



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Departamento de Química Biológica

Señalización de la hormona de crecimiento (GH) en  
hígado de ratones expuestos a concentraciones  
suprafisiológicas de GH: relación con el desarrollo  
de tumores hepáticos

*Autora:* Bioq. Verónica Gabriela Piazza

*Directora:* Dra. Ana Isabel Sotelo

*Directora Adjunta:* Dra. Johanna Gabriela Miquet

Señalización de la hormona de crecimiento (GH) en hígado  
de ratones expuestos a concentraciones suprafisiológicas  
de GH: relación con el desarrollo de tumores hepáticos

Trabajo presentado para optar por el título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

*Área de investigación:* Farmacia y Bioquímica

*Subárea:* Ciencias Biológicas

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Sotelo, por haberme dado la posibilidad de formar parte de este grupo de trabajo y así recorrer este camino de crecimiento profesional y personal.

A la Dra Johanna Miquet, por guiarme. Por darme siempre el tiempo para aprender. Por mostrarme que el trabajo en equipo no solo es más provechoso, sino que, sin duda, es el que más se disfruta.

A mis compañeros del laboratorio, por su apoyo y por cada uno de los momentos que compartimos. A Yami, por estar ahí para escucharme, por la infinidad de consejos. A Nadia, por sus ganas, por su ayuda. A Vale, por las charlas interminables. A Marina y Mariana, por las risas. A Lore, por interesarse siempre por mis cosas. A Sofi, Guada, Diego y Fernando.

A todos aquellos miembros del IQUIFIB que me abrieron las puertas de sus laboratorios y, de una forma u otra, colaboraron con este trabajo. Muy especialmente a Lorena Bacigalupo y Fernanda Troncoso, por su generosidad.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, por haberme otorgado la beca para poder llevar a cabo este trabajo de tesis.

Por último, a mi familia y amigos, porque nada de esto hubiese sido posible sin su sostén.

A Flor, por su amistad inquebrantable. Por hacerme parte de su familia y regalarme dos hermosos sobrinos. Por cada “¿Y los ratoncitos, Tía?”.

A mis amigas de toda la vida, por alegrarse por mis avances y compartir conmigo la alegría de los suyos. A mis amigos de la Facultad, por la paciencia. Por ayudarme a ver cada cosa en su real dimensión.

A mis tíos y primos, por preocuparse siempre por mí y por su apoyo.

A mis hermanos, por aceptarme y acompañarme en cada decisión. Por su amistad.

A mi mamá, por ser incondicional. Por su amor. Por su ejemplo.

A mi papá, porque me hace bien pensar que, quizás, estarías orgulloso.

Parte de los resultados desarrollados en la presente Tesis Doctoral han sido publicados en el siguiente trabajo:

MARTÍNEZ CS, **PIAZZA VG**, GONZÁLEZ L, FANG Y, BARTKE A, TURYN D, MIQUET JG y SOTELO AI (2016). Mitogenic signaling pathways in the liver of growth hormone (GH)-overexpressing mice during the growth period. *Cell Cycle* 15, 748-759.

Además, durante el período de realización de esta Tesis Doctoral, se publicaron los siguientes trabajos:

**PIAZZA VG**, BARTKE A, MIQUET JG y SOTELO AI (2017). Analysis of Different Approaches for the selection of reference genes in RT-qPCR experiments: a case study in skeletal muscle of growing mice. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1060.

MARTÍNEZ CS, **PIAZZA VG**, DÍAZ ME, BOPARAI RK, ARUM O, RAMÍREZ MC, GONZÁLEZ L, BECU DE VILLALOBOS D, BARTKE A, TURYN D, MIQUET JG y SOTELO AI (2015). Growth hormone (GH)/STAT5 signaling during the growth period in liver of mice overexpressing GH. *Journal of molecular endocrinology* 54, 171-184.

MARTÍNEZ CS, **PIAZZA VG**, RATNER LD, MATOS MN, GONZÁLEZ L, RULLI SB, MIQUET JG y SOTELO AI (2013). Growth hormone STAT5-mediated signaling and its modulation in mice liver during the growth period. *Growth Hormone & IGF Research* 23, 19-28.

<b>INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>1. Hormona de crecimiento</b>	6
<b>1.1. Acciones fisiológicas de la GH</b>	6
<b>1.2. Síntesis y liberación de la GH</b>	8
1.2.1. Perfiles de secreción de GH	8
1.2.2. Regulación de la secreción de GH	10
1.2.3. Variación de la secreción de GH en función de la edad	13
<b>1.3. Señalización de la GH</b>	15
1.3.1. Receptor de GH (GHR): estructura, activación e inicio de la señalización	15
1.3.2. Vía de señalización JAK2/STAT	18
1.3.3. Vía de señalización PI3K/Akt	19
1.3.4. Vía de señalización MAPK/ERK1/2	21
<b>1.4. Regulación negativa de la señalización de GH</b>	22
1.4.1. Supresores de la señal de citoquinas	22
1.4.2. Fosfatasas	24
1.4.3. Retroalimentación negativa mediada por proteínas quinasas	26
<b>2. Uso terapéutico de la hormona de crecimiento</b>	27
2.1. Formas de administración de GH	28
2.2. Efectos adversos del tratamiento con GH	29
<b>3. Relación entre la hormona de crecimiento y el desarrollo de tumores</b>	31
3.1. Ratones que sobreexpresan GH como modelo del proceso de carcinogénesis hepática	32
3.2. Otros actores en el proceso de carcinogénesis hepática	34
3.2.1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	34
3.2.2. Galectina-1	36
<b>OBJETIVOS</b>	39
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	44
<b>1. Materiales</b>	44
<b>2. Modelos animales</b>	45
2.1. Ratones tratados con GH	45

2.2. Ratones transgénicos que sobreexpresan GH	47
3. Determinaciones somatométricas	49
4. Prueba de tolerancia a la glucosa	49
5. Estimulación con EGF	49
6. Obtención de tejidos	50
7. Procesamiento de las muestras	50
7.1. Sangre	50
7.2. Orina	50
7.3. Hígado	51
7.3.1. Fijación y obtención de cortes histológicos	51
7.3.2. Obtención del solubilizado hepático	51
7.3.3. Inmunoprecipitación	52
7.3.4. Extracción de ARN y obtención de ADN copia	52
7.3.4.1. Electroforesis en geles de agarosa	53
7.3.4.2. Digestión con ADNasa y transcripción reversa (RT)	53
8. Análisis de las muestras	54
8.1. Determinaciones bioquímicas en suero	54
8.1.1. Determinación de colesterol y triglicéridos	54
8.1.2. Determinación de insulina	54
8.2. Análisis de los cortes histológicos	55
8.2.1. Tinción con hematoxilina y eosina	55
8.2.2. Inmunohistoquímica	55
8.2.3. Obtención y procesamiento de imágenes microscópicas	56
8.3. SDS-PAGE	57
8.4. Inmunotransferencia ( <i>Immunoblotting</i> )	58
8.4.1. Dilución de los anticuerpos	59
8.4.2. Controles del ensayo	59
8.5. PCR cuantitativa (qPCR)	60
9. Procesamiento de datos y análisis estadístico	64
9.1. Curvas de peso corporal	64
9.2. Curvas de tolerancia a la glucosa	65
9.3. <i>Immunoblotting</i> y RT-qPCR	65
9.4. Análisis estadístico	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66

<b>SECCIÓN I: Ratones normales tratados con hormona de crecimiento</b>	66
<b>1. Desarrollo del modelo de administración de GH en concentraciones farmacológicas</b>	66
<b>1.1. Puesta a punto: análisis de la dosis de GH, edad de inicio del tratamiento y duración del mismo</b>	66
1.1.1. Ratones tratados de forma intermitente durante dos semanas (2 µg GH/g peso corporal/día) a partir de la tercera semana de vida	67
1.1.2. Ratones tratados de forma intermitente durante cuatro semanas (2 µg GH/g peso corporal/día) a partir de la segunda semana de vida	70
1.1.3. Ratones tratados de forma intermitente durante cinco semanas (6 µg GH/g peso corporal/día) a partir de la tercera semana de vida	73
<b>1.2. Caracterización de los modelos de administración intermitente o continua de GH en concentraciones farmacológicas</b>	78
1.2.1. Tratamiento intermitente	79
1.2.1.1. Tamaño de órganos blanco de la acción de la GH	79
1.2.1.2. Efectos metabólicos	80
1.2.2. Tratamiento continuo	82
1.2.2.1. Crecimiento corporal	84
1.2.2.2. Tamaño de órganos blanco de la acción de la GH	85
1.2.2.3. Efectos metabólicos	86
1.2.3. Efectividad del tratamiento a nivel molecular: expresión de proteínas moduladas por el perfil sanguíneo de GH	88
<b>2. Evaluación de los efectos del tratamiento con GH sobre el parénquima hepático</b>	91
2.1. Tamaño celular	92
2.2. Tamaño nuclear	93
2.3. Porcentaje de células en proliferación	94
<b>3. Evaluación de los efectos moleculares del tratamiento con GH en hígado</b>	95
3.1. Receptor de GH (GHR)	95
3.2. Vías de señalización activadas por GH	96
3.2.1. Activación de STAT5	96
3.2.2. Activación de STAT3	101

3.2.3. Activación de Akt y sus sustratos GSK3 $\beta$ y mTOR	103
3.2.4. Activación de ERK1/2	110
3.2.5. Análisis general de las vías de señalización activadas por GH	113
<b>3.3. Moduladores negativos de la señalización de GHR</b>	118
3.3.1. Tratamiento intermitente	119
3.3.2. Tratamiento continuo	122
3.3.3. Análisis general de la expresión de moduladores negativos de la señalización de GHR	126
<b>3.4. Expresión de protooncogenes</b>	126
<b>4. Evaluación de los efectos del tratamiento con GH un mes después de finalizada su administración</b>	131
4.1. Tamaño corporal	132
4.2. Peso de órganos blanco de la acción de la GH	133
4.3. Colesterolemia	134
4.4. Tamaño de hepatocitos	135
<b>4.5. Efectos moleculares del tratamiento con GH en hígado</b>	135
4.5.1. Expresión de proteínas moduladas por el perfil sanguíneo de GH	135
4.5.2. Vías de señalización activadas por GH	137
4.5.2.1. Activación de STAT5	137
4.5.2.2. Activación de STAT3	139
4.5.2.3. Activación de Akt y sus sustratos GSK3 $\beta$ y mTOR	141
4.5.2.4. Activación de ERK1/2	146
4.6. Análisis general de los resultados obtenidos un mes después de finalizada la administración de GH	148
<b>5. Evaluación de la sensibilidad al EGF en ratones tratados con GH</b>	149
5.1. Activación de STAT5	150
5.2. Activación de STAT3	151
5.3. Activación de Akt	153
5.4. Activación de ERK1/2	154
5.5. Análisis general de los resultados obtenidos en ratones tratados con GH y estimulados con EGF	155
<b>SECCIÓN II: Expresión de protooncogenes durante el crecimiento en ratones transgénicos que sobreexpresan GH</b>	157
<b>SECCIÓN III: Relación entre la hormona de crecimiento y la expresión de galectina-1</b>	164

1. Expresión de Gal-1 en ratones transgénicos que sobreexpresan GH	164
2. Expresión de Gal-1 en ratones tratados con GH	167
3. Análisis general de los resultados referidos a la relación entre GH y Gal-1	168
SECCIÓN IV: Discusión general	170
CONCLUSIONES	185
RESUMEN	189
BIBLIOGRAFÍA	192
ABREVIATURAS Y SIGLAS	222

# INTRODUCCIÓN

---

## INTRODUCCIÓN

### 1. Hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento (“GH”, del inglés *Growth Hormone*) o somatotrofina es una proteína de 22 kDa compuesta por una única cadena polipeptídica de 191 aminoácidos con cuatro regiones helicoidales y dos puentes disulfuro (Niall, 1971, Cohen y col., 1987). La GH es la principal hormona responsable de promover el crecimiento corporal longitudinal posnatal. Además, está implicada en numerosos procesos fisiológicos, como el metabolismo de lípidos, proteínas e hidratos de carbono, o aquellos relacionados con la función neuronal, reproductiva, inmune, cardiovascular y muscular (Hull y col., 2003, Mauras y col., 2005). A nivel celular, la GH modula el crecimiento, proliferación, diferenciación, motilidad y apoptosis (Waters y col., 2012, Chia, 2014).

La GH se sintetiza en la hipófisis anterior, se libera al torrente sanguíneo y actúa fundamentalmente en hígado, músculo, hueso y tejido adiposo, tanto directamente como induciendo la síntesis y liberación del factor de crecimiento similar insulina de tipo 1 (IGF1), que actúa en forma autócrina, parácrina y endócrina (Le Roith y col., 2001, Le Roith, 2003, Kaplan y col., 2007). El tejido hepático es la principal fuente de IGF1 circulante (Yakar y col., 1999).

#### 1.1. Acciones fisiológicas de la GH

La GH promueve el crecimiento al actuar sobre el hueso, el cartílago y el músculo esquelético. Las acciones de la hormona en estos tejidos son directas o mediadas por IGF1, tanto de origen hepático como local (Le Roith y col., 2001, Kaplan y col., 2007). En las placas de crecimiento epifisarias de los huesos largos, la GH y el IGF1 promueven la proliferación, hipertrofia y diferenciación de los condrocitos y el proceso de osificación endocondral (Isaksson y col., 1982, Giustina y col., 2008, Tritos y col., 2009). Asimismo, la hormona induce la remodelación ósea, ya que regula las acciones de los osteoblastos y osteoclastos, estimulando así la formación y la resorción del tejido óseo (Giustina y col., 2008, Tritos y col., 2009). De esta forma el eje GH/IGF1 modula el crecimiento longitudinal del esqueleto óseo. En el músculo esquelético, la GH promueve la hipertrofia e hiperplasia de las fibras musculares y, en consecuencia, el aumento de la masa muscular que acompaña el crecimiento de los huesos largos (Velloso, 2008).

En pacientes con niveles muy elevados de GH en sangre, los efectos de la hormona sobre el crecimiento corporal se exageran y el cuadro clínico resultante depende de en qué momento de la vida se manifiesta la patología. Si el exceso de GH comienza antes de que se cierren las epífisis de los huesos largos, los pacientes desarrollan gigantismo. Estos pacientes se caracterizan por exhibir una talla alta, con brazos y piernas largos, producto de un crecimiento corporal desmesurado. En cambio, si el aumento de los niveles de GH tiene lugar luego de la fusión de las epífisis, la patología se denomina acromegalia. Los pacientes acromegálicos exhiben un crecimiento excesivo de manos y pies, además de un crecimiento desproporcionado de los tejidos blandos y huesos faciales, que lleva a la deformación de la fisonomía de la cara. Asimismo presentan agrandamiento de las vísceras y en general desarrollan patologías cardiovasculares, insulinoresistencia y neoplasias (Renehan y col., 2008, Melmed, 2009, Anagnostis y col., 2011).

La GH tiene también numerosas acciones a nivel metabólico (Mauras y col., 2005, Vijayakumar y col., 2009, Vijayakumar y col., 2011). Por un lado, actúa sobre el tejido adiposo, donde estimula a la enzima lipasa hormono-sensible (LHS) y, en consecuencia, promueve la lipólisis y liberación de ácidos grasos a circulación. Además, la GH inhibe la captación de glucosa en este tejido. En el hígado y en el músculo esquelético, la GH aumenta la expresión de la enzima lipoproteinlipasa (LPL) y promueve así la captación y almacenamiento de triglicéridos. Asimismo, la GH modula el metabolismo de las proteínas. En el músculo esquelético, la hormona estimula la captación de aminoácidos y la síntesis de proteínas, al mismo tiempo que inhibe su degradación (Vijayakumar y col., 2011). Las acciones de la hormona en este tejido estarían mediadas principalmente por el IGF1 de síntesis local (Kim y col., 2005, Klover y col., 2007). A través de sus acciones sobre el tejido adiposo y muscular, la GH regula la composición corporal (Veldhuis y col., 2005).

Por otro lado, la GH tiene un rol importante en la homeostasis de la glucosa, con efectos tanto similares a los de la insulina como antagónicos. Los primeros, que estarían mediados por el IGF1, tienen lugar inmediatamente después de una administración de GH e incluyen la promoción de la captación de glucosa y la inhibición de la gluconeogénesis, como también la adipogénesis e inhibición de la lipólisis. Luego de un plazo de 2 a 3 horas, se manifiestan los efectos intrínsecos y antiinsulínicos de la GH, la cual estimula la gluconeogénesis y la lipólisis (Vijayakumar y col., 2009).

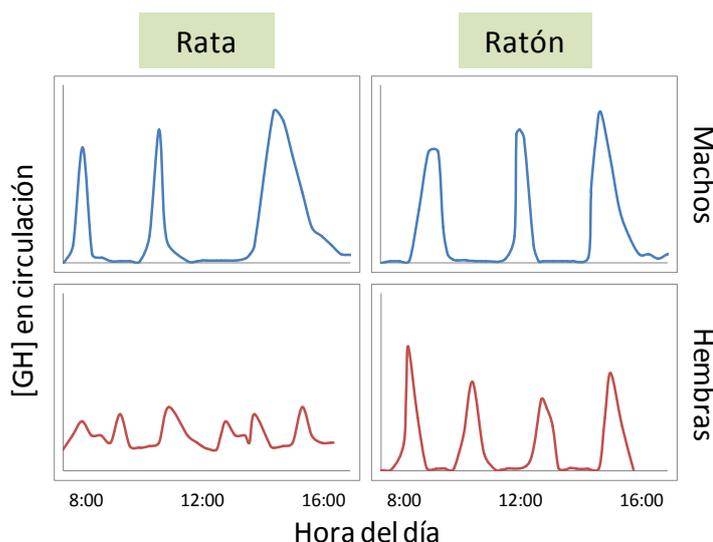
La exposición prolongada a la GH, como la que ocurre en los pacientes acromegálicos, se asocia a la aparición de hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y alteraciones en la tolerancia a la glucosa. Diversos mecanismos estarían implicados en el desarrollo de estas alteraciones. Por un lado, el aumento del flujo de ácidos grasos libres de la circulación al músculo esquelético y el hígado para la síntesis de triglicéridos, promovido por la GH, produce un incremento en segundos mensajeros lipídicos que pueden modular la acción de la insulina en estos tejidos. A su vez, los mecanismos moleculares que regulan la señalización de la GH, y que son inducidos por la propia hormona, pueden actuar sobre la vías de señalización de la insulina atenuando su acción (Dominici y col., 2005, Kaplan y col., 2007, Vijayakumar y col., 2009).

## **1.2. Síntesis y liberación de la GH**

La hormona de crecimiento se sintetiza y almacena principalmente en las células somatotropas de la hipófisis anterior. Además, se han descrito numerosos sitios de síntesis de GH extrapituitarios, como los sistemas inmune, reproductivo, gastrointestinal, óseo, muscular, nervioso, cardiovascular y respiratorio, en los que la hormona tendría un rol preferentemente autócrino o parácrino (Le Roith y col., 2001, Le Roith, 2003, Harvey y col., 2014).

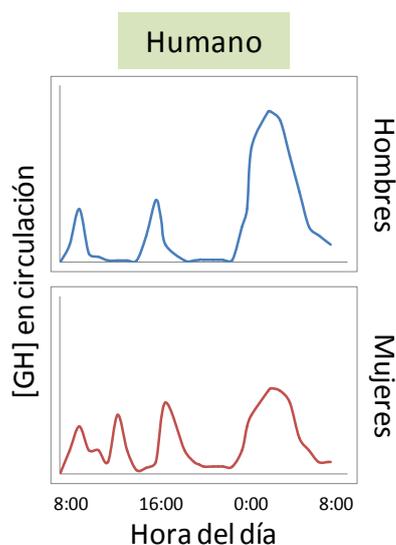
### **1.2.1. Perfiles de secreción de GH**

La hormona se libera desde la hipófisis al torrente sanguíneo en forma de pulsos, que varían en intensidad y amplitud en función de la edad y del sexo. Los perfiles plasmáticos de GH son diferentes entre hembras y machos para muchas especies, incluyendo ratas, ratones y humanos. En ratas se observan las diferencias más marcadas: en machos la hormona se secreta por pulsos de alta amplitud y baja frecuencia, con niveles indetectables de GH entre picos, mientras que en las hembras los pulsos son de menor amplitud y mayor frecuencia, por lo que la hormona puede detectarse constantemente en circulación. En consecuencia, se habla de un perfil plasmático de GH de tipo intermitente en las ratas macho y de tipo continuo en las hembras (**Fig. 1**). En el ratón, las diferencias entre sexos no son tan marcadas, principalmente porque hembras y machos presentan períodos libres de GH en circulación. Sin embargo, en las hembras los pulsos de liberación de hormona son más frecuentes (Edén, 1979, Jansson y col., 1985, MacLeod y col., 1991).



**Figura 1 – Patrones de secreción de hormona de crecimiento (GH) en rata y ratón** – Se esquematiza el perfil de concentración de GH ([GH]) en sangre de ratas y ratones adultos, hembras y machos (Adaptado de Waxman y col. 1991 y MacLeod y col. 1991).

En el humano, al igual que en el ratón, tanto mujeres como hombres presentan períodos libres de GH en circulación, aunque también estos son más prolongados en los hombres (**Fig. 2**) (Jaffe y col., 1998). El perfil de GH masculino se caracteriza por un máximo durante la noche y, durante el día, picos de menor amplitud. En las mujeres, en cambio, la liberación de GH se da en pulsos de similar amplitud y mayor frecuencia, con una mayor concentración promedio de hormona entre picos. En ambos sexos la cantidad de GH liberada por día es similar y la mayor liberación de hormona tiene lugar durante la noche.



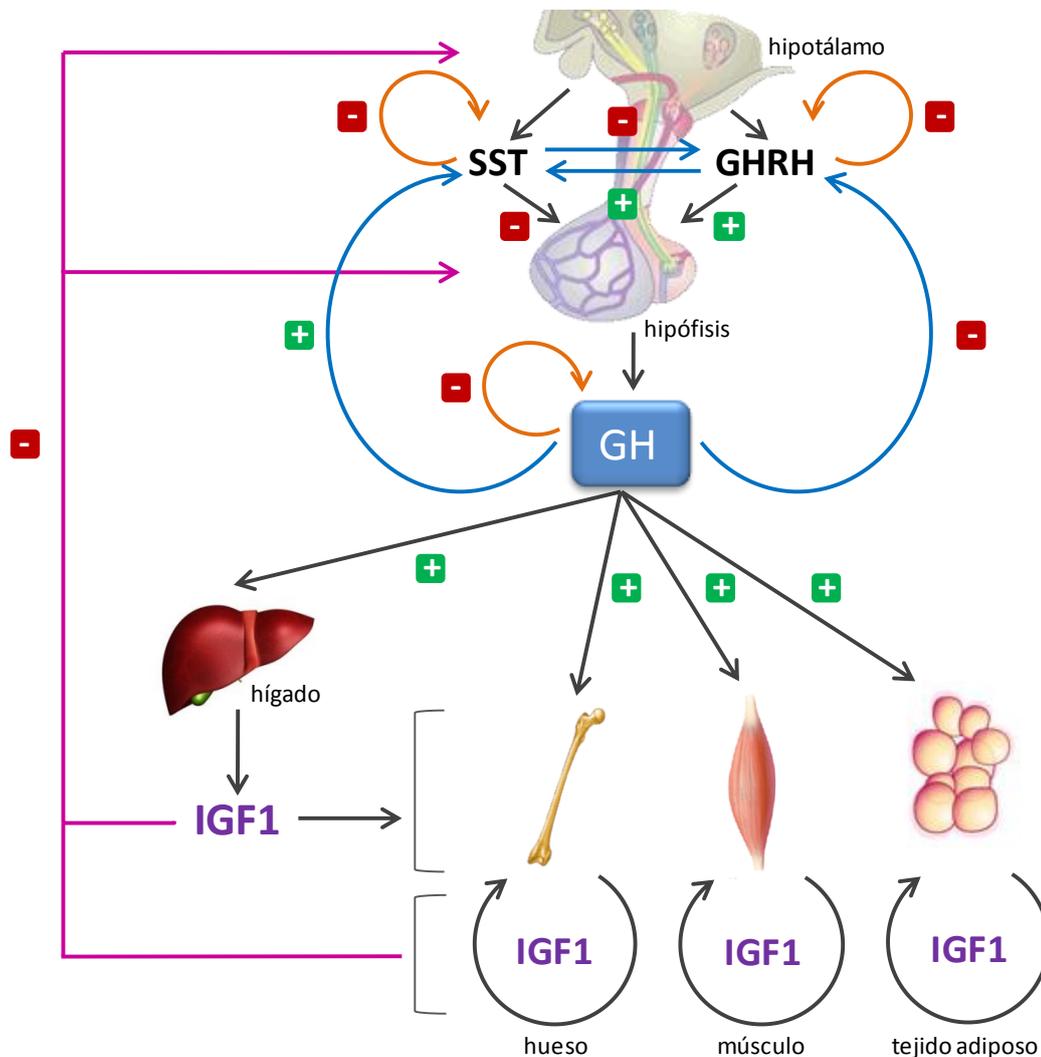
**Figura 2 – Patrones de secreción de hormona de crecimiento (GH) en humanos** – Se esquematiza el perfil de concentración de GH ([GH]) en sangre de hombres y mujeres adultos (Adaptado de Jaffé y col. 1998).

Estos patrones de secreción diferenciales determinan las tasas de crecimiento peripuberales: en ratas hipofisectomizadas, la administración intermitente de GH es más efectiva que la administración continua en la promoción del crecimiento corporal (Jansson y col., 1982, Clark y col., 1985, Isgaard y col., 1988). Además, los perfiles de concentración de GH en sangre determinan la función hepática según el sexo (Jansson y col., 1985, Waxman y col., 2006, Wauthier y col., 2008). Entre los genes cuya expresión depende del perfil de GH en circulación se encuentran aquellos que codifican para las enzimas de la familia del citocromo P450 (CYP), las proteínas mayoritarias de la orina (MUP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Las CYP median el metabolismo hepático de esteroides, ácidos grasos y diversos xenobióticos. Entre ellas, las enzimas CYP11 y CYP12 han sido ampliamente estudiadas y su expresión en hígado constituye un marcador de los perfiles de GH plasmáticos de tipo continuo o intermitente, respectivamente (Waxman y col., 1991, Jaffe y col., 2002). Las MUPs, que actúan como transportadoras de feromonas en la orina, y el EGFR presentan una mayor expresión en ratas macho que en hembras (Norstedt y col., 1984, Ekberg y col., 1989, Hirao y col., 2011).

### **1.2.2. Regulación de la secreción de GH**

La síntesis y liberación de GH está regulada tanto por factores de origen hipotalámico, como la hormona liberadora de GH (GHRH) y la somatostatina (SST), como de origen periférico (**Fig. 3**). Mediante su acción sobre las células somatotropas de la hipófisis, la GHRH y la SST estimulan o inhiben, respectivamente, la liberación de GH y definen no sólo la cantidad de hormona que se libera en cada pulso, sino también su frecuencia. De esta forma se constituye un eje neuroendócrino hipotálamo-hipofisario clásico, sobre el cual actúan mecanismos de retroalimentación de distinto alcance (Giustina y col., 1998, Steyn y col., 2016). Los llamados mecanismos ultracortos quedan definidos por los efectos inhibitorios que tienen la GH, la SST y, probablemente, la GHRH sobre su propia liberación. Los mecanismos cortos o parácrinos, en cambio, implican la interacción de estos tres factores. Por un lado, la SST inhibe la liberación de GHRH y esta estimula la liberación de la primera (Tannenbaum y col., 1984, Yamauchi y col., 1991, de los Frailes y col., 1992). A su vez, la GH induce la activación de las neuronas que producen SST e inhibe a aquellas que producen GHRH (Berelowitz y col., 1981, Maiter y col., 1990). Por

último, los mecanismos de largo alcance implican la acción de factores de origen periférico sobre el hipotálamo y la hipófisis que modulan la secreción de GH. Entre ellos, el principal mediador es el IGF1, que, al inhibir la liberación de GH, constituye un mecanismo de retroalimentación negativa (Giustina y col., 1998, Kaplan y col., 2007, Ohlsson y col., 2009).



**Figura 3 - Regulación de la secreción de hormona de crecimiento (GH)** - Se esquematizan los mecanismos de regulación de la secreción de GH ultracortos (anaranjado), cortos (azul) y largos (rosa). SST: somatostatina, GHRH: hormona liberadora de GH, IGF1: factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1. Los signos + indican estimulación y los signos -, inhibición.

Los patrones diferenciales de GH entre sexos se originan por la acción de las hormonas sexuales sobre la liberación de GHRH y SST. En ratas macho, la SST y la GHRH se liberan en forma de pulsos completamente desfasados en el tiempo (Tannenbaum y col., 1984). En las hembras, en cambio, predomina

una secreción tónica de SST y, si bien la GHRH también se libera de forma intermitente, su concentración promedio es mayor que en los machos. Como resultado, las hembras presentan una secreción de GH pulsátil pero con mayores niveles de hormona entre pulsos (Painson y col., 1991).

A su vez, la liberación de GH a lo largo del día también se modifica por factores relacionados con la ingesta de alimentos y las necesidades metabólicas del individuo. Entre ellos, la grelina, una hormona con propiedades orexigénicas que se sintetiza en el estómago y se libera justo antes de la ingesta y durante períodos de ayuno, actúa tanto a nivel hipotalámico como hipofisario. Allí, induce la secreción de GH y potencia la acción de la GHRH, además de inhibir la liberación de SST (Kojima y col., 2005). En humanos, niveles bajos de glucosa en sangre estimulan la liberación de GH y, por el contrario, aumentos de la glucemia inhiben su liberación e interfieren con la acción de la GHRH (Roth y col., 1963, Garrel y col., 1989, Cornford y col., 2011). Dado que la GH estimula la lipólisis del tejido adiposo, el ayuno y la hipoglucemia inducen la liberación de la hormona y, a través de ella, aumentan los ácidos grasos libres en circulación. Estos, a su vez, actúan a nivel central para inhibir la liberación de GH (Ho y col., 1988, Hartman y col., 1992, Briard y col., 1998).

Los ciclos de sueño y vigilia también modulan la liberación de GH actuando a nivel hipotalámico (Holl y col., 1991, Steiger, 2003). En el humano, unos minutos antes del comienzo del sueño de ondas lentas ocurre la mayor secreción de GH. Si el sueño se retrasa, también lo hace este pico de hormona. Otras variables involucradas en la regulación de la liberación de GH son el estrés y el ejercicio. En niños, la exposición prolongada a situaciones estresantes aumenta los niveles de glucocorticoides y citoquinas proinflamatorias en circulación, que inhiben el proceso de condrogénesis de forma directa en la placa de crecimiento y al modular la acción de la GH (Sävendahl, 2012). En cuanto al ejercicio, se ha descrito, en humanos, que la actividad física estimula la secreción de GH y que esta relación se ve influenciada por la intensidad y duración del ejercicio, así como también por el sexo y la edad del individuo (Felsing y col., 1992, Weltman y col., 2006, Wideman y col., 2006).

### **1.2.3. Variación de la secreción de GH en función de la edad**

La secreción de GH en humanos comienza en la vida fetal y aumenta a lo largo del período de gestación (Hindmarsh y col., 1987, Mullis y col., 2008). Sin embargo, la hormona no participa en la regulación del crecimiento uterino (Rimoin y col., 1966); en esta etapa, el crecimiento depende principalmente de la función placentaria y del estado nutricional de la madre y el feto. Las principales hormonas que influyen en este proceso son la insulina, el IGF1 y el IGF2 (Murray y col., 2013).

En el inicio de la vida posnatal, el crecimiento continúa a una velocidad similar a la del feto, pero luego disminuye de forma pronunciada durante el primer año de vida. En este período, si bien el estado nutricional es el principal determinante del crecimiento, las acciones de la GH y las hormonas tiroideas comienzan a cobrar relevancia (Murray y col., 2013). Desde el primer día de vida ya se observa una marcada liberación pulsátil de GH, con niveles de hormona, referidos al área corporal, superiores a los que se observan en la infancia y en el adulto (de Zegher y col., 1993).

Durante la niñez, la velocidad de crecimiento se mantiene relativamente constante aunque, en general, la menor tasa de crecimiento se alcanza al final de este período, justo antes de la pubertad (Giustina y col., 1998, Murray y col., 2013). En esta etapa el eje GH/IGF1 y las hormonas tiroideas cumplen un rol primordial en el control del crecimiento corporal. Cuando comienzan a evidenciarse cambios bioquímicos y fisiológicos asociados a la acción de las hormonas sexuales, la secreción de GH y la tasa de crecimiento corporal aumentan sustancialmente (Rose y col., 1991, Martha y col., 1992, Mauras y col., 1996). Durante la pubertad, los niveles de testosterona y de estrógenos correlacionan de forma positiva con los niveles de GH y participan, junto con el eje GH/IGF1, en la promoción del crecimiento corporal longitudinal. Entre los 18 y los 25 años, se alcanza la máxima liberación de GH y terminan de establecerse los patrones de secreción característicos de cada sexo (Giustina y col., 1998).

A lo largo de la vida adulta la secreción de GH disminuye exponencialmente. Este fenómeno, conocido como somatopausia, se generaría por un aumento de la liberación tónica de SST y una disminución de la secreción de GHRH. La edad, la composición corporal y la capacidad de ejercicio del individuo determinan la liberación de GH en esta etapa de la vida (Bartke y col., 2013, Steyn y col., 2016). En las mujeres, los estrógenos retrasan

el efecto de la somatopausia (Weltman y col., 1994). En hombres y mujeres postmenopáusicas, la menor liberación de GH se asocia con pérdida de la vitalidad, disminución de la masa muscular y de la capacidad física, fragilidad ósea, adiposidad central, complicaciones cardiovasculares y deterioro de la función mental (Jørgensen y col., 2005).

Los ratones presentan distintas etapas de crecimiento que mayormente reflejan las descritas en el humano (Lupu y col., 2001, Tang y col., 2005, Martínez y col., 2013, Martínez y col., 2015). Luego del nacimiento, tiene lugar una primera etapa de crecimiento rápido que dura hasta aproximadamente las dos semanas de vida. A lo largo de esta fase, la elevada velocidad de crecimiento observada al nacer disminuye gradualmente. Luego de una breve pausa, se inicia una segunda etapa de crecimiento rápido que corresponde al crecimiento peripuberal. Durante este período se manifiestan los efectos de las hormonas sexuales y, alrededor del día 20 de vida, comienzan a evidenciarse diferencias en el tamaño corporal de hembras y machos. Luego de las cinco semanas de vida, el crecimiento se desacelera gradualmente. A diferencia del humano, en el que el crecimiento longitudinal finaliza cuando se cierran las placas epifisarias de los huesos largos, el crecimiento en los ratones persiste durante la adultez, aunque a baja velocidad (Lui y col., 2011).

El rol que ejercen el eje somatotrópico y otras hormonas en la regulación del crecimiento corporal se conoce, en gran medida, debido a las observaciones realizadas en modelos animales. La modificación genética de uno o varios de los actores involucrados en la regulación del crecimiento corporal brinda información acerca de la contribución de cada uno al proceso final (Efstratiadis, 1998). Ratones con mutaciones en el gen que codifica para IGF1 presentan un retraso del crecimiento ya desde el período embrionario (Baker y col., 1993, Liu y col., 1993, Lupu y col., 2001). En cambio, modelos murinos con deficiencia de GH, o con resistencia a la acción de la hormona por mutaciones a nivel de su receptor, exhiben un tamaño corporal normal al nacer (Zhou y col., 1997, Bartke y col., 2001, Lupu y col., 2001). Sin embargo, luego de la segunda semana de vida comienza a evidenciarse un retraso de crecimiento significativo en estos animales. La ausencia de actividad de la GH, además, induce una marcada reducción de la producción de IGF1 en hígado, pero no en otros tejidos (Lupu y col., 2001). Este IGF1, de síntesis independiente de la GH y de acción autócrina y parácrina sería uno de los principales mediadores del crecimiento posnatal temprano. A partir de la segunda semana de vida, el crecimiento corporal pasa estar bajo la regulación del eje endócrino GH/IGF1.

En concordancia con estas observaciones, ratones que sobreexpresan GH no se diferencian de sus hermanos de camada normales hasta alrededor de la tercera semana de vida (Mathews y col., 1988, Martínez y col., 2015).

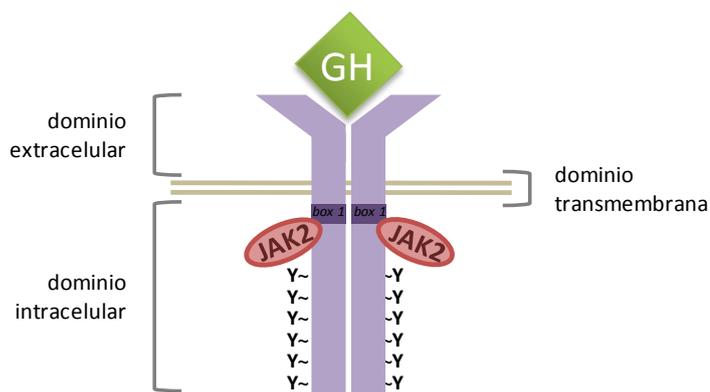
En resumen, en estos modelos animales se evidencia el rol de la GH en la promoción del crecimiento corporal longitudinal: mientras que el crecimiento embrionario y la primera etapa de crecimiento rápido posnatal son independientes de la acción de la GH, a partir de la tercera semana de vida el crecimiento es dependiente de la hormona. Sin embargo, antes de esa edad la GH ya es capaz de desencadenar eventos moleculares en hígado, según antecedentes de nuestro grupo de trabajo en ratones GH-transgénicos o en animales normales estimulados con la hormona (Martínez y col., 2013, Martínez y col., 2015).

### 1.3. Señalización de la GH

#### 1.3.1. Receptor de GH (GHR): estructura, activación e inicio de la señalización

La hormona de crecimiento ejerce sus acciones a través de la unión a su receptor de membrana plasmática (GHR), una proteína de 110-130 kDa que pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas de tipo I. Entre los miembros de esta familia se encuentran los receptores de eritropoyetina, prolactina, distintas interleuquinas y factores estimulantes de colonias (Bazan, 1990). GHR se expresa principalmente en hígado, pero también se ha detectado en numerosos tejidos como hueso, tejido adiposo, riñón, hipotálamo e hipófisis, entre otros (Kelly y col., 1991, Ballesteros y col., 2000).

Los receptores de citoquinas de tipo I poseen un dominio extracelular de unión al ligando, un único paso transmembrana y un dominio citoplasmático que media su señalización intracelular (**Fig. 4**). La GH se une a la región extracelular de GHR, la cual es estructuralmente equivalente a la proteína de unión a GH (GHBP) que transporta la hormona cuando esta se libera a circulación. Los receptores de esta familia no tienen actividad tirosina quinasa intrínseca, sino que su señalización se inicia por la activación de proteínas quinasas asociadas. Entre ellas, la tirosina quinasa *Janus 2* (JAK2) es la principal enzima que participa en la señalización del receptor. JAK2 interacciona con GHR específicamente a través de una secuencia rica en prolina de la región citoplasmática del receptor. Esta secuencia es conocida como *box 1* y se ubica cerca de la cara interna de la membrana plasmática (Argetsinger y col., 1993, Brooks y col., 2010).

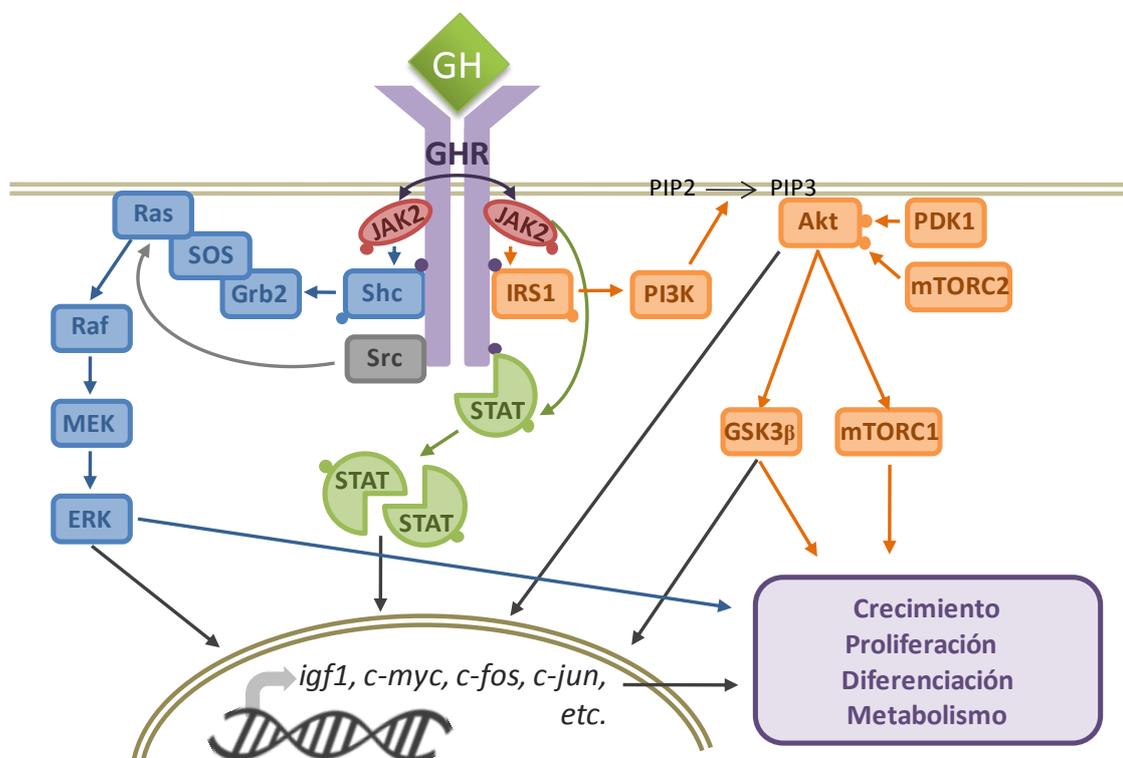


**Figura 4 – Esquema de la estructura del receptor de GH (GHR)** – Se representa la estructura del complejo formado por dos monómeros de GHR unidos a una molécula de GH. Se muestran sus dominios, la región *box 1* y los residuos de tirosina (Y) del dominio intracelular susceptibles de ser fosforilados (Adaptado de Brooks y col. 2010).

El receptor de GH se sintetiza como un precursor, que luego se ensambla en dímeros o trímeros en el retículo endoplasmático y se glicosila en el aparato de Golgi. Una vez en la superficie de la célula, varias moléculas de receptor pueden interactuar y formar complejos de mayor peso molecular. La unión de la GH promueve la formación de estos multímeros, principalmente aquel formado por seis moléculas de GHR y dos moléculas de GH, que actúan como plataformas de señalización (Sedek y col., 2014). En este proceso, la GH induce cambios conformacionales en GHR que acercan espacialmente sus regiones citoplasmáticas y, en consecuencia, las moléculas de JAK2 asociadas al receptor. Este movimiento es fundamental para permitir la transfosforilación y consecuente activación de la quinasa (Rowlinson y col., 2008).

Una vez activa, JAK2 fosforila residuos de tirosina clave en la región citoplasmática de GHR que sirven como sitios de anclaje para proteínas de señalización con dominios de unión a tirosina fosforilada (PTB) o dominios de homología al dominio 2 de la proteína Src (SH2). La unión de estas proteínas mediadoras a fosfotirosinas específicas en el receptor desencadena la activación de múltiples vías de señalización, entre las que se encuentran la vía de los transductores de la señal y activadores de la transcripción (STATs), la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (**Fig. 5**) (Zhu y col., 2001, Rowland y col., 2005, Lanning y col., 2006, Brooks y col., 2010, Carter-Su y col., 2015). Asimismo, a través de su receptor la GH es capaz de inducir la reorganización del citoesqueleto de actina. Si bien JAK2 es reconocida como la principal quinasa asociada a GHR, la unión de la GH a su receptor puede inducir

también la activación directa de las quinasas de la familia de Src. El rol que cumple una u otra quinasa en la señalización de GH depende del tipo celular (Zhu y col., 2002, Jin y col., 2008, Rowlinson y col., 2008).



**Figura 5 – Vías de señalización activadas por la unión de la GH a su receptor** – Se representan los principales mecanismos de transducción de la señal de la hormona de crecimiento. Akt: proteína quinasa b; ERK: quinasa regulada por señales extracelulares; Grb2: proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2; GSK3β: glucógeno sintasa quinasa 3β; IRS1: sustrato del receptor de insulina 1; JAK2: tirosina quinasa *Janus* 2; mTORC1/2: complejos 1 y 2 de la proteína-quinasa blanco de rapamicina en mamíferos; MEK: ERK quinasa; PDK1: quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PIP2: fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato; PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; Raf: MEK quinasa; Ras: proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina; Shc: proteína relacionada con el colágeno con dominio SH2; SOS: factor intercambiador de nucleótidos de guanina; Src: proteína quinasa producto del protooncogén *Src*; STAT: transductor de la señal y activador de la transcripción. Los círculos llenos representan residuos de aminoácidos fosforilados.

Muchos de los efectos de la GH en los distintos tejidos están dados por la modulación que la hormona ejerce a través de su receptor sobre procesos de crecimiento y la proliferación celular. Mediante la activación de las vías de señalización mencionadas, la GH induce la expresión de los genes *c-myc*, *c-fos* y *c-jun* que codifican para factores de transcripción de proteínas reguladoras del ciclo celular (Waters y col., 2012, Chia, 2014). El estricto control de la

división celular está dado por un conjunto de proteínas conocidas como quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que, en asociación con ciclinas específicas, regulan el pasaje a través de cada fase del ciclo celular (Sherr y col., 1999). La proteína c-Myc activa la expresión de *ciclina D1*, *ciclina E* y *cdk4*, entre otros, y reprime la expresión de inhibidores del ciclo celular (*p15*, *p21*, *p27*) (Dang y col., 2006, Wierstra y col., 2008). Por otro lado, c-Fos y c-Jun dimerizan y forman la proteína activadora 1 (AP-1), un factor de transcripción que induce la expresión de estos y otros genes implicados en la proliferación celular (Hess y col., 2004). Asimismo, a través de fosforilaciones en sitios específicos, ciertas quinasas de las vías de señalización de GH pueden modular la estabilidad de c-Myc, AP-1 y algunas ciclinas (Hess y col., 2004, Sears, 2004).

### 1.3.2. Vía de señalización JAK2/STAT

Los STATs, o transductores de la señal y activadores de la transcripción, son una familia de proteínas que contienen un dominio SH2 y que son principalmente activadas por JAK. Actúan como factores de transcripción de genes relacionados con procesos de inmunidad, proliferación, apoptosis y diferenciación celular. Dentro de las proteínas de esta familia, la GH es capaz de inducir la activación de STAT1, STAT3 y STAT5 (Herrington y col., 2000). A través de su dominio SH2, los STATs se unen a residuos de fosfotirosina específicos en la región citoplasmática de GHR, donde son activados por JAK2 mediante su fosforilación en residuos de tirosinas específicas. Luego, los STATs son fosforilados por las MAP quinasas en residuos de serina, alcanzando su máxima activación como factores de transcripción (Decker y col., 2000, Park y col., 2001). Una vez activos, se disocian del receptor, dimerizan, traslocan a núcleo y se unen a sitios específicos del ADN para inducir la transcripción génica (Lanning y col., 2006, Waxman y col., 2006, Carter-Su y col., 2015).

STAT5 es el principal mediador de la acción de la GH. Existen dos isoformas, STAT5a y STAT5b, codificadas por dos genes distintos, que presentan un 90 % de identidad en su secuencia codificante. La isoforma STAT5b está directamente relacionada con las acciones de la GH sobre la promoción del crecimiento. A través de STAT5b, la GH induce la expresión del gen que codifica para IGF1 (Woelfle y col., 2004, Chia y col., 2006). Mientras que ratones deficientes en STAT5a presentan un tamaño corporal normal, aquellos deficientes en STAT5b tienen un retraso importante del crecimiento

que se manifiesta en ambos sexos, pero principalmente en los machos (Udy y col., 1997, Davey y col., 1999b). El déficit de STAT5b se acompaña de una feminización de la expresión génica en hígado (Clodfelter y col., 2006).

En ratas, el perfil marcadamente pulsátil de GH en circulación asociado a los machos induce ciclos repetidos de activación e inactivación de STAT5b en hígado. En las hembras, en cambio, el perfil de hormona aproximadamente continuo y la ausencia de períodos prolongados libres de GH dan lugar a una baja activación de STAT5b que se mantiene en el tiempo. Tanto en ratas como en ratones, la duración del período libre de GH entre pulsos determina la resensibilización de STAT5b, la que, a su vez, modula la expresión de genes masculinos o femeninos (Waxman y col., 2006, Thangavel y col., 2007).

En líneas generales, la acción de los STATs se relaciona con mecanismos de proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Shuai, 1999). En células normales, estos mecanismos de señalización son estrictamente controlados para evitar su desregulación y respuestas celulares inapropiadas. En cambio, la activación constitutiva de estos factores de transcripción puede contribuir a la oncogénesis al inducir la expresión elevada de proteínas que inician o mantienen la transformación celular (Bowman y col., 2000, Calò y col., 2003, Thomas y col., 2015). Entre ellas, pueden mencionarse los factores de transcripción c-Myc y c-Fos, y otras proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular, como ciclina D1 y p21, así como también proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2.

### **1.3.3. Vía de señalización PI3K/Akt**

La GH induce la activación de la vía de la PI3K/Akt a través de la activación de los sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1, IRS2), o directamente mediante la interacción de la PI3K con el complejo GHR:JAK2 (Zhu y col., 2001, Lanning y col., 2006). Una vez activa, la PI3K fosforila al lípido de membrana fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PIP2) y lo convierte en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que recluta Akt a la membrana plasmática y permite que la quinasa PDK1 acceda a Akt. PDK1 fosforila Akt en el residuo de treonina 308 y lo activa parcialmente. La activación completa de Akt tiene lugar una vez que es fosforilado en su serina 473. El complejo mTORC2 sería el principal responsable de la fosforilación de Akt en este residuo (Sarbasov y col., 2005, Jacinto y col., 2006, Laplante y col., 2009).

La vía de la PI3K/Akt activa diferentes sustratos que median procesos celulares relacionados con la proliferación y supervivencia celular, la reorganización del citoesqueleto y el metabolismo de proteínas e hidratos de carbono (Zhu y col., 2001, Song y col., 2005, Manning y col., 2017).

Uno de los mediadores esenciales de las acciones de Akt es la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Existen dos isoformas de GSK3,  $\alpha$  y  $\beta$ , que exhiben un 85 % de homología de secuencia. Si bien comparten algunas de sus funciones, la isoforma  $\beta$  estaría más relacionada con la supervivencia y viabilidad celular (Jope y col., 2007, Kaidanovich-Beilin y col., 2011, Jacobs y col., 2012). Akt inhibe a GSK3 $\beta$  mediante su fosforilación en el residuo de serina 9. La menor actividad de GSK3 $\beta$  resulta, por un lado, en una menor fosforilación de C/EBP $\beta$  que permite la unión de este factor de transcripción al promotor de *c-fos* y, en consecuencia, un aumento de su expresión (Pawien-Pilipuk y col., 2001). Por otro lado, al inhibir a GSK3 $\beta$ , Akt previene la fosforilación y degradación de ciclina D1 y  $\beta$ -catenina. La acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma promueve su traslocación a núcleo donde induce la transcripción de genes tales como *ciclina D1*, *c-myc* y *c-jun* (Nicholson y col., 2002, Takahashi-Yanaga y col., 2008, Manning y col., 2017). GSK3 $\beta$  también regula el metabolismo celular, tanto de forma directa, al fosforilar e inhibir enzimas involucradas en vías metabólicas, como la glucógeno sintasa, o indirectamente, mediante la regulación de factores de transcripción que regulan globalmente programas metabólicos (Kaidanovich-Beilin y col., 2011).

Akt cumple un rol fundamental en la promoción del crecimiento celular mediante la activación del complejo mTORC1, formado por las proteínas mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 y Deptor. La activación de este complejo tiene lugar cuando Akt fosforila e inactiva a la tuberina (TSC2), que mantiene inhibido a mTOR. Una vez activo, mTORC1 induce numerosos procesos anabólicos, que incluyen la biosíntesis de proteínas y lípidos, y limita procesos catabólicos como la autofagia, permitiendo un mayor crecimiento y proliferación celular (Laplante y col., 2009). La fosforilación de mTOR en la serina 2448 constituiría un marcador de la señalización a través de mTORC1, aunque los mecanismos que dan lugar a ella no son claros (Chiang y col., 2005, Rosner y col., 2010, Manning y col., 2017). A su vez, mTOR participa del complejo mTORC2, que incluye también a las proteínas Rictor, mSIN1, Protor-1, mLST8 y Deptor, involucrado en la activación de Akt, a través de mecanismos que tampoco están aún establecidos.

Adicionalmente, Akt actúa directamente sobre proteínas que modulan el proceso de apoptosis, como BAD, caspasa-9 y los factores de transcripción Foxo y CREB, promoviendo la supervivencia celular. Además, Akt fosforila y activa al factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que induce la expresión de genes que codifican para proteínas antiapoptóticas, como Bcl-xL e inhibidores de las caspasas (Song y col., 2005, Manning y col., 2017).

#### 1.3.4. Vía de señalización MAPK/ERK1/2

Las MAPK son una superfamilia de serina-treonina quinasas activadas por mitógenos que median las respuestas celulares a diversos estímulos extracelulares. Entre las cascadas de señalización de las MAPK, la GH activa principalmente a la vía de ERK1/2 (quinasa regulada por señales extracelulares), pero también a JNK (quinasa del amino terminal de c-Jun) y p38 (Zhu y col., 2001, Lanning y col., 2006, Carter-Su y col., 2015).

La activación de la vía de las MAPK por GH comienza con la unión de la proteína adaptadora Shc a GHR, mediante su dominio de unión a tirosinas fosforiladas. Una vez unida al receptor, Shc es fosforilada por JAK2 en residuos de tirosina específicos e interacciona con la proteína adaptadora Grb2. A continuación, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina, SOS, se une a Shc y se activa, permitiendo que la proteína Ras se una al nucleótido GTP. Este evento da lugar a la activación secuencial de las quinasas Ras, Raf, MEK1/2 y, finalmente, ERK1/2. Otros mecanismos, que involucran la acción de Src o PI3K, también pueden desencadenar la activación de ERK1/2 (VanderKuur y col., 1997, Zhu y col., 2001).

ERK1/2 regula la actividad de distintos tipos de mediadores moleculares, como proteínas quinasas, proteínas del citoesqueleto, fosfolipasas y factores de transcripción. Entre estos últimos, ERK1/2 fosforila a Elk1 y al factor de respuesta al suero (SRF), que promueven la transcripción de *c-fos*. A su vez, ERK1/2 fosforila a c-Fos, aumentando su estabilidad, y a c-Jun, estimulando su actividad. Por consiguiente, a través de esta vía, la GH modula numerosas respuestas celulares relacionadas con mecanismos de proliferación, diferenciación, respuesta al estrés y apoptosis (Yoon y col., 2006, Chhabra y col., 2011).

#### **1.4. Regulación negativa de la señalización de GH**

El control de la acción de la GH requiere una regulación precisa de su señalización, que tiene lugar a través de diversos mecanismos que limitan la magnitud y la duración de la respuesta iniciada a través de GHR. De esta forma, se modulan los procesos de crecimiento y metabolismo relacionados con la actividad de la hormona.

Los niveles de GHR en superficie son los principales determinantes de la capacidad de respuesta a la GH. La disponibilidad de GHR es regulada tanto a nivel transcripcional (Schwartzbauer y col., 1998, Talamantes y col., 2002) como postranscripcional. La internalización de GHR ocurre de forma constitutiva, pero la unión de GH promueve este proceso (Flores-Morales y col., 2006), dando lugar a la degradación de los complejos formados por la hormona y el receptor en el lisosoma o mediante el sistema ubiquitina-proteosoma (Strous y col., 2002, Frank y col., 2008).

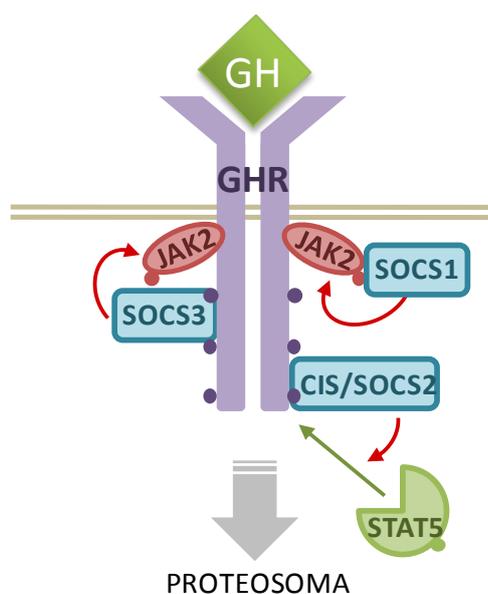
La remoción de GHR de la superficie celular constituye uno de los primeros pasos involucrados en la terminación de la señal de la hormona (Allevato y col., 1995). Además, otros mecanismos participan en este proceso. A la vez que se inicia la transducción de la señal de la hormona, se recluta un grupo de fosfatasas de tirosina que actúa sobre proteínas activadas por fosforilación, constituyendo un primer mecanismo de finalización inmediato. A continuación, comienzan a actuar los supresores de la señal de citoquinas (SOCS), cuya expresión se induce por la misma respuesta que regulan. En consecuencia, las proteínas SOCS constituyen un mecanismo de retroalimentación negativa de la señalización a través de GHR de efecto mediato (Flores-Morales y col., 2006, Croker y col., 2008).

##### **1.4.1. Supresores de la señal de citoquinas**

La familia de proteínas supresoras de la señal de citoquinas (SOCS) cumple un rol primordial en la regulación de la transducción de la señal a través de GHR. En general, la expresión de las SOCS es constitutivamente baja, pero aumenta rápidamente por la estimulación con diferentes citoquinas o factores de crecimiento, entre ellas la GH. De los ocho miembros de esta familia, la GH induce la expresión de SOCS1, 2, 3 y CIS (proteína inducible por citoquinas que contiene un dominio SH2) (Adams y col., 1998, Tollet-Egnell y col., 1999), mediante la activación de STAT5b (Davey y col., 1999a, Woelfle y col., 2004). En particular, en hígado, la inducción de SOCS1 por la GH es muy

débil o no existe, mientras que las otras tres tienen un rol destacado (Flores-Morales y col., 2006).

Las proteínas SOCS contienen un dominio SH2 de unión a fosfotirosinas y un motivo conocido como “SOCS box”, que participan en los dos mecanismos de acción que presentan estas proteínas, el de inhibición directa y el de promoción de la degradación (**Fig. 6**). Para cualquiera de ellos, es fundamental el dominio SH2, que les permite unirse al complejo hormona-receptor activado. SOCS1 y SOCS3 exhiben, además, una región inhibidora de quinasas (KIR) mediante la cual inhiben la actividad de JAK2. Para ello, SOCS1 se une previamente a JAK2. En cambio, SOCS3 puede unirse tanto a JAK2 como a fosfotirosinas de la región citoplasmática de GHR para ejercer su acción. SOCS2 y CIS, a su vez, cuando se unen al receptor, bloquean los residuos de tirosina fosforilados necesarios para la unión y activación de STAT5b (Ram y col., 2000, Greenhalgh y col., 2005, Landsman y col., 2005, Vesterlund y col., 2011). La inhibición de STAT5b por CIS cumple un rol fundamental *in vivo*, ya que su sobreexpresión produce un fenotipo similar al de ratones modificados genéticamente que no expresan STAT5b (Matsumoto y col., 1999). Además, una mayor actividad de CIS sería la responsable de la desensibilización de STAT5b frente a niveles continuos de GH, como los que presentan las ratas hembra o modelos de ratones transgénicos que sobreexpresan GH (Gebert y col., 1999a, González y col., 2002, Miquet y col., 2004, Waxman y col., 2006, Thangavel y col., 2007, Martínez y col., 2015).



**Figura 6 – Regulación negativa de la señalización de GH mediada por las proteínas SOCS** – El esquema muestra los mecanismos de acción de los supresores de la señal de citoquinas (SOCS) 1, 2, 3 y CIS (proteína inducible por citoquinas que contiene un

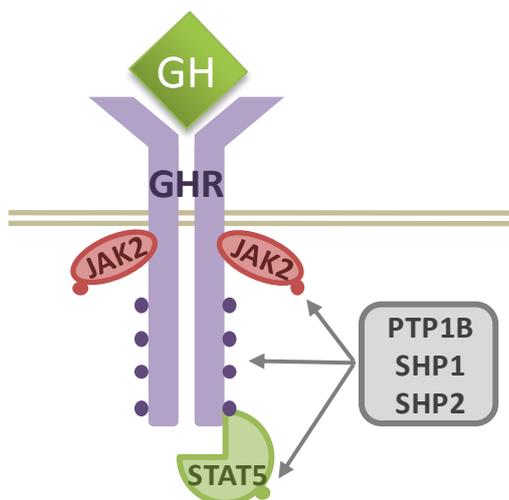
dominio SH2) sobre la señalización de GH mediada por JAK2 y STAT5. Estos supresores pueden, además, inducir la internalización y degradación por proteosoma del receptor de GH. Las flechas rojas indican mecanismos inhibitorios. Los círculos llenos representan residuos de tirosina fosforilados.

Por otro lado, a través de la caja SOCS, estos supresores reclutan las elonginas B y C, permitiendo el ensamblado del complejo ubiquitina-ligasa. Luego, mediante la interacción con las enzimas activadora y conjugadora de ubiquitina, se produce la poliubiquitinización y degradación por proteosoma de las proteínas que se encuentren unidas a SOCS (Kile y col., 2002, Linossi y col., 2012). De esta forma, la unión de estos supresores a GHR promueve su internalización y proteólisis. A su vez, las mismas SOCS pueden ser degradadas activamente en el proceso. Si bien SOCS1 y SOCS3 tienen la capacidad de actuar como ubiquitina-ligasas y marcar a GHR para su degradación por proteosoma, su principal mecanismo de acción está dado por su actividad sobre JAK2 (Ram 2000). Para poner fin a este proceso inhibitorio, SOCS2 se une a SOCS1 y SOCS3 e induce su degradación por proteosoma (Tannahill y col., 2005, Piessevaux y col., 2006).

En conjunto, estos supresores permiten la terminación de la señal de STAT5b y la resensibilización del sistema para el siguiente pulso de GH (Ram y col., 2000, Landsman y col., 2005). A su vez, las proteínas SOCS intervienen en la modulación de la señalización de GH promovida por otros factores o señales extracelulares. Por ejemplo, los estrógenos, los glucocorticoides y la insulina influyen sobre la actividad de la GH al inducir la síntesis de SOCS2 y SOCS3 (Flores-Morales y col., 2006).

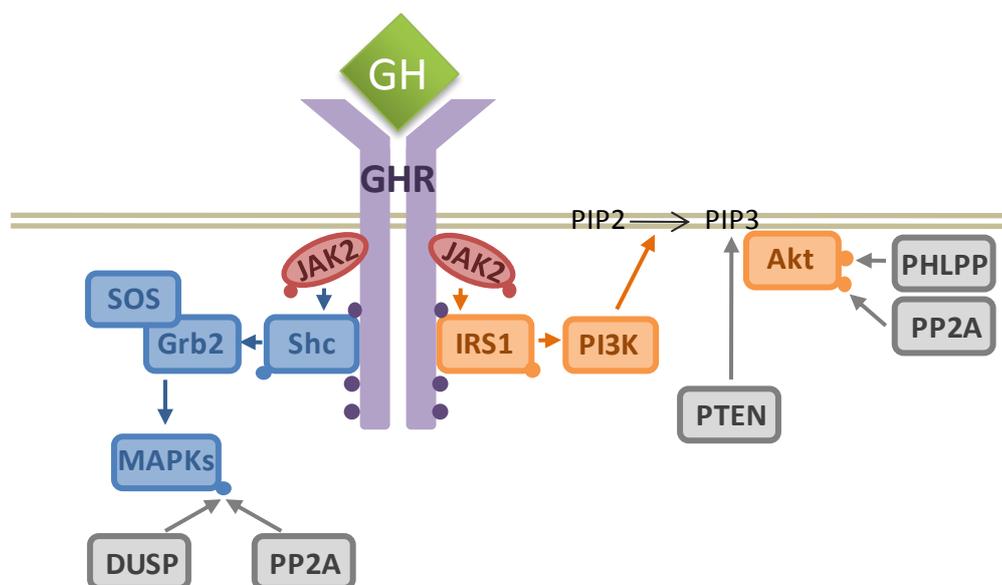
#### **1.4.2. Fosfatasas**

Las fosfatasas de tirosinas participan en la regulación negativa de la señalización de GH al remover fosfotirosinas activadoras y sitios de anclaje para distintas proteínas mediadores de la señalización (**Fig. 7**) (Flores-Morales y col., 2006). Entre ellas, SHP1, SHP2 y PTP-1B se unen a través de su dominio SH2 a tirosinas fosforiladas de GHR, JAK2 y STAT5 y los desfosforilan, atenuando la activación de esta vía. SHP2 tiene un rol dual, ya que si bien actúa como fosfatasa, también puede servir como proteína adaptadora al unirse al receptor y desencadenar la señalización a través de las vías de la PI3K/Akt o de las MAPK (Ram y col., 1997, Yu y col., 2000, Qu, 2002, Pasquali y col., 2003).



**Figura 7 – Regulación negativa de la vía de señalización JAK2/STAT5 mediada por proteínas fosfatasas** – El esquema muestra los mecanismos de terminación de la señal de GH mediados por la desfosforilación de residuos de tirosina (círculos llenos) por la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) y las fosfatasas de tirosina con dominio SH2 1 y 2 (SHP1 y SHP2).

Existen otras familias de proteínas fosfatasas que modulan la señalización a través de las vías de la PI3K/Akt y de las MAPK (**Fig. 8**). Si bien no estarían particularmente implicadas en la regulación de su activación a través de GHR, se incluyen en esta sección porque contribuyen a finalizar la señalización de GH. Por un lado, las fosfatasas de la familia PP2A, remueven grupos fosforilados de residuos de serina y treonina en Akt y en distintas enzimas de la familia de las MAPK (Janssens y col., 2001, Junntila y col., 2008). PP2A, junto con las fosfatasas PHLPP, limitan la actividad de Akt al desfosforilar sus residuos de serina 473 y treonina 308, respectivamente (Gao y col., 2005, Newton y col., 2014). La regulación negativa de la vía de la PI3K/Akt también está mediada por PTEN, que desfosforila al fosfolípido PIP3 y remueve el sitio de anclaje de Akt a la membrana. Al liberarse Akt, esta no puede ser fosforilada por PDK1 y es susceptible a la acción de PP2A y PHLPP (Shi y col., 2012).



**Figura 8 – Regulación negativa de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPKs mediada por proteínas fosfatasas** – El esquema muestra los sustratos susceptibles de ser desfosforilados por la proteína fosfatasa 2A (PP2A), la proteína fosfatasa con dominio PH y repetición rica en leucinas (PHLPP), la proteína homóloga de fosfatasa y tensina (PTEN) y la proteína fosfatasa de actividad dual (DUSP). Los círculos llenos representan residuos de aminoácidos fosforilados.

Por otro lado, las proteínas fosfatasas de especificidad dual (DUSP), también conocidas como MAPK fosfatasas (MKP), actúan específicamente sobre la vía de las MAPK al desfosforilar residuos de tirosina y treonina activadores. Algunas proteínas de esta familia presentan especificidad por ERK1/2, JNK o p38 y pueden ser inducidas por una o varias MAPK, conformando un mecanismo de retroalimentación negativa y de intercomunicación entre las distintas quinasas de estas vías (Kidger y col., 2016).

#### 1.4.3. Retroalimentación negativa mediada por proteínas quinasas

La regulación de las vías de las MAPK y de la PI3K/Akt también está dada por mecanismos de retroalimentación negativa que involucran la fosforilación inhibitoria de mediadores de estas vías. Por un lado, tanto ERK1/2 como Akt pueden fosforilar e inactivar a Ras, limitando la señalización a través de las vías de las MAPK (Zimmermann y col., 1999, Dougherty y col., 2005). Por otro lado, la quinasa S6K, sustrato de Akt, fosforila a IRS-1 y lo conduce a degradación, disminuyendo la activación de PI3K (Zick, 2004, Harrington y col., 2005).

## 2. Uso terapéutico de la hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento se utiliza en la práctica clínica para tratar su deficiencia desde la década de 1950 (Raben, 1958). Las causas de la deficiencia de GH (GHD) pueden ser congénitas, de origen genético o asociadas a defectos estructurales del cerebro, o adquiridas. Entre estas últimas pueden mencionarse: trauma cerebral pre o postnatal, meningitis, encefalitis, tumores del sistema nervioso central, exposición a radioterapia, hipotiroidismo, deficiencias neurosecretoras, entre otras. Sin embargo, en niños predomina la GHD idiopática (Dattani y col., 2004, Ayuk y col., 2006).

La deficiencia de GH en la infancia se manifiesta por un marcado retraso del crecimiento, con baja estatura y proporciones corporales normales. En los casos más severos, si no se tratan, los pacientes pueden alcanzar solo un 70 % de su talla esperada. Además, los niños con GHD exhiben un retraso en el comienzo de la pubertad y, en algunos casos, menor capacidad de atención y trastornos de conducta (Hull y col., 2003). En los adultos, la deficiencia de GH tiene efectos perjudiciales sobre la calidad de vida. Por un lado, los pacientes presentan alteraciones en la composición corporal, debido a la disminución de la masa muscular y el aumento de la adiposidad central, además de disminución de la capacidad de hacer ejercicio, osteopenia, osteoporosis y sequedad de la piel. Asimismo, la GHD en el adulto se asocia al desarrollo de patologías cardiovasculares, como consecuencia de la disfunción endotelial vascular, la dislipidemia y la insulinoresistencia que la deficiencia de GH promueve (Hull y col., 2003, Ayuk y col., 2006, Høybye y col., 2015b).

Las primeras preparaciones de GH provenían de hipófisis humanas cadavéricas, por lo que su disponibilidad era baja. En consecuencia, pocos pacientes accedían al tratamiento (Kemp y col., 2011). En la década de 1980, el uso de estas preparaciones de GH se vinculó a la aparición de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob en algunos países, por lo que su uso fue discontinuado. Sin embargo, en esta misma época comenzó a producirse GH en grandes cantidades mediante su expresión en *Escherichia coli* y, en 1985, la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos aprobó la comercialización de la GH humana recombinante. Las primeras preparaciones de GH, cuya secuencia contenía una metionina que se adicionaba para permitir el inicio de su síntesis en bacterias, promovían la producción de anticuerpos en los pacientes (Kaplan y col., 1986). En consecuencia, el efecto del tratamiento se atenuaba con el tiempo. La producción de GH se fue perfeccionando y las

preparaciones actuales tienen una secuencia aminoacídica idéntica a la GH nativa (Franklin y col., 2011).

Cuando comenzó a comercializarse la hormona recombinante, su uso se extendió a otras condiciones clínicas no relacionadas con la deficiencia de GH (Laron, 2011, Pfäffle, 2015). En la actualidad, la hormona se utiliza en niños con retraso del crecimiento intrauterino, nacidos pequeños para la edad gestacional que no alcanzan el tamaño esperado a los dos años de vida o con baja talla asociada a enfermedad renal. Asimismo, se tratan con GH pacientes con distintas enfermedades genéticas que cursan con retraso del crecimiento, como el síndrome de Prader-Willi, el síndrome de Turner y el síndrome de Noonan. El tratamiento con GH también se recomienda para aquellos niños que presentan baja estatura sin causa aparente -baja talla idiopática- y que cumplan una serie de criterios clínicos por los cuales se evidencia que su estatura es significativamente menor a la esperada según su edad y la talla de sus padres. En general, en los pacientes con retraso de crecimiento no asociado a alteraciones en la secreción de hormona, el tratamiento con GH se discontinúa luego del cierre de las epífisis o cuando se haya alcanzado la estatura esperada (Rose y col., 2014).

Los adultos con deficiencia de GH también son tratados con la hormona por sus efectos sobre el perfil metabólico, la composición corporal y la función neuronal y reproductiva. Además, se utiliza en el tratamiento de procesos catabólicos severos, como el cuadro caquético asociado al síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Asimismo, se ha descrito el uso ilegal de la hormona, como suplemento para mejorar el rendimiento físico de atletas o para retardar el envejecimiento, aun cuando los beneficios de estos tratamientos no estén debidamente comprobados (Kemp y col., 2011, Laron, 2011).

## **2.1. Formas de administración de GH**

A lo largo de los años, los protocolos de administración de GH fueron variando con el fin de encontrar aquellas condiciones que logren, no solo una mayor efectividad, sino también que sean menos incómodos para los pacientes, ya que el tratamiento puede extenderse por años. Los primeros pacientes tratados con GH eran inyectados por vía intramuscular, pero luego, al comprobarse una efectividad similar, la hormona comenzó a administrarse de forma subcutánea y por esta vía se administra en la actualidad. En general, las inyecciones se dan a la noche, para emular el pico de GH que ocurre

normalmente antes del período de sueño. Asimismo, la frecuencia de estas administraciones fue variando a lo largo del tiempo: los primeros tratamientos implicaban dos o tres inyecciones por semana, pero luego comenzó a indicarse una aplicación diaria con menores dosis de GH (Kemp y col., 2011). Si bien este protocolo de administración logra un perfil de GH en circulación más similar al fisiológico y, por ende, una mayor respuesta al tratamiento, resulta inconveniente y estresante para los pacientes y en muchos casos lleva a la falta de adhesión al mismo. Por este motivo, hay un creciente interés en desarrollar formulaciones que permitan la liberación sostenida de GH para prolongar el tiempo entre administraciones (Clemmons, 2007, Høybye y col., 2015a). Estas nuevas estrategias, algunas de las cuales ya han sido aprobadas o están en fases avanzadas de los estudios clínicos, incluyen prodrogas, formas pegiladas de GH o la hormona fusionada a proteínas que prolonguen su actividad en el tiempo (Høybye y col., 2015a).

