bajas de IGF-1 (Castilla de Cortázar I, et al., 1997, 1999, 2000 y 2001; Picardi et al., 1997; Mugerza et al., 2001; Mirpuri et al., 2002), sugiriendo que en estadios incipientes de la enfermedad hepática, a pesar de no estar comprometidas las concentraciones circulantes de esta hormona, parece estar disminuida su biodisponibilidad, probablemente por estar incrementadas las concentraciones circulantes de IGFBP-3 (Picardi et al., 1997), proteína transportadora que "secuestra" el IGF-1 en suero disminuyendo su biodisponibilidad e incrementando su vida media.

En nuestra experiencia en la cirrosis hepática, se verificó la eficacia de estas dosis de IGF-1 sobre el estado nutricional, la absorción intestinal de azúcares y aminoácidos, la osteopenia, el hipogonadismo y la fibrosis hepática a dosis de $2\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\cdot \text{día}^{-1}$ (Picardi et al., 1996; Castilla-Cortázar I, et al., 1997, 1999, 2000, 2004; Cemborain et al., 1997; Pascual et al., 2000; Mugerza et al., 2001). En estos trabajos, el tratamiento indujo efectos anabolizantes y

antioxidantes, y en ningún caso estas pautas de tratamiento provocaron hipoglucemia, al contrario, se revirtió ésta, probablemente por mejoría en la absorción intestinal de azúcares (Castilla-Cortázar 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 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ (con escalada de dosis hasta 50 – 1000 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$), 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 acerca del envejecimiento, otra condición de deficiencia de IGF-1, se eligieron dosis similares ($2,25\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$) que igualmente elevaron las concentraciones de IGF-1, induciendo acciones anabolizantes y antioxidantes a la vez que se evitaba cualquier efecto hipoglucemiante (García-Fernández M., et al., 2008).

Dosis superiores (60-80 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) fueron eficaces en el tratamiento de la osteopenia en mujeres postmenopáusicas, aunque produjeron efectos secundarios. Dosis más bajas (30 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$) estimularon la renovación ósea sin provocar efectos adversos (Ebeling P.R., et al., 1993). En otros estudios con dosis de 24 a 32 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ se han observado efectos secundarios como artralgias, mialgias, astenia, dolor mandibular y edema en cara y manos (Bondy, et al., 1994). Otros trabajos demostraron que dosis mayores de 2600 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ son letales por su efecto hipoglucemiante (Bagi et al, 1994).

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

En nuestro actual estudio, la administración exógena de dosis bajas de IGF-1 semejantes a la de anteriores trabajos, logró normalizar las concentraciones circulantes de esta hormona en animales deficientes en IGF-1, de modo que

estos resultados son congruentes con todos los anteriores, y nos confirman una vez más la eficacia de esta hormona a dosis bajas, que se comporta como una verdadera “terapia sustitutiva”, sin inducir efecto adverso alguno.

V.3. LA TERAPIA SUSTITUTIVA CON IGF-1 NORMALIZÓ LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE IGF-1 A LA VEZ QUE INCREMENTABA LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DEL GEN DE IGF-1 Y DEL GEN DE IGFBP1.

El hígado es la principal fuente de IGF-1 (~75%), tras la estimulación de los hepatocitos por la hormona de crecimiento (Cohick W.S., Clemmons D.R. 1993; Ohlson C. et al., 2009; Froesch E.R. et al., 1985; Sjogren K. et al., 1999). A pesar de ello, poco se conoce acerca del papel del IGF-1 sobre el propio tejido hepático en condiciones normales (Skrtic S. et al., 1997), probablemente debido al reducido número 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., 1997), que constituyen alrededor del 80% del tejido hepático (Malarkey D.E., et al., 2005); es decir, en condiciones normales, el hígado no es un órgano “diana” para IGF-1.

Hasta el momento, en los órganos estudiados previamente (encéfalo, hueso, testículo) igual que ha sucedido para el hígado en este trabajo, encontramos una reducción significativa de la expresión de IGF-1, como era esperable por tratarse de un modelo con una delección sistémica del gen *igf-1*. Uno de los datos más relevantes del presente estudio centrado en el hígado, es que la terapia sustitutiva incrementó significativamente la expresión del gen de IGF-1, cambio en la expresión génica que no ocurrió en el resto de los tejidos estudiados (Guerra L., 2012; Gago A., 2012; Iturrieta I., 2013 y Puche I. E., 2013).

Por tanto, podríamos decir, a partir de estos resultados, que la normalización de las concentraciones circulantes de IGF-1 se debe no solo a la administración exógena, sino a la mejoría de la producción endógena de esta hormona, de síntesis fundamentalmente hepática. La comprobación de esta

sugerencia requeriría que se demostrase la síntesis de la proteína específica, por ensayos como el Western blot, y será motivo de trabajos posteriores, actualmente en curso.

Por otra parte, la IGFBP1 es una proteína fundamentalmente de síntesis hepática, de bajo peso molecular, capaz de transportar el IGF-1 y facilitar su acceso a los tejidos, al atravesar los capilares (Cohick W.S., Clemmons D.R. 1993). En este modelo, se encontró que la expresión de IGFBP1 estuvo significativamente reducida, y el tratamiento sustitutivo, en solo 10 días, la normalizó.

Sin embargo, no se observó reversión de la hipoexpresión génica de otras BPs como la IGFBP3, IGFBP5 e IGFBP8, cuya expresión se encontró comprometida en los animales deficientes de IGF-1. Como ya se ha comentado, de éstas, IGFBP-3 es la proteína de unión más importante, la que muestra mayor afinidad, y la que tiene mayor concentración plasmática (Langford K.S. et al., 1993; Baxter R.C., 1994). Unida a la glicoproteína ALS (*Acid-labile subunit*) forma un complejo ternario que le da estabilidad, y de este modo actúa como reservorio de IGF-1, siendo el principal mecanismo fisiológico para prolongar la vida media de éste en la circulación (Clemmons D.R. et al., 1992; Thissen J. P. et al., 1994; Smith W.J. et al., 1995). De este modo, modula la acción de IGF-1 a nivel tisular, al impedir su acceso a los tejidos, con lo que se inhibiría el crecimiento y sus efectos anabólicos relacionados, o facilitar el crecimiento a través de aumentar la interacción de IGF-1 con sus receptores (Clemmons D.R. et al., 1992). En cuanto a los resultados relativos a IGFBP-8, se discutirán en el apartado siguiente.

V.4. NOVEDOSOS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS EN HÍGADO, SECUNDARIOS A LA DEFICIENCIA PARCIAL DE IGF-1: POLARIDAD DE LOS HEPATOCITOS Y ARQUITECTURA HEPÁTICA.

