

FORMAS PREDOMINANTES DE HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA (hGH) EN SUEROS DE PACIENTES CON SECRECIÓN ELEVADA

Marta L. Pinzón, Cecilia Anzola V.*, Myriam S. de Gómez*.

*Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

Keywords: Growth hormone, acromegaly, pituitary gland.

RESUMEN

En este trabajo se compararon las formas predominantes de la Hormona de Crecimiento Humana (hGH), proveniente de sueros de pacientes con hipersecreción hormonal, para determinar los cambios que presenta en ellas y que puedan servir de diagnóstico para la detección de patologías, tales como acromegalia, como también alteraciones en el metabolismo degradativo de la proteína o en la unión a sus receptores específicos.

Las muestras de sueros (normal, post-estímulo con clonidina o ejercicio y de adenoma) se fraccionaron en Sephadex-G100 y la actividad inmunológica se estableció por medio del ensayo inmunoradiométrico (IRMA) específico. Los tres sueros presentaron las tres formas mayoritarias de hGH: monomérica (22K), «grande» (45K) y «grande-grande» (80K). La proporción relativa de las formas en el suero post-estímulo mostró un notorio incremento de la forma 22K, indicando que la estimulación conduce a un aumento de la forma monomérica con poca tendencia a la formación de agregados. La presencia de un adenoma hipofisiario acelera la producción de las tres formas mayoritarias de la hormona, con evidencia de un incremento en la forma "grande-grande", sugiriendo que la presencia de un adenoma va acompañada de una síntesis elevada de hGH y aparentemente no se producen otras formas diferentes a las del suero normal.

ABSTRACT

Human Growth Hormone (hGH) in serum from subjects with hormonal hypersecretion was partially characterized in order to establish the changes

in the different molecular weight sizes that could be used in the diagnosis of pathologies associated with hGH.

Serum samples (normal, after exercise or stimulation with clonidine and from adenoma) were fractionated in Sephadex G-100 and the immunological activity was measured by specific immunoradiometric assay (IRMA). All sera yielded the three mayor GH species: monomeric GH (22K), big GH (45K) and big-big GH (80K). The relative amount of 22K form in serum after stimulation increased significantly, meaning that stimulus increases monomeric GH with little tendency to form GH aggregates. Presence of pituitary adenoma accelerates the production of the three mayor forms of hormone, with evidence of increased amount of big-big GH, suggesting that the adenoma is associated with high synthesis of hGH without production of forms different to those in normal serum.

INTRODUCCION

La hGH es un polipéptido sintetizado por las células somatotropas de la hipófisis anterior (1) y ejerce una variedad de efectos metabólicos y de proliferación y diferenciación celular. Sus acciones más conocidas son las de promover el crecimiento longitudinal a través de los IgFs o factores de crecimiento de tipo insulínico (2). Su componente mayoritario es la forma 22K o monomérica (PM 22kDa), presentando otras formas minoritarias como la 20K (PM 20kDa), la 45 K o forma "grande" (PM 45kDa) y la 80K o forma «grande-grande» (PM 80KDa, detectada en suero humano) (3). Su secreción es regulada por el hipotálamo por medio de la GRH (hormona liberadora de GH) que estimula su liberación y por la somatostatina que inhibe su secreción (4). La presencia de tumores hipofisarios (adenoma) va acompañada frecuentemente de una hipersecreción hormonal (5). La evaluación de desórdenes en el crecimiento se lleva a cabo mediante aplicación de estímulos fisiológicos (ejercicio) y farmacológicos (dopamina, clonidina) con el fin de diagnosticar la causa primaria, dirigir el tratamiento hacia ese transtorno y predecir la respuesta del paciente al tratamiento (6,7).

El objetivo de este trabajo es caracterizar en forma parcial la hGH, obtenida de sueros de pacientes con niveles circulantes elevados (adenomas y niños estimulados con clonidina o ejercicio) para determinar los cambios que presenta en sus diferentes formas de peso molecular, que puedan servir como diagnóstico para la detección de patologías, como también alteraciones en el metabolismo degradativo de la proteína o en la unión a sus receptores específicos.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Recolección de muestras

Las muestras fueron colectadas de pacientes en ayunas y en horas de la mañana.

a) Sueros normales: se recogieron muestras de sueros de 5 personas (3 hombres y 2 mujeres) con edades entre 24 y 35 años, sin alteraciones fisiológicas.

b) Sueros post-estímulo: colectados en el Instituto para el Desarrollo y el Crecimiento de 21 niños (18 niños y 3 niñas) entre 12 y 14 años, cuya secreción fue estimulada con clonidina o ejercicio.

c) Sueros de adenoma: proporcionados por el Instituto de Seguros Sociales de 5 pacientes (mujeres entre 40 y 50 años) con características típicas de acromegalia y sin tratamiento previo.