La efectividad del tratamiento con GH administrado de forma intermitente o sostenida se ha evaluado tanto en humanos como en modelos animales. En roedores, la administración pulsátil de GH promueve un mayor crecimiento corporal y una mayor producción de IGF1 que el tratamiento continuo (Jansson y col., 1982, Clark y col., 1985, Isgaard y col., 1988, Maiter y col., 1988, Bick y col., 1992). En humanos, las administraciones intermitente y continua de hormona a niños con GHD promueven cambios similares en el tamaño corporal, aunque la forma sostenida induce un mayor aumento de los niveles de IGF1 circulante (Tauber y col., 1993). En pacientes adultos, la terapia de reemplazo con GH intermitente o continua genera efectos similares a nivel óseo y de la composición corporal, así como también en marcadores bioquímicos del metabolismo de lípidos, proteínas e hidratos de carbono (Laursen y col., 2001, Høybye y col., 2015a). Sin embargo, al igual que en los niños, la administración continua generaría mayores niveles de IGF1 en suero que la administración intermitente (Jørgensen y col., 1990).

## **2.2. Efectos adversos del tratamiento con GH**

Los estudios referidos a la seguridad del tratamiento con la hormona abarcan el análisis de efectos adversos que pueden ocurrir tanto a corto como a largo plazo. Entre los primeros, el más frecuente es la aparición de reacciones en el sitio de inyección, que raramente lleva al abandono del tratamiento. Con menor frecuencia, los pacientes, principalmente los adultos,

pueden exhibir dolor de cabeza, edemas o síndrome del túnel carpiano, debido a una mayor retención de fluidos, así como también mialgia y artralgia. En niños, particularmente, se ha descrito la aparición de hipertensión intracraneal transitoria, que resuelve si el tratamiento se discontinúa y se retoma luego con menores dosis de GH. Además, pueden desarrollar ginecomastia y deslizamiento de las epífisis femorales. En algunos pacientes tratados con dosis elevadas de hormona por períodos prolongados se observó la maduración temprana del esqueleto y el inicio prematuro de la pubertad. Otros efectos adversos relacionados al tratamiento con GH son el desarrollo de resistencia a la insulina, especialmente en pacientes con síndrome de Turner o de Prader-Willi (Kemp y col., 2011, Laron, 2011).

En cuanto a los efectos adversos que el tratamiento con GH podría producir a largo plazo, la aparición de neoplasias constituyó, desde que comenzó a usarse la hormona en la práctica clínica, uno de los principales aspectos a considerar. Los primeros estudios epidemiológicos parecían indicar una relación entre el tratamiento con GH y la aparición de segundas neoplasias, e incluso se describieron casos de cáncer *de novo* en estos pacientes (Swerdlow y col., 2002, Jenkins y col., 2006). Sin embargo, la población analizada incluía a muchos de los primeros pacientes tratados, que, en general, recibían menos aplicaciones de GH por semana con dosis más altas. Por ende, estaban expuestos a mayores cantidades de hormona en cada inyección que los pacientes sometidos a los protocolos de administración más modernos. Además, en esos pacientes, la dosis de GH no se ajustaba a sus necesidades individuales. Si bien otros estudios más recientes también mostraron un aumento en la mortalidad de los pacientes tratados con GH asociada, no sólo a la aparición de tumores, sino también al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y hemorragias cerebrales (Carel y col., 2012, Poidvin y col., 2014), esto no fue confirmado en otros estudios epidemiológicos (Sävendahl, 2012). Recientemente se han publicado los resultados de un análisis retrospectivo, que incluyó el seguimiento por alrededor de 25 años de pacientes de ocho países europeos tratados con GH durante el período de crecimiento desde la década de 1980 (Swerdlow y col., 2017). Se evaluaron aproximadamente 24 000 pacientes, a diferencia de otros estudios a largo plazo que involucraron un número restringido de individuos, y se incluyeron aquellos tratados por distintas causas, no solo GHD. Los resultados de este análisis sugieren que el tratamiento con GH no incrementaría el riesgo de desarrollar tumores en pacientes con antecedentes de cáncer. Sin embargo, en

pacientes con falla de crecimiento aislada sin evidencias de otra patología de gravedad, se observa una mayor incidencia de cáncer de hueso y vejiga asociada a la administración de la hormona.

### **3. Relación entre la hormona de crecimiento y el desarrollo de tumores**

A lo largo de los años, los efectos observados en situaciones de exceso o déficit de GH, tanto en humanos como en modelos murinos, sugieren la participación de la hormona en el desarrollo y progresión tumoral (Jenkins y col., 2006, Bartke, 2011, Clayton y col., 2011, Perry y col., 2013). Por un lado, la ausencia de actividad de GH se asocia a una menor incidencia de cáncer: prácticamente no se describen casos de neoplasias en pacientes resistentes a la acción de la hormona o con GHD (Shevah y col., 2007, Guevara-Aguirre y col., 2011, Steuerman y col., 2011). Por otro lado, niveles elevados de GH como los que presentan pacientes acromegálicos se asocian a una mayor incidencia de cáncer de colon, de mama y de próstata (Jenkins y col., 2006, Renehan y col., 2008). Sin embargo, los estudios epidemiológicos no son concluyentes en cuanto a la relación entre la exposición a niveles terapéuticos de hormona y el riesgo de desarrollar neoplasias, como se describió en la sección anterior.

En cuanto a los modelos murinos, ratones con deficiencia de GH o IGF1, o con mutaciones que inactivan sus receptores, desarrollan tumores menos severos y a edades más avanzadas que los ratones normales (Wu y col., 2002, Alderman y col., 2009, Ikeno y col., 2009). Más aún, estos animales son resistentes a la inducción de tumores por agentes carcinogénicos (Ramsey y col., 2002, Swanson y col., 2002, Wu y col., 2003). En cambio, ratones transgénicos que sobreexpresan GH son más susceptibles al desarrollo de tumores y presentan una mayor incidencia de carcinoma hepatocelular (HCC) en edades avanzadas que los ratones normales (Orian y col., 1989, Quaife y col., 1989, Orian y col., 1990, Snibson y col., 1999). Este modelo animal ha permitido el estudio de los mecanismos moleculares que podrían estar implicados en el desarrollo de tumores asociados a niveles muy elevados de hormona. Asimismo, estos ratones permiten el estudio del proceso de carcinogénesis hepática como consecuencia de un continuo estímulo proliferativo en hígado.

A continuación se detallan los cambios que se suceden a lo largo del tiempo en el hígado de ratones que sobreexpresan GH y que dan lugar al desarrollo de HCC. Si bien son numerosas las alteraciones moleculares

vinculadas al proceso de carcinogénesis hepática, se describirá en mayor detalle la participación en este proceso de dos factores que se evaluarán en este trabajo de tesis, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la galectina-1.

### **3.1. Ratones que sobreexpresan GH como modelo del proceso de carcinogénesis hepática**

El proceso de tumorogénesis hepática en ratones que sobreexpresan GH se desarrolla a lo largo de un período de aproximadamente un año, con una secuencia que incluye: daño hepatocelular, inflamación progresiva, hiperplasia regenerativa, adenomas y, eventualmente, HCC (Snibson y col., 1999). Los cambios que preceden a la aparición de tumores en estos animales también predisponen al desarrollo de cáncer hepático en humanos (Orian y col., 1989, Orian y col., 1990, Snibson, 2002).

Los primeros cambios se evidencian a edades tempranas, cuando comienzan a manifestarse las acciones de la GH sobre el crecimiento corporal. Alrededor de las tres semanas de vida, estos animales presentan hepatocitos de mayor tamaño, con una mayor tasa de proliferación y hepatomegalia, en comparación con los ratones normales (Quaife y col., 1989, Snibson y col., 1999, Snibson, 2002, Martínez y col., 2016). El porcentaje de células en proliferación se mantiene en el tiempo, mientras que en los ratones normales disminuye en función de la edad. En ratones adultos jóvenes, de entre dos y tres meses de vida, se profundiza la hipertrofia de los hepatocitos, que además presentan núcleos de mayor tamaño con inclusiones e invaginaciones de la membrana nuclear (Orian y col., 1989, Orian y col., 1990, Miquet y col., 2013). Los hepatocitos hipertróficos y en activa proliferación se localizan preferentemente cerca de los espacios portales y de las venas centrolobulillares, pero a esta edad aún se mantiene la organización del tejido en lobulillos (Quaife y col., 1989, Miquet y col., 2013).

A lo largo del tiempo, en paralelo al aumento de las áreas con células hipertróficas, comienzan a aparecer signos de inflamación de bajo grado. Después de los seis meses, las zonas displásicas pueden abarcar todo el lóbulo hepático y se observa frecuentemente infiltración linfocítica intralobulillar. La severidad de la inflamación aumenta con la edad y siempre precede al desarrollo tumoral, que comienza a observarse alrededor de los ocho meses de

vida, en general en forma de adenomas. Más del 70 % de los ratones que sobreexpresan GH presentan tumores después del año, que van desde adenomas eosinofílicos, basofílicos o mixtos hasta carcinomas hepatocelulares con distintos grados de diferenciación. En el hígado tumoral se observan, además, distintos grados de cambios cirróticos, con depósitos de fibras de colágeno y evidencia de regeneración tisular (Quaife y col., 1989, Orian y col., 1990, Snibson, 2002).

El proceso de tumorigénesis descrito se observa no solo en distintas líneas de ratones transgénicos, independientemente del origen de la GH que sobreexpresen y del promotor que induzca la expresión del transgén, sino también en ratones que sobreexpresan GHRH (Quaife y col., 1989, Snibson, 2002). Asimismo, ratones que sobreexpresan IGF1 no exhiben estas lesiones hepáticas, por lo que se trataría de efectos directos de la hormona y no mediados por dicho factor de crecimiento (Quaife y col., 1989, Behringer y col., 1990). Las evidencias provenientes de cultivos primarios de hepatocitos de rata respaldan esta aseveración: luego de una exposición prolongada a la GH, las células presentan hipertrofia y pleomorfismo celular, vacuolización e inclusiones citoplasmáticas (Vergani y col., 1991).

En estudios realizados en ratones transgénicos adultos jóvenes, se demostró que existe una mayor activación y/o expresión de mediadores de las vías de señalización relacionadas con crecimiento, proliferación y supervivencia celular en comparación con sus hermanos de camada no transgénicos. Entre ellos se destacan Akt y sus sustratos mTOR y GSK3, Src y Erk1/2 (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013). Por otro lado, estos animales presentaron mayor activación de otros factores, como NFκB y STAT3, que median procesos inflamatorios en hígado y contribuyen a la tumorigénesis hepática (Aggarwal y col., 2009, Luedde y col., 2011, Miquet y col., 2013). Además, se observó un aumento en los niveles de β-catenina, que participaría en el proceso de transformación de los hepatocitos (Miquet y col., 2013, Lee y col., 2014). La mayor activación de estas vías de señalización en los ratones transgénicos se asocia a una mayor expresión de los reguladores del ciclo celular ciclina D1 y ciclina E, como también a mayores niveles de c-Myc, c-Fos y c-Jun (Miquet y col., 2013).

### **3.2. Otros actores en el proceso de carcinogénesis hepática**

#### **3.2.1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

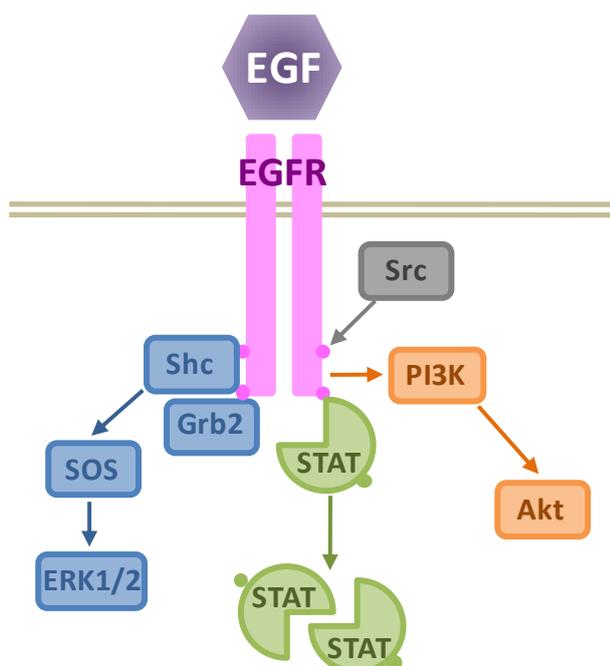
Los factores de crecimiento comprenden un numeroso grupo de compuestos, principalmente de naturaleza polipeptídica, que modulan procesos celulares básicos en distintos tejidos. En general actúan de forma autócrina o parácrina, regulando el crecimiento, la proliferación, la supervivencia y la movilidad celular. La desregulación de su señalización cumple un rol importante en los procesos de tumorigénesis: diferentes familias de factores de crecimiento o sus receptores están involucradas en el crecimiento autónomo de las células cancerosas. Estas células, en general, exhiben un menor requerimiento de factores de crecimiento de origen exógeno para mantener una elevada tasa de proliferación debido, en parte, a que producen altos niveles de los mismos con acción autócrina. En las células tumorales, además, otros mecanismos pueden amplificar las señales intracelulares que desencadenan los factores de crecimiento, contribuyendo al proceso de crecimiento desregulado. Entre ellos puede mencionarse, por ejemplo, el aumento del número de receptores en la superficie celular o la expresión de variantes constitutivamente activas (Normanno y col., 2006).

Entre los factores de crecimiento, el EGF y su receptor participan en la patogénesis y progresión de distintos tipos de carcinoma, incluido el carcinoma hepatocelular (Ito y col., 2001, Henson y col., 2006, Normanno y col., 2006, Buckley y col., 2008, Wee y col., 2017). En el hígado, el EGFR cumple un rol fundamental principalmente en la vida adulta (Carver y col., 2002) y, en particular, en los procesos de regeneración del tejido hepático luego de una injuria. Si el daño persiste, los mecanismos involucrados en la recuperación del tejido pueden desregularse, dando lugar a una proliferación celular desmesurada que facilita la acumulación de alteraciones genéticas y, en algunos casos, conduce al desarrollo de HCC. La señalización a través del EGFR participa en todos los estadios de la respuesta al daño hepático, desde la inflamación temprana y la proliferación hepatocelular hasta la fibrogénesis y transformación neoplásica (Berasain y col., 2014, Komposch y col., 2016).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa ErbB. Además de EGFR, esta familia está compuesta por ErbB-2, ErbB-3 y ErbB-4, que son activados por otros miembros de la familia del EGF (Yarden, 2001, Normanno y col., 2005). Estos receptores poseen un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y un

dominio intracitoplasmático con actividad tirosina quinasa, altamente conservado entre los miembros de la familia (Olayioye y col., 2000, Lemmon y col., 2014). La unión específica del ligando induce la dimerización del receptor y su activación, que conduce a la transfosforilación en tirosinas específicas de la región citoplasmática mediada por su dominio tirosina quinasa (Ferguson y col., 2003, Lemmon y col., 2014, Wee y col., 2017). Estas fosfotirosinas sirven como anclaje para proteínas con dominios SH2 o PTB, que luego desencadenan la activación de diversas vías de señalización.

Una vez activo, el EGFR recluta a proteínas de andamiaje como Shc, Grb2, Src y PI3K y activa, en consecuencia, las vías de las MAPK/ERK1/2, la vía de la PI3K/Akt y de los STATs (**Fig. 9**) (Henson y col., 2006, Normanno y col., 2006, Quesnelle y col., 2007). A su vez, Src puede fosforilar tirosinas en la región intracitoplasmática del receptor, potenciando su actividad (Biscardi y col., 1999). La fosforilación y activación de STAT3 y STAT5 puede ocurrir de forma directa, mediante su unión al receptor, o a través de Src o JAK, según el tipo celular (Quesnelle y col., 2007). La hormona de crecimiento, así como también la prolactina, pueden activar a EGFR al inducir su fosforilación en residuos específicos mediada por JAK2 (Yamauchi y col., 1997, Yamauchi y col., 2000).



**Figura 9** – Vías de señalización activadas por la unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a su receptor EGFR – Se muestra un esquema simplificado de los principales mecanismos de transducción de la señal del EGF que llevan a la activación de las vías de las MAPK/ERK1/2, de la PI3K/Akt y de los STATs.

El EGF y la GH se encuentran estrechamente relacionados a nivel intracelular, ya que ambos activan las mismas vías de señalización y controlan la expresión de los mismos moduladores de la señal (Frank, 2008). Además, la GH regula los niveles del receptor del EGF: mientras que ratones que sobreexpresan la hormona presentan mayores niveles de EGFR en hígado, ratones con una disrupción en el gen que codifica para GHR presentan una menor expresión del receptor (Miquet y col., 2008, González y col., 2010, Miquet y col., 2013). A su vez, la expresión de EGFR depende del perfil de liberación de GH. En roedores, los machos presentan mayores niveles de EGFR en hígado que las hembras, en asociación al perfil intermitente de GH en circulación (Norstedt y col., 1984, Ekberg y col., 1989, Johansson y col., 1989). De la misma forma, la expresión de EGFR aumenta en ratones hembra expuestos a un tratamiento intermitente con GH y disminuye en machos tratados de forma continua (Díaz y col., 2014).

### **3.2.2. Galectina-1**

Las galectinas son una familia de proteínas de unión a  $\beta$ -galactósidos que se caracterizan por la presencia de al menos un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) (Elola y col., 2007). Existen 15 galectinas, algunas, como Gal-1, -3 y -9 se expresan en numerosos sitios, como el músculo esquelético, el tracto gastrointestinal, el sistema inmune, el endotelio y las neuronas, mientras que otras proteínas de esta familia tienen una ubicación más restringida (Chiariotti y col., 2002).

Las galectinas actúan tanto a nivel intracelular como extracelular. En el citoplasma se unen a sus ligandos preferentemente por uniones proteína-proteína y regulan el procesamiento del ARN premensajero, la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la proliferación celular (Liu y col., 2002). Si bien no poseen un péptido señal, son secretadas al medio extracelular mediante una vía no clásica, independiente del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi (Nickel, 2003, 2005). En el medio extracelular, se unen a componentes glicoconjugados de la matriz y moléculas de adhesión de la superficie celular. En consecuencia, las galectinas cumplen roles importantes en la adhesión, migración y supervivencia celular al regular las interacciones entre células y entre las células y la matriz extracelular (Liu y col., 2005, Elola y col., 2007). Además, mediante la unión a glicoconjugados de la superficie celular, pueden

desencadenar la transmisión de señales intracelulares (Rabinovich y col., 2007, Garner y col., 2008, Laderach y col., 2010).

Galectina-1 (Gal-1) pertenece al grupo de galectinas prototípicas, con un único CRD. Puede formar homodímeros mediante uniones no covalentes y así permitir el entrecruzamiento de moléculas glicoconjugadas de la superficie celular como las integrinas, y glicoproteínas de la matriz extracelular, como laminina y fibronectina (Elola y col., 2005a). A nivel intracelular, Gal-1 participa en el procesamiento del ARN e interacciona con la proteína H-Ras, uno de los miembros de la familia de proteínas Ras en células humanas. Gal-1 contribuye al anclaje de esta proteína a la membrana plasmática, un paso necesario para que H-Ras active la vía de las MAPK/ERK1/2 y la PI3K. Por consiguiente, la sobreexpresión de Gal-1 promueve la transformación celular (Liu y col., 2005, Belanis y col., 2008).

La expresión de Gal-1 está aumentada en el HCC (Chung y col., 2002, Kondoh y col., 2003), pero también en el carcinoma de próstata, tiroides, colon, vejiga y ovario, astrocitoma y melanoma (Danguy y col., 2002, Balan y col., 2010). En pacientes con HCC los niveles de Gal-1 aumentan de forma drástica, principalmente en los estadios más avanzados de la enfermedad y en aquellos pacientes con un tipo de cáncer metastásico. La expresión de Gal-1 correlaciona con la agresividad del HCC (Spano y col., 2010, Wu y col., 2012, Chen y col., 2014). Los tumores más agresivos presentan un mayor tamaño, baja diferenciación, encapsulación incompleta, mayor capacidad metastásica y mayor riesgo de recurrencia. En consecuencia, la sobreexpresión de Gal-1 es un predictor de mal pronóstico para los pacientes (Wu y col., 2012).

En líneas celulares de HCC, que presentan una mayor expresión de Gal-1, esta proteína media los procesos de adhesión celular al actuar sobre integrinas específicas y desencadenar la activación de las vías de la PI3K/Akt y/o ERK1/2 (Espelt y col., 2011). La sobreexpresión de Gal-1 en estas líneas celulares genera una activación constitutiva de Akt, un incremento en la traslocación de  $\beta$ -catenina al núcleo y una mayor expresión de *ciclina D1* y *c-myc*, promoviendo la proliferación celular. Por otro lado, niveles elevados de Gal-1 inducen la transición epitelio-mesénquima, proceso por el cual las células pasan de un fenotipo epitelial a uno de tipo fibroblástico y que es clave durante la progresión y diseminación tumoral. Durante esta transición, disminuye la expresión de proteínas que participan en las uniones adherentes y, en consecuencia, las células son capaces de invadir el tejido circundante y hacer metástasis. Asimismo, Gal-1 promueve la resistencia a la anoikis, un tipo de

muerte celular programada que se induce cuando las células dejan de interactuar con las células vecinas, facilitando su diseminación por el torrente sanguíneo (Bacigalupo y col., 2015).

En vista de los antecedentes descritos, niveles constantemente elevados de hormona de crecimiento, como los que exhiben los ratones GH-transgénicos, están vinculados con el desarrollo de neoplasias hepáticas en ratones. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados son complejos y aún no fueron completamente dilucidados. Asimismo, tampoco está establecido específicamente el rol del perfil de concentración de GH en circulación sobre estos mecanismos que podrían vincularse con procesos de transformación celular. Dado que la hormona tiene efectos diferenciales según su perfil de concentración en sangre, ya sea este intermitente o continuo, y que, además, estas diferencias fisiológicas tienen relevancia en la práctica clínica debido al creciente interés en el desarrollo de formulaciones de liberación sostenida de GH, es fundamental explorar esta relación. Teniendo esto en consideración, se plantean a continuación los objetivos de la presente tesis.

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVOS

La hormona de crecimiento se utiliza en el tratamiento de niños con deficiencia de GH (GHD) desde finales de la década de 1950. Desde 1980, cuando la GH comenzó a producirse de forma recombinante, su uso se ha extendido a otras patologías que cursan con disminución de la tasa de crecimiento aun cuando no se relacionen directamente con alteraciones del eje somatotrópico (Kemp y col., 2011, Laron, 2011, Pfäffle, 2015). En simultáneo, ha aumentado la preocupación acerca de la seguridad de este tratamiento considerando las acciones anabólicas y mitogénicas de la hormona y las acciones antiapoptóticas de su mediador, el IGF1 (Jenkins y col., 2006, Perry y col., 2006, Clayton y col., 2011).

Estudios epidemiológicos y en modelos animales ponen de manifiesto la relación que existe entre la GH y el desarrollo de tumores. En humanos, pacientes con GHD u otras patologías asociadas a una menor actividad de la hormona presentan una menor prevalencia de cáncer (Guevara-Aguirre y col., 2011). Asimismo, ratones con deficiencia de GH son resistentes a la inducción de tumores por agentes carcinogénicos (Ramsey y col., 2002, Swanson y col., 2002). Por otro lado, pacientes acromegálicos exhiben una mayor incidencia de neoplasias en comparación con la población sana (Renehan y col., 2008). En modelos de ratones transgénicos con niveles elevados de GH, se observa una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores y una mayor incidencia de carcinoma hepatocelular (HCC) en edades avanzadas (Orian y col., 1989, Quaife y col., 1989, Orian y col., 1990, Snibson y col., 1999, Snibson, 2002, Bartke, 2003).

En situaciones extremas de exceso o déficit de GH, la asociación entre la hormona y el desarrollo de tumores resulta evidente y está debidamente documentada (Perry y col., 2013). Sin embargo, aún hoy existe controversia en cuanto al potencial oncogénico de la terapia con GH en humanos, donde los niveles de hormona en circulación son menores que en los pacientes acromegálicos, pero se elevan por encima de los valores normales (Renehan y col., 2008, Kemp y col., 2011, Chae y col., 2015, Swerdlow y col., 2017). En general, las poblaciones de pacientes tratados con GH son heterogéneas y los estudios epidemiológicos frecuentemente carecen de una verdadera población control (Rosenfeld y col., 2012). Muchos de los pacientes que reciben una terapia de reemplazo con GH presentan una patología tumoral subyacente al déficit de hormona, como por ejemplo en aquellos casos en los que su

secreción se ve afectada por neoplasias del sistema nervioso central o como consecuencia de la exposición a radioterapia para tratar el cáncer. Por otro lado, algunas de las patologías genéticas que cursan con baja talla no relacionada a la actividad de la GH se asocian a un mayor riesgo de desarrollar tumores (Thorner, 2001, Clayton y col., 2011). En consecuencia, los pacientes tratados con la hormona generalmente exhiben un mayor riesgo de desarrollar neoplasias que el resto de la población debido a sus antecedentes clínicos (Allen y col., 2015). La clasificación de los pacientes que recibieron GH como de alto o bajo riesgo de desarrollar tumores y la decisión de incluirlos o no en los estudios epidemiológicos da lugar a distintos resultados y condiciona las conclusiones finales de estos estudios. Asimismo, su interpretación puede estar limitada por el tamaño de la muestra o el período de seguimiento de los pacientes, considerando la baja incidencia y prolongada latencia del cáncer (Rosenfeld y col., 2012).

En pacientes con GHD u otras patologías, el riesgo potencial del tratamiento con GH se evalúa teniendo en cuenta la mortalidad asociada a la patología en sí misma (Jenkins y col., 2006, Rose y col., 2014). No obstante, dado que el uso de la GH en pacientes de baja talla sin una patología severa de base ha ido en aumento a lo largo de los años, es esencial comprender los efectos de la hormona en concentraciones que superen los valores fisiológicos. Teniendo en cuenta que las aplicaciones de la GH en pacientes con secreción normal de hormona han sido aprobadas hace relativamente poco tiempo (Kemp y col., 2011) y que, por ende, no existen estudios epidemiológicos a largo plazo, el análisis de los mecanismos moleculares que se desencadenan ante niveles suprafisiológicos de GH constituye un abordaje fundamental para explorar el potencial oncogénico de este tipo de tratamiento. Por lo tanto, el **objetivo general** de esta tesis es estudiar los efectos a nivel molecular de la hormona de crecimiento en relación al desarrollo de tumores. Los estudios se centrarán en el tejido hepático ya que es el principal órgano blanco de la GH y, en ratones, las neoplasias asociadas a niveles elevados de la hormona se desarrollan principalmente en hígado (Orian y col., 1989, Quaife y col., 1989, Orian y col., 1990).

Los ratones GH-transgénicos constituyen un modelo de carcinogénesis hepatocelular como resultado de un continuo estímulo proliferativo en hígado durante toda la vida del animal. Sin embargo, no es posible extrapolar directamente las observaciones realizadas en este modelo a otras situaciones donde la exposición a niveles suprafisiológicos de GH tiene lugar por un

período limitado y en dosis farmacológicas como ocurre, por ejemplo, en niños con baja talla no asociada a alteraciones en la actividad de la hormona que son tratados con GH. Es por ello que se postula, como **primer objetivo específico**, evaluar los efectos hepáticos de un tratamiento con GH en una dosis baja pero suficiente para promover el crecimiento corporal en ratones en crecimiento sin alteraciones en el eje somatotrópico. En particular, se estudiará si los animales tratados con es dosis farmacológica de GH exhiben, al finalizar el tratamiento, alguna de las alteraciones hepáticas que se observan en los ratones que sobreexpresan la hormona, tanto a nivel histológico como molecular. En este aspecto se evaluará el estado de activación de vías de señalización relacionadas con procesos de crecimiento y proliferación celular, como también la expresión de protooncogenes vinculados a estos procesos. Además, de existir alteraciones asociadas a la administración de la hormona, se evaluará si estas perduran luego de finalizado el tratamiento. Teniendo en cuenta el interés creciente en desarrollar formulaciones de liberación sostenida de GH que permitan prolongar el tiempo entre aplicaciones y que ciertos efectos de la hormona dependen de su patrón de administración (Jansson y col., 1985, Waxman y col., 2006, Wauthier y col., 2008), estos análisis serán realizados en animales tratados de forma intermitente, mediante inyecciones diarias, y de forma continua, a través de dispositivos de liberación sostenida.

El efecto de la GH sobre el desarrollo de tumores hepáticos no estaría mediado por el IGF1, sino que se trataría de un efecto directo de la hormona. Ratones que sobreexpresan IGF1 presentan una mayor incidencia de tumores en distintos tejidos, pero no desarrollan lesiones en hígado (Quaife y col., 1989). Además de las acciones mitogénicas propias de la GH, esta podría actuar favoreciendo la acción de otros factores que promuevan procesos de crecimiento y proliferación celular hepática, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF). El EGF y la GH se encuentran estrechamente relacionados a nivel intracelular, ya que ambos activan las mismas vías de señalización (Frank, 2008). Además, la GH regula los niveles del receptor de EGF y modula su señalización (Jansson y col., 1988, González y col., 2010, Díaz y col., 2012, Miquet y col., 2013, Díaz y col., 2014). Considerando la participación del EGF en el desarrollo del HCC (Normanno y col., 2006, Berasain y col., 2014, Komposch y col., 2016), se propone, como **segundo objetivo específico**, evaluar los efectos del tratamiento con dosis farmacológicas de GH sobre la sensibilidad del tejido hepático a un estímulo con EGF.

En los ratones GH-transgénicos se evidencia, a lo largo del período de crecimiento, una desregulación secuencial de vías de señalización relacionadas con crecimiento, proliferación y supervivencia celular como correlato de los cambios a nivel histológico que presentan estos animales desde edades tempranas (Martínez y col., 2015, Martínez y col., 2016). Dichas alteraciones moleculares se profundizan en los adultos jóvenes, en los que la patología preneoplásica ya está establecida. Además, en la adultez, los ratones GH-transgénicos presentan una mayor expresión de protooncogenes (Miquet y col., 2013), una característica típica de los estadios tempranos del HCC (Feitelson y col., 2004, Llovet y col., 2008, Niu y col., 2016). Dada la implicancia de los factores de transcripción y otras proteínas codificadas por estos genes en la regulación del crecimiento y la proliferación celular, alteraciones en su expresión podrían estar también relacionadas con los cambios histológicos que se observan antes de que se establezca la patología. Por consiguiente, se postula, como **tercer objetivo específico**, evaluar la expresión de protooncogenes en ratones GH-transgénicos en crecimiento para ahondar en los mecanismos moleculares que llevan a la transformación de los hepatocitos frente a niveles elevados de GH. Conocer en detalle la progresión de cambios que tiene lugar en este modelo de hepatocarcinogénesis permitirá establecer un marco de comparación para los ratones tratados con dosis farmacológicas de GH. De esta forma, se podrá determinar si los mecanismos moleculares que pueda desencadenar el tratamiento con la hormona se corresponden con alguno de los estadios de avance de la patología hepática asociada a niveles suprafisiológicos de GH.

El HCC es uno de los tumores sólidos más frecuentes y una de las principales causas de mortalidad relacionada a cáncer a nivel mundial (Global Burden of Disease Liver Cancer, 2017). Normalmente se asocia a la infección con el virus de la hepatitis B o C, el consumo excesivo de alcohol o la exposición a aflatoxinas. Independientemente de su etiología, el proceso de hepatocarcinogénesis involucra múltiples pasos que van desde daño hepatocelular, inflamación progresiva, hiperplasia regenerativa, adenomas y, eventualmente, HCC (Schlageter y col., 2014). Numerosos estudios se han llevado a cabo con el objetivo de dilucidar los mecanismos subyacentes a este proceso y así obtener marcadores moleculares tempranos y/o nuevos blancos terapéuticos. A partir de ellos surge abundante evidencia que destaca la participación de las galectinas, una familia de proteínas de unión a glicanos, en el proceso de hepatocarcinogénesis (Chung y col., 2002, Bacigalupo y col.,

2013). En particular, galectina-1 (Gal-1) se encuentra sobreexpresada en líneas celulares de HCC y en humanos con esta patología sus niveles de expresión correlacionan con la agresividad del tumor (Wu y col., 2012, Chen y col., 2014). Considerando la participación de Gal-1 en el desarrollo y progresión del HCC, se propone, como **cuarto objetivo específico**, explorar si existe una relación entre GH y Gal-1 en un contexto de hepatocarcinogénesis. Para ello, se estudiará la expresión de Gal-1 en el modelo de ratones GH-transgénicos adultos donde ya está establecida la patología preneoplásica. Luego, se explorará su expresión en estos ratones durante el período de crecimiento y en los modelos de ratones tratados con dosis farmacológicas de GH para evaluar si, de existir alguna relación entre estas proteínas, también se evidencia a edades tempranas y/o frente a menores niveles de hormona.

Los resultados de esta tesis permitirán profundizar el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que se desencadenan frente a niveles suprafisiológicos de GH en relación al desarrollo de tumores hepáticos. Se hará especial hincapié en determinar cuáles son los primeros mecanismos que se alteran, que luego pueden dar lugar al desarrollo de esta patología, a través de los estudios en ratones expuestos a dosis farmacológicas de GH o en ratones GH-transgénicos en crecimiento.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

Los siguientes compuestos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Inc. (San Luis, Misuri, EE. UU.): 2-mercaptoetanol, aprotinina, azul de Coomassie R-250, dodecilsulfato de sodio (SDS), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fluoruro de sodio (NaF), glucosa, HEPES, ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), persulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), pirofosfato de sodio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ), seroalbúmina bovina (SAB), Tricina, Tris-HCl, Tritón X-100 y Tween 20. Los reactivos acrilamida, N,N'-metilenbisacrilamida y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) fueron comprados en Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, California, EE. UU.). Los compuestos ácido acético glacial p.a., cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), etanol absoluto p.a., glicina p.a., metanol p.a., paraformaldehído (PFA) puro, peróxido de hidrógeno 30 % p/v p.a. y xilol p.a. fueron adquiridos en Biopack (Zárate, Buenos Aires, Argentina). Los siguientes reactivos fueron comprados en MERCK KGaA (Darmstadt, Alemania): ácido bórico, ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), cloroformo p.a., fosfato ácido de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e isopropanol p.a. Los reactivos agarosa y Tris base utilizados son de Genbiotech (Sophia Antipolis, Antibes, Francia), el glicerol ultrapuro, de la marca Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts EE. UU.) y el azul de bromofenol, de Mallinckrodt (Dublin, Irlanda).

Los anticuerpos primarios anti-actina (cat. 47778), anti-CIS (cat. 1529), anti-GAPDH (cat. 47724), anti-IR (cat. 711), anti-MUP (cat. 66976), anti-PCNA (cat. 7907), anti-SOCS2 (cat. 9022), anti-SOCS3 (cat. 9023), anti-STAT5a/b (cat. 835), anti-tubulina (cat. 166729) y los anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulina G de cabra (cat. 2020), conejo (cat. 2004) y ratón (cat. 2005) unidos a peroxidasa de rábano picante (IgG-HRP) fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, EE. UU.). Los anticuerpos anti-Akt (cat. 9272), anti-fosfo-Akt Ser<sup>473</sup> (cat. 4060), anti-EGFR (cat. 2232), anti-ERK1/2 (cat. 9102), anti-fosfo-ERK1/2 Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup> (cat. 4370), anti-GSK3 $\beta$  (cat. 9315), anti-fosfo-GSK3 $\beta$  Ser<sup>9</sup> (cat. 9323), anti-mTOR (cat. 2972), anti-fosfo-mTOR Ser<sup>2448</sup> (cat. 2971) y anti-fosfo-STAT3 Tyr<sup>705</sup> (cat. 9131) fueron adquiridos en Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, Massachusetts, EE. UU.). El anticuerpo anti-STAT3 (cat. S21320) es de BD Transduction Laboratories<sup>TM</sup> (San José, California, EE. UU.) y el anticuerpo anti-fosfo-STAT5a/b Tyr<sup>694</sup>/Tyr<sup>699</sup> (cat. 05-495), de Millipore (Millipore, Billerica, Massachusetts, EE. UU.). El anticuerpo anti-Gal-1 fue generado por las Dras.

Nilda Fink y Mariana González de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (La Plata, Buenos Aires, Argentina) (Elola y col., 2005b).

## **2. Modelos animales**

### **2.1. Ratones tratados con GH**

En el presente trabajo de tesis se utilizaron ratones hembra y macho exocriados de la cepa Swiss-Webster provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (Ciudad de Buenos Aires, Argentina). Los animales fueron mantenidos en un ambiente controlado con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C y con libre acceso a agua corriente y a una dieta balanceada estándar (Alimento Balanceado Cooperación, ACA Nutrición Animal, San Nicolás de los Arroyos, Buenos Aires, Argentina). Para poder realizar un seguimiento de los animales desde los primeros días de vida, se obtuvieron ratones hembra nulíparas preñadas y se trabajó con sus crías. Las camadas se limitaron a doce animales para asegurar su correcta alimentación. El destete se realizó el día 18 de vida y los animales se separaron en grupos de entre 4 y 5 ratones hembra o macho por jaula.

Los ratones fueron tratados con hormona de crecimiento porcina (Reporcin®, Zamira Life Sciences, Pty Ltd, Knoxfield, Australia) mediante dos patrones de administración: uno intermitente y otro continuo. La elección de la dosis utilizada, la edad y la duración del tratamiento será explicada en la sección “Resultados”. Los ratones alojados en cada jaula se dividieron aleatoriamente en dos grupos: uno que recibió GH y el otro, solución fisiológica (grupo control). Para lograr una administración intermitente los ratones fueron inyectados dos veces por día a las 8 h y 17 h. Los días sábado y domingo los animales recibieron la misma dosis diaria de GH pero en una única aplicación al mediodía. Las inyecciones se administraron por vía subcutánea en la región interescapular, con los animales inmovilizados manualmente.

El tratamiento continuo se realizó mediante el implante de bombas osmóticas (modelo 1002, Alzet®, DURECT Corporation, Cupertino, California, EE. UU.) que contenían una solución de GH disuelta en solución fisiológica. Para ello, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, Holliday Scott, Beccar, Buenos Aires, Argentina) y clorhidrato de xilazina (5 mg/kg, Kensol König, Avellaneda, Buenos Aires, Argentina), controlándose la

inducción de la anestesia por medio de la pérdida de los reflejos pedal y corneal. A continuación, se realizó una incisión de 0,5 cm en la región dorsal interescapular, habiéndose afeitado y lavado previamente la zona. Por dicha incisión se insertó una pinza hemostática y se fue expandiendo el espacio subcutáneo para generar un bolsillo donde alojar el dispositivo. Una vez introducida la bomba, la herida se suturó y se aplicó un antiséptico de uso externo (yodo povidona). Un grupo de animales se sometió a una intervención simulada como control del tratamiento. Los ratones tratados y control se colocaron en jaulas individuales, para evitar que el contacto normal entre los animales genere la apertura de la herida, y se mantuvieron así hasta el final del tratamiento.

Las bombas utilizadas aseguran una liberación sostenida de su contenido por aproximadamente 17 días. Por ende, para lograr una liberación de GH durante cinco semanas fue necesario reemplazar las bombas el día 17 de tratamiento. Para ello se repitió el procedimiento descrito: una vez anestesiados los animales, se realizó una nueva incisión y se retiró la bomba con ayuda de una pinza. Luego, en el espacio que ocupaba esta, se colocó la segunda bomba. Los ratones control fueron sometidos nuevamente a una intervención simulada.

Con el objeto de evaluar la estabilidad de la hormona expuesta a temperatura corporal durante 17 días, una alícuota de la solución de GH se mantuvo en una estufa a 37 °C durante este tiempo. Luego, se analizó la capacidad de esta preparación de hormona de inducir la fosforilación de STAT5 en hígado de ratones, como una medida de su actividad. Para ello, un grupo de ratones hembra adultas de la cepa Swiss-Webster fue estimulado con esta solución de GH durante 7,5 minutos en una dosis de 1 µg/g de peso corporal, por vía intraperitoneal (Martínez y col., 2013). En paralelo y a modo de comparación, otro grupo de animales se estimuló con la misma dosis de GH, pero proveniente de una solución conservada a -20 °C y se sacrificó transcurridos 7,5 minutos. Además, se realizó un control del estímulo mediante un tercer grupo de ratones inyectados con solución fisiológica. Los animales fueron sacrificados de acuerdo a la técnica que se detallará a continuación en la sección "Obtención de tejidos".

La manipulación de estos animales, así como todos los procedimientos a los que fueron sometidos que se describen a continuación, se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y

Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo nº 0032383/2014).

## **2.2. Ratones transgénicos que sobreexpresan GH**

Los ratones transgénicos utilizados para la presente tesis derivan de animales originalmente provistos por el Dr. T.E. Wagner y actualmente son mantenidos por el Dr. A. Bartke en la Facultad de Medicina de la Universidad del Sur de Illinois (Springfield, Illinois, EE. UU). Estos ratones poseen el gen de la hormona de crecimiento bovina (*bGH*) fusionado a una secuencia de la región reguladora del promotor de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) de rata. Para su obtención se llevaron a cabo técnicas estándar: luego de la microinyección del gen de fusión en el pronúcleo masculino de huevos fertilizados de ratón, los embriones viables se implantaron en ratones hembra receptoras (Wagner y col., 1981, McGrane y col., 1988). La descendencia fue analizada por técnicas de *dot blot*, *Southern blot* y ELISA para seleccionar como machos fundadores aquellos ratones en los que se hubiese integrado el transgén y que mostrasen niveles elevados de bGH en suero. Estos fueron apareados con hembras C57BL/6 x C3H y luego se seleccionó de la primera filiación (F1) un macho heterocigoto con altos niveles de expresión de bGH y un tamaño corporal equivalente a dos veces el de sus hermanos de camada normales. A partir de este individuo deriva la línea de ratones transgénicos PEPCK-bGH utilizada para este trabajo, a los cuales se hará referencia como “GH-transgénicos” para simplificar la lectura. Dado que las hembras que expresan el transgén son estériles y los machos presentan fertilidad reducida, esta línea es conservada mediante el apareamiento de machos transgénicos heterocigotos con hembras C57BL/6 x C3H. En esta cepa, la transmisión del transgén da lugar a una progenie con aproximadamente la misma proporción de animales normales y transgénicos. En los experimentos desarrollados en este modelo animal, los ratones normales hermanos de camada de los GH-transgénicos se utilizaron como individuos control.

El gen de fusión se expresa luego del nacimiento y durante toda la vida posnatal de los ratones GH-transgénicos, principalmente en hígado, corteza renal y tejido adiposo (McGrane y col., 1990). Como consecuencia, estos animales presentan niveles de GH en sangre que son alrededor de 300 veces mayores que los de sus hermanos de camada normales (Sotelo y col., 1998, Miquet y col., 2008, Palmer y col., 2009). Por el contrario, los valores de IGF1

circulante solo alcanzan a ser entre dos y tres veces mayores que los de los controles (Mathews y col., 1988, McGrane y col., 1990, Sotelo y col., 1998). A pesar de los niveles continuamente elevados de hormona desde el nacimiento, los ratones GH-transgénicos presentan un mayor peso corporal que los animales normales recién a partir de la tercera semana de vida (Mathews y col., 1988, Martínez y col., 2015). La diferencia de peso aumenta con la edad y en la adultez los ratones GH-transgénicos duplican el peso de los normales y exhiben organomegalia, con lesiones histofisiopatológicas en hígado, corazón y riñón (Wanke y col., 1991, Kopchick y col., 1999, Bartke y col., 2002, Palmer y col., 2009, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016). Los ratones GH-transgénicos presentan, además, alteraciones de la composición corporal, con una disminución del tejido adiposo y un aumento de la masa muscular en comparación con sus hermanos de camada normales después de los seis meses de vida (Palmer y col., 2009, Ding y col., 2011). El conjunto de cambios que se observa en este modelo animal se asemeja a las alteraciones que presentan los pacientes con gigantismo o acromegalia (Wanke y col., 1991, Kopchick y col., 1999, Bartke y col., 2002).

En los estudios llevados a cabo en estos animales se utilizaron ratones hembra y macho, adultos y en período de crecimiento. Se eligieron tres edades representativas:

- dos semanas de vida, cuando los animales transgénicos no se distinguen por su tamaño corporal de sus hermanos de camada normales;
- cuatro semanas de vida, cuando los animales se encuentran en período de crecimiento rápido dependiente de GH y los ratones que sobreexpresan la hormona presentan un crecimiento exacerbado en comparación con los no transgénicos;
- nueve semanas de vida, que es un adulto joven que ya presenta lesiones hepáticas preneoplásicas (Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016).

Los ratones se distribuyeron en grupos de entre 3 y 5 animales por jaula y fueron mantenidos en un ambiente controlado con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C y libre acceso a agua corriente y una dieta balanceada estándar (5001, LabDiet, San Luis, Misuri, EE. UU.). La manipulación de estos animales se llevó a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad del Sur de Illinois de acuerdo al protocolo aprobado

por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (LACUC) de dicha universidad (Permiso nº 178-02-001).

### **3. Determinaciones somatométricas**

Con el objeto de evaluar la efectividad de los tratamientos intermitente y continuo con GH, se determinaron en los animales tratados y sus controles: el peso corporal, tres veces por semana a partir de la primera semana de vida y hasta el sacrificio; la longitud corporal, a las tres, seis y nueve semanas de vida; el peso del hígado, corazón y riñones y la longitud de la tibia y el fémur, *post mortem*.

### **4. Prueba de tolerancia a la glucosa**

Para realizar este ensayo, los ratones fueron sometidos a un ayuno durante 6 horas a partir de las 8 h, cuando se retiró el alimento de las tolvas. Durante este período se permitió el libre acceso de los animales al agua de bebida. Transcurrido el tiempo de ayuno, se realizó una pequeña incisión de forma oblicua en la parte lateral de la cola de manera de obtener una gota de sangre, según el método descrito por Dürschlag y colaboradores (Dürschlag y col., 1996). Mediante tiras reactivas y un glucómetro (Accu-check® Performa, Roche, Basilea, Suiza) se realizó la determinación de glucemia. Este valor corresponde a la glucemia basal, en ayunas. A continuación los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con una solución de glucosa (20 % p/v en solución fisiológica) en una dosis de 2 g/kg de peso corporal. A los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos luego de la inyección se repitió la medición.

### **5. Estimulación con EGF**

Un grupo de ratones hembra de ocho semanas de vida de la cepa Swiss-Webster previamente tratados con GH de forma intermitente y sus respectivos controles sin tratar fueron estimulados con EGF humano recombinante (Sigma-Aldrich, Inc.) el último día del tratamiento. El estímulo se realizó transcurridas 6 horas de la última aplicación de GH. Para ello, los animales recibieron por vía intraperitoneal una dosis de EGF de 2 µg/g peso corporal y fueron sacrificados luego de 10 minutos. La dosis y el tiempo de estímulo se seleccionaron en base a resultados previos de nuestro grupo de trabajo que corroboraron una activación significativa en estas condiciones de

las vías de señalización de EGF en hígado de ratones (González y col., 2010, Díaz y col., 2012, Díaz y col., 2014). Los animales fueron sacrificados de acuerdo a la técnica que se detallará a continuación.

## **6. Obtención de tejidos**

Los ratones utilizados para los distintos experimentos que se presentan en este trabajo de tesis fueron sometidos a un ayuno de 6 horas a partir de las 8 h. Durante este período se permitió el libre acceso de los animales al agua de bebida. A los animales sometidos al tratamiento intermitente con GH y sus respectivos controles se les retiró el alimento en el momento en que recibieron la última inyección de hormona o solución fisiológica.

Transcurrido el período de ayuno, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les extrajo el hígado, el corazón, los riñones y los huesos de las patas traseras. En estos animales, siempre que fue posible, se recogió la orina al acecho en el momento del sacrificio. Cuando fue necesario tomar muestras de sangre, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, Holliday Scott) y clorhidrato de xilazina (5 mg/kg, Kensol König), controlándose la inducción de la anestesia por medio de la pérdida de los reflejos pedal y corneal. La extracción de sangre se realizó por punción intracardíaca y los animales fueron inmediatamente sacrificados por dislocación cervical para extraer el hígado.

## **7. Procesamiento de las muestras**

### **7.1. Sangre**

Las muestras de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la formación del coágulo de fibrina. Luego, fueron centrifugadas a 3000 g por 15 minutos a 4 °C (microcentrífuga 5415 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para separar el suero, el cual fue conservado a -70 °C hasta su utilización.

### **7.2. Orina**

Las muestras de orina fueron centrifugadas a 8800 g durante 3 minutos a 4 °C inmediatamente después de su obtención (microcentrífuga 5415 R, Eppendorf). A continuación se recuperaron los sobrenadantes, los cuales fueron, en primer lugar, diluidos 1:1 en un *buffer* que contenía Tris 60 mM y EDTA 1

mM (pH 7,40) y luego, nuevamente diluidos 1:1 en *buffer* Laemmli 2X (Tris-HCl 125 mM, 2-mercaptoetanol 10 % v/v, glicerol 20 % v/v, SDS 4 % p/v, azul de bromofenol 0,05 % p/v; pH 6,80) (Laemmli, 1970). Por último, las muestras fueron hervidas a 100 °C por 5 minutos y conservadas a -20 °C hasta su utilización.

### **7.3. Hígado**

#### **7.3.1. Fijación y obtención de cortes histológicos**

Una porción de hígado fresco se fijó en una solución de paraformaldehído al 4 % p/v en *buffer* fosfato salino (PBS; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, NaCl 150 mM, KCl 2,7 mM; pH 7,40) durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego, los tejidos fijados se lavaron con agua corriente y se deshidrataron con soluciones de alcoholes de concentración creciente (etanol 70°, 90°, 96° y 100°) en incubaciones sucesivas de 5 minutos cada una. Luego de la aclaración con xilol por 1 minuto, las muestras se incluyeron en parafina.

#### **7.3.2. Obtención del solubilizado hepático**

Porciones de 100 mg de tejido hepático obtenidas y conservadas a -70 °C fueron homogeneizadas en *buffer* de solubilización (1 ml/100 mg de tejido) durante 15 segundos a 4 °C mediante un homogeneizador (Omni-Mixer, Omni International, Inc., Kennesaw, Georgia, EE. UU.) operado a máxima velocidad. Dicho *buffer*, de pH 7,40, está compuesto por un detergente (Tritón X-100 1 % p/v), una solución amortiguadora de pH (HEPES 100 mM) e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 100 mM, NaF 100 mM, EDTA 10 mM, Na<sub>3</sub>VaO<sub>4</sub> 10 mM, PMSF 2 mM y aprotinina 0,02-0,04 UIT/ml). El homogenato resultante se centrifugó a 15 700 g por 90 minutos a 4 °C (microcentrífuga 5415 R, Eppendorf) para separar el material insoluble. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas de los sobrenadantes mediante el método del ácido bicinconínico (Smith y col., 1985), utilizando un kit comercial (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.). Las muestras se diluyeron en *buffer* de solubilizado y *buffer* Laemmli 2X hasta una concentración final de 4 mg/ml. Finalmente, se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se conservaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

### **7.3.3. Inmunoprecipitación**

Con el objetivo de enriquecer el solubilizado de tejido hepático en la proteína CIS, que de lo contrario no se detecta dada su baja concentración en hígado, se realizó una inmunoprecipitación. Para ello se incubaron 3,5 mg de proteína total con 4 µl de anticuerpo anti-CIS en *buffer* de solubilizado hasta un volumen final de 250 µl. Se permitió la formación de los inmunocomplejos durante toda la noche a 4 °C y en agitación constante. Luego, se agregó a cada muestra 15 µl de proteína G inmovilizada en agarosa (Protein G-Sepharose®, Sigma-Aldrich, Inc.) en una concentración de 50 % v/v en *buffer* de solubilizado y se procedió a incubarlas durante dos horas en agitación constante a 4 °C. La proteína G reconoce el fragmento Fc de ciertas inmunoglobulinas y permite la precipitación de los inmunocomplejos mediante una centrifugación corta y a baja velocidad. Una vez separado el sobrenadante, el precipitado se lavó tres veces con 300 µl de *buffer* de lavado (Tris-HCl 50 mM, Tritón X-100 1 % v/v, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM; pH 7,40) y se resuspendió en 50 µl de *buffer* Laemmli 2X. Las muestras se calentaron 10 minutos a 100 °C, se separó el sobrenadante de cada una de ellas y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

### **7.3.4. Extracción de ARN y obtención de ADN copia**

A partir de una porción de 50 mg de tejido hepático conservada a -70 °C, se obtuvo el ARN total mediante el método de extracción con fenol-cloroformo en presencia de isotiocianato de guanidinio, utilizando el reactivo comercial TRIzol (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts EE. UU.) y de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para la disrupción mecánica del tejido se utilizó un homogeneizador dispersor (Ultra Turrax-T-25, IKA, Staufen, Alemania) que se operó a una velocidad de 11 000 rpm, durante 15 segundos y manteniendo la muestra a 4 °C. Una vez extraído el ARN, se calculó su concentración en las muestras a partir de la determinación de su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Para ello, se consideró que una unidad de absorbancia a esta longitud de onda equivale a una solución de ARN de 40 µg/ml. Asimismo, se evaluó la calidad del ARN extraído mediante el análisis de su pureza e integridad. Por un lado, las relaciones entre valores de absorbancia determinados a distintas longitudes de onda (260/280 nm y 260/230 nm) permitieron evaluar la presencia de proteínas que podrían haberse extraído

junto al ARN o remanentes de los reactivos utilizados para su extracción. Por otro lado, mediante electroforesis en geles de agarosa se pudo evaluar la integridad del ARN observando la intensidad y definición de las bandas correspondientes al ARN ribosomal 28S y 18S. Solo aquellas muestras con ARN de buena calidad ( $A_{260/280\text{nm}} > 1,8$ ,  $A_{260/230\text{nm}} > A_{260/280\text{nm}}$  y bandas definidas en el gel) fueron sometidas a los pasos subsiguientes.

#### 7.3.4.1. Electroforesis en geles de agarosa

Para analizar las muestras de ARN se realizó una corrida electroforética en geles de agarosa en un equipo Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se utilizó una concentración de agarosa de 2 % p/v en *buffer* TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM; pH 8,30) en presencia de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU). El *buffer* TBE también se utilizó como *buffer* de corrida. Las muestras de ARN se diluyeron hasta una concentración de 0,25 µg/µl en *buffer* de siembra (EDTA 5 µM, glicerol 5 % v/v, azul de bromofenol 0,025 % p/v) y la electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V y a temperatura ambiente. Luego de aproximadamente 20 minutos, las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV T2201 (Sigma-Aldrich, Inc.).

#### 7.3.4.2. Digestión con ADNasa y transcripción reversa (RT)

Con el objeto de eliminar posibles restos de ADN genómico, las muestras de ARN fueron sometidas a un tratamiento con la enzima ADNasa (DNase I Amplification Grade, Invitrogen™). Para ello, 2 µg de ARN se incubaron con la enzima durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por el agregado de EDTA 2,5 mM y posterior calentamiento a 65 °C durante 10 minutos. A continuación, se llevó a cabo la transcripción reversa (RT) agregando al ARN una solución conteniendo la enzima retrotranscriptasa y cebadores con secuencias de nucleótidos generadas al azar y secuencias de oligodesoxitimidinas (iScript™ cDNA synthesis kit, Bio-Rad Laboratories, Inc.). La mezcla se incubó por 5 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C y 5 minutos a 85 °C en un termociclador T18 (Ivema Desarrollos, Lavallol, Buenos Aires, Argentina). En paralelo se procesó una muestra de ARN a la que no se le agregó la retrotranscriptasa (NoRTC) para evaluar la efectividad del tratamiento con la enzima ADNasa. Las muestras de ADN copia (ADNc) se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior utilización.

## **8. Análisis de las muestras**

### **8.1. Determinaciones bioquímicas en suero**

#### **8.1.1. Determinación de colesterol y triglicéridos**

Se midió la concentración de lípidos en suero mediante kits comerciales basados en reacciones enzimáticas. La determinación de colesterol se realizó mediante el método de la enzima colesterol oxidasa (Colestat enzimático AA, Wiener lab Group, Rosario, Santa Fe, Argentina) y la determinación de triglicéridos, mediante el método de la enzima glicerol fosfato oxidasa (TG Color GPO/PAP, Wiener lab Group). En ambos casos se acopla una reacción colorimétrica catalizada por una enzima peroxidasa a la reacción principal, lo que da lugar a la formación de un producto coloreado con un máximo de absorbancia entre 490 y 530 nm. A partir de estándares de concentración conocida de colesterol o triglicéridos provistos en los kits, se realizaron las curvas de calibración correspondientes y se calculó la concentración de cada analito en las muestras.

Los métodos propuestos por el fabricante se adaptaron para realizar las determinaciones en microvolúmenes de muestra. Para ello, 2 µl de suero o de estándar se incubaron con 200 µl del reactivo correspondiente en placas de 96 pocillos. Luego de 5 minutos de incubación a 37 °C, se realizó la lectura de absorbancia a 495 nm en un espectrofotómetro de placas (Sunrise™, Tecan, Männedorf, Suiza).

#### **8.1.2. Determinación de insulina**

Se determinaron los niveles de insulina en suero mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) de tipo sándwich (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit 96-Well Plate, Millipore) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El ensayo se basa en la interacción de la insulina con dos anticuerpos específicos. El primero, monoclonal, se encuentra inmovilizado en la placa y captura al analito presente en las muestras. Una vez que esta interacción ha tenido lugar se agrega el segundo anticuerpo, policlonal y biotinilado, que reconoce a la insulina presente en los complejos ya formados. Luego, a este anticuerpo se une una enzima HRP conjugada a estreptavidina. Finalmente, mediante el monitoreo de la actividad de esta enzima en presencia del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina se cuantifican los conjugados anticuerpo-enzima, lo que resulta directamente

proporcional a la concentración de insulina presente en la muestra. La actividad enzimática se calcula a partir de la determinación espectrofotométrica del producto formado en un espectrofotómetro de placa (Sunrise™, Tecan). La medición de absorbancia se realiza a 450 nm y se corrige por el valor correspondiente a la absorbancia determinada a 590 nm. El valor resultante se interpola en una curva de calibración generada en el mismo ensayo con estándares de concentración conocida de insulina.

## **8.2. Análisis de los cortes histológicos**

### **8.2.1. Tinción con hematoxilina y eosina**

A partir de las muestras incluidas en parafina se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor que fueron dispuestos sobre un portaobjetos. Posteriormente, las secciones de tejido fueron desparafinizadas con xilol durante 1 minuto e hidratadas mediante incubaciones sucesivas de 5 minutos cada una en soluciones de alcohol de concentración decreciente (etanol 96°, 70°, 50°) y, finalmente, agua destilada. Luego de la tinción con hematoxilina (Biopur, Rosario, Santa Fe, Argentina) por 30 minutos y posterior viraje con agua corriente, las muestras se colorearon con eosina alcohólica (Biopur) durante 3 minutos. Los cortes fueron lavados con agua destilada y deshidratados por 5 minutos con etanol 90° y otros 5 minutos con etanol 100°. Por último, las muestras se dejaron secar, se agregó una gota de medio de montaje sobre ellas (Canadax, Biopur) y se cubrieron con un cubreobjetos.

### **8.2.2. Inmunohistoquímica**

Secciones de tejido de 5 µm de espesor incluidas en parafina fueron colocadas sobre portaobjetos y desparafinizadas con dos incubaciones de 5 minutos cada una en xilol e hidratadas con dos incubaciones de 5 minutos cada una en etanol 100° y en etanol 96°. Con el objeto de restaurar la conformación de los epitopes que podrían haberse alterado durante el proceso de fijación e inclusión de los tejidos, se sometieron las muestras a un paso de recuperación antigénica. Para ello, se incubaron con un *buffer* citrato 0,01 M en presencia de Tween 20 0,05 % v/v (pH 6,00) por 30 minutos a 98 °C. Luego, los cortes se incubaron con Tritón X-100 0,3 % v/v por 10 minutos para permitir una mejor penetración de los anticuerpos en el tejido. Con el fin de evitar su unión inespecífica, se realizó un bloqueo con SAB 1 % p/v en PBS

durante 1 hora a 4 °C y luego con suero de caballo 2,5 % v/v (R.T.U. VECTASTAIN kit, Vector Laboratories, Burlingame, California, EE. UU.) por 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C. En paralelo, cortes adicionales se incubaron con SAB 1 % p/v en PBS en las mismas condiciones para evaluar la señal inespecífica (control negativo). Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra/conejo/ratón seguido del complejo estreptavidina-peroxidasa (R.T.U. VECTASTAIN kit, Vector Laboratories), ambos por 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de las peroxidasas endógenas se bloqueó por el agregado de peróxido de hidrógeno 3 % v/v en PBS durante 30 minutos. La unión antígeno-anticuerpo se visualizó mediante la tinción con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB; Peroxidase (HRP) substrate kit, Vector Laboratories) que, en presencia de la enzima peroxidasa, produce un precipitado color marrón insoluble en alcohol y xilol. Los cortes se tiñeron con hematoxilina (Biopur) por 30 segundos y se enjuagaron con agua corriente para virar el colorante. Finalmente, se procedió a su deshidratación mediante incubaciones de 1 minuto en etanol 96°, de 3 minutos en etanol 100° y de 5 minutos en xilol. Las muestras se dejaron secar, se agregó el medio de montaje (Candax, Biopur) y se cubrieron con un cubreobjetos.

Esta técnica se utilizó para determinar la presencia en el tejido hepático del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y de galectina-1 (Gal-1). Para ello se utilizaron anticuerpos específicos anti-PCNA (dilución 1:100) y anti-Gal-1 (dilución 1:2000).

### **8.2.3. Obtención y procesamiento de imágenes microscópicas**

Las secciones de hígado teñidas con hematoxilina-eosina y aquellas sometidas a inmunohistoquímica se observaron en un microscopio de campo claro Leica DM2000 acoplado al programa Leica Application Suite (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Mediante una cámara digital Leica DFC400 (Leica Microsystems) se tomaron microfotografías representativas de cada preparado. Las imágenes obtenidas de los cortes teñidos con hematoxilina-eosina se analizaron con el *software* de dominio público Fiji (Schindelin y col., 2012) para determinar el número de hepatocitos por campo, como un estimativo del tamaño celular, y el área nuclear. De la misma forma, en los cortes sometidos a inmunohistoquímica se determinó el número de núcleos de

hepatocitos positivos para PCNA. A partir de este valor y el número total de estas células por campo se calculó el porcentaje de células en proliferación. Para cada determinación se analizaron diez campos por animal con un aumento de 400 x y se contaron todos los hepatocitos dentro de cada campo.

### **8.3. SDS-PAGE**

Las proteínas presentes en las muestras de hígado u orina se separaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras en un equipo para electroforesis Mini Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Estos geles se prepararon a partir de una solución madre de acrilamida/bisacrilamida compuesta por 29,2 % p/v de acrilamida y 0,8 % p/v de N,N'-metilenbisacrilamida. La reacción de polimerización se inició mediante el agregado de  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (1 % p/v) y se utilizó TEMED como catalizador de la reacción (0,09 % v/v). En todos los casos se emplearon geles discontinuos compuestos por un gel concentrador o *stacking* con una concentración de acrilamida/bisacrilamida de 4 % y un gel de resolución o *running* con una concentración de acrilamida/bisacrilamida entre 6 y 14 %, según el peso molecular de las proteínas en estudio. En cada corrida electroforética se incluyeron marcadores de peso molecular en un rango de 10 a 250 kDa (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Como medio de corrida se utilizó un *buffer* Tris-Glicina, de pH 8,30, compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % p/v. En aquellos experimentos en los que se evaluó la movilidad electroforética de Gal-1, se utilizó el sistema de *buffer* Tris-Tricina que brinda una mejor resolución de proteínas de peso molecular menor a 20 kDa (Schägger y col., 1987). En estos casos se usaron dos soluciones de corrida distintos como *buffer* ánodo (Tris-HCl 200 mM; pH 8,90) y *buffer* cátodo (Tris-HCl 100 mM, Tricina 100 mM, SDS 0,1 % v/v; pH 8,25). Todas las corridas electroforéticas se realizaron a temperatura ambiente, aplicando un voltaje constante de 100 V hasta que las proteínas alcanzaron el gel de resolución y luego un voltaje de 150 V hasta finalizar la electroforesis.

Para determinar la presencia de la proteína mayoritaria urinaria (MUP) en las muestras de orina, los geles correspondientes se tiñeron durante toda la noche con el colorante azul de Coomassie (0,25 % p/v en metanol, ácido acético y agua 45:7:48 v/v). Al día siguiente, los geles se decoloraron con agua hirviendo para observar las bandas correspondientes a las proteínas presentes en las muestras.

#### 8.4. Inmunotransferencia (*immunoblotting*)

Las proteínas provenientes de las muestras de solubilizado e inmunoprecipitación del tejido hepático separadas por SDS-PAGE fueron transferidas del gel a membranas de PVDF (Amersham Hybond P 0,45 PVDF, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) previamente activadas con metanol durante 20 segundos. La electrotransferencia en condiciones semisecas se realizó en un equipo modelo V20-SDB (Scie-Plas Ltd., Cambourne Cambridge, Reino Unido) durante una hora a corriente constante (0,1 A/membrana) y en presencia de un *buffer* de transferencia compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % v/v y SDS 0,03 % p/v. A continuación, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo compuesta por SAB al 3 % p/v en *buffer* Tris salino con Tween 20 (T-TBS; Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0,02 % p/v; pH 7,60) para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos. Una vez bloqueadas, las membranas se incubaron durante toda la noche, a 4 °C y en agitación constante, con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés diluido en T-TBS y en presencia de SAB 1 % p/v. Al día siguiente, luego de 30 minutos de lavados con T-TBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con HRP diluido en T-TBS y en presencia de SAB 0,3 % p/v. Este anticuerpo reconoce la IgG de la especie correspondiente al primer anticuerpo. Luego de una hora a temperatura ambiente, las membranas se sometieron a múltiples lavados con T-TBS durante una hora. La presencia del complejo formado por la proteína de interés y los anticuerpos primario y secundario se reveló utilizando un reactivo quimioluminiscente y quimiofluorescente sustrato de la enzima HRP (Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific, Inc.) y placas autorradiográficas (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare). La intensidad de las bandas específicas obtenidas se cuantificó por densitometría óptica con el programa Gel-Pro® Analyzer 4.1 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EE. UU.).

En los casos en que fue posible según los pesos moleculares de las proteínas de interés, las membranas fueron reincubadas con otro anticuerpo primario para evidenciar la expresión de una segunda proteína. Para ello, las membranas se lavaron por al menos media hora con T-TBS en agitación, para remover restos del reactivo quimioluminiscente, y luego fueron incubadas con otro anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C y en agitación constante. Al día siguiente se continuó con el protocolo ya descrito.

#### 8.4.1. Dilución de los anticuerpos

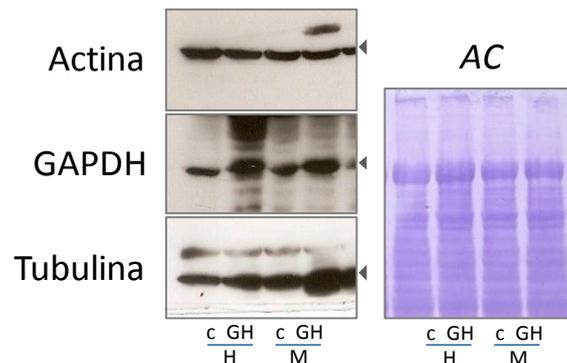
Los anticuerpos se utilizaron en las siguientes diluciones: anti-actina 1:600, anti-Akt 1:1000, anti-fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>) 1:1000, anti-CIS 1:200, anti-EGFR 1:1000, anti-ERK1/2 1:1000, anti-fosfo-ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) 1:750, anti-Gal-1 1:1000, anti-GAPDH 1:100, anti-GSK3 1:1000, anti-fosfo-GSK3 (Ser<sup>9</sup>) 1:1000, anti-mTOR 1:500, anti-fosfo-mTOR (Ser<sup>2448</sup>) 1:500, anti-MUP 1:2000, anti-SOCS2 1:500, anti-SOCS3 1:500, anti-STAT3 1:1000, anti-fosfo-STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) 1:750, anti-STAT5a/b 1:20 000, anti-fosfo-STAT5a/b (Tyr<sup>694</sup>/Tyr<sup>699</sup>) 1:750, anti-tubulina 1:500, anti-IgG de cabra 1:10 000, anti-IgG de conejo 1:15 000 y anti-IgG de ratón 1:15 000

#### 8.4.2. Controles del ensayo

Las proteínas comúnmente utilizadas como control de carga en ensayos de *immunoblotting* presentan variaciones asociadas a la sobreexpresión de GH en el hígado de los ratones GH-transgénicos y sus hermanos de camada normales (Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2015, Martínez y col., 2016). En consecuencia, para evidenciar la homogeneidad del contenido proteico total de las muestras de hígado de estos ratones analizadas por SDS-PAGE, las membranas de PVDF fueron teñidas con azul de Coomassie luego de cada ensayo de *immunoblotting* (Welinder y col., 2011, Martínez y col., 2015, Martínez y col., 2016). Para ello, las membranas se incubaron durante 15 minutos con una solución del colorante (0,1 % p/v en metanol y agua 1:1 v/v) luego de lavarlas brevemente, primero con T-TBS y luego con agua destilada. A continuación, las membranas se decoloraron entre 1 y 2 minutos con una solución de ácido acético, etanol y agua (1:5:4 v/v).

Para evaluar si el tratamiento con dosis farmacológicas de GH también afecta la expresión de proteínas típicamente utilizadas como control de carga, se analizaron mediante ensayos de *immunoblotting* muestras de solubilizados hepáticos provenientes de ratones tratados con GH y sus respectivos controles con anticuerpos anti-actina, anti-GAPDH y anti-tubulina. Los resultados se muestran en la **Figura 10**, junto a la imagen de una de las membranas teñida con azul de Coomassie luego del revelado. Se observa que tanto la expresión de GAPDH como de tubulina presentan variaciones asociadas al tratamiento con GH. En cambio, no se observan variaciones en la expresión de actina, lo que reflejaría la homogeneidad del contenido total de proteínas presentes en las muestras. La tinción con azul de Coomassie también permite evidenciar esto,

pero presenta la ventaja, en comparación con el uso de actina como control de carga, que evita un paso adicional de remoción de los anticuerpos primario y secundario unidos a la membrana, que sería necesario llevar a cabo si la proteína de interés tiene un peso molecular similar al de la actina. Además, en los geles de bajo porcentaje de acrilamida/bisacrilamida, la actina no queda retenida debido a su peso molecular, por lo que se necesitaría utilizar otra proteína como control de carga. En cambio, la tinción con azul de Coomassie no tiene esta limitación. Asimismo, esta técnica permite hacer un control de la eficiencia de la electrotransferencia en toda la membrana. En consecuencia, la tinción con azul de Coomassie también se utilizó como control de carga en los ensayos de *immunoblotting* realizados con muestras provenientes de los ratones tratados con GH y sus controles.



**Figura 10 – Tinción con azul de Coomassie y expresión de actina, GAPDH y tubulina como controles de carga para los ensayos de immunoblotting** - Se determinaron los niveles de estas proteínas en solubilizados hepáticos de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH de forma intermitente durante cinco semanas (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) por immunoblotting mediante anticuerpos específicos. A continuación, las membranas de PVDF fueron teñidas con azul de Coomassie (AC). Se muestra una membrana representativa.

### 8.5. PCR cuantitativa (qPCR)

Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en un equipo Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Beverly, Massachusetts, EE. UU.) que permite el seguimiento de la aparición de producto en tiempo real. Para ello se utilizó la mezcla Sybr® Select Master Mix (Applied Biosystems™) que contiene, además de la enzima, el buffer y los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) necesarios para la reacción de polimerización del ADN, el colorante verde SYBR. Este compuesto se asocia al ADN de doble cadena y, una vez unido, aumenta su capacidad de fluorescencia. Por consiguiente, cuando la

muestra es excitada a 498 nm, que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción del verde SYBR, se produce un aumento de la emisión de fluorescencia a 522 nm que es proporcional a la cantidad de ADN doble cadena presente.

Las muestras de ADNc se incubaron con cebadores en una concentración final de 300 nM y la mezcla Sybr® Select Master Mix (Applied Biosystems™) en un volumen final de 13 µl. Luego, fueron sometidas a las siguientes condiciones de reacción: 2 minutos a 50 °C y 2 minutos a 95 °C para activar la enzima ADN polimerasa, seguidos de 40 ciclos compuestos de 15 segundos de desnaturalización a 95 °C y 1 minuto de hibridación y extensión a 60 °C. En paralelo, se procesaron dos tipos de controles negativos: uno sin templado (NTC) y otro con ARN que no fue sometido a la reacción de RT (NoRTC). Luego de cada corrida se generaron curvas de disociación para evaluar la especificidad de la reacción y detectar la presencia de productos secundarios. La determinación del ciclo de cuantificación (*C<sub>q</sub>*) se realizó mediante el *software* Step One Plus™ v2.3 (Applied Biosystems™) con el umbral y la línea de base determinados automáticamente. Todas las muestras y controles se procesaron por duplicado. Esta técnica también se utilizó para detectar el transgén *bGH* dado que los ratones GH-transgénicos de dos semanas de vida no se diferencian de sus hermanos de camada normales por el tamaño corporal.

Los cebadores utilizados se diseñaron mediante los programas de libre acceso Primer BLAST (Ye y col., 2012) y OligoPerfect™ Designer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo a recomendaciones estándar: temperatura de disociación entre 55 y 65 °C, longitud entre 18 y 25 pares de bases, contenido de GC entre 45 y 60 % y que delimiten un producto de amplificación de entre 50 y 150 pares de bases. La presencia de estructuras secundarias estables de los cebadores y de los productos de amplificación se evaluó mediante el programa de libre acceso OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, EE. UU.). De esta forma, se seleccionaron aquellos cebadores que no formasen horquillas, homo u heterodímeros y que no amplificasen regiones que pudieran formar estructuras secundarias estables. Además, se verificó su especificidad mediante la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del programa Primer BLAST. En la **Tabla 1** se presentan las secuencias de los cebadores utilizados, los cuales se adquirieron a Integrated DNA Technologies, Inc. e Invitrogen™.

Tabla 1 – Secuencias de los cebadores utilizados en los ensayos de qPCR.