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 desencadenado 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. En este contexto, fuimos capaces de relacionar la deficiencia de IGF-1 con la desnutrición progresiva que sufre el paciente cirrótico, con pérdida de peso, hipoproteinemia, reducción de masa muscular, malabsorción intestinal, osteopenia, hipogonadismo, etc.). Nuestros trabajos precedentes en cirrosis experimental inducida por CCl₄ nos han permitido aclarar en parte el papel fisiopatológico de IGF-1 en la progresión de la enfermedad hepática crónica. En concreto, nuestro grupo demostró que el tratamiento con rhIGF-1 en cirrosis experimental inducía: un aumento de la eficacia de la dieta, con mayor absorción de nitrógeno y mejor balance nitrogenado (Picardi A. et al., 1997); la normalización de la absorción intestinal de aminoácidos y azúcares (Castilla-Cortázar I. et al., 1997; Castilla-Cortázar I. et al., 1999; Pascual M. et al., 2000) incluyendo animales con cirrosis descompensada y ascitis (Castilla-Cortázar I. et al., 2004), mejorando el metabolismo de la glucosa (Castilla-Cortázar I. et al., 1997), disminuyendo la hipertensión portal, la endotoxemia y la translocación bacteriana (Lorenzo-Zúñiga V. et al., 2006), mejorando la osteopenia tanto en la cirrosis compensada como en la ascítica (Cemborain A. et al., 2000; Cemborain A. et al., 1998) y la morfología y función testicular (Castilla-Cortázar I. et al., 2000; Castilla-Cortázar I. et al., 2000 a; Castilla-Cortázar I. et al., 2004), recuperando el tono somatostatinérgico (Castilla-Cortázar I. et al., 2001) con mejoría de la función hepática (aumento de la albuminemia y factores de la coagulación) y disminuyendo el daño oxidativo y la fibrosis hepática (Castilla-Cortázar I. et al., 1997; Mugerza B. et al., 2001).

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

Sin embargo, la coexistencia o preexistencia de otros factores fisiopatológicos (como es el caso de la cirrosis hepática, hepatectomía parcial, etc.) hacen que

los efectos de la sola deficiencia de IGF-1 sean menos evidentes, o incluso, costosamente reconocibles o discutibles. En este contexto, entendemos que el establecimiento de un modelo experimental en el que sólo se reproduzca la deficiencia parcial de IGF-1, es un instrumento imprescindible para poder discernir todas aquellas disfunciones de las que es responsable el déficit de IGF-1, en las que sería esperable que la terapia sustitutiva ejerciera efectos beneficiosos.

En primer lugar, en el presente estudio se encontró que la sola deficiencia de IGF-1 se asociaba con una disminución del peso hepático absoluto, y con evidente alteración de la arquitectura hepática, utilizando elementales técnicas de histología convencional, en cortes teñidos con H&E. Como ya se ha mencionado, la incorrecta formación de los cordones de hepatocitos –cfr. figuras 38 y 39), se asoció con hipoexpresión de genes que codifican para proteínas del citoesqueleto y de las uniones intercelulares, tales como: *tubb2a* (Tubulina β 2-A), *vcl* (Vinculina), *mark2* (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2) y *actb* (Actin β), que la terapia sustitutiva con IGF-1 mejoró o normalizó, aproximando los valores de expresión a los de los controles, salvo en el caso de la espectrina α 2 .

MARK2, también conocido como EMK1, es el homólogo de PAR-1 en mamíferos, PAR-1, de la familia de proteínas PAR, juega un importante papel en el desarrollo de o bien un epitelio columnar (típico de órganos como riñón e intestino) o bien un epitelio hepático. En función de sus diferentes niveles de expresión, puede modular la formación de distintos tipos de lúmenes. Si sus niveles de expresión son bajos, se formará un lumen típico de un epitelio columnar con una orientación vertical de los microtúbulos. Por el contrario, si sus niveles de expresión son altos, se produce la formación de un lumen en puntos de contacto célula-célula (canalículo biliar) típico de los hepatocitos, con una disposición horizontal de los microtúbulos (Cohen *et al*, 2004a). Además, produce la reorganización del tráfico proteico, tal y como se ha observado en células de riñón MDCK (Madin-Darby canine kidney), en las cuales cambia el modo directo de transporte de proteínas de nueva síntesis (desde el aparato de Golgi hacia el lumen) por la ruta de transocitosis (en donde las proteínas pasan

primero por los endosomas basolaterales antes de llegar al lumen apical) típica de los hepatocitos, cuando sus niveles de expresión son altos (Cohen *et al*, 2004b; Pombo *et al*, 2012).

En sentido contrario, la deficiencia de IGF-1 y la pérdida de alineación de los hepatocitos se acompañaron con la hiperexpresión de genes que codifican para otras proteínas del citoesqueleto o de las uniones intercelulares, como son: *myo1b* (Myosin 1B), *vim* (Vimentin), *cldn1* (Claudina 1), *cldn7* (Claudina 7), *cldn14* (Claudina 14), *jam2* (JAM, Junction adhesion molecule 2), *cdh1* (Cadherina 1), *cdh5* (Cadherina 5) y *dsc2* (Desmocollin 2). En estos casos, la terapia sustitutiva fue capaz de revertir lo observado en todas estas proteínas, excepto Desmocollin 2, cfr. figuras 52, 53 y 54.

Las Claudinas son responsables de la permeabilidad a solutos y electrolitos en las uniones estrechas, la delección de *cldn7* en ratones se ha asociado a pérdida grave de sal, mutaciones en *cldn14* se asocian a daño coclear profundo y sordera (Niessen *et al*, 2007; Soini, 2012; Ichikawa-Tomikawa *et al*, 2011).

JAMs, glicoproteínas transmembrana emparentadas con las inmunoglobulinas funcionan como componentes de las uniones estrechas que impide mezcla de proteínas entre los dominios apical y basolateral de la membrana de los hepatocitos, JAMs de células vecinas se unen para formar dobletes (Ichikawa-Tomikawa *et al*, 2011; Lee y Luk, 2010; Niessen *et al*, 2007).

Las Cadherinas son parte de la gran familia de proteínas adhesivas dependientes de Ca^{2+} (Harstock y Nelson, 2008). E-cadherina (*cdh-1*, caderina-1 ó uvomorulina) es una glicoproteína de membrana de un solo paso perteneciente a esta familia, que es requerida para la unión y localización de un gran número de proteínas citoplásmicas que conectan el complejo cadherina con el citoesqueleto de actina y diversas vías de señalización. Estas proteínas son las cateninas, entre las que destacan catenina-p120 (subfamilia en la que se encuentra la catenina- δ (Carnham *et al*, 2010) y las placofilinas, encontradas fundamentalmente en desmosomas (Niessen, 2007)), catenina- β y catenina- α de las células endoteliales, proceso dependiente de la correcta

formación de contactos célula-célula (Caveda *et al*, 1996; Lampugnani *et al*, 1992). En la figura 57 se ilustra cómo E-cadherina/Cdh-1 interviene en diversas vías de señalización.

