

11213 8
Ti.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

SUBDIRECCION GENERAL MEDICA
DELEGACION 3 SUROESTE DEL DISTRITO FEDERAL

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
"DR. BERNARDO SEPULVEDA G."
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

***VARIACIONES EN LAS ISOFORMAS DEL RNAm DEL
RECEPTOR DE HORMONA DEL CRECIMIENTO EN
PACIENTES
ACROMEGALICOS TRATADOS CON OCTREOTIDO***

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL DIPLOMA COMO ESPECIALISTA EN

ENDOCRINOLOGIA

PRESENTA:

DANIELA NORA SÖDERLUND SEOANE

MEXICO, D.F.

ENERO DE 1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

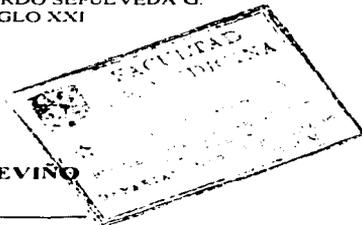
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. NIELS HANSEN WACHER RODARTE

wah

JEFE DE LA DIVISION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPULVEDA G."
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI



DR. ARTURO ZARATE TREVINO

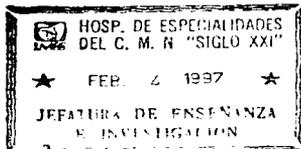
Zarate

JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN ENFERMEDADES ENDOCRINAS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACION EN ENDOCRINOLOGIA
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPULVEDA G."
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

DR. MOISES MERCADO ATRI

M.A.

JEFE DEL SERVICIO DE ENDOCRINOLOGIA
PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO DE ESPECIALIZACION EN ENDOCRINOLOGIA
ASESOR DE TESIS
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. BERNARDO SEPULVEDA G."
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI



“Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por el Gobierno de México, a través de la Secretaría de Relaciones Exteriores”.

Se agradece a la División de Intercambio y Becas de la Secretaría de Relaciones Exteriores el apoyo prestado para la realización de ésta Subespecialidad.

A Carlos y Georgina, por Todo.

INDICE

I. ANTECEDENTES

- a)** Heterogeneidad de GH
- b)** Proteínas ligadoras de GH
- c)** Receptor de GH
- d)** Acromegalia.
- e)** Medidas terapéuticas en Acromegalia. Octreótido.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III. HIPOTESIS

IV. OBJETIVOS

V. MATERIAL Y METODOS

- a)** Selección de pacientes
- b)** Controles sanos
- c)** Protocolo de estudio
- d)** Extracción de RNA total
- e)** RT-PCR
- f)** Análisis de resultados

VI. CONSIDERACIONES ETICAS

VII. RESULTADOS

VIII. DISCUSION

IX. CONCLUSIONES

X. TABLAS.FIGURAS.

XI. BIBLIOGRAFIA

I. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

La hormona de crecimiento (GH-N) es sintetizada y secretada por la adenohipófisis, y tiene múltiples efectos: promueve el crecimiento corporal, estimula el metabolismo intermedio y regula la transcripción de genes específicos como el del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I), el citocromo P450, el *c-fos* y el *c-jun*.

La GH-N proviene de una familia de proteínas que incluyen la variante de GH que se expresa en la placenta (GH-V) y las somatomotropinas coriónicas (hCS-A y hCS-B). Estas formas de GH están codificadas por diferentes genes (GH-N, GH-V, CS-A y CS-B) que se encuentran en el brazo corto del cromosoma 17.

El gen de la hormona del crecimiento genera, mediante empalme alternativo, 2 RNAm que respectivamente dan lugar a 2 proteínas, conocidas como GH 22K y GH 20K (1). La forma dominante de GH tanto en la hipófisis como en la circulación es la GH 22K; la cual consta de 191 aminoácidos.

Además de estos procesos pretraduccionales, la GH sufre modificaciones presecretorias tales como amidación y glucosilación y postsecretorias entre las que se incluyen agregación molecular y unión a proteínas transportadoras (1).