Gen	Nombre	nº de acceso GeneBank	Secuencia (5'-3')*
<i>B2m</i>	beta-2 microglobulina	NM_009735.3	AAGTATACTCAGCCACCCA <sup>a</sup> AAGACCAGTCCTTGCTGAAG <sup>b</sup>
<i>Ccnd1</i>	ciclina D1	NM_007631.2	GCGAAGTGGAGACCATCCG <sup>a</sup> GGTCTCCTCCGTCTTGAGC <sup>b</sup>
<i>Ccne1</i>	ciclina E	NM_007633.2	GGCGGACACAGCTTCGGGTC <sup>a</sup> TGGGTCTTGCAAAAACACGGCCA <sup>b</sup>
<i>Cis</i>	proteína SH2 inducible por citoquinas	NM_009895.4	TGCATAGCCAAGACGTTCTC <sup>a</sup> GTGGGTGCTGTCTCGAATA <sup>b</sup>
<i>Fos</i>	oncogén de osteosarcoma FBJ	NM_010234.2	CCGACTACGAGGCGTCATCC <sup>a</sup> CTGCGCAAAAGTCCTGTGT <sup>b</sup>
<i>GH (bovina)</i>	hormona de crecimiento (bovina)	NM_180996.1	GGGCAGATCCTCAAGCAGAC <sup>a</sup> GAAGCAGGAGAGCAGACCG <sup>b</sup>
<i>Ghr</i>	receptor de hormona de crecimiento	NM_001286370.1	CCAACCTCGCTTACACCG <sup>a</sup> GGGAAAGGACTACACCACCTG <sup>b</sup>
<i>Igf1</i>	factor de crecimiento similar a insulina de tipo 1	NM_010512.4	CCAAACACAATTCTCCTTCC <sup>a</sup> GCTACAGCAACCTGTGATTG <sup>b</sup>
<i>Jun</i>	protooncogén Jun	NM_010591.2	CATTGCCGCTCCAAGTG <sup>a</sup> CCAGCTCGGAGTTTTGCG <sup>b</sup>
<i>Lgals1</i>	lectina soluble de unión a galactosa 1 (Gal-1)	NM_008495.2	TGAACCTGGGAAAAGACAGC <sup>a</sup> TCAGCCTGGTCAAAGGTGAT <sup>b</sup>
<i>Myc</i>	oncogén de mielocitomatosis	NM_001177352.1	TCACCAGCACAACTACGCCG <sup>a</sup> TGCTTCAGGACCCTGCCACT <sup>b</sup>
<i>Ppia</i>	peptidilprolil isomerasa A	NM_008907.1	GCGTCTCCTTGAGCTGTT <sup>a</sup> AAGTACCACCTGGCAC <sup>b</sup>
<i>Rpl13a</i>	proteína ribosomal L13A	NM_009438.5	TGACAAGAAAAGCGGATGGTG <sup>a</sup> GCTGTCACTGCCTGGTACTT <sup>b</sup>
<i>Socs2</i>	supresor de la señal de citoquinas 2	NM_007706.4	TGTGAGTCCCAACCTAGTGC <sup>a</sup> GTAGAAGGGAGGCAGCTGTT <sup>b</sup>
<i>Socs3</i>	supresor de la señal de citoquinas 3	NM_007707.3	CTAGGTGAGGAGTGGTGGCT <sup>a</sup> CTGCGAGGTTTCATTAGCTG <sup>b</sup>

\*Se presentan las secuencias sentido (a) y antisentido (b).

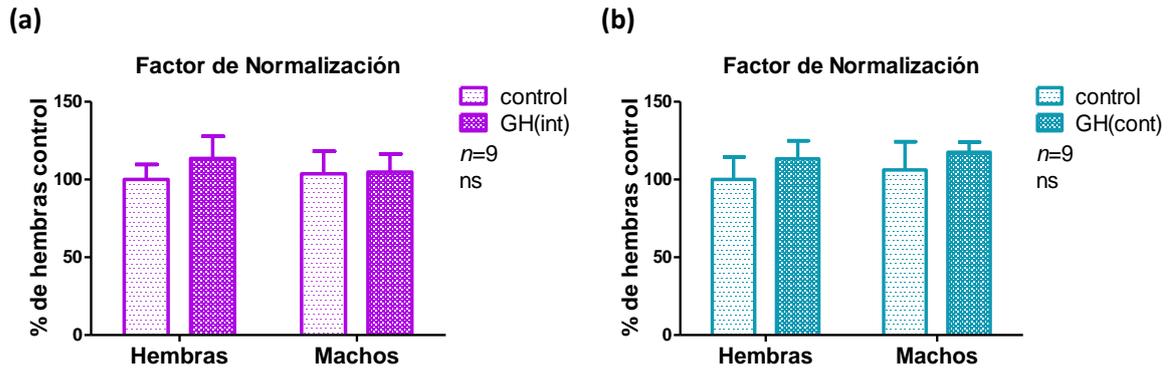
La eficiencia de amplificación de cada par de cebadores se obtuvo a partir del valor de la pendiente ( $m$ ) de curvas estándar generadas mediante la determinación del valor de  $C_q$  de diluciones seriadas de ADNc. Para ello se utilizó una mezcla de muestras de ADNc obtenidas de hígado de ratones normales (Swiss-Webster o hermanos de camada de los ratones GH-transgénicos) y se realizaron seis diluciones seriadas al medio. La eficiencia de amplificación de cada par de cebadores se calculó según la ecuación  $E\% = (10^{(-1/m)} - 1) \cdot 100\%$  (Tabla 2). Asimismo, estos gráficos permitieron elegir la cantidad de ADNc a utilizar en las mediciones de cada gen de interés, de manera tal de asegurar un valor de  $C_q$  adecuado (menor a 35).

**Tabla 2** – Eficiencia (%) de cada par de cebadores y cantidad de ADNc utilizada en los distintos ensayos de qPCR

Gen	Eficiencia (%)	Cantidad de ADNc (ng*)
<i>B2m</i>	106	20
<i>Ccnd1</i>	98	30
<i>Ccne1</i>	95	30
<i>Cis</i>	96	30
<i>Ghr</i>	99	20
<i>Fos</i>	98	30
<i>Jun</i>	97	30
<i>Lgals1</i>	98	20
<i>Myc</i>	102	10
<i>Igf1</i>	97	20
<i>Ppia</i>	104	10
<i>Rpl13a</i>	97	10
<i>Socs2</i>	103	20
<i>Socs3</i>	103	30

\*Estos valores corresponden a la masa de ARN que fue sometida a la reacción de RT.

La expresión relativa de cada gen se calculó mediante el método de comparación de  $C_q$  (Pfaffl, 2001) por el cual los resultados de las muestras se refieren a un calibrador según la ecuación  $(E+1)^{A-B}$ , donde E es igual a la eficiencia de amplificación, A, al promedio de valores de  $C_q$  del experimento correspondiente y B, al promedio de valores de  $C_q$  de la muestra en cuestión. Los niveles relativos de expresión de los genes de interés se normalizaron por los niveles de genes de referencia. Los genes *B2m*, *Ppia* y *Rpl13a* se utilizaron como tales en los experimentos realizados con muestras obtenidas de ratones tratados con GH. Se calculó un factor de normalización para cada muestra en estudio como la media geométrica de los niveles relativos de expresión de estos tres genes (Vandesompele y col., 2002). En la **Figura 11** se presentan los valores promedio del factor de normalización obtenidos para cada condición experimental, donde se verifica que no existen diferencias significativas en sus niveles asociadas al tratamiento con GH o al sexo.



**Figura 11 – Factor de normalización obtenido a partir de los niveles de expresión de genes de referencia** – Se determinaron los niveles de ARNm de *B2m*, *Ppia* y *Rpl13a* por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídos de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día). Se calcularon los niveles relativos de expresión de cada gen y las medias geométricas de estos valores para cada muestra. Se representa la media  $\pm$  ESM del número n de individuos por condición. No se observan diferencias significativas entre las condiciones experimentales evaluadas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (ns).

En los experimentos realizados en ratones GH-transgénicos y sus hermanos de camada normales, se utilizó *Ppia* como gen de referencia de acuerdo a trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo en muestras de hígados provenientes de estos ratones, adultos y en período de crecimiento (Martínez y col., 2013, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2015, González y col., 2017).

## 9. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los resultados se indican como la media  $\pm$  el error estándar de la media (ESM) de los valores obtenidos para el conjunto de individuos correspondientes a cada condición experimental. Los experimentos se realizaron analizando todos los grupos de animales en paralelo.

### 9.1. Curvas de peso corporal

Las curvas de peso corporal se obtuvieron graficando el peso de los animales en función de la edad. Los datos también se presentan como diferencia de peso entre los ratones tratados y los controles, tomando como 100 % el peso promedio de estos últimos para cada punto de la curva.

## **9.2. Curvas de tolerancia a la glucosa**

Las curvas de tolerancia a la glucosa se obtuvieron graficando el valor de glucemia en función del tiempo transcurrido después de la inyección de glucosa. El área bajo la curva se calculó mediante el programa estadístico GraphPad Prism™ 5.01 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, California, EE. UU.).

## **9.3. Immunoblotting y RT-qPCR**

En los experimentos realizados en ratones Swiss-Webster tratados con GH, los resultados de *immunoblotting* y RT-qPCR se expresaron como el porcentaje del valor promedio obtenido para las hembras control de cada tratamiento. En el caso de las proteínas MUPs y EGFR que no se detectan en estos animales por su baja concentración, los resultados se expresaron como el porcentaje del valor promedio obtenido para los machos control. En los experimentos donde los animales previamente tratados con GH se estimularon con EGF, se tomó como referencia el valor promedio de las hembras control del tratamiento con la hormona que fueron estimuladas con EGF para calcular el porcentaje. En los experimentos realizados en ratones GH-transgénicos y sus hermanos de camada normales de distintas edades, los resultados se expresaron como porcentaje del valor promedio obtenido para los animales hembra y macho normales de nueve semanas de vida.

## **9.4. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Bonferroni, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism™ 5.01 (GraphPad Software, Inc.). En algunos casos, donde se buscó analizar alguna de las condiciones experimentales de forma independiente, los datos se analizaron por el test *t* de Student. Los resultados experimentales se consideraron significativamente diferentes cuando el valor de  $p$  fue menor a 0,05.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **SECCIÓN I: Ratones normales tratados con hormona de crecimiento**

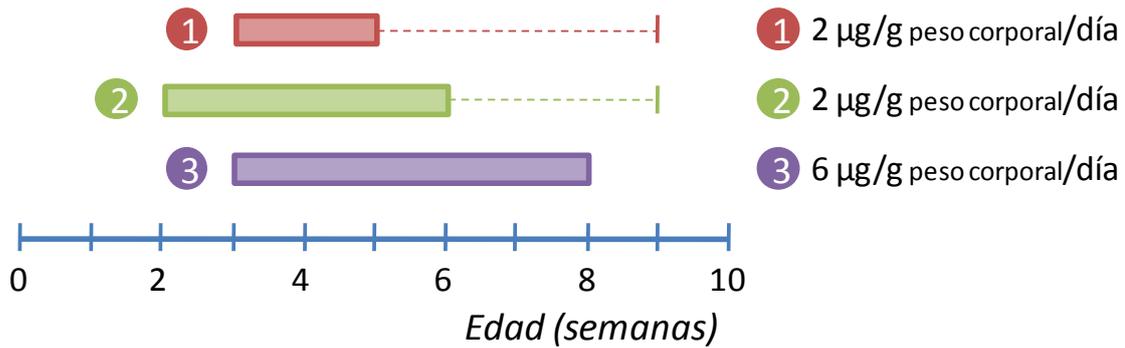
En esta sección se presentan los resultados correspondientes a ratones de la cepa Swiss-Webster que han sido sometidos a un tratamiento con GH para promover su crecimiento corporal. Estos ratones no poseen alteraciones en el eje somatotrópico, por lo que con este modelo se buscó emular la terapia farmacológica que reciben niños sin déficit de hormona. Se evaluaron distintas condiciones, de manera tal de encontrar aquellas que promuevan diferencias significativas en el crecimiento corporal entre los ratones tratados y sus respectivos controles. Para ello fue necesario no solo determinar la dosis diaria de GH a utilizar, sino también la duración del tratamiento y el momento de inicio del mismo, ya que la sensibilidad a la hormona varía a lo largo del período de crecimiento. Para esta puesta a punto, las dosis de GH evaluadas se administraron divididas en dos inyecciones diarias. A esta forma de administración se hará referencia a lo largo del texto como “intermitente”.

Una vez establecidas las condiciones necesarias para generar el modelo de ratones expuestos a concentraciones farmacológicas de GH, se compararon los efectos del tratamiento intermitente con los producidos por la misma dosis de hormona administrada mediante dispositivos de liberación sostenida durante el mismo período. Este modo de administración se denomina “continuo” en contraposición al anterior.

#### **1. Desarrollo del modelo de administración de GH en concentraciones farmacológicas**

##### **1.1. Puesta a punto: análisis de la dosis de GH, edad de inicio del tratamiento y duración del mismo**

Con el objeto de definir el tratamiento a utilizar, se evaluaron dos dosis de GH y distintos períodos de tratamiento. La dosis diaria de GH se dividió en dos inyecciones, buscando imitar los pulsos endógenos de GH, ya que así sería más eficiente en la promoción del crecimiento corporal que una única aplicación por día (Jørgensen y col., 1990, Alba y col., 2005). En la **Figura 12** se presenta un esquema que resume las condiciones evaluadas.



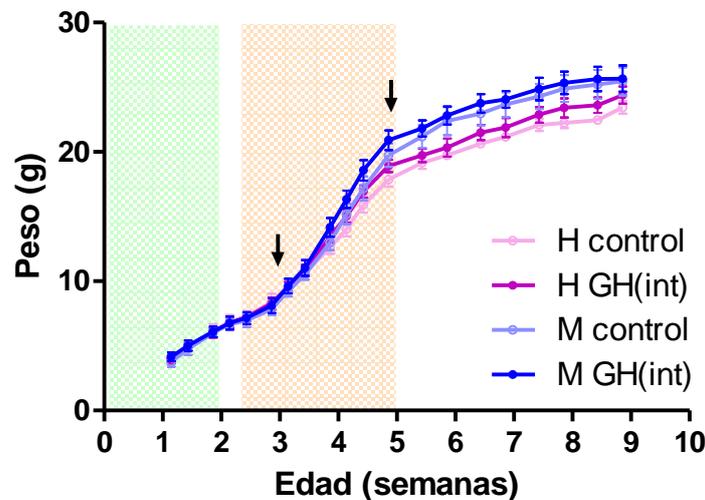
**Figura 12 – Dosis y duración de los tratamientos evaluados** – Las cajas muestran el período durante el cual los animales recibieron GH en la dosis especificada, dividida en dos inyecciones diarias. En el caso de las condiciones 1 y 2, los animales se sacrificaron a las nueve semanas de vida; mientras que en la condición 3, el sacrificio se llevó a cabo al finalizar el tratamiento, a las ocho semanas de vida.

### 1.1.1. Ratones tratados de forma intermitente durante dos semanas (2 $\mu\text{g}$ GH/g peso corporal/día) a partir de la tercera semana de vida

En experimentos anteriores de nuestro laboratorio, se observó que una dosis de GH de 1  $\mu\text{g/g}$  peso corporal/día, administrada durante cinco días a ratones hembra adultos, induce cambios a nivel de la señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Díaz y col., 2014). El tratamiento con GH en esta dosis modifica el contenido de EGFR en hígado y, en consecuencia, la respuesta al EGF de proteínas involucradas en la promoción de la proliferación celular. Cuando se analizan otros trabajos realizados en distintos modelos de animales tratados con GH, donde se evalúa el efecto de su administración sobre el crecimiento corporal, la dosis efectiva varía según la edad de los animales tratados. Dosis cercanas a la utilizada por nuestro grupo de trabajo inducen un aumento de peso en animales adultos en comparación con sus controles correspondientes, tanto en ratas hipofisectomizadas (Oscarsson y col., 1999) como en animales sin alteraciones en el eje somatotrópico (Jørgensen y col., 1988, Jørgensen y col., 1991, Gao y col., 2013). Sin embargo, las dosis que se utilizan con ese fin en animales en crecimiento generalmente son mayores a 1  $\mu\text{g/g}$  peso corporal/día (Kasukawa y col., 2003, Masternak y col., 2010, Panici y col., 2010). Por ende, se evaluó una dosis de 2  $\mu\text{g}$  GH/g peso corporal/día, considerando que podría promover el crecimiento corporal sin ser mucho mayor que aquella que ya tiene efectos a nivel molecular en el hígado adulto. El tratamiento se inició a las tres semanas de vida y se prolongó durante 14 días, ya que a esta edad tiene lugar el período de crecimiento rápido peripuberal dependiente de GH y la capacidad de respuesta frente a un

estímulo agudo con hormona, evaluada en términos de fosforilación de STAT5 en hígado, es máxima (Martínez y col., 2013).

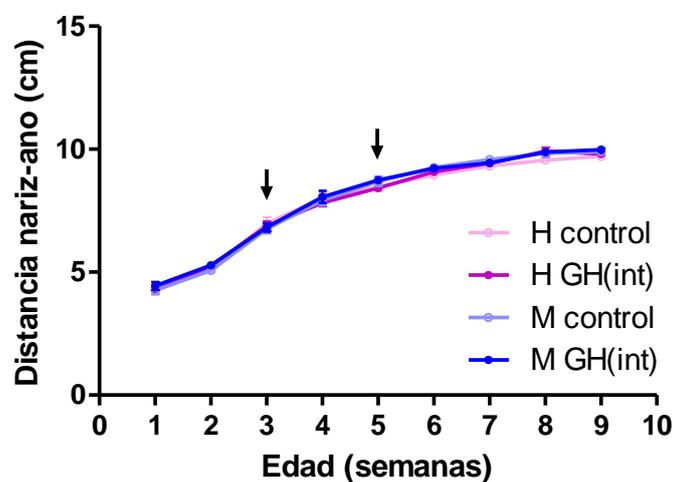
Para evaluar los efectos de la administración de la hormona sobre el crecimiento corporal, los ratones tratados con GH y sus controles se pesaron tres veces por semana desde la primera semana de vida. A partir de estos datos se construyó una curva de peso en función de la edad (**Fig. 13**). En este gráfico se ponen de manifiesto las distintas fases de crecimiento: una etapa inicial de crecimiento rápido, que dura alrededor de dos semanas, un breve período de desaceleración y luego, una segunda fase de crecimiento rápido peripuberal que se mantiene hasta aproximadamente las cinco semanas de vida y corresponde al crecimiento dependiente de GH. Luego, el crecimiento se desacelera gradualmente. Si se comparan las curvas obtenidas para los cuatro grupos experimentales, se observa que el peso promedio de los ratones tratados con GH es levemente mayor que el de sus respectivos controles desde el inicio del tratamiento, aunque en ninguno de los sexos estas diferencias son significativas.



**Figura 13 – Crecimiento corporal (tratamiento de dos semanas de duración)** – Peso corporal en función de la edad de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH ( $2 \mu\text{g/g}$  peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante dos semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 4 y 6 individuos por condición. Las áreas sombreadas, verde y anaranjada, corresponden a los períodos de crecimiento independiente y dependiente de GH, respectivamente. Las flechas indican el inicio y fin del tratamiento. No se observan diferencias significativas entre las curvas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

La determinación del peso corporal es una medida rápida y sencilla que permite evaluar los efectos sobre el crecimiento. En general se observa una

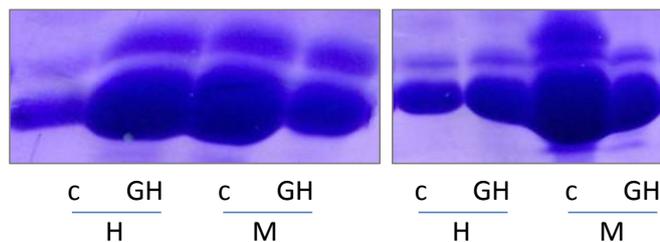
buena correlación entre los efectos de la GH sobre el peso corporal y la longitud corporal en animales en crecimiento (Jansson y col., 1982). Sin embargo, en algunas circunstancias el peso puede no ser un buen indicador del crecimiento longitudinal, sobre todo si se producen alteraciones en la composición corporal que afecten el peso del individuo (Palmer y col., 2009). Por ende, se realizaron otras determinaciones relacionadas directamente con el crecimiento longitudinal como la medición de la distancia nariz-ano y, en algunos casos, la determinación *post mortem* de la longitud de los huesos de las patas traseras. Cuando se analizó la variación de la longitud corporal en función de la edad de los ratones tratados con GH durante dos semanas y los controles, no se observaron diferencias por sexo ni por tratamiento (Fig. 14).



**Figura 14 – Crecimiento corporal longitudinal (tratamiento de dos semanas de duración)** – Distancia nariz-ano en función de la edad de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH (2  $\mu\text{g/g}$  peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante dos semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 4 y 6 individuos por condición. Las flechas indican el inicio y fin del tratamiento. No se observan diferencias significativas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

Para corroborar que la ausencia de efectos significativos de la GH sobre el crecimiento corporal se debe únicamente a que la dosis o duración del tratamiento no resultó suficiente, se realizó un control indirecto de la efectividad de la administración de la GH mediante la determinación de ciertas proteínas cuya expresión depende del perfil sanguíneo de hormona. Con este propósito, se evaluó el contenido de las proteínas urinarias mayoritarias (MUPs) en orina recolectada al acecho al finalizar el tratamiento. La expresión de las mismas se induce por el perfil intermitente de GH en sangre característico de los machos (Knopf y col., 1983, Norstedt y col., 1984, Johnson y col., 1995,

Stopková y col., 2007). En las hembras los pulsos de GH se dan con alta frecuencia y baja amplitud, por lo que el perfil fisiológico de hormona en sangre puede considerarse de tipo continuo, en contraposición al descripto para los machos (Jansson y col., 1985, MacLeod y col., 1991). En consecuencia, la expresión de las MUPs en las hembras en condiciones fisiológicas es muy baja. Ante la administración intermitente de GH, que simula el perfil plasmático de hormona de los machos, es de esperarse que la expresión de estas proteínas aumente en las hembras (Norstedt y col., 1984, Díaz y col., 2014). Como se observa en la **Figura 15**, al finalizar el tratamiento los niveles de MUPs en orina son mayores en las hembras que recibieron GH de forma intermitente que en los controles correspondientes. En el caso de los machos, la administración de la hormona genera una disminución en los niveles de estas proteínas en orina. Dado que el tratamiento se asemeja al perfil intermitente de GH característico de los machos, no cabría esperar una variación en el contenido de MUPs en orina (Díaz, 2013).



**Figura 15 – Contenido de MUPs en orina al finalizar el tratamiento de dos semanas de duración** – Muestras de orina de ratones hembra (H) y macho (M) de cinco semanas de vida, control (c) y tratados con GH (2  $\mu\text{g/g}$  peso corporal/día) de forma intermitente (GH) durante dos semanas fueron analizadas por SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie.

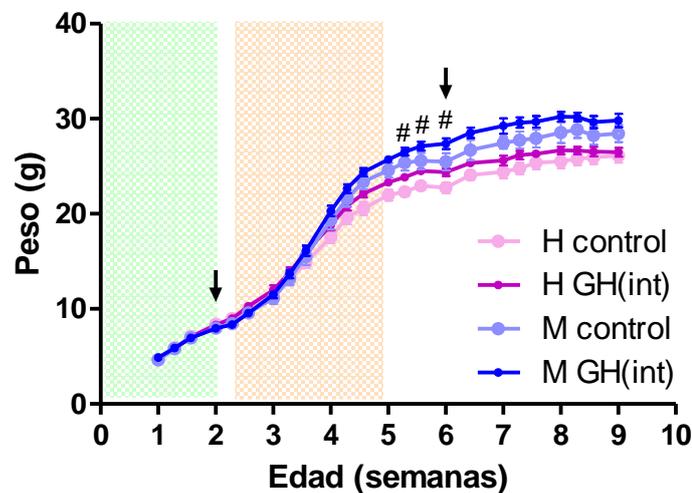
Con estos resultados se comprueba que, si bien la hormona llega efectivamente a circulación y modifica el perfil fisiológico de concentración de GH en sangre, la dosis administrada y/o la duración del tratamiento es insuficiente para promover el crecimiento corporal de forma significativa.

### 1.1.2. Ratones tratados de forma intermitente durante cuatro semanas (2 $\mu\text{g}$ GH/g peso corporal/día) a partir de la segunda semana de vida

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se evaluó el efecto de un tratamiento de mayor duración que, además, se inicie antes del período de crecimiento rápido dependiente de GH. Como se ha descrito previamente, aun

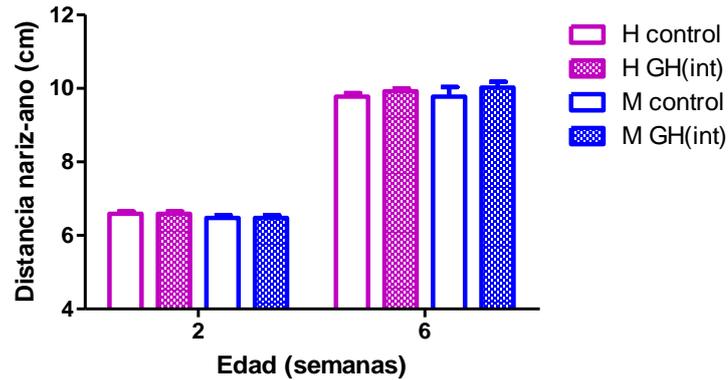
durante el período de crecimiento independiente de GH el tejido hepático es capaz de responder ante un estímulo agudo de la hormona. De hecho, a las dos semanas de vida el grado de respuesta ante este estímulo es similar al obtenido en ratones de tres semanas (Martínez y col., 2013).

Para evaluar la efectividad del tratamiento, se registró el peso de los animales tres veces por semana a partir de la primera semana de vida y se construyó la curva de crecimiento correspondiente (Fig. 16). Cuando se comparan las curvas de los ratones tratados con GH con sus respectivos controles, solo se observan diferencias significativas en las hembras en los últimos cinco días de tratamiento, mientras que no se observan diferencias significativas asociadas al tratamiento en los ratones macho.



**Figura 16 – Crecimiento corporal (tratamiento de cuatro semanas de duración) –** Peso corporal en función de la edad de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH ( $2 \mu\text{g/g}$  peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cuatro semanas. Las áreas sombreadas, verde y anaranjada, corresponden a los períodos de crecimiento independiente y dependiente de GH, respectivamente. Las flechas indican el inicio y fin del tratamiento. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 9 y 11 individuos por condición. Numerales indican diferencias significativas entre ratones hembra tratados con GH y su control correspondiente según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $\#p < 0,05$ ).

La longitud corporal se evaluó al inicio y al final del tratamiento, a las dos y seis semanas de vida respectivamente (Fig. 17). Al finalizar el tratamiento, la distancia nariz-ano de los ratones tratados con GH es levemente mayor que la de los controles, aunque estas diferencias no son significativas.



**Figura 17 - Longitud corporal (tratamiento de cuatro semanas de duración)** - Distancia nariz-ano de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH (2  $\mu\text{g/g}$  peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cuatro semanas. Se muestran las determinaciones realizadas el día de inicio y fin del tratamiento. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 9 y 11 individuos por condición. No se observan diferencias significativas entre los ratones tratados y sus respectivos controles según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

A las nueve semanas de vida los animales fueron sacrificados para evaluar la longitud de los huesos de las patas traseras, el peso de órganos blanco de la GH y su relación con el peso corporal (**Tablas 3 y 4**). Cuando se comparan los valores obtenidos para los ratones tratados con GH durante cuatro semanas y sus controles correspondientes, no se detectan diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados.

**Tabla 3 - Longitud de los huesos de las patas traseras de ratones hembra (H) y macho (M) de nueve semanas de vida, control y tratados con GH (2  $\mu\text{g/g}$  peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cuatro semanas.** Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 9 y 11 individuos por condición. No se observan diferencias significativas entre los ratones tratados y sus respectivos controles según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

	Longitud de huesos (mm)			
	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)
<b>Fémur</b>	14,01 $\pm$ 0,26	14,08 $\pm$ 0,08	13,95 $\pm$ 0,14	14,15 $\pm$ 0,14
<b>Tibia</b>	17,53 $\pm$ 0,17	17,65 $\pm$ 0,19	17,54 $\pm$ 0,27	17,35 $\pm$ 0,14

**Tabla 4** - Peso de órganos blanco de la GH **(a)** y su relación con el peso corporal **(b)** de ratones hembra (H) y macho (M) de nueve semanas de vida, control y tratados con GH (2 µg/g peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cuatro semanas. Se representa la media ± ESM de entre 9 y 11 individuos por condición. No se observan diferencias significativas entre los ratones tratados y sus respectivos controles según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

<b>(a)</b>				
<b>Peso de órganos (g)</b>				
	<b>H control</b>	<b>H GH(int)</b>	<b>M control</b>	<b>M GH(int)</b>
<b>Hígado</b>	1,215 ± 0,082	1,079 ± 0,064	1,286 ± 0,093	1,288 ± 0,093
<b>Corazón</b>	0,129 ± 0,007	0,140 ± 0,011	0,142 ± 0,007	0,158 ± 0,008
<b>Riñón</b>	0,299 ± 0,018	0,280 ± 0,011	0,380 ± 0,030	0,389 ± 0,017
<b>(b)</b>				
<b>Peso de órganos / Peso corporal (%)</b>				
	<b>H control</b>	<b>H GH(int)</b>	<b>M control</b>	<b>M GH(int)</b>
<b>Hígado</b>	4,625 ± 0,227	4,050 ± 0,191	4,522 ± 0,230	4,266 ± 0,230
<b>Corazón</b>	0,494 ± 0,025	0,525 ± 0,038	0,499 ± 0,009	0,512 ± 0,020
<b>Riñón</b>	1,142 ± 0,052	1,051 ± 0,030	1,335 ± 0,067	1,293 ± 0,042

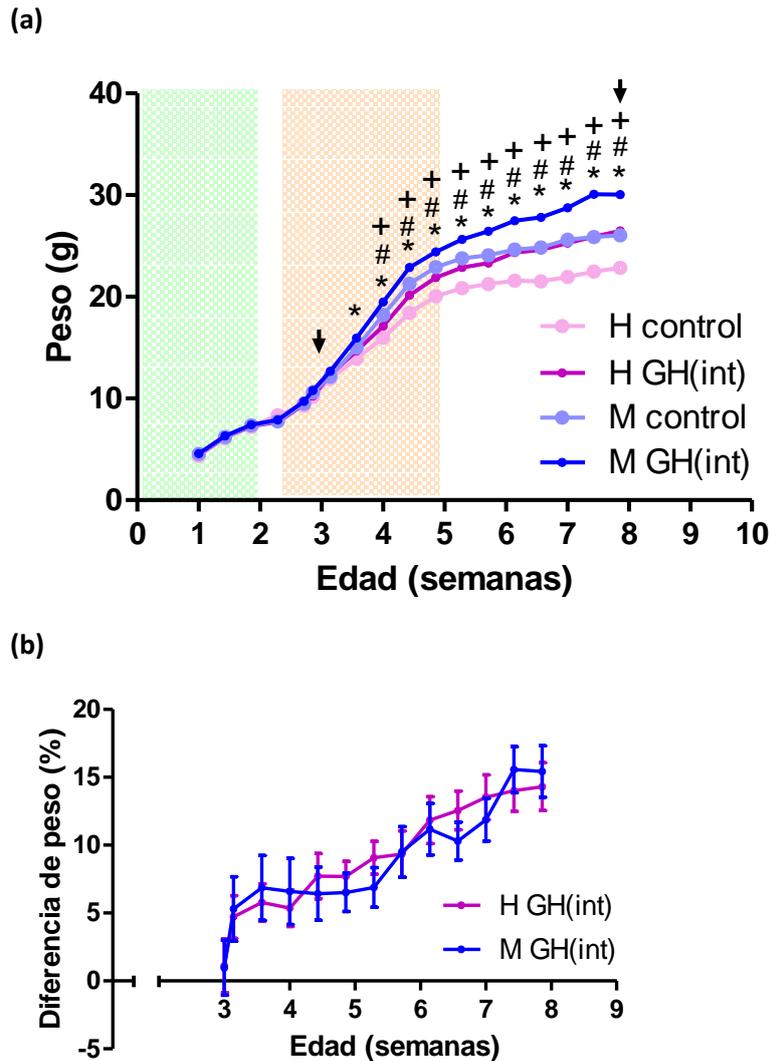
Del análisis de estos resultados se desprende que una dosis de 2 µg GH/g peso corporal/día resultaría insuficiente para promover el crecimiento corporal de forma significativa en ratones normales, ya sea que esta se administre durante el período de crecimiento rápido dependiente de GH (tratamiento de dos semanas) o incluyendo las semanas anterior y posterior a este período (tratamiento de cuatro semanas).

### 1.1.3. Ratones tratados de forma intermitente durante cinco semanas (6 µg GH/g peso corporal/día) a partir de la tercera semana de vida

En función de los resultados anteriores se decidió estudiar el efecto de una dosis de GH mayor. Según se ha reportado, dosis de entre 4 y 6 µg GH/g peso corporal/día administradas durante el período de crecimiento resultan suficientes para aumentar significativamente el peso corporal de ratones enanos, aunque no logran que estos alcancen el peso de ratones normales (Kasukawa y col., 2003, Masternak y col., 2010, Panici y col., 2010). En consecuencia, se eligió una dosis de 6 µg GH/g peso corporal/día y el tratamiento se inició a las tres semanas de vida. A esta edad los ratones están preparados para el destete y pueden ser separados de su madre, lo cual

facilitó el desarrollo de estos experimentos, particularmente los correspondientes a ratones sometidos al tratamiento continuo (resultados que serán presentados en la Sección 1.2.2). Además, considerando lo expuesto en las secciones anteriores y los reportes de trabajos llevados a cabo en ratones deficientes en GH (Kasukawa y col., 2003), no se esperan diferencias significativas en el efecto final del tratamiento si este se inicia antes del período de crecimiento dependiente de GH. Finalmente, se decidió prolongar el tratamiento hasta las ocho semanas de vida de manera tal de abarcar también el período de crecimiento pospuberal lento.

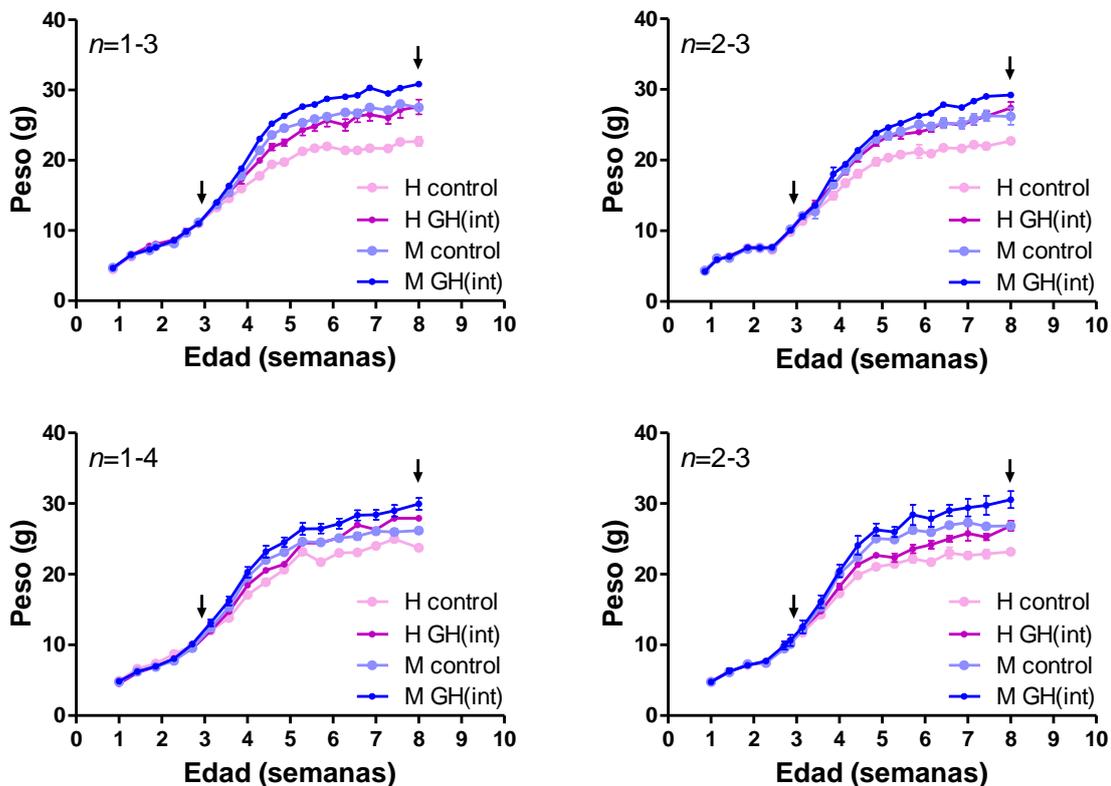
Las curvas de crecimiento corporal obtenidas muestran que, transcurrida una semana del inicio del tratamiento, el peso corporal de los animales que recibieron GH, tanto hembras como machos, es mayor que el de sus respectivos controles (**Fig. 18a**). Las diferencias significativas se mantienen hasta el final del tratamiento. Cuando se representa la diferencia de peso entre los ratones tratados y sus correspondientes controles, tomando como 100 % el peso promedio de estos últimos para cada punto de la curva, se observa que, además, esta diferencia aumenta a medida que transcurre el tratamiento (**Fig. 18b**).



**Figura 18 – Crecimiento corporal (tratamiento de cinco semanas de duración) – (a)** Peso corporal en función de la edad de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH de forma intermitente (GH(int)). Las áreas sombreadas, verde y anaranjada, corresponden a los períodos de crecimiento independiente y dependiente de GH, respectivamente. Las flechas indican el inicio y fin del tratamiento. **(b)** Diferencia (%) entre el peso de los ratones tratados con GH de forma intermitente (GH(int)), hembras (H) y machos (M), y el peso promedio de sus respectivos controles en función de la edad durante el período de tratamiento. Los ratones fueron tratados por cinco semanas con una dosis de GH de  $6 \mu\text{g/g}$  de peso corporal/día. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 32 y 40 individuos por condición. Los datos fueron analizados por el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni. Diferencias significativas entre ratones tratados con GH y control se indican mediante numerales para las hembras y cruces para los machos ( $\#/+p < 0,01$ ). Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones hembra y macho control ( $*p < 0,01$ ).

Para construir estas curvas de crecimiento se reunieron los pesos registrados de dos cohortes de animales, una correspondiente a ratones sacrificados al finalizar el tratamiento y otra a aquellos sacrificados después de un mes de suspendida la administración de GH (resultados que serán

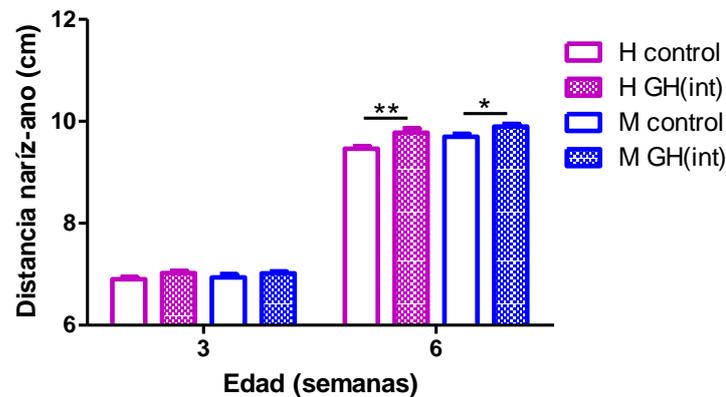
presentados en la Sección 4). Es por esto que el número de datos que se usó para generar las curvas de la **Figura 18** es significativamente mayor ( $n = 32-40$ ) que el utilizado en las demás curvas de crecimiento presentadas a lo largo de este trabajo (**Fig. 13, 16 y 24**,  $n < 12$ ). En ellas, o bien no se percibe un efecto del tratamiento sobre el peso corporal o bien se observa una tendencia que no resulta estadísticamente significativa. Para poder asegurar que el tratamiento intermitente en una dosis de  $6 \mu\text{g GH/g}$  de peso corporal/día es ciertamente más eficiente que los demás tratamientos evaluados y que esto no se debe únicamente a que se analizó un mayor número de individuos en paralelo, se muestran por separado las curvas de peso correspondientes a ratones hermanos de camada que recibieron este tratamiento (**Fig. 19**). Estos grupos incluyen hasta cuatro individuos por condición experimental ( $n \leq 4$ ). A pesar del menor número de animales procesados en paralelo, en estas curvas se observan con claridad las diferencias de peso asociadas al tratamiento y estas son notablemente mayores que las registradas para las demás condiciones de tratamiento evaluadas.



**Figura 19** – Análisis del crecimiento corporal en distintas camadas de ratones tratados con GH (tratamiento de cinco semanas de duración) – Peso corporal en función de la edad de ratones hermanos de camada hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH ( $6 \mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas. Las flechas indican el inicio y fin del tratamiento. Se representa la media  $\pm$

ESM del número  $n$  de individuos por condición. Cada gráfico corresponde a una camada distinta de animales.

El efecto de la administración de GH sobre el crecimiento se evaluó también mediante la determinación de la longitud corporal. En la **Figura 20** se muestran los valores obtenidos al inicio del tratamiento y luego de tres semanas, a las seis semanas de vida. A esa edad se observan diferencias significativas entre los ratones hembra y macho tratados y sus respectivos controles. Estos resultados pueden compararse con los presentados en la **Figura 17**, donde también se muestran determinaciones realizadas a las seis semanas de vida pero en ratones tratados por cuatro semanas con la dosis de GH de  $2 \mu\text{g/g}$  de peso corporal/día. En ese caso, no se detectaron diferencias significativas en la longitud corporal. Por el contrario, cuando se administra una dosis mayor de GH ( $6 \mu\text{g GH/g}$  de peso corporal/día), el efecto sobre el crecimiento se manifiesta en la longitud corporal además de en el peso, a pesar de que el tiempo transcurrido de tratamiento haya sido menor.



**Figura 20 – Longitud corporal (tratamiento de cinco semanas de duración) -** Distancia nariz-ano de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH ( $6 \mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) a partir de la tercera semana de vida. Se muestran los resultados correspondientes al inicio del tratamiento y luego de tres semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 10 y 17 individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones tratados y su control correspondiente según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ).

Por último, se evaluó la longitud de los huesos de las patas traseras (**Tabla 5**). En los animales que recibieron GH, la longitud de los huesos femorales es significativamente mayor que la de los controles al finalizar el tratamiento. El efecto del tratamiento no se manifiesta de forma significativa en

el largo de las tibias, aunque los valores presentan una tendencia en el mismo sentido.

**Tabla 5** - Longitud de los huesos de las patas traseras de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho semanas de vida, control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 10 y 13 individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones tratados y su control correspondiente según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ).

	Longitud de huesos (mm)			
	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)
<b>Fémur</b>	13,27 $\pm$ 0,09	13,78 $\pm$ 0,14*	13,36 $\pm$ 0,10	13,85 $\pm$ 0,15*
<b>Tibia</b>	17,64 $\pm$ 0,15	17,91 $\pm$ 0,13	17,62 $\pm$ 0,22	18,07 $\pm$ 0,16

A partir del análisis de los resultados obtenidos con las distintas condiciones evaluadas se llegó a la conclusión que la hormona de crecimiento administrada de forma intermitente en una dosis de 6  $\mu\text{g/g}$  peso corporal/día entre las tres y las ocho semanas de vida promueve de forma significativa el crecimiento corporal en ratones sin alteraciones en el eje somatotrópico. Por consiguiente, esta dosis diaria es la que se estableció como dosis farmacológica y se utilizó para generar los modelos de ratones tratados con GH de forma intermitente o continua.

## 1.2. Caracterización de los modelos de administración intermitente o continua de GH en concentraciones farmacológicas

Una vez establecidas las condiciones para generar el modelo de ratones tratados con dosis farmacológicas de GH, se evaluó el efecto del tratamiento sobre otros parámetros somatométricos y bioquímicos que se ven alterados en ratones con niveles suprafisiológicos de GH. Estas mediciones se realizaron una vez finalizado el tratamiento, a las ocho semanas de vida, tanto en animales tratados de forma intermitente como en animales tratados de forma continua.

### 1.2.1. Tratamiento intermitente

#### 1.2.1.1. Tamaño de órganos blanco de la acción de la GH

En los ratones tratados con GH de forma intermitente, se determinó el peso del hígado, el corazón y los riñones y su relación con el peso corporal al momento del sacrificio. A las ocho semanas de vida, el peso de los tres órganos evaluados es significativamente mayor en los ratones tratados, tanto hembras como machos (**Tabla 6a**). Para evaluar si este incremento acompaña de forma proporcional el aumento de peso inducido por el tratamiento o si, por el contrario, los niveles elevados de GH promueven el crecimiento exacerbado de alguno de estos órganos, se calculó para cada individuo la relación entre el peso del mismo y el peso corporal (**Tabla 6b**). En los machos, los valores correspondientes a los tres órganos evaluados tienden a ser mayores en los animales tratados que en los controles, pero estas diferencias no son significativas. En las hembras, se observa una tendencia similar asociada al tratamiento únicamente en la relación entre el peso del hígado y el peso corporal.

**Tabla 6** - Peso de órganos blanco de la GH (**a**) y su relación con el peso corporal (**b**) de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho semanas de vida, control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 21 y 27 individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones tratados y su control correspondiente según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $***p < 0,001$ ).

(a)

	Peso de órganos (g)			
	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)
Hígado	1,018 $\pm$ 0,025	1,257 $\pm$ 0,024***	1,162 $\pm$ 0,030	1,368 $\pm$ 0,035***
Corazón	0,107 $\pm$ 0,002	0,124 $\pm$ 0,002***	0,116 $\pm$ 0,002	0,135 $\pm$ 0,004***
Riñón	0,249 $\pm$ 0,004	0,289 $\pm$ 0,005***	0,327 $\pm$ 0,007	0,384 $\pm$ 0,011***

(b)

	Peso de órganos / Peso corporal (%)			
	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)
Hígado	4,589 $\pm$ 0,094	4,841 $\pm$ 0,071	4,536 $\pm$ 0,102	4,698 $\pm$ 0,068
Corazón	0,484 $\pm$ 0,007	0,477 $\pm$ 0,009	0,452 $\pm$ 0,009	0,465 $\pm$ 0,011
Riñón	1,125 $\pm$ 0,018	1,117 $\pm$ 0,020	1,275 $\pm$ 0,023	1,309 $\pm$ 0,032

## 1.2.1.2. Efectos metabólicos

Además de sus acciones sobre el crecimiento, la GH tiene efectos a nivel metabólico. En el hígado promueve la producción de glucosa y modula tanto la captación como la secreción de triglicéridos, mientras que en el tejido adiposo induce lipólisis (Mauras y col., 2005, Vijayakumar y col., 2011). En ratones que sobreexpresan GH, la exposición a niveles elevados de hormona se asocia, en la adultez, con alteraciones en el metabolismo lipídico, con mayores niveles de colesterol y niveles normales o disminuidos de triglicéridos en circulación, además de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en presencia de niveles normales de glucosa plasmática (Quaife y col., 1989, McGrane y col., 1990, Dominici y col., 1998, Dominici y col., 1999a, Dominici y col., 1999b, Frick y col., 2001, Olsson y col., 2005, Berryman y col., 2006, Wang y col., 2007, Ding y col., 2011, Miquet y col., 2011). En consecuencia, se midieron los niveles de colesterol, triglicéridos, glucosa e insulina en suero una vez finalizado el tratamiento con GH (Tabla 7).

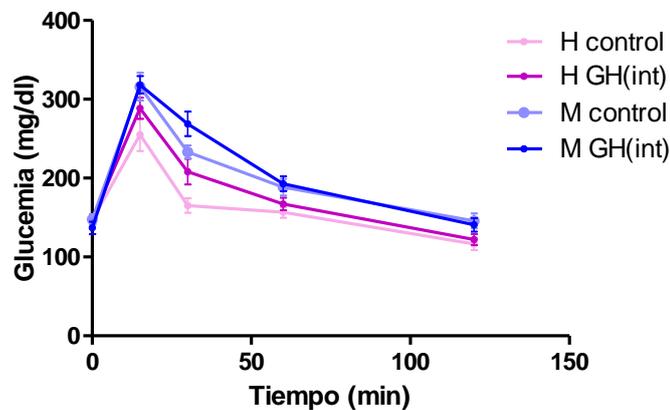
**Tabla 7** – Determinaciones bioquímicas en suero de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho semanas de vida, control y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones tratados y su control correspondiente según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)	<i>n</i>
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	98 ± 3	125 ± 5***	103 ± 5	132 ± 5***	9-13
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	151 ± 18	138 ± 13	150 ± 21	135 ± 13	10-12
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	120 ± 7	122 ± 3	132 ± 5	131 ± 6	11-14
<b>Insulina (ng/ml)</b>	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,3	10-13

En lo que respecta al perfil lipídico, se observa que la administración de GH aumenta los niveles de colesterol en suero en comparación con los controles, tanto en hembras como en machos. En cambio, se detecta una tendencia hacia menores niveles de triglicéridos en los ratones que recibieron GH, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. En cuanto a la glucemia, no se perciben cambios asociados al tratamiento, aunque los animales tratados presentan una tendencia no significativa a mayores valores de insulina en suero en comparación con los controles, efecto que se observa principalmente en los machos.

Considerando que el exceso de GH en los ratones transgénicos se asocia a hiperinsulinemia e insulinoresistencia con valores normales de glucemia (Dominici y col., 1999a, Dominici y col., 1999b, Wang y col., 2007), se evaluó la capacidad de respuesta a una sobrecarga de glucosa de los ratones tratados con GH. Para ello se realizó, en otra cohorte de animales, una curva de tolerancia a la glucosa un día después de la última inyección de hormona (**Fig. 21a**). A los 30 minutos, la glucemia de los animales tratados con GH tiende a ser mayor que la de sus respectivos controles, aunque las diferencias no son significativas, así como tampoco se observan diferencias significativas en el área bajo la curva calculada para cada condición experimental (**Fig. 21b**). Tanto los ratones tratados como los controles recuperan los valores normales de glucemia transcurridas 2 horas de la sobrecarga.

(a)



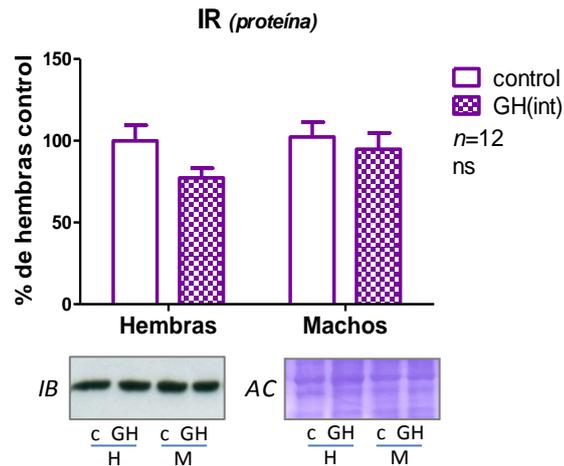
(b)

	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)
Área bajo la curva (mg.min/dl)	19452 ± 731	20377 ± 1100	21628 ± 1533	23554 ± 1015

**Figura 21 – Curva de tolerancia a la glucosa – (a)** Glucemia en función del tiempo transcurrido luego de una inyección intraperitoneal de glucosa de 2 mg/g de peso corporal a ratones hembra (H) y macho (M) de ocho semanas de vida, control y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas. **(b)** Área bajo la curva correspondiente a cada curva del gráfico anterior. Se representa la media ± ESM de entre 10 y 17 individuos por condición. No se observan diferencias significativas entre los ratones tratados y sus respectivos controles según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

Acompañando las alteraciones ya mencionadas, los ratones GH-transgénicos presentan menores niveles del receptor de insulina (IR) en hígado en comparación con sus hermanos de camada normales (Balbis y col., 1996, Dominici y col., 1998, Dominici y col., 1999a). Sin embargo, este efecto no sería

consecuencia directa del exceso de GH sino de la hiperinsulinemia resultante. Por ende, se evaluó también la expresión de IR en hígado a las ocho semanas de vida, cuando finaliza el tratamiento con GH (**Fig. 22**). Al analizar los resultados obtenidos, no se detectan diferencias significativas entre los ratones tratados con GH y sus respectivos controles, aunque en las hembras tratadas los niveles de IR tienden a ser menores que en aquellas que recibieron solución fisiológica.



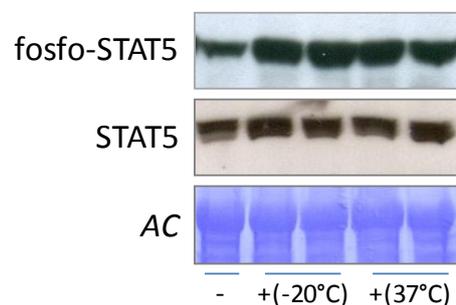
**Figura 22 – Contenido proteico de IR (tratamiento intermitente)** – Se determinaron los niveles de IR en solubilizados hepáticos de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas por *immunoblotting* (IB) mediante un anticuerpo específico. Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por condición. No se observan diferencias significativas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (ns).

### 1.2.2. Tratamiento continuo

Con el objetivo de explorar las posibles diferencias en los efectos del tratamiento con GH según este sea de tipo intermitente o continuo, un grupo de animales fue tratado con la misma dosis de hormona pero administrada de forma sostenida. Para ello se utilizaron bombas osmóticas que liberan su contenido de forma constante a lo largo de un período de tiempo determinado por el fabricante. Para mantener el tratamiento durante cinco semanas fue necesario reemplazar las bombas luego de 17 días. A diferencia del tratamiento intermitente, en el cual la cantidad de GH administrada se reguló cada día de acuerdo con el peso corporal para lograr una dosis de 6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día, la cantidad diaria de hormona que recibieron los animales desde las bombas osmóticas fue necesariamente la misma cada día. La cantidad total

de GH que contenían las bombas al momento de ser implantadas se calculó sumando las cantidades diarias que debería recibir un ratón de un peso equivalente al peso promedio, para cada día, de todos los ratones sometidos con anterioridad al tratamiento intermitente. En consecuencia, ambos tratamientos son comparables considerando que el total de hormona que recibieron los animales durante las cinco semanas que dura el tratamiento fue aproximadamente la misma.

Para poder comparar ambas formas de administración, además, fue necesario evaluar la estabilidad de la GH expuesta a temperatura corporal durante el tiempo que duró el tratamiento, ya que la hormona que se administró de forma intermitente se mantuvo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en fracciones que se descongelaron antes de cada inyección. Para ello se tomó una alícuota de GH y se la incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 17 días. Este tiempo equivale a aproximadamente la mitad de la duración del tratamiento, momento en el cual fue necesario reemplazar las bombas para asegurar una liberación sostenida durante cinco semanas. Transcurrido este período, se utilizó esta solución de GH, y otra mantenida  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  como control, para realizar un estímulo agudo a ratones adultos y evaluar así su actividad en términos de su capacidad de inducir la fosforilación de STAT5 en hígado. En la **Figura 23** se muestra el resultado del *immunoblot* correspondiente, donde se observa que la preparación de GH que permaneció a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  fue capaz de estimular la fosforilación de STAT5 en un grado similar al que se alcanzó con la que se mantuvo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estos resultados demuestran que el tiempo que la hormona permaneció a temperatura corporal no afectó su estabilidad.

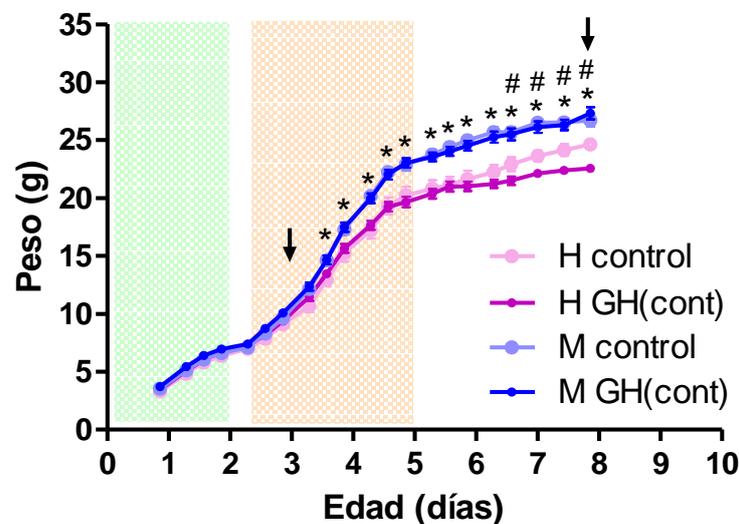


**Figura 23 – Estabilidad de la GH a  $37^{\circ}\text{C}$**  – Se evaluó la capacidad de inducir la fosforilación de STAT5 de soluciones de GH mantenidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 17 días. Con estas soluciones se estimularon por vía intraperitoneal ratones hembra adultos en una dosis de  $1\text{ }\mu\text{g}$  GH/g de peso corporal (+). En paralelo, un animal fue inyectado con solución fisiológica como control del estímulo (-). A los 7,5 minutos se extrajeron los hígados y se realizaron experimentos de *immunoblotting* con anticuerpos anti-fosfo-STAT5a/b (Tyr<sup>694/699</sup>) o anti-STAT5a/b. Posteriormente, las membranas se

tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras.

### 1.2.2.1. Crecimiento corporal

A partir de los registros de peso corporal de los ratones tratados de forma continua y sus respectivos controles se construyó la curva de crecimiento correspondiente (Fig. 24). A diferencia de los resultados obtenidos con el tratamiento intermitente, no se observa un mayor peso corporal en los ratones tratados con GH en comparación a los animales control. De hecho, es notable que las hembras tratadas exhiban un menor peso promedio que sus respectivos controles a partir del día 46 de vida. Cuando se evalúa el largo de los huesos de las patas traseras al finalizar el tratamiento no se detectan diferencias significativas asociadas al tratamiento (Tabla 8). En las hembras que recibieron GH se observa una tendencia a una menor longitud de los huesos tibiales en comparación con los controles, acompañando el menor peso corporal registrado al final del tratamiento.



**Figura 24 - Crecimiento corporal (tratamiento continuo)** - Peso corporal en función de la edad de ratones hembra (H) y macho (M) control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas. Las áreas sombreadas, verde y anaranjada, corresponden a los períodos de crecimiento independiente y dependiente de GH, respectivamente. Las flechas indican el inicio y fin del tratamiento. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 9 y 12 individuos por condición. Los datos fueron analizados por el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni. Diferencias significativas entre ratones hembra tratados con GH y control se indican mediante numerales ( $\#p < 0,01$ ). Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones hembra y macho control ( $*p < 0,01$ ).

**Tabla 8** - Longitud de los huesos de las patas traseras de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho semanas de vida, control y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas. Se representa la media ± ESM de entre 9 y 12 individuos por condición. No se observan diferencias significativas entre los ratones tratados y sus respectivos controles según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

Longitud de huesos (mm)				
	H control	H GH(cont)	M control	M GH(cont)
<b>Fémur</b>	13,51 ± 0,14	13,14 ± 0,12	13,38 ± 0,12	13,50 ± 0,17
<b>Tibia</b>	17,66 ± 0,17	17,14 ± 0,16	17,64 ± 0,20	17,51 ± 0,17

#### 1.2.2.2. Tamaño de órganos blanco de la acción de la GH

A las ocho semanas de vida, al finalizar el tratamiento, se determinó el peso del hígado, el corazón y los riñones y su relación con el peso corporal (**Tabla 9a-b**). Cuando se comparan los resultados correspondientes a las hembras tratadas con los de sus respectivos controles, no se observan diferencias significativas en el peso de los órganos evaluados a pesar del menor peso corporal registrado al finalizar el tratamiento. En los machos tratados con GH, en cambio, se detectó un mayor peso del corazón en comparación con los controles y una tendencia similar en el peso del hígado, aun cuando no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal. Por consiguiente, se observa una mayor relación entre el peso de estos órganos y el peso corporal en los machos tratados, solo significativo en el caso del corazón.

**Tabla 9** - Peso de órganos blanco de la hormona de crecimiento **(a)** y su relación con el peso corporal **(b)** de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho semanas de vida, control y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas. Se representa la media ± ESM de entre 9 y 12 individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones tratados y su control correspondiente según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

**(a)**

	Peso de órganos (g)			
	H control	H GH(cont)	M control	M GH(cont)
Hígado	1,090 ± 0,039	1,096 ± 0,023	1,178 ± 0,024	1,244 ± 0,022
Corazón	0,116 ± 0,003	0,112 ± 0,002	0,128 ± 0,004	0,148 ± 0,005**
Riñón	0,283 ± 0,009	0,280 ± 0,007	0,381 ± 0,009	0,384 ± 0,009

**(b)**

	Peso de órganos / Peso corporal (%)			
	H control	H GH(cont)	M control	M GH(cont)
Hígado	4,683 ± 0,112	5,010 ± 0,173	4,604 ± 0,178	4,783 ± 0,148
Corazón	0,500 ± 0,011	0,510 ± 0,011	0,498 ± 0,021	0,569 ± 0,026*
Riñón	1,217 ± 0,027	1,277 ± 0,029	1,487 ± 0,056	1,471 ± 0,036

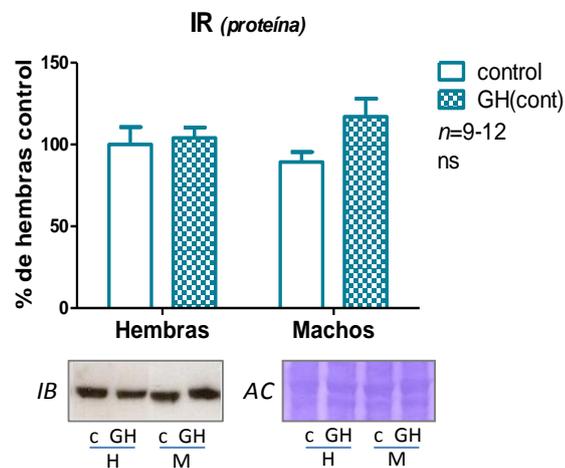
### 1.2.2.3. Efectos metabólicos

Considerando los efectos metabólicos de la GH y los resultados obtenidos en los ratones sometidos al tratamiento intermitente, se determinaron los valores de colesterol, triglicéridos y glucosa en el suero de los ratones tratados con GH de forma continua y sus respectivos controles al final del tratamiento (**Tabla 10**). A diferencia de lo que se observó en los ratones que recibieron la administración intermitente de hormona, no se observan efectos significativos asociados al tratamiento continuo sobre los niveles de colesterol, pero sí una disminución en los niveles de triglicéridos de las hembras en comparación con los ratones no tratados.

**Tabla 10** – Determinaciones bioquímicas en suero de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho semanas de vida, control y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones tratados y su control correspondiente según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*\**p* < 0,01).

	H control	H GH(cont)	M control	M GH(cont)	<i>n</i>
Colesterol (mg/dl)	94 ± 3	102 ± 6	120 ± 5	114 ± 6	7 - 12
Triglicéridos (mg/dl)	101 ± 7	68 ± 6**	80 ± 9	89 ± 7	9 - 12
Glucosa (mg/dl)	102 ± 8	103 ± 6	115 ± 7	117 ± 8	7 - 10

En lo que respecta al metabolismo de la glucosa, en estos animales se realizó únicamente la determinación de glucemia (**Tabla 10**) y del contenido proteico de IR (**Fig. 25**) y no se detectaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales a las ocho semanas de vida. A diferencia de lo observado en los ratones tratados de forma intermitente, en los que se evidenció una leve disminución del contenido de IR en las hembras tratadas en comparación con los controles, la GH administrada de forma continua se asocia a un aumento no significativo en los machos.

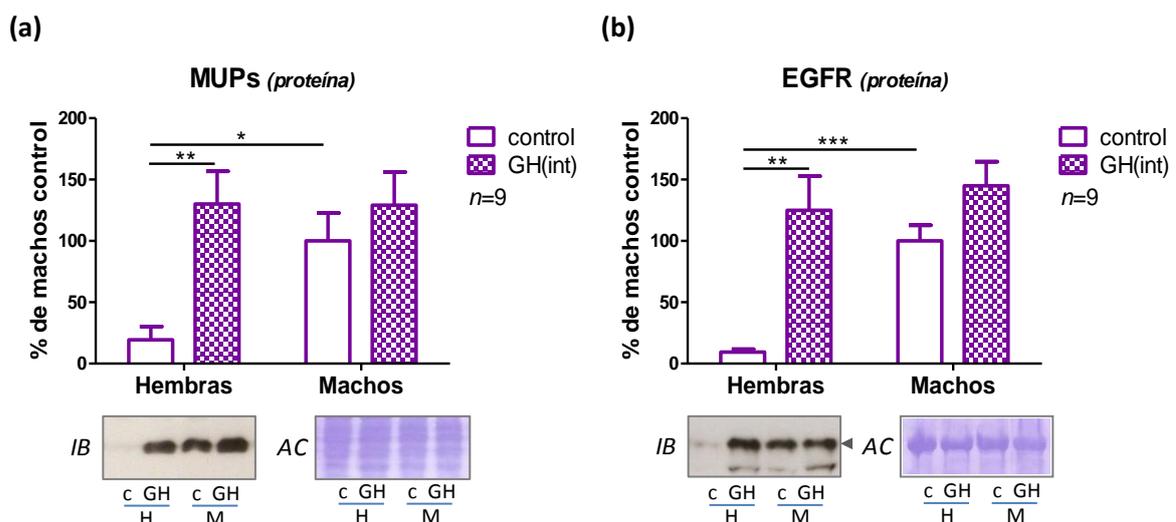


**Figura 25** – Contenido proteico de IR (tratamiento continuo) – Se determinaron los niveles de IR en solubilizados hepáticos de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas por *immunoblotting* (IB) mediante un anticuerpo específico. Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por condición. No se observan diferencias significativas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (ns).

### 1.2.3. Efectividad del tratamiento a nivel molecular: expresión de proteínas moduladas por el perfil sanguíneo de GH

En los animales tratados con GH de forma intermitente o continua se determinaron los niveles hepáticos de las proteínas MUPs, CIS y EGFR. Dado que se espera que su expresión se modifique con el tratamiento según el sexo del animal, el perfil asociado de concentraciones de GH y el tipo de administración que reciba (Norstedt y col., 1984, Ekberg y col., 1989, Kashimata y col., 1989, Johnson y col., 1995, Karlsson y col., 1999, Díaz y col., 2014), su determinación permite evaluar la efectividad de ambos tratamientos a nivel molecular.

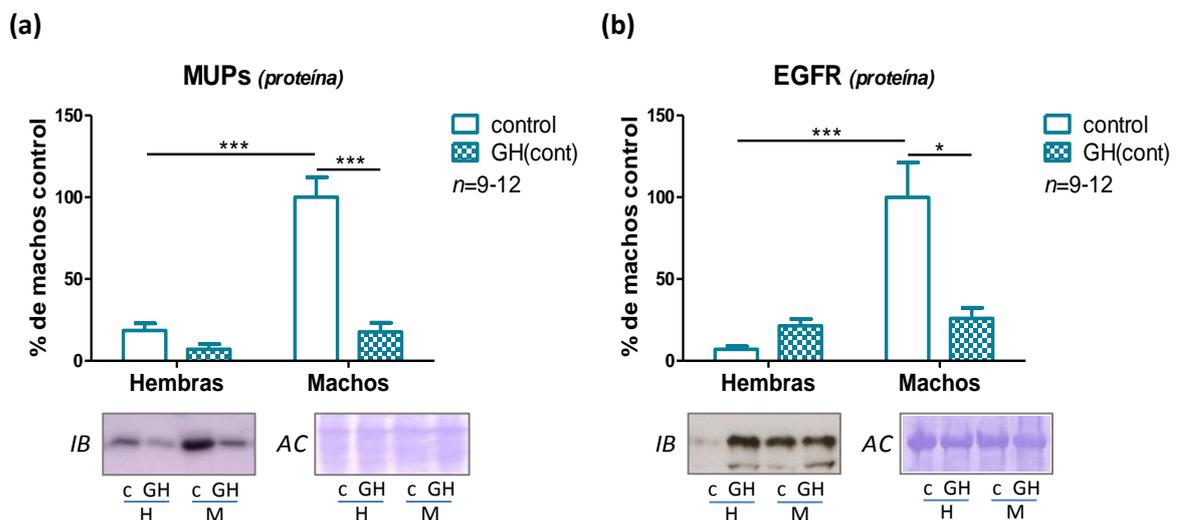
Como se mencionó previamente, la expresión de las MUPs es promovida por un perfil de GH intermitente, característico de los machos, y lo mismo ocurre con el EGFR. Si se comparan los niveles de estas proteínas entre los ratones hembra y macho control se observa que, efectivamente, son mayores en los machos (Fig. 26). Cuando a las hembras se les administra un tratamiento con GH de forma intermitente, se modifica su perfil de hormona en circulación de tipo continuo y, en consecuencia, aumenta la expresión de MUPs y EGFR hasta niveles similares a los de los machos. En los ratones macho, en cambio, este tratamiento no modifica de forma significativa el contenido de estas proteínas, aunque se observa una leve tendencia a niveles más altos que en los controles.



**Figura 26 – Contenido proteico de MUPs y EGFR (tratamiento intermitente)** – Se determinaron los niveles de MUPs (a) y EGFR (b) en solubilizados hepáticos de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas por *immunoblotting* (IB) mediante un anticuerpo específico. Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras.

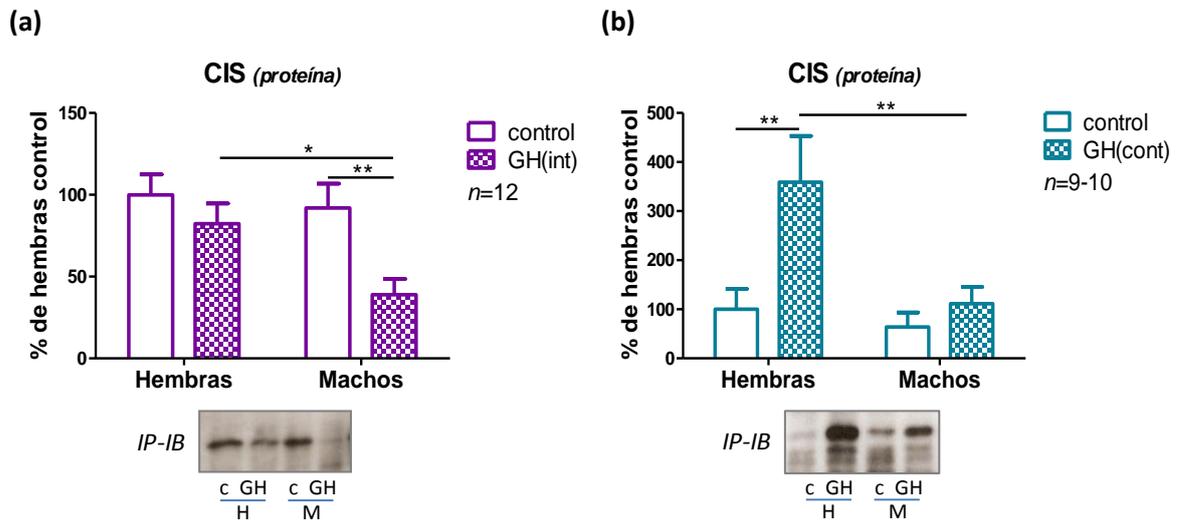
Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

De la misma forma, cuando se somete a los machos a una administración sostenida de GH, el cambio sustancial en el perfil de concentración de hormona en circulación induce una disminución en la expresión de MUPs y EGFR de alrededor del 75 % (Fig. 27). En las hembras, la administración sostenida de GH induce distintos efectos en la expresión de MUPs y EGFR: mientras que los niveles de MUPs tienden a ser menores en las hembras tratadas que en los controles, el contenido de EGFR tiende a aumentar. Estas diferencias no son significativas cuando los resultados se analizan por el test de ANOVA junto a los resultados correspondientes a los ratones macho. Sin embargo, si se analizan los resultados de hembras y machos por separado mediante el test  $t$  de Student, el efecto del tratamiento continuo en las hembras resulta significativo con una disminución de la expresión de MUPs ( $p < 0,05$ ) y un aumento de la expresión de EGFR ( $p < 0,01$ ) en comparación con los controles.



**Figura 27 – Contenido proteico de MUPs y EGFR (tratamiento continuo)** – Se determinaron los niveles de MUPs (a) y EGFR (b) en solubilizados hepáticos de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas por *immunoblotting* (IB) mediante un anticuerpo específico. Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

La expresión de CIS, por el contrario, se ve favorecida por un perfil de GH de tipo continuo y, en consecuencia, es mayor en ratas hembra que en ratas macho (Karlsson y col., 1999). En los ratones, este efecto no es tan marcado ante concentraciones fisiológicas de GH, como se observa si se compara la expresión de esta proteína entre hembras y machos control (Fig. 28). Sin embargo, cuando se administra GH de forma sostenida se observa un aumento en la expresión de CIS en las hembras, aunque no se detectan cambios significativos en los machos (Fig. 28b). Por el contrario, la administración de GH de forma intermitente solo afecta a los machos, que presentan una disminución en la expresión de CIS en comparación con los controles (Fig. 28a). Dado que esta proteína participa en la regulación negativa de la señalización de la hormona, el significado de estos cambios se discutirá más adelante junto a otros moduladores.



**Figura 28 - Contenido proteico de CIS** - Se determinaron los niveles de CIS en solubilizados hepáticos de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas por *immunoblotting* (IB) mediante un anticuerpo específico. Las muestras de solubilizados hepáticos fueron enriquecidas previamente mediante una inmunoprecipitación (IP) con el mismo anticuerpo anti-CIS. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01).

En resumen, tanto el tratamiento intermitente como el continuo generan cambios en la expresión de proteínas moduladas por el perfil de concentración plasmática de GH. Esto confirma el efecto del tratamiento sobre los niveles de hormona circulante y, como consecuencia, su acción a nivel molecular en hígado.