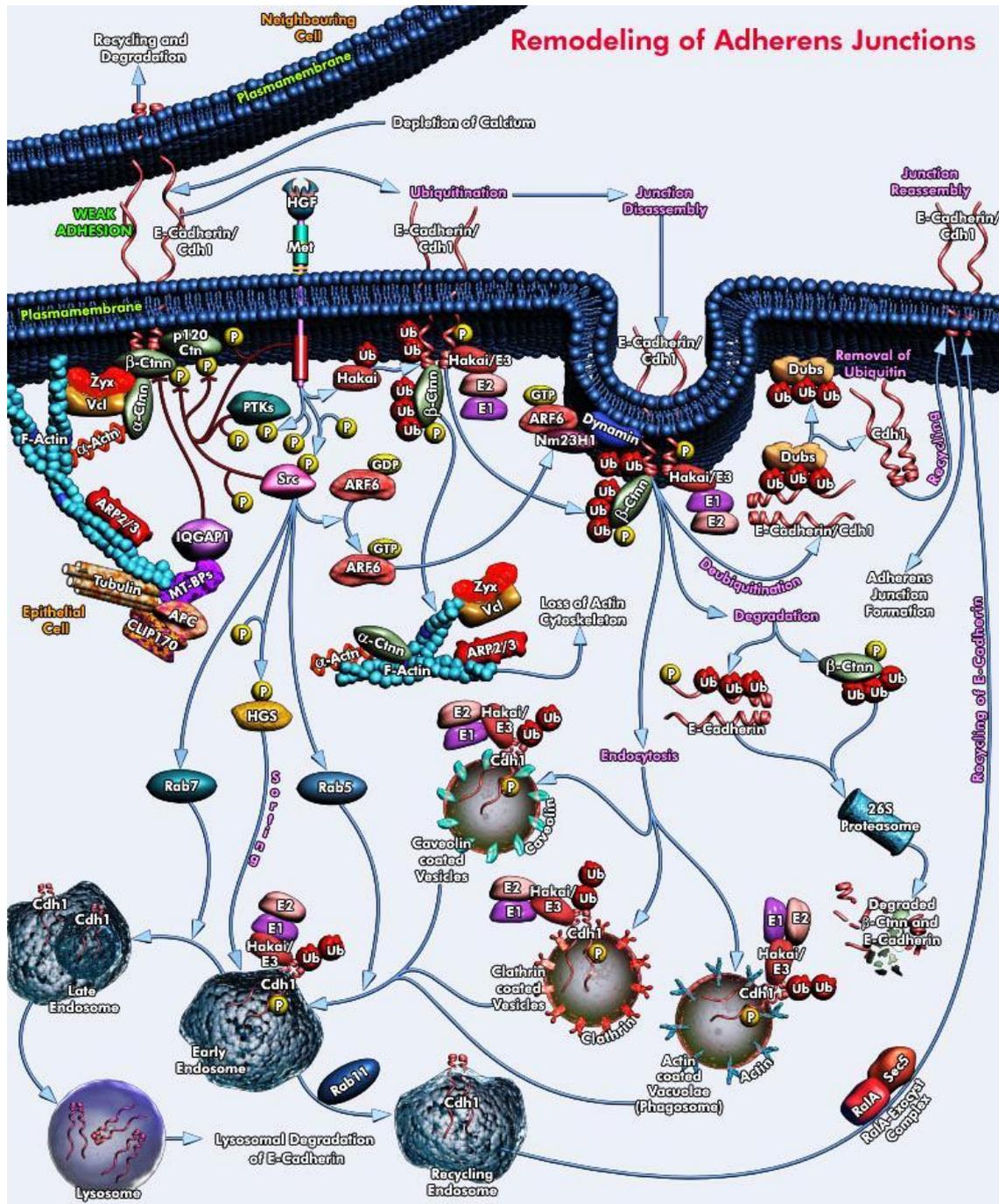


Figura 57. Representación esquemática de la función de las Cadherinas y su unión con las Cateninas, entre las que la catenina- α , la catenina- β y la catenina P120 juegan un papel preponderante, siendo responsable de la activación o inactivación de diferentes vías de señalización intracelulares

La cadherina-5 o VE-cadherina (vascular-endotelial cadherin) es expresada en hendiduras intercelulares en el endotelio y, además de unirse a cateninas para formar las uniones adherentes entre células, es necesaria para la proliferación de las células endoteliales, proceso dependiente de la correcta formación de contactos célula-célula (Caveda *et al*, 1996; Lampugnani *et al*, 1992).

La Desmocolina 2 es una proteína desmosomal perteneciente a la familia de las Cadherinas, también participa en la formación de uniones adherentes intercelulares dependientes de Ca^{2+} (Collins *et al*, 1991), la disminución en su expresión promueve la proliferación celular permitiendo el desarrollo de tumores colorrectales, debido a que activa la vía de señalización Akt/ β -catenina (Kolleggratt *et al.*, 2010).

Estos resultados parecen sugerir que la deficiencia de IGF-1 compromete la correcta polarización de los hepatocitos y el consiguiente alineamiento de los mismos, alterando la formación de los cordones hepatocitarios típicos de la peculiar arquitectura de este órgano.

Otro dato que merece especial mención es que los animales deficientes de IGF-1 presentaron una hipoexpresión de las principales proteínas de la matriz extracelular hepática (Colágeno I y Colágeno III), así como del CTGF, que es la IGFBP8, implicadas en el proceso de formación de la matriz extracelular, aunque proteoglicanos y fibronectina se hiperexpresaron.

El CTGF, inicialmente conocido como IGFBP-rP2, equivalente a IGFBP-8 (Kim H.S. *et al.*, 1997) tiene función en la formación de la matriz extracelular. Por ello, es de gran importancia tanto en condiciones fisiológicas (homeostasis tisular) como patológicas (fibrosis) (Nguyen T.Q. *et al.*, 2008). Así, cuando esta proteína se hiperexpresa, se aprecian acúmulos de matriz extracelular, que en los diferentes órganos pueden manifestarse como fibrosis hepática, renal ó pulmonar (Oemar B.S. y Luscher T.F., 1997), mientras que cuando esta proteína es deficiente o ausente, se observan 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 $\text{TGF}\beta$, angiotensina II, aldosterona, glucocorticoides y VEGF,

entre otros. Un esquema de estas interacciones se ha representado en la figura 21.

Asimismo, esta proteína tiene interacción con una gran variedad de moléculas implicadas en el remodelado de matriz extracelular (TGF- β 1, TGF- β 2 y fibronectina), permeabilidad vascular y angiogénesis (VEGF), adhesión celular y migración (integrinas), entre otras (Oliver N. *et al*, 2010).

Los resultados en el presente trabajo no son suficientes para concluir acerca del alcance que la hipoexpresión de CTGF puede tener en el hígado.

Aunque harán falta ulteriores estudios, todos estos resultados parecen indicar que la deficiencia de IGF-1 se asocia con una mayor vulnerabilidad hepática a la agresión, incluido el daño oxidativo que acompaña a las diferentes funciones fisiológicas, como se comentará en el apartado siguiente.

Para dilucidar el alcance terapéutico de estos datos se ha iniciado un protocolo en que los animales deficientes de IGF-1 reciben daño agudo con tetracloruro de carbono.