Se han identificado por lo menos, 2 proteínas transportadoras de GH en plasma de humanos y varias otras especies (GHBPs). La principal de estas proteínas transportadoras es la llamada de "alta afinidad". Esta GHBP de alta

afinidad fué descrita y caracterizada en 1985/86 por Baumann et al (2) y Herrington et al (3). Se trata de una glucoproteína de cadena simple que posee una alta afinidad, una capacidad de unión limitada y una alta especificidad para GH 22K, si bien une también GH-V y GH 20K. El peso molecular de la misma es de aproximadamente 60-65 KD, lo cual hace que el complejo hormona-proteína sea de 80-85 KD. En la circulación, este complejo GH/GHBP constituye parte de la llamada "big-big GH" (4). En plasma, la concentración de GHBP favorece la formación de complejos 1:1 debido a que las concentraciones de BP son muy bajas como para permitir estequiometría 1:2 (5). En el estado de equilibrio, la GHBP de alta afinidad une el 40-50% de la hormona circulante (6). Se sabe que la GHBP de alta afinidad corresponde a la porción extracelular (aproximadamente los 240-246 aminoácidos terminales) del receptor de GH. Lo anterior se sospechó poco después del descubrimiento de GHBP, y posteriormente fue corroborado por semejanzas inmunológicas y finalmente, demostrado con la clonación y secuenciación del gen del receptor de GH (7). La GH interactúa con su receptor con una estequiometría 1:2; esto es, 1 molécula de GH se une al receptor mediante un primer sitio de unión, lo que activa un segundo sitio de unión, el cual se une a una segunda molécula de receptor, produciendo dimerización de dos receptores, y con ello, activación de la señal (8). Aunque la GH se une a su proteína transportadora (BP) con alta afinidad, la afinidad del receptor de GH por su ligando es 5 a 10 veces mayor que el de la BP y la concentración de receptores

es muy alta en los órganos blanco, lo que asegura la unión de la hormona al receptor (5).

Las ventajas de una proteína transportadora son muchas. En primer lugar, la GH tiene una vida media en plasma muy corta (3 a 7 minutos), pero cuando se encuentra unida a su proteína transportadora su vida media se incrementa considerablemente (20 minutos) (9, 10). En segundo término, la GHBP funciona como un amortiguador de la secreción pulsátil de GH (10). Además, como la hormona se depura de la circulación por filtración glomerular y por endocitosis mediada por receptor en las células blanco, su unión a la proteína retarda ambos procesos, porque el complejo hormona-BP es muy grande para ser filtrado en el riñón y porque la BP interfiere con la unión de la GH con su receptor (9, 10). Todo esto incrementa las concentraciones séricas de la GH y la mantiene disponible para que sea cedida a su receptor por el gradiente de afinidad anteriormente mencionado (11).

La segunda forma molecular en importancia de la GH es la 20K, la cual pierde los últimos 32-46 aminoácidos por empalme alternativo del gen que codifica para la GH. Desde su descubrimiento en 1978 por Lewis et al (12), sus propiedades biológicas han sido investigadas en varios modelos animales, pero se sabe poco acerca de su rol biológico en humanos. Tiene una afinidad reducida por la GHBP de la 22K y además una capacidad de unión nula al receptor hepático de GH, lo cual indica que esta forma molecular tiene muy poca actividad somatotrópica (13, 14, 15).

Todo lo anterior produce la heterogeneidad de la GH circulante. Se desconoce el significado de tanta heterogeneidad; pero sin duda la actividad biológica varía entre las distintas isoformas.

A diferencia de otras hormonas, la GH no tiene un tejido o célula blanco específicos. Esta hormona ejerce sus acciones biológicas, en particular sus efectos somatotrópicos y metabólicos, interactuando con un receptor que se expresa en forma ubicua en los tejidos del organismo (7). Al igual que la prolactina y algunas interleucinas, este receptor pertenece a la familia de receptores de citocinas y factores de crecimiento, los cuales tienen un dominio extracelular con secuencias repetidas de cisteínas en la porción que liga a la hormona, un dominio transmembrana simple y un dominio intracelular de longitud variable (16).