En los ratones GH-transgénicos, los niveles de hormona también se mantienen elevados de forma sostenida, por lo que es interesante comparar los resultados obtenidos en los animales tratados de forma continua con lo que ya se ha descrito en los ratones transgénicos adultos. En estos animales, la sobreexpresión de GH también genera una disminución de la expresión de las MUPs en comparación con sus hermanos de camada normales: tanto en hembras como en machos transgénicos los niveles de esta proteína son indetectables (Norstedt y col., 1984, Martínez, 2013). Por el contrario, mientras que los niveles de EGFR aumentan en las hembras transgénicas en comparación con los ratones normales, de forma similar a lo que ocurre en las hembras tratadas con GH, no se detectan cambios por genotipo en los machos (González y col., 2010, Miquet y col., 2013). En cuanto a CIS, su expresión aumenta tanto en hembras como en machos GH-transgénicos. En consecuencia, los efectos de la administración continua de GH sobre la expresión de estas proteínas son similares a los detectados por la sobreexpresión de la hormona únicamente en las hembras.

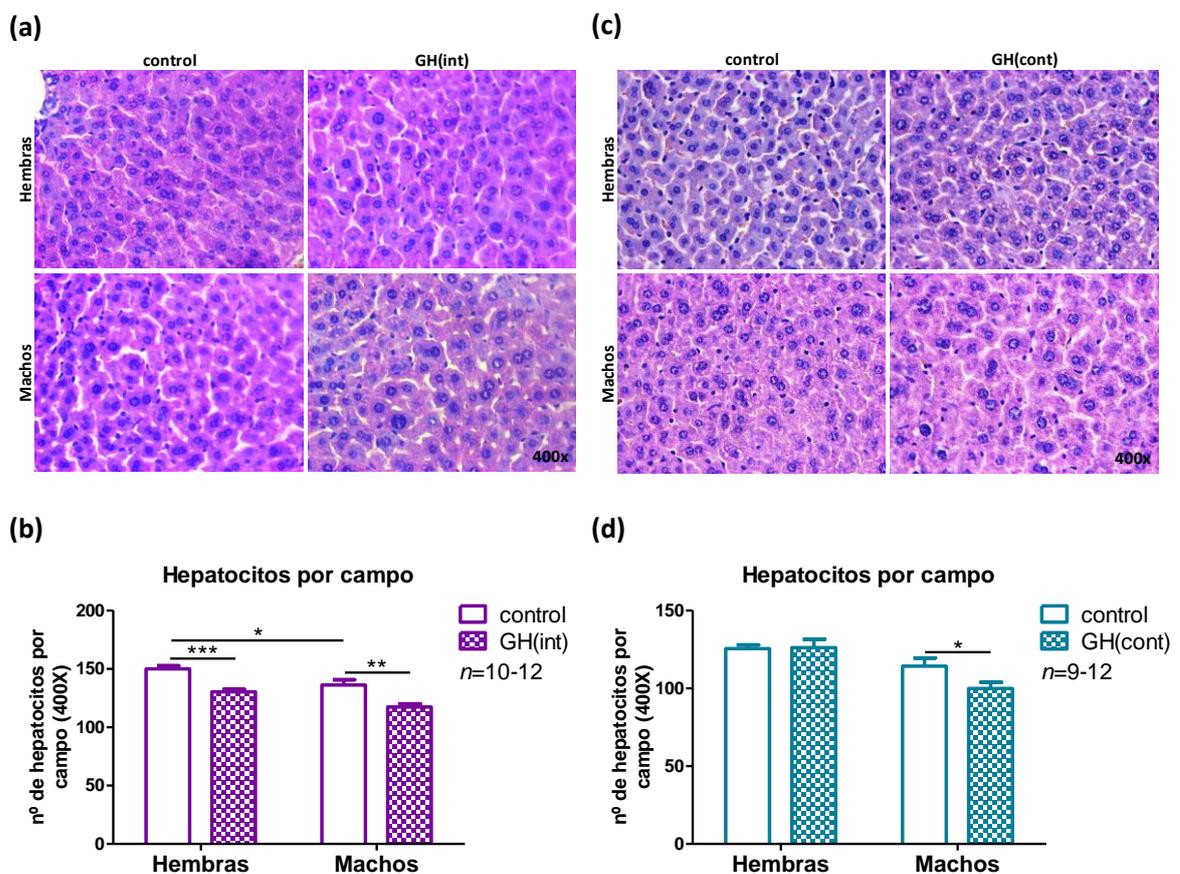
## **2. Evaluación de los efectos del tratamiento con GH sobre el parénquima hepático**

La exposición a niveles elevados de GH durante toda la vida provoca, en los ratones transgénicos, hipertrofia e hiperplasia de los hepatocitos, que resultan en una marcada hepatomegalia (Orian y col., 1989, Quaife y col., 1989, Orian y col., 1990, Snibson y col., 1999, Snibson, 2002, Bartke, 2003, Miquet y col., 2013).

Como se mostró previamente, la administración intermitente de GH se asocia a un aumento significativo del peso del hígado y una tendencia similar se observa en los ratones tratados de forma continua, principalmente en los machos. En ambos modelos, además, la relación entre el peso del hígado y el peso corporal de los animales tratados es ligeramente mayor que la relación correspondiente a sus controles, aunque no se alcanza significación estadística. Para evaluar si estos cambios se acompañan de características histológicas similares a las observadas en los ratones GH-transgénicos, se obtuvieron cortes de hígado de ratones de ocho semanas sometidos al tratamiento intermitente o continuo con GH y se determinaron el tamaño de los hepatocitos, el área de sus núcleos y el grado de proliferación celular.

## 2.1. Tamaño celular

Para evaluar el efecto del tratamiento con GH sobre el tamaño de los hepatocitos, se contó el número de células por campo en cortes de tejido teñidos con hematoxilina-eosina. Esta determinación permite estimar el tamaño de las células, donde un menor número de hepatocitos por campo indicaría hipertrofia celular. En la **Figura 29** se presentan los resultados correspondientes a los animales tratados de forma intermitente y continua. Cuando la GH es administrada de forma intermitente, tanto hembras como machos presentan un menor número de células hepáticas por campo en comparación con los animales control (**Fig. 29a-b**). Lo mismo se observa ante la administración continua de hormona, pero únicamente en los machos (**Fig. 29c-d**). Cuando se comparan los resultados obtenidos en los animales control, se evidencia un mayor número de hepatocitos por campo en las hembras que en los machos, aunque las diferencias por sexo alcanzan significancia estadística solo en el caso de los controles del tratamiento intermitente. Resultados similares en cuanto a las diferencias que se observan entre hembras y machos control se han reportado previamente en otra cepa de ratones (Miquet y col., 2013).

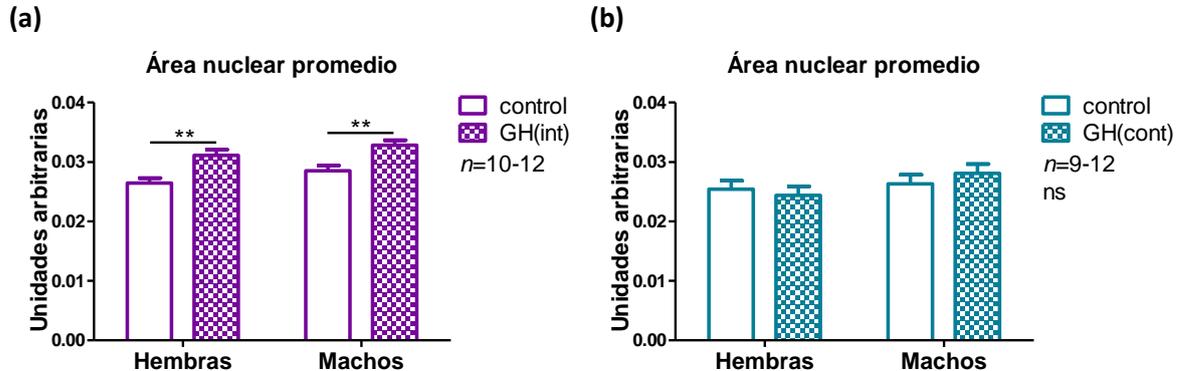


**Figura 29** - Estimación del tamaño de las células hepáticas - Se determinó el número de hepatocitos por campo en cortes de hígado de ratones hembra y macho de ocho

semanas de vida, control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a-b) o continua (GH(cont)) (c-d) durante cinco semanas teñidos con hematoxilina-eosina. Se muestran microfotografías representativas de cada condición (a,c). En los gráficos se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental (b,d). Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ).

## 2.2. Tamaño nuclear

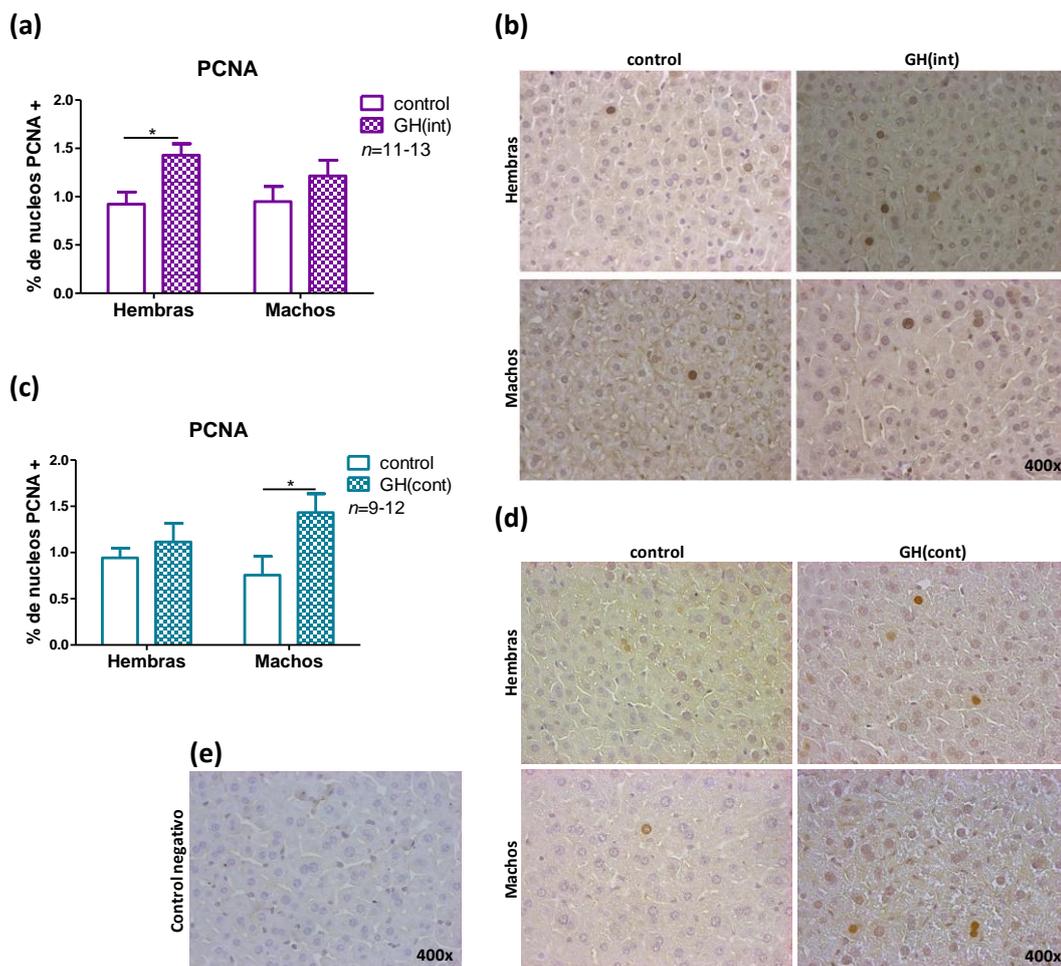
El tamaño de los núcleos de los hepatocitos se determinó en los cortes de tejido teñidos con hematoxilina-eosina (Fig. 30). El perfil obtenido acompaña al de la estimación del tamaño celular en los ratones tratados de forma intermitente, ya que dicho tratamiento se asocia a núcleos de mayor tamaño tanto en hembras como en machos en comparación con los controles (Fig. 30a). El tratamiento continuo, en cambio, no genera variaciones significativas en el área nuclear de las células hepáticas (Fig. 30b), aunque se observa una ligera tendencia a mayores valores en los machos sometidos al tratamiento, siguiendo el mayor tamaño celular que estos exhiben en comparación con los controles.



**Figura 30 – Área nuclear promedio de las células hepáticas** – Se determinó el área promedio de los núcleos de hepatocitos de cada campo en cortes de hígado de ratones hembra y macho de ocho semanas de vida, control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas teñidos con hematoxilina-eosina. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $**p < 0,01$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

### 2.3. Porcentaje de células en proliferación

El grado de proliferación celular se estudió mediante la determinación del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) por inmunohistoquímica en secciones de tejido hepático. En la **Figura 31** se presenta el porcentaje de células positivas para PCNA referido al número total de células. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con GH induce una mayor proliferación celular en comparación con la proliferación basal, aunque esta diferencia es significativa solo en las hembras tratadas de forma intermitente (**Fig. 31a**) y en los machos tratados de forma continua (**Fig. 31c**).



**Figura 31 – Expresión de PCNA** – Se determinó el porcentaje de células positivas para PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) por inmunohistoquímica en hígado de ratones hembra y macho de ocho semanas de vida, control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) **(a-b)** o continua (GH(cont)) **(c-d)** durante cinco semanas. En paralelo, se realizó un control del ensayo mediante cortes de tejido adicionales que se incubaron con PBS en lugar del anticuerpo anti-PCNA. Se muestran microfotografías representativas de cortes provenientes de animales de cada condición experimental incubados con el anticuerpo anti-PCNA **(b,d)** y del control negativo **(e)**. En los gráficos se representa la media  $\pm$  ESM del número *n* de individuos por grupo experimental **(a,c)**. Asteriscos indican diferencias

significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ).

En función del análisis realizado a nivel histológico, puede concluirse que el tratamiento con GH induce alteraciones en el hígado similares a las que han sido descritas en procesos preneoplásicos. El efecto observado no es el mismo según el tipo de administración realizada y el sexo del individuo tratado. Las alteraciones más profundas se detectan en las hembras sometidas a un tratamiento intermitente con GH, que presentan hipertrofia de los hepatocitos, núcleos de mayor tamaño y un incremento en el porcentaje de células en proliferación en comparación con los controles, además de exhibir el mayor aumento del peso del hígado asociado al tratamiento. En los machos tratados de forma intermitente se detectan cambios significativos similares en el tamaño celular y nuclear y un ligero aumento, no significativo, en el porcentaje de células positivas para PCNA. Mientras que el tratamiento intermitente afecta tanto a machos como a hembras, aunque en mayor medida a estas últimas, el tratamiento continuo solo genera alteraciones en el hígado de los ratones macho.

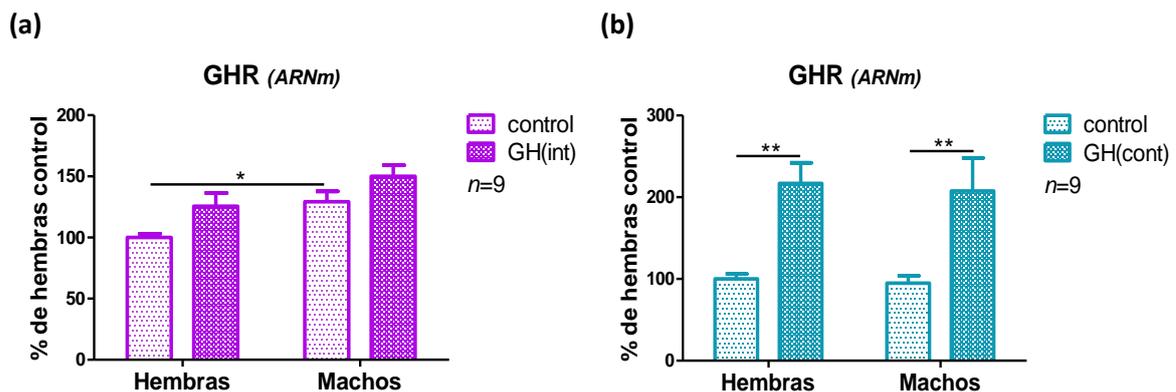
### **3. Evaluación de los efectos moleculares del tratamiento con GH en hígado**

Considerando las observaciones realizadas a nivel histológico, se decidió estudiar aquellas vías de señalización activadas por GH que podrían estar relacionadas con estos cambios y cuya hiperactivación se ha asociado al desarrollo de lesiones preneoplásicas en el hígado de los ratones transgénicos que sobreexpresan GH (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016). Las determinaciones se realizaron sobre muestras provenientes de los mismos animales analizados por microscopía, obtenidos al finalizar el tratamiento con GH.

#### **3.1. Receptor de GH (GHR)**

La señalización de la GH se inicia cuando la hormona se une a su receptor, GHR (Carter-Su y col., 2015). En trabajos realizados en modelos animales que sobreexpresan GH o tratados con la hormona, se observó no solo que esta induce la expresión hepática de su propio receptor sino que, además, los niveles de ARN mensajero (ARNm) de GHR correlacionan con sus niveles

proteicos, tanto en solubilizados totales como en la fracción microsomal (Maiter y col., 1988, lida y col., 2004, González y col., 2007, Jiang y col., 2007, Martínez y col., 2015). Por ende, se midieron los niveles de ARNm de GHR en los ratones tratados con GH (Fig. 32). En hembras y machos, la administración intermitente se asocia con una tendencia hacia mayores niveles del ARNm que codifica para el receptor, aunque estas diferencias no alcanzan significación estadística (Fig. 32a). En los ratones tratados de forma continua, en cambio, la expresión del ARNm de GHR aumenta de forma significativa en ambos sexos, duplicando aproximadamente los valores que presentan los animales no tratados (Fig. 32b). En los animales control del tratamiento intermitente se observa una mayor expresión del ARNm de GHR en los machos en comparación con las hembras. Sin embargo, estos resultados no pudieron corroborarse en los ratones control de los experimentos correspondientes a la administración continua.



**Figura 32 – Expresión de GHR** – Se determinaron los niveles de ARNm de GHR por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

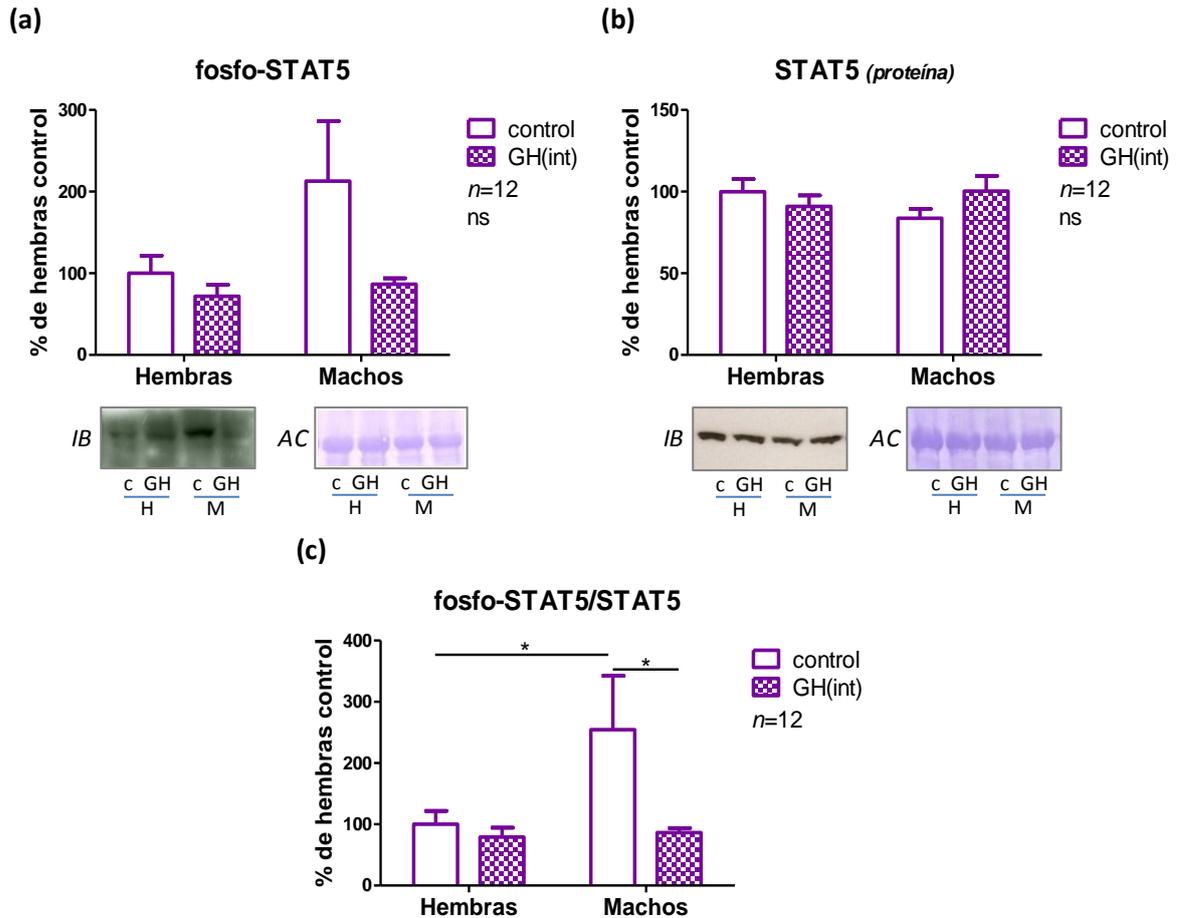
## 3.2. Vías de señalización activadas por GH

### 3.2.1. Activación de STAT5

A través de su receptor de membrana, la GH desencadena la activación de diversas vías de señalización. Entre ellas, la vía JAK2/STAT5b es la principal mediadora de su acción: una vez activo, STAT5b trasloca a núcleo e induce la transcripción de genes relacionados con la actividad de la hormona, como *lgr1* (Woelfle y col., 2004, Hennighausen y col., 2008, Rotwein, 2012). Por ende, el

contenido de STAT5 y su grado de activación se analizaron en los ratones tratados con GH (**Fig. 33 y 34**). Los anticuerpos utilizados reconocen las dos isoformas de STAT5, a y b, y sus variantes fosforiladas en residuos homólogos de activación (Tyr<sup>694</sup> en STAT5a y Tyr<sup>699</sup> en STAT5b). STAT5b es la forma predominante en hígado, por lo que los resultados presentados corresponderían principalmente a esta isoforma (Ripperger y col., 1995).

En condiciones fisiológicas, los niveles de STAT5 fosforilado tienden a ser mayores en los machos que en las hembras a pesar de que el contenido proteico es ligeramente menor (**Fig. 33a-b y 34a-b**). Por consiguiente, cuando se analiza la relación entre la fosforilación y el contenido total de STAT5, que indica qué proporción de esta proteína se encuentra fosforilada, las diferencias entre hembras y machos alcanzan significación estadística (**Fig. 33c y 34c**). En los machos, STAT5b se fosforila ante cada pulso de GH y luego se desfosforila al activarse los mecanismos de regulación negativa de la señal que permiten la resensibilización del sistema. De este modo, el individuo puede responder al siguiente estímulo hormonal (Waxman y col., 1995, Gebert y col., 1999b, Tannenbaum y col., 2001, Waxman y col., 2006). Según en qué momento de este proceso se encuentre el animal cuando es sacrificado, pueden obtenerse valores dispares de fosforilación de STAT5, como se observa en los machos control del tratamiento. En las hembras, la liberación de GH se da en pulsos más frecuentes y, en consecuencia, el grado de fosforilación basal de STAT5 se mantiene relativamente constante y por debajo de los niveles de fosforilación promedio de los machos (Choi y col., 1999, Gebert y col., 1999a, Waxman y col., 2006).



**Figura 33 – Activación y contenido proteico de STAT5 (tratamiento intermitente) –** Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-STAT5a/b (Tyr<sup>694/699</sup>) (a) o anti-STAT5a/b (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel (c) muestra la relación fosfo-STAT5/STAT5. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

Mientras que en las hembras no se detectan cambios asociados al tratamiento intermitente con GH, en los ratones macho el tratamiento disminuye los niveles netos y la proporción de STAT5 fosforilado hasta niveles similares a los que exhiben las hembras (Fig. 33a y c). Solo cuando se analiza la relación entre la proteína fosforilada y la proteína total las diferencias alcanzan significación estadística, ya que en los machos tratados con GH, además, el contenido proteico de STAT5 es levemente mayor que en los ratones no tratados (Fig. 33b).

En los ratones hembra y macho tratados con GH de forma continua, por el contrario, no se observan diferencias en los niveles de STAT5 fosforilado en comparación con los controles (Fig. 34a). Ante un tratamiento continuo con GH, el perfil de concentraciones plasmáticas de hormona que se genera en los machos difiere sustancialmente del fisiológico. Como correlato de esta feminización del perfil de GH en sangre, que en los machos se verifica por la menor expresión de MUPs y EGFR asociada al tratamiento continuo, cabría esperar una disminución de STAT5 fosforilado hasta valores similares a los de las hembras. Si bien esto no se observa en los niveles netos de fosforilación, la proporción de STAT5 fosforilado en los machos tratados es ligeramente menor que en los controles y no presenta diferencias significativas con las hembras (Fig. 34c).

Cuando se analiza el contenido proteico de STAT5, se observa un perfil similar al obtenido en los animales tratados de forma intermitente, con un leve aumento en la abundancia de esta proteína en los machos tratados con GH en comparación con los controles (Fig. 34b).

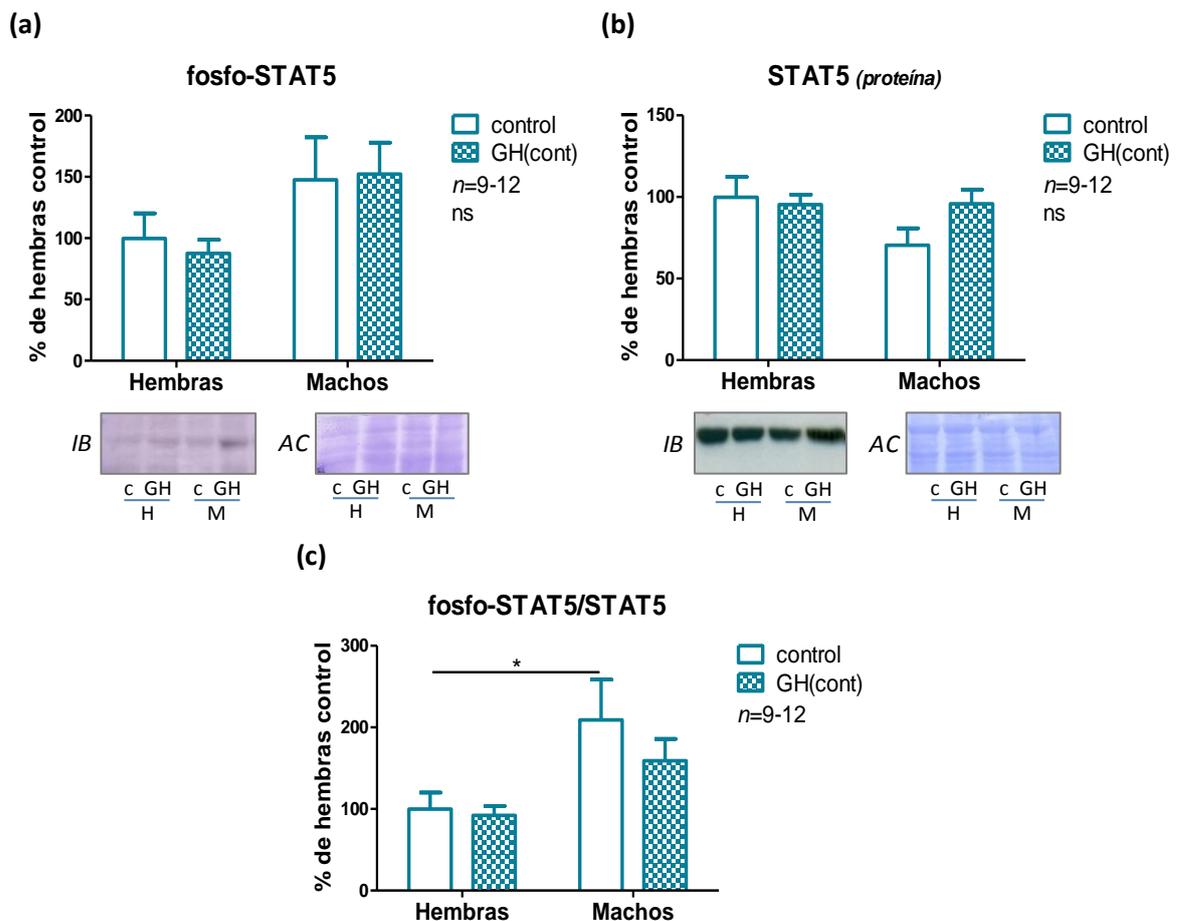
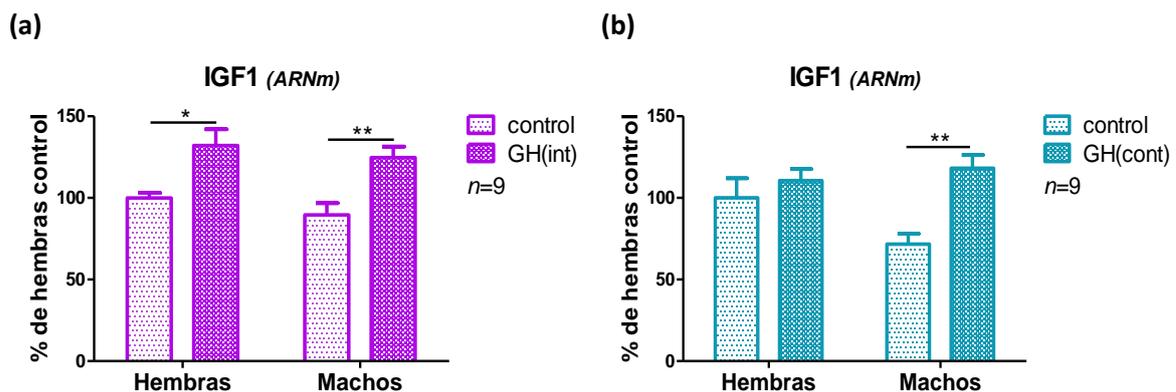


Figura 34 - Activación y contenido proteico de STAT5 (tratamiento continuo) - Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con

GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-STAT5a/b (Tyr<sup>694/699</sup>) (a) o anti-STAT5a/b (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel (c) muestra la relación fosfo-STAT5/STAT5. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

A través de la activación de STAT5b, la GH induce la expresión de diversos genes, entre ellos aquel que codifica para el factor de crecimiento similar insulina de tipo I (IGF1) (Woelfle y col., 2004, Hennighausen y col., 2008, Rotwein, 2012). Por ende, se midieron los niveles de ARNm de IGF1 en los ratones tratados de forma intermitente y continua (Fig. 35). Mientras que el tratamiento intermitente se asocia a una mayor expresión de IGF1 tanto en hembras como en machos (Fig. 35a), la administración continua solo genera este efecto en los ratones macho (Fig. 35b).



**Figura 35 - Expresión de IGF1** - Se determinaron los niveles de ARNm de IGF1 por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ).

Si se comparan estos resultados con los de activación de STAT5 (Fig. 33a y 34a), se observa que la expresión de IGF1 no presenta el mismo perfil que la fosforilación de STAT5. Este fenómeno se ha descrito previamente en otros trabajos realizados en ratones con niveles suprafisiológicos de GH (Bielohuby y col., 2011, Martínez y col., 2015). En los ratones GH-transgénicos, los niveles de IGF1 en hígado son mayores que en sus hermanos de camada

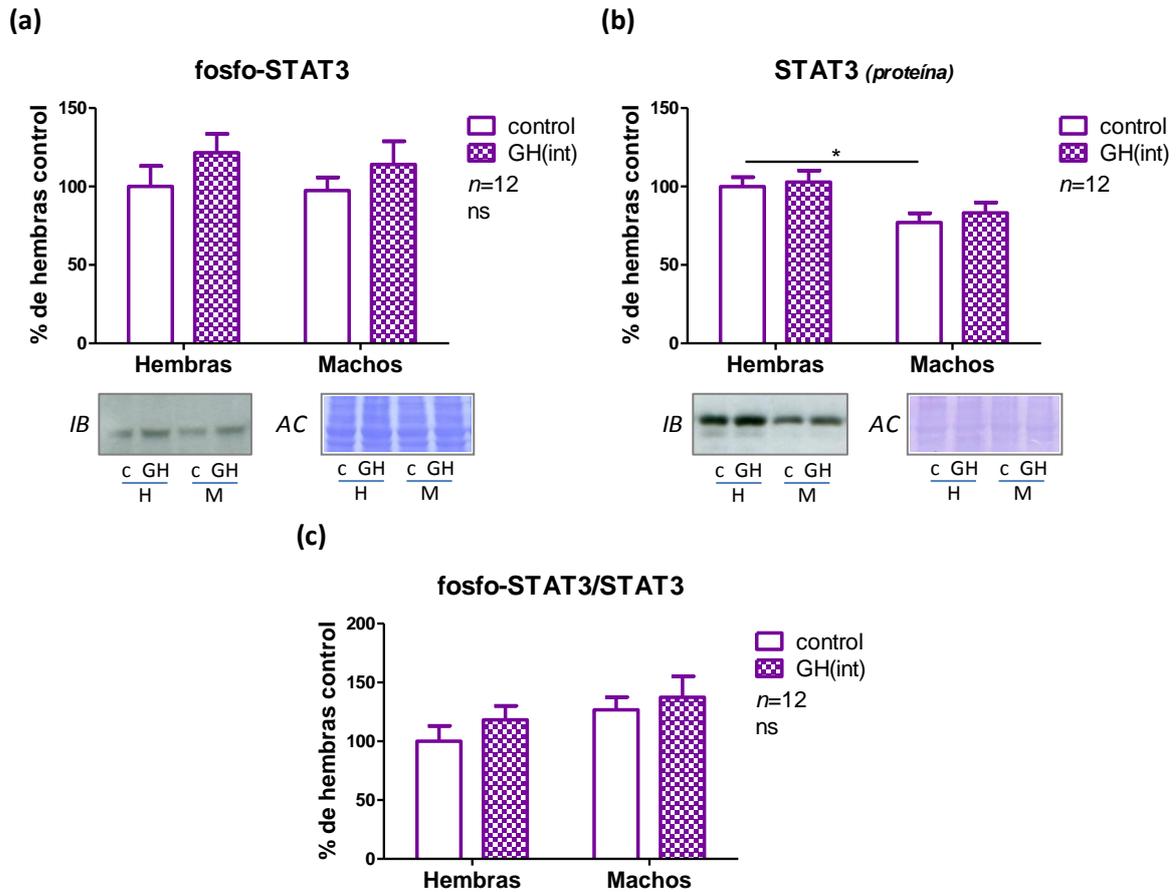
no transgénicos, aunque no se detecta una mayor activación basal de STAT5 probablemente debido a la acción de mecanismos de modulación negativa que se ponen en marcha frente a niveles elevados de GH y que limitan o regulan su fosforilación (Martínez y col., 2015). Un fenómeno similar podría estar ocurriendo en los ratones macho tratados con GH de forma continua en los que no se registran cambios asociados al tratamiento en la fosforilación de STAT5. En los ratones tratados de forma intermitente, en cambio, esta falta de correlación podría deberse al desfasaje que existe entre la activación de STAT5 y la inducción de la expresión de IGF1 ante una inyección de GH. En ratas macho, los niveles de STAT5b fosforilado aumentan rápidamente luego de un pulso de GH y retornan a valores basales dentro de la primera hora posterior al estímulo (Waxman y col., 1995, Tannenbaum y col., 2001). En cambio, los niveles de ARNm de IGF1 comienzan a aumentar a los 30 minutos y alcanzan su máximo entre 4 y 6 horas después (Murphy y col., 1987, Bichell y col., 1992). Por consiguiente, transcurridas 6 horas desde la última inyección de GH, los niveles de STAT5 fosforilado ya habrían disminuido y los de IGF1 estarían cercanos a su máximo.

### **3.2.2. Activación de STAT3**

La hormona de crecimiento también señala a través de STAT3, induciendo su fosforilación en el residuo de Tyr<sup>705</sup>. Una vez fosforilado, dimeriza y trasloca a núcleo, donde induce la expresión de genes involucrados en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Carter-Su y col., 2015, Thomas y col., 2015). Por consiguiente, la activación constitutiva de STAT3 se asocia al desarrollo y progresión de tumores (Bowman y col., 2000, Calò y col., 2003, Aggarwal y col., 2009). Asimismo, los ratones transgénicos que sobreexpresan GH, presentan una mayor fosforilación basal de STAT3 en comparación con sus hermanos de camada normales (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016).

En los ratones tratados con GH, la administración intermitente de hormona se asocia a una ligera tendencia a mayores niveles de STAT3 activo en comparación con los ratones no tratados (**Fig. 36a**). Cuando se analiza la abundancia de esta proteína, no se observan diferencias entre los ratones tratados y sus controles correspondientes, pero se observan diferencias por sexo, ya que los machos presentan menores niveles de STAT3 que las hembras (**Fig. 36b**). Por consiguiente, la relación entre los niveles de proteína fosforilada

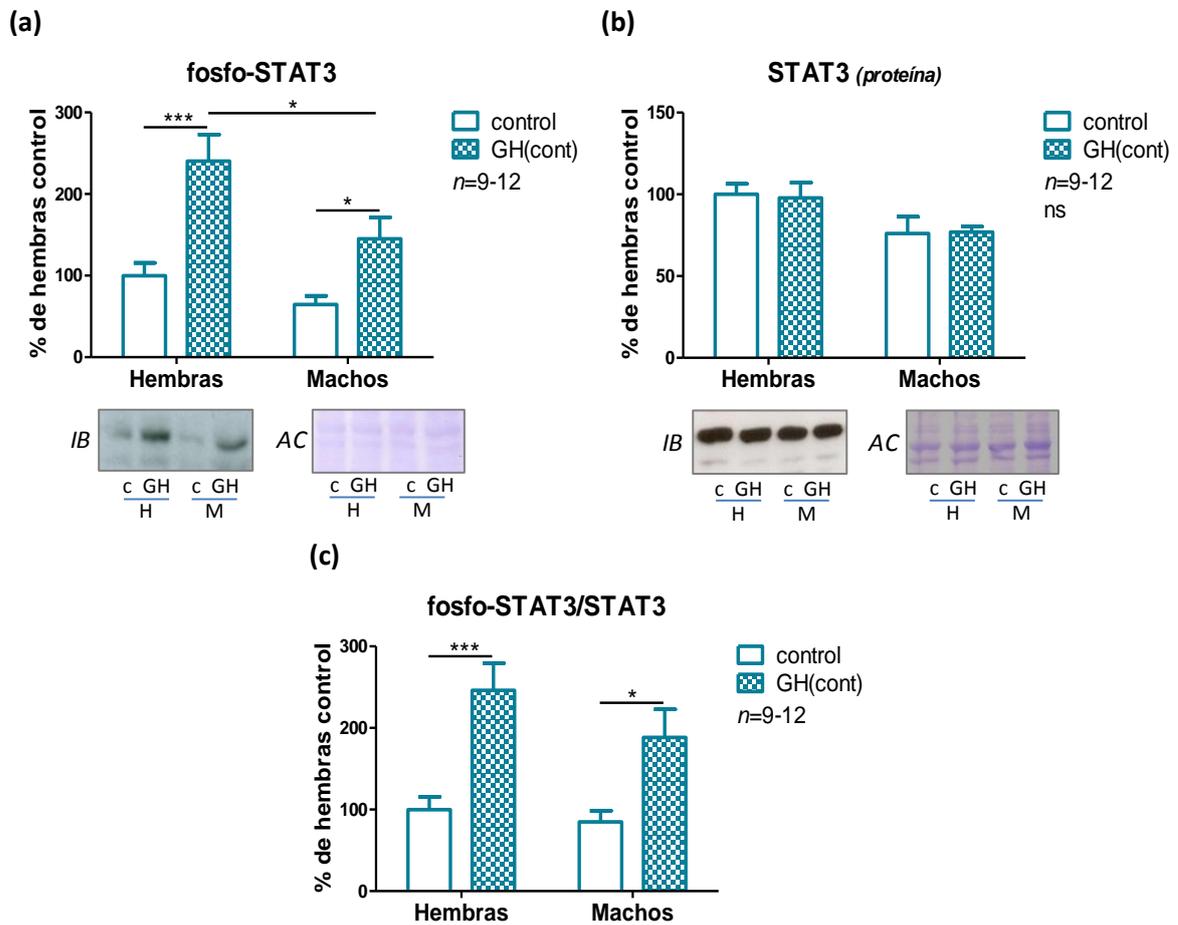
y su contenido proteico total es ligeramente mayor en los machos que en las hembras y se atenúan las diferencias asociadas al tratamiento (Fig. 36c).



**Figura 36 - Activación y contenido proteico de STAT3 (tratamiento intermitente) -** Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) **(a)** o anti-STAT3 **(b)**. Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel **(c)** muestra la relación fosfo-STAT3/STAT3. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\**p* < 0,05). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

En los animales sometidos a una administración sostenida de hormona, los efectos del tratamiento sobre la activación de STAT3 son más marcados. Los niveles de fosforilación de esta proteína duplican los de los controles y los niveles que se alcanzan son mayores en las hembras que en los machos tratados (Fig. 37a). En este caso, los machos también presentan un menor contenido proteico de STAT3 que las hembras, aunque las diferencias no

alcanzan significación estadística (Fig. 37b). Cuando se analiza qué proporción de STAT3 se encuentra activo, se observa un perfil similar al que exhibe la proteína fosforilada (Fig. 37c).



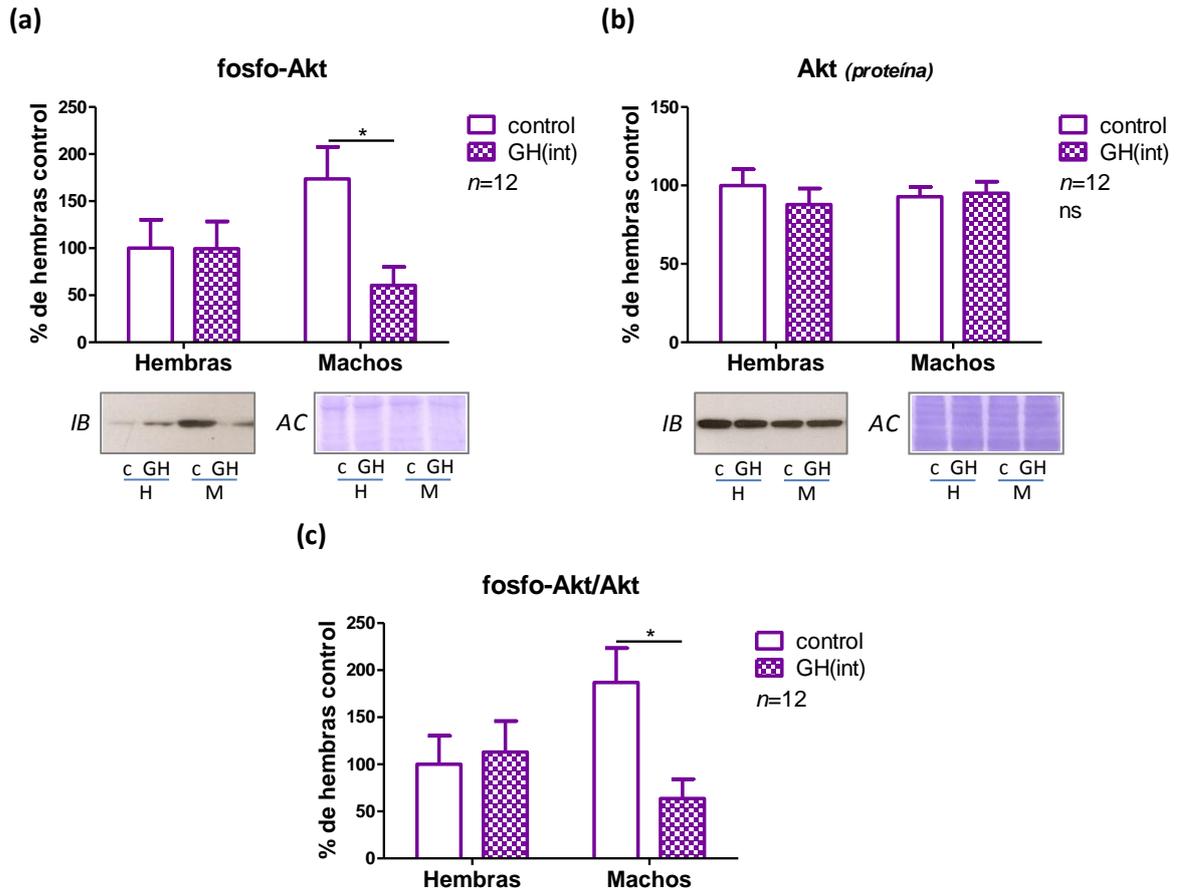
**Figura 37 – Activación y contenido proteico de STAT3 (tratamiento continuo) –** Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) (a) o anti-STAT3 (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel (c) muestra la relación fosfo-STAT3/STAT3. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

### 3.2.3. Activación de Akt y sus sustratos GSK3 $\beta$ y mTOR

La vía de la PI3K/Akt tendría un rol fundamental en el crecimiento de las células hepáticas (Ono y col., 2003, Haga y col., 2009) y su desregulación ha sido descrita en diversos tipos de tumores, incluso en tumores de hígado (Nicholson y col., 2002, Song y col., 2005, Llovet y col., 2008, Spangenberg y

col., 2009, Zender y col., 2010, Chuma y col., 2015). Los ratones GH-transgénicos adultos jóvenes presentan una mayor activación de Akt y sus sustratos GSK3 $\beta$  y mTOR en comparación con los controles, incluso durante el período de crecimiento rápido, cuando estos animales ya manifiestan marcada hepatomegalia producto de la hipertrofia e hiperplasia de los hepatocitos (Miquet y col., 2008, González y col., 2010, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016).

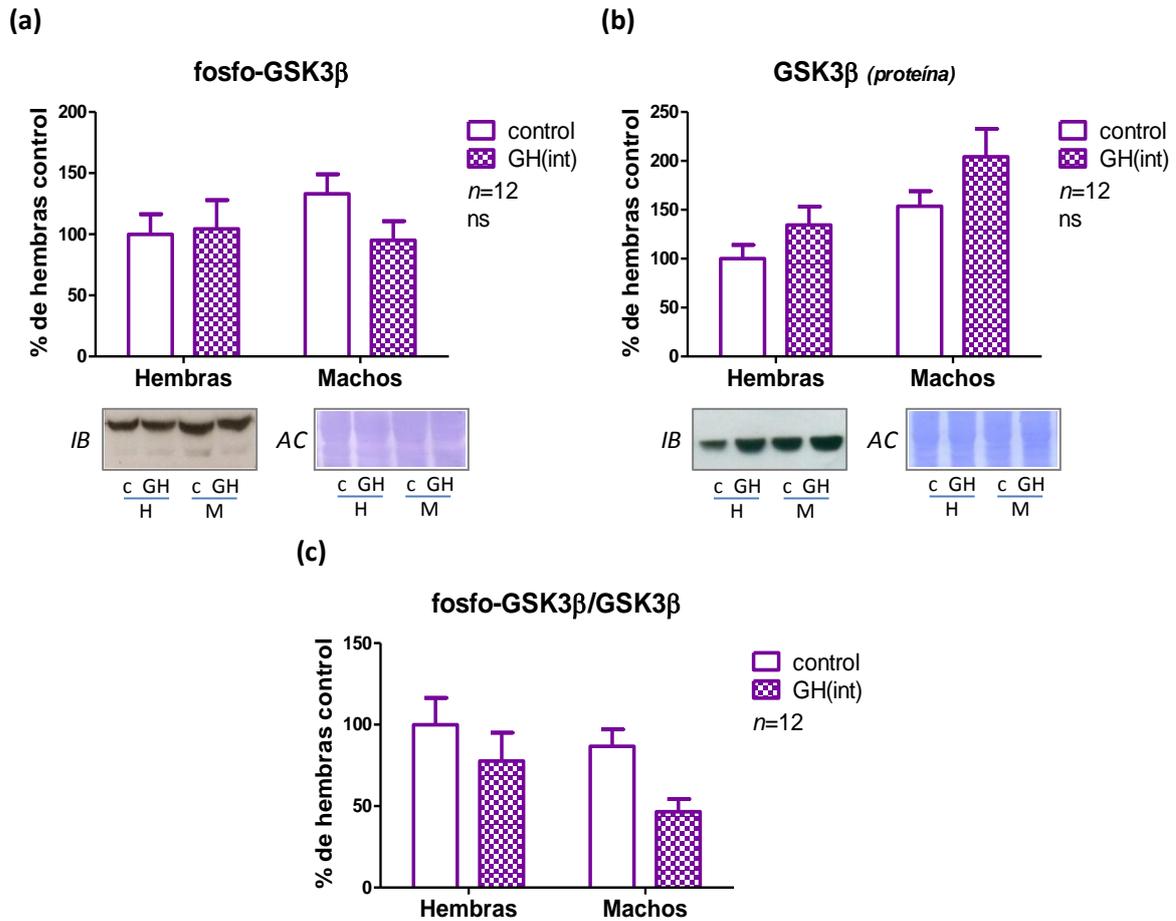
Para evaluar los niveles de activación de esta vía se midieron, en primer lugar, los niveles de Akt fosforilado en el residuo de Ser<sup>473</sup>. En los ratones control, la fosforilación basal de Akt es mayor en los machos que en las hembras, aunque las diferencias no alcanzan significación estadística. Ante un tratamiento intermitente con GH, los niveles de Akt fosforilado disminuyen en los machos hasta valores similares a los de las hembras control y tratadas, que no exhiben diferencias significativas entre sí (**Fig. 38a**). La relación entre los niveles de fosforilación y el contenido proteico de Akt presenta un perfil similar al de la proteína fosforilada ya que no se perciben variaciones significativas en la abundancia proteica de Akt entre las distintas condiciones en estudio (**Fig. 38b-c**).



**Figura 38– Activación y contenido proteico de Akt (tratamiento intermitente) –** Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>) (a) o anti-Akt (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel (c) muestra la relación fosfo-Akt/Akt. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

La actividad de Akt se evaluó también mediante el análisis de la fosforilación de sus sustratos GSK3 $\beta$ , en el residuo Ser<sup>9</sup>, y mTOR, en el residuo Ser<sup>2448</sup>. En cuanto a GSK3 $\beta$ , se observa únicamente en los machos una disminución no significativa de su fosforilación asociada al tratamiento intermitente con GH, que acompaña los menores niveles de Akt fosforilado (Fig. 39a). En cambio, las hembras tratadas y control presentan niveles similares de fosforilación de GSK3 $\beta$ . El contenido de esta proteína está ligeramente aumentado en los ratones tratados con GH en comparación con los controles (Fig. 39b). En consecuencia, se observa una disminución no significativa

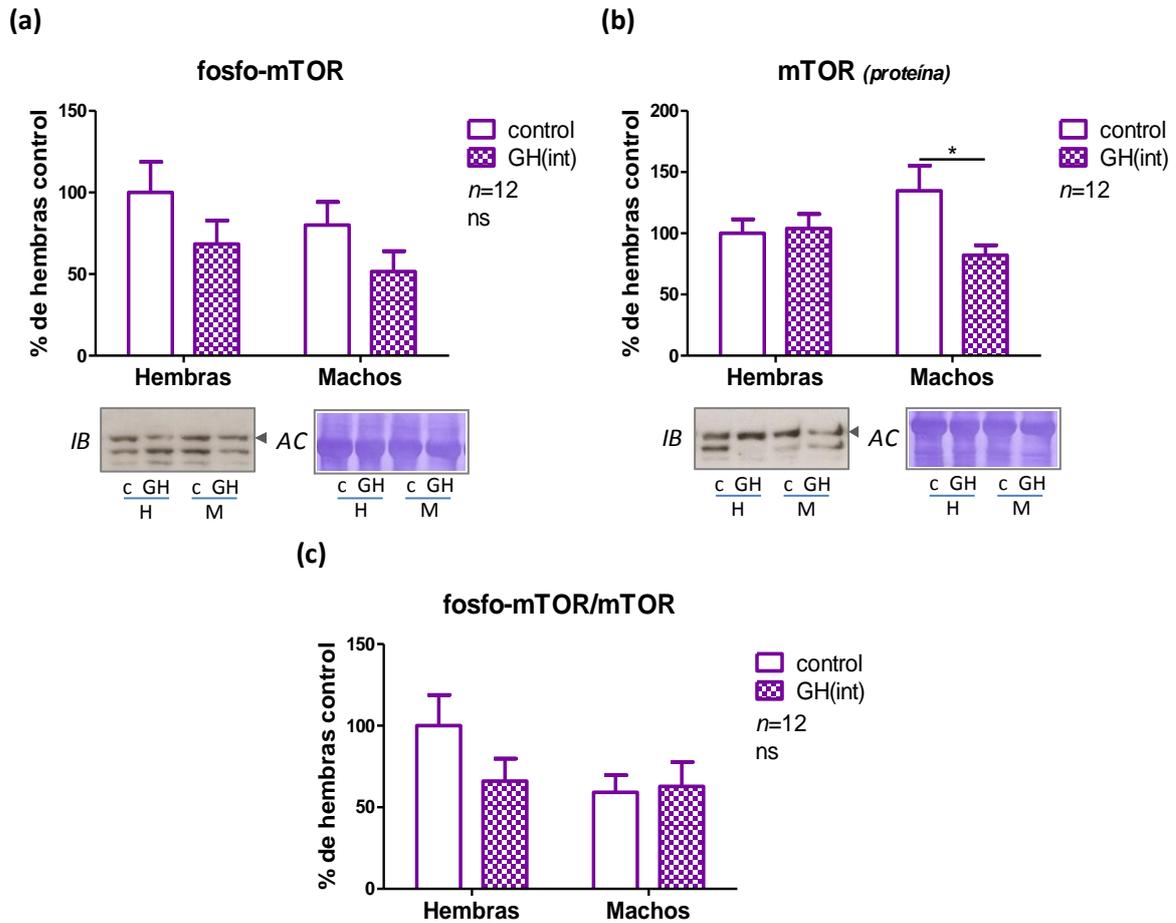
asociada al tratamiento en la proporción de GSK3 $\beta$  fosforilado, de mayor magnitud en los ratones macho (Fig. 39c).



**Figura 39 – Activación y contenido proteico de GSK3 $\beta$  (tratamiento intermitente)** – Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu$ g/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-GSK3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) (a) o anti-GSK3 $\beta$  (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel (c) muestra la relación fosfo-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ . Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. ns: no significativo según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

En el caso de mTOR, se observa una ligera disminución de su activación, tanto en machos como en hembras sometidas al tratamiento intermitente con GH. Notablemente, en los machos, esto se acompaña de un menor contenido proteico que en los ratones control (Fig. 40b). Por consiguiente, la proporción de mTOR que se encuentra fosforilado no presenta diferencias significativas en este sexo (Fig. 40c). En las hembras en cambio, la ligera disminución de la fosforilación de mTOR no se acompaña de cambios en su contenido proteico en comparación con los ratones no tratados. Por ende, la relación

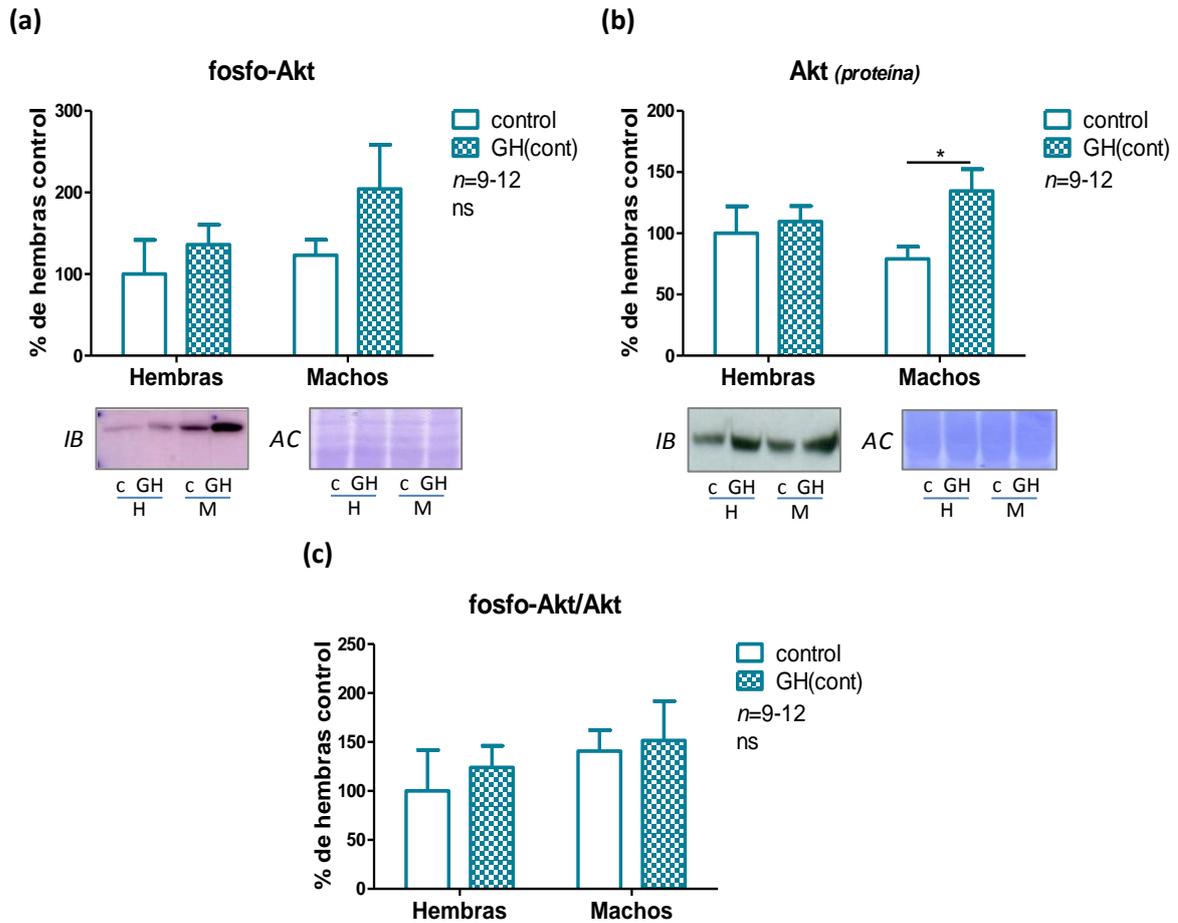
correspondiente también es ligeramente menor en las hembras sometidas al tratamiento con GH.



**Figura 40 - Activación y contenido proteico de mTOR (tratamiento intermitente) -** Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-mTOR (Ser<sup>2448</sup>) (a) o anti-mTOR (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel (c) muestra la relación fosfo-mTOR/mTOR. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

La administración continua de GH, a diferencia del tratamiento intermitente, se asocia a una tendencia hacia mayores niveles de activación de Akt en los ratones macho en comparación con los controles (Fig. 41a). Dado que el contenido de Akt también es mayor en los machos expuestos a la hormona (Fig. 41b), cuando se analiza la proporción de Akt que se encuentra fosforilado no se detectan diferencias asociadas al tratamiento (Fig. 41c). Las

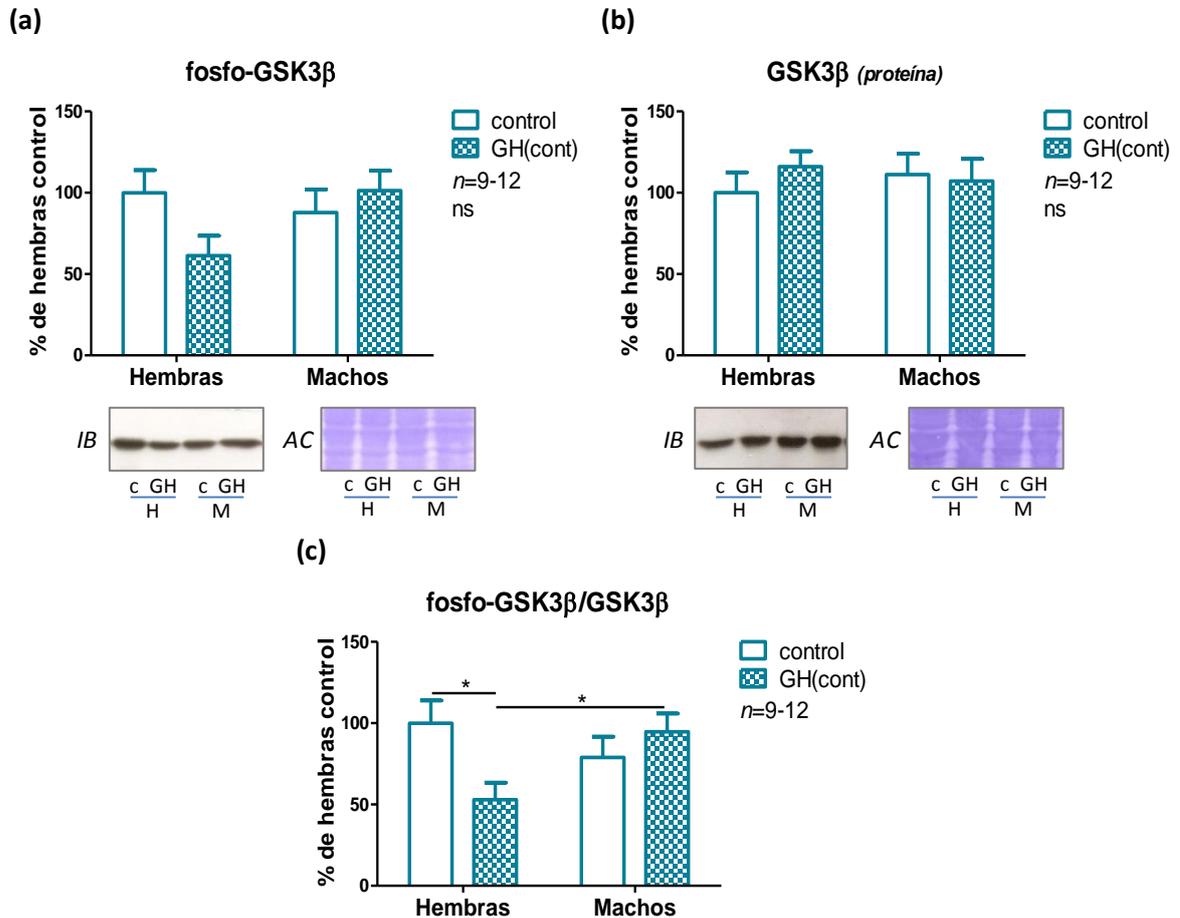
hembras, por el contrario, no presentan diferencias significativas en la activación y el contenido proteico de Akt debido a la exposición a la hormona.



**Figura 41 - Activación y contenido proteico de Akt (tratamiento continuo) -** Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>) (a) o anti-Akt (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel (c) muestra la relación fosfo-Akt/Akt. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). *ns*: no significativo según el mismo análisis estadístico.

En cuanto a GSK3 $\beta$ , el efecto del tratamiento continuo se observa principalmente en las hembras, que exhiben una ligera disminución de los niveles de fosforilación de esta proteína en comparación con los controles (Fig. 42a). Dado que el contenido proteico presenta una tendencia en el sentido opuesto (Fig. 42b), cuando se analiza la proporción de GSK3 $\beta$  que se encuentra fosforilado, resulta significativamente menor en las hembras tratadas con GH en comparación con los controles (Fig. 42c). En los machos, por el contrario, no

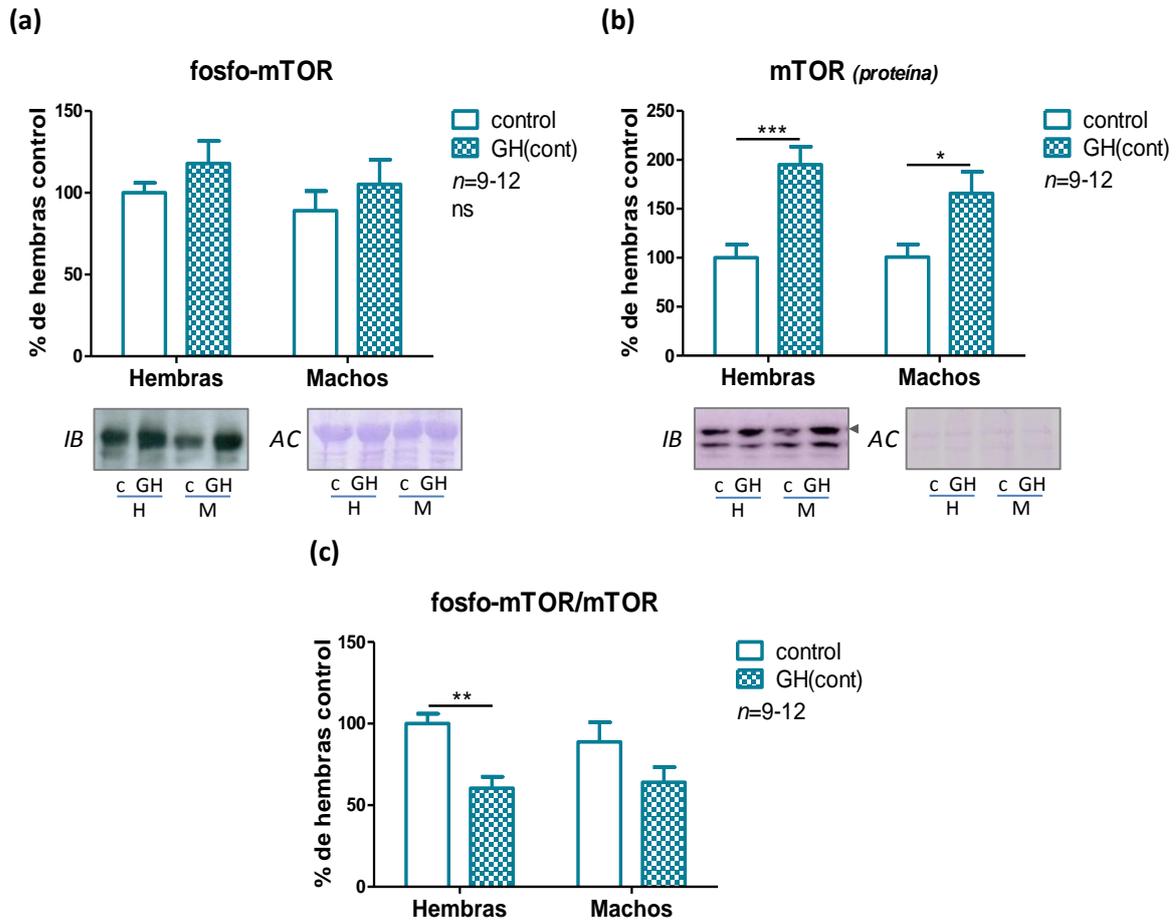
se perciben diferencias ni en la activación ni en la cantidad total de GSK3 $\beta$  asociadas al tratamiento y, por lo tanto, tampoco en la relación entre estas determinaciones.



**Figura 42 – Activación y contenido proteico de GSK3 $\beta$  (tratamiento continuo)** – Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu$ g/g de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-GSK3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) (a) o anti-GSK3 $\beta$  (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel (c) muestra la relación fosfo-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ . Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

Por último, se observa una ligera tendencia hacia mayores niveles de fosforilación de mTOR en los ratones tratados con GH de forma continua en comparación con los controles, que es acompañado por un marcado aumento del contenido proteico de mTOR (Fig. 43a-b). Como consecuencia, la relación entre mTOR fosforilado y su contenido proteico es menor en los ratones

expuestos a una administración continua de GH, aunque solo en las hembras las diferencias son significativas (Fig. 43c).



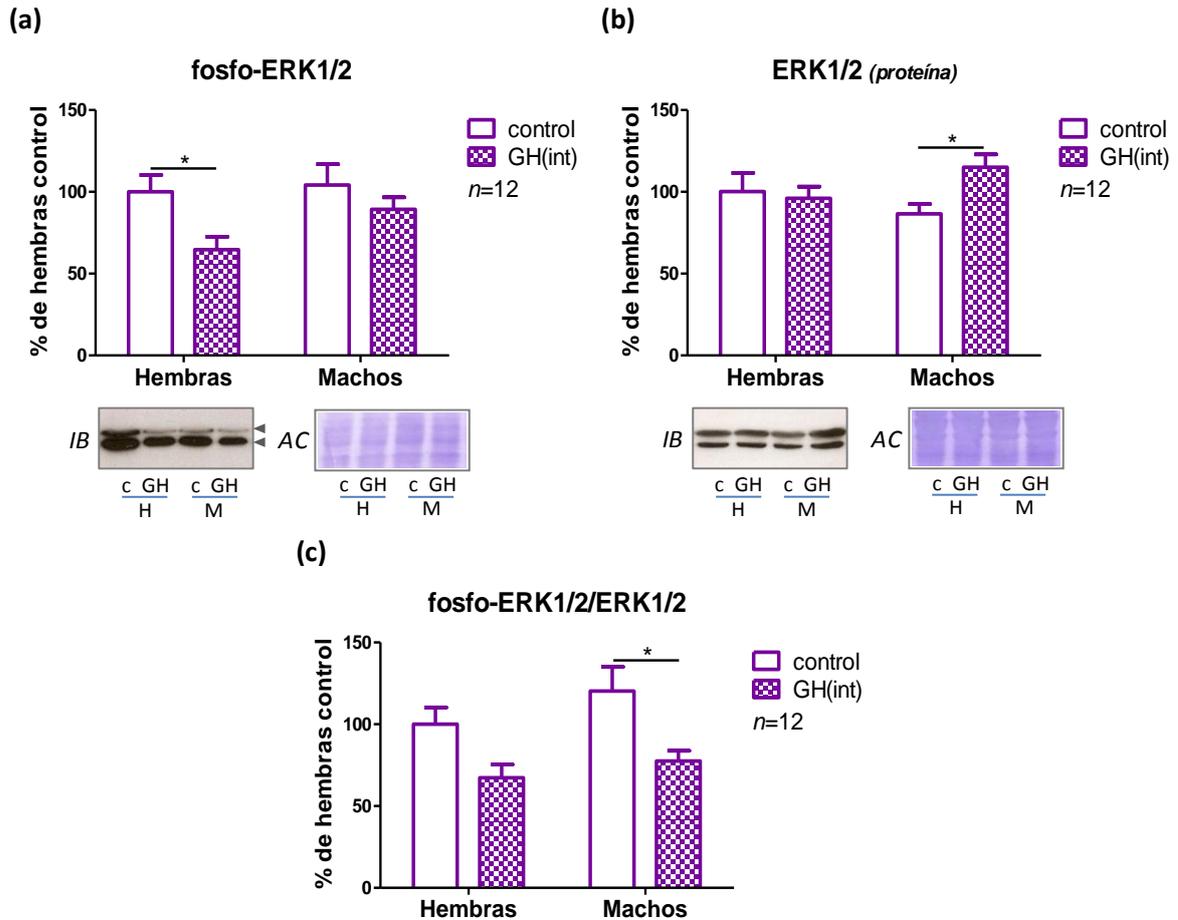
**Figura 43 – Activación y contenido proteico de mTOR (tratamiento continuo) –** Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-mTOR (Ser<sup>2448</sup>) (a) o anti-mTOR (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. El panel (c) muestra la relación fosfo-mTOR/mTOR. Se representa la media  $\pm$  ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

### 3.2.4. Activación de ERK1/2

La vía de las MAPK/ERK1/2 también es activada por la hormona de crecimiento. La activación de ERK1/2 implica la fosforilación secuencial en los residuos Thr<sup>202</sup> y Tyr<sup>204</sup> de ERK1 y Thr<sup>185</sup> y Tyr<sup>187</sup> de ERK2. A través de esta vía, diversos factores de crecimiento inducen mecanismos de proliferación celular (Llovet y col., 2008, Sun y col., 2015). Ratones GH-transgénicos adultos

presentan una mayor abundancia de ERK1 y ERK2 que sus hermanos de camada normales (Miquet y col., 2008, González y col., 2010, Martínez y col., 2016), aunque no se detectan cambios significativos en la fosforilación basal de ERK1. Los resultados de dichos trabajos en cuanto a la fosforilación de ERK2 no son concluyentes y las discrepancias podrían deberse a la cantidad de grupos analizados en paralelo. En los ratones tratados con GH se hizo un análisis conjunto de ambas isoformas, por lo que se continuará haciendo referencia a estas proteínas como ERK1/2.