V.5. LA MERA DEFICIENCIA DE IGF-1 SE ASOCIÓ CON UN INCREMENTO DEL DAÑO OXIDATIVO HEPÁTICO, Y DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS DE FASE AGUDA, FACTORES DEL COMPLEMENTO, CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS Y FACTORES PREAPOPTÓTICOS, ASÍ COMO LA REDUCCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE FACTORES ANTIAPOPTÓTICOS.

Uno de los resultados más relevantes del presente trabajo es que la sola deficiencia de IGF-1 se asoció con un incremento significativo de la peroxidación lipídica, que la terapia sustitutiva fue capaz de revertir (Figura 40). Puesto que en este protocolo los animales no han recibido ningún daño oxidativo, la peroxidación lipídica en hígado sólo puede ser el resultado de la peroxidación secundaria a procesos fisiológicos (respiración mitocondrial, estallido respiratorio de la fagocitosis, metabolismo de tóxicos, etc.), sugiriendo que los animales deficientes de IGF-1 son más vulnerables al estrés oxidativo.

En este sentido, se encontró que los animales Hz (Igf+/-) mostraron una hiperexpresión de genes relacionados con las proteínas de fase aguda, factores del complemento, citoquinas proinflamatorias (cfr. figuras 41-A y 41-B) y factores proapoptóticos (cfr. figura 42); asimismo, se hipoexpresaron genes relacionados con proteínas inhibidoras de la apoptosis, como con gadd45a y las proteínas de choque térmico (HSP; cfr. figura 43).

La administración exógena de IGF-1 a dosis bajas, en solo 10 días de tratamiento, normalizó estos genes, sugiriendo una respuesta antiinflamatoria y antiapoptótica, en hígado de animales que, de nuevo, no habían recibido agresión oxidativa alguna.

Estos resultados son congruentes con el efecto hepatoprotector descrito en la cirrosis experimental (Castilla-Cortázar I., et al, 1997; Muguerza B. et al., 2001; Mirpuri E., et al., 2002; García-Fernández M. et al., 2005; Pérez R., et al., 2008 y Tutau F. et al., 2009) con recuperación de la función mitocondrial. Estudios en marcha en este mismo modelo experimental pretenden dilucidar si la sola deficiencia de IGF-1 se asocia con disfunción mitocondrial.

V.6. EXPRESIÓN HEPÁTICA DEL RECEPTOR DE IGF-1 EN CONDICIONES NORMALES Y FISIOPATOLÓGICAS.

Como ya se ha mencionado, el hígado no es un órgano diana para el IGF-1. De hecho, los hepatocitos no expresan el receptor de IGF-1 en condiciones normales (Froesch E.R. et al., 1985; Caro J.F. et al., 1988; Skrtic S. et al., 1997; Cohick W. S., Clemmons D.R. 1993). Sin embargo, las células hepáticas no parenquimatosas (Células de Kupffer, células estrelladas, etc.) expresan IGFR (Skrtic S. et al., 1997; Malarkey D.E. et al., 2005) donde promueve la síntesis de ADN (Pinzanni M., et al, 1990; Gressner A.M., et al, 1993) así como la producción del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en las células estrelladas hepáticas (Skrtic S. et al., 1997).

En condiciones de regeneración hepática (por ejemplo, tras una hepatectomía parcial) donde se requieren altas tasas de replicación de hepatocitos, se ha demostrado el papel de apoyo de IGF-1, al estimular la proliferación de hepatocitos y acelerar la síntesis de ADN (Pennisi P.A. et al, 2004; Desbois-Mouthon C. et al, 2006) junto con IL-6, TNF- α , HGF, y TGF- α /EGF (Fausto N. et al, 1995; Cressman D.E. et al, 1996).

Esta notable diferencia podría deberse al incremento de receptores de IGF-1 que parece acontecer durante el daño hepático (Stefano J.T. et al., 1996).

En nuestra experiencia, el hígado sano, no agredido, no expresa IGFR, al menos en la edad adulta, sin embargo, lo expresa el hígado cirrótico, y también cuando ha recibido daño oxidativo agudo (Castilla-Cortázar I., datos no publicados). En el presente estudio, los animales con deficiencia de IGF-1 sobreexpresaron el gen *igfR*, esto inicialmente podría ser entendido como una respuesta compensatoria al déficit de IGF-1. En las coordenadas conceptuales que propiciaron los resultados de este trabajo, la hiperexpresión del gen del receptor de IGF-1 también podría ser interpretada como un signo “defensivo” de un hígado “per se” más vulnerable al daño. En condiciones fisiopatológicas, la expresión del receptor de IGF-1 tiene ese significado, por las acciones antiinflamatorias, anabolizantes y citoprotectoras de esta hormona.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en el presente trabajo con ratones de 25 semanas de edad nos permiten inferir las siguientes conclusiones:

1. Este estudio confirmó, como trabajos precedentes, que los animales heterocigotos (Hz *Igf-1*^{+/-}) presentan concentraciones circulantes de IGF-1 significativamente bajas, que son reversibles a la administración exógena de rhIGF-1 por vía subcutánea, a dosis de 2 µg/100 g peso corporal/día durante 10 días.
2. En este modelo experimental que hipoexpresa sistémicamente IGF-1, en el hígado - principal fuente de síntesis de esta hormona - el tratamiento sustitutivo promovió la normal expresión del gen *igf-1*, que podría estar contribuyendo a la normalización de sus concentraciones circulantes.
3. Por otra parte, los animales deficientes mostraron un incremento en la peroxidación lipídica en hígado, con hiperexpresión de genes relacionados con proteínas del complemento, proinflamatorias, así como hipoexpresión génica de enzimas antioxidantes y factores inhibidores de apoptosis. El tratamiento sustitutivo normalizó la peroxidación lipídica y mejoró la expresión de la mayoría de estos genes.
4. La mera deficiencia parcial de IGF-1 se asoció con una alteración significativa de genes que codifican para las proteínas del citoesqueleto y uniones estrechas entre los hepatocitos, que parecen provocar una incorrecta organización de la arquitectura hepática, como pudo observarse en los estudios histológicos, que muestran desalineación de los cordones hepatocitarios.
5. Además, la sola deficiencia parcial de IGF-1 se acompañó de una reducción en la expresión de genes que codifican para proteínas esenciales de la matriz extracelular hepática (Colágeno α -2 tipo I y Colágeno α -1 tipo III), así

como con incremento en la expresión de otros como proteoglicanos, fibronectina-1 e integrina β -2.

6. Los animales con deficiencia parcial de IGF-1 hiperexpresan el gen del receptor de esta hormona en hígado, que no se expresa en el hígado sano, y el tratamiento sustitutivo promovió la normal expresión de este gen.
7. Tomados todos estos datos en conjunto, sugieren que la sola deficiencia de IGF-1 imposibilita la correcta estructura celular y tisular del hígado, y parece convertirlo en más vulnerable al daño oxidativo, incluso al daño producido como resultado de funciones fisiológicas.

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. Ang SL, Rossant J. HNF-3b is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 1994;78:561–574.

11. Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Science* 2001;114(4):629-641.
12. 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.
13. 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.
14. Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA. *The liver: biology and pathobiology*. New York: Raven Press 1987.
15. 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.
16. Bach LA, Fu P, Yang Z: Insulin-like growth factor-binding protein-6 and cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2013, 124(4):215-29.
17. Bach LA: The insulin-like growth factor system in kidney disease and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012, 21(1):86–91.
18. 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.
19. Backstrom M, Hall K, Sara V: Somatomedin levels in cerebrospinal fluid from adults with pituitary disorders. *Acta Endocrinol* 1984, 107(2):171–78.
20. 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.
21. 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
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Barker DJ: The developmental origins of well-being. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;359(1449):1359–66.
27. Barnes PJ and Karin M: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066–71.
28. 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.
29. Barret KE, et al. *Ganong's Review of Medical Physiology, Twenty-Fourth Edition*, Copyright © 2012 by The McGraw-Hill Companies, Inc. ISBN 978-0-07-178003-2; MHID 0-07-178003-3, ISSN 0892-1253
30. 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.
31. 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.
32. Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A: The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 2012, 61(6):1315–22.

33. Baxter R. C. Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res* 1994;42(4-5): 140-4.
34. 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.
35. Beckman KB and Ames BN: The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998, 78(2):547-81.
36. Bedford FK, Ashworth A, Enver T, Wiedemann LM. HEX: a novel homeobox gene expressed during hematopoiesis and conserved between mouse and human. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:1245–1249.
37. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* 1995;376:167–170.
38. 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.
39. 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.
40. Benedicto I, Molina-Jiménez F, García-Buey L, Gondar V, López-Cabrera M, Moreno-Otero R, Majano PL. Role of tight junctions in hepatitis C virus infection. *Rev Esp Enf Dig* 2012;104(5):255-263.
41. 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.
42. 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.

43. Bertherat J, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J: Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur J Endocrinol* 1995, 132(1):12–24.
44. Bex M, Bouillon R: Growth hormone and bone health. *Horm Res* 2003, 60(Suppl 3):80–6.
45. 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.
46. Binoux M. The IGF system in metabolism regulation. *Diabete Metab* 1995;21(5): 330-7.
47. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995;376:768–771.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Boveris A, Oshino N, Chance B: The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972, 128(3):617–30.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Bright GM, Rogers D, Gonzalez-Mendoza LJF. Safety and efficacy of once daily 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Brzozowski AM, Dodson EJ, Dodson GG, Murshudov G, Verma C, Turkenburg JP, De Bree FM, Dauter Z. Structural origins of the functional divergence of human insulin-like growth factor-1 and insulin. *Biochemistry* 2002;41:p.9389.
64. Bulla GA. Hepatocyte nuclear factor-4 prevents silencing of hepatocyte nuclear factor-1 expression in hepatoma x fibroblast cell hybrids [In Process Citation]. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2501–2508.
65. Bulow B, Hagmar L, Mikoczy Z, Nordstrom CH, Erfurth EM: Increased cerebrovascular mortality in patients with hypopituitarism. *Clin Endocrinol* 1997, 46(1):75–81.
66. Bunn RC and Fowlkes JL. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol Metab.* 2003 May-Jun;14(4):176-81
67. Burt AD, Day CP. Pathophysiology of the liver. En: *Pathology of the liver.* Ed. RNM MacSween, AD Burt, BC Portmann, KG Ishak, PJ Scheuer y PP Anthony. 2002, Churchill Livingstone, New York, pp 67-105.
68. 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.
69. Cardoso SM, Pereira C, Oliveira R. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;26(1-2): 3-13.
70. 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.

71. 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.
72. Carmeli E, Coleman R, Reznick AZ: The biochemistry of aging muscle. *Exp Gerontol* 2002, 37(4):477–89.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.

80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.

88. 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.
89. 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.
90. Cereghini S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 1996;10:267–282.
91. Chandra P, Brouwer KLR. The complexities of hepatic drug transport: Current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* 2004;21(5):719-735.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. Chernausk 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.
96. 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.
97. 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.

98. 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.
99. 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.
100. Chubb C: Sexual behavior and fertility of little mice. *Biol Reprod* 1987, 37(3):564–569.
101. 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.
102. Cirillo LA, Zaret KS. An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. *Mol Cell* 1999;4:961–969.
103. 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.
104. Clark R: The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr Rev* 1997, 18(2):157–179.
105. 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.
106. 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.
107. Clemmons DR, Underwood LE: Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annu Rev Nutr* 1991, 11:393–412.
108. Clemmons DR: Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2007, 6(10):821–833.
109. Clemmons DR: Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* 1998, 140(1–2):19–24.
110. Cohen D, Rodriguez-Boulan E, Müsch A. Par-1 promotes a hepatic mode of apical protein trafficking in MDCK cells. *et al, PNAS_2004;101(38):13792-13797*
111. Cohen D, Brennwald PJ, Rodriguez-Boulan E, Müsch A. Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. *J Cell Biol_2004;164(5):717-727.*
112. Cohick W. S. and Clemmons D. R. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993;55: 131-53.
113. 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.
114. 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.
115. 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.

116. 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.
117. 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.
118. Copeland KC, Nair KS: Recombinant human insulin-like growth factor-I increases forearm blood flow. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79(1):230–232.
119. 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.
120. Costa RH, Kalinichenko VV, Holterman AX, Wang X. Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology* 2003; 38:1331-47.
121. 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.
122. 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.
123. Csiszar A, Labinsky 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.

124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. Dandona P, Aljada A, Dhindsa S, Garg R: Insulin as an anti-inflammatory and antiatherosclerotic hormone. *Clin Cornerstone* 2003, (Suppl 4):S13–20.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. Daughaday WH: Growth hormone and the somatomedins. In *Endocrine control of growth*. Edited by Daughaday WH. New York: Elsevier; 1981:1–24.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. Delafontaine P, Bernstein KE, Alexander RW: Insulin-like growth factor I gene expression in vascular cells. *Hypertension* 1991, 17(5):693–699.
137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. Denton RM and Tavaré 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.
141. Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, Rey C, Leneuve P, Blaise A, Housset Ch, 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.

142. 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.
143. 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.
144. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM: Stroke. *Lancet* 2008, 371(9624):1612–1623.
145. 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.
146. 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.
147. 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.
148. Duffy KR, Pardridge WM, Rosenfeld RG: Human blood–brain barrier insulin-like growth factor receptor. *Metab Clin Exp* 1988, 37(2):136–140.
149. Duncan SA, Manova K, Chen WS, Hoodless P, Weinstein DC, Bachvarova RF, Darnell JE Jr. Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7598–7602.
150. Duncan SA. Transcriptional regulation of liver development. *Dev Dyn* 2000;219:131-142.

151. 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
152. 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.
153. 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.
154. 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.
155. 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.
156. 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.
157. Fernandez AM, Torres-Aleman I: The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2012, 13(4):225–239.
158. 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.
159. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA: Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 1996, 17(5):481–517.
160. Flyvbjerg A: Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. *Diabetologia* 2000, 43(10):1205–1223.