2. Concentración de los sueros

Los sueros colectados fueron reunidos y concentrados por ultrafiltración (Sartorius SM 145/SM 146, membrana 10K) en atmósfera de nitrógeno (30 lbs., 1500 psi). El control de proteína total se determinó según el método de Lowry (8).

3. Separación de hGH de suero humano por cromatografía de exclusión molecular

Se empleó una columna de Sephadex-G100 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (1.5x90 cm) equilibrada con buffer de acetato de amonio 50 mM, EDTA 5mM, azida sódica 10mM a pH 8.5, eluida a una velocidad de 7.5 ml/hora a 4°C.

La calibración de la columna se realizó mediante la determinación del volumen muerto, volumen total y proteínas de peso molecular conocido: albúmina sérica bovina (BSA, 65kDa), pepsina (34.7 kDa), lisozima (14.5kDa). La separación de hGH de cada una de las mezclas concentradas de suero se realizó aplicando 3 ml de muestra a la columna y eluyendo bajo las mismas condiciones que los patrones de peso molecular conocido. El contenido de proteína fue detectado en cada fracción mediante lecturas de absorbancia a 280 nm y la fracción hormonal fue detectada mediante el ensayo inmunorradiométrico (IRMA) (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Recolección de muestras

En la tabla 1 se muestran los contenidos de proteína total y hGH en los sueros estudiados antes y después de concentrarlos mediante ultrafiltración.

2. Separación de hGH de suero humano

Los perfiles de elución protéica y de la hGH obtenidos en los tres tipos de mezclas de sueros fraccionados en la columna de Sephadex G-100, se muestran en la figura 1. En los tres perfiles se observa un comportamiento muy semejante en cuanto a contenido global de proteína.

En los tres sueros se encontraron especies de hGH inmunorreactivas a lo largo del rango de fraccionamiento de la resina, siendo los valores más altos en la zona correspondiente al monómero 22K (pico III) y en menor proporción en las zonas de la forma «grande» (pico II) y de la «grande-grande» (pico I).

En la tabla 2 se muestran los valores de hGH correspondientes a cada una de las formas predominantes en los sueros analizados. En el suero normal fue posible identificar la forma 22K en concentración mayor a las formas 45K y 80K, resultados que concuerdan con la literatura (3). En el suero post-estímulo la forma de mayor concentración correspondió a la 22K, aunque también se vieron incrementadas las otras dos formas, resultados que coinciden con reportes bibliográficos (6,10,11). Esto indica que la prueba de estimulación por inducción de hipoglicemia (clonidina o ejercicio) conduce principalmente a la secreción de la forma 22K indicando que el producto almacenado en la pituitaria normal es la forma monomérica, lo que haría pensar que esta es la proteína sintetizada en mayor cantidad por las células somatotróficas, mientras que las especies de mayor peso molecular podrían formarse en los gránulos secretores, durante el almacenamiento, mediante mecanismos pos-traducción o posteriormente en el suero por asociación con proteínas de transporte o por agregación de la misma hormona.

En el suero de adenoma la concentración de las tres formas mayoritarias de hGH se ve incrementada, respecto al suero normal, y de acuerdo con lo reportado por Amit y cols. (5), la forma 22K sigue siendo la más abundante. El incremento en la concentración de la forma 22K en el suero de adenoma respecto al normal, estaría indicando que la velocidad de transcripción del gen para hGH estaría elevada cuando se presenta un adenoma a nivel de la hipófisis. Además se observa un aumento de la forma 80K, respecto a la 22K, sugiriendo que hay una mayor tendencia a la formación de especies de alto peso molecular en condiciones patológicas donde está comprometida la glándula pituitaria.

CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL DE hGH EN LOS SUEROS ANALIZADOS