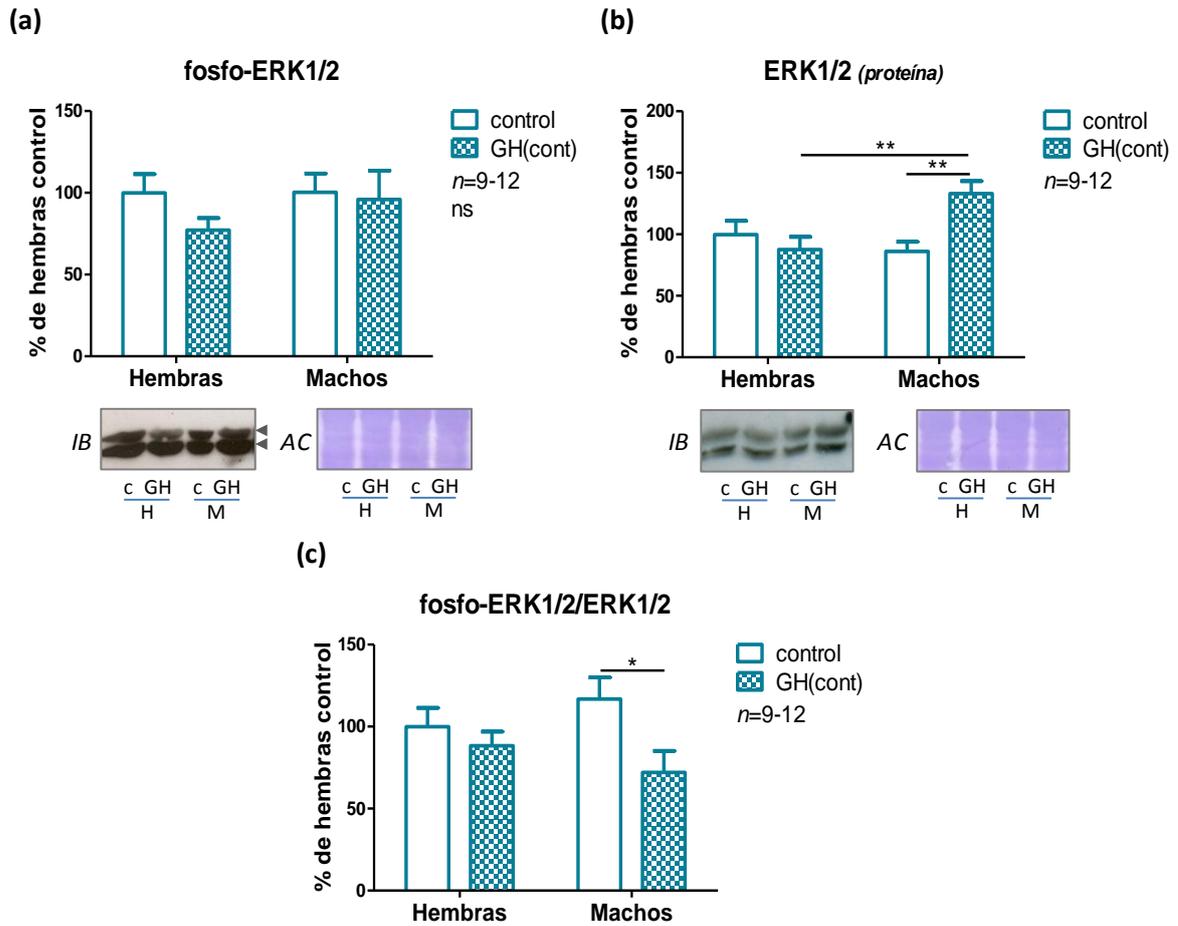
En las hembras, la administración intermitente de GH induce una disminución en los niveles de ERK1/2 fosforilado en residuos de activación en comparación con los animales no tratados (**Fig. 44a**), mientras que no se detectan cambios significativos en su contenido proteico (**Fig. 44b**). Por consiguiente, la proporción de ERK1/2 fosforilado también tiende a ser menor en las hembras sometidas al tratamiento intermitente, aunque las diferencias no son significativas (**Fig. 44c**). En los machos, en cambio, la administración de GH da lugar a una mayor expresión de ERK1/2 en comparación con los animales no tratados, pero no modifica los niveles de fosforilación de esta proteína. En consecuencia, la proporción de ERK1/2 fosforilado resulta menor en los machos tratados con GH que en sus respectivos controles.



**Figura 44 – Activación y contenido proteico de ERK1/2 (tratamiento intermitente)** – Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>185</sup>/Tyr<sup>187</sup>) (a) o anti-ERK1/2 (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los resultados se obtuvieron a partir de la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a ERK1 y ERK2. El panel (c) muestra la relación fosfo-ERK1/2/ERK1/2. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

La administración sostenida de GH se asocia a cambios en la activación y el contenido proteico de ERK1/2 en el mismo sentido que los obtenidos con el tratamiento intermitente (Fig. 45). Las hembras tratadas presentan una disminución de la fosforilación de ERK1/2, no significativa para este tipo de administración, sin cambios en su contenido proteico. Los machos, por el contrario, exhiben un marcado aumento en la abundancia de ERK1/2 asociado al tratamiento, que no se traduce en una mayor fosforilación. En consecuencia,

el grado de activación de ERK1/2 en los machos tratados con GH es significativamente menor que el de los controles.



**Figura 45 - Activación y contenido proteico de ERK1/2 (tratamiento continuo) -** Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>185</sup>/Tyr<sup>187</sup>) **(a)** o anti-ERK1/2 **(b)**. Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los resultados se obtuvieron a partir de la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a ERK1 y ERK2. El panel **(c)** muestra la relación fosfo-ERK1/2/ERK1/2. Se representa la media  $\pm$  ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

### 3.2.5. Análisis general de las vías de señalización activadas por GH

Con el objeto de evaluar los efectos a nivel molecular del tratamiento con GH, se exploró la activación de vías de señalización relacionadas con crecimiento, proliferación y supervivencia celular, como las vías de los STATs, PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2. La señalización a través de estas vías se encuentra

desregulada en el hígado de los ratones GH-transgénicos, en algunos casos incluso desde el período de crecimiento (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2015, Martínez y col., 2016).

En los modelos de ratones tratados con GH que se presentan en esta tesis se observa, en primer lugar, que la administración de GH genera un aumento en la expresión del ARNm de su receptor, GHR, en comparación con los controles. Estos cambios son estadísticamente significativos solo cuando la GH es administrada de forma continua. En ese caso, tanto en hembras como en machos, el tratamiento da lugar a niveles de expresión de GHR que duplican aproximadamente los obtenidos en los controles. Estos cambios se asemejan en magnitud y sentido a los detectados entre los ratones GH-transgénicos adultos y sus hermanos de camada normales (González y col., 2002, Miquet y col., 2004, Sotelo y col., 2008, Martínez y col., 2015).

Si bien el tratamiento intermitente no induce un aumento significativo de la expresión de GHR, los resultados obtenidos cobran relevancia si se analizan en el contexto de la cinética de activación de la señalización de GH. En paralelo a los ciclos de desensibilización y resensibilización de la vía JAK2/STAT5b en respuesta a la GH, el receptor atraviesa ciclos de síntesis, internalización y degradación; procesos que también son promovidos por la propia hormona (Bick y col., 1989, Strous y col., 1996, Ji y col., 2002, Landsman y col., 2005). Ante la unión de la GH a su receptor, se induce la internalización y degradación del mismo, que se vuelve a sintetizar en el período libre de hormona entre pulsos. El carácter cíclico de estos mecanismos requeriría una expresión también cíclica del ARNm de GHR. En ratas hipofisectomizadas sometidas a un tratamiento intermitente con GH, se ha descrito un aumento de la expresión de su receptor una hora después de la última inyección, hasta niveles similares a los que induce la misma dosis de hormona administrada de forma continua (Maiter y col., 1992). Luego del aumento inicial, los niveles de ARNm de GHR disminuyen hasta recuperar los valores basales. De forma similar, en los ratones tratados con GH de forma intermitente para este trabajo de tesis, la expresión de GHR se encontraría en su fase de declive transcurridas 6 horas de la última inyección, cuando se obtuvieron las muestras. En consecuencia, solo se detecta un leve aumento del ARNm de GHR. En cambio, el estímulo constante producto de la administración sostenida de GH mantendría los niveles de receptor continuamente elevados.

En cuanto a la vía JAK2/STAT5, no se observa una mayor fosforilación de STAT5 en los ratones tratados con GH a pesar de los mayores niveles de hormona, ya sea que esta se administre de forma intermitente o sostenida. Sin embargo, los resultados obtenidos se asemejan a lo que ocurre en los ratones GH-transgénicos adultos. En estos animales, la exposición a niveles sostenidos de hormona tampoco modifica la activación basal de STAT5, aunque los ratones transgénicos duplican el peso corporal de los normales y presentan claras evidencias de que la hormona actúa en hígado, como hepatomegalia, hipertrofia e hiperplasia hepatocelular y alteraciones moleculares (González y col., 2002, Miquet y col., 2004, Miquet y col., 2008, Sotelo y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2015).

En particular, los machos expuestos a un tratamiento intermitente presentan una menor fosforilación de STAT5 y una menor dispersión de los resultados obtenidos para esta condición experimental. Estos resultados sugerirían la sincronización de los ciclos de fosforilación/desfosforilación de STAT5 ante las inyecciones de GH en los animales tratados. De acuerdo con los resultados obtenidos, y en concordancia con reportes previos (Ram y col., 1996, Tannenbaum y col., 2001, Waxman y col., 2006), luego de 6 horas de la última inyección de GH la señal que se desencadenó ya habría finalizado y, por ende, los niveles de STAT5 fosforilado en los machos tratados son menores que en los controles y similares a los de las hembras. Si en las hembras tratadas con GH de forma intermitente STAT5 se activa ante cada inyección con una cinética similar a la de los machos, en el momento de obtener las muestras la señal ya habría vuelto a sus valores basales. En consecuencia, no se detectarían diferencias en los niveles de STAT5 fosforilado entre las hembras tratadas y sus controles. Si bien la ausencia de diferencias podría significar que, en realidad, el tratamiento intermitente no induce la activación de esta vía, antecedentes de nuestro grupo de trabajo mostraron que, en ratones hembra, STAT5 se fosforila en los primeros minutos luego de una inyección con dosis similares de GH (Miquet y col., 2004, Miquet y col., 2005b, Miquet y col., 2005a, Miquet y col., 2005c, Martínez y col., 2013, Martínez y col., 2015). Además, el efecto masculinizante del tratamiento sobre la expresión de MUPs y EGFR sugiere que, efectivamente, STAT5 respondería de forma coordinada en ambos sexos.

La exposición prolongada a dosis farmacológicas de GH redundaría en una mayor expresión de IGF1 en hígado, en comparación con los ratones no

tratados. El tratamiento intermitente genera este efecto tanto en machos como en hembras mientras que el tratamiento continuo induce un aumento en la expresión de IGF1 únicamente en los machos. En línea con estos resultados, otros autores describieron que la misma dosis de GH, administrada de forma intermitente en ratones adultos jóvenes, promueve la expresión de IGF1, no solo en hígado, sino también en otros tejidos, como músculo esquelético y tejido adiposo, y resulta en mayores niveles de IGF1 en circulación (Ueki y col., 2009).

A diferencia de los resultados obtenidos de fosforilación de STAT5, la activación de STAT3 en los animales expuestos a niveles sostenidos de GH duplica la de los controles, tanto en hembras como en machos. Una tendencia en el mismo sentido se observa en los ratones tratados con GH de forma intermitente. La desregulación de STAT3 está estrechamente vinculada con procesos inflamatorios en hígado, que tienen lugar en las primeras etapas del proceso de hepatocarcinogénesis (Aggarwal y col., 2009, He y col., 2011, Stotz y col., 2015). En concordancia, los ratones GH-transgénicos presentan una mayor activación de esta vía desde edades tempranas (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016). Por consiguiente, este marcado aumento en la fosforilación de STAT3 asociada al tratamiento continuo con GH constituye un evento a considerar al analizar la seguridad de esta forma de administración.

Otra de las vías que se encuentra desregulada en los ratones GH-transgénicos es la vía de la PI3K/Akt. La mayor activación de Akt que estos animales presentan en comparación con los ratones normales, que comienza a evidenciarse desde el período de crecimiento y se magnifica en la adultez, se ha vinculado con el desarrollo de hipertrofia de los hepatocitos y hepatomegalia (Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016). Por el contrario, el tratamiento con dosis farmacológicas de GH, administradas de forma intermitente o continua, no resultó en una mayor activación de esta vía, como podría haberse esperado conforme a los antecedentes en ratones GH-transgénicos y las alteraciones histológicas asociadas a los dos modelos.

Si se analizan los resultados de activación de la vía de la PI3K/Akt en los ratones sometidos a una administración intermitente de GH, es llamativo que los machos tratados presenten menores niveles de Akt fosforilado que los controles. El perfil de fosforilación de Akt se refleja sutilmente en la activación de sus sustratos GSK3 $\beta$  y mTOR y se asemeja al de fosforilación de STAT5. No obstante, en estos animales no se esperaría una respuesta rápida y transitoria

de Akt ante cada inyección de GH que justifique la disminución de Akt fosforilado en los ratones tratados, como ocurre con STAT5. Ante un estímulo agudo con GH en ratones adultos sin alteraciones en el eje somatotrópico, se induce una mayor activación de STAT5 y de STAT3, pero no de Akt y ERK1/2 (Miquet y col., 2008, González y col., 2010, Martínez y col., 2013). Cabe aclarar que, sin embargo, tanto Akt como ERK1/2 responden a un estímulo agudo con GH en modelos animales con una sensibilidad aumentada a la hormona, como los ratones con déficit de GH (Miquet y col., 2010). Asimismo, en ratones en crecimiento sin alteraciones en el eje somatotrópico, que son más sensibles a la acción de la GH que los adultos, el estímulo con GH también es capaz de inducir la fosforilación de Akt y ERK1/2, pero solo a altas dosis (Barclay y col., 2010, Martínez, 2013). La menor fosforilación de Akt en los ratones macho tratados con GH de forma intermitente puede explicarse considerando los mecanismos que se desencadenan luego de cada pulso de hormona y que permiten la finalización de la señal a través de GHR. Estos procesos, además, pueden modular la activación de la vía de la PI3K/Akt (Ji y col., 2002, Dominici y col., 2005, Ridderstråle, 2005) y, como consecuencia, restringir la fosforilación de Akt y sus sustratos, disminuyendo el estado de activación de esta vía en los ratones tratados con GH.

En cuanto a la vía de las MAPK/ERK1/2, estrechamente relacionada con mecanismos de proliferación celular, el tratamiento con GH, intermitente o continuo, tampoco resulta en una mayor activación de ERK1/2 al finalizar el tratamiento. Asimismo, niveles más elevados de hormona como los que exhiben los ratones GH-transgénicos, no afectan sustancialmente la señalización a través de esta vía (Miquet y col., 2008, González y col., 2010, Martínez y col., 2016). Como ocurre con Akt, es llamativo que el grado de activación de ERK1/2 sea menor en los ratones tratados con GH en comparación con los controles, lo que se evidencia principalmente en aquellos animales tratados de forma intermitente. Los mecanismos de modulación negativa que se ponen en marcha luego de la activación de STAT5 también limitarían la fosforilación de ERK1/2 (Ji y col., 2002). Además, la PI3K puede estar implicada en la activación de la vía de las MAPK/ERK1/2, por lo que podía esperarse que ERK1/2 presente un perfil de activación similar al de la vía de la PI3K/Akt (Liang y col., 2000, Zhu y col., 2001).

En los ratones tratados con GH de forma continua, si bien no se observa una mayor activación de las vías de la PI3K/Akt o de las MAPK/ERK1/2, el

tratamiento se asocia a un aumento del contenido proteico de Akt, mTOR y ERK1/2 en comparación con controles, principalmente en los machos. A diferencia de Akt y mTOR, el aumento de ERK1/2 se evidencia, además, en los machos tratados con GH de forma intermitente. Los ratones GH-transgénicos exhiben aumentos similares, pero la exposición constante a niveles aún más elevados de GH incrementa también la fosforilación basal de estos mediadores en comparación con sus hermanos de camada normales (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016). Por consiguiente, estos resultados indicarían que, ante dosis farmacológicas de hormona, se logra contener la activación de las vías de la PI3K/Akt y de las MAPK/ERK1/2 a pesar del aumento en el contenido proteico de algunos de sus mediadores.

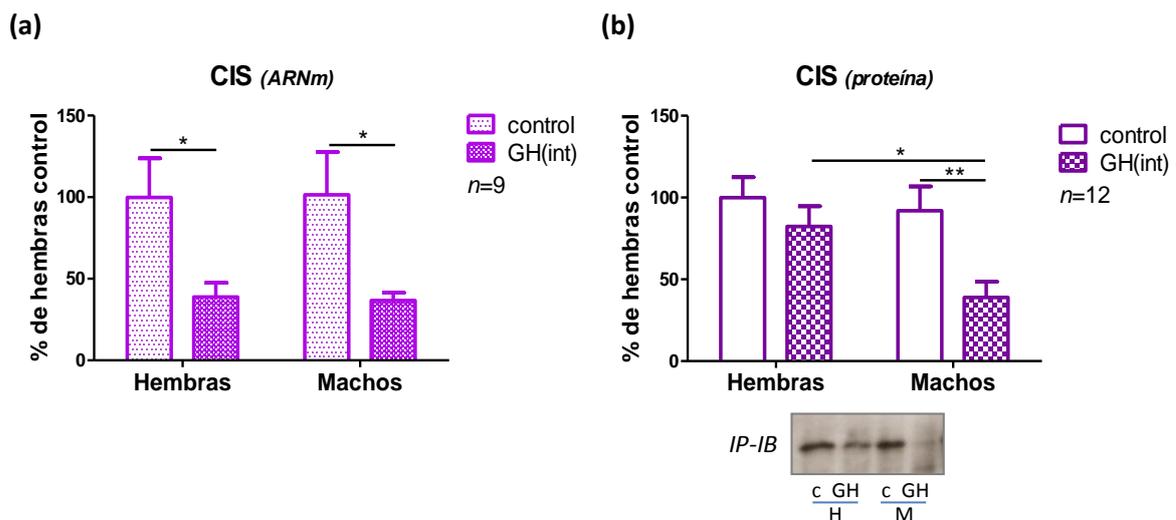
### **3.3. Moduladores negativos de la señalización de GHR**

Los supresores de la señal de citoquinas, SOCS, constituyen un mecanismo primordial en la terminación de la señalización de GH. En particular, SOCS-1, -2, -3 y CIS, cuya expresión se induce a través de la propia hormona, inhiben a JAK2, bloquean sitios de anclaje en GHR para proteínas mediadoras de su señalización y/o conducen al receptor a degradación por proteosoma (Woelfle y col., 2004, Flores-Morales y col., 2006). En hígado, la GH induce la transcripción de SOCS-2, -3 y CIS, aunque con distinta cinética (Adams y col., 1998, Davey y col., 1999a, Tollet-Egnell y col., 1999). Ante un estímulo con GH y la consecuente activación de STAT5b, se induce la expresión rápida y transitoria de SOCS3 y, en menor medida, de CIS. Esta última, luego de un primer máximo, disminuye para comenzar a aumentar nuevamente a menor velocidad y de forma sostenida. Por el contrario, la expresión de SOCS2 inducida por GH aumenta a muy baja velocidad y de forma constante, acompañando la segunda ola de expresión de CIS. Esta cinética más lenta de expresión de SOCS2 estaría relacionada con su participación en los mecanismos que ponen fin a la terminación de la señal mediada por SOCS3. SOCS2 induce la degradación por proteosoma de los complejos formados por GH, GHR y SOCS3, y permite, de esta forma, que un nuevo estímulo hormonal desencadene una respuesta al unirse a su receptor (Tannahill y col., 2005, Piessevaux y col., 2006). Los distintos mecanismos en los que participa SOCS2 explican su rol dual en la señalización de GH: si bien a bajas concentraciones actúa como supresor, a altas concentraciones promueve la transducción de su señal al limitar la acción de otros supresores (Favre y col., 1999).

Considerando los resultados presentados en la sección anterior y con el objeto de explorar los efectos del tratamiento con GH, intermitente y continuo, sobre la expresión de estos moduladores de la acción de la hormona, se determinó el contenido de ARNm y de proteína de CIS, SOCS2 y SOCS3. Los resultados correspondientes a la abundancia de la proteína CIS se mostraron previamente para evaluar la efectividad de la administración de la hormona, pero se repiten en esta sección para analizarlos en conjunto con los demás moduladores negativos en estudio.

### 3.3.1. Tratamiento intermitente

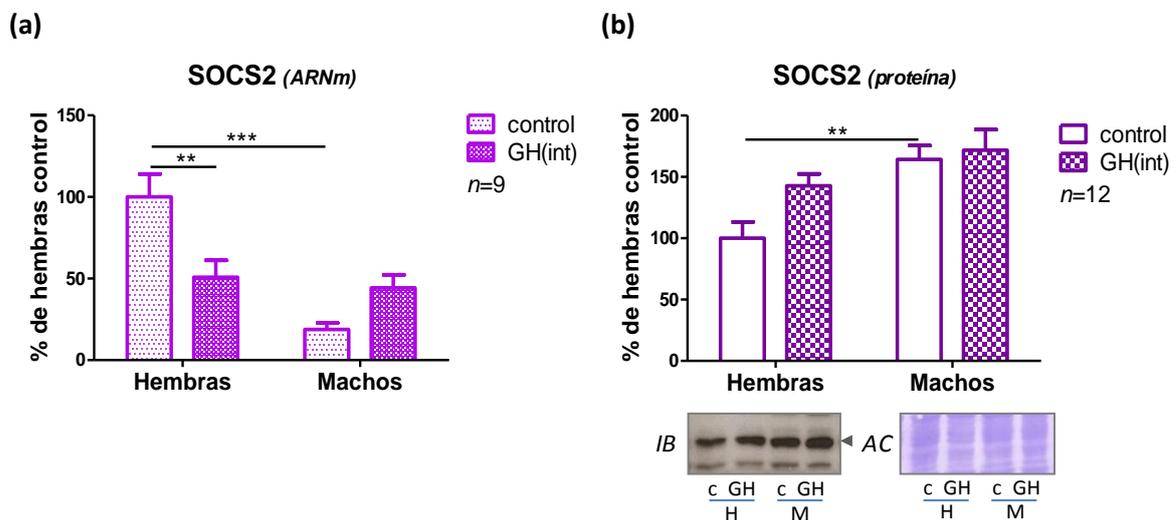
Los ratones tratados con GH de forma intermitente presentan menores niveles de ARNm de CIS que los animales control y, al igual que estos, no exhiben diferencias por sexo (Fig. 46a). En los machos tratados con GH, los menores niveles de ARNm dan lugar a un menor contenido proteico de CIS en comparación con los animales no tratados (Fig. 46b). En las hembras, en cambio, solo se observa una leve disminución no significativa de la abundancia de esta proteína asociada al tratamiento intermitente. Dado que la expresión de CIS se induce vía STAT5b, el perfil de ARNm obtenido podría reflejar la sincronización de los ciclos de activación de esta vía ante un tratamiento intermitente con GH, tanto en hembras como en machos. Transcurridas 6 horas de la última inyección de hormona, la fosforilación de STAT5b ya ha disminuido y lo mismo ocurre con la expresión de CIS.



**Figura 46 - Expresión de CIS (tratamiento intermitente)** - Extractos de ARN total y solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por RT-qPCR (a) e *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos

específicos (b). Los solubilizados hepáticos fueron sometidos a una inmunoprecipitación (IP) para enriquecer la muestra en el contenido proteico de CIS antes del *immunoblotting*. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

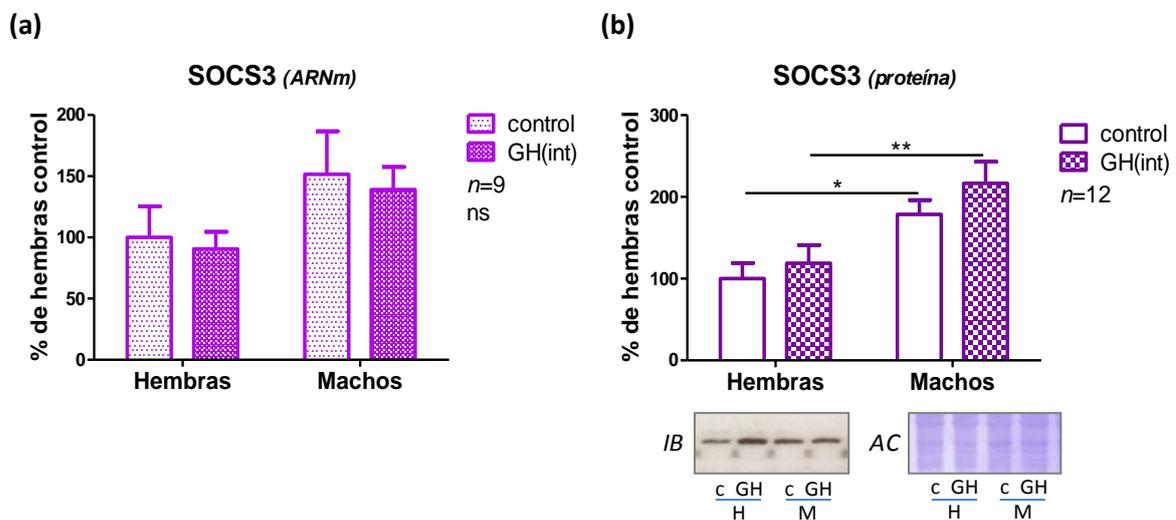
En cuanto a SOCS2 se observa, en primer lugar, una marcada diferencia entre los controles, con mayores niveles de ARNm en las hembras que en los machos (Fig. 47a) y una relación inversa en su contenido proteico (Fig. 47b). Cuando se administra GH de forma intermitente, la expresión de ARNm y de proteína de SOCS2 en ratones hembra y macho se equipara. El tratamiento induce una disminución de los niveles de ARNm de SOCS2 en las hembras y un aumento en los machos en comparación con los controles. Si bien este aumento no es estadísticamente significativo según el test de ANOVA, si se analizan de forma independiente los resultados correspondientes a los machos, se alcanza significación estadística ( $p < 0,05$  por el test  $t$  de Student). Por otro lado, el tratamiento con GH promueve un leve aumento en abundancia proteica de SOCS2 de las hembras tratadas ( $p < 0,05$  si se analiza de forma independiente por el test  $t$  de Student) hasta niveles similares a los de los machos, control y tratados.



**Figura 47 – Expresión de SOCS2 (tratamiento intermitente)** – Extractos de ARN total y solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por RT-qPCR (a) e *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos específicos (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican

diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

En cuanto a SOCS3, se observa que su expresión es mayor en los machos que en las hembras, aunque solo se observan diferencias significativas a nivel del contenido proteico. A diferencia de CIS y SOCS2, no se detectaron diferencias significativas asociadas al tratamiento intermitente con GH en los niveles de ARNm de SOCS3, ni en machos ni en hembras (Fig. 48). Estos resultados, obtenidos 6 horas después de la última inyección, son coherentes con la activación rápida y transitoria de la expresión del supresor ante un estímulo con la hormona y se reflejan en su contenido proteico.



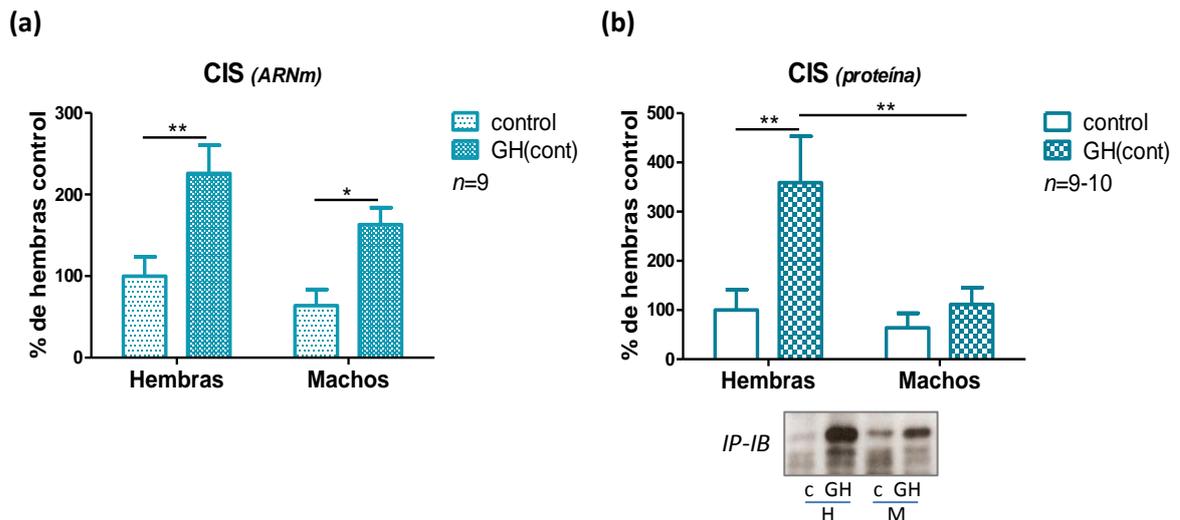
**Figura 48 – Expresión de SOCS3 (tratamiento intermitente)** – Extractos de ARN total y solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por RT-qPCR (a) e *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos específicos (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de expresión de CIS y SOCS2 confirman la sincronización de los ciclos de encendido y apagado de la vía JAK2/STAT5 en los ratones tratados con GH de forma intermitente. Tanto hembras como machos expuestos al tratamiento presentan niveles de ARNm de CIS y SOCS2 similares y que reflejan el estado de activación que se esperaría de esta vía transcurridas 6 horas del último estímulo. Estos ciclos de desensibilización y

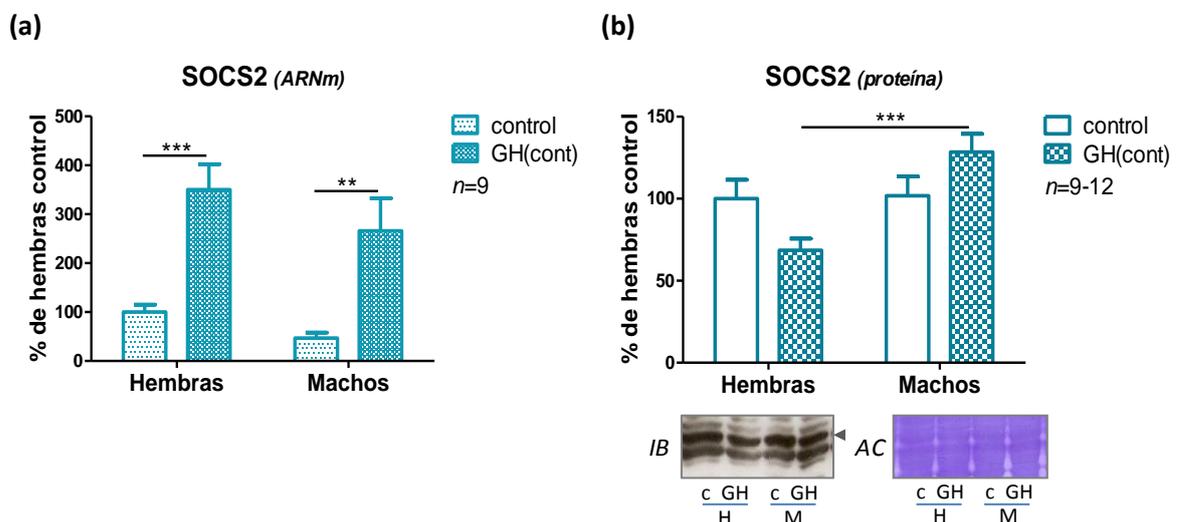
resensibilización de STAT5 que se desencadenan ante una inyección de GH se asemejan a lo que ocurre ante cada pulso de hormona en los machos en condiciones fisiológicas, pero difieren sustancialmente del perfil de activación normal de las hembras, en las que la fosforilación basal de STAT5 se mantiene relativamente constante y por debajo de los niveles promedio de los machos (Choi y col., 1999, Waxman y col., 2006). La masculinización de la activación de esta vía que se produce ante un tratamiento intermitente con GH en las hembras se evidencia en los niveles de ARNm de CIS y SOCS2, que se equiparan con los de los machos. Sin embargo, mientras que los niveles proteicos de SOCS2 de las hembras aumentan con el tratamiento hasta asemejarse a los de los machos, el contenido de CIS de las hembras tratadas es mayor que el de los machos a pesar de los niveles similares de ARNm entre sexos. Es decir que, mientras que en los machos el contenido proteico de CIS refleja el contenido de ARNm, en las hembras esto no ocurre. Una posible explicación a este fenómeno es que CIS se esté acumulando en las hembras sometidas al tratamiento intermitente, denotando el costo molecular de mantener una respuesta relativamente conservada de la activación de STAT5 ante una inyección de GH en un contexto que difiere del fisiológico.

### **3.3.2. Tratamiento continuo**

En los ratones expuestos a una administración sostenida de GH se registran cambios más profundos en la expresión de los supresores de la señal de GH que los promovidos por el tratamiento intermitente. Los niveles de ARNm de CIS y SOCS2 aumentan entre dos y tres veces en comparación con los animales control, tanto en hembras como en machos (**Fig. 49a y 50a**). Considerando que ante un estímulo agudo de GH la expresión de ambos genes presenta una fase de aumento sostenido, la administración continua de la hormona mantiene la expresión de CIS y SOCS2 elevada en comparación con los controles.



**Figura 49 – Expresión de CIS (tratamiento continuo)** – Extractos de ARN total y solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por RT-qPCR (a) e *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos específicos (b). Los solubilizados hepáticos fueron sometidos a una inmunoprecipitación (IP) para enriquecer la muestra en el contenido proteico de CIS antes del *immunoblotting*. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones indicadas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01).

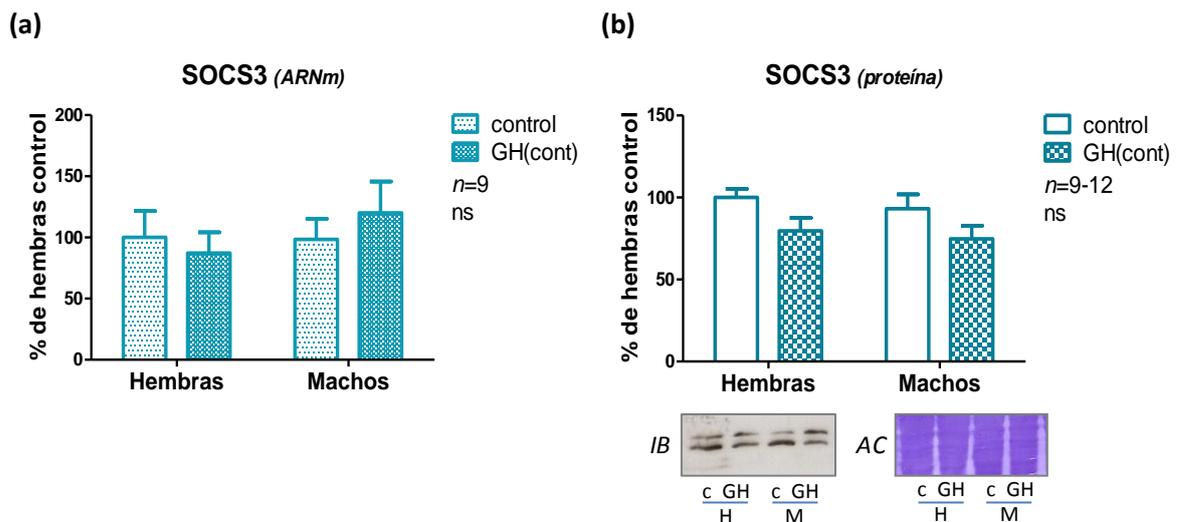


**Figura 50 – Expresión de SOCS2 (tratamiento continuo)** – Extractos de ARN total y solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por RT-qPCR (a) e *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos específicos (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones indicadas según el test de ANOVA de dos

vías seguido del test de Bonferroni (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

Cuando se analiza el contenido proteico de CIS, los resultados difieren entre hembras y machos (Fig. 49b). Mientras que el aumento de ARNm de CIS que presentan los ratones tratados con GH se refleja en una mayor abundancia de esta proteína en las hembras, en los machos no se detectan diferencias significativas asociadas al tratamiento. En cuanto al contenido proteico de SOCS2, las hembras tratadas con GH exhiben niveles ligeramente menores que los animales control y no se detectan diferencias significativas en los machos, a pesar de que ambos sexos presentan mayores niveles de ARNm de SOCS2 luego del tratamiento con GH (Fig. 50).

Ante una administración continua de GH tampoco se observan variaciones asociadas al tratamiento en los niveles de ARNm y en el contenido proteico de SOCS3 (Fig. 51).



**Figura 51 – Expresión de SOCS3 (tratamiento continuo)** – Extractos de ARN total y solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por RT-qPCR (a) e *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos específicos (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. ns: no significativo según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

Los resultados de contenido de ARNm y proteína de los supresores de la señal de GH en los ratones tratados de forma continua se asemejan en cierta forma a lo que se ha descrito previamente en ratones GH-transgénicos

(González y col., 2002, Miquet y col., 2004, Martínez y col., 2015). En dichos ratones, donde los niveles de hormona también exhiben un perfil continuo, la expresión génica de CIS, SOCS2 y SOCS3 aumenta sustancialmente en comparación con sus hermanos de camada normales. Los mayores niveles de ARNm de CIS se asocian a una mayor abundancia de esta proteína en los ratones transgénicos, que impediría la fosforilación de STAT5 al bloquear su unión a GHR. Por el contrario, los niveles proteicos de SOCS2 y SOCS3 en los ratones que sobreexpresan GH son menores que en los normales, a pesar de los mayores niveles de ARNm. Estas diferencias podrían explicarse considerando uno de los mecanismos de acción de las SOCS, las cuales pueden unirse a GHR e inducir su internalización y degradación por proteosoma. Se ha postulado que, en los ratones GH-transgénicos, SOCS2 y SOCS3 limitarían la acción de la GH preferentemente por este mecanismo, consumiéndose activamente en el proceso (Miquet y col., 2004, Martínez y col., 2015). En los ratones tratados de forma continua, SOCS2 actuaría de forma similar, ya que no se percibe un aumento del contenido proteico a pesar de los mayores niveles de ARNm. En cuanto a CIS, se observa un comportamiento semejante al de los ratones transgénicos solo en las hembras, en las que el tratamiento con GH da lugar a un aumento tanto del ARNm como de la proteína en comparación con los controles. Por el contrario, en los machos tratados con GH, el aumento del ARNm de CIS no se traduce en una mayor abundancia proteica, lo que podría indicar que en estas condiciones CIS actúa preferentemente como promotor de la degradación de GHR en lugar de como inhibidor competitivo de STAT5. Finalmente, el efecto de niveles continuamente elevados de GH sobre la expresión de SOCS3 dependería de la concentración de hormona en circulación, ya que ante una dosis farmacológica de GH no se inducen cambios en su expresión, ni en hembras ni en machos, como los que tienen lugar en los ratones GH-transgénicos.

En consecuencia, ambos modelos muestran, frente a un exceso sostenido de GH, una respuesta de CIS y SOCS2 en el mismo sentido pero en una magnitud que dependería de los niveles de hormona. En los ratones tratados con GH, la respuesta de los mecanismos de regulación negativa sería suficiente para limitar la activación de la mayoría de las vías de señalización de la hormona, con la excepción de STAT3. En los ratones GH-transgénicos, a pesar de que la acción de los supresores de la señal de GH parecería ser máxima, no sería suficiente y en consecuencia se observa una desregulación de las vías

de señalización de la hormona (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2015, Martínez y col., 2016).

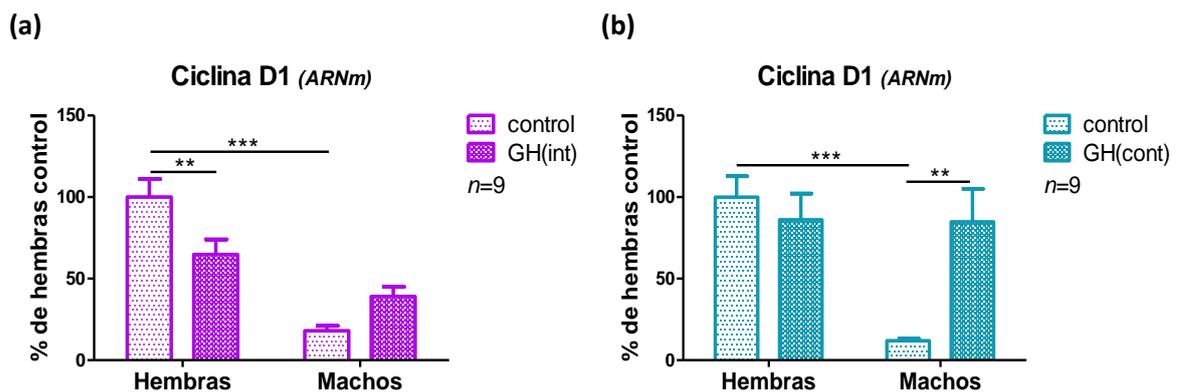
### **3.3.3. Análisis general de la expresión de moduladores negativos de la señalización de GHR**

El tratamiento con GH, ya sea administrado de forma intermitente o continua, induce cambios en la expresión de proteínas involucradas en la regulación negativa de la señalización de GH, principalmente CIS y SOCS2. En los animales sometidos al tratamiento intermitente, los efectos son más marcados en las hembras, en las que el tratamiento modifica sustancialmente el perfil fisiológico de concentración plasmática de GH y produce una respuesta cíclica de STAT5 similar a la de los machos. En los ratones tratados con GH de forma continua, por el contrario, los cambios que se generan en la expresión de CIS y SOCS2 no solo son más profundos que los que promueve el tratamiento intermitente, sino que también tienen lugar tanto en hembras como en machos. El aumento en la expresión de moduladores negativos restringiría la respuesta a niveles continuamente elevados de GH, como ocurre en los ratones transgénicos. Si bien en los ratones tratados con la hormona estos mecanismos lograrían contener la activación de la mayoría de las vías de señalización de GHR, podrían ser los responsables de que el tratamiento continuo no sea suficiente para promover el crecimiento corporal.

### **3.4. Expresión de protooncogenes**

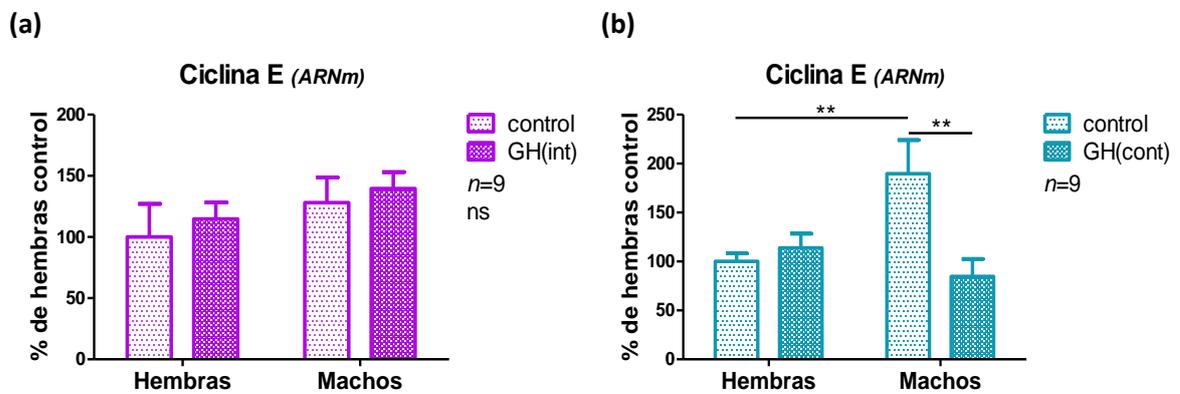
Finalmente, se evaluó la expresión de genes tempranos involucrados en la promoción del ciclo celular que se activan por diferentes vías de señalización, incluidas las vías de los STATs, PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2. En los ratones transgénicos que sobreexpresan GH, las lesiones hepáticas preneoplásicas que presentan han sido asociadas a la hiperactivación de estas vías y, en consecuencia, a una mayor expresión de las ciclinas D1 y E y los factores de transcripción c-Myc, c-Jun y c-Fos (Miquet y col., 2013). Si bien en los ratones tratados con GH no se detectaron cambios que indicasen una mayor activación de estas vías, con la excepción de STAT3 ante un tratamiento continuo con GH, cambios sutiles en su activación podrían efectivamente redundar en una mayor expresión de estos protooncogenes que acompañen los efectos observados a nivel del parénquima hepático.

Los resultados correspondientes a ciclina D1 muestran una marcada diferencia en su expresión entre hembras y machos, con niveles de ARNm en los machos control de entre un 10 % y un 20 % de los valores correspondientes a las hembras (Fig. 52). Estos resultados coinciden con los obtenidos en trabajos previos del laboratorio realizados en los ratones GH-transgénicos, donde se observa que sus hermanos de camada normales también exhiben estas diferencias en la expresión de ciclina D1 entre hembras y machos (Miquet y col., 2013). Cuando se analizan los resultados obtenidos en los animales tratados con GH, se observa que el efecto de la administración de hormona difiere entre hembras y machos. En las hembras, el tratamiento intermitente promueve una disminución de los niveles de ARNm de ciclina D1 en comparación con los controles, mientras que el tratamiento continuo no tiene efectos significativos. En los machos, por el contrario, la administración sostenida de GH induce un aumento en los niveles de ARNm de esta ciclina hasta valores similares a los de las hembras. El tratamiento intermitente, genera un efecto en el mismo sentido pero de menor magnitud ( $p < 0,01$  si se analiza de forma independiente por el test  $t$  de Student). Los resultados obtenidos en los ratones tratados con GH de forma continua coinciden con los reportados en los ratones GH-transgénicos (Miquet y col., 2013, González y col., 2017). El exceso sostenido de hormona en estos animales no se asocia a cambios en la expresión de ciclina D1 en las hembras, pero aumenta su expresión en los machos hasta niveles similares a los de las hembras.



**Figura 52 – Expresión de ciclina D1** – Se determinaron los niveles de ARNm de ciclina D1 por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

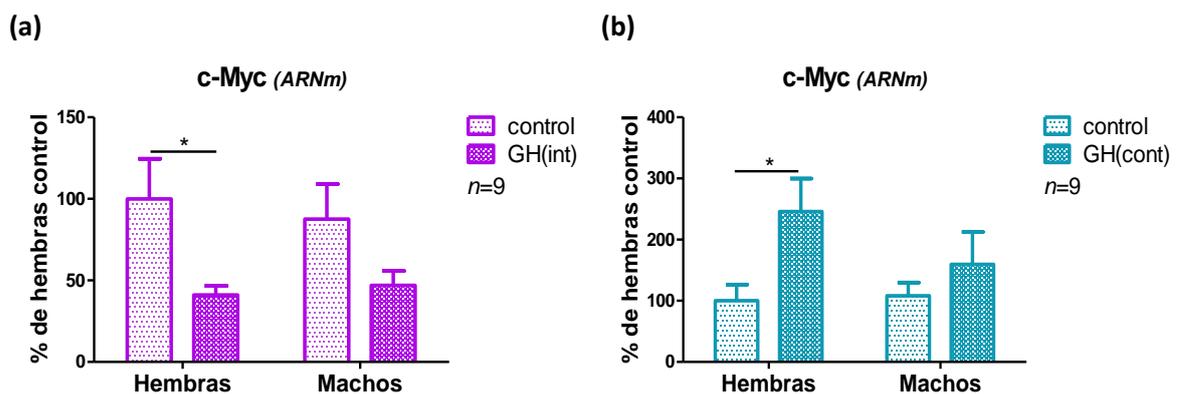
Por otro lado, no se detectaron diferencias en los niveles de ARNm de ciclina E asociadas al tratamiento intermitente con GH (**Fig. 53a**), mientras que el tratamiento continuo induce una disminución de sus niveles únicamente en machos (**Fig. 53b**). En los ratones transgénicos, en cambio, el exceso sostenido de GH en los adultos se asocia a un aumento de esta ciclina (Miquet y col., 2013, González y col., 2017). Si se comparan los resultados obtenidos para los ratones hembra y macho no tratados, se observan diferencias significativas en los controles del tratamiento continuo, con mayores niveles de ciclina E en los machos que en las hembras. Si bien en los controles del tratamiento intermitente se observa una tendencia similar, las diferencias no son estadísticamente significativas.



**Figura 53 – Expresión de ciclina E** – Se determinaron los niveles de ARNm de ciclina E por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*\* $p < 0,01$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

Además de las ciclinas mencionadas, se evaluaron otros protooncogenes: los factores de transcripción c-Myc, c-Jun y c-Fos. En lo que respecta a c-Myc, se observa que, en las hembras, los niveles de ARNm se ven marcadamente afectados por el tratamiento con GH (**Fig. 54**). Mientras que el tratamiento intermitente induce una disminución de los niveles de ARNm en comparación con los animales no tratados, el tratamiento continuo genera el efecto contrario. En los machos se observan cambios asociados al tratamiento en el mismo sentido que en las hembras, pero más sutiles y no significativos. Trabajos realizados por otros autores en ratas hipofisectomizadas mostraron que la expresión de c-Myc aumenta de forma transitoria luego de un estímulo

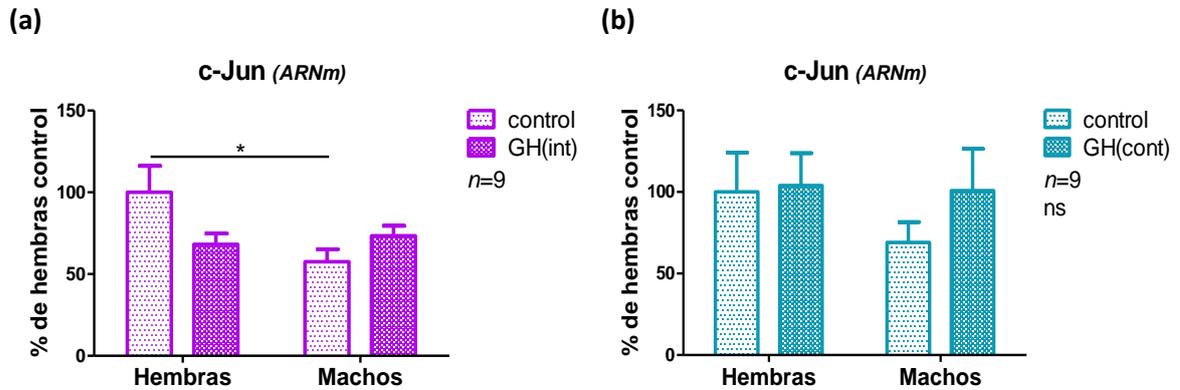
con GH (Murphy y col., 1987). Si bien se ha demostrado que la principal vía implicada en la inducción de c-Myc por GH sería la vía PI3K/Akt, otros factores, como diversas interleuquinas o la leptina, que también inducen la expresión de este gen en distintos tejidos, lo hacen a través de la vía JAK2/STATs (Wierstra y col., 2008, Lee y col., 2009). El perfil de expresión de c-Myc ante una administración intermitente de GH, sumado a la cinética de activación en hígado descrita por Murphy y colaboradores, respaldaría una posible participación de STAT5 en la inducción de c-Myc por GH. La disminución de su ARNm registrada en los ratones tratados con GH de forma intermitente en comparación con los controles se asemeja a los resultados descritos de activación de STAT5 y de expresión de su gen blanco, CIS, por lo que también reflejaría la sincronización de la respuesta de esta vía. Asimismo, tanto c-Myc como CIS responden de igual manera ante la administración continua de hormona.



**Figura 54 - Expresión de c-Myc** - Se determinaron los niveles de ARNm de c-Myc por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ).

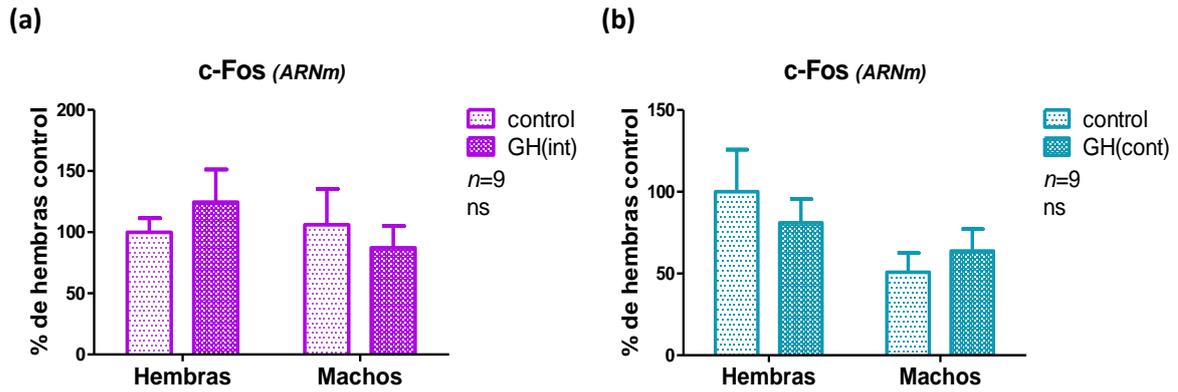
En cuanto a c-Jun, los niveles de expresión en condiciones fisiológicas son mayores en las hembras que en los machos, aunque solo en el grupo de controles del tratamiento intermitente se detectaron diferencias significativas (Fig. 55). Cuando se analiza el efecto del tratamiento intermitente, se observa una ligera disminución de la expresión de c-Jun en las hembras tratadas con GH hasta niveles similares a los de los machos. Como se discutió previamente en referencia a la activación de c-Myc, los cambios observados también

estarían reflejando la sincronización de la señalización de GH en las hembras. En los ratones tratados de forma continua, no se observan diferencias significativas asociadas al tratamiento.



**Figura 55 - Expresión de c-Jun** - Se determinaron los niveles de ARNm de c-Jun por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

A diferencia de los resultados obtenidos para c-Myc y c-Jun, no se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm de c-Fos asociados al tratamiento con GH, ya sea intermitente o continuo, o al sexo (Fig. 56). Los resultados obtenidos en los ratones tratados de forma intermitente concuerdan con reportes previos en los que se describió una activación rápida y transitoria de la expresión de c-Fos ante un estímulo con GH. En ratas hipofisectomizadas inyectadas con la hormona, los niveles de ARNm de c-Fos alcanzan su máximo luego de 30 minutos y retornan a valores basales en la primera hora después del estímulo (Gronowski y col., 1995).



**Figura 56 - Expresión de c-Fos** - Se determinaron los niveles de ARNm de c-Fos por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones hembra (H) y macho (M), control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) (a) o continua (GH(cont)) (b) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. ns: no significativo según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

En síntesis, no se detectan cambios en la expresión de los protooncogenes evaluados que puedan relacionarse directamente con las acciones del tratamiento con GH a nivel histológico. En los machos, los efectos observados en el parénquima hepático se asocian a un aumento en la expresión de ciclina D1. Sin embargo, este resulta de mayor magnitud en los ratones tratados de forma continua, los cuales exhibieron menores cambios en la arquitectura hepática que los tratados de forma intermitente. Asimismo, en las hembras sometidas a una administración intermitente con GH, que presentaron los cambios histológicos más marcados, no se observa una desregulación en la expresión de ninguno de estos protooncogenes. Por el contrario, se observa un aumento de c-Myc en las hembras tratadas de forma continua a pesar de que no se percibieron alteraciones histológicas en esta condición experimental.

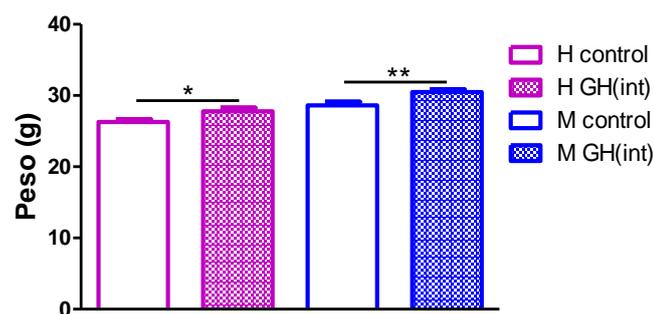
#### 4. Evaluación de los efectos del tratamiento con GH un mes después de finalizada su administración

De acuerdo con los resultados presentados en las secciones anteriores, solo el tratamiento intermitente con GH resultó ser efectivo en la promoción del crecimiento corporal. Asimismo, los animales sometidos a este tipo de administración de GH presentaron alteraciones histológicas en el hígado como hipertrofia de los hepatocitos, incremento del tamaño de sus núcleos y aumento de la proliferación celular. Con el objeto de evaluar si el efecto del

tratamiento sobre el tejido hepático se mantiene en el tiempo, se decidió estudiar un grupo de animales un mes después de haber retirado la administración de la hormona. Para ello, ratones hembra y macho fueron tratados con el mismo protocolo: GH en una dosis de 6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día, dividida en dos inyecciones diarias, entre las tres y las ocho semanas de vida. Una vez finalizado el tratamiento, se dejó transcurrir un mes y los ratones fueron sacrificados a las doce semanas de vida. En este grupo de animales se evaluó, por un lado, si la diferencia de tamaño corporal inducida por el tratamiento se mantenía en el tiempo y, por otro, si la arquitectura del parénquima hepático de los ratones que recibieron la hormona continuaba presentando diferencias con los controles. Asimismo, se analizó la evolución de los cambios detectados a nivel molecular en las vías de señalización activadas por GH al finalizar el tratamiento.

#### 4.1. Tamaño corporal

En primer lugar, se evaluó el tamaño de los ratones un mes después de finalizada la administración de la hormona. A las doce semanas de vida, los ratones tratados con GH continuaron exhibiendo un mayor peso corporal que los controles (**Fig. 57**). Sin embargo, mientras que a las ocho semanas de vida la diferencia de peso entre los animales tratados y los controles fue de aproximadamente un 15 % en promedio para hembras y machos, a las doce semanas este porcentaje disminuyó a menos de la mitad (6 %).



**Figura 57 - Crecimiento corporal** – Peso de ratones hembra (H) y macho (M) de doce semanas de vida, control y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas. Se representa la media  $\pm$  ESM de entre 10 y 17 individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Asimismo, la longitud de los huesos de las patas traseras a las doce semanas de vida tiende a ser mayor en los animales tratados en comparación con sus respectivos controles, pero solo se detectan diferencias significativas en la longitud de las tibias de los ratones macho (**Tabla 11**).

**Tabla 11** - Longitud (mm) de los huesos de las patas traseras de ratones hembra (H) y macho (M) de doce semanas de vida, control y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas. Se representa la media ± ESM de entre 11 y 17 individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones tratados y su control correspondiente según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*\* $p < 0,01$ ).

	Longitud de huesos (mm)			
	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)
<b>Fémur</b>	14,28 ± 0,14	14,58 ± 0,32	14,32 ± 0,29	14,52 ± 0,45
<b>Tibia</b>	18,27 ± 0,38	18,32 ± 0,38	17,95 ± 0,39	18,19 ± 1,03**

#### 4.2. Peso de órganos blanco de la acción de la GH

Como se mostró con anterioridad, el tratamiento intermitente se asoció con un aumento significativo del peso del hígado, el corazón y los riñones a las ocho semanas de vida, cuando termina el tratamiento con GH. Cuando se evaluó la relación entre el peso del hígado y el peso corporal en esos animales, se observó un ligero aumento, no significativo, en ambos sexos, mientras que para las relaciones correspondientes al corazón o los riñones se apreció lo mismo solo en los machos. Para evaluar si los efectos sobre el hígado detectados al momento de finalizar el tratamiento se mantienen en el tiempo o si, por el contrario, son transitorios y revierten al suspender el mismo, se evaluó el peso del hígado y su relación con el peso corporal a las doce semanas de vida. Estos resultados se presentan en la **Tabla 12**, junto con las determinaciones correspondientes al corazón y los riñones. De forma similar a lo que se observó a las ocho semanas, a las doce semanas de vida el peso del hígado, el corazón y los riñones es mayor en los ratones tratados que en los controles. Cuando se analizan las relaciones entre estos valores y el peso corporal, tampoco se observan diferencias significativas. Sin embargo, la tendencia observada en los valores correspondientes al hígado al finalizar el tratamiento se mantiene un mes después de suspendida la administración de la hormona.

**Tabla 12** - Peso de órganos blanco de la hormona de crecimiento (a) y su relación con el peso corporal (b) de ratones hembra (H) y macho (M) de doce semanas de vida, control y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas. Se representa la media ± ESM de entre 11 y 17 individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre ratones tratados y su control correspondiente según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

(a)

	Peso de órganos (g)			
	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)
Hígado	0,989 ± 0,076	1,231 ± 0,088***	1,098 ± 0,134	1,280 ± 0,139**
Corazón	0,106 ± 0,010	0,123 ± 0,015**	0,112 ± 0,009	0,128 ± 0,020*
Riñón	0,245 ± 0,025	0,282 ± 0,024**	0,307 ± 0,030	0,344 ± 0,041*

(b)

	Peso de órganos / Peso corporal (%)			
	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)
Hígado	4,421 ± 0,289	4,687 ± 0,343	4,345 ± 0,491	4,587 ± 0,261
Corazón	0,477 ± 0,038	0,465 ± 0,048	0,444 ± 0,043	0,452 ± 0,045
Riñón	1,100 ± 0,091	1,072 ± 0,119	1,220 ± 0,103	1,220 ± 0,157

### 4.3. Colesterolemia

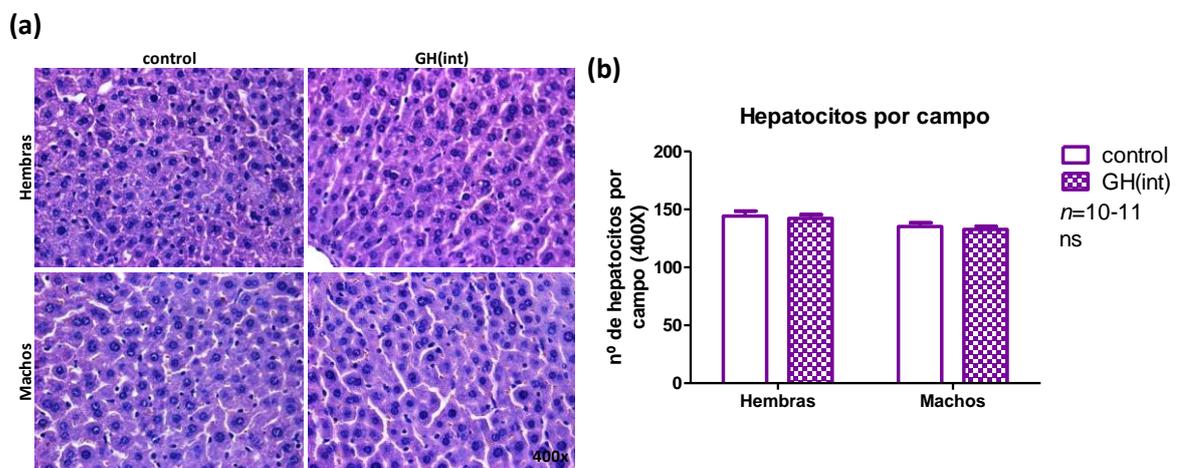
Considerando que al momento de finalizar el tratamiento con GH los ratones tratados exhibieron mayores valores de colesterol en sangre que los controles, se determinó su colesterolemia un mes después de haber cesado la administración de hormona (Tabla 13). De forma similar a lo que se observó en los animales de ocho semanas de vida, los valores obtenidos en las muestras de ratones de doce semanas tratados con GH tienden a ser superiores que los de los animales control. Sin embargo, en este experimento el número de animales evaluados es menor y las diferencias no son estadísticamente significativas.

**Tabla 13** - Determinación de colesterol en suero en ratones hembra (H) y macho (M) de doce semanas de vida, control y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma continua (GH(cont)) durante cinco semanas. Se representa la media ± ESM del número indicado ( $n$ ) de individuos por condición. No se observan diferencias significativas entre los ratones tratados y sus respectivos controles según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

	H control	H GH(int)	M control	M GH(int)	$n$
Colesterol (mg/dl)	108 ± 13	135 ± 16	107 ± 14	138 ± 11	9-10

#### 4.4. Tamaño de hepatocitos

A las ocho semanas de vida, cuando finaliza el tratamiento con GH, los animales que recibieron la hormona presentaron un aumento en el peso del hígado, asociado a hepatocitos de mayor tamaño con núcleos agrandados. Solo en las hembras se detectó, además, un mayor porcentaje de células en proliferación. En la **Figura 58** se presentan los resultados correspondientes al número de hepatocitos por campo de ratones hembra y macho de doce semanas, controles y tratados con GH. Luego de un mes de finalizado el tratamiento, no se observan diferencias significativas en el tamaño de los hepatocitos, lo que indicaría una recuperación del tejido en este aspecto.



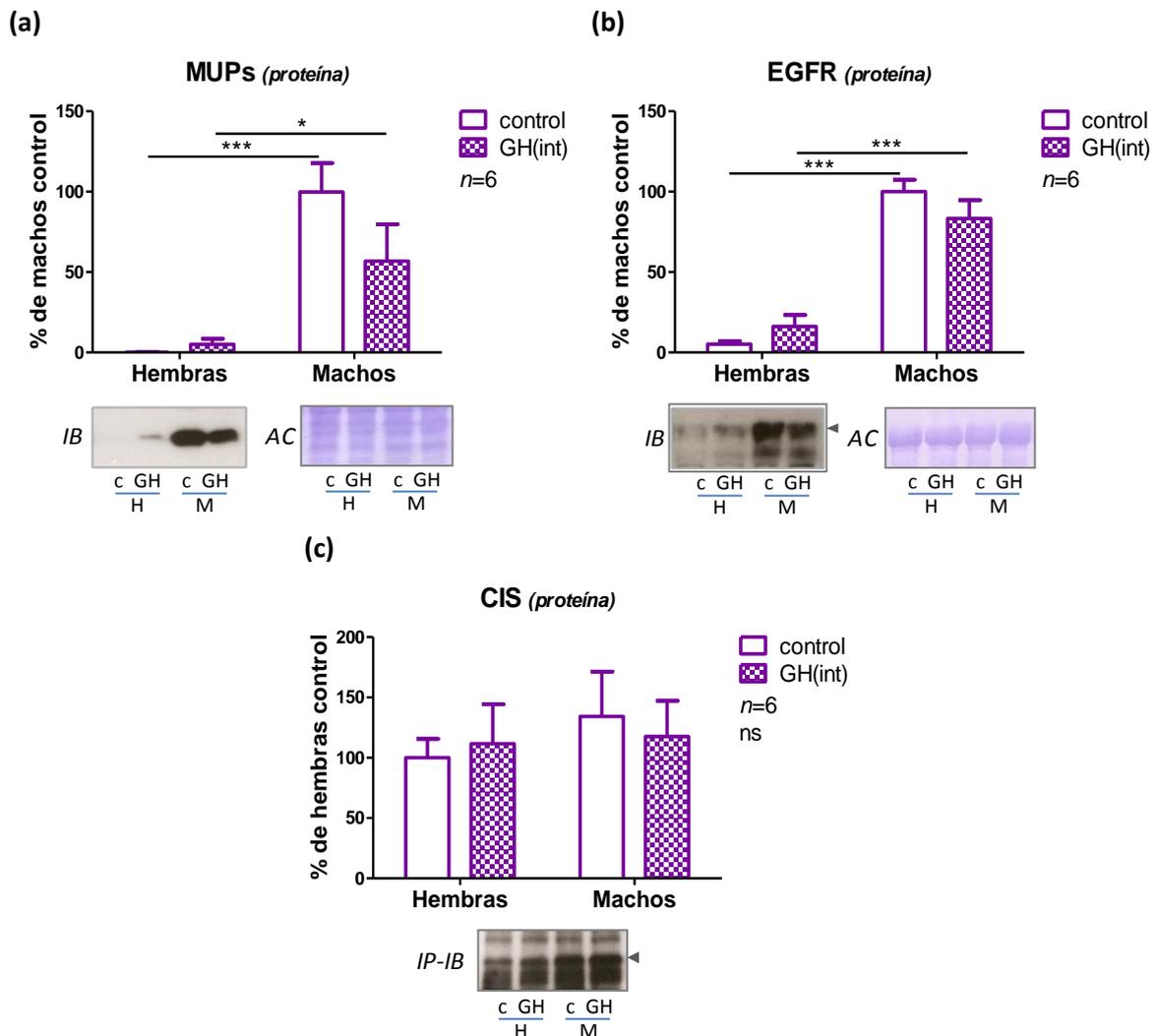
**Figura 58** – Estimación del tamaño de las células hepáticas – Se determinó el número de hepatocitos por campo en cortes de hígado de ratones hembra (H) y macho (M) de doce semanas de vida, control y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas teñidos con hematoxilina-eosina. Se muestran microfotografías representativas de cada condición (a). En los gráficos se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por grupo experimental (b). ns: no significativo según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

#### 4.5. Efectos moleculares del tratamiento con GH en hígado

##### 4.5.1. Expresión de proteínas moduladas por el perfil sanguíneo de GH

En primer lugar se evaluaron los niveles de aquellas proteínas cuya expresión se modifica de acuerdo con el perfil de GH circulante, para determinar si se restablece el perfil fisiológico normal o si la administración de la hormona durante el período de crecimiento genera algún tipo de cambio que induzca un efecto residual en este patrón y/o en la expresión de estas proteínas. Cuando se analizaron los niveles de MUPs y EGFR a las doce semanas de vida, se observa un ligero aumento en su expresión en las

hembras tratadas con GH y una leve disminución en los machos, pero estas diferencias no son significativas (Fig. 59a-b). En cuanto a CIS, no se observaron diferencias significativas entre los ratones tratados con GH y sus respectivos controles (Fig. 59c). Por consiguiente, los animales que recibieron el tratamiento hasta las ocho semanas habrían recuperado el perfil fisiológico de liberación de GH un mes después de la última administración de hormona.



**Figura 59 – Contenido proteico de MUPs, EGFR y CIS** – Se determinaron los niveles de estas proteínas en solubilizados hepáticos de ratones hembra (H) y macho (M) de doce semanas vida, control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-MUPs (a), anti-EGFR (b) o anti-CIS (c). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Para la determinación de CIS se realizó una inmunoprecipitación (IP) para enriquecer la muestra en el contenido de esta proteína. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

#### **4.5.2. Vías de señalización activadas por GH**

A continuación se presentan los resultados de abundancia y fosforilación de mediadores de la señalización de la GH en muestras provenientes de ratones de doce semanas de vida. Para facilitar la comparación y análisis de los resultados, estos gráficos se acompañan de los ya presentados correspondientes a ratones de ocho semanas de vida.

##### **4.5.2.1. Activación de STAT5**

Cuando se analizó la activación de STAT5 al final del tratamiento intermitente con GH, se observó una tendencia hacia menores niveles de STAT5 fosforilado en los ratones macho tratados, con una menor dispersión entre individuos que en los controles. Como se discutió previamente, esto podría interpretarse como una sincronización de los ciclos de fosforilación/desfosforilación de esta proteína ante las inyecciones con GH (**Fig. 60a**). De acuerdo a los resultados obtenidos de los genes activados vía STAT5, CIS y SOCS2, un efecto similar tendría lugar en las hembras tratadas con la hormona. Por el contrario, a las doce semanas de vida los niveles de STAT5 fosforilado en los ratones macho tratados se asemejan a los de los controles (**Fig. 60b**). Notablemente, en las hembras de doce semanas se observan menores niveles de STAT5 fosforilado en aquellas que recibieron el tratamiento en comparación con los animales no tratados. Si bien estas diferencias no son significativas, son mucho más pronunciadas que las que se encontraron en las hembras de ocho semanas de vida. Además, cuando se comparan los resultados de STAT5 fosforilado en hembras y machos control se percibe un cambio en la relación entre sexos entre las ocho y las doce semanas de vida. A las doce semanas, la fosforilación de STAT5 es mayor en las hembras que en los machos, mientras que a las ocho semanas la tendencia es opuesta.

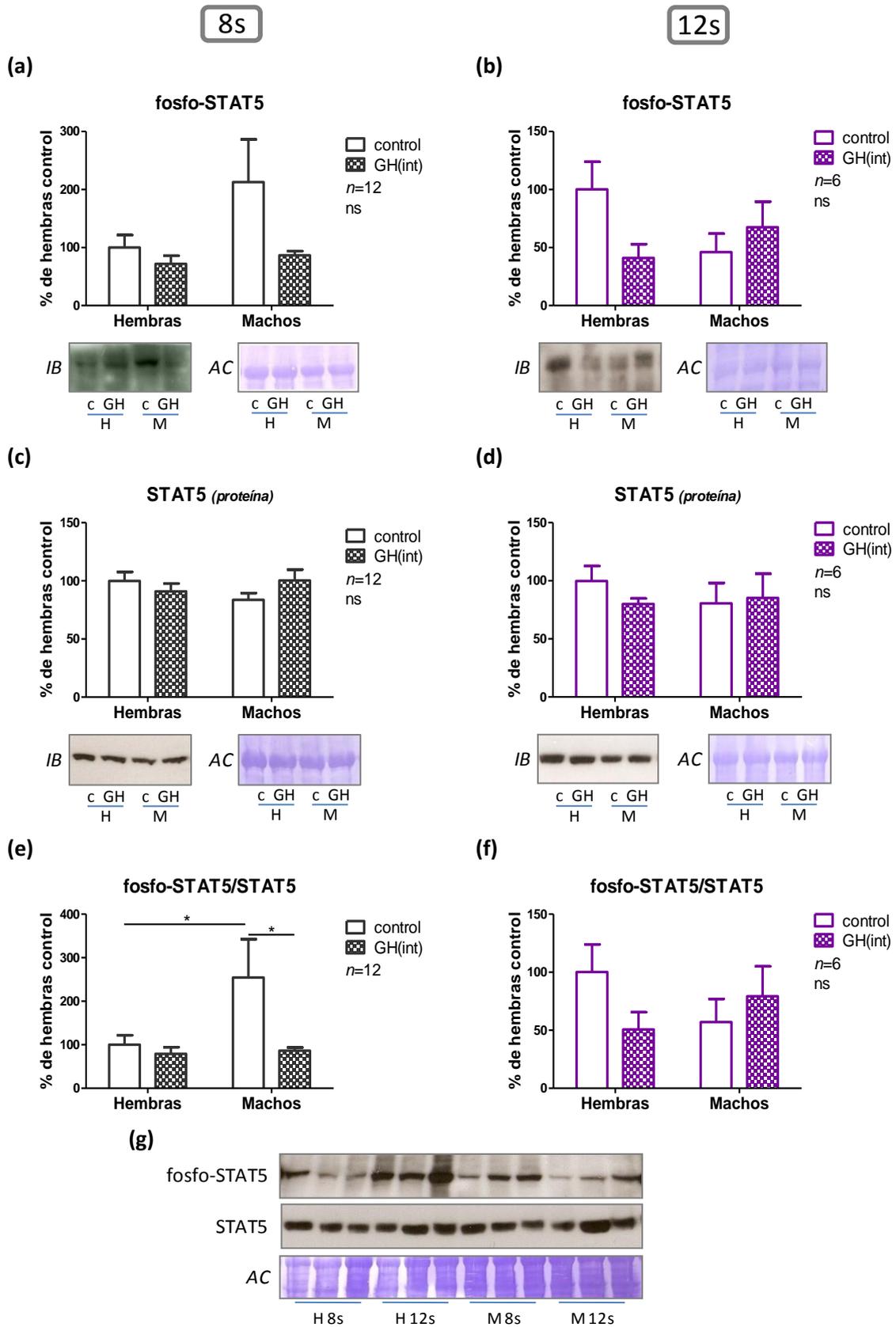


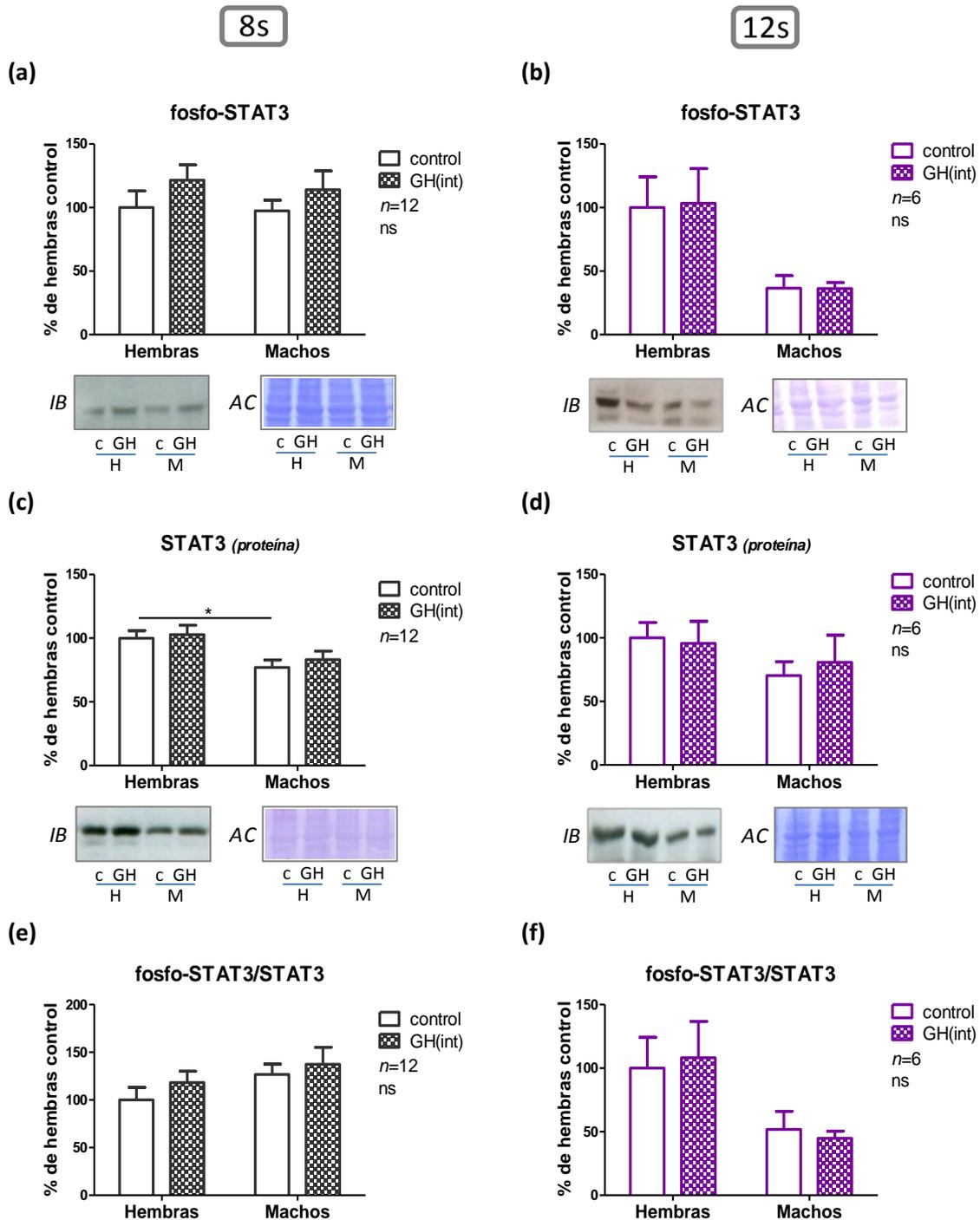
Figura 60 - Activación y contenido proteico de STAT5 - Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho (8s) y doce semanas (12s) de vida, control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos

anti-fosfo-STAT5a/b (Tyr<sup>694/699</sup>) (a,b,g) o anti-STAT5a/b (c,d,g). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los paneles (e,f) muestran la relación fosfo-STAT5/STAT5. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico. Se muestran ensayos representativos correspondientes al análisis de activación y contenido proteico de STAT5 en ratones hembra y macho control en paralelo (g).