161. Frei B. Molecular & biological mechanisms of antioxidant action. *Faseb J* 1999;13(9): 963-4.
162. Fries JF: Aging, natural death, and the compression of morbidity. *N Eng J Med* 1980, 303(3):130–135.
163. 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.
164. 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.
165. 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.
166. Froesch ER, Schmid Chr, Schwander J, Zapf J. Actions of insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 1985;47:443-467.
167. Fu D, Wakabayashi Y, Lippincott-Schwarz J, Arias IM. Regulation of bile canalicular network formation and maintenance by AMP-activated protein kinase and LKB1. *J Cell Sci.* 2010;123(19):3294-3302.
168. Fu D, Wakabayashi Y, Lippincott-Schwarz J, Arias IM. Bile acid stimulates hepatocyte polarization through a cAMP-Epac-MEK-LKB1-AMPK pathway. *PNAS* 2011; 108(4):1403-1408.
169. Fukuda-Taira S. Hepatic induction in the avian embryo: specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J Embryol Exp Morphol* 1981;63:111–125.
170. 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.

171. Gadaleta MN, Cormio A, Pesce V, Lezza AM, Cantatore P: Aging and mitochondria. *Biochimie* 1998, 80(10):863-870.
172. 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.
173. 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.
174. 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.
175. 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.
176. 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.
177. 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.
178. Gasperi M, Castellano AE: Growth hormone/insulin-like growth factor I axis in neurodegenerative diseases. *J Endocrinol Invest* 2010, 33(8):587–591.
179. 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.
180. 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.
181. 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.
182. 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.
183. 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.
184. 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.
185. 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.
186. 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.
187. Giudice LC, Saleh W: Growth factors in reproduction. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 1995, 6(2):60–69.
188. Giudice LC: Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 1992, 13(4):641–669.
189. 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.

190. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E: Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev* 2008, 29(5):535–559.
191. Gluckman PD, Hanson MA: Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin Fetal Neonatal Med* 2004, 9(5):419–425.
192. 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.
193. Goldstein S, Gallo JJ, Reichel W: Biologic theories of aging. *Am Fam Physician* 1989, 40(3):195-200
194. Goldstein B, Macara IG: The PAR Proteins: Fundamental players in animal cell polarization. *Developmental Cell* 2007;13:609-623
195. 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.
196. 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.
197. 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.
198. 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.
199. 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.

200. Greengard O, Federman M, Knox WE. Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation. *J Cell Biol* 1972;52:261–272.
201. Gregory PD, Horz W. Life with nucleosomes: chromatin remodeling in gene regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:339–345.
202. 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.
203. 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.
204. 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.
205. Gualdi R, Bossard P, Zheng M, Hamada Y, Coleman JR, Zaret KS. Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 1996;10:1670–1682.
206. 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.
207. Guevara-Aguirre J, Rosenbloom AL, Vaccarello MA, Fielder PJ, de la Vega A, Diamond FB Jr, Rosenfeld RG: Growth hormone receptor deficiency (laron syndrome): clinical and genetic characteristics. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1991, 377:96–103.
208. 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.

209. 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.
210. 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.
211. Halliwell B: Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001, 18(9):685-716.
212. Hamdani SD, Baron RL. Ectopic liver simulating a mass in the gallbladder wall: Imaging findings. *AJR* 1994;162: 647-648.
213. Han VK, Carter AM: Control of growth and development of the fetoplacental unit. *Curr Opin Pharmacol* 2001, 1(6):632-640.
214. 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.
215. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956 Jul; 11(3):298-300.
216. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res* 1992;275(3-6):257-266.
217. Harman D. Free radical theory of aging. *Triangle* 1973;12(4):153-158.
218. Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:10-21.
219. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton *Biochim Biophys Acta* 2008;1778(3);660-669.

220. 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.
221. Hentsch B, Lyons I, Li R, Hartley L, Lints TJ, Adams JM, Harvey RP. Hlx homeo box gene is essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Genes Dev* 1996;10:70–79.
222. 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.
223. Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF. c-Jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature* 1993;365:179–181.
224. 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.
225. 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.
226. Hirschberg R: Insulin-like growth factor I in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 1996, 22(1–3):128–132.
227. 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.
228. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7.
229. 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.

230. 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.
231. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999 Dec;20(6):761-87.
232. 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.
233. 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.
234. 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
235. 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.
236. 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.
237. 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.
238. 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.
239. 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.
240. 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.
241. 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.
242. 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.
243. Johnson RS, van Lingen B, Papaioannou VE, Spiegelman BM. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev* 1993;7: 1309–1317.
244. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*, 2007, 8:118–127.
245. 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.
246. Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999;284:1998–2003.
247. 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.

248. Kalmar B and Greensmith L: Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61(4):310-318.
249. 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.
250. Kaestner K.H. The Making of the liver. Developmental competence in foregut endoderm and induction of the hepatogenic program. *Cell Cycle* 2005;4(9);1146-1148.
251. 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.
252. 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.
253. 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.
254. 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.
255. Kim SH, Kaminker P, Campisi J: Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene* 2002, 21(4):503-511.
256. Kirkwood TB, Finch CE: Ageing: the old worm turns more slowly. *Nature* 2002;419(6909): 794-5.

257. Kirkwood TB: Evolution of ageing. *Mech Ageing Dev* 2002;123(7): 737-45.
258. 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.
259. 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.
260. 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.
261. 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.
262. 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.
263. Kowald A. The mitochondrial theory of aging. *Biol Signals Recept* 2001;10(3-4): 162-75.
264. Kowaltowski AJ and Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999;26(3-4): 463-71.
265. 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.
266. Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic Signalling By The Insulin-Like Growth Factor I Receptor, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 1997; p. 1595–1606.

267. 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.
268. Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE Jr, Crabtree GR. A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 1992;355:458–460.
269. Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 1997;11:1048–1060.
270. Lamberts SW, van den Beld AW, van der Lely AJ: The endocrinology of aging. *Science* 1997, 278(5337):419–424.
271. 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.
272. Landreth KS, Narayanan R, Dorshkind K: Insulin-like growth factor-I regulates pro-B cell differentiation. *Blood* 1992, 80(5):1207–1212.
273. 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.
274. 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.
275. 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.
276. Laron Z: Laron syndrome (primary growth hormone resistance or insensitivity): the personal experience 1958–2003. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(3):1031–1044.