El gen que codifica para el receptor de GH ha sido clonado recientemente (7). El mismo está compuesto por ocho exones en el dominio extracelular. Este gen produce 2 isoformas de RNAm mediante la inclusión o exclusión alternativa del exón 3 (17, 18, 19). Así, las proteínas que se codifican a partir de estas dos isoformas de RNAm difieren en el extremo amino terminal por la presencia (+3) o ausencia (-3) de 22 aminoácidos (17, 18, 19). Se sabe que las dos isoformas de RNAm del receptor de GH se expresan en todos los tejidos humanos (7), aunque en proporciones variables (17, 18, 19). Urbanek et al en 1992 propusieron que la proporción con la que se expresan las isoformas +3 y -3, es "tejido-específica" (19). No obstante lo anterior, Sobrier et al en 1993 evidenciaron que la proporción de las dos isoformas no solamente varía entre tejidos, sino que también es variable en un

mismo tejido (18). Esto último llevó a Mercado et al en 1994 a concluir que la expresión del gen del receptor de GH depende de las condiciones metabólicas de la célula en cuestión (17). Estas condiciones metabólicas incluyen factores como la glucosa y el efecto de la misma GH, y otras hormonas como la insulina, sobre la expresión de este gen (17).

No se sabe con precisión si la GH regula su receptor positiva o negativamente. A este respecto, existen estudios en animales que apoyan ambas posibilidades (14); sin embargo, estos estudios no necesariamente reflejan lo que sucede en el humano, pues esta regulación varía entre las diferentes especies (14).

Cuando se miden las concentraciones circulantes de la proteína ligadora de GH (GHBP), que como ya se comentó representa la porción extracelular del receptor de GH, podemos deducir en forma indirecta las concentraciones tisulares del receptor (20, 21). En niños con deficiencia de GH, que reciben tratamiento con GH recombinante, algunos autores han demostrado que los niveles de GHBP se elevan (22, 23) mientras que otros no encontraron cambio alguno (24). Por otra parte, en la acromegalia, que se caracteriza por un aumento en las concentraciones de GH, los niveles de GHBP se han reportado consistentemente disminuidos (25, 26).

Se desconoce en que forma se regula la expresión del gen del receptor de GH en estados de deficiencia y exceso de GH. La acromegalia es una entidad caracterizada por un incremento sostenido en las concentraciones de GH que escapan a la regulación por el eje hipotálamo-hipófisis-periferia. La misma puede

ser eutópica, por producción de GH por un adenoma localizado en la región selar (27, 28), o ectópica producida por tumores extraselares ya sea intraeraneanos, como en los casos de gangliocitomas hipotalámicos que producen el factor liberador de GH (27, 28, 29, 30) o por carcinoides bronquiales productores del mismo factor o en un menor número de casos, productores de GH (29, 30, 31, 32). La mayoría de los casos son secundarios a un adenoma hipofisario productor de GH.

El diagnóstico se realiza en base a los cambios físicos dados en forma predominante por acroecrecimiento, y con las alteraciones bioquímicas secundarias al exceso de GH como por ejemplo intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus, los cuales llevan a buscar una confirmación bioquímica que se lleva a cabo por medio de la determinación de GH e IGF-I (33).

En condiciones normales, la hormona de crecimiento es suprimida por una carga oral de glucosa, pero cuando la producción de GH es tumoral se pierde la regulación fisiológica del eje. Es por ello, que el diagnóstico bioquímico se realiza por medio de la determinación de GH en condiciones basales y luego de una carga de 75 g de glucosa por vía oral, con lo que las concentraciones de GH deben suprimirse a menos de 2ng/dl a los 90 minutos (34). En cuanto a las concentraciones de IGF-I, ésta varía con la edad y el sexo, y un valor por encima de los referidos como normales, según los parámetros antes citados, hacen el diagnóstico.

Actualmente se propone la medición de una de las proteínas transportadoras de la IGF-I, la IGF-BP3, que se considera como un parámetro más fidedigno de las concentraciones de IGF-I, ya que tiene una vía media más larga.

Debido a los efectos deletéreos que provoca un exceso de GHI por los cambios físicos, fisiológicos y bioquímicos que ocasiona, esta entidad debe ser tratada en forma rápida. El tratamiento de elección es la cirugía hipofisaria (en los casos eutópicos, en los demás depende de la localización del tumor, y se considera a cada caso en particular). La misma se lleva a cabo idealmente por vía transfenoidal, aunque en ocasiones, por el tamaño tumoral, la misma debe ser ejecutada en más de una ocasión, ya que la permanencia de remanentes tumorales impiden la curación (35).