Para corroborar las diferencias en la fosforilación de STAT5 entre ratones hembra y macho, de ocho y doce semanas de vida, se analizaron en paralelo muestras correspondientes a ratones control de esas edades (Fig. 60g). De acuerdo con los resultados obtenidos, en las hembras la fosforilación basal de STAT5 aumenta entre las ocho y las doce semanas de vida, mientras que en los machos disminuye, sin que se perciban variaciones significativas en su contenido proteico en función de la edad (Fig. 60c-d y g). Este cambio, que se da en condiciones fisiológicas en este período y que no se observa en aquellos animales que recibieron el tratamiento con GH, justifica que a las doce semanas la fosforilación de STAT5 tienda a ser menor en las hembras tratadas que en las hembras control.

#### 4.5.2.2. Activación de STAT3

La fosforilación y el contenido proteico de STAT3 se analizaron en los ratones de doce semanas de vida. En primer lugar se observa que, a diferencia de los ratones de ocho semanas que no mostraban diferencias significativas, las hembras de doce semanas de vida, tratadas y control, presentan mayores niveles de STAT3 fosforilado que los machos ( $p < 0,05$  por el test  $t$  de Student) (Fig. 61a-b). Por consiguiente, la activación basal de STAT3 debe modificarse en función de la edad de forma diferente en hembras y machos y este fenómeno no se ve afectado por el tratamiento previo con la hormona. Por ende, ratones tratados y control presentan niveles similares de fosforilación de STAT3 a las doce semanas.



**Figura 61 - Activación y contenido proteico de STAT3** - Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho (8s) y doce semanas (12s) de vida, control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) (a,b) o anti-STAT3 (c,d). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los paneles (e,f) muestran la relación fosfo-STAT3/STAT3. Se representa la media  $\pm$  ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

En cuanto al contenido proteico de STAT3, los resultados son similares a lo observado a las ocho semanas de vida, con una tendencia hacia mayores niveles de STAT3 en las hembras que en los machos de doce semanas (**Fig. 61c-d**). A las doce semanas de vida, la proporción de proteína fosforilada refleja los niveles de fosforilación de STAT3 ya que no se observan diferencias asociadas al tratamiento y la magnitud de la diferencia entre sexos es menor para STAT3 que para la proteína fosforilada y por ende no afecta sustancialmente la relación (**Fig. 61f**).

#### 4.5.2.3. Activación de Akt y sus sustratos GSK3 $\beta$ y mTOR

Para evaluar la activación de la vía de la PI3K/Akt un mes después de suspendida la administración de GH se analizó, en primer lugar, la fosforilación y contenido proteico de Akt. Cuando se comparan los resultados obtenidos de Akt fosforilado para hembras y machos control a las doce semanas de vida, se observa una relación opuesta a la obtenida a las ocho semanas, aunque en ninguno de los casos las diferencias son estadísticamente significativas (**Fig. 62a-b**). Para corroborar estos cambios, se procesaron en paralelo muestras correspondientes a animales hembra y macho control de ocho y doce semanas de vida. En la **Figura 62g** se muestra un ensayo representativo donde se comprueba que las hembras de doce semanas exhiben en promedio una mayor fosforilación de Akt que las de ocho semanas de vida, de manera similar a lo previamente descrito para STAT5 fosforilado. Por el contrario, en los machos, la fosforilación de Akt disminuye entre las ocho y las doce semanas de vida. En este caso, los ratones tratados con GH alcanzan niveles similares de Akt fosforilado a las doce semanas de vida y, en consecuencia, no se detectan diferencias significativas asociadas al tratamiento en esta edad (**Fig. 62a-b**). Finalmente, el contenido proteico de Akt es similar entre los ratones que recibieron hormona y sus respectivos controles, tanto a las ocho como a las doce semanas de vida (**Fig. 62c-d**) y, en consecuencia, la relación entre los niveles de Akt fosforilado y el contenido total de esta proteína presenta un perfil similar al de Akt fosforilado (**Fig. 62e-f**).

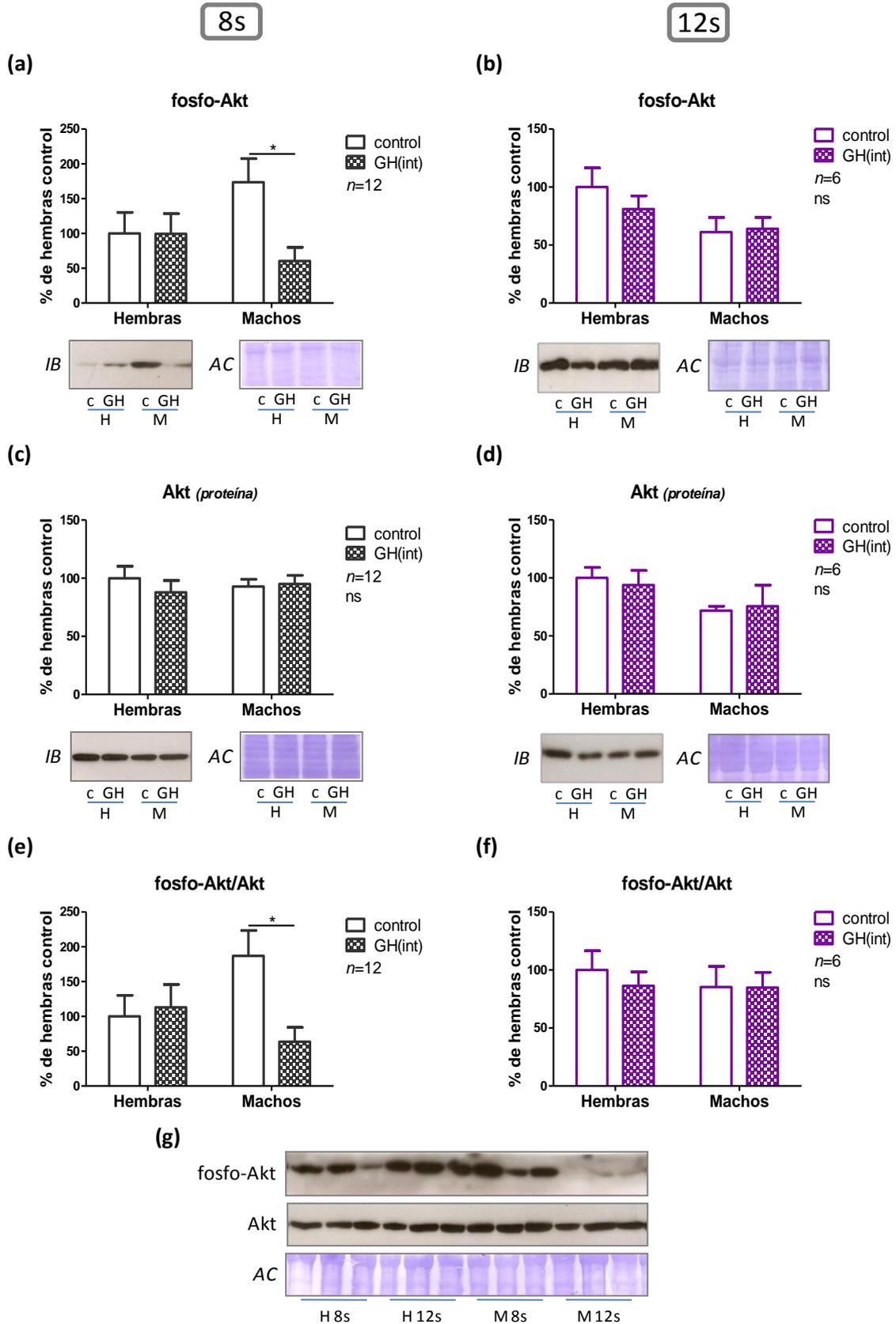
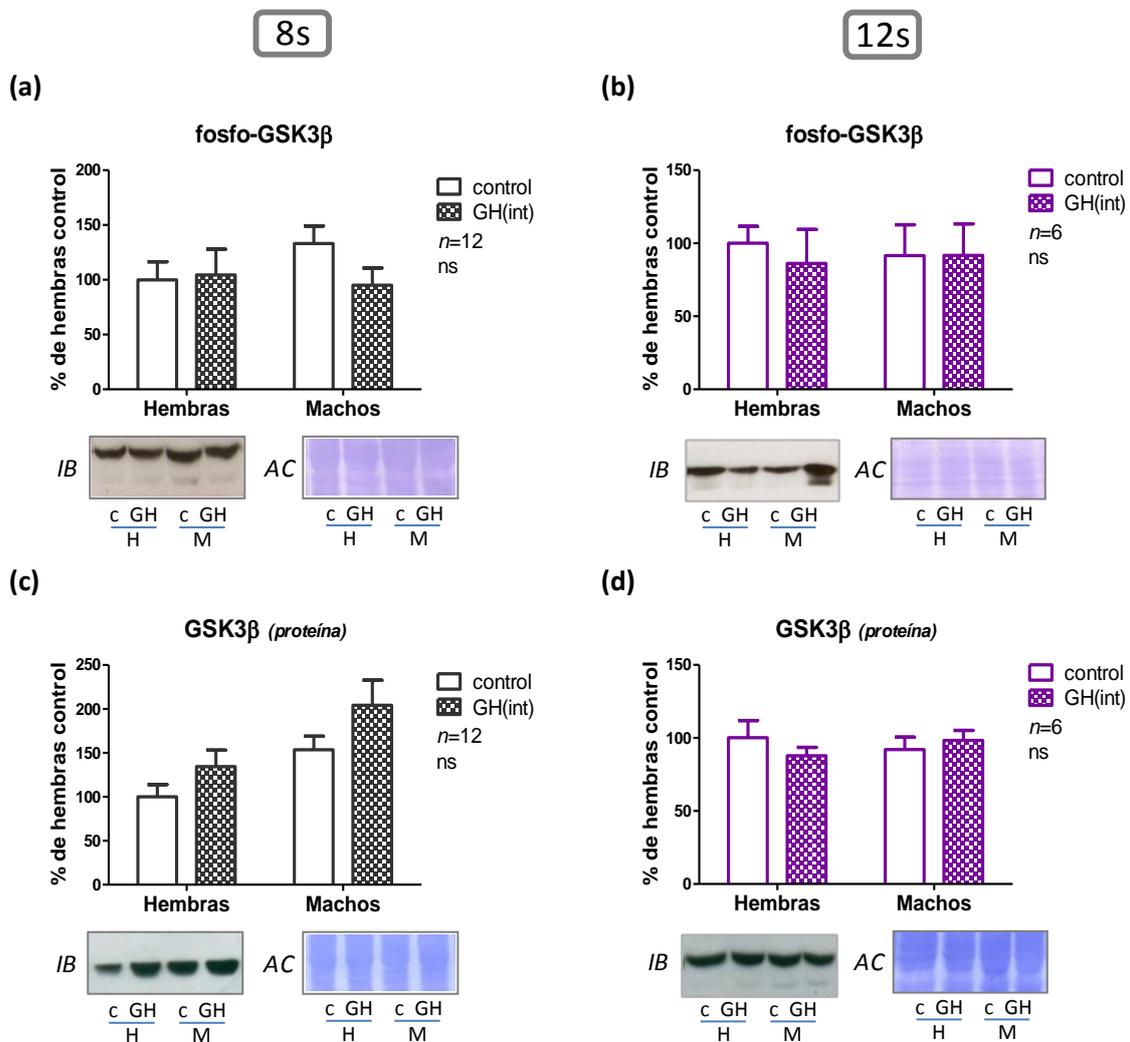


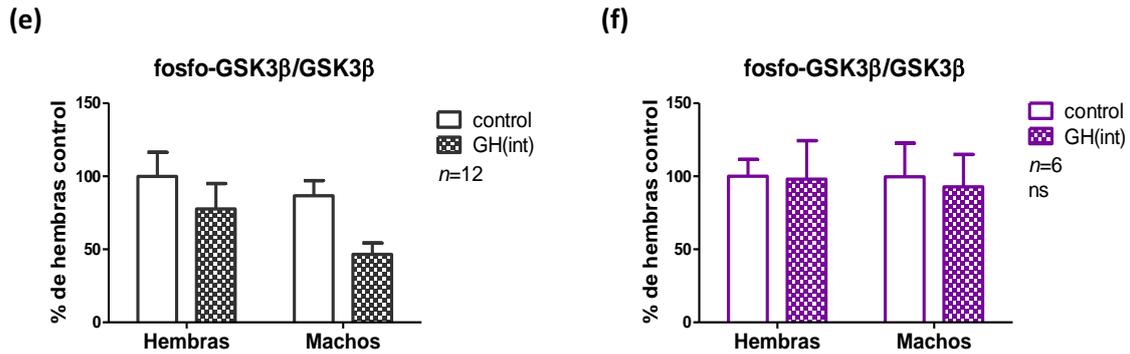
Figura 62 - Activación y contenido proteico de Akt - Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho (8s) y doce semanas (12s) de vida, control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos

anti-fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>) (a,b,g) o anti-Akt (c,d,g). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los paneles (e,f) muestran la relación fosfo-Akt/Akt. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico. Se muestran ensayos representativos correspondientes al análisis de activación y contenido proteico de Akt en ratones hembra y macho control en paralelo (g).

Del mismo modo que a las ocho semanas de vida, la fosforilación y contenido proteico de GSK3 $\beta$ , uno de los sustratos de Akt, no presentan diferencias significativas entre los ratones tratados y sus respectivos controles (Fig. 63).



(La imagen continúa en la página siguiente).



**Figura 63 - Activación y contenido proteico de GSK3 $\beta$**  - Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho (8s) y doce semanas (12s) de vida, control (c) y tratados con GH (6  $\mu$ g/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-GSK3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) (a,b) o anti-GSK3 $\beta$  (c,d). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los paneles (e,f) muestran la relación fosfo-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ . Se representa la media  $\pm$  ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. ns: no significativo según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni.

Por último, se analizó la activación de mTOR, otro de los sustratos de la vía PI3K/Akt. En primer lugar, se observa que las hembras control presentan una mayor fosforilación de mTOR que los machos de doce semanas de vida (Fig. 64b). A las ocho semanas de vida, se observó una tendencia en el mismo sentido, pero de magnitud mucho menor (Fig. 64a). La relación entre el contenido proteico de mTOR de hembras y machos exhibe un cambio similar entre las ocho y las doce semanas de vida: a las ocho semanas tiende a ser mayor en los machos y a las doce semanas, en las hembras (Fig. 64c-d). Estos cambios que se desarrollan en función de la edad en los ratones control se corroboraron al procesar en paralelo muestras provenientes de ratones de estas edades (Fig. 64g). En las hembras, la fosforilación y el contenido proteico de mTOR aumenta entre las ocho y las doce semanas de vida, mientras que en los machos parecería disminuir.

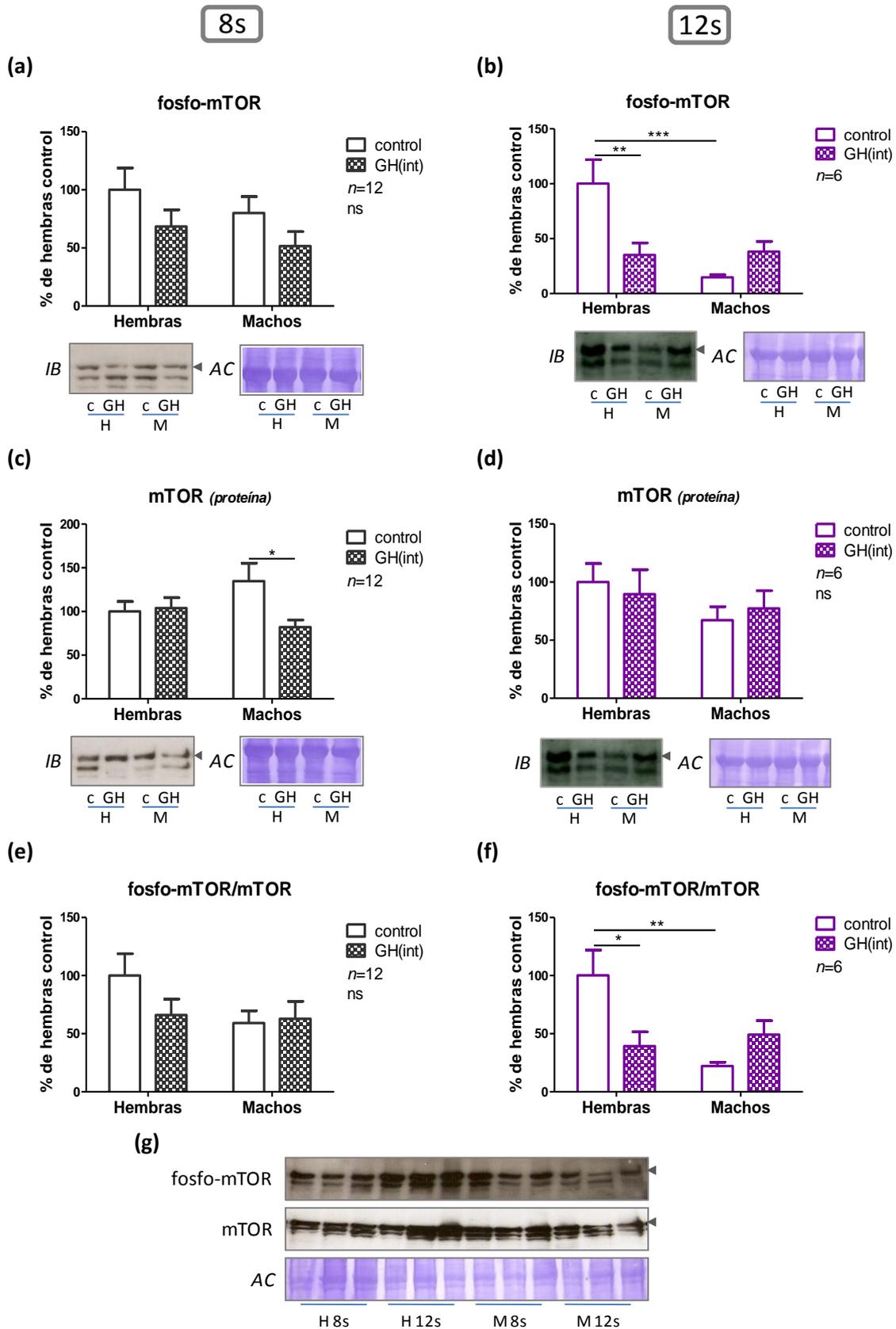


Figura 64 - Activación y contenido proteico de mTOR - Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho (8s) y doce semanas (12s) de vida, control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos

anti-fosfo-mTOR (Ser<sup>2448</sup>) **(a,b,g)** o anti-mTOR **(c,d,g)**. Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los paneles **(e,f)** muestran la relación fosfo-mTOR/mTOR. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico. Se muestran ensayos representativos correspondientes al análisis de activación y contenido proteico de mTOR en ratones hembra y macho control en paralelo **(g)**.

Los ratones tratados con GH, en cambio, no presentan diferencias por sexo en la fosforilación y abundancia de mTOR. Por consiguiente, un mes después de la última inyección de GH se detecta una menor fosforilación de mTOR en las hembras tratadas que en las hembras control y una tendencia hacia mayores niveles de mTOR fosforilado en los machos expuestos a la hormona en comparación con los no tratados **(Fig. 64b)**. Como consecuencia de la disminución de mTOR en los machos control entre las ocho y las doce semanas de vida, las diferencias que se habían detectado entre los ratones tratados y control al finalizar el tratamiento no se perciben un mes después **(Fig. 64c-d)**. En las hembras, en cambio, no se detectaron diferencias significativas en la abundancia de mTOR en ninguna de las edades evaluadas. La relación entre mTOR fosforilado y su contenido proteico total exhibe un perfil similar al de su fosforilación en hembras y machos, tanto de ocho como de doce semanas de vida **(Fig. 64e-f)**.

#### 4.5.2.4. Activación de ERK1/2

Por último, se evaluaron a las doce semanas de vida los niveles de ERK1/2 y su grado de fosforilación. Cuando se comparan los resultados obtenidos un mes después de finalizada la administración de la hormona en los ratones tratados con GH y sus respectivos controles, no se perciben diferencias significativas **(Fig. 65)**. La disminución de ERK1/2 fosforilado asociada al tratamiento con GH que se observó en las hembras de ocho semanas de vida ya no se percibe a las doce semanas. Los ratones tratados y control presentan niveles similares de fosforilación de ERK1/2 en esta edad **(Fig. 65a-b)**. En los machos, el tratamiento con GH genera un aumento en el contenido proteico de ERK1/2 a las ocho semanas de vida en comparación con los controles, que no se observa a las doce semanas de vida **(Fig. 65c-d)**. Sin embargo, cabe destacar que un mes después de haber finalizado el tratamiento, la relación

entre los niveles de ERK1/2 fosforilado y el contenido total de esta proteína es mayor en los machos que fueron tratados con la hormona, aunque estas diferencias no son significativas (Fig. 65f).

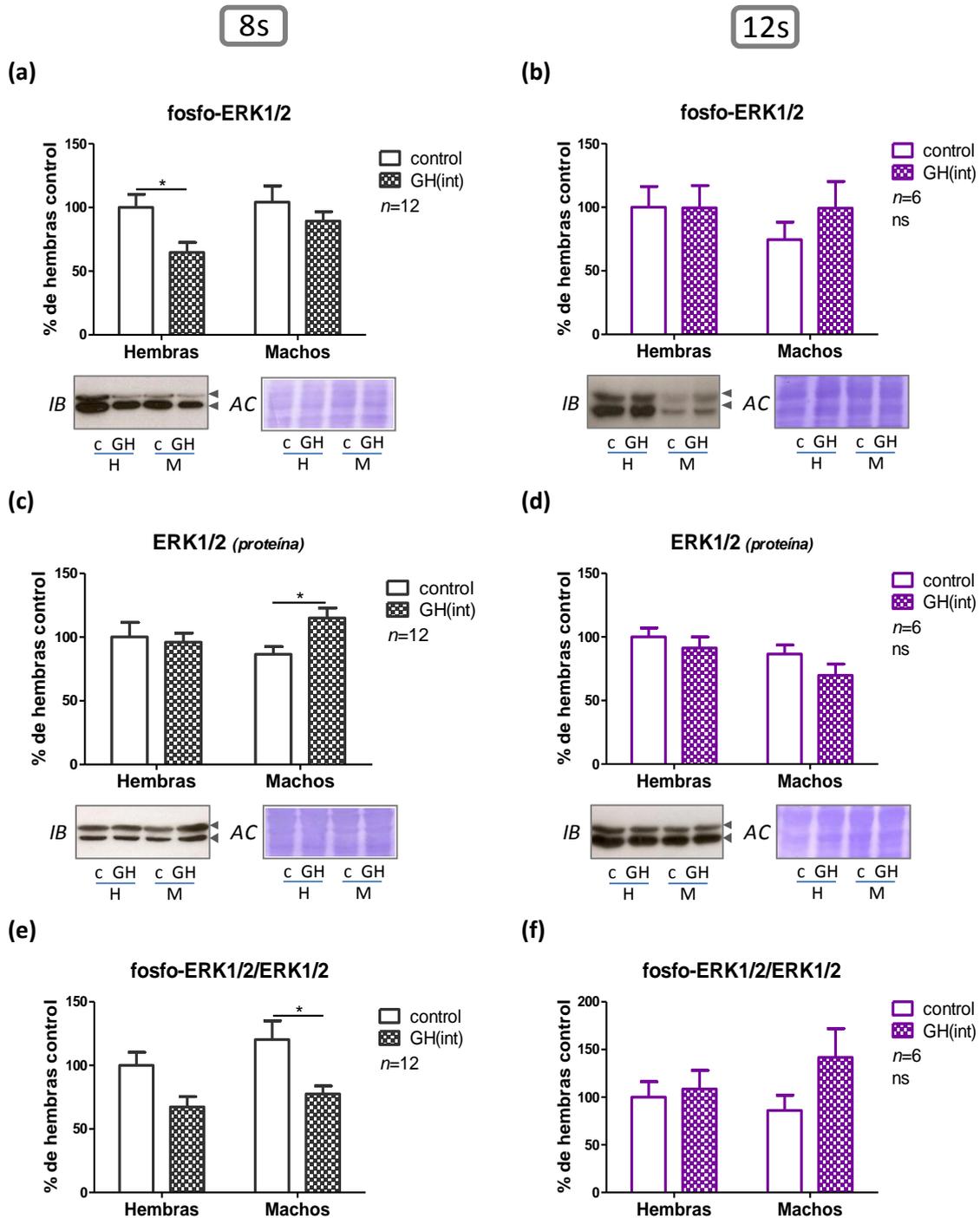


Figura 65 – Activación y contenido proteico de ERK1/2 – Solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho (8s) y doce semanas (12s) de vida, control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>185</sup>/Tyr<sup>187</sup>) (a,b) o anti-ERK1/2 (c,d). Los resultados se obtuvieron a partir de la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a ERK1 y ERK2. Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC)

para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los paneles (e,f) muestran la relación fosfo-ERK1/2/ERK1/2. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni ( $*p < 0,05$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

#### **4.6. Análisis general de los resultados obtenidos un mes después de finalizada la administración de GH**

El análisis de los efectos del tratamiento intermitente con GH a las ocho semanas de vida mostró, por un lado, que muchos de los cambios detectados en las vías de señalización en estudio reflejan la sincronización de los ciclos de activación e inactivación de la señalización de la hormona. En estos casos, se debió considerar el tiempo transcurrido desde la última inyección de hormona para analizar los resultados obtenidos de su activación o de expresión génica, como se discutió previamente en la Sección 3.2. En cambio, alteraciones a nivel del contenido proteico, como el aumento de ERK1/2 o la disminución de mTOR, no se tratarían de efectos agudos de la hormona, sino que probablemente sean debido a la GH administrada durante un tiempo prolongado. Con el objeto de profundizar en el origen de estos cambios y, más importante aún, evaluar si un mes después de haber finalizado la administración de la hormona perduran estas alteraciones asociadas al tratamiento o incluso aparecen nuevas, se evaluó la activación de estas vías en animales de doce semanas.

La mayor parte de los cambios detectados cuando finaliza el tratamiento no se evidencian un mes después. Sin embargo, si se analizan exhaustivamente y en conjunto los resultados obtenidos, se observan ciertos efectos a largo plazo del tratamiento tanto en hembras como en machos. En las hembras, en condiciones fisiológicas, se detecta un aumento de la fosforilación de STAT5, Akt y mTOR entre las ocho y las doce semanas de vida. En cambio, en aquellas que recibieron el tratamiento intermitente con GH, el aumento de la fosforilación de STAT5 y mTOR no ocurriría, al menos entre las dos edades evaluadas en este trabajo. Por el contrario, el aumento de la fosforilación de Akt sí se produciría en las hembras tratadas. Una posible explicación a este fenómeno es que, al haber estado sometidas a un perfil de concentraciones de GH diferente al fisiológico, que trajo aparejados cambios principalmente a nivel de proteínas reguladoras de la señalización de la hormona, las hembras

tratadas con GH no hayan podido acoplarse al cambio fisiológico que atravesaron los controles.

En los machos, se observa una serie de cambios que, aunque no sean siempre estadísticamente significativos, cobran relevancia cuando se analizan en conjunto. Por un lado, la fosforilación de mTOR en los machos tratados duplica la determinada en los controles a las doce semanas de vida. Si bien por el test de ANOVA estas diferencias no son significativas, lo son por el test *t* de Student ( $p < 0,05$ ). Este efecto se generaría luego del tratamiento, ya que a las ocho semanas de vida no se detectaron cambios significativos en los niveles de mTOR fosforilado e incluso el contenido proteico de mTOR medido fue menor que en los animales control. Además, los machos de doce semanas presentan una tendencia hacia una mayor proporción de ERK1/2 fosforilado y los niveles de MUPs y EGFR se encuentran levemente disminuidos en comparación con los ratones no tratados. A las ocho semanas de vida se observaron tendencias en el sentido contrario en ERK1/2, MUPs y EGFR. Si bien las diferencias no son significativas, estos cambios entre las ocho y las doce semanas de vida asociados al tratamiento con la hormona podrían estar indicando la existencia de algún efecto residual del mismo que afectaría, por un lado, la expresión de proteínas que dependen del perfil de GH plasmático y, por otro, la activación basal de mediadores de vías de señalización de la hormona.

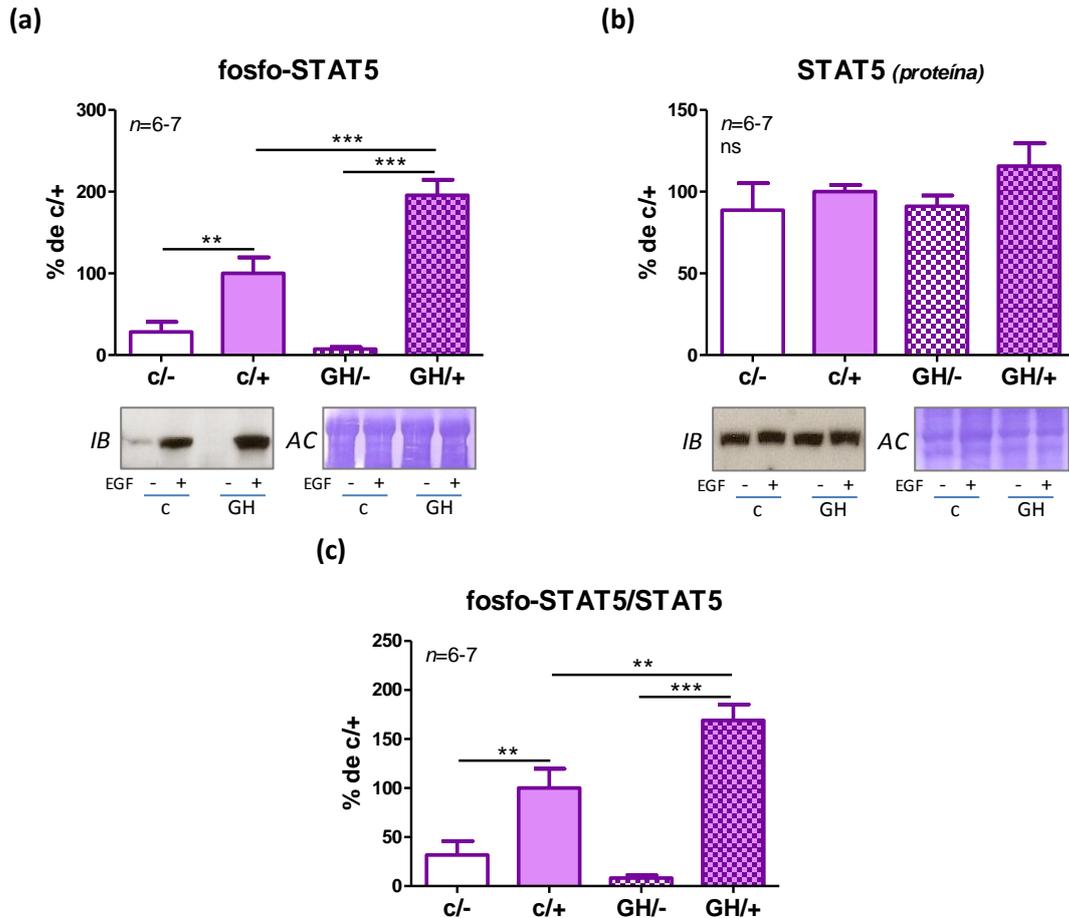
## **5. Evaluación de la sensibilidad al EGF en ratones tratados con GH**

Hasta el momento se han analizado los efectos del tratamiento con GH tanto a las ocho semanas de vida, cuando finaliza el mismo, como un mes después de suspendida la administración de la hormona. Uno de los efectos moleculares más importantes del tratamiento intermitente es el aumento en más de diez veces del contenido de EGFR que exhiben las hembras tratadas con GH a las ocho semanas de vida. Mientras que en las hembras control los niveles de este receptor son prácticamente indetectables, en aquellas tratadas con GH se registran niveles similares a los de los ratones macho. La expresión aberrante de este receptor o su hiperactivación se asocia con el desarrollo de hepatocarcinoma (Normanno y col., 2006, Berasain y col., 2014, Komposch y col., 2016). En los ratones tratados con GH intermitente para este trabajo de tesis, el aumento de EGFR no produce una mayor activación basal de las vías de señalización que este desencadena, que son las mismas que pueden

inducirse a través de GHR. Por consiguiente, se decidió evaluar la sensibilidad del tejido ante un estímulo agudo con EGF. Para ello, una vez finalizada la administración intermitente, un grupo de ratones hembra de ocho semanas tratadas y control fue estimulado con este factor de crecimiento durante diez minutos. La respuesta de los principales mediadores de la señalización de EGF, STAT5, STAT3, Akt y ERK1/2, fue analizada en el hígado de estos animales. La dosis de EGF y el tiempo de estimulación se eligieron en base a resultados previos de nuestro grupo de trabajo que corroboraron una activación significativa de estas vías transcurridos diez minutos del estímulo (González y col., 2010, Díaz y col., 2012, Díaz y col., 2014).

### **5.1. Activación de STAT5**

En primer lugar, se analizó la fosforilación de STAT5 en residuos de activación. Ante un estímulo con EGF, tanto los ratones control como aquellos que recibieron el tratamiento con GH presentan mayores niveles de STAT5 fosforilado que los animales no estimulados (**Fig. 66a**). Sin embargo, la respuesta al estímulo con EGF es mayor en las hembras que fueron previamente tratadas con GH. Luego del estímulo agudo con EGF no se modifica de forma significativa el contenido proteico de STAT5 (**Fig. 66b**) y por ende la relación proteína fosforilada/proteína total presenta un perfil similar al de STAT5 fosforilado (**Fig. 66c**).

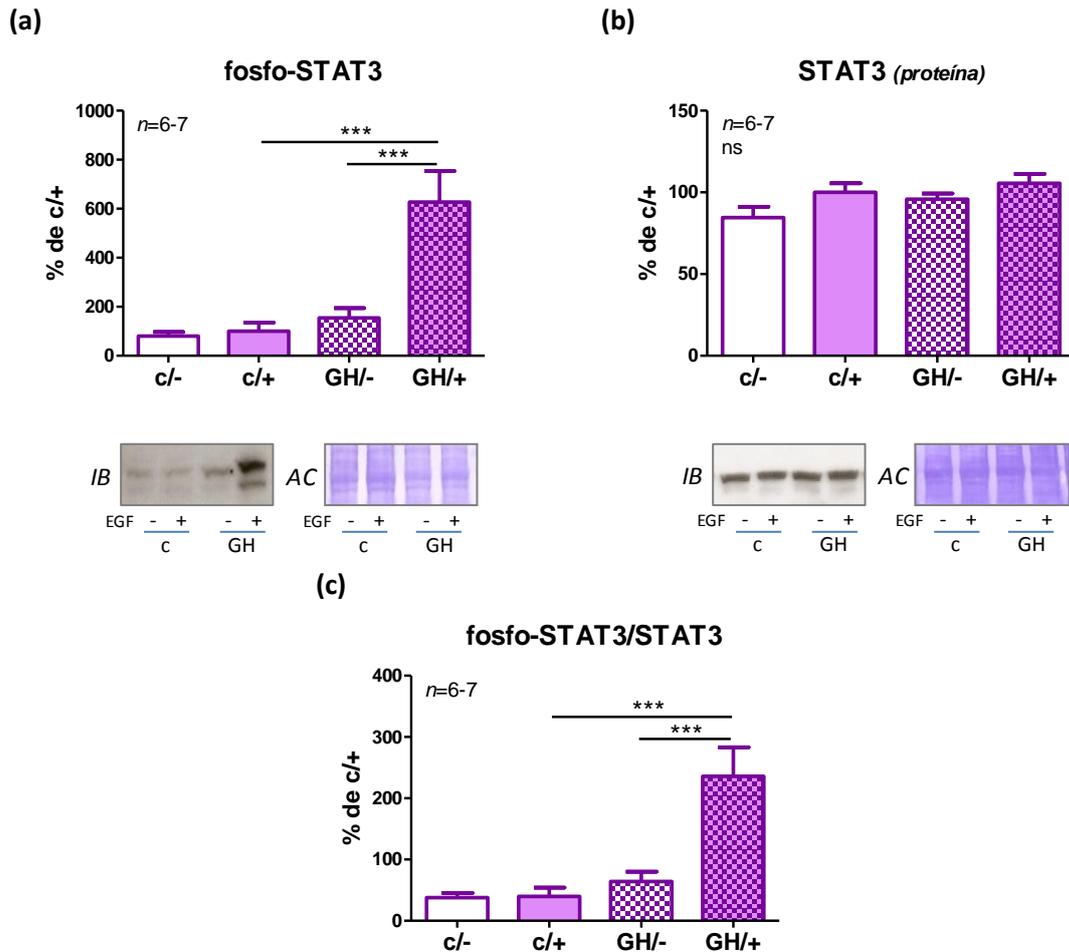


**Figura 66 – Activación y contenido proteico de STAT5 en ratones estimulados con EGF** – Solubilizados de hígado de ratones hembra de ocho semanas de vida, control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente durante cinco semanas, estimulados con EGF (+) o SF (-), fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-STAT5a/b (Tyr<sup>694/699</sup>) (a) o anti-STAT5a/b (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. En el panel (c) se muestra la relación fosfo-STAT5/STAT5. Se representa la media  $\pm$  ESM del número *n* de individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

## 5.2. Activación de STAT3

Cuando se analizaron los niveles de STAT3 fosforilado en el residuo de Tyr<sup>705</sup> se observa que en aquellos ratones que recibieron el tratamiento con GH el estímulo con EGF induce una mayor activación de STAT3 (Fig. 67a). En los animales estimulados con EGF, que no fueron tratados previamente con la hormona, los niveles de STAT3 fosforilado son similares a los de su fosforilación basal. Estos resultados se contradicen con trabajos previos de nuestro laboratorio que mostraron que, en condiciones fisiológicas, este factor

de crecimiento induce la fosforilación de STAT3 en hígado, según pudo comprobarse en dos cepas distintas de ratones (Miquet y col., 2008, González y col., 2010). Sin embargo, esta falta de concordancia podría deberse a la alta intensidad de la banda correspondiente a los ratones tratados con GH y estimulados con EGF que disminuye la sensibilidad para detectar diferencias en la intensidad del resto de las bandas cuando se analizan en paralelo (Díaz y col., 2014).



**Figura 67 - Activación y contenido proteico de STAT3 en ratones estimulados con EGF** – Solubilizados de hígado de ratones hembra de ocho semanas de vida, control (c) y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, estimulados con EGF (+) o SF (-), fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-STAT3 (Tyr<sup>705</sup>) (a) o anti-STAT3 (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. En el panel (c) se muestra la relación fosfo-STAT3/STAT3. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*\*\*)  $p < 0,001$ . ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

La abundancia proteica de STAT3 es similar entre los grupos experimentales evaluados (Fig. 67b) y, en consecuencia, la relación proteína fosforilada/proteína total presenta un perfil similar al de STAT3 fosforilado (Fig. 67c).

### 5.3. Activación de Akt

La respuesta de Akt frente a un estímulo agudo con EGF también se evaluó en las hembras tratadas con GH. En este caso, tanto en las hembras que recibieron GH como en aquellas que no fueron tratadas con la hormona, se observa una mayor fosforilación de Akt en respuesta al EGF en comparación con los ratones no estimulados (Fig. 68a). A diferencia de la respuesta de los STATs, la magnitud de la respuesta de Akt es similar en las hembras que recibieron GH y en las que no. Como era de esperarse, no se registran cambios en el contenido de Akt frente a un estímulo agudo con EGF (Fig. 68b) y, por consiguiente, el perfil de la relación entre los niveles de Akt fosforilado y su contenido proteico es similar al perfil de fosforilación de Akt (Fig. 68c).

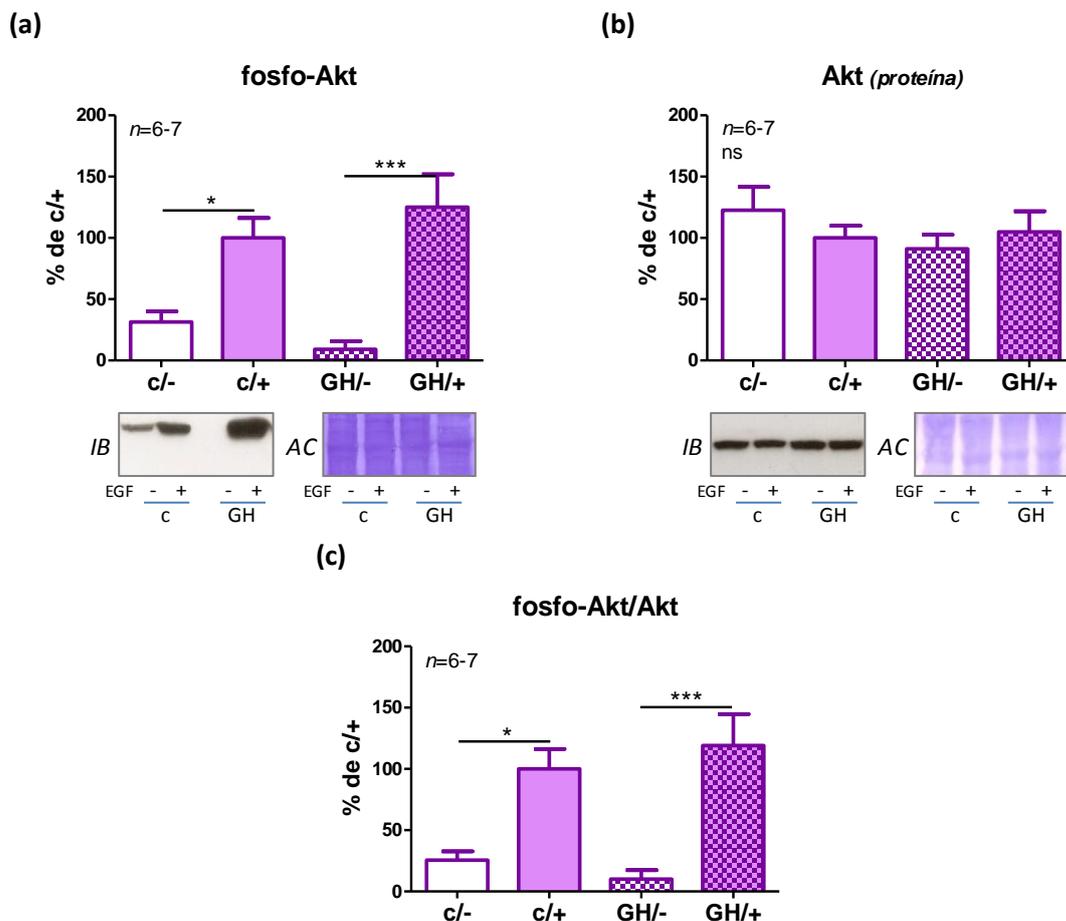


Figura 68 – Activación y contenido proteico de Akt en ratones estimulados con EGF – Solubilizados de hígado de ratones hembra de ocho semanas de vida, control (c) y

tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, estimulados con EGF (+) o SF (-), fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-Akt (Ser<sup>473</sup>) (a) o anti-Akt (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. En el panel (c) se muestra la relación fosfo-Akt/Akt. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\**p* < 0,05; \*\*\**p* < 0,001). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

#### 5.4. Activación de ERK1/2

Finalmente, se analizó la activación de ERK1/2. Los niveles de ERK1/2 fosforilado son mayores en los animales estimulados con EGF (Fig. 69a), sin embargo, no se detectan diferencias en su capacidad de respuesta asociadas al tratamiento previo con GH. Dado que los niveles proteicos de ERK1/2 no se modifican significativamente entre los grupos experimentales (Fig. 69b), la relación entre ERK1/2 fosforilado y su contenido proteico total presenta un perfil similar al de la proteína fosforilada (Fig. 69c).

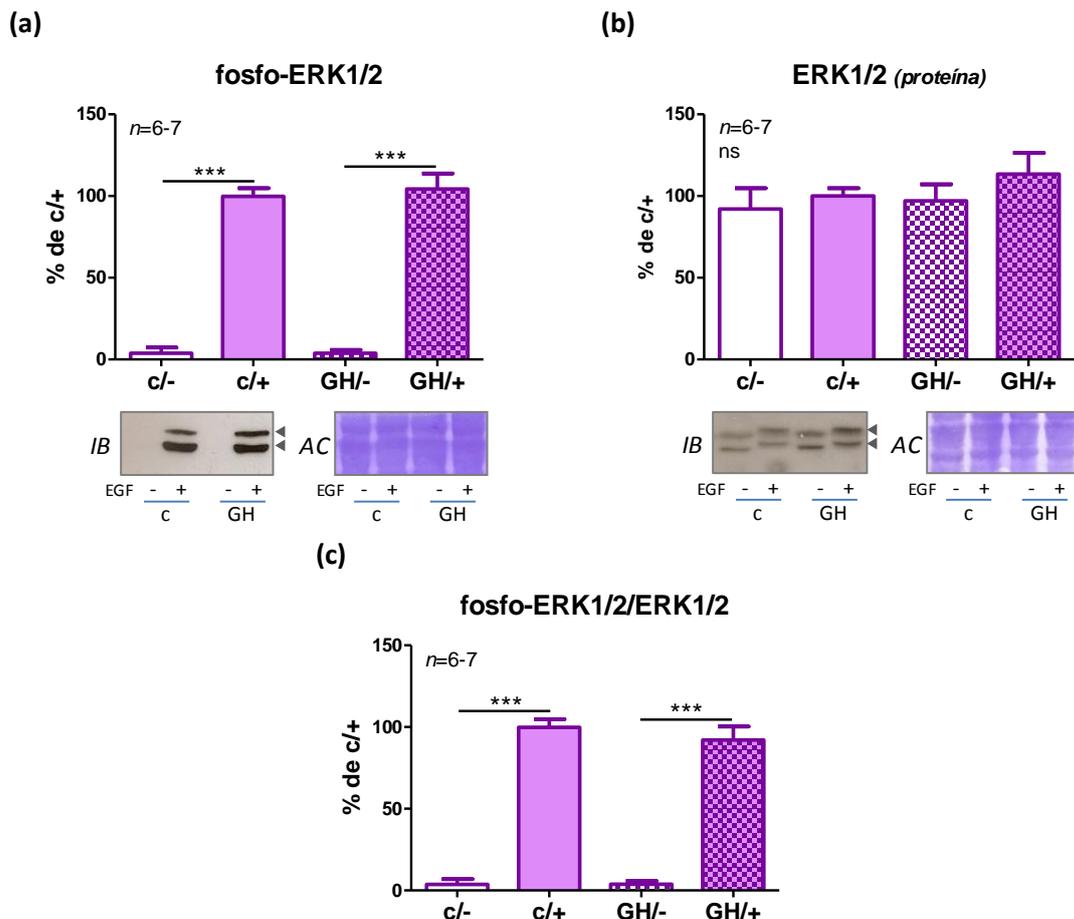


Figura 69 – Activación y contenido proteico de ERK1/2 en ratones estimulados con EGF – Solubilizados de hígado de ratones hembra de ocho semanas de vida, control (c)

y tratados con GH (6 µg/g de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) durante cinco semanas, estimulados con EGF (+) o SF (-), fueron analizados por *immunoblotting* (IB) mediante anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>, Thr<sup>185</sup>/Tyr<sup>187</sup>) (a) o anti-ERK1/2 (b). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los resultados se obtuvieron a partir de la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a ERK1 y ERK2. En el panel (c) se muestra la relación fosfo-ERK1/2/ERK1/2. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por condición. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001). ns: no significativo según el mismo análisis estadístico.

### 5.5. Análisis general de los resultados obtenidos en ratones tratados con GH y estimulados con EGF

El aumento del contenido proteico de EGFR que exhiben las hembras tratadas con GH intermitente resultó en una mayor sensibilidad del tejido hepático a un estímulo agudo con EGF, aunque este efecto no se manifiesta por igual en todas las vías que pueden ser activadas por el factor de crecimiento. En condiciones fisiológicas, dicho estímulo induce una mayor fosforilación de STAT5, Akt y ERK1/2 en residuos de activación en comparación con animales estimulados con solución salina. Los ratones que recibieron previamente el tratamiento con GH también son capaces de responder a este estímulo, pero el grado de respuesta varía entre los distintos mediadores evaluados. En el caso de Akt y ERK1/2, la fosforilación inducida por EGF es similar a la de los animales que no recibieron GH. Por el contrario, la respuesta de STAT5 y STAT3 es sustancialmente mayor en aquellas hembras que fueron tratadas previamente con GH de modo intermitente.

En trabajos previos se han reportado alteraciones en la sensibilidad del tejido hepático al EGF en ratones tratados con GH de forma intermitente durante un período más corto y con una menor dosis (Díaz y col., 2014). Luego de cinco días de tratamiento intermitente en una dosis de 1 µg GH/g peso corporal/día, ratones hembra adultos presentan una mayor capacidad de respuesta a un estímulo con EGF. A diferencia de los resultados obtenidos en los ratones tratados por cinco semanas, esta mayor capacidad de respuesta se manifiesta no solo a nivel de los STATs sino también a nivel de Akt y ERK1/2. Dado que ambos experimentos fueron realizados en ratones de la misma cepa y estimulados durante el mismo tiempo con la misma dosis de EGF, las diferencias registradas pueden deberse, o bien a la edad de los animales tratados, o bien a la dosis de GH y/o duración del tratamiento. Mientras que el

tratamiento corto y de menor dosis afecta la capacidad de respuesta de todas las vías evaluadas, frente a un tratamiento más largo y de mayor dosis el sistema logra mantener la respuesta al EGF de Akt y ERK1/2 en condiciones similares a las fisiológicas a pesar del mayor contenido de EGFR. Por el contrario, la activación de los STATs frente a un estímulo agudo con EGF se encuentra exacerbada en ambos modelos de ratones tratados con GH.

## **SECCIÓN II: Expresión de protooncogenes durante el crecimiento en ratones transgénicos que sobreexpresan GH**

Los estudios realizados en ratones tratados con GH en concentraciones farmacológicas muestran una clara relación entre el conjunto de efectos que produce el tratamiento y su perfil plasmático, intermitente o continuo. A nivel del parénquima hepático, el tratamiento intermitente se asocia a procesos de hipertrofia celular y aumento del tamaño de los núcleos de los hepatocitos. En las hembras, además, se detecta un mayor porcentaje de células en proliferación en comparación con los ratones control. En estos animales, la masculinización del perfil de GH en sangre por el tratamiento intermitente se asocia a un mayor contenido de EGFR y una mayor sensibilidad de la vía de los STATs ante un estímulo con EGF. Sin embargo, no se manifiestan otros cambios a nivel de la activación basal de vías de señalización, ni en hembras ni en machos, que puedan vincularse directamente con la exacerbación de procesos de crecimiento y proliferación celular ante esta forma de administración de la hormona. En los ratones tratados con GH de forma continua, por el contrario, solo se detectan alteraciones histológicas en los machos, que presentan hepatocitos agrandados y un mayor porcentaje de células en proliferación que los controles. En este caso, los animales expuestos a la hormona exhiben cambios moleculares en vías asociadas a procesos de crecimiento, supervivencia y proliferación celular. Los ratones tratados con GH de forma continua presentan, en comparación con los controles, mayores niveles de ARNm de GHR, mayor activación de la vía de STAT3 y mayor contenido proteico de mTOR. Los machos sometidos a este tratamiento exhiben, además, un mayor contenido de Akt y ERK1/2.

En los ratones GH-transgénicos adultos, que constituyen un modelo de carcinogénesis hepatocelular como resultado de un continuo estímulo proliferativo en hígado, se han descrito alteraciones similares a nivel histológico y molecular (Miquet y col., 2008, González y col., 2010, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2015, Martínez y col., 2016). Cuando se estudiaron ratones GH-transgénicos en crecimiento, de dos y cuatro semanas de vida, se reportó que, mientras algunas de estas alteraciones se observan incluso antes del período de crecimiento rápido dependiente GH, otras recién se detectan a las cuatro semanas de vida o en la adultez (Martínez y col., 2015, Martínez y col., 2016). A las dos semanas de vida, los ratones GH-transgénicos presentan hipertrofia de los hepatocitos y a las cuatro semanas ya exhiben, además, un

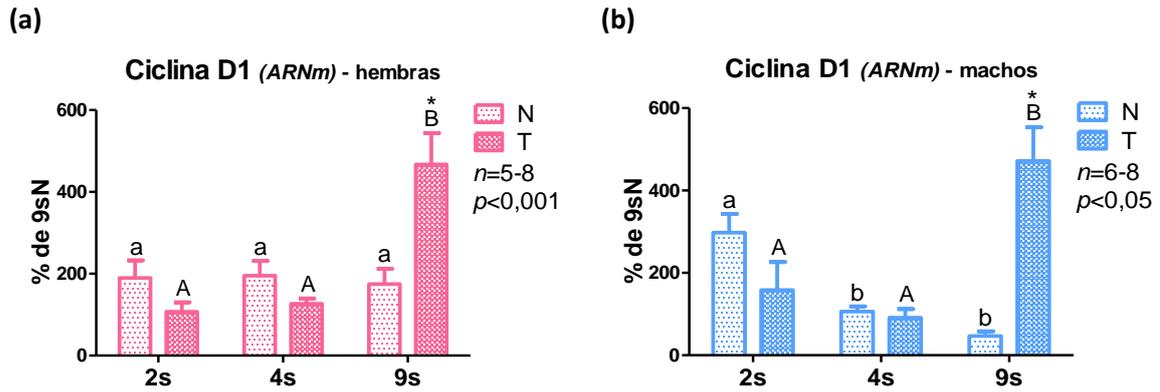
aumento del porcentaje de células en proliferación en comparación con los ratones normales, que resulta en hepatomegalia significativa. Estos cambios perduran en el tiempo e incluso se intensifican en los adultos jóvenes. Acompañando la progresión de las alteraciones histológicas, distintos cambios moleculares se van sucediendo a lo largo del crecimiento. A las dos semanas de vida, los ratones transgénicos presentan mayores niveles de GHR y STAT3 que sus hermanos de camada normales. A las cuatro semanas de vida, a estos cambios se le suman aumentos en el contenido proteico de Akt, mTOR y GSK3 $\beta$ . En cuanto a su activación, solo se detecta una mayor fosforilación de STAT3 y mTOR a las cuatro semanas. Estas alteraciones perduran en los ratones adultos, que también exhiben un aumento significativo en la fosforilación de Akt y GSK3 $\beta$ . Como se mencionó anteriormente, los adultos presentan, además, un mayor contenido proteico de ERK1/2.

Si se analiza la progresión de los cambios reportados en ratones GH-transgénicos en crecimiento, se observa que, en muchos casos, el aumento del contenido proteico de los mediadores de las vías de señalización en estudio precede al aumento significativo de su fosforilación en comparación con los ratones normales. Además, en los ratones transgénicos algunas vías se muestran más activas que otras a edades tempranas, lo que sugiere una activación diferencial de las distintas vías de señalización que podrían estar implicadas en el desarrollo de las lesiones preneoplásicas. Esto respalda lo que se ha discutido previamente en la Sección 3.2: si bien los ratones tratados de forma continua presentan cambios histológicos más sutiles en comparación con los efectos del tratamiento intermitente, las alteraciones detectadas a nivel molecular sugerirían que este tipo de administración no es inocua a pesar de que la mayor parte solo implica cambios en el contenido proteico de mediadores de señalización, pero no en su grado de activación. Conforme a lo descrito en los ratones GH-transgénicos, el aumento de la abundancia de estos mediadores ante un tratamiento continuo con GH podría progresar a una mayor activación de las vías de señalización en las que estén implicados en comparación con animales no tratados. Es necesario considerar, además, que serían necesarias dosis más altas de GH cuando esta es administrada de forma continua para generar un aumento significativo en el tamaño corporal, lo que probablemente potenciaría los efectos de este tipo de tratamiento.

En los ratones tratados de forma continua se observó un aumento en la expresión de ciclina D1 en los machos y de c-Myc en las hembras, en

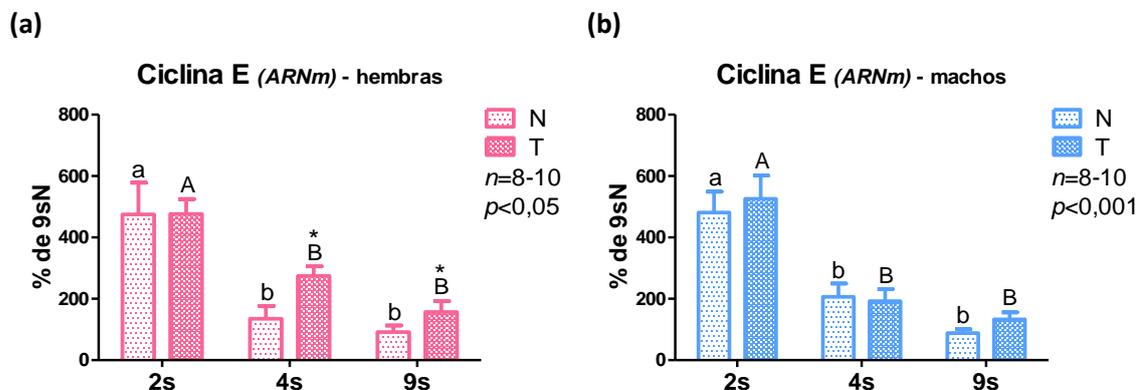
comparación con los controles correspondientes. Cambios similares se han detectado en ratones transgénicos adultos jóvenes, de nueve semanas de vida, sumado a mayores niveles de ciclina E, c-Myc, c-Fos y c-Jun que sus hermanos de camada normales (Miquet y col., 2013, González y col., 2017). En consecuencia, dado que ante menores concentraciones de GH ya se observa un aumento en su expresión, ciclina D1 y c-Myc serían de los primeros protooncogenes en verse afectados por niveles suprafisiológicos de GH. Cuando la concentración de GH circulante es aún mayor, como ocurre en los ratones GH-transgénicos, se alteran también ciclina E, c-Fos y c-Jun. Teniendo esto en consideración y sabiendo que algunas de las alteraciones moleculares que se observan en el hígado de ratones transgénicos adultos comienzan a manifestarse a edades tempranas mientras que otras no (Martínez y col., 2015, Martínez y col., 2016), resta averiguar la participación de estos protooncogenes en el desarrollo de la patología hepática a lo largo del período de crecimiento. Para ello se determinaron los niveles de ARNm de ciclina D1, ciclina E, c-Myc y c-Jun en ratones normales y transgénicos de dos, cuatro y nueve semanas de vida.

Cuando se analizan los niveles de ciclina D1 en los animales control se observa que, mientras los machos exhiben una disminución de la expresión de esta ciclina en función de la edad, las hembras no presentan diferencias entre las distintas edades evaluadas (**Fig. 70**). En los ratones transgénicos, en cambio, la expresión de ciclina D1 se incrementa sustancialmente entre las cuatro y las nueve semanas de vida. Por consiguiente, tanto machos como hembras presentan un marcado aumento de la expresión de esta ciclina en los ratones transgénicos adultos en comparación con sus hermanos de camada normales. La magnitud de esta diferencia es mayor en los machos que en las hembras, tal como se ha descrito previamente (Miquet y col., 2013).



**Figura 70 – Expresión de Ciclina D1** – Se determinaron los niveles de ARNm de ciclina D1 por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones normales (N) y transgénicos (T), hembras (a) y machos (b), de dos, cuatro y nueve semanas de vida (2s, 4s y 9s). Los resultados están expresados como el porcentaje del valor promedio obtenido para los animales hembra y macho normales de nueve semanas de vida. Se representa la media  $\pm$  ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Distintas letras indican diferencias significativas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni entre las edades evaluadas. Las letras minúsculas corresponden a los ratones normales y las letras mayúsculas a los ratones transgénicos. Asteriscos indican diferencias significativas por genotipo según el mismo test estadístico.

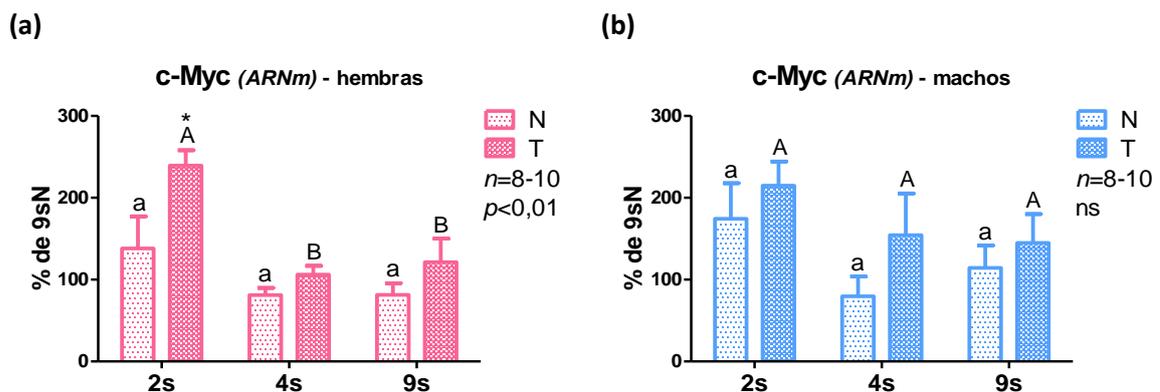
En cuanto a ciclina E se observa, tanto en machos como en hembras, una mayor expresión a edades tempranas (Fig. 71). Cuando se analizan todas las edades en paralelo, los valores elevados obtenidos a las dos semanas de vida no permiten detectar diferencias significativas por genotipo en las demás edades evaluadas, como se había descrito previamente en animales adultos (Miquet y col., 2013). Si los resultados de ratones normales y transgénicos se comparan en cada edad de forma independiente, la expresión de ciclina E es significativamente mayor en los ratones hembra transgénicos de cuatro y nueve semanas de vida ( $p < 0,05$  por el test *t* de Student).



**Figura 71 – Expresión de ciclina E** – Se determinaron los niveles de ARNm de ciclina E por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones normales (N) y transgénicos (T), hembras (a) y machos (b), de dos, cuatro y nueve semanas de vida

(2s, 4s y 9s). Los resultados están expresados como el porcentaje del valor promedio obtenido para los animales hembra y macho normales de nueve semanas de vida. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Distintas letras indican diferencias significativas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni entre las edades evaluadas. Las letras minúsculas corresponden a los ratones normales y las letras mayúsculas a los ratones transgénicos.

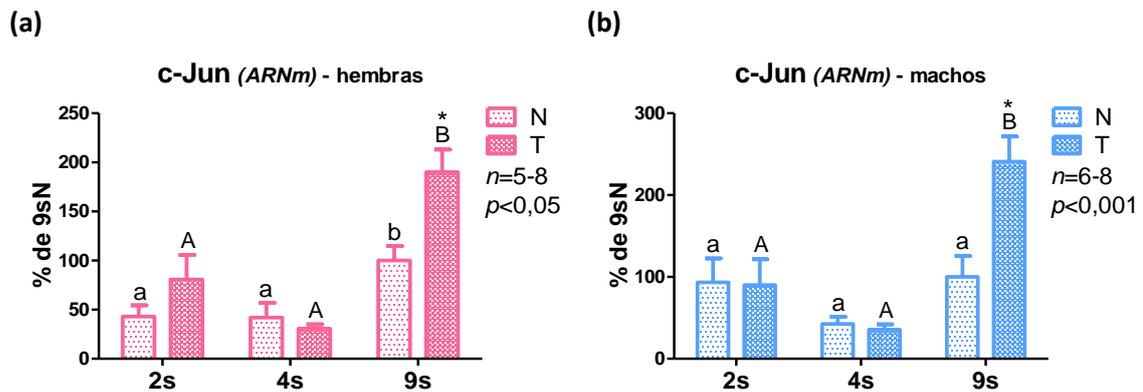
En el caso de los factores de transcripción evaluados, los niveles de expresión de c-Myc tienden a ser mayores en los animales de dos semanas de vida, aunque estas diferencias solo son significativas en las hembras que sobreexpresan GH (Fig. 72). Cuando se comparan ratones normales y transgénicos, se percibe una ligera tendencia hacia mayores niveles de c-Myc en los animales que sobreexpresan GH, aunque solo en las hembras de dos semanas de vida estas diferencias resultan estadísticamente significativas. En esta cohorte de animales, aunque se analicen los resultados de forma independiente, no se detectan diferencias significativas por genotipo en los niveles de c-Myc a las nueve semanas de vida como se había reportado previamente (Miquet y col., 2013).



**Figura 72 - Expresión de c-Myc** - Se determinaron los niveles de ARNm de c-Myc por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones normales (N) y transgénicos (T), hembras (a) y machos (b), de dos, cuatro y nueve semanas de vida (2s, 4s y 9s). Los resultados están expresados como el porcentaje del valor promedio obtenido para los animales hembra y macho normales de nueve semanas de vida. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Distintas letras indican diferencias significativas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni entre las edades evaluadas. Las letras minúsculas corresponden a los ratones normales y las letras mayúsculas a los ratones transgénicos. Asteriscos indican diferencias significativas por genotipo según el mismo test estadístico. ns: no significativo.

En cuanto a c-Jun, sus niveles de expresión en los ratones normales no se modifican entre las dos y las cuatro semanas de vida, pero aumentan entre

las cuatro y las nueve semanas, aumento que resulta significativo solo en las hembras (**Fig. 73**). En los ratones transgénicos, la variación en la expresión de c-Jun en función de la edad es de mayor magnitud. Por ende, los ratones transgénicos de nueve semanas exhiben niveles de este factor de transcripción que prácticamente duplican los de los controles, como se había descrito previamente (Miquet y col., 2013).



**Figura 73 - Expresión de c-Jun** - Se determinaron los niveles de ARNm de cJun por RT-qPCR en muestras de ARN total extraídas de hígado de ratones normales (N) y transgénicos (T), hembras (a) y machos (a), de dos, cuatro y nueve semanas de vida (2s, 4s y 9s). Los resultados están expresados como el porcentaje del valor promedio obtenido para los animales hembra y macho normales de nueve semanas de vida. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Distintas letras indican diferencias significativas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni entre las edades evaluadas. Las letras minúsculas corresponden a los ratones normales y las letras mayúsculas a los ratones transgénicos. Asteriscos indican diferencias significativas por genotipo según el mismo test estadístico.

En resumen, los ratones GH-transgénicos, a pesar de presentar marcadas alteraciones en la activación y el contenido proteico de mediadores de vías relacionadas con crecimiento y proliferación celular ya a edades tempranas (Martínez y col., 2015, Martínez y col., 2016), no exhiben en simultáneo una mayor expresión significativa de los protooncogenes evaluados. El aumento en la expresión de estos genes se registra posteriormente, en la adultez. Como excepción, se encontraron niveles de c-Myc incrementados en los ratones GH-transgénicos hembra de dos semanas de vida en comparación con sus hermanos de camada normales. Ante un estímulo proliferativo en hígado, como el promovido por la GH, los niveles de c-Myc aumentan antes de que se evidencien cambios en la tasa de división celular (Murphy y col., 1987, Wierstra y col., 2008, Bretones y col., 2015). Por consiguiente, el aumento de la expresión de c-Myc a edades tempranas estaría relacionado con el mayor

porcentaje de células en proliferación que se ha descrito en ratones GH-transgénicos adultos (Miquet y col., 2013).

Si se comparan los resultados de los ratones GH-transgénicos en crecimiento con los obtenidos en animales tratados con menores concentraciones de GH durante cinco semanas, se explicaría por qué, en general, no se detectan alteraciones significativas asociadas a este tratamiento en los niveles de los protooncogenes en estudio. Los ratones tratados con GH se encontrarían en una situación previa, donde solo se detectan algunos cambios en las vías de señalización que regulan su transcripción. Principalmente, se ven afectados aquellos genes cuya expresión parece depender del perfil de hormona en circulación, como *ciclina D1* y *c-myc*. Sin embargo, la conclusión primordial que se obtiene a partir de esta comparación es que podría ocurrir una desregulación en la inducción de estos protooncogenes si se prolonga la exposición a la hormona o si se administra una dosis mayor.

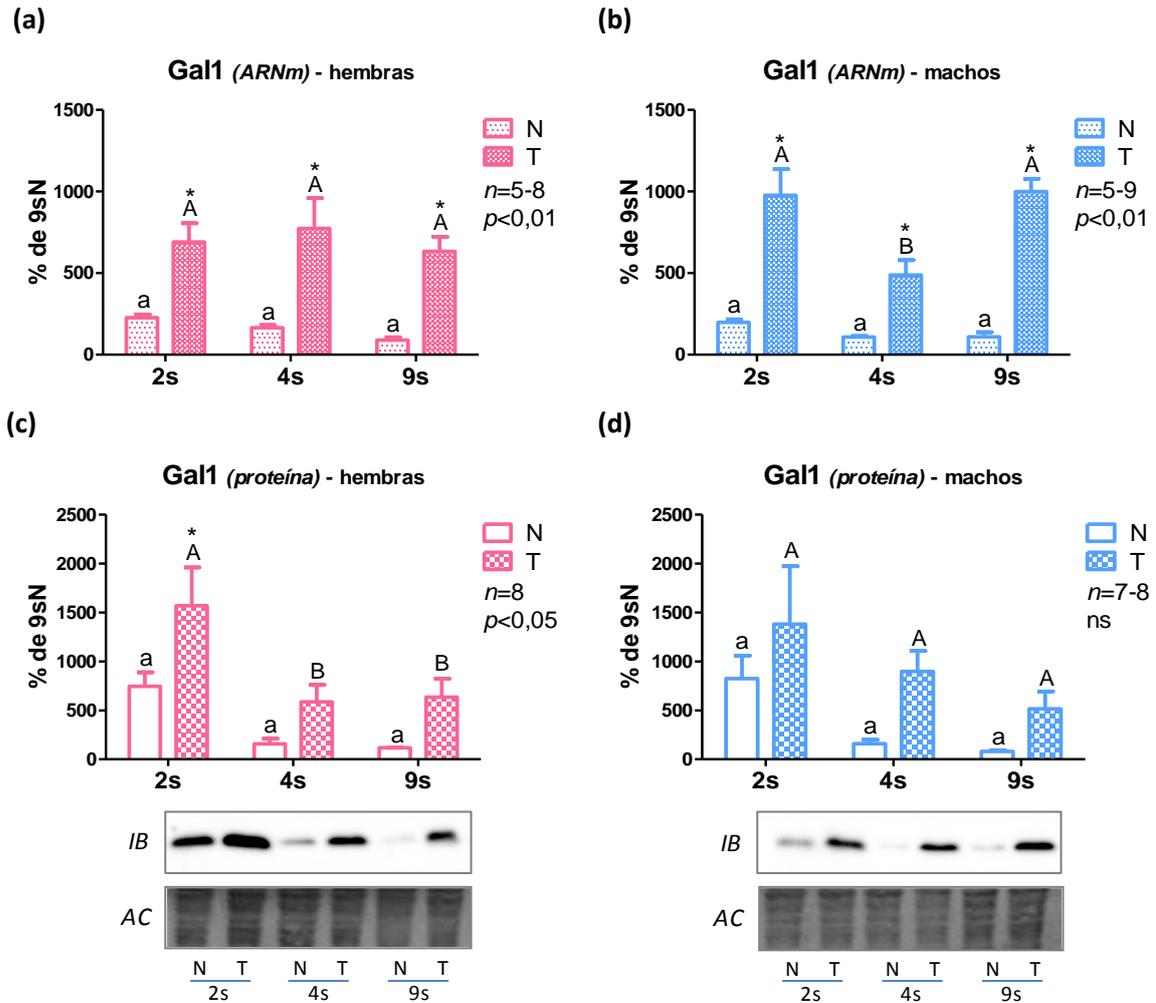
### SECCIÓN III: Relación entre la hormona de crecimiento y la expresión de galectina-1

Galectina-1 (Gal-1) es una proteína que une  $\beta$ -galactósidos y cumple un rol fundamental en las interacciones entre células y entre ellas y la matriz extracelular (Elola y col., 2007, Yang y col., 2008). Además, Gal-1 se encuentra sobreexpresada en pacientes con carcinoma hepatocelular y en diversas líneas celulares humanas (Chung y col., 2002, Kondoh y col., 2003). Dicha sobreexpresión se asocia a una mayor invasión tumoral, metástasis, y menor supervivencia de los pacientes (Wu y col., 2012, Bacigalupo y col., 2017). Dado que el exceso de hormona de crecimiento se asocia al desarrollo de este mismo tipo de tumores en ratones, se decidió estudiar la expresión de Gal-1 en los modelos de ratones con niveles suprafisiológicos de GH empleados para este trabajo.