277. 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.
278. 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.
279. 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.
280. 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.
281. Le lay J, Kaestner K.H. The fox genes in the liver: From organogenesis to functional integration. *Physiol Rev* 2010;90(1):1-22.
282. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A: The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001, 22(1):53–74.
283. 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.
284. 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.
285. LeDouarin NM. An experimental analysis of liver development. *Med Biol* 1975;53:427-455.
286. 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.
287. Lee WH, Clemens JA, Bondy CA: Insulin-like growth factors in the response to cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* 1992, 3(1):36–43.
288. Lemaigre FP, Durviaux SM, Truong O, Lannoy VJ, Hsuan JJ, Rousseau GG. Hepatocyte nuclear factor 6, a transcription factor that contains a novel type of homeodomain and a single cut domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9460–9464.
289. 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.
290. 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.
291. 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.
292. 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
293. Li J, Ning G, Duncan SA. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4a. *Genes Dev* 2000;14:464–474.
294. 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.
295. 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.
296. Li Q, Ren J: Influence of cardiac-specific overexpression of insulin-like growth factor 1 on lifespan and aging-associated changes in cardiac

- intracellular Ca²⁺ homeostasis, protein damage and apoptotic protein expression. *Aging Cell* 2007, 6(6):799–806.
297. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the I κ B kinase 2 gene. *Science* 1999;284:321–325.
298. 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.
299. 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.
300. Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor κ B activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 1999;189:1839–1845.
301. 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.
302. 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.
303. 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.
304. Lin XZ, Horng MH, Sun YN. Computer morphometry for quantitative measurement of liver fibrosis: comparison with Knodell's score, colorimetry and conventional description reports. *J Gastroenterol* 1998;131): 75-80.
305. Liu J and Mori A: Stress, aging, and brain oxidative damage. *Neurochem Res* 1999, 24(11):1479-1497.

306. 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.
307. 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.
308. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002;80(5):780-7.
309. 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.
310. 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.
311. Longo VD: Linking sirtuins, IGF-I signaling, and starvation. *Exp Gerontol* 2009, 44(1–2):70–74.
312. 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.
313. 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.
314. 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.

315. 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.
316. 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.
317. 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.
318. 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.
319. MacSween RNM, Desmet VJ, Roskams T y Scothorne RJ. Developmental anatomy and normal structure. En: *Pathology of the liver*. Ed. RNM MacSween, AD Burt, BC Portmann, KG Ishak, PJ Scheuer y PP Anthony. 2002, Churchill Livingstone, New York, pp 1-66.
320. Madej T, Address KJ, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Lanczycki CJ, Liu C, Lu S, Marchler-Bauer A, Panchenko AR, Chen J, Thiessen PA, Wang Y, Zhang D, Bryant SH. ["MMDB: 3D structures and macromolecular interactions." *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan; 40 \(Database issue\):D461-4](#)
321. 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.
322. Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* 2005;33:27-34.
323. 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.
324. Mannervik M, Nibu Y, Zhang H, Levine M. Transcriptional coregulators in development. *Science* 1999;284:606–609.
325. 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.
326. 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.
327. Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS. The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* 2000;127:2433–2445.
328. 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.
329. Martinez-Hernandez A, Amenta P. The hepatic extracellular matrix I. Components and distribution in normal liver. *Virchows A Pathol Anat Histopathol* 1993;423(1): 1-11.
330. Martinez-Hernandez A, Amenta P. The hepatic extracellular matrix II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows A Pathol Anat Histopathol* 1993;423(2): 77-84.
331. Matsumoto T, Komori R, Hamadeh HK. A study on the normal structure of human liver, with special reference to its angioarchitecture. *Jikeikai Med* 1979; 26: 1-40.
332. Matsumoto T, Kawakami M. The unit-concept of hepatic parenchyma – a re-examination based on angioarchitectural studies. *Acta Pathol Jpn* 1982; 32 (Suppl 2): 285-314.

333. Mayer MP and Bukau B: Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62: 670–684.
334. McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 2000; 20: 3-7.
335. Medlock ES, Haar JL. The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. *Anat Rec* 1983;207:31–41.
336. Melov S. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(11): 1395.
337. Meredith JE Jr, Fazelli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993;4(9): 953-961.
338. Mescher, Anthony L. *Junqueira's basic histology: Text & atlas*. New York: Mcgraw-Hill medical, 2010.
339. 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.
340. 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.
341. 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.
342. Miller HC: Prenatal factors affecting intrauterine growth retardation. *Clin Perinatol* 1985, 12(2):307–318.
343. 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.

344. 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.
345. 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.
346. Molitoris BA, Nelson WJ. Alterations in the establishment and maintenance of epithelial cell polarity as a basis for disease processes. *J Clin Invest* 1990;85:3-9
347. Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997;11:1061–1072.
348. 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.
349. 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.
350. 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.
351. 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.
352. Muguerza 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.

353. 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.
354. 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.
355. 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.
356. 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.
357. 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.
358. Murray CJ, Lopez AD: Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997, 349(9061):1269–1276.
359. 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.
360. 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.
361. 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
362. 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.
363. 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.
364. Niessen CM. Tight junctions/Adherens junctions: Basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007;127: 2525-2532.
365. Nishijima T, Piriz J, Dufлот 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.
366. Nohl H. Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994;52(3): 199-204.
367. 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.
368. Oemar BS and Luscher TF: Connective tissue growth factor, friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, 17:1483–1489.
369. 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.
370. 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.
371. 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.
372. 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.
373. Ozdinler PH, Macklis JD: IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci* 2006, 9(11):1371–1381.
374. 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.
375. 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.
376. 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.
377. 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.
378. Pennisi PA, Kopchick JJ, Thorgeirsson S, LeRoith D, Yakar S: Role of growth hormone (GH) in liver regeneration. *Endocrinology* 2004, 145(10):4748–4755.
379. Penrose LS: Data on the genetics of birth weight. *Ann Eugen* 1952, 16(4):378–381.
380. 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.

381. 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.
382. 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.
383. 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.
384. 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.
385. 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.
386. 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.
387. 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.
388. Popken GJ, Dechert-Zeger M, Ye P, D'Ercole AJ: Brain development. *Adv Exp Med Biol* 2005, 567:187–220.
389. 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.
390. 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.
391. Quiroga J, Beloqui O, Castilla A: Cirrhosis. In *Hepatobiliary diseases*. Edited by Prieto J, Rodes J, Shafritz DA. Berlin: Springer-Verlag; 1992:323–415.
392. 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.
393. 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.
394. 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.
395. Rasmussen MH, Hvidberg A, Juul A, Main KM, Gotfredsen A, Skakkebaek NE, Hilsted J, Skakkebaek 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.
396. Reaven GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988, 37(12):1595–1607.
397. 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.
398. Reimold AM, Etkin A, Clauss I, Perkins A, Friend DS, Zhang J, Horton HF, Scott A, Orkin SH, Byrne MC, Grusby MJ, Glimcher LH. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev* 2000;14:152–157.

399. 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.
400. Reinhardt RR, Bondy CA: Insulin-like growth factors cross the blood–brain barrier. *Endocrinology* 1994, 135(5):1753–1761.
401. Resnik R: Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* 2002, 99(3):490–496.
402. 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.
403. 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.
404. Rinderknecht E, Humbel RE: Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 1978, 89(2):283–286.
405. 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.
406. 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.
407. 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.
408. 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.
409. 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.

410. 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.
411. Rosen T, Bengtsson BA: Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 1990, 336(8710):285–288.
412. 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.
413. Rosenbloom AL: Growth hormone insensitivity: physiologic and genetic basis, phenotype, and treatment. *J Pediatr* 1999, 135(3):280–289.
414. 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.
415. Rosenfeld RG, Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J: Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocr Rev* 1994, 15(3):369–390.
416. Ross R: Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Eng J Med* 1999, 340(2):115–126.
417. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. 1995. *Histology: a text and atlas*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
418. 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.
419. 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.
420. 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.

421. Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, Rudolph B, Nallainathan D, Potter J, Elia AJ, Mak TW. Severe liver degeneration and lack of NF- κ B activation in NEMO/IKK γ -deficient mice. *Genes Dev* 2000;14:854–862.
422. 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.
423. Saez JM: Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 1994, 15(5):574–626.
424. Saito M, Tucker DK, Kohlhorst D, Niessen CM, Kowalczyk AP. Classical and desmosomal cadherins at a glance. *J Cell Sci* 2012;125:2547-2552.
425. 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.
426. Samadani U, Costa RH. The transcriptional activator hepatocyte nuclear factor 6 regulates liver gene expression. *Mol Cell Biol* 1996;16:6273–6284.
427. 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.
428. Sara VR and Hall K. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 1990;70(3): 591-614
429. 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.
430. 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.
431. 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.
432. 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.
433. 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.
434. 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.
435. 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.
436. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995;373:699–702.
437. 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.
438. Semsei I: On the nature of aging. *Mech Ageing Dev* 2000;117(1-3): 93-108.
439. 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.
440. 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.
441. Shea BT, Hammer RE, Brinster RL: Growth allometry of the organs in giant transgenic mice. *Endocrinology* 1987, 121(6):1924–1930.
442. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 1998;333 (Pt 3): 471-90.
443. 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.
444. 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.
445. Sies H: Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res* 1993, 299(3-4):183-191.
446. 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.
447. 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.
448. 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.
449. 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 USA* 1999, 96(12):7088–7092.
450. 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.
451. 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.
452. 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.
453. Sladek FM. Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). In: Tronch F, Yanish M, editors. *Transcriptional regulation of liver specific genes*. Austin, Texas: R.G. Landes Company, 1994.
454. 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.
455. 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.
456. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004, 3:Article3.

457. 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.
458. 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.
459. 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.
460. 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.
461. Spath GF, Weiss MC. Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 1997;17:1913–1922.
462. 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.
463. 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.
464. 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.
465. Tang BL: SIRT1, neuronal cell survival and the insulin/IGF-1 aging paradox. *Neurobiol Aging* 2006, 27(3):501–505.

466. 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.
467. Taraviras S, Monaghan AP, Schutz G, Kelsey G. Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 1994;48:67–79.
468. 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.
469. 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.
470. Tejada E, Danielson C. Ectopic or heterotopic liver (choristoma) associated with the gallbladder. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113(8):950-952.
471. Teramukai S, Rohan T, Eguchi H, Oda T, Shinchu 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.
472. 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.
473. Thomas PK, Brown A, Beddington RS. Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* 1998;125:85–94.
474. 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.

475. Tian JM, Schibler U. Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev* 1991;5:2225–2234
476. 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.
477. Toescu EC: Normal brain ageing: models and mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005, 29(1464):2347-2354.
478. 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.
479. 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.
480. 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.
481. Torres-Aleman I. Homeostasis Cerebral e IGF-I. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 2010.
482. Torres-Aleman I: Targeting insulin-like growth factor-1 to treat Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets* 2007, 11(12):1535–1542.
483. 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.
484. 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.
485. Treyer A, Müsch A. Hepatocyte Polarity. *Comp Physiol* 2013;3:243-287.

486. Troen BR: The biology of aging. *Mt Sinai J Med* 2003, 70(1):3-22.
487. Tronche F, Yaniv M. Liver gene expression. Austin, Texas: R.G. Landes Company, 1994.
488. 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.
489. 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.
490. 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.
491. 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.
492. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1995;373:702–705
493. Umegaki H: Neurodegeneration in diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol* 2012, 724:258–265.
494. 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.
495. 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.

496. 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.
497. 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.
498. 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.
499. 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.
500. 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.
501. 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.
502. Vanhaesebroeck B and Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000;346 Pt 3:561-76.
503. 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.

504. 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.
505. 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.
506. Vassy J, Kraemer M, Chalumeau MT, Foucrier J. Development of the fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes. *Cell Diff* 1988;24:9–24.
507. Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J: Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* 2001, 59(1):238–45.
508. 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.
509. 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.
510. Voigt HJ, Becker V: Doppler flow measurements and histomorphology of the placental bed in uteroplacental insufficiency. *J Perinat Med* 1992, 20(2):139–47.
511. 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.
512. 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.

513. 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.
514. Weinert BT, Timiras PS: Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 2003, 95(4):1706–16.
515. Weinstein DC, Altaba AR, Chen WS, Hoodless P, Prezioso VR, Jessell TM, Darnell JE Jr. The winged-helix transcription factor HNF-3b is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 1994;78:575–588.
516. Welsch Ulrich. Sobotta, *Histología, Atlas Digital*, 2a ed. 2006. Ed. Médica Panamericana, S.A., Madrid.
517. White MF: The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998, 182(1–2):3–11.
518. 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.
519. Wit JM, van Unen H: Growth of infants with neonatal growth hormone deficiency. *Arch Dis Child* 1992, 67(7):920–4.
520. Wolf E, Gill R, Geddes S, Pitts J, Wollmer A, Grotzinger J. Solution structure of a mini igf-1. *Protein Sci.* 1996;5:2193
521. 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.
522. Woods A, Heslegrave AJ, Muckett PJ, Levene AP, Clements M, Mobberley M, Ryder TA, Abu-Hayyeh S, Williamson C, Goldin RD, Ashworth A, Whitters DJ, Carling D. LKB1 is required for hepatic bile acid transport and canalicular membrane integrity in mice. *Biochem. J.* 2011 434:49-60.

523. 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.
524. Woods KA, van Helvoirt M, Ong KK, Mohn A, Levy J, de Zegher F, Dunger DB: The somatotropic axis in short children born small for gestational age: relation to insulin resistance. *Pediatr Res* 2002, 51(1):76–80.
525. 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.
526. Wu X, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 May 29;246(3):589-95
527. 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.
528. Yabuuchi H, Kamai I, Nezu JI, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional and pH-dependent transport of organic cations. *JPET* 1999;289:768-773.
529. 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.
530. 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.
531. 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.
532. 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.
533. 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.
534. 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.
535. 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.
536. 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.
537. 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.
538. 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.
539. 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.
540. 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.
541. Zaret K. Developmental Competence of the Gut Endoderm: Genetic Potentiation by GATA and HNF3/Fork Head Proteins. *Developmental Biology* 1999;209(1):1-10.
542. Zaret K. Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:526–531.
543. Zhadanov AB, Provance DW, Speer CA, Coffin JD, Goss D, Blixt JA, Reichert ChM, Mercer JA. Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. *Current Biol* 1999;9:880-888.
544. 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 FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem* 2002, 277(47):45276–84.
545. 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.
546. 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.
547. 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.
548. Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology* 2005;41:956-67.
549. 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.
550. 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.
551. Zhu C, Combe DR, Zheng MH, Yeoh GCT, Li L. Liver progenitor cell interactions with the extracellular matrix. *J Tissue Eng Regen Med* 2012. DOI: 10.1002/term.1470.