Cuando con la cirugía no es posible llegar a la curación (localización tumoral de difícil acceso, por ejemplo) el paciente es enviado a radioterapia, la cual como la cirugía, conlleva el riesgo de ocasionar déficit hormonal en otras esferas (35).

Se han propuesto varios esquemas terapéuticos con fármacos. Dentro de los más usados se encuentran el uso de la bromoergocriptina (BEC), con la cual se ha evidenciado mejoría en el tamaño tumoral debido a que algunos de los tumores productores de GHI son mixtos y también producen prolactina (PRL), y los tumores productores de PRL responden bien a este medicamento. Sin embargo, no es una medida de elección para los pacientes acromegálicos(35, 36).

Hay varios estudios que utilizan a un análogo de la somatostatina, el octreótido, como herramienta para tratar a la acromegalia. Ha demostrado ser sumamente efectivo en mejorar esta condición ya que disminuye el tamaño del tumor (36, 37), y si bien en ocasiones no disminuye las concentraciones de GH sérica, el paciente tiene una mejoría ostensible la cual se refleja en disminución de los cambios acrales y disminución o desaparición de la cefalea que estos pacientes presentan muy frecuentemente. Se propone como tratamiento en los casos que por alguna razón no pueden ser manejados quirúrgicamente, y en tanto se espera el efecto de la radioterapia, la cual en ocasiones lleva varios años para lograr su efecto (35). Dentro de los efectos adversos se encuentran predominantemente diarrea, constipación, molestias abdominales, náuseas, formación de lodo biliar, y en menor proporción litiasis vesicular (38, 39).

La acromegalia se acompaña de bajos niveles de GHBP, mismos que tienden a elevarse con el tratamiento de la enfermedad y corrección del hipersomatotropismo (40, 41). Estudios preliminares parecen demostrar que el tratamiento de la acromegalia con octreótido también tiende a elevar los niveles de GHBP de estos sujetos (42, 43)

Se desconoce si el octreótido produce cambios en las concentraciones y/o proporciones de las isoformas del RNA del receptor de GH.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que el exceso de Hormona de Crecimiento (GH) va acompañado de profundos cambios metabólicos, y partiendo de la tesis de que la regulación de la expresión del gen del receptor de GH se modifica por influencias metabólicas, se estudiará en el paciente acromegálico dicha regulación, por medio de la administración de Octreótido, un análogo de la somatostatina (*Sandostatina*®). resultando de esta forma el paciente acromegálico un modelo único in vivo para tal propósito.

III. HIPOTESIS

- La proporción en la expresión de las dos isoformas del RNAm del receptor de la Hormona de Crecimiento es diferente en pacientes acromegálicos que en controles sanos de la misma edad y sexo.
- La proporción en la expresión de las dos isoformas del RNAm del receptor de la Hormona de Crecimiento se modifica con el tratamiento con un análogo sintético de la somatostatina (octreótido)

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión del RNAm del receptor de la Hormona de Crecimiento “in vivo” en pacientes acromegálicos y en controles sanos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar en que proporción se expresan las dos isoformas del RNAm del receptor de la Hormona de Crecimiento en adultos sanos y en pacientes acromegálicos.
- Determinar si la proporción en la expresión de estas dos isoformas se modifica con el tratamiento con octreótido en el paciente acromegálico.

V. MATERIAL Y METODOS

Selección de pacientes:

Pacientes con acromegalia corroborada clínica y bioquímicamente, con documentación de lesión hipofisaria mediante resonancia magnética nuclear. Sin restricción de edad o sexo.

Ya que lo que investigamos en este trabajo (regulación "in vivo" de la expresión genética del receptor de GH) no ha sido hecho con anterioridad, estudiamos un número muy bajo de pacientes pues los resultados fueron consistentemente los mismos, y el Comité de Investigación y Etica de este Hospital autorizó este proyecto con el recaudo de hacerlo en el mínimo de pacientes posibles, ya que el medicamento utilizado (Oetreótido) implica un alto costo para la Institución. En base a nuestros resultados determinamos que no era necesario incrementar el número de la muestra a más de 3 pacientes.

Parámetros bioquímicos:

- a) GH basal ≥ 2 ng/dl, que no suprime a menos de 2 ng/dl luego de una carga oral de 75 g de glucosa.
- b) IGF-I elevada para edad y sexo.