#### 1. Expresión de Gal-1 en ratones transgénicos que sobreexpresan GH

Para estudiar la potencial relación entre Gal-1, GH y el desarrollo de tumores hepáticos se evaluó su expresión en los ratones transgénicos que sobreexpresan GH de dos, cuatro y nueve semanas de vida. En estos ratones, como se mencionó previamente, a las dos semanas ya existen evidencias de hipertrofia celular, con hepatocitos de mayor tamaño en los ratones transgénicos en comparación con sus hermanos de camada normales. A las cuatro semanas de vida, también se evidencia un aumento en el porcentaje de células en proliferación y hepatomegalia. Los cambios se intensifican con el paso del tiempo y ya los adultos jóvenes presentan alteraciones hepáticas típicas de lesiones preneoplásicas y focos de displasia (Orlan y col., 1989, Quaife y col., 1989, Orlan y col., 1990, Snibson y col., 1999, Snibson, 2002, Bartke, 2003, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016).

Los resultados obtenidos del contenido de ARNm y proteína de Gal-1 se presentan en la **Figura 74**. Los niveles de ARNm de los ratones GH-transgénicos son mayores que los de sus hermanos de camada normales en todas las edades estudiadas (**Fig. 74a-b**). Cuando se analiza la variación de su expresión en función de la edad, no se observan diferencias significativas, con la excepción de los ratones macho transgénicos, que presentan una disminución de los niveles de ARNm de Gal-1 entre las dos y las cuatro semanas de vida, que revierte para las nueve semanas.

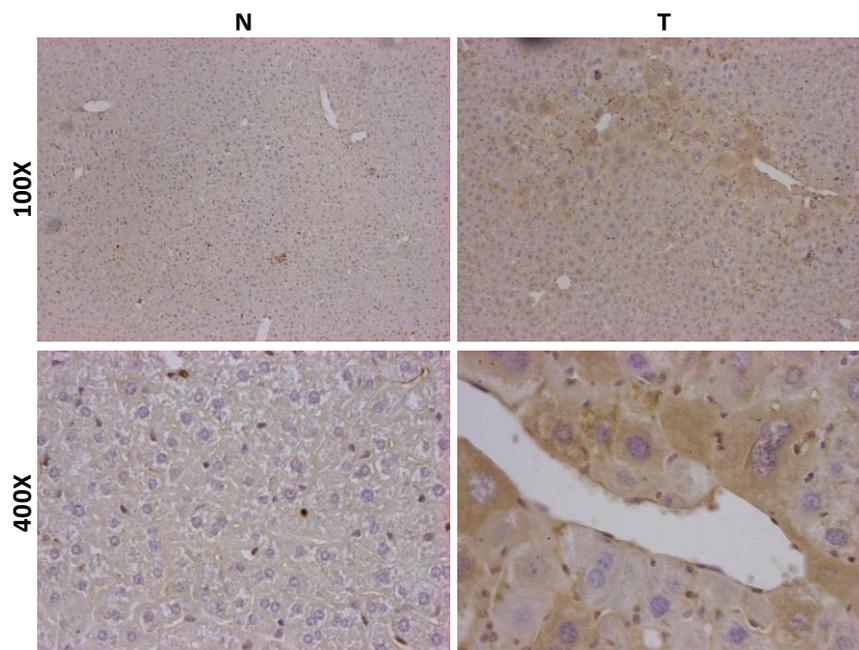


**Figura 74 – Expresión de galectina-1 en ratones GH-transgénicos**– Extractos de ARN total y solubilizados de hígado de ratones normales (N) y transgénicos (T), hembras (H) y machos (M), de dos, cuatro y nueve semanas de vida (2s, 4s y 9s), fueron analizados por RT-qPCR (a-b) e *immunoblotting* (IB) mediante un anticuerpo anti-Gal-1 (c-d). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Los resultados están expresados como el porcentaje del valor promedio obtenido para los animales hembra y macho normales de nueve semanas de vida. Se representa la media ± ESM del número *n* de individuos por grupo experimental. Distintas letras indican diferencias significativas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni entre las edades evaluadas. Las letras minúsculas corresponden a los ratones normales y las letras mayúsculas a los ratones transgénicos. Asteriscos indican diferencias significativas por genotipo según el mismo test estadístico. ns: no significativo.

El contenido proteico de Gal-1 tiende a ser mayor en los ratones GH-transgénicos en comparación con los ratones normales, aunque solo en las hembras de dos semanas de vida las diferencias son significativas por el test de ANOVA de dos vías (Fig. 74c-d). Asimismo, estos valores son significativamente mayores que los correspondientes a los ratones hembra transgénicos de cuatro y nueve semanas de vida. Si se analizan solo las

diferencias por genotipo en cada edad, se observa un aumento significativo de la expresión de Gal-1 en los ratones GH-transgénicos de cuatro y nueve semanas de vida, tanto machos como hembras ( $p < 0,05$  por el test  $t$  de Student).

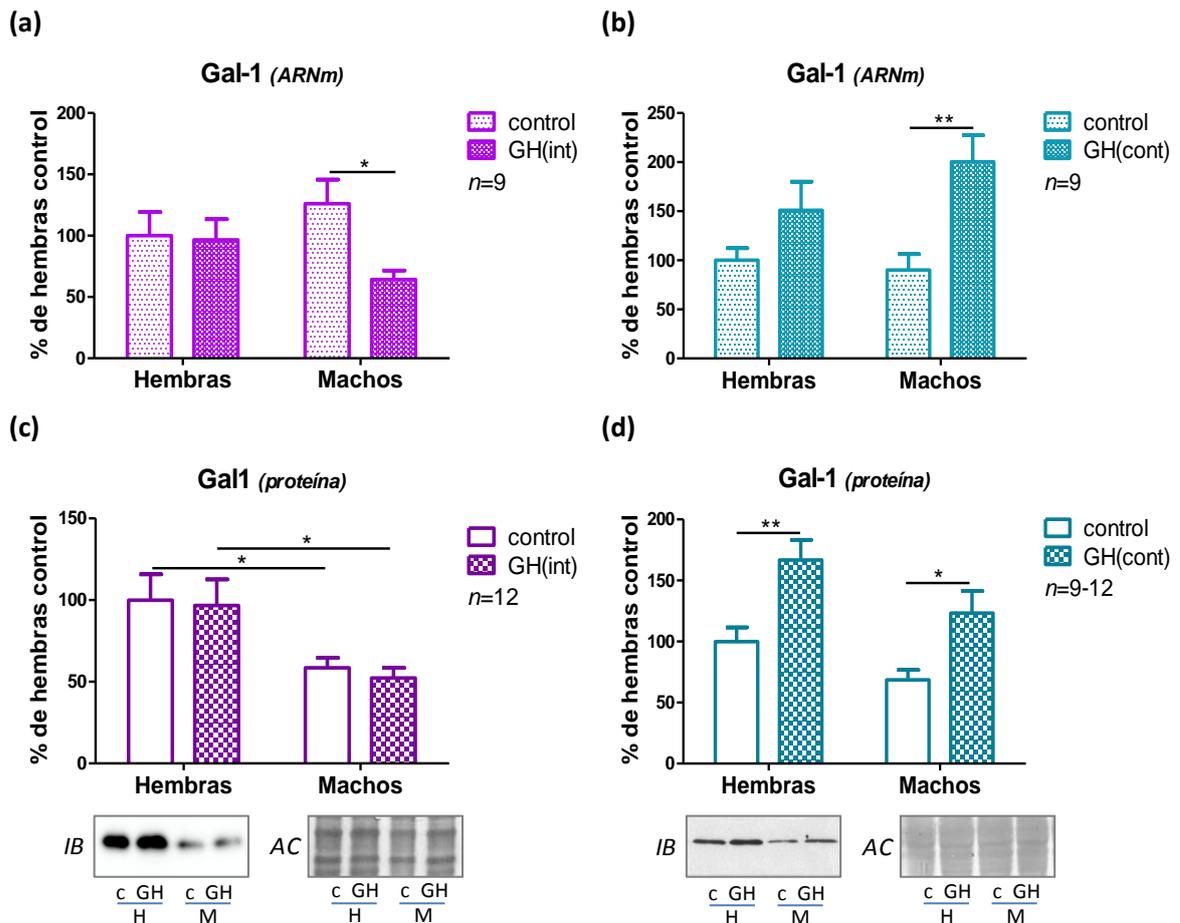
Para evaluar la localización celular de Gal-1, se analizaron por inmunohistoquímica cortes de hígado de ratones hembra de nueve semanas normales y transgénicos. En la **Figura 75** se muestran microfotografías representativas donde se confirma la mayor expresión de esta proteína en los ratones transgénicos en comparación con los normales. Cuando se analizan las imágenes tomadas a menor aumento, se observan hepatocitos de mayor tamaño con núcleos agrandados concentrados principalmente alrededor de las estructuras vasculares, como se describió en trabajos anteriores (Miquet y col., 2013). Notablemente, la marca correspondiente a Gal-1 se localiza principalmente en el citoplasma de dichas células.



**Figura 75** - Expresión de galectina-1 en cortes de tejido hepático de ratones GH-transgénicos - Microfotografías representativas de cortes de hígado de ratones hembra adultos, normales (N) y transgénicos (T), analizados por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-Gal-1.

## 2. Expresión de Gal-1 en ratones tratados con GH

Con el objeto de explorar si los efectos de la GH sobre la expresión de Gal-1 se observan incluso ante bajos niveles de hormona y si existe algún tipo de relación con el perfil de hormona circulante, se estudió la expresión de esta proteína en el modelo de ratones tratados con dosis farmacológicas de GH administrada de forma intermitente o continua. Cuando se analizan los resultados obtenidos con el tratamiento intermitente, se observa que la GH induce una disminución en los niveles de ARNm de Gal-1 en los machos y no afecta su expresión en las hembras (**Fig. 76a**). En cuanto al contenido proteico, no se observan diferencias asociadas al tratamiento ni en machos ni en hembras (**Fig. 76c**). El tratamiento continuo, en cambio, induce una mayor expresión del ARNm de Gal-1 en los machos en comparación con los ratones no tratados (**Fig. 76b**). Las hembras exhiben un perfil similar, aunque las diferencias no alcanzan significación estadística. Asimismo, la administración sostenida de GH se traduce en un aumento en el contenido proteico de Gal-1 en comparación con los animales no tratados, tanto en hembras como en machos (**Fig. 76d**). Si se comparan los resultados obtenidos entre hembras y machos control, se repite el patrón descrito previamente en los ratones normales hermanos de camada de los GH-transgénicos: mientras que no se detectan diferencias significativas a nivel del ARNm, las hembras presentan mayores niveles de la proteína Gal-1 que los machos. Si bien cuando se analizan los resultados correspondientes al tratamiento continuo por el test ANOVA las diferencias entre hembras y machos sin tratar no alcanzan significación estadística, estas sí se detectan si se analizan de forma independiente de los ratones tratados ( $p < 0,05$  por el test  $t$  de Student). De esta forma se comprueba, en dos cepas distintas, que la expresión hepática de Gal-1 en ratones adultos es mayor en hembras que machos.



**Figura 76 – Expresión de galectina-1 en ratones tratados con GH** – Extractos de ARN total y solubilizados de hígado de ratones hembra (H) y macho (M) de ocho semanas de vida, control (c) y tratados con GH (6  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal/día) de forma intermitente (GH(int)) o continua (GH(cont)) durante cinco semanas, fueron analizados por RT-qPCR (a,b) e *immunoblotting* (IB) mediante un anticuerpo anti-Gal-1 (c,d). Posteriormente, las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (AC) para evaluar la homogeneidad del contenido proteico de las muestras. Se representa la media  $\pm$  ESM del número  $n$  de individuos por grupo experimental. Asteriscos indican diferencias significativas entre las condiciones señaladas según el test de ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

### 3. Análisis general de los resultados referidos a la relación entre GH y Gal-1

Los resultados obtenidos en los modelos animales en estudio muestran que la GH modula positivamente la expresión de Gal-1. En los ratones transgénicos se pone en evidencia que este efecto tiene lugar ya desde edades tempranas, cuando aún no se ha desarrollado completamente la patología hepática preneoplásica característica de estos animales. Incluso en ratones transgénicos de dos semanas, que presentan hipertrofia celular pero aún no desarrollaron hepatomegalia, se detectan mayores niveles de ARNm de Gal-1. Este efecto, acompañado de un mayor contenido proteico, también se evidencia

en ratones transgénicos de cuatro y nueve semanas. Asimismo, en los ratones transgénicos adultos se observa una mayor expresión de esta proteína principalmente en los focos de células displásicas.

Los estudios realizados en animales tratados con GH muestran que el efecto de la hormona sobre la expresión de Gal-1 ocurre incluso a menores dosis, en ratones donde la arquitectura tisular hepática está relativamente conservada y no hay evidencias de una patología preneoplásica en curso. Además, las determinaciones realizadas en estos ratones permiten hacer ciertas inferencias en cuanto a la relación existente entre estas proteínas. Por un lado, la inducción de Gal-1 mediada por GH estaría más vinculada a un perfil de concentración de la hormona en sangre de tipo continuo, ya que se observa un aumento de Gal-1 solo en los ratones sometidos a una administración sostenida de GH en comparación con los controles. La magnitud de esta diferencia es menor que la observada entre los ratones GH-transgénicos, que también presentan niveles continuos de GH en sangre, y sus hermanos de camada normales, lo que podría sugerir un efecto dosis-dependiente. En los ratones tratados de forma intermitente, en cambio, la administración de GH se asocia a una menor expresión de Gal-1 en los machos en comparación con los controles, como se observó para genes inducidos por la hormona vía STAT5b. Estas evidencias permitirían proponer la participación de este factor de transcripción en la inducción de la expresión de Gal-1 por la GH, aunque no es posible establecer una relación directa a partir de estos resultados.

## **SECCIÓN IV: Discusión general**

La utilidad de la administración de GH en la promoción del crecimiento corporal se conoce desde la década de 1950 cuando Raben y colaboradores reportaron el caso de un niño con enanismo hipofisario tratado satisfactoriamente con una preparación de hormona extraída de hipófisis humanas (Raben, 1958). A partir de la obtención de las primeras preparaciones de GH recombinante en 1985, sus aplicaciones en la práctica clínica han ido en aumento. Si bien existe un consenso generalizado acerca de la necesidad de administrar una terapia de reemplazo a niños que padecen deficiencia de GH, su administración en adultos sigue siendo discutida en algunos casos (Cook, 2002, Nilsson y col., 2007). Más aún, el tratamiento de niños con retraso del crecimiento no asociado al déficit de hormona constituye un tópico importante del debate acerca del uso de la GH en la práctica clínica (Quigley y col., 2005). Estas controversias se deben, principalmente, a la falta de estudios concluyentes sobre la potencial aparición de neoplasias a largo plazo asociadas al tratamiento con GH (Rose y col., 2014, Swerdlow y col., 2017)

En este trabajo de tesis se estudió la relación entre los efectos moleculares de niveles suprafisiológicos de GH y el desarrollo de tumores hepáticos. En particular, se generó un modelo de ratones tratados con GH que permitiese evaluar los efectos de una dosis baja de hormona pero suficiente para promover el crecimiento en ratones, emulando la terapia que reciben niños sin déficit de GH. Por ello, a lo largo de este trabajo se hizo referencia a esta dosis como “farmacológica”. Una vez establecida dicha dosis mediante una administración intermitente, la misma cantidad de GH se suministró de forma continua para comparar los efectos producidos por su perfil de concentración plasmática.

Los ratones sometidos al tratamiento intermitente presentaron un mayor crecimiento corporal que los controles, evaluado mediante la determinación del peso, la distancia nariz-ano y la longitud de los huesos de las patas traseras. En comparación con los ratones GH-transgénicos, que en la adultez duplican el peso corporal de sus hermanos de camada normales (Sotelo y col., 1998, Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2015), los ratones tratados con GH exhibieron un aumento moderado de peso respecto de los controles de aproximadamente el 15 % al finalizar el tratamiento. Un mes después de concluida la administración de hormona, se siguió observando una

diferencia de peso entre los ratones tratados y los controles, aunque la magnitud de la misma resultó menor.

Por el contrario, la misma dosis de GH administrada de forma continua no fue suficiente para promover el crecimiento corporal, aunque modificó el perfil de concentración de hormona en sangre. Esta menor eficacia del tratamiento continuo concuerda con lo que se ha descrito previamente en ratas adultas hipofisectomizadas tratadas con GH (Jansson y col., 1982, Isgaard y col., 1988, Maiter y col., 1988, Bick y col., 1992). Estudios realizados en ratas adultas normales mostraron, además, que el efecto sobre la ganancia de peso corporal que se alcanza con ambas formas de administración de hormona depende de la dosis (Azain y col., 1993). A bajas dosis, similares a las que se utilizaron en este trabajo, la administración intermitente genera un mayor aumento de peso corporal que el continuo. A medida que aumenta la dosis de hormona, la eficiencia de la administración sostenida en la promoción del crecimiento se incrementa hasta superar a la del tratamiento intermitente. De la misma forma, otros autores mostraron que para alcanzar el mismo efecto sobre el peso corporal con ambos tipos de tratamiento se necesita una dosis de GH cuatro veces mayor si esta es administrada de forma continua a ratas adultas hipofisectomizadas (Maiter y col., 1988).

Además de sus efectos sobre la promoción del crecimiento corporal, la GH tiene acciones a nivel metabólico (Mauras y col., 2005, Vijayakumar y col., 2011). En modelos animales y en pacientes con patologías ligadas al eje somatotrópico, tanto el exceso como el déficit de hormona generan cambios en el perfil lipídico y en parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa. La terapia de reemplazo en pacientes con deficiencia de GH no siempre corrige estos valores y el resultado final depende de la dosis, la edad del individuo y la duración del tratamiento (Oscarsson y col., 1996, Laursen y col., 2001, Simpson y col., 2002, Feldt-Rasmussen y col., 2004).

En los ratones tratados con dosis farmacológicas de GH para esta tesis, se detectaron alteraciones principalmente en el perfil lipídico, con efectos que varían según el tipo de administración de hormona. En los ratones sometidos a un tratamiento intermitente, los niveles de colesterol en circulación se encontraron aumentados en comparación con los controles y los de triglicéridos, levemente disminuidos. Un mes después de haber finalizado el tratamiento, se observó una diferencia similar entre los valores promedio de colesterol en sangre de los animales expuestos a la hormona y los controles,

aunque el efecto del tratamiento no resultó estadísticamente significativo a esta edad. Los cambios bioquímicos asociados al tratamiento intermitente con GH se asemejan a los que se generan por la sobreexpresión de la hormona. Los ratones GH-transgénicos adultos exhiben un aumento del colesterol y niveles normales o disminuidos de triglicéridos en sangre en comparación con sus hermanos de camada normales (Quaife y col., 1989, Frick y col., 2001, Olsson y col., 2005, Wang y col., 2007). En los ratones tratados con GH de forma continua no se percibieron cambios en los niveles de colesterol en circulación, pero se observó, solo en las hembras, una disminución significativa de la trigliceridemia en comparación con los controles correspondientes. El efecto de la GH sobre los niveles de triglicéridos concuerda con lo reportado en ratas hipofisectomizadas en las que el tratamiento con GH disminuye estos valores de forma significativa en las hembras, pero no en los machos, y únicamente si es administrada de forma sostenida (Oscarsson y col., 1989, Oscarsson y col., 1991).

En cuanto a los parámetros evaluados relacionados con el metabolismo de hidratos de carbono, los ratones tratados con GH presentaron una glucemia similar a la de los controles. La respuesta frente a una sobrecarga de glucosa se encontró sutilmente alterada y los niveles de insulina ligeramente incrementados respecto de los ratones no tratados. Estos efectos fueron más marcados en los machos que en las hembras. En los ratones GH-transgénicos, ante mayores niveles de hormona en circulación se profundizan estas alteraciones y, en consecuencia, a los dos meses de vida exhiben hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en presencia de valores normales de glucemia en ayunas (Quaife y col., 1989, McGrane y col., 1990, Berryman y col., 2006, Ding y col., 2011, Miquet y col., 2011). Asimismo, mientras que los ratones que sobreexpresan GH exhiben un mayor contenido hepático del receptor de insulina como consecuencia de la hiperinsulinemia asociada (Balbis y col., 1996, Dominici y col., 1998, Dominici y col., 1999a), el tratamiento con dosis farmacológicas de hormona en ratones normales no promovió cambios significativos en el contenido hepático del receptor. Estos resultados sugieren que el efecto de la exposición prolongada a la GH sobre el metabolismo de la glucosa sería dependiente de su concentración en circulación.

En lo que respecta a los efectos del tratamiento con GH específicamente sobre el hígado, la administración intermitente se asoció a un mayor peso de este órgano en comparación con los controles. Ante un tratamiento continuo

solo se evidenció un ligero aumento, no significativo, en el peso promedio de los hígados provenientes de ratones macho. Estos resultados están en concordancia con estudios realizados en ratas hipofisectomizadas tratadas con GH, en las que la hormona administrada de forma intermitente induce un mayor aumento del peso del hígado que la misma dosis administrada de forma sostenida (Isgaard y col., 1988). Cuando se analizó la relación entre el peso del hígado y el peso corporal, si bien se percibió un ligero aumento de este valor en los ratones tratados con GH en comparación con los controles de cada tratamiento, en ninguno de los casos resultó estadísticamente significativo. Es decir que, a diferencia de los ratones GH-transgénicos que exhiben marcada hepatomegalia (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016), dosis farmacológicas de hormona no inducen un crecimiento exacerbado de este tejido. Por el contrario, el efecto sobre el peso del hígado refleja el grado de promoción del crecimiento corporal que se alcanza con cada tipo de administración de GH.

Cuando se analizó la arquitectura hepática luego del tratamiento con GH, se observaron alteraciones histológicas ante los dos tipos de administración de hormona, aunque los efectos difirieron entre hembras y machos. Los cambios más marcados se detectaron en las hembras sometidas al tratamiento intermitente, las cuales exhibieron un aumento del tamaño de los hepatocitos, núcleos agrandados y mayor proliferación celular. En los machos tratados de la misma forma, se detectó hipertrofia celular y nuclear, pero sin cambios en el porcentaje de hepatocitos en proliferación. El tratamiento continuo solo generó alteraciones significativas en el hígado de los ratones macho, similares a las producidas por el tratamiento intermitente.

Las características histológicas del hígado de los ratones tratados con una dosis farmacológica de GH presentan cierta relación con la sucesión de cambios que se dan en función de la edad en los ratones GH-transgénicos. Cuando se estudian estos animales desde las dos semanas de vida, se observa, en primer lugar, hepatocitos de mayor tamaño que los de sus hermanos de camada no transgénicos, sin evidencias de una mayor proliferación celular ni hepatomegalia significativa. Luego, durante el período de crecimiento rápido dependiente de GH se percibe, además, un mayor porcentaje de células en proliferación y hepatomegalia (Martínez y col., 2016). En los ratones adultos, a estas alteraciones se le suman otras, características de lesiones preneoplásicas: pleomorfismo hepatocelular y nuclear, núcleos de mayor tamaño e

invaginaciones de la membrana nuclear (Orian y col., 1989, Quaife y col., 1989, Snibson y col., 1999, Miquet y col., 2013). Por consiguiente, los cambios detectados en los ratones tratados con dosis farmacológicas de GH, que varían en su magnitud de acuerdo con el tipo de administración y el sexo del animal tratado, se asemejan a los observados en los ratones GH-transgénicos en crecimiento. El hígado de ratones que sobreexpresan IGF1 no presenta estas características, por lo que las alteraciones histológicas asociadas a niveles suprafisiológicos de GH serían producidas directamente por la hormona (Quaife y col., 1989).

No obstante, si la administración de GH concluye al finalizar el período de crecimiento, el hígado recupera su arquitectura normal en el mes posterior, asemejándose al tejido de los ratones que no recibieron el tratamiento. De acuerdo con estos resultados, los cambios detectados en el parénquima hepático de los ratones tratados de forma intermitente no progresarían hacia lesiones con mayor significancia clínica, como en los ratones GH-transgénicos, si el tratamiento se discontinúa. Es probable que el aumento del tamaño de los hepatocitos y el incremento en su grado de proliferación ocurran como parte del proceso de crecimiento de este órgano que acompaña al crecimiento corporal inducido por dicho tratamiento. Del mismo modo, en las hembras, el tratamiento continuo que no fue suficiente para promover el crecimiento corporal tampoco produjo cambios relevantes en el hígado. Distinto es el caso de los machos sometidos a una administración continua de GH en los que, si bien el tratamiento no fue efectivo en la promoción del crecimiento corporal, el peso del hígado se encontró levemente aumentado en un contexto donde además se detectó hipertrofia de los hepatocitos y un mayor porcentaje de células en proliferación.

Después de lo expuesto anteriormente resulta evidente que un tratamiento con dosis farmacológicas de GH produce cambios más profundos en el hígado cuando modifica el perfil de hormona circulante. Es decir, la administración de GH de forma sostenida produce más efectos cuando el perfil de hormona endógena es de tipo pulsátil, y viceversa. Por ende, los efectos generados por ambos tipos de tratamiento difieren entre sexos: mientras que el intermitente induce cambios más profundos en las hembras, el continuo lo hace en los machos. De hecho, en las hembras tratadas con GH de forma continua prácticamente no se observaron alteraciones histológicas asociadas al tratamiento, como se mencionó previamente. De la misma forma, en los ratones

GH-transgénicos, donde los niveles de hormona en circulación son también continuos, los machos exhiben los cambios histológicos más profundos. Sin embargo, la elevada concentración de GH en circulación también repercute en el hígado de las hembras, de modo que en ambos sexos se detectan importantes alteraciones hepáticas desde edades tempranas, que luego progresan a tumores (Snibson y col., 1999, Miquet y col., 2013). Las observaciones realizadas en ambos modelos probarían que los ratones macho son más susceptibles a niveles continuamente elevados de GH. Sin embargo, aún no es posible dilucidar si esta mayor susceptibilidad está relacionada con la mayor incidencia de hepatocarcinoma en los machos, evidenciada tanto en humanos como en modelos murinos (Montalto y col., 2002, Ruggieri y col., 2010).

Las características histológicas del hígado de los ratones GH-transgénicos se asocian a la desregulación de numerosas vías de señalización relacionadas con procesos de crecimiento y proliferación celular (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016). Estos animales presentan una mayor expresión y activación de mediadores de las vías de PI3K/Akt, MAPK/ERK1/2, STAT3, NFκB y β-catenina, entre otros. En cuanto a la vía JAK2/STAT5, si bien otros autores postularon a STAT5 como el principal mediador de la patología hepática observada en los ratones GH-transgénicos (Friedbichler y col., 2012), los estudios de nuestro grupo de trabajo en ratones adultos mostraron que no habría una mayor activación basal de este factor de transcripción en comparación con los ratones normales, a pesar de los elevados niveles de hormona circulante (González y col., 2002, Miquet y col., 2004, Sotelo y col., 2008). Sin embargo, la vía JAK2/STAT5 se encuentra más activa durante el período de crecimiento rápido dependiente de GH en el hígado de los ratones transgénicos, constituyendo uno de los principales mecanismos por el cual estos animales exhiben un crecimiento corporal exacerbado en comparación con sus hermanos de camada normales (Martínez y col., 2015).

Cuando se evaluó la activación y contenido proteico de mediadores de las vías de señalización de GH en los ratones tratados con dosis farmacológicas de hormona, no se encontraron cambios tan marcados como los que produce la sobreexpresión de GH, en concordancia con los menores niveles de hormona en circulación. Conforme a lo descrito en los ratones transgénicos adultos, los ratones tratados con GH administrada de forma intermitente o continua tampoco presentaron, al finalizar el tratamiento, una

mayor fosforilación de STAT5 en comparación con los animales control. En los ratones hembra y macho tratados con GH de forma intermitente, los niveles de STAT5 fosforilado y de ARNm de GHR, IGF1, CIS y SOCS2 mostraron variaciones al finalizar el tratamiento que sugerirían la sincronización de los ciclos de activación y desactivación de la vía JAK2/STAT5 ante una inyección de GH. Estos resultados indican que, incluso luego de cinco semanas de tratamiento, el tejido hepático muestra una respuesta conservada a la hormona cuando esta es administrada de forma intermitente en dosis farmacológicas.

En los machos, la respuesta aguda de STAT5 que se genera ante una inyección de GH se asemeja a la activación de la vía en condiciones fisiológicas ante cada pulso de hormona. Las hembras, en cambio, mantienen una respuesta sostenida de STAT5 en condiciones fisiológicas, menor que la respuesta promedio de los machos, debido a la ausencia de periodos prolongados libres de GH en circulación (Choi y col., 1999, Tannenbaum y col., 2001, Waxman y col., 2006). La masculinización del perfil de GH en sangre en las hembras tratadas de forma intermitente, que se manifiesta en la mayor expresión de EGFR y MUPs, conlleva cambios en la activación de la vía JAK2/STAT5 y, en consecuencia, en el contenido de proteínas moduladoras de la acción de la GH. En particular, las hembras tratadas con la hormona exhiben un mayor contenido de CIS que los machos tratados. Sin embargo, a pesar de estas diferencias a nivel molecular, el tratamiento intermitente con GH promueve el crecimiento corporal en hembras y machos en un grado similar. Considerando el rol de la vía JAK2/STAT5 en la inducción del crecimiento corporal y el efecto de la administración intermitente de GH en este aspecto, es probable que en algún momento del tratamiento haya existido una mayor activación de esta vía en hígado y/o en otros tejidos en comparación con los ratones control, como sucede en los ratones GH-transgénicos en crecimiento.

En los ratones tratados de forma continua, si bien el estímulo constante con GH tampoco se asoció a una mayor fosforilación de STAT5, se detectó un marcado aumento en los niveles de expresión de genes que se inducen a través de este factor de transcripción. En particular, los ratones tratados con GH presentaron mayores niveles de ARNm de GHR, CIS y SOCS2 en comparación con los controles. En los machos, además, el tratamiento redundó en una mayor expresión de IGF1. En los ratones transgénicos, los niveles continuamente elevados de GH dan lugar a cambios similares en la expresión de estos genes, que se evidencian desde edades tempranas y perduran en los

adultos. Sin embargo, solo se verifica una mayor activación basal de STAT5 en estos ratones durante el período de crecimiento, como se mencionó previamente. El balance entre moduladores negativos y positivos va variando a lo largo de la vida en los ratones transgénicos y, de esta forma, permiten una mayor activación de STAT5 durante el crecimiento pero limitan más tarde su fosforilación a pesar de los niveles elevados de GH (Martínez y col., 2015). En los ratones tratados con la hormona de forma continua ocurriría un fenómeno similar, con un balance a favor de la restricción de la fosforilación de STAT5 mediada, al menos en parte, por los supresores CIS y SOCS2. Si esta limitación de la señalización de GH tuviera lugar durante todo el tratamiento, podría constituir el mecanismo responsable de que la administración sostenida de hormona no promueva el crecimiento corporal.

En referencia a los mayores niveles de expresión de IGF1 asociados al tratamiento continuo con GH, es importante destacar que el hígado es la principal fuente de IGF1 circulante y que niveles elevados de este potente agente proliferativo y antiapoptótico en circulación han sido asociados con una mayor incidencia de neoplasias, principalmente cáncer colorrectal, de próstata y de mama (Roddam y col., 2008, Key y col., 2010, Rinaldi y col., 2010). Si bien no hay estudios concluyentes que prueben que niveles suprafisiológicos de IGF1 como los que podrían generarse durante una terapia con GH se asocian a un mayor riesgo de tumorigénesis, en la práctica clínica se busca mantener su concentración plasmática dentro del rango de valores normales. Por consiguiente, el aumento de la expresión hepática de IGF1 percibido en los machos sometidos a una administración continua de GH cobra relevancia a la hora de analizar la seguridad de este tipo de tratamiento (Pfäffle, 2015).

A diferencia de STAT5, existe una clara vinculación entre STAT3 y los procesos de tumorigénesis hepática. Este factor de transcripción participa en mecanismos de inflamación, transformación, proliferación e invasión celular, y se encuentra constitutivamente activo en el hepatocarcinoma y otros tumores, pero no en células normales (Aggarwal y col., 2009). Asimismo, los ratones GH-transgénicos presentan una mayor activación de esta vía incluso desde el período de crecimiento (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016). Mientras que la activación de STAT3 no se modificó sustancialmente por el tratamiento intermitente con GH, en los ratones tratados de forma continua, los niveles de STAT3 fosforilado duplicaron aproximadamente los de los animales control.

Otras vías de señalización, como las vías de la PI3K/Akt y de las MAPK/ERK1/2, se vinculan estrechamente con la promoción del crecimiento y proliferación celular. En particular, la activación de Akt está relacionada con el aumento del tamaño de los hepatocitos (Haga y col., 2009). Asimismo, ratones que sobreexpresan esta proteína exhiben marcada hepatomegalia (Ono y col., 2003). En los ratones GH-transgénicos, la mayor activación de Akt se evidencia desde edades tempranas y muestra cierta correlación con los cambios histológicos y el desarrollo de hepatomegalia de estos animales a lo largo del período de crecimiento (Martínez y col., 2016). Por el contrario, la vía de las MAPK/ERK1/2 no estaría particularmente implicada en los mecanismos que conducen a las alteraciones hepáticas de los ratones GH-transgénicos, aunque en los adultos se percibe un aumento en el contenido proteico de ERK1/2 en comparación con los ratones normales (Miquet y col., 2008, González y col., 2010, Martínez y col., 2016).

Dadas las características histológicas del hígado de los ratones tratados con GH, cabría esperar cambios moleculares al menos en la vía de Akt que justifiquen estas alteraciones hepáticas. No obstante, no se detectó una mayor activación de las vías de la PI3K/Akt ni de las MAPK/ERK1/2 después de cinco semanas de tratamiento intermitente o continuo con GH. De hecho, en algunos casos los niveles de activación de sus mediadores fueron incluso menores que en los animales control. Pese a ello, no puede descartarse su participación en los procesos de hipertrofia e hiperproliferación de los hepatocitos asociados al tratamiento con GH, ya que podría haber tenido lugar al inicio del tratamiento. Siguiendo con esta hipótesis, posteriormente cobrarían relevancia mecanismos de adaptación y, en consecuencia, la activación de las vías de la PI3K/Akt y/o de las MAPK/ERK1/2 estaría restringida al final del tratamiento a pesar de los niveles suprafisiológicos de GH. Como resultado, no se observó una mayor fosforilación de Akt y sus sustratos o de ERK1/2 en los animales tratados con la hormona y un mes después de finalizada la administración de GH el tamaño de sus hepatocitos fue similar al de los controles.

Cabe destacar que, si bien las vías de la PI3K/Akt y de las MAPK/ERK1/2 no se encontraron más activas al finalizar el tratamiento continuo, los niveles sostenidos de GH en circulación generaron un aumento de la expresión de Akt, mTOR y ERK1/2 en los machos en comparación con los controles. En las hembras tratadas de forma continua los cambios fueron en general más sutiles, pero igualmente se percibió un incremento significativo de

la expresión de mTOR en comparación con los animales control. En los ratones GH-transgénicos, frente a mayores niveles de GH, no solo aumenta el contenido proteico de mediadores de estas vías de señalización, sino también hay una hiperactivación de la mayoría de ellos (Miquet y col., 2013, Martínez y col., 2016). Durante el tratamiento con GH las menores concentraciones de hormona permitirían que el sistema mantenga la fosforilación de Akt, mTOR y ERK1/2 en niveles similares a los de los controles. Sin embargo, el aumento del contenido proteico podría constituir un primer paso hacia una hiperactivación de esta vía si los mecanismos que limitan su activación dejaran de ser suficientes.

El aumento de la expresión de ERK1/2 se registró también en los machos ante una administración intermitente de GH, a diferencia de los demás mediadores cuya expresión solo se modificó por el tratamiento continuo. Sin embargo, al finalizar la administración de GH, el aumento de ERK1/2 revierte dentro del mes siguiente. Considerando los resultados obtenidos en los ratones tratados con GH y los antecedentes en ratones que sobreexpresan la hormona, podría postularse un efecto positivo de la GH sobre la expresión proteica de ERK1/2 en ratones adultos, que tiene lugar incluso ante bajos niveles de hormona y de forma independiente a su perfil de concentración en circulación.

En los ratones GH-transgénicos adultos, la hiperactivación de distintas vías de señalización resulta en una mayor expresión de protooncogenes, como las ciclinas D1 y E y los factores de transcripción c-Myc, c-Fos y c-Jun, en comparación con sus hermanos de camada normales (Miquet y col., 2013, González y col., 2017). En los ratones tratados con GH de forma intermitente, no se registró un aumento significativo de la expresión de estos genes y los cambios percibidos parecerían acompañar la sincronización de los ciclos de activación de la señalización de GH ante cada inyección de hormona. Por un lado, se observó una disminución de la expresión de c-Myc en los ratones tratados de forma intermitente en relación a los controles, dando lugar a un perfil muy similar al de CIS. Por otro lado, el tratamiento intermitente equiparó los niveles de expresión de ciclina D1 entre hembras y machos, ya que disminuyó su expresión en las hembras y aumentó levemente su expresión en los machos en comparación con sus respectivos controles. Si bien son numerosas las vías de señalización que inducen la expresión de estos genes, ambos pueden ser activados a través de STAT5 (Bowman y col., 2000). Dado que ciclina D1 y c-Myc presentan, frente a un tratamiento intermitente con GH, perfiles de expresión muy similares a los de otros genes que se activan a

través de esta vía, como CIS y SOCS2, es posible que los cambios reflejen la preponderancia en este contexto de su activación a través de la vía JAK2/STAT5.

La administración sostenida de GH, por el contrario, generó aumentos en la expresión de algunos protooncogenes en comparación con los ratones no tratados. En los machos tratados de forma continua, el tratamiento dio lugar a un aumento muy marcado de ciclina D1, con niveles de ARNm que alcanzaron los de las hembras control, probablemente debido al cambio en el perfil de GH en circulación. Asimismo, se evidenció un aumento en los niveles de c-Myc en los animales sometidos a una administración sostenida de hormona en comparación con los controles. Este perfil de expresión de c-Myc también se asemeja al obtenido para CIS en los ratones tratados de forma continua.

Llamativamente, el aumento de c-Myc asociado al tratamiento resultó significativo solo en las hembras, que fueron, en general, las menos afectadas por el tratamiento con GH tanto a nivel histológico como molecular. La expresión de c-Myc en hígado aumenta rápidamente por un estímulo proliferativo y precede a los procesos de división celular (Murphy y col., 1987, Wierstra y col., 2008). Además, su sobreexpresión en el hígado de ratones adultos promueve el crecimiento de los hepatocitos, la replicación del ADN y, luego de un largo período de latencia, el desarrollo de neoplasias (Beer y col., 2004). Sobre la base de las consideraciones anteriores, los mayores niveles de ARNm de c-Myc en las hembras sometidas al tratamiento continuo podrían anticipar la aparición de cambios a nivel histológico.

En este punto resulta interesante discutir los resultados obtenidos de expresión de protooncogenes en los ratones GH-transgénicos en crecimiento. En estos ratones se observó un aumento de c-Myc a las dos semanas de vida en comparación con sus hermanos de camada normales, estadísticamente significativo solo en las hembras. A esta edad, el porcentaje de células en proliferación es similar entre ratones normales y transgénicos, pero a partir del mes de vida comienza a evidenciarse una mayor proliferación de los hepatocitos (Snibson y col., 1999, Martínez y col., 2016). Este escenario se asemeja al observado en las hembras tratadas con GH de forma continua donde se evidencia un aumento de c-Myc en ausencia de alteraciones histológicas.

En lo que respecta a los demás protooncogenes evaluados, ciclina D1, ciclina E, c-Jun y c-Fos, la desregulación de su expresión en los ratones GH-

transgénicos en crecimiento estaría más relacionada con la profundización de las lesiones hepáticas que se observan en los adultos que con su inicio y progresión a lo largo del crecimiento. Estos resultados también se asemejan a lo observado en los ratones tratados con GH en los que no se evidenció una relación directa entre los niveles de expresión de los protooncogenes analizados y los cambios inducidos por el tratamiento sobre el crecimiento y la proliferación de los hepatocitos.

De acuerdo con los resultados presentados hasta el momento, la administración intermitente de GH surgiría como más segura que la administración continua de acuerdo con sus efectos a nivel molecular. Sin embargo, el tratamiento intermitente se asocia con variaciones más marcadas en cuanto al peso del hígado, el tamaño de los hepatocitos y, en las hembras en particular, el porcentaje de células en proliferación. Uno de los posibles mecanismos que podrían contribuir a estos efectos de la administración intermitente de GH es la regulación que ejerce la hormona sobre los niveles de EGFR. En las hembras sometidas a este tratamiento, el cambio en el perfil de concentración plasmática de GH induce un aumento sustancial del contenido de este receptor en comparación con las hembras control (Jansson y col., 1988, Díaz y col., 2014). Niveles elevados de EGFR, su activación constitutiva o alteraciones en su señalización promueven procesos de proliferación y supervivencia celular que pueden facilitar procesos tumorigénicos (Henson y col., 2006, Normanno y col., 2006).

En ratones con distintas concentraciones de GH en sangre, no solo se producen variaciones en el contenido hepático de EGFR, sino también a nivel de las vías de señalización que este desencadena. Los efectos no siempre correlacionan de manera directa con el contenido del receptor: una mayor abundancia de EGFR no implica necesariamente una mayor capacidad de respuesta a su ligando, como ocurre en los ratones GH-transgénicos. En estos animales, las vías de STAT3 y STAT5 se encuentran incluso desensibilizadas y no responden a un estímulo con EGF a pesar del mayor contenido de EGFR (González y col., 2010, Díaz y col., 2012). Por el contrario, en el caso de ratones hembra adultos tratados con bajas dosis de GH (1 µg/g de peso corporal/día) por cinco días, la mayor expresión del receptor se asocia a una mayor respuesta de sus vías de señalización (Díaz y col., 2014).

En función de las consideraciones anteriores, es evidente que la sensibilidad al EGF del tejido hepático expuesto a niveles suprafisiológicos de

GH no depende únicamente del contenido de EGFR, sino que el tiempo durante el cual los animales están expuestos a la hormona y su nivel en circulación también son factores determinantes. Por consiguiente, se evaluó la capacidad de respuesta a este factor de crecimiento en las hembras tratadas con GH de forma intermitente en las que, como se mencionó anteriormente, se observó un marcado efecto sobre el crecimiento y proliferación de los hepatocitos en presencia de niveles elevados de EGFR en comparación con los ratones control.

Luego de cinco semanas de tratamiento con GH, el estímulo agudo con EGF generó una mayor respuesta de STAT3 y STAT5 en aquellos animales tratados previamente con GH. En cambio, la respuesta de Akt y ERK1/2 fue similar a la observada en los ratones estimulados con EGF que no recibieron GH previamente. Estos resultados, junto con los antecedentes de los ratones GH-transgénicos muestran que la modulación de la respuesta de STAT3 y STAT5 frente a un estímulo con EGF varía de acuerdo con el nivel de GH y su perfil de concentración en sangre. Mientras que en los ratones transgénicos estas vías se encuentran desensibilizadas, en los ratones tratados con GH de forma intermitente su respuesta es mayor que en los animales control, a pesar de que en ambos modelos los niveles elevados de GH se asocian a un mayor contenido de EGFR.

En consecuencia, si bien la administración intermitente de GH no modificó sustancialmente la activación basal de vías relacionadas con crecimiento y proliferación celular, que pueden ser activadas tanto a través de GHR como de EGFR, los efectos sobre la sensibilidad hepática al EGF deben ser considerados al analizar la seguridad de esta forma de administración de GH en relación al desarrollo de lesiones hepáticas, especialmente en las hembras.

En estudios sobre los mecanismos involucrados en el desarrollo de los tumores hepáticos, galectina-1 (Gal-1) aparece como uno de los actores involucrados en este proceso (Chung y col., 2002, Bacigalupo y col., 2013). En condiciones fisiológicas, esta proteína cumple un rol fundamental en la matriz extracelular ya que, mediante su unión a  $\beta$ -galactósidos, modula las uniones célula-célula y célula-matriz (Elola y col., 2007, Yang y col., 2008). En condiciones patológicas, Gal-1 controla el proceso de hepatocarcinogénesis: en estadios tempranos actúa como un agente protector por sus acciones antiinflamatorias y en estadios más avanzados contribuye al crecimiento del tumor y su capacidad metastásica mediante la promoción de la adhesión, migración y supervivencia celular (Liu y col., 2005, Espelt y col., 2011, Ito y col.,

2012, Bacigalupo y col., 2015). En pacientes con hepatocarcinoma se encontraron niveles elevados de Gal-1 y su expresión correlaciona con la agresividad del tumor (Spano y col., 2010, Wu y col., 2012, Chen y col., 2014). Por consiguiente, se evaluó la potencial relación entre la GH y Gal-1 en el desarrollo de tumores hepáticos mediante la determinación de su expresión en presencia de distintos niveles de hormona.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ratones GH-transgénicos y en aquellos expuestos a una menor dosis de hormona administrada de forma sostenida, la GH modularía positivamente la expresión de Gal-1 en hígado. Este efecto se pone de manifiesto incluso antes que se desarrolle la patología hepática preneoplásica o en ausencia de ella, según lo observado en los ratones transgénicos en crecimiento o en aquellos tratados con GH, respectivamente. Asimismo, dependería del perfil de hormona en circulación, ya que los ratones tratados con GH de forma intermitente no mostraron un aumento de la expresión de Gal-1. En el hígado de los ratones GH-transgénicos adultos, Gal-1 se localizó en el citoplasma de los hepatocitos displásicos y no se observó su expresión en las zonas donde la estructura del parénquima hepático se encontró relativamente conservada. Estas evidencias sugerirían algún tipo de participación de Gal-1 en el desarrollo de los tumores hepáticos asociados a niveles continuamente elevados de GH.

En conjunto, los resultados de esta tesis mostraron que la administración continua de GH se asocia con cambios a nivel molecular más profundos que los producidos por la administración intermitente y que muchas de estas alteraciones son similares a las que se han descrito previamente en el hígado de los ratones GH-transgénicos (Miquet y col., 2008, Miquet y col., 2013). Mientras que el tratamiento continuo generó cambios principalmente en el contenido proteico de mediadores de la señalización de GH, en los ratones transgénicos adultos se evidencia, además, una mayor activación basal de prácticamente todas las vías evaluadas. Cuando se analiza el desarrollo de estos cambios moleculares a lo largo del período de crecimiento de los ratones transgénicos se observa que, en general, en primer lugar aumenta la expresión de las proteínas de señalización y luego se manifiesta una mayor activación de las mismas (Martínez y col., 2016).

Ante las evidencias presentadas, puede inferirse que el estímulo constante de GH inicialmente daría lugar a un aumento en el contenido proteico de mediadores como Akt, mTOR y ERK1/2 y al mismo tiempo

desencadenaría mecanismos de modulación negativa, como por ejemplo aquellos mediados por CIS y SOCS2. El balance entre estos mecanismos y el estímulo constante de la GH sobre su receptor es lo que finalmente determina el grado de activación de las vías de señalización mencionadas. En los ratones transgénicos, la exposición sostenida a niveles muy elevados de hormona perturbaría este equilibrio a lo largo del tiempo, dando lugar a una activación secuencial de estas vías durante la vida del animal. Los ratones tratados con dosis farmacológicas de hormona estarían en una situación intermedia donde se evidencia un aumento del contenido proteico de mediadores de la señalización de GH, pero no de la activación de la mayoría de ellos.

Sin embargo, en los animales sometidos a una administración continua de GH se percibe una mayor activación de STAT3 y una mayor expresión de c-Myc y Gal-1. Estos cambios en sí mismos no implican necesariamente el inicio de un proceso de daño celular promovido por la GH, pero podrían contribuir a generar un ambiente propicio para la transformación de los hepatocitos ante un estímulo protumorigénico. En los ratones GH-transgénicos en crecimiento, la desregulación de STAT3 y el aumento de la expresión de c-Myc y Gal-1 son de las primeras alteraciones que se detectan. Además, el aumento en la producción hepática de IGF1 en los ratones macho tratados con GH puede incrementar el riesgo de neoplasias en otros tejidos. Finalmente, es necesario considerar que se necesitarían dosis más altas de hormona para generar un aumento significativo en el tamaño corporal si se la administra de forma continua, lo que podría conducir a una desregulación de estas vías durante el tratamiento, como se observa en los ratones GH-transgénicos.

# CONCLUSIONES

---

## CONCLUSIONES

El estudio de los efectos de dosis farmacológicas de GH en ratones sin alteraciones en el eje somatotrópico permitió una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que tienen lugar en el tejido hepático en respuesta a niveles suprafisiológicos de GH. En presencia de niveles muy elevados de hormona por períodos prolongados, como ocurre en los modelos de animales transgénicos, las profundas alteraciones moleculares que se generan, así como el contexto fisiopatológico existente, dificultan la comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso de transformación celular asociado a estos niveles de GH. En cambio, a partir del modelo de ratones tratados con dosis farmacológicas de GH se pudo explorar en detalle la respuesta inicial del tejido a concentraciones de hormona que se encuentran por encima de los niveles normales. El análisis en conjunto de este modelo y el de ratones GH-transgénicos dio la posibilidad de evaluar la relación que podría existir entre algunos efectos moleculares de la GH y la dosis y duración del período de exposición a la hormona. Asimismo, se compararon los efectos de la GH administrada de forma intermitente o continua, en vistas del interés creciente en desarrollar formulaciones de liberación sostenida que permitan espaciar el tiempo entre las inyecciones de hormona en los pacientes en tratamiento. Esta comparación no solo confirmó gran parte de la información disponible en bibliografía respecto de la eficacia y seguridad a corto plazo de ambos tipos de tratamiento con GH, sino que también aportó nuevos datos en referencia al potencial oncogénico de cada forma de administración.

La GH administrada de forma intermitente resultó más efectiva en la promoción del crecimiento corporal en comparación con la administración sostenida. Los efectos del tratamiento intermitente se evidenciaron tanto a nivel del crecimiento longitudinal como del peso corporal que, en parte, ocurre por el incremento del tamaño de órganos como el hígado, el corazón y los riñones. Dado que estos aumentos son proporcionales, los animales tratados con dosis farmacológicas de GH no exhibieron organomegalia significativa. En cuanto a los posibles efectos adversos del tratamiento, los ratones sometidos a una administración intermitente presentaron mayores niveles de colesterol en comparación con los controles. En cambio, el tratamiento continuo no tuvo efectos negativos significativos sobre el perfil metabólico de los animales en estudio.

El aumento del peso del hígado en respuesta al tratamiento con GH ocurre a expensas de un mayor crecimiento y proliferación de los hepatocitos. En los ratones tratados de forma intermitente se registraron los cambios histológicos más marcados, en concordancia con el efecto contundente de este tratamiento sobre el peso del hígado y el tamaño corporal. En cambio, a pesar de que el tratamiento continuo no fue efectivo en promover el crecimiento longitudinal ni en hembras ni en machos, estos últimos presentaron un mayor tamaño de los hepatocitos y un mayor porcentaje de células en proliferación que dio lugar a un ligero aumento del peso del hígado en comparación con los controles. En las hembras tratadas de forma continua, en cambio, no se evidenciaron alteraciones en la arquitectura hepática. Si bien no se alcanzó a percibir un aumento en la relación entre el peso del hígado y el peso corporal, los efectos histológicos observados en los machos cobran relevancia en un contexto donde el tratamiento no es suficiente para promover el crecimiento corporal. Por consiguiente, es de esperar que estas alteraciones se profundicen si se administrara una dosis de GH mayor que logre promover el crecimiento corporal, como se observa en los ratones GH-transgénicos.

En los ratones GH-transgénicos, niveles elevados de hormona promueven cambios moleculares que se manifiestan incluso antes de que haya evidencias de alteraciones histológicas importantes y hepatomegalia (Martínez y col., 2016). Por ende, se evaluaron los efectos moleculares de ambas formas de administración de la GH, tanto en machos como en hembras. En las hembras tratadas de forma intermitente, los cambios más pronunciados se debieron principalmente a la disrupción del perfil fisiológico de concentración de GH en circulación, que pasa de ser de tipo continuo a intermitente. Por ende, la expresión de proteínas que dependen del perfil de hormona en sangre, como MUPs y EGFR, se vio afectada. Además, se observaron variaciones que indicarían la sincronización de la activación de la vía JAK2/STAT5 ante cada estímulo con GH, pero no se observaron cambios significativos en la activación de las vías de STAT3, PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2. Sin embargo, el aumento sustancial del contenido de EGFR asociado a esta forma de administración de GH en las hembras promueve una mayor sensibilidad de la vía de los STATs frente a un estímulo con EGF, la cual ha sido ampliamente relacionada con procesos de tumorigénesis hepática (Bowman y col., 2000, Berasain y col., 2014).

En los machos, que en condiciones fisiológicas ya presentan un perfil de GH circulante de tipo intermitente, los cambios registrados solo reflejarían la

sincronización de los ciclos de activación y desactivación de la vía JAK2/STAT5 ante cada inyección de hormona. Al igual que en las hembras tratadas, tampoco se detectó una mayor activación de las demás vías de señalización de GH analizadas, pero a diferencia de ellas, los machos presentaron un aumento de la expresión de ERK1/2 asociado al tratamiento. Este efecto de la GH sería independiente de la forma de administración de hormona ya que también se observa en los machos tratados de forma continua. Sin embargo, un mes después de haber concluido el tratamiento los niveles de expresión de ERK1/2 nuevamente se asemejan a los de los ratones no tratados.

En consecuencia, la activación sincronizada de la vía JAK2/STAT5 que exhibieron hembras y machos ante cada inyección de GH indicaría que el organismo logró adaptarse a estos aumentos intermitentes de hormona, incluso después de un largo período de tratamiento. Asimismo, el análisis realizado en estos ratones luego de un mes de finalizado el tratamiento mostró que la administración intermitente no genera efectos significativos a largo plazo y que los cambios moleculares producidos por el tratamiento que se observaron a las ocho semanas de vida, revierten.

El tratamiento continuo, por el contrario, se asoció a una mayor cantidad de cambios moleculares, algunos de los cuales se asemejan a los que presentan los ratones GH-transgénicos. A pesar de que el análisis histológico del hígado de los ratones tratados con GH reveló alteraciones en los machos y un parénquima conservado en las hembras, la administración de la hormona promovió cambios moleculares significativos en ambos sexos. En estos animales se observaron aumentos en el contenido proteico de mediadores de las vías de PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2, pero no una mayor activación de los mismos. Además, el tratamiento continuo se asoció a una mayor activación de STAT3 y una mayor expresión de IGF-1, c-Myc y galectina-1. Estos cambios, con la excepción del aumento de c-Myc, fueron más marcados en los machos que en las hembras, probablemente debido a la disrupción, por la administración continua de GH, del perfil de concentración plasmática de hormona característico de los machos. Aunque en el momento que finaliza el tratamiento la activación de la mayoría de las vías evaluadas fue similar a la de los ratones control, los cambios registrados podrían constituir un paso previo a la desregulación de estas vías y un factor de riesgo que aumente la susceptibilidad de los animales tratados con GH frente a un estímulo protumorigénico.

En síntesis, los resultados de esta tesis muestran que el tratamiento con GH no es completamente inocuo en ninguna de las formas de administración evaluadas. Se evidenciaron cambios histológicos y/o moleculares en el hígado asociados tanto al tratamiento intermitente como al continuo en ambos sexos. Sin embargo, el tratamiento intermitente no solo resulta el más eficaz en la promoción del crecimiento corporal, por lo que su objetivo se alcanzaría con menores dosis de hormona, sino que también sería la forma de administración más segura. Ante un tratamiento intermitente con GH, el tejido hepático muestra evidencias de que lograría adaptarse a estos niveles farmacológicos de hormona y los efectos potencialmente adversos detectados al finalizar el tratamiento resultarían transitorios. Los cambios detectados ante una administración continua de GH, por el contrario, podrían contribuir a generar un ambiente propicio para el desarrollo de tumores incluso en una dosis que resulta insuficiente para promover el crecimiento corporal.

# RESUMEN

---

## RESUMEN

La hormona de crecimiento (GH) promueve el crecimiento corporal longitudinal posnatal y tiene acciones sobre el metabolismo de lípidos, proteínas e hidratos de carbono. La GH se sintetiza en la hipófisis, desde donde se libera a circulación en forma de pulsos con una frecuencia que varía entre sexos. Estos perfiles de secreción diferenciales determinan la tasa de crecimiento peripuberal y la función hepática de cada sexo. Una vez en circulación, la GH actúa principalmente en hígado, músculo, hueso y tejido adiposo, tanto directamente como a través de la síntesis del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF1), de acción local y endócrina.

La unión de la GH a su receptor (GHR) desencadena la activación de múltiples vías de señalización, entre las que se encuentra la de los transductores de la señal y activadores de la transcripción, STAT5 y STAT3. La activación de STAT5 es fundamental para las acciones sexualmente dimórficas de la GH. Además, la hormona promueve la activación de la cascada de las MAP quinasas y de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt. A través de estas vías, la GH induce la expresión de genes vinculados con el crecimiento, proliferación y supervivencia celular.

La deficiencia de GH (GHD) durante la niñez resulta en un severo retraso del crecimiento. En los adultos, el déficit se manifiesta principalmente a nivel metabólico. En la actualidad, la aplicación de GH en la clínica ya no se limita a casos de GHD, sino también a diversas patologías asociadas a un menor crecimiento. Si bien no hay estudios concluyentes en pacientes expuestos a niveles terapéuticos de hormona, se han publicado numerosos estudios que asocian concentraciones elevadas de GH e IGF1 con un mayor riesgo de desarrollar tumores. En consecuencia, es fundamental entender los mecanismos que se desencadenan ante niveles suprafisiológicos de GH y que podrían vincularse con la aparición de neoplasias.

En esta tesis se exploraron los efectos de una dosis baja de GH administrada en ratones normales durante el período de crecimiento, simulando la terapia que reciben niños sin déficit de hormona. El estudio se centró en el hígado, dado que ratones que sobreexpresan GH exhiben una mayor incidencia de carcinoma hepatocelular (HCC) en edades avanzadas. Se evaluaron dos formas de administración, intermitente y continua, que se asemejan a los perfiles de GH de machos y hembras, respectivamente, y que tienen relevancia

en la práctica clínica debido al creciente interés en el desarrollo de formulaciones de liberación sostenida de hormona.

La GH administrada de forma intermitente, en una dosis suficiente para promover el crecimiento corporal, generó un aumento proporcional del peso del hígado a expensas de un mayor crecimiento y proliferación de los hepatocitos. A nivel molecular, se evidenció una respuesta conservada de STAT5 al finalizar el tratamiento, similar a la que ocurre en condiciones fisiológicas luego de cada pulso de hormona, y no se observaron variaciones significativas en la activación de las vías de STAT3, PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2. En las hembras, el tratamiento intermitente induce un aumento del contenido del receptor de EGF (EGFR) y una mayor respuesta de la vía de los STATs frente a un estímulo agudo con este factor de crecimiento. La señalización desregulada a través de EGFR se ha vinculado al desarrollo de HCC. Sin embargo, un mes después de haber finalizado el tratamiento los niveles de EGFR vuelven a los valores normales.

Cuando se administró la misma dosis de GH de forma continua, el tratamiento no promovió el crecimiento corporal, aunque se observaron cambios en el hígado a nivel molecular. Los ratones tratados con GH presentaron, en comparación con los controles, una mayor expresión de GHR, IGF1 y los moduladores negativos de la señalización de GH, CIS y SOCS2. Además, exhibieron una mayor activación de STAT3 y un aumento en el contenido proteico de Akt, mTOR y ERK1/2. Los cambios moleculares vinculados al tratamiento continuo con GH se asemejan a los reportados en el hígado de ratones GH-transgénicos en crecimiento, previo a la aparición de tumores. En los animales que sobreexpresan GH, estas alteraciones se profundizan en la adultez y se asocian a una mayor expresión de genes que promueven la proliferación celular. Para poder extender la comparación entre los ratones GH-transgénicos en crecimiento y los tratados con la hormona, se analizó la expresión de protooncogenes en ambos modelos. Tanto los ratones tratados de forma continua como los GH-transgénicos en crecimiento exhibieron una mayor expresión de c-Myc y no se observaron otros cambios similares a los descritos en los ratones adultos que sobreexpresan la hormona.

Asimismo, se exploró en ambos modelos la expresión de galectina-1 (Gal-1), una proteína que se encuentra sobreexpresada en pacientes con HCC. Los ratones tratados de forma continua y los ratones GH-transgénicos, adultos y en crecimiento, presentaron niveles elevados de esta proteína. Estas observaciones

sugieren que Gal-1 podría estar involucrada en el proceso de carcinogénesis asociado a niveles continuamente elevados de hormona.

Los resultados de esta tesis muestran que el tratamiento con GH no es inocuo en ninguna de las formas de administración evaluadas, aunque la administración intermitente sería más segura. Las alteraciones moleculares que se generan ante una administración continua de GH se asemejan a las observadas en ratones GH-transgénicos en crecimiento. Por consiguiente, esta forma de administración podría contribuir a generar un ambiente protumorigénico incluso en una dosis que resulta insuficiente para promover el crecimiento corporal.

# BIBLIOGRAFÍA

---

## BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS TE, HANSEN JA, STARR R, NICOLA NA, HILTON DJ and BILLESTRUP N (1998). Growth Hormone Preferentially Induces the Rapid, Transient Expression of SOCS-3, a Novel Inhibitor of Cytokine Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 273, 1285-1287.
- AGGARWAL BB, KUNNUMAKKARA AB, HARIKUMAR KB, GUPTA SR, THARAKAN ST, KOCA C, DEY S and SUNG B (2009). Signal Transducer and Activator of Transcription-3, Inflammation, and Cancer: How Intimate Is the Relationship? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171, 59-76.
- ALBA M, FINTINI D and SALVATORI R (2005). Effects of recombinant mouse growth hormone treatment on growth and body composition in GHRH knock out mice. *Growth Hormone & IGF Research* 15, 275-282.
- ALDERMAN JM, FLURKEY K, BROOKS NL, NAIK SB, GUTIERREZ JM, SRINIVAS U, ZIARA KB, JING L, BOYSEN G, BRONSON R, KLEBANOV S, CHEN X, SWENBERG JA, STRIDSBERG M, PARKER CE, HARRISON DE and COMBS TP (2009). Neuroendocrine inhibition of glucose production and resistance to cancer in dwarf mice. *Experimental gerontology* 44, 26-33.
- ALLEN DB, BACKELJAUW P, BIDLINGMAIER M, BILLER BMK, BOGUSZEWSKI M, BURMAN P, BUTLER G, CHIHARA K, CHRISTIANSEN J, CIANFARANI S, CLAYTON P, CLEMMONS D, COHEN P, DARENDELILER F, DEAL C, DUNGER D, ERFURTH EM, FUQUA JS, GRIMBERG A, HAYMOND M, HIGHAM C, HO K, HOFFMAN AR, HOKKEN-KOELEGA A, JOHANSSON G, JUUL A, KOPCHICK J, LEE P, POLLAK M, RADOVICK S, ROBISON L, ROSENFELD R, ROSS RJ, SAVENDAHL L, SAENGER P, TOFT SORENSEN H, STOCHHOLM K, STRASBURGER C, SWERDLOW A and THORNER M (2015). GH safety workshop position paper: a critical appraisal of recombinant human GH therapy in children and adults. *European Journal of Endocrinology* 174, P1-P9.
- ALLEVATO G, BILLESTRUP N, GOUJON L, GALSGAARD ED, NORSTEDT G, POSTEL-VINAY M-C, KELLY PA and NIELSEN JH (1995). Identification of Phenylalanine 346 in the Rat Growth Hormone Receptor as Being Critical for Ligand-mediated Internalization and Down-regulation. *Journal of Biological Chemistry* 270, 17210-17214.
- ANAGNOSTIS P, EFSTATHIOU ZA, POLYZOS SA, ADAMIDOU F, SLAVAKIS A, SAPRANIDIS M, LITSAS ID, KATERGARI S, SELALMATZIDOU D and KITA M (2011). Acromegaly: presentation, morbidity and treatment outcomes at a single centre. *International Journal of Clinical Practice* 65, 896-902.
- ARGETSINGER LS, CAMPBELL GS, YANG X, WITTHUHN BA, SILVENNOINEN O, IHLE JN and CARTER-SU C (1993). Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74, 237-244.
- AYUK J and SHEPPARD MC (2006). Growth hormone and its disorders. *Postgraduate Medical Journal* 82, 24-30.
- AZAIN MJ, KASSER TR, SABACKY MJ and BAILE CA (1993). Comparison of the growth-promoting properties of daily versus continuous administration of

somatotropin in female rats with intact pituitaries. *Journal of animal science* 71, 384-392.

BACIGALUPO ML, CARABIAS P and TRONCOSO MF (2017). Contribution of galectin-1, a glycan-binding protein, to gastrointestinal tumor progression. *World Journal of Gastroenterology* 23, 5266-5281.

BACIGALUPO ML, MANZI M, ESPELT MV, GENTILINI LD, COMPAGNO D, LADERACH DJ, WOLFENSTEIN-TODEL C, RABINOVICH GA and TRONCOSO MF (2015). Galectin-1 Triggers Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Journal of Cellular Physiology* 230, 1298-1309.

BACIGALUPO ML, MANZI M, RABINOVICH GA and TRONCOSO MF (2013). Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis, liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 19, 8831-8849.

BAKER J, LIU JP, ROBERTSON EJ and EFSTRATIADIS A (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73-82.

BALAN V, NANGIA-MAKKER P and RAZ A (2010). Galectins as Cancer Biomarkers. *Cancers* 2, 592-610.

BALBIS A, BARTKE A and TURYN D (1996). Overexpression of bovine growth hormone in transgenic mice is associated with changes in hepatic insulin receptors and in their kinase activity. *Life Sciences* 59, 1363-1371.

BALLESTEROS M, LEUNG K-C, ROSS RJM, IISMAA TP and HO KKY (2000). Distribution and Abundance of Messenger Ribonucleic Acid for Growth Hormone Receptor Isoforms in Human Tissues<sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85, 2865-2871.

BARCLAY JL, KERR LM, ARTHUR L, ROWLAND JE, NELSON CN, ISHIKAWA M, D'ANIELLO EM, WHITE M, NOAKES PG and WATERS MJ (2010). In Vivo Targeting of the Growth Hormone Receptor (GHR) Box1 Sequence Demonstrates that the GHR Does Not Signal Exclusively through JAK2. *Molecular Endocrinology* 24, 204-217.

BARTKE A (2003). Can Growth Hormone (GH) Accelerate Aging? Evidence from GH-Transgenic Mice. *Neuroendocrinology* 78, 210-216.

BARTKE A (2011). Growth hormone, insulin and aging: The benefits of endocrine defects. *Experimental gerontology* 46, 108-111.

BARTKE A, COSCHIGANO K, KOPCHICK J, CHANDRASHEKAR V, MATTISON J, KINNEY B and HAUCK S (2001). Genes that prolong life: relationships of growth hormone and growth to aging and life span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56, 340-349.

BARTKE A, CHANDRASHEKAR V, BAILEY B, ZACZEK D and TURYN D (2002). Consequences of growth hormone (GH) overexpression and GH resistance. *Neuropeptides* 36, 201-208.

- BARTKE A, SUN LY and LONGO V (2013). Somatotropic Signaling: Trade-Offs Between Growth, Reproductive Development, and Longevity. *Physiological Reviews* 93, 571-598.
- BAZAN JF (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 6934-6938.
- BEER S, ZETTERBERG A, IHRIE RA, MCTAGGART RA, YANG Q, BRADON N, ARVANITIS C, ATTARDI LD, FENG S, RUEBNER B, CARDIFF RD and FELSHER DW (2004). Developmental Context Determines Latency of MYC-Induced Tumorigenesis. *PLoS Biology* 2, e332.
- BEHRINGER RR, LEWIN TM, QUAIFE CJ, PALMITER RD, BRINSTER RL and D'ERCOLE AJ (1990). Expression of Insulin-Like Growth Factor I Stimulates Normal Somatic Growth in Growth Hormone-Deficient Transgenic Mice. *Endocrinology* 127, 1033-1040.
- BELANIS L, PLOWMAN SJ, ROTBLAT B, HANCOCK JF and KLOOG Y (2008). Galectin-1 Is a Novel Structural Component and a Major Regulator of H-Ras Nanoclusters. *Molecular Biology of the Cell* 19, 1404-1414.
- BERASAIN C and AVILA MA (2014). The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *Journal of Gastroenterology* 49, 9-23.
- BERELOWITZ M, FIRESTONE SL and FROHMAN LA (1981). Effects of Growth Hormone Excess and Deficiency on Hypothalamic Somatostatin Content and Release and on Tissue Somatostatin Distribution. *Endocrinology* 109, 714-719.
- BERRYMAN DE, LIST EO, KOHN DT, COSCHIGANO KT, SEELEY RJ and KOPCHICK JJ (2006). Effect of Growth Hormone on Susceptibility to Diet-Induced Obesity. *Endocrinology* 147, 2801-2808.
- BICK T, HOCHBERG Z, AMIT T, ISAKSSON OG and JANSSON JO (1992). Roles of pulsatility and continuity of growth hormone (GH) administration in the regulation of hepatic GH-receptors, and circulating GH-binding protein and insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 131, 423-429.
- BICK T, YODIM MBH and HOCHBERG Z (1989). Adaptation of Liver Membrane Somatogenic and Lactogenic Growth Hormone (GH) Binding to the Spontaneous Pulsation of GH Secretion in the Male Rat. *Endocrinology* 125, 1711-1717.
- BICHELL DP, KIKUCHI K and ROTWEIN P (1992). Growth hormone rapidly activates insulin-like growth factor I gene transcription in vivo. *Molecular Endocrinology* 6, 1899-1908.
- BIELOHUBY M, SCHAAB M, KUMMANN M, SAWITZKY M, GEBHARDT R, BINDER G, FRYSTYK J, BJERRE M, HOEFLICH A, KRATZSCH J and BIDLINGMAIER M (2011). Serum IGF-I Is Not a Reliable Pharmacodynamic Marker of Exogenous Growth Hormone Activity in Mice. *Endocrinology* 152, 4764-4776.

- BISCARDI JS, MAA M-C, TICE DA, COX ME, LEU T-H and PARSONS SJ (1999). c-Src-mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr845 and Tyr1101 Is Associated with Modulation of Receptor Function. *Journal of Biological Chemistry* 274, 8335-8343.
- BOWMAN T, GARCIA R, TURKSON J and JOVE R (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474.
- BRETONES G, DELGADO MD and LEÓN J (2015). Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849, 506-516.
- BRIARD N, RICO-GOMEZ M, GUILLAUME V, SAUZE N, VUAROQUEAUX V, DADOUN F, LE BOUC Y, OLIVER C and DUTOUR A (1998). Hypothalamic Mediated Action of Free Fatty Acid on Growth Hormone Secretion in Sheep. *Endocrinology* 139, 4811-4819.
- BROOKS AJ and WATERS MJ (2010). The growth hormone receptor: mechanism of activation and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol* 6, 515-525.
- BUCKLEY AF, BURGART LJ, SAHAI V and KAKAR S (2008). Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Gene Copy Number in Conventional Hepatocellular Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology* 129, 245-251.
- CALÒ V, MIGLIAVACCA M, BAZAN V, MACALUSO M, BUSCEMI M, GEBBIA N and RUSSO A (2003). STAT proteins: From normal control of cellular events to tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology* 197, 157-168.
- CAREL J-C, ECOSSE E, LANDIER F, MEGUELLATI-HAKKAS D, KAGUELIDOU F, REY G and COSTE J (2012). Long-Term Mortality after Recombinant Growth Hormone Treatment for Isolated Growth Hormone Deficiency or Childhood Short Stature: Preliminary Report of the French SAGhE Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, 416-425.
- CARTER-SU C, SCHWARTZ J and ARGETSINGER LS (2015). Growth hormone signaling pathways. *Growth Hormone & IGF Research* 28, 11-15.
- CARVER RS, STEVENSON MC, SCHEVING LA and RUSSELL WE (2002). Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration. *Gastroenterology* 123, 2017-2027.
- CLARK RG, JANSSON J-O, ISAKSSON O and ROBINSON ICAF (1985). Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats. *Journal of Endocrinology* 104, 53-61.
- CLAYTON PE, BANERJEE I, MURRAY PG and RENEHAN AG (2011). Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nat Rev Endocrinol* 7, 11-24.
- CLEMMONS DR (2007). Long-Acting Forms of Growth Hormone-Releasing Hormone and Growth Hormone: Effects in Normal Volunteers and Adults with Growth Hormone Deficiency. *Hormone Research in Paediatrics* 68(suppl 5), 178-181.