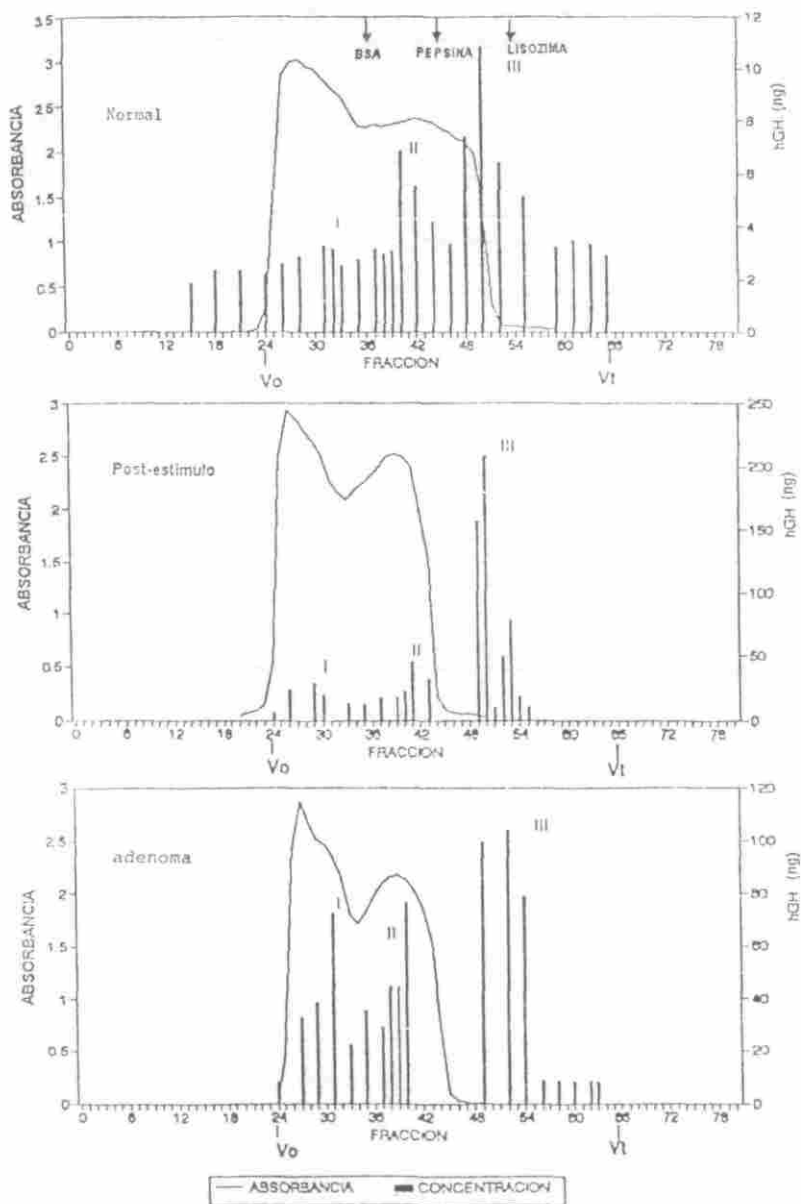


Figura 1.

Tabla 1. Determinación de proteína total y hGH en los sueros analizados.

Suero	Prot. inicial (mg/ml)	prot. post concentrac. (mg/ml)	prot. total (mg)	hGH total (ng)
Normal	124.07	247.23	3634.	30245
Post-estímulo	104.90	200.00	2100.08	1365
Adenoma	111.38	175.94	1900.18	1350

Tabla 2. Contenido hormonal de las formas de hGH en los sueros analizados utilizando la técnica Irma.

hGH	Suero normal (ng/ml)	Suero post-estímulo (ng/ml)	Suero adenoma (ng/ml)
80K	0.50 (19.3%)	3.70 (9.31%)	10.10 (25.3%)
45K	0.74 (28.5%)	5.40 (13.7%)	11.10 (27.7%)
22K	1.35 (52.2%)	30.40 (76.9%)	18.83 (47%)

AGRADECIMIENTOS

Al Programa IPICS, Universidad de Uppsala, Suecia; a Colciencias y al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFIA

1. Goodman, A.; Goodman, L.; Gilman, A. «*Las bases farmacológicas de la terapéutica*» 6 ed. Ed. Med. Panamericana, Argentina, 1980 p. 1153-1177.
2. Labhart, A. «*Endocrinología clínica teórica y práctica*». Ed. Salvat, España, 1990. p.119-137.
3. Chawla, R.K.; Parks, J.S.; Rudman, D. *An.Rev.Med.* 34:519-47, 1983.
4. Guillemin, R. *Science News*, 1982, 122, 292.
5. Amit T.; Ish-Shalom, S.; Glaser, B.; Youdim, M.; Hochberg, Z. *Horm.Res.* 1992, 37, 205-211.
6. Mazzajerri E.L. «*Avances en endocrinología y metabolismo*». Ed. Ancora, España, 1991. p.109-111.
7. Skottner, A. *Human Growth Hormone variants and insuline-like growth factor. I: Effects on growth parameters and peripheral nerve regeneration in rats*. Ph.D. Thesis. Printed by Reklam. Uppsala, Sweden, 1988. p.7-9.
8. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.; Randall, R.J. *Biol.Chem.* 1951, 193: 265.
9. Ayala, J.; Carvajal, C.; Anzola, C.; de Gómez, M. «*Obtención de hTSH de hipófisis humana*». *Revista Colombiana de Química*, Bogotá, Colombia. 1993, 22:(1), 15.
10. Markoff, E.; Lee, D.; Culler, F.; Jones, K.; Lewis, U. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986, 62, 644-69.
11. Baumann, G.; Stolar, M. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986, 62, 789.