- CLODFELTER KH, HOLLOWAY MG, HODOR P, PARK S-H, RAY WJ and WAXMAN DJ (2006). Sex-Dependent Liver Gene Expression Is Extensive and Largely Dependent upon Signal Transducer and Activator of Transcription 5b (STAT5b): STAT5b-Dependent Activation of Male Genes and Repression of Female Genes Revealed by Microarray Analysis. *Molecular Endocrinology* 20, 1333-1351.
- COHEN FE and KUNTZ ID (1987). Prediction of the three-dimensional structure of human growth hormone. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2, 162-166.
- COOK DM (2002). Shouldn't adults with growth hormone deficiency be offered growth hormone replacement therapy? *Annals of Internal Medicine* 137, 197-201.
- CORNFORD AS, BARKAN AL and HOROWITZ JF (2011). Rapid Suppression of Growth Hormone Concentration by Overeating: Potential Mediation by Hyperinsulinemia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96, 824-830.
- CROKER BA, KIU H and NICHOLSON SE (2008). SOCS Regulation of the JAK/STAT Signalling Pathway. *Seminars in cell & developmental biology* 19, 414-422.
- CHAE H-W, KIM D-H and KIM H-S (2015). Growth hormone treatment and risk of malignancy. *Korean Journal of Pediatrics* 58, 41-46.
- CHEN J, TANG D, WANG S, LI Q-G, ZHANG J-R, LI P, LU Q, NIU G, GAO J, YE N-Y and WANG D-R (2014). High expressions of galectin-1 and VEGF are associated with poor prognosis in gastric cancer patients. *Tumor Biology* 35, 2513-2519.
- CHHABRA Y, WATERS MJ and BROOKS AJ (2011). Role of the growth hormone-IGF-1 axis in cancer. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 6, 71-84.
- CHIA DJ (2014). Minireview: Mechanisms of Growth Hormone-Mediated Gene Regulation. *Molecular Endocrinology* 28, 1012-1025.
- CHIA DJ, ONO M, WOELFLE J, SCHLESINGER-MASSART M, JIANG H and ROTWEIN P (2006). Characterization of Distinct Stat5b Binding Sites That Mediate Growth Hormone-stimulated IGF-I Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 281, 3190-3197.
- CHIANG GG and ABRAHAM RT (2005). Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) at Ser-2448 Is Mediated by p70S6 Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25485-25490.
- CHIARIOTTI L, SALVATORE P, FRUNZIO R and BRUNI CB (2002). Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J* 19, 441-449.
- CHOI HK and WAXMAN DJ (1999). Growth Hormone, but Not Prolactin, Maintains Low-Level Activation of STAT5a and STAT5b in Female Rat Liver. *Endocrinology* 140, 5126-5135.

- CHUMA M, TERASHITA K and SAKAMOTO N (2015). New molecularly targeted therapies against advanced hepatocellular carcinoma: From molecular pathogenesis to clinical trials and future directions. *Hepatology Research* 45, E1-E11.
- CHUNG EJ, SUNG YK, FAROOQ M, KIM Y, IM S, TAK WY, HWANG YJ, KIM YI, HAN HS, KIM J-C and KIM MK (2002). Gene Expression Profile Analysis in Human Hepatocellular Carcinoma by cDNA Microarray. *Mol. Cells* 14, 382-387.
- DANG CV, O'DONNELL KA, ZELLER KI, NGUYEN T, OSTHUS RC and LI F (2006). The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology* 16, 253-264.
- DANGUY A, CAMBY I and KISS R (2002). Galectins and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1572, 285-293.
- DATTANI M and PREECE M (2004). Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis, and treatment. *The Lancet* 363, 1977-1987.
- DAVEY HW, MCLACHLAN MJ, WILKINS RJ, HILTON DJ and ADAMS TE (1999a). STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. *Molecular and Cellular Endocrinology* 158, 111-116.
- DAVEY HW, PARK S-H, GRATTAN DR, MCLACHLAN MJ and WAXMAN DJ (1999b). STAT5b-deficient Mice Are Growth Hormone Pulse-resistant: Role of STAT5b in Sex-Specific Liver P450 Expression. *Journal of Biological Chemistry* 274, 35331-35336.
- DE LOS FRAILES MT, CACICEDO L, FERNANDEZ G, TOLÓN RM, JESUS LORENZO M, AGUADO F and SÁNCHEZ FRANCO F (1992). Role of locally produced growth hormone-releasing factor in somatostatin regulation by fetal rat brain cells in culture. *Neuroendocrinology* 55, 221-229.
- DE ZEGHER F, DEVLIEGER H and VELDHUIS JD (1993). Properties of growth hormone and prolactin hypersecretion by the human infant on the day of birth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 76, 1177-1181.
- DECKER T and KOVARIK P (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628.
- DÍAZ ME (2013). Modulación de las vías de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) por la hormona de crecimiento (GH) en hígado (Tesis Doctoral). Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- DÍAZ ME, GONZÁLEZ L, MIQUET JG, MARTÍNEZ CS, SOTELO AI, BARTKE A and TURYN D (2012). Growth hormone modulation of EGF-induced PI3K-Akt pathway in mice liver. *Cellular Signalling* 24, 514-523.
- DÍAZ ME, MIQUET JG, ROSSI SP, IRENE PE, SOTELO AI, FRUNGIERI MB, TURYN D and GONZÁLEZ L (2014). GH administration patterns differently regulate epidermal growth factor signaling. *Journal of Endocrinology* 221, 309-323.

DING J, BERRYMAN DE and KOPCHICK JJ (2011). Plasma proteomic profiles of bovine growth hormone transgenic mice as they age. *Transgenic research* 20, 1305-1320.

DOMINICI F, BALBIS A, BARTKE A and TURYN D (1998). Role of hyperinsulinemia on hepatic insulin receptor concentration and autophosphorylation in the presence of high growth hormone levels in transgenic mice overexpressing growth hormone gene. *Journal of Endocrinology* 159, 15-25.

DOMINICI F, CIFONE D, BARTKE A and TURYN D (1999a). Loss of sensitivity to insulin at early events of the insulin signaling pathway in the liver of growth hormone-transgenic mice. *Journal of Endocrinology* 161, 383-392.

DOMINICI FP, ARGENTINO DP, MUÑOZ MC, MIQUET JG, SOTELO AI and TURYN D (2005). Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Hormone & IGF Research* 15, 324-336.

DOMINICI FP, CIFONE D, BARTKE A and TURYN D (1999b). Alterations in the early steps of the insulin-signaling system in skeletal muscle of GH-transgenic mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 277, E447-E454.

DOUGHERTY MK, MÜLLER J, RITT DA, ZHOU M, ZHOU XZ, COPELAND TD, CONRADS TP, VEENSTRA TD, LU KP and MORRISON DK (2005). Regulation of Raf-1 by Direct Feedback Phosphorylation. *Molecular Cell* 17, 215-224.

DÜRSCHLAG M, WÜRBEL H, STAUFFACHER M and VON HOLST D (1996). Repeated Blood Collection in the Laboratory Mouse by Tail Incision—Modification of an Old Technique. *Physiology & Behavior* 60, 1565-1567.

EDÉN S (1979). Age- and Sex-Related Differences in Episodic Growth Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology* 105, 555-560.

EFSTRATIADIS A (1998). Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol* 42, 955-976.

EKBERG S, CARLSSON L, CARLSSON B, BILLIG H and JANSSON J-O (1989). Plasma Growth Hormone Pattern Regulates Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels and EGF Binding in the Rat Liver. *Endocrinology* 125, 2158-2166.

ELOLA MT, CHIESA ME, ALBERTI AF, MORDOH J and FINK NE (2005a). Galectin-1 receptors in different cell types. *J Biomed Sci* 12, 13-29.

ELOLA MT, CHIESA ME and FINK NE (2005b). Activation of oxidative burst and degranulation of porcine neutrophils by a homologous spleen galectin-1 compared to N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 141, 23-31.

ELOLA MT, WOLFENSTEIN-TODEL C, TRONCOSO MF, VASTA GR and RABINOVICH GA (2007). Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 1679-1700.

- ESPELT MV, CROCI DO, BACIGALUPO ML, CARABIAS P, MANZI M, ELOLA MT, MUÑOZ MC, DOMINICI FP, WOLFENSTEIN-TODEL C, RABINOVICH GA and TRONCOSO MF (2011). Novel roles of galectin-1 in hepatocellular carcinoma cell adhesion, polarization, and in vivo tumor growth. *Hepatology* 53, 2097-2106.
- FAVRE H, BENHAMOU A, FINIDORI J, KELLY PA and EDERY M (1999). Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Letters* 453, 63-66.
- FEITELSON MA, PAN J and LIAN Z (2004). Early molecular and genetic determinants of primary liver malignancy. *Surgical Clinics of North America* 84, 339-354.
- FELDT-RASMUSSEN U, WILTON P and JONSSON P (2004). Aspects of growth hormone deficiency and replacement in elderly hypopituitary adults. *Growth Hormone & IGF Research* 14, 51-58.
- FELSING NE, BRASEL JA and COOPER DM (1992). Effect of low and high intensity exercise on circulating growth hormone in men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 75, 157-162.
- FERGUSON KM, BERGER MB, MENDROLA JM, CHO H-S, LEAHY DJ and LEMMON MA (2003). EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Molecular Cell* 11, 507-517.
- FLORES-MORALES A, GREENHALGH CJ, NORSTEDT G and RICO-BAUTISTA E (2006). Negative Regulation of Growth Hormone Receptor Signaling. *Molecular Endocrinology* 20, 241-253.
- FRANK SJ (2008). Mechanistic Aspects of Crosstalk Between GH and PRL and ErbB Receptor Family Signaling. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 13, 119-129.
- FRANK SJ and FUCHS SY (2008). Modulation of growth hormone receptor abundance and function: roles for the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1782, 785-794.
- FRANKLIN SL and GEFFNER ME (2011). Growth Hormone: The Expansion of Available Products and Indications. *Pediatric Clinics of North America* 58, 1141-1165.
- FRICK F, BOHLOOLY-Y M, LINDÉN D, OLSSON B, TÖRNELL J, EDÉN S and OSCARSSON J (2001). Long-term growth hormone excess induces marked alterations in lipoprotein metabolism in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 281, E1230-E1239.
- FRIEDBICHLER K, THEMANNS M, MUELLER KM, SCHLEDERER M, KORNFELD J-W, TERRACCIANO LM, KOZLOV AV, HAINDL S, KENNER L, KOLBE T, MUELLER M, SNIBSON KJ, HEIM MH and MORIGGL R (2012). Growth-hormone-induced signal transducer and activator of transcription 5 signaling causes gigantism, inflammation, and premature death but protects mice from aggressive liver cancer. *Hepatology* 55, 941-952.

- GAO T, FURNARI F and NEWTON AC (2005). PHLPP: A Phosphatase that Directly Dephosphorylates Akt, Promotes Apoptosis, and Suppresses Tumor Growth. *Molecular Cell* 18, 13-24.
- GAO Y, SU P, WANG C, ZHU K, CHEN X, LIU S and HE J (2013). The Role of PTEN in Chronic Growth Hormone-Induced Hepatic Insulin Resistance. *PLOS ONE* 8, e68105.
- GARNER OB and BAUM LG (2008). Galectin-glycan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signalling. *Biochemical Society transactions* 36, 1472-1477.
- GARREL DR, BAJARD L, HARFOUCHE M and TOURNIAIRE J (1989). Effect of sustained hyperglycemia on GHRH induced GH secretion in man. *Diabetes Metab.* 15, 251-254.
- GEBERT CA, PARK S-H and WAXMAN DJ (1999a). Down-Regulation of Liver JAK2-STAT5b Signaling by the Female Plasma Pattern of Continuous Growth Hormone Stimulation. *Molecular Endocrinology* 13, 213-227.
- GEBERT CA, PARK S-H and WAXMAN DJ (1999b). Termination of Growth Hormone Pulse-Induced STAT5b Signaling. *Molecular Endocrinology* 13, 38-56.
- GIUSTINA A, MAZZIOTTI G and CANALIS E (2008). Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocrine Reviews* 29, 535-559.
- GIUSTINA A and VELDHUIS JD (1998). Pathophysiology of the Neuroregulation of Growth Hormone Secretion in Experimental Animals and the Human. *Endocrine Reviews* 19, 717-797.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE LIVER CANCER C (2017). The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global, regional, and national level: Results from the global burden of disease study 2015. *JAMA Oncology*.
- GONZÁLEZ L, CURTO LM, MIQUET JG, BARTKE A, TURYN D and SOTELO AI (2007). Differential regulation of membrane associated-growth hormone binding protein (MA-GHBP) and growth hormone receptor (GHR) expression by growth hormone (GH) in mouse liver. *Growth Hormone & IGF Research* 17, 104-112.
- GONZÁLEZ L, DÍAZ ME, MIQUET JG, SOTELO AI, FERNÁNDEZ D, DOMINICI FP, BARTKE A and TURYN D (2010). GH modulates hepatic epidermal growth factor signaling in the mouse. *Journal of Endocrinology* 204, 299-309.
- GONZÁLEZ L, MIQUET JG, IRENE PE, DÍAZ ME, ROSSI SP, SOTELO AI, FRUNGIERI MB, HILL CM, BARTKE A and TURYN D (2017). Attenuation of epidermal growth factor (EGF) signaling by growth hormone (GH). *Journal of Endocrinology* 233, 175-186.
- GONZÁLEZ L, MIQUET JG, SOTELO AI, BARTKE A and TURYN D (2002). Cytokine-Inducible SH2 Protein Up-Regulation Is Associated with Desensitization of GH Signaling in GHRH-Transgenic Mice. *Endocrinology* 143, 386-394.

- GREENHALGH CJ, RICO-BAUTISTA E, LORENTZON M, THAUS AL, MORGAN PO, WILLSON TA, ZERVOUDAKIS P, METCALF D, STREET I, NICOLA NA, NASH AD, FABRI LJ, NORSTEDT G, OHLSSON C, FLORES-MORALES A, ALEXANDER WS and HILTON DJ (2005). SOCS2 negatively regulates growth hormone action in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 115, 397-406.
- GRONOWSKI AM and ROTWEIN P (1995). Rapid Changes in Gene Expression after in Vivo Growth Hormone Treatment. *Endocrinology* 136, 4741-4748.
- GUEVARA-AGUIRRE J, BALASUBRAMANIAN P, GUEVARA-AGUIRRE M, WEI M, MADIA F, CHENG C-W, HWANG D, MARTIN-MONTALVO A, SAAVEDRA J, INGLES S, DE CABO R, COHEN P and LONGO VD (2011). Growth Hormone Receptor Deficiency is Associated With a Major Reduction in Pro-aging Signaling, Cancer and Diabetes in Humans. *Science Translational Medicine* 3, 70ra13-70ra13.
- HAGA S, OZAKI M, INOUE H, OKAMOTO Y, OGAWA W, TAKEDA K, AKIRA S and TODO S (2009). The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 49, 204-214.
- HARRINGTON LS, FINDLAY GM and LAMB RF (2005). Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 35-42.
- HARTMAN ML, VELDHUIS JD, JOHNSON ML, LEE MM, ALBERTI KG, SAMOJLIK E and THORNER MO (1992). Augmented growth hormone (GH) secretory burst frequency and amplitude mediate enhanced GH secretion during a two-day fast in normal men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 74, 757-765.
- HARVEY S and BAUDET M-L (2014). Extrapituitary growth hormone and growth? *General and Comparative Endocrinology* 205, 55-61.
- HE G and KARIN M (2011). NF- $\kappa$ B and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Research* 21, 159-168.
- HENNIGHAUSEN L and ROBINSON GW (2008). Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes & Development* 22, 711-721.
- HENSON ES and GIBSON SB (2006). Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cellular Signalling* 18, 2089-2097.
- HERRINGTON J, SMIT LS, SCHWARTZ J and CARTER-SU C (2000). The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene* 19, 2585.
- HESS J, ANGEL P and SCHORPP-KISTNER M (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science* 117, 5965-5973.
- HINDMARSH P, BROOK C, RODECK C and NICOLAIDES K (1987). Hormonal levels in the human fetus between 14 and 22 weeks gestation. *Early Hum Dev* 15, 253-254.

- HIRAO J, NISHIMURA M, ARAKAWA S, NIINO N, MORI K, FURUKAWA T, SANBUISHO A, MANABE S, NISHIHARA M and MORI Y (2011). Sex and circadian modulatory effects on rat liver as assessed by transcriptome analyses. *The Journal of Toxicological Sciences* 36, 9-22.
- HO KY, VELDHUIS JD, JOHNSON ML, FURLANETTO R, EVANS WS, ALBERTI KG and THORNER MO (1988). Fasting enhances growth hormone secretion and amplifies the complex rhythms of growth hormone secretion in man. *Journal of Clinical Investigation* 81, 968-975.
- HOLL RW, HARTMAN ML, VELDHUIS JD, TAYLOR WM and THORNER MO (1991). Thirty-Second Sampling of Plasma Growth Hormone in Man: Correlation with Sleep Stages. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 72, 854-861.
- HØYBYE C, COHEN P, HOFFMAN AR, ROSS R, BILLER BMK and CHRISTIANSEN JS (2015a). Status of long-acting-growth hormone preparations - 2015. *Growth Hormone & IGF Research* 25, 201-206.
- HØYBYE C and CHRISTIANSEN JS (2015b). Growth hormone replacement in adults - current standards and new perspectives. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29, 115-123.
- HULL K and HARVEY S (2003). Growth hormone therapy and Quality of Life: possibilities, pitfalls and mechanisms. *Journal of Endocrinology* 179, 311-333.
- IIDA K, DEL RINCON JP, KIM D-S, ITOH E, COSCHIGANO KT, KOPCHICK JJ and THORNER MO (2004). Regulation of full-length and truncated growth hormone (GH) receptor by GH in tissues of lit/lit or bovine GH transgenic mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 287, E566-E573.
- IKENO Y, HUBBARD GB, LEE S, CORTEZ LA, LEW CM, WEBB CR, BERRYMAN DE, LIST EO, KOPCHICK JJ and BARTKE A (2009). Reduced Incidence and Delayed Occurrence of Fatal Neoplastic Diseases in Growth Hormone Receptor/Binding Protein Knockout Mice. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 64A, 522-529.
- ISAKSSON O, JANSSON J and GAUSE I (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216, 1237-1239.
- ISGAARD J, CARLSSON L, ISAKSSON OGP and JANSSON J-O (1988). Pulsatile Intravenous Growth Hormone (GH) Infusion to Hypophysectomized Rats Increases Insulin-Like Growth Factor I Messenger Ribonucleic Acid in Skeletal Tissues More Effectively than Continuous GH Infusion. *Endocrinology* 123, 2605-2610.
- ITO K, STANNARD K, GABUTERO E, CLARK AM, NEO S-Y, ONTURK S, BLANCHARD H and RALPH SJ (2012). Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer and Metastasis Reviews* 31, 763-778.
- ITO Y, TAKEDA T, SAKON M, TSUJIMOTO M, HIGASHIYAMA S, NODA K, MIYOSHI E, MONDEN M and MATSUURA N (2001). Expression and clinical significance of

erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* 84, 1377-1383.

JACINTO E, FACCHINETTI V, LIU D, SOTO N, WEI S, JUNG SY, HUANG Q, QIN J and SU B (2006). SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* 127, 125-137.

JACOBS KM, BAVE SR, FERRARO DJ, JABOIN JJ, HALLAHAN DE and THOTALA D (2012). GSK-3 $\beta$ : A Bifunctional Role in Cell Death Pathways. *International Journal of Cell Biology* 2012, 11.

JAFFE CA, OCAMPO-LIM B, GUO W, KRUEGER K, SUGAHARA I, DEMOTT-FRIBERG R, BERMAN M and BARKAN AL (1998). Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *Journal of Clinical Investigation* 102, 153-164.

JAFFE CA, TURGEON DK, LOWN K, DEMOTT-FRIBERG R and WATKINS PB (2002). Growth hormone secretion pattern is an independent regulator of growth hormone actions in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 283, E1008-E1015.

JANSSENS V and GORIS J (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal* 353, 417-439.

JANSSON JO, ALBERTSSON-WIKLAND K, EDÉN S, THORNGREN K-G and ISAKSSON O (1982). Effect of frequency of growth hormone administration on longitudinal bone growth and body weight in hypophysectomized rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 114, 261-265.

JANSSON JO, EDÉN S and ISAKSSON O (1985). Sexual Dimorphism in the Control of Growth Hormone Secretion. *Endocrine Reviews* 6, 128-150.

JANSSON JO, EKBERG S, HOATH SB, BEAMER WG and FROHMAN LA (1988). Growth hormone enhances hepatic epidermal growth factor receptor concentration in mice. *Journal of Clinical Investigation* 82, 1871-1876.

JENKINS PJ, MUKHERJEE A and SHALET SM (2006). Does growth hormone cause cancer? *Clinical Endocrinology* 64, 115-121.

JI S, FRANK SJ and MESSINA JL (2002). Growth Hormone-induced Differential Desensitization of STAT5, ERK, and Akt Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 28384-28393.

JIANG H, WANG Y, WU M, GU Z, FRANK SJ and TORRES-DIAZ R (2007). Growth Hormone Stimulates Hepatic Expression of Bovine Growth Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid through Signal Transducer and Activator of Transcription 5 Activation of a Major Growth Hormone Receptor Gene Promoter. *Endocrinology* 148, 3307-3315.

JIN H, LANNING NJ and CARTER-SU C (2008). JAK2, But Not Src Family Kinases, Is Required for STAT, ERK, and Akt Signaling in Response to Growth Hormone in Preadipocytes and Hepatoma Cells. *Molecular Endocrinology* 22, 1825-1841.

- JOHANSSON S, HUSMAN B, NORSTEDT G and ANDERSSON G (1989). Growth hormone regulates the rodent hepatic epidermal growth factor receptor at a pretranslational level. *J Mol Endocrinol* 3, 113-120.
- JOHNSON D, AL-SHAWI R and BISHOP J (1995). Sexual dimorphism and growth hormone induction of murine pheromone-binding proteins. *J Mol Endocrinol* 14, 21-34.
- JOPE RS, YUSKAITIS CJ and BEUREL E (2007). Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochemical Research* 32, 577-595.
- JØRGENSEN JO and CHRISTIANSEN JS (2005). Clinical aspects of growth hormone deficiency in adults. An overview. *Front Horm Res* 33, 1-20.
- JØRGENSEN JOL, MØLLER N, LAURITZEN T and CHRISTIANSEN JS (1990). Pulsatile Versus Continuous Intravenous Administration of Growth Hormone (GH) in GH-Deficient Patients: Effects on Circulating Insulin-Like Growth Factor-I and Metabolic Indices. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 70, 1616-1623.
- JØRGENSEN KD, SVENDSEN O, GREENOUGH RJ, KALLESEN T, GOBURDHUN R, SKYDSGAARD K, FINCH J, DINESEN B and NILSSON P (1988). Biosynthetic Human Growth Hormone: Subchronic Toxicity Studies in Rats and Monkeys. *Pharmacology & Toxicology* 62, 329-333.
- JØRGENSEN PH, BAK B and ANDREASSEN TT (1991). Mechanical properties and biochemical composition of rat cortical femur and tibia after long-term treatment with biosynthetic human growth hormone. *Bone* 12, 353-359.
- JUNTTILA MR, LI S-P and WESTERMARCK J (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *The FASEB Journal* 22, 954-965.
- KAIDANOVICH-BEILIN O and WOODGETT JR (2011). GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4, 40.
- KAPLAN SA and COHEN P (2007). The Somatomedin Hypothesis 2007: 50 Years Later. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 4529-4535.
- KAPLAN SL, AUGUST GP, BLETHEN SL, BROWN DR, HINTZ RL, JOHANSEN A, PLOTNICK LP, UNDERWOOD LE, BELL JJ, BLIZZARD RM, FOLEY TP, HOPWOOD NJ, KIRKLAND RT, ROSENFELD RG and VAN WYK JJ (1986). Clinical studies with recombinant-DNA-derived methionyl human growth hormone in growth hormone deficient children. *The Lancet* 327, 697-700.
- KARLSSON H, GUSTAFSSON J-Å and MODE A (1999). Cis desensitizes GH induced Stat5 signaling in rat liver cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 154, 37-43.

- KASHIMATA M, HIRAMATSU M and MINAMI N (1989). Differential secretory rhythm of growth hormone controls the number of hepatic epidermal growth factor receptors in the rat. *Journal of Endocrinology* 123, 75-81.
- KASUKAWA Y, BAYLINK DJ, GUO R and MOHAN S (2003). Evidence that Sensitivity to Growth Hormone (GH) Is Growth Period and Tissue Type Dependent: Studies in GH-Deficient lit/lit Mice. *Endocrinology* 144, 3950-3957.
- KELLY PA, DJIANE J, POSTEL-VINAY M-C and EDERY M (1991). The Prolactin/Growth Hormone Receptor Family. *Endocrine Reviews* 12, 235-251.
- KEMP SF and FRINDIK JP (2011). Emerging options in growth hormone therapy: an update. *Drug Design, Development and Therapy* 5, 411-419.
- KEY TJ, APPLEBY PN, REEVES GK and RODDAM AW (2010). Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *The Lancet Oncology* 11, 530-542.
- KIDGER AM and KEYSE SM (2016). The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Seminars in Cell & Developmental Biology* 50, 125-132.
- KILE BT, SCHULMAN BA, ALEXANDER WS, NICOLA NA, MARTIN HME and HILTON DJ (2002). The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 235-241.
- KIM H, BARTON E, MUJA N, YAKAR S, PENNISI P and LEROITH D (2005). Intact Insulin and Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Signaling Is Required for Growth Hormone Effects on Skeletal Muscle Growth and Function in Vivo. *Endocrinology* 146, 1772-1779.
- KLOVER P and HENNIGHAUSEN L (2007). Postnatal Body Growth Is Dependent on the Transcription Factors Signal Transducers and Activators of Transcription 5a/b in Muscle: A Role for Autocrine/Paracrine Insulin-Like Growth Factor I. *Endocrinology* 148, 1489-1497.
- KNOFF JL, GALLAGHER JF and HELD WA (1983). Differential, multihormonal regulation of the mouse major urinary protein gene family in the liver. *Molecular and Cellular Biology* 3, 2232-2240.
- KOJIMA M and KANGAWA K (2005). Ghrelin: Structure and Function. *Physiological Reviews* 85, 495-522.
- KOMPOSCH K and SIBILIA M (2016). EGFR Signaling in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 30.
- KONDOH N, HADA A, RYO A, SHUDA M, ARAI M, MATSUBARA O, KIMURA F, WAKATSUKI T and YAMAMOTO M (2003). Activation of Galectin-1 gene in human hepatocellular carcinoma involves methylation-sensitive complex formations at the transcriptional upstream and downstream elements. *International Journal of Oncology* 23, 1575-1583.

- KOPCHICK JJ, BELLUSH LL and COSCHIGANO KT (1999). Transgenic models of growth hormone action. *Annual Review of Nutrition* 19, 437-461.
- LADERACH DJ, COMPAGNO D, TOSCANO MA, CROCI DO, DERGAN-DYLON S, SALATINO M and RABINOVICH GA (2010). Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. *IUBMB Life* 62, 1-13.
- LAEMMLI U (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LANDSMAN T and WAXMAN DJ (2005). Role of the Cytokine-induced SH2 Domain-containing Protein CIS in Growth Hormone Receptor Internalization. *Journal of Biological Chemistry* 280, 37471-37480.
- LANNING NJ and CARTER-SU C (2006). Recent advances in growth hormone signaling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 7, 225-235.
- LAPLANTE M and SABATINI DM (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122, 3589-3594.
- LARON Z (2011). Growth hormone therapy: emerging dilemmas. *Pediatr Endocrinol Rev* 8, 364-373.
- LAURSEN T, GRAVHOLT CH, HEICKENDORFF L, DRUSTRUP J, KAPPELGAARD A-M, JØRGENSEN JOL and CHRISTIANSEN JS (2001). Long-Term Effects of Continuous Subcutaneous Infusion Versus Daily Subcutaneous Injections of Growth Hormone (GH) on the Insulin-Like Growth Factor System, Insulin Sensitivity, Body Composition, and Bone and Lipoprotein Metabolism in GH-Deficient Adults1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 1222-1228.
- LE ROITH D (2003). The Insulin-Like Growth Factor System. *Experimental Diabetes Research* 4, 205-212.
- LE ROITH D, BONDY C, YAKAR S, LIU J-L and BUTLER A (2001). The Somatomedin Hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews* 22, 53-74.
- LEE JM, YANG J, NEWELL P, SINGH S, PARWANI A, FRIEDMAN SL, NEJAK-BOWEN KN and MONGA SP (2014). Beta-catenin signaling in hepatocellular cancer: Implications in inflammation, fibrosis, and proliferation. *Cancer letters* 343, 10.1016/j.canlet.2013.1009.1020.
- LEE W-H, LIU F-H, LIN JY-C, HUANG S-Y, LIN H, LIAO W-J and HUANG H-M (2009). JAK pathway induction of c-Myc critical to IL-5 stimulation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry* 106, 929-936.
- LEMMON MA, SCHLESSINGER J and FERGUSON KM (2014). The EGFR Family: Not So Prototypical Receptor Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6.
- LIANG L, JIANG J and FRANK SJ (2000). Insulin Receptor Substrate-1-Mediated Enhancement of Growth Hormone-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Endocrinology* 141, 3328-3336.

- LINOSSI EM and NICHOLSON SE (2012). The SOCS box—Adapting proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. *IUBMB Life* 64, 316-323.
- LIU F-T, PATTERSON RJ and WANG JL (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1572, 263-273.
- LIU F-T and RABINOVICH GA (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer* 5, 29.
- LIU JP, BAKER J, PERKINS AS, ROBERTSON EJ and EFSTRATIADIS A (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.
- LUEDDE T and SCHWABE RF (2011). NF- $\kappa$ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 8, 108-118.
- LUI JC and BARON J (2011). Mechanisms Limiting Body Growth in Mammals. *Endocrine Reviews* 32, 422-440.
- LUPU F, TERWILLIGER JD, LEE K, SEGRE GV and EFSTRATIADIS A (2001). Roles of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor 1 in Mouse Postnatal Growth. *Developmental Biology* 229, 141-162.
- LLOVET JM and BRUIX J (2008). Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48, 1312-1327.
- MACLEOD JN, PAMPORI NA and SHAPIRO BH (1991). Sex differences in the ultradian pattern of plasma growth hormone concentrations in mice. *Journal of Endocrinology* 131, 395-399.
- MAITER D, UNDERWOOD LE, MAES M, DAVENPORT ML and KETELSLEGERS JM (1988). Different Effects of Intermittent and Continuous Growth Hormone (GH) Administration on Serum Somatomedin-C/Insulin-Like Growth Factor I and Liver GH Receptors in Hypophysectomized Rats. *Endocrinology* 123, 1053-1059.
- MAITER D, WALKER JL, ADAM E, MOATSSTAATS B, MULUMBA N, KETELSLEGERS JM and UNDERWOOD LE (1992). Differential regulation by growth hormone (GH) of insulin-like growth factor I and GH receptor/binding protein gene expression in rat liver. *Endocrinology* 130, 3257-3264.
- MAITER DM, GABRIEL SM, KOENIG JL, RUSSELL WE and MARTIN JB (1990). Sexual differentiation of growth hormone feedback effects on hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Neuroendocrinology* 51, 174-180.
- MANNING BD and TOKER A (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381-405.
- MARTHA JPM, GORMAN KM, BLIZZARD RM, ROGOL AD and VELDHUIS JD (1992). Endogenous growth hormone secretion and clearance rates in normal boys, as determined by deconvolution analysis: relationship to age, pubertal status,

and body mass. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 74, 336-344.

MARTÍNEZ CS (2013). Señalización de la hormona de crecimiento (GH) durante la etapa de crecimiento en ratones (Tesis Doctoral). Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

MARTÍNEZ CS, PIAZZA VG, DÍAZ ME, BOPARAI RK, ARUM O, RAMÍREZ MC, GONZÁLEZ L, BECÚ-VILLALOBOS D, BARTKE A, TURYN D, MIQUET JG and SOTELO AI (2015). Growth hormone (GH)/STAT5 signaling during the growth period in liver of mice overexpressing GH. *Journal of molecular endocrinology* 54, 171-184.

MARTÍNEZ CS, PIAZZA VG, GONZÁLEZ L, FANG Y, BARTKE A, TURYN D, MIQUET JG and SOTELO AI (2016). Mitogenic signaling pathways in the liver of growth hormone (GH)-overexpressing mice during the growth period. *Cell Cycle* 15, 748-759.

MARTÍNEZ CS, PIAZZA VG, RATNER LD, MATOS MN, GONZÁLEZ L, RULLI SB, MIQUET JG and SOTELO AI (2013). Growth hormone STAT5-mediated signaling and its modulation in mice liver during the growth period. *Growth Hormone & IGF Research* 23, 19-28.

MASTERNAK MM, PANICI JA, WANG F, WANG Z and SPONG A (2010). The Effects of Growth Hormone (GH) Treatment on GH and Insulin/IGF-1 Signaling in Long-Lived Ames Dwarf Mice. *The Journals of Gerontology: Series A* 65A, 24-30.

MATHEWS LS, HAMMER RE, BRINSTER RL and PALMITER RD (1988). Expression of Insulin-Like Growth Factor I in Transgenic Mice with Elevated Levels of Growth Hormone Is Correlated with Growth. *Endocrinology* 123, 433-437.

MATSUMOTO A, SEKI Y, KUBO M, OHTSUKA S, SUZUKI A, HAYASHI I, TSUJI K, NAKAHATA T, OKABE M, YAMADA S and YOSHIMURA A (1999). Suppression of STAT5 Functions in Liver, Mammary Glands, and T Cells in Cytokine-Inducible SH2-Containing Protein 1 Transgenic Mice. *Molecular and Cellular Biology* 19, 6396-6407.

MAURAS N and HAYMOND MW (2005). Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable? *Growth Hormone & IGF Research* 15, 19-27.

MAURAS N, ROGOL AD, HAYMOND MW and VELDHIJS JD (1996). Sex steroids, growth hormone, insulin-like growth factor-1: neuroendocrine and metabolic regulation in puberty. *Horm Res* 45, 74-80.

MCGRANE MM, DE VENUE J, YUN J, BLOOM J, PARK E, WYNSHAW-BORIS A, WAGNER T, ROTTMAN FM and HANSON RW (1988). Tissue-specific expression and dietary regulation of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* 263, 11443-11451.

MCGRANE MM, YUN JS, MOORMAN AF, LAMERS WH, HENDRICK GK, ARAFAH BM, PARK EA, WAGNER TE and HANSON RW (1990). Metabolic effects of developmental,

tissue-, and cell-specific expression of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)/bovine growth hormone gene in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* 265, 22371-22379.

MELMED S (2009). Acromegaly pathogenesis and treatment. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 3189-3202.

MIQUET JG, FREUND T, MARTÍNEZ CS, GONZÁLEZ L, DÍAZ ME, MICUCCI GP, ZOTTA E, BOPARAI RK, BARTKE A, TURYN D and SOTELO AI (2013). Hepatocellular alterations and dysregulation of oncogenic pathways in the liver of transgenic mice overexpressing growth hormone. *Cell Cycle* 12, 1042-1057.

MIQUET JG, GIANI JF, MARTÍNEZ CS, MUÑOZ MC, GONZÁLEZ L, SOTELO AI, BOPARAI RK, MASTERNAK MM, BARTKE A, DOMINICI FP and TURYN D (2011). Prolonged exposure to GH impairs insulin signaling in the heart. *Journal of molecular endocrinology* 47, 167-177.

MIQUET JG, GONZÁLEZ L, MATOS MN, HANSEN CE, LOUIS A, BARTKE A, TURYN D and SOTELO AI (2008). Transgenic mice overexpressing GH exhibit hepatic upregulation of GH-signaling mediators involved in cell proliferation. *Journal of Endocrinology* 198, 317-330.

MIQUET JG, MUÑOZ MC, GIANI JF, GONZÁLEZ L, DOMINICI FP, BARTKE A, TURYN D and SOTELO AI (2010). Ames dwarf (*Prop1<sup>df</sup>/Prop1<sup>df</sup>*) mice display increased sensitivity of the major GH-signaling pathways in liver and skeletal muscle. *Growth Hormone & IGF Research* 20, 118-126.

MIQUET JG, SOTELO AI, BARTKE A and TURYN D (2004). Suppression of Growth Hormone (GH) Janus Tyrosine Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 5 Signaling Pathway in Transgenic Mice Overexpressing Bovine GH. *Endocrinology* 145, 2824-2832.

MIQUET JG, SOTELO AI, BARTKE A and TURYN D (2005a). Desensitization of the JAK2/STAT5 GH signaling pathway associated with increased CIS protein content in liver of pregnant mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 289, E600-E607.

MIQUET JG, SOTELO AI, BARTKE A and TURYN D (2005b). Increased SH2-B $\beta$  content and membrane association in transgenic mice overexpressing GH. *Journal of Endocrinology* 185, 301-306.

MIQUET JG, SOTELO AI, DOMINICI FP, BONKOWSKI MS, BARTKE A and TURYN D (2005c). Increased sensitivity to GH in liver of Ames dwarf (*Prop1<sup>df</sup>/Prop1<sup>df</sup>*) mice related to diminished CIS abundance. *Journal of Endocrinology* 187, 387-397.

MONTALTO G, CERVELLO M, GIANNITRAPANI L, DANTONA F, TERRANOVA A and CASTAGNETTA LAM (2002). Epidemiology, Risk Factors, and Natural History of Hepatocellular Carcinoma. *Annals of the New York Academy of Sciences* 963, 13-20.

- MULLIS P-E and TONELLA P (2008). Regulation of fetal growth: Consequences and impact of being born small. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 22, 173-190.
- MURPHY LJ, BELL GI and FRIESEN HG (1987). Growth Hormone Stimulates Sequential Induction of c-myc and Insulin-Like Growth Factor I Expression in Vivo. *Endocrinology* 120, 1806-1812.
- MURRAY PG and CLAYTON PE (2013). Endocrine Control of Growth. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 163, 76-85.
- NEWTON AC and TROTMAN LC (2014). Turning Off AKT: PHLPP as a Drug Target. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 54, 537-558.
- NIALL HD (1971). Revised Primary Structure for Human Growth Hormone. *Nat New Biol* 230, 90-91.
- NICKEL W (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. *European Journal of Biochemistry* 270, 2109-2119.
- NICKEL W (2005). Unconventional Secretory Routes: Direct Protein Export Across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *Traffic* 6, 607-614.
- NICHOLSON KM and ANDERSON NG (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* 14, 381-395.
- NILSSON AG, SVENSSON J and JOHANSSON G (2007). Management of growth hormone deficiency in adults. *Growth Hormone & IGF Research* 17, 441-462.
- NIU Z-S, NIU X-J and WANG W-H (2016). Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. *World Journal of Gastroenterology* 22, 9069-9095.
- NORMANNO N, BIANCO C, STRIZZI L, MANCINO M, MAIELLO MR, LUCA AD, CAPONIGRO F and SALOMON DS (2005). The ErbB Receptors and their Ligands in Cancer: An Overview. *Current Drug Targets* 6, 243-257.
- NORMANNO N, DE LUCA A, BIANCO C, STRIZZI L, MANCINO M, MAIELLO MR, CAROTENUTO A, DE FEO G, CAPONIGRO F and SALOMON DS (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366, 2-16.
- NORSTEDT G and PALMITER R (1984). Secretory rhythm of growth hormone regulates sexual differentiation of mouse liver. *Cell* 36, 805-812.
- OHLSSON C, MOHAN S, SJÖGREN K, TIVESTEN Å, ISGAARD J, ISAKSSON O, JANSSON J-O and SVENSSON J (2009). The Role of Liver-Derived Insulin-Like Growth Factor-I. *Endocrine Reviews* 30, 494-535.
- OLAYIOYE MA, NEVE RM, LANE HA and HYNES NE (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal* 19, 3159-3167.
- OLSSON B, BOHLOOLY-Y M, FITZGERALD SM, FRICK F, LJUNGBERG A, AHREN B, TÖRNELL J, BERGSTROM GR and OSCARSSON J (2005). Bovine Growth Hormone Transgenic Mice Are Resistant to Diet-Induced Obesity but Develop

Hyperphagia, Dyslipidemia, and Diabetes on a High-Fat Diet. *Endocrinology* 146, 920-930.

ONO H, SHIMANO H, KATAGIRI H, YAHAGI N, SAKODA H, ONISHI Y, ANAI M, OGIHARA T, FUJISHIRO M, VIANA AYI, FUKUSHIMA Y, ABE M, SHOJIMA N, KIKUCHI M, YAMADA N, OKA Y and ASANO T (2003). Hepatic Akt Activation Induces Marked Hypoglycemia, Hepatomegaly, and Hypertriglyceridemia With Sterol Regulatory Element Binding Protein Involvement. *Diabetes* 52, 2905-2913.

ORIAN J, TAMAKOSHI K, MACKAY I and BRANDON M (1990). New murine model for hepatocellular carcinoma: transgenic mice expressing metallothionein-ovine growth hormone fusion gene. *J Natl Cancer Inst* 82, 393-398.

ORIAN JM, SEONG LEE C, WEISS LM and BRANDON MR (1989). The Expression of a Metallothionein-Ovine Growth Hormone Fusion Gene in Transgenic Mice Does Not Impair Fertility but Results in Pathological Lesions in the Liver. *Endocrinology* 124, 455-463.

OSCARSSON J, CARLSSON LMS, BICK T, LIDELL A, OLOFSSON S-O and EDÉN S (1991). Evidence for the role of the secretory pattern of growth hormone in the regulation of serum concentrations of cholesterol and apolipoprotein E in rats. *Journal of Endocrinology* 128, 433-438.

OSCARSSON J, OTTOSSON M, JOHANSSON J-O, WIKLUND O, MÅRIN P, BJÖRNTORP P and BENGTTSSON B-Å (1996). Two weeks of daily injections and continuous infusion of recombinant human growth hormone (GH) in GH-deficient adults. II. Effects on serum lipoproteins and lipoprotein and hepatic lipase activity. *Metabolism - Clinical and Experimental* 45, 370-377.

OSCARSSON J, OTTOSSON M, VIKMAN-ADOLFSSON K, FRICK F, ENERBACK S, LITHELL H and EDEN S (1999). GH but not IGF-I or insulin increases lipoprotein lipase activity in muscle tissues of hypophysectomised rats. *Journal of Endocrinology* 160, 247-255.

OSCARSSON JAN, OLOFSSON S-O, BONDJERS G and EDEN SA (1989). Differential Effects of Continuous Versus Intermittent Administration of Growth Hormone to Hypophysectomized Female Rats on Serum Lipoproteins and Their Apoproteins. *Endocrinology* 125, 1638-1649.

PAINSON J-C and TANNENBAUM GS (1991). Sexual Dimorphism of Somatostatin and Growth Hormone-Releasing Factor Signaling in the Control of Pulsatile Growth Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology* 128, 2858-2866.

PALMER AJ, CHUNG M-Y, LIST EO, WALKER J, OKADA S, KOPCHICK JJ and BERRYMAN DE (2009). Age-Related Changes in Body Composition of Bovine Growth Hormone Transgenic Mice. *Endocrinology* 150, 1353-1360.

PANICI JA, HARPER JM, MILLER RA, BARTKE A, SPONG A and MASTERNAK MM (2010). Early life growth hormone treatment shortens longevity and decreases cellular stress resistance in long-lived mutant mice. *The FASEB Journal* 24, 5073-5079.

- PARK S-H, YAMASHITA H, RUI H and WAXMAN DJ (2001). Serine Phosphorylation of GH-Activated Signal Transducer and Activator of Transcription 5a (STAT5a) and STAT5b: Impact on STAT5 Transcriptional Activity. *Molecular Endocrinology* 15, 2157-2171.
- PASQUALI C, CURCHOD M-L, WÄLCHLI SB, ESPANEL X, GUERRIER M, ARIGONI F, STROUS G and VAN HUIJSDUIJNEN RH (2003). Identification of Protein Tyrosine Phosphatases with Specificity for the Ligand-Activated Growth Hormone Receptor. *Molecular Endocrinology* 17, 2228-2239.
- PERRY JK, EMERALD BS, MERTANI HC and LOBIE PE (2006). The oncogenic potential of growth hormone. *Growth Hormone & IGF Research* 16, 277-289.
- PERRY JK, LIU DX, WU ZS, ZHU T and LOBIE PE (2013). Growth hormone and cancer: an update on progress. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 20, 307-313.
- PFÄFFL MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45-e45.
- PFÄFFLE R (2015). Hormone replacement therapy in children: The use of growth hormone and IGF-I. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29, 339-352.
- PIESSEVAUX J, LAVENS D, MONTOYE T, WAUMAN J, CATTEEUW D, VANDEKERCKHOVE J, BELSHAM D, PEELMAN F and TAVERNIER J (2006). Functional Cross-modulation between SOCS Proteins Can Stimulate Cytokine Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 281, 32953-32966.
- PIWIEN-PILIPUK G, VAN MATER D, ROSS SE, MACDOUGALD OA and SCHWARTZ J (2001). Growth Hormone Regulates Phosphorylation and Function of CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\beta$  by Modulating Akt and Glycogen Synthase Kinase-3. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19664-19671.
- POIDVIN A, TOUZÉ E, ECOSSE E, LANDIER F, BÉJOT Y, GIROUD M, ROTHWELL PM, CAREL JC and COSTE J (2014). Growth hormone treatment for childhood short stature and risk of stroke in early adulthood. *Neurology* 83, 780-786.
- QU C-K (2002). Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1592, 297-301.
- QUAIFE CJ, MATHEWS LS, PINKERT CA, HAMMER RE, BRINSTER RL and PALMITER RD (1989). Histopathology Associated with Elevated Levels of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor I in Transgenic Mice. *Endocrinology* 124, 40-48.
- QUESNELLE KM, BOEHM AL and GRANDIS JR (2007). STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 102, 311-319.
- QUIGLEY CA, GILL AM, CROWE BJ, ROBLING K, CHIPMAN JJ, ROSE SR, ROSS JL, CASSORLA FG, WOLKA AM, WIT JM, REKERS-MOMBARG LTM and CUTLER JGB (2005). Safety of Growth Hormone Treatment in Pediatric Patients with

Idiopathic Short Stature. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90, 5188-5196.

RABEN MS (1958). Treatment of a Pituitary Dwarf with Human Growth Hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 18, 901-903.

RABINOVICH GA, TOSCANO MA, JACKSON SS and VASTA GR (2007). Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current opinion in structural biology* 17, 513-520.

RAM PA, PARK S-H, CHOI HK and WAXMAN DJ (1996). Growth Hormone Activation of Stat 1, Stat 3, and Stat 5 in Rat Liver: Differential Kinetics of Hormone Desensitization and Growth Hormone Stimulation of both Tyrosine Phosphorylation and Serine/Threonine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 271, 5929-5940.

RAM PA and WAXMAN DJ (1997). Interaction of Growth Hormone-activated STATs with SH2-containing Phosphotyrosine Phosphatase SHP-1 and Nuclear JAK2 Tyrosine Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17694-17702.

RAM PA and WAXMAN DJ (2000). Role of the Cytokine-inducible SH2 Protein CIS in Desensitization of STAT5b Signaling by Continuous Growth Hormone. *Journal of Biological Chemistry* 275, 39487-39496.

RAMSEY MM, INGRAM RL, CASHION AB, NG AH, CLINE JM, PARLOW AF and SONNTAG WE (2002). Growth Hormone-Deficient Dwarf Animals Are Resistant to Dimethylbenzanthracene (DMBA)-Induced Mammary Carcinogenesis. *Endocrinology* 143, 4139-4142.

RENEHAN AG and BRENNAN BM (2008). Acromegaly, growth hormone and cancer risk. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 22, 639-657.

RIDDERSTRÅLE M (2005). Signaling Mechanism for the Insulin-like Effects of Growth Hormone - Another Example of a Classical Hormonal Negative Feedback Loop. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5, 79-92.

RIMOIN DL, MERIMEE TJ and MCKUSICK VA (1966). Growth-Hormone Deficiency in Man: An Isolated, Recessively Inherited Defect. *Science* 152, 1635-1637.

RINALDI S, CLEVELAND R, NORAT T, BIESSY C, ROHRMANN S, LINSEISEN J, BOEING H, PISCHON T, PANICO S, AGNOLI C, PALLI D, TUMINO R, VINEIS P, PEETERS PHM, VAN GILS CH, BUENO-DE-MESQUITA BH, VRIELING A, ALLEN NE, RODDAM A, BINGHAM S, KHAW K-T, MANJER J, BORGQUIST S, DUMEAUX V, TORHILD GRAM I, LUND E, TRICHOPOULOU A, MAKRYGIANNIS G, BENETOU V, MOLINA E, DONATE SUÁREZ I, BARRICARTE GURREA A, GONZALEZ CA, TORMO M-J, ALTZIBAR JM, OLSEN A, TJONNELAND A, GRØNBÆK H, OVERVAD K, CLAVEL-CHAPELON F, BOUTRON-ROUAULT M-C, MOROIS S, SLIMANI N, BOFFETTA P, JENAB M, RIBOLI E and KAAKS R (2010). Serum levels of IGF-I, IGFBP-3 and colorectal cancer risk: results from the EPIC cohort, plus a meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer* 126, 1702-1715.

- RIPPERGER JA, FRITZ S, RICHTER K, HOCKE GM, LOTTSPEICH F and FEY GH (1995). Transcription Factors Stat3 and Stat5b Are Present in Rat Liver Nuclei Late in an Acute Phase Response and Bind Interleukin-6 Response Elements. *Journal of Biological Chemistry* 270, 29998-30006.
- RODDAM AW, ALLEN NE, APPLEBY P, KEY TJ, FERRUCCI L, CARTER HB, METTER EJ, CHEN C, WEISS NS, FITZPATRICK A, HSING AW, LACEY JV, HELZLSOUER K, RINALDI S, RIBOLI E, KAAKS R, JANSSEN JA, WILDHAGEN MF, SCHRÖDER FH, PLATZ EA, POLLAK M, GIOVANNUCCI E, SCHAEFER C, QUESENBERRY CP, VOGELMAN JH, SEVERI G, ENGLISH DR, GILES GG, STATTIN P, HALLMANS G, JOHANSSON M, CHAN JM, GANN P, OLIVER SE, HOLLY JM, DONOVAN J, MEYER F, BAIRATI I and GALAN P (2008). Insulin-like Growth Factors, Their Binding Proteins, and Prostate Cancer Risk: Analysis of Individual Patient Data from 12 Prospective Studies. *Annals of internal medicine* 149, 461-W488.
- ROSE SR, COOK DM and FINE MJ (2014). Growth Hormone Therapy Guidelines: Clinical and Managed Care Perspectives *Am J Pharm Benefits* 6, 134-146.
- ROSE SR, MUNICCHI G, BARNES KM, KAMP GA, URIARTE MM, ROSS JL, CASSORLA F and CUTLER JGB (1991). Spontaneous Growth Hormone Secretion Increases during Puberty in Normal Girls and Boys. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 73, 428-435.
- ROSENFELD RG, COHEN P, ROBISON LL, BERCU BB, CLAYTON P, HOFFMAN AR, RADOVICK S, SAENGER P, SAVAGE MO and WIT JM (2012). Long-Term Surveillance of Growth Hormone Therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, 68-72.
- ROSNER M, SIEGEL N, VALLI A, FUCHS C and HENGSTSCHLÄGER M (2010). mTOR phosphorylated at S2448 binds to raptor and rictor. *Amino Acids* 38, 223-228.
- ROTH J, GLICK SM, YALOW RS and BERSON SA (1963). Hypoglycemia: A Potent Stimulus to Secretion of Growth Hormone. *Science* 140, 987-988.
- ROTWEIN P (2012). Mapping the Growth Hormone – Stat5b – IGF-I Transcriptional Circuit. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23, 186-193.
- ROWLAND JE, LICHANSKA AM, KERR LM, WHITE M, D'ANIELLO EM, MAHER SL, BROWN R, TEASDALE RD, NOAKES PG and WATERS MJ (2005). In Vivo Analysis of Growth Hormone Receptor Signaling Domains and Their Associated Transcripts. *Molecular and Cellular Biology* 25, 66-77.
- ROWLINSON SW, YOSHIKATO H, BARCLAY JL, BROOKS AJ, BEHNCKEN SN, KERR LM, MILLARD K, PALETHORPE K, NIELSEN K, CLYDE-SMITH J, HANCOCK JF and WATERS MJ (2008). An agonist-induced conformational change in the growth hormone receptor determines the choice of signalling pathway. *Nature Cell Biology* 10, 740.
- RUGGIERI A, BARBATI C and MALORNI W (2010). Cellular and molecular mechanisms involved in hepatocellular carcinoma gender disparity. *International Journal of Cancer* 127, 499-504.

- SARBASSOV DD, GUERTIN DA, ALI SM and SABATINI DM (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* 307, 1098-1101.
- SÄVENDAHL L (2012). The Effect of Acute and Chronic Stress on Growth. *Science Signaling* 5.
- SCHÄGGER H and VON JAGOW G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
- SCHINDELIN J, ARGANDA-CARRERAS I, FRISE E, KAYNIG V, LONGAIR M, PIETZSCH T, PREIBISCH S, RUEDEN C, SAALFELD S, SCHMID B, TINEVEZ J-Y, WHITE DJ, HARTENSTEIN V, ELICEIRI K, TOMANCAK P and CARDONA A (2012). Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nature methods* 9, 10.1038/nmeth.2019.
- SCHLAGETER M, TERRACCIANO LM, D'ANGELO S and SORRENTINO P (2014). Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20, 15955-15964.
- SCHWARTZBAUER G and MENON RK (1998). Regulation of Growth Hormone Receptor Gene Expression. *Molecular Genetics and Metabolism* 63, 243-253.
- SEARS RC (2004). The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle* 3, 1133-1137.
- SEDEK M, VAN DER VELDEN LM and STROUS GJ (2014). Multimeric Growth Hormone Receptor Complexes Serve as Signaling Platforms. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 65-73.
- SHERR CJ and ROBERTS JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* 13, 1501-1512.
- SHEVAH O and LARON Z (2007). Patients with congenital deficiency of IGF-I seem protected from the development of malignancies: A preliminary report. *Growth Hormone & IGF Research* 17, 54-57.
- SHI Y, PALUCH BE, WANG X and JIANG X (2012). PTEN at a glance. *Journal of Cell Science* 125, 4687-4692.
- SHUAI K (1999). The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 71, 405-422.
- SIMPSON H, SAVINE R, SÖNKSEN P, BENGSSON B-Å, CARLSSON L, CHRISTIANSEN JS, CLEMMONS D, RAYMOND HINTZ PC, HO K, MULLIS P, ROBINSON I, STRASBURGER C, TANAKA T and THORNER M (2002). Growth hormone replacement therapy for adults: Into the new millennium. *Growth Hormone & IGF Research* 12, 1-33.
- SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ and KLENK DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.

- SNIBSON KJ (2002). Hepatocellular kinetics and the expression of growth hormone (GH) in the livers and liver tumours of GH-transgenic mice. *Tissue and Cell* 34, 88-97.
- SNIBSON KJ, BHATHAL PS, HARDY CL, BRANDON MR and ADAMS TE (1999). High, persistent hepatocellular proliferation and apoptosis precede hepatocarcinogenesis in growth hormone transgenic mice. *Liver* 19, 242-252.
- SONG G, OUYANG G and BAO S (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9, 59-71.
- SOTELO A, BARTKE A, KOPCHICK J, KNAPP and TURYN D (1998). Growth hormone (GH) receptors, binding proteins and IGF-I concentrations in the serum of transgenic mice expressing bovine GH agonist or antagonist. *Journal of Endocrinology* 158, 53-59.
- SOTELO AI, MIQUET JG, GONZÁLEZ L, BARTKE A and TURYN D (2008). Vitamin D3 cannot revert desensitization of growth hormone (GH)-induced STAT5-signaling in GH-overexpressing mice non-calcemic tissues. *Growth Hormone & IGF Research* 18, 148-156.
- SPANGENBERG HC, THIMME R and BLUM HE (2009). Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6, 423-432.
- SPANO D, RUSSO R, DI MASO V, ROSSO N, TERRACCIANO LM, RONCALLI M, TORNILLO L, CAPASSO M, TIRIBELLI C and IOLASCON A (2010). Galectin-1 and Its Involvement in Hepatocellular Carcinoma Aggressiveness. *Molecular Medicine* 16, 102-115.
- STEIGER A (2003). Sleep and endocrinology. *Journal of Internal Medicine* 254, 13-22.
- STEUERMAN R, SHEVAH O and LARON Z (2011). Congenital IGF1 deficiency tends to confer protection against post-natal development of malignancies. *European Journal of Endocrinology* 164, 485-489.
- STEYN FJ, TOLLE V, CHEN C and EPELBAUM J (2016). Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion. *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- STOPKOVÁ R, STOPKA P, JANOTOVÁ K and JEDELSKÝ PL (2007). Species-specific Expression of Major Urinary Proteins in the House Mice (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*). *Journal of Chemical Ecology* 33, 861-869.
- STOTZ M, GERGER A, HAYBAECK J, KIESSLICH T, BULLOCK M and PICHLER M (2015). Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma: Past, Present and Future. *Anticancer Research* 35, 5737-5744.
- STROUS GJ and GENT J (2002). Dimerization, ubiquitylation and endocytosis go together in growth hormone receptor function. *FEBS Letters* 529, 102-109.

- STROUS GJ, VAN KERKHOFF P, GOVERS R, CIECHANOVER A and SCHWARTZ AL (1996). The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *The EMBO Journal* 15, 3806-3812.
- SUN Y, LIU W-Z, LIU T, FENG X, YANG N and ZHOU H-F (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 35, 600-604.
- SWANSON SM and UNTERMAN TG (2002). The growth hormone-deficient Spontaneous Dwarf rat is resistant to chemically induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 23, 977-982.
- SWERDLOW AJ, COOKE R, BECKERS D, BORGSTRÖM B, BUTLER G, CAREL J-C, CIANFARANI S, CLAYTON P, COSTE J, DEODATI A, ECOSSE E, GAUSCHE R, GIACOMOZZI C, HOKKEN-KOELEGA ACS, KHAN AJ, KIESS W, KUEHNI CE, MULLIS P-E, PFAFFLE R, SÄVENDAHL L, SOMMER G, THOMAS M, TIDBLAD A, TOLLERFIELD S, VAN EYCKEN L and ZANDWIJKEN GRJ (2017). Cancer Risks in Patients Treated With Growth Hormone in Childhood: The SAGhE European Cohort Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102, 1661-1672.
- SWERDLOW AJ, HIGGINS CD, ADLARD P and PREECE MA (2002). Risk of cancer in patients treated with human pituitary growth hormone in the UK, 1959-85: a cohort study. *The Lancet* 360, 273-277.
- TAKAHASHI-YANAGA F and SASAGURI T (2008). GSK-3 $\beta$  regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. *Cellular Signalling* 20, 581-589.
- TALAMANTES F and ORTIZ R (2002). Structure and regulation of expression of the mouse GH receptor. *Journal of Endocrinology* 175, 55-59.
- TANG Z, YU R, LU Y, PARLOW AF and LIU J-L (2005). Age-dependent onset of liver-specific IGF-I gene deficiency and its persistence in old age: implications for postnatal growth and insulin resistance in LID mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 289, E288-E295.
- TANNAHILL GM, ELLIOTT J, BARRY AC, HIBBERT L, CACALANO NA and JOHNSTON JA (2005). SOCS2 Can Enhance Interleukin-2 (IL-2) and IL-3 Signaling by Accelerating SOCS3 Degradation. *Molecular and Cellular Biology* 25, 9115-9126.
- TANNENBAUM GS, CHOI HK, GURD W and WAXMAN DJ (2001). Temporal Relationship Between the Sexually Dimorphic Spontaneous GH Secretory Profiles and Hepatic STAT5 Activity. *Endocrinology* 142, 4599-4606.
- TANNENBAUM GS and LING N (1984). The Interrelationship of Growth Hormone (GH)-Releasing Factor and Somatostatin in Generation of the Ultradian Rhythm of GH Secretion. *Endocrinology* 115, 1952-1957.
- TAUBER M, DE BOUET DU PORTAL H, SALLERIN-CAUTE B, ROCHICCIOLI P and BASTIDE R (1993). Differential regulation of serum growth hormone (GH)-binding protein during continuous infusion versus daily injection of recombinant

- human GH in GH-deficient children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 76, 1135-1139.
- THANGAVEL C and SHAPIRO BH (2007). A Molecular Basis for the Sexually Dimorphic Response to Growth Hormone. *Endocrinology* 148, 2894-2903.
- THOMAS SJ, SNOWDEN JA, ZEIDLER MP and DANSON SJ (2015). The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *British Journal of Cancer* 113, 365-371.
- THORNER M (2001). Critical Evaluation of the Safety of Recombinant Human Growth Hormone Administration: Statement from the Growth Hormone Research Society. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 1868-1870.
- TOLLET-EGNELL P, FLORES-MORALES A, STAVRÉUS-EVERS A, SAHLIN L and NORSTEDT G (1999). Growth Hormone Regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Rat. *Endocrinology* 140, 3693-3704.
- TRITOS NA and BILLER BMK (2009). Growth hormone and bone. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 16, 415-422.
- UDY GB, TOWERS RP, SNELL RG, WILKINS RJ, PARK S-H, RAM PA, WAXMAN DJ and DAVEY HW (1997). Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7239-7244.
- UEKI I, GIESY SL, HARVATINE KJ, KIM JW and BOISCLAIR YR (2009). The Acid-Labile Subunit Is Required for Full Effects of Exogenous Growth Hormone on Growth and Carbohydrate Metabolism. *Endocrinology* 150, 3145-3152.
- VANDERKUR JA, BUTCH ER, WATERS SB, PESSIN JE, GUAN K-L and CARTER-SU C (1997). Signaling Molecules Involved in Coupling Growth Hormone Receptor to Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Endocrinology* 138, 4301-4307.
- VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A and SPELEMAN F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, research0034.0031-research0034.0011.
- VELDHUIS JD, ROEMMICH JN, RICHMOND EJ, ROGOL AD, LOVEJOY JC, SHEFFIELD-MOORE M, MAURAS N and BOWERS CY (2005). Endocrine Control of Body Composition in Infancy, Childhood, and Puberty. *Endocrine Reviews* 26, 114-146.
- VELLOSO CP (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British Journal of Pharmacology* 154, 557-568.
- VERGANI G, MAYERHOFER A and BARTKE A (1991). Acute effects of human growth hormone on liver cells in vitro: A comparison with livers of mice transgenic for human growth hormone. *Tissue and Cell* 23, 607-612.

- VESTERLUND M, ZADJALI F, PERSSON T, NIELSEN ML, KESSLER BM, NORSTEDT G and FLORES-MORALES A (2011). The SOCS2 Ubiquitin Ligase Complex Regulates Growth Hormone Receptor Levels. *PLOS ONE* 6, e25358.
- VIJAYAKUMAR A, NOVOSYADLYY R, WU Y, YAKAR S and LEROITH D (2009). Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth Hormone & IGF Research* 20, 1-7.
- VIJAYAKUMAR A, YAKAR S and LEROITH D (2011). The Intricate Role of Growth Hormone in Metabolism. *Frontiers in Endocrinology* 2, 32.
- WAGNER TE, HOPPE PC, JOLICK JD, SCHOLL DR, HODINKA RL and GAULT JB (1981). Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 6376-6380.
- WANG Z, MASTERNAK MM, AL-REGAIEY KA and BARTKE A (2007). Adipocytokines and the Regulation of Lipid Metabolism in Growth Hormone Transgenic and Calorie-Restricted Mice. *Endocrinology* 148, 2845-2853.
- WANKE R, HERMANNNS W, FOLGER S, WOLF E and BREM G (1991). Accelerated growth and visceral lesions in transgenic mice expressing foreign genes of the growth hormone family: an overview. *Pediatr Nephrol* 5, 513-521.
- WATERS MJ and BROOKS AJ (2012). Growth hormone and cell growth. *Enocr Dev* 23, 86-95.
- WAUTHIER V and WAXMAN DJ (2008). Sex-Specific Early Growth Hormone Response Genes in Rat Liver. *Molecular Endocrinology* 22, 1962-1974.
- WAXMAN DJ and O'CONNOR C (2006). Growth Hormone Regulation of Sex-Dependent Liver Gene Expression. *Molecular Endocrinology* 20, 2613-2629.
- WAXMAN DJ, PAMPORI NA, RAM PA, AGRAWAL AK and SHAPIRO BH (1991). Interpulse interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic cytochrome P450. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 6868-6872.
- WAXMAN DJ, RAM PA, PARK S-H and CHOI HK (1995). Intermittent Plasma Growth Hormone Triggers Tyrosine Phosphorylation and Nuclear Translocation of a Liver-Expressed, Stat 5-related DNA Binding Protein.: Proposed Role as an Intracellular Regulator of Male-Specific Liver Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 270, 13262-13270.
- WEE P and WANG Z (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* 9, 52.
- WELINDER C and EKBLAD L (2011). Coomassie Staining as Loading Control in Western Blot Analysis. *Journal of Proteome Research* 10, 1416-1419.
- WELTMAN A, WELTMAN JY, HARTMAN ML, ABBOTT RD, ROGOL AD, EVANS WS and VELDHIJS JD (1994). Relationship between age, percentage body fat, fitness,

and 24-hour growth hormone release in healthy young adults: effects of gender. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 78, 543-548.

WELTMAN A, WELTMAN JY, ROY CP, WIDEMAN L, PATRIE J, EVANS WS and VELDHIJS JD (2006). Growth hormone response to graded exercise intensities is attenuated and the gender difference abolished in older adults. *Journal of Applied Physiology* 100, 1623-1629.

WIDEMAN L, CONSITT L, PATRIE J, SWEARINGIN B, BLOOMER R, DAVIS P and WELTMAN A (2006). The impact of sex and exercise duration on growth hormone secretion. *Journal of Applied Physiology* 101, 1641-1647.

WIERSTRA I and ALVES J (2008). The c-myc Promoter: Still Mystery and Challenge. *Advances in Cancer Research*. Academic Press, pp. 113-333.

WOELFLE J and ROTWEIN P (2004). In vivo regulation of growth hormone-stimulated gene transcription by STAT5b. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 286, E393-E401.

WU H, CHEN P, LIAO R, LI Y-W, YI Y, WANG J-X, SUN T-W, ZHOU J, SHI Y-H, YANG X-R, JIN J-J, CHENG Y-F, FAN J and QIU S-J (2012). Overexpression of galectin-1 is associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma following resection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27, 1312-1319.

WU Y, CUI K, MIYOSHI K, HENNIGHAUSEN L, GREEN JE, SETSER J, LEROITH D and YAKAR S (2003). Reduced Circulating Insulin-like Growth Factor I Levels Delay the Onset of Chemically and Genetically Induced Mammary Tumors. *Cancer Research* 63, 4384-4388.

WU Y, YAKAR S, ZHAO L, HENNIGHAUSEN L and LEROITH D (2002). Circulating Insulin-like Growth Factor-I Levels Regulate Colon Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Research* 62, 1030-1035.

YAKAR S, LIU J-L, STANNARD B, BUTLER A, ACCILI D, SAUER B and LEROITH D (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7324-7329.

YAMAUCHI N, SHIBASAKI T, LING N and DEMURA H (1991). In vitro release of growth hormone-releasing factor (GRF) from the hypothalamus: Somatostatin inhibits GRF release. *Regul Pept* 33, 71-78.

YAMAUCHI T, UEKI K, TOBE K, TAMEMOTO H, SEKINE N, WADA M, HONJO M, TAKAHASHI M, TAKAHASHI T, HIRAI H, TUSHIMA T, AKANUMA Y, FUJITA T, KOMURO I, YAZAKI Y and KADOWAKI T (1997). Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 390, 91.

YAMAUCHI T, YAMAUCHI N, UEKI K, SUGIYAMA T, WAKI H, MIKI H, TOBE K, MATSUDA S, TSUSHIMA T, YAMAMOTO T, FUJITA T, TAKETANI Y, FUKAYAMA M, KIMURA S, YAZAKI Y, NAGAI R and KADOWAKI T (2000). Constitutive Tyrosine Phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by Autocrine Secretion of Prolactin in Human Breast Cancer. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33937-33944.

- YANG R-Y, RABINOVICH GA and LIU F-T (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10.
- YARDEN Y (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. *European Journal of Cancer* 37, 3-8.
- YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, CUTCUTACHE I, ROZEN S and MADDEN TL (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134-134.
- YOON S and SEGER R (2006). The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- YU C-L, JIN Y-J and BURAKOFF SJ (2000). Cytosolic Tyrosine Dephosphorylation of STAT5: potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 599-604.
- ZENDER L, VILLANUEVA A, TOVAR V, SIA D, CHIANG DY and LLOVET JM (2010). Cancer Gene Discovery in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of hepatology* 52, 921-929.
- ZHOU Y, XU BC, MAHESHWARI HG, HE L, REED M, LOZYKOWSKI M, OKADA S, CATALDO L, COSCHIGAMO K, WAGNER TE, BAUMANN G and KOPCHICK JJ (1997). A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13215-13220.
- ZHU T, GOH ELK, GRAICHEN R, LING L and LOBIE PE (2001). Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cellular Signalling* 13, 599-616.
- ZHU T, LING L and LOBIE PE (2002). Identification of a JAK2-independent Pathway Regulating Growth Hormone (GH)-stimulated p44/42 Mitogen-activated Protein Kinase Activity: GH Activation of Ral and Phospholipase D is Src-Dependent. *Journal of Biological Chemistry* 277, 45592-45603.
- ZICK Y (2004). Uncoupling insulin signalling by serine/threonine phosphorylation: a molecular basis for insulin resistance. *Biochemical Society Transactions* 32, 812-816.
- ZIMMERMANN S and MOELLING K (1999). Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). *Science* 286, 1741-1744.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

- A:** absorbancia  
**AC:** azul de Coomassie  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** ADN copia  
**Akt:** proteína quinasa b  
**ANOVA:** análisis de la varianza  
**AP-1:** proteína activadora 1  
**ARN:** ácido ribonucleico  
**ARNm:** ARN mensajero
- BAD:** agonista de muerte celular asociado a la proteína reguladora de la apoptosis Bcl-2
- c:** control  
**C/EBP $\beta$ :** proteína  $\beta$  de unión al potenciador CCAAT  
**CDK:** quinasa dependiente de ciclina  
**CIS:** proteína inducible por citoquinas que contiene un dominio SH2  
**Cq:** ciclo de cuantificación  
**CRD:** dominio de reconocimiento de carbohidratos  
**CREB:** proteína de unión al elemento de respuesta a la adenosina monofosfato cíclico  
**CYP:** citocromo P450
- dNTP:** desoxirribonucleótido trifosfato  
**DUSP:** proteína fosfatasa de especificidad dual
- E:** eficiencia de amplificación  
**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético  
**EGF:** factor de crecimiento epidérmico  
**EGFR:** receptor de EGF  
**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
**Elk1:** proteína que contiene un dominio ETS  
**ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares
- Fig.:** figura
- Gal-1:** galectina-1  
**GH:** hormona de crecimiento  
**GH (cont):** GH administrada de forma continua  
**GH (int):** GH administrada de forma intermitente  
**GHBP:** proteína de unión a GH  
**GHD:** deficiencia de GH  
**GHR:** receptor de GH  
**GHRH:** hormona liberadora de GH  
**Grb2:** proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2  
**GSK3:** glucógeno sintasa quinasa 3  
**GTP:** guanosina trifosfato
- H:** hembra  
**HCC:** carcinoma hepatocelular  
**HEPES:** ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-2-etano-sulfónico  
**HRP:** peroxidasa de rábano picante
- IB:** *immunoblotting*  
**Ig:** inmunoglobulina  
**IGF:** factor de crecimiento similar insulina  
**IP:** inmunoprecipitación  
**IR:** receptor de insulina  
**IRS:** sustrato del IR
- JAK:** tirosina quinasa *Janus*  
**JNK:** quinasa del amino terminal de c-Jun
- KIR:** región inhibidora de quinasas
- m:** pendiente  
**M:** macho  
**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos  
**MEK:** ERK quinasa  
**MKP:** MAPK fosfatasa

**mLST8:** subunidad LST8 del complejo blanco de rapamicina en mamíferos  
**mSIN:** proteína de interacción con la proteína quinasa activada por estrés de mamíferos

**mTOR:** proteína-quinasa blanco de rapamicina en mamíferos  
**mTORC:** complejo blanco de rapamicina en mamíferos  
**MUP:** proteína mayoritaria de orina

**N:** normal

**NF- $\kappa$ B:** factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B

**NoRTC:** control sin transcriptasa reversa

**ns:** no significativo

**NTC:** control sin templado

**PBS:** *buffer* fosfato salino

**PCNA:** antígeno nuclear de células en proliferación

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PDK:** quinasa dependiente de fosfoinosítidos

**PEPCK:** fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

**PFA:** paraformaldehído

**PHLPP:** proteína fosfatasa con dominio PH y repetición rica en leucinas

**PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinasa

**PIP2:** fosfatidilinositol 3,4-bifosfato

**PIP3:** fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**PP2A:** proteína fosfatasa 2A

**PRAS40:** sustrato de Akt rico en prolina de 40 kDa

**PTB:** dominio de unión a tirosina fosforilada

**PTEN:** proteína homóloga de fosfatasa y tensina

**PTP1B:** proteína tirosina fosfatasa 1B

**PVDF:** difluoruro de polivinilideno

**qPCR:** PCR cuantitativa

**Raf:** MEK quinasa

**Ras:** proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina

**RT:** transcripción reversa

**s:** semanas

**SAB:** seroalbúmina bovina

**SDS:** dodecilsulfato de sodio

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

**Ser:** serina

**SH2:** dominio de homología al dominio 2 de la proteína Src

**Shc:** proteína relacionada con el colágeno con dominio SH2

**SHP:** proteína fosfatasa de tirosina con dominio SH2

**SOCS:** supresor de la señal de citoquinas

**SOS:** factor intercambiador de nucleótidos de guanina

**Src:** proteína quinasa producto del protooncogén *Src*

**SRF:** factor de respuesta al suero

**SST:** somatostatina

**STAT:** transductor de la señal y activador de la transcripción

**T:** transgénico

**T-TBS:** *buffer* Tris salino con Tween 20

**TBE:** *buffer* compuesto por Tris, borato y EDTA

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

**Thr:** treonina

**TSC2:** tuberina

**Tyr:** tirosina