Parámetros de imagenología:

Imagen de micro o macroadenoma hipofisario demostrada por resonancia magnética nuclear (RMN).

Controles sanos:

Hombres y mujeres con edades ajustadas de acuerdo a los pacientes reclutados, con integridad en sus funciones endócrinas hipotálamo-hipófiso-periferia , y que no padezcan enfermedades que pudieran afectar el eje somatotrópico, tales como la diabetes, el hipotiroidismo, la insuficiencia renal o hepática, u otras enfermedades sistémicas importantes.

Estos controles fueron seleccionados entre aquellos pacientes que ya tenían determinaciones hormonales basales, por algún otro motivo, y laboratorios básicos dentro de límites normales y que consintieron en la extracción de 30 ml de sangre para este protocolo.

Protocolo de estudio:

Una vez diagnosticada clínica, bioquímica y por imagenología la acromegalia, a los pacientes reclutados se les tomó una muestra basal de sangre venosa (30 ml). Inmediatamente después, se les inició octreótido a razón de 100 µg (0.5 ml) cada 8 horas por vía subcutánea durante dos meses. Al término de estos dos meses, y menos de una hora después de haber recibido la dosis matutina de octreótido, se volvió a tomar muestra de sangre venosa (30 ml). Posteriormente, se suspendió el octreótido y el paciente fue sometido a cirugía hipofisaria. Se

establecieron estos lapsos ya que son los tiempos aproximados de diferimiento de la cirugía hipofisaria, la cual es el tratamiento definitivo.

Se extrajeron 30 ml de sangre de una vena periférica en tubos con EDTA. El plasma fué separado del paquete celular por centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 4°C, usándose el mismo para determinaciones de: GH, IGF-I, IGF-BP3, Hormona Folículo Estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), Prolactina (PRL), Hormona de Crecimiento (GH), Cortisol, pruebas de funcionamiento tiroideo (PFT) y Estradiol o Testosterona según se trató de paciente femenino o masculino respectivamente. Todas estas determinaciones son imprescindibles para valorar el eje hipotálamo-hipófiso-periferia que se efectúa en todos los pacientes con enfermedades hipofisarias

El paciente fue controlado clínicamente cada 15 días, y a los 30 y 60 días se le efectuó un ultrasonido abdominal para detectar precozmente el mayor efecto indeseable del octreótido que es la litiasis vesicular.

Ensayos hormonales específicos

La determinación de GH se hizo mediante radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo, utilizando un estuche comercial de Diagnostic Products Corporation (DPC, Los Angeles Cal, USA), el cual tiene una sensibilidad de 0.9ng/ml y un coeficiente de variación (CV), intra e interensayo de 2.7 y 4.2% respectivamente.

La determinación de IGF-I se realizó con análisis inmunorradiométrico de dos sitios (IRMA), previa separación con ácido-etanol de proteínas ligadoras de IGF (IGF-BPs) (DSL; Webster, TX, USA). La sensibilidad de este método es de 0.8 ng/ml y los CVs intra e interensayo son de 2.6 y 4.4%, respectivamente.

Los niveles de IGFBP3 se determinaron mediante un IRMA (DSL, Webster, TX, USA) con una sensibilidad de 0.5 ng/ml, con CVs intra e interensayo de 1% y 2.96%, respectivamente.

Extracción de RNA

Al paquete celular obtenido después de centrifugar la sangre, se le añadió un buffer de lisis de eritrocitos (KHCO₃ 10 mM, NH₄Cl 155mM, 0.1 mM EDTA); la mezcla se lavó repetidamente con solución salina 0.9%, descartando por centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 4°C el sobrenadante que es donde los restos de eritrocitos permanecen. Las células mononucleares que quedaron en el botón fueron resuspendidas en solución salina al 0.9% y cuantificadas en un hemocitómetro.

El RNA total fue extraído de las células mediante el método simplificado de Chomezynski (extracción con isotiocianato de guanidinio y precipitación con fenol-cloroformo) (44). La simplicidad y rapidez de éste método permitió una alta recuperación con una baja degradación del RNA.

Brevemente, una suspensión de células (entre 5 y 10 millones) colectadas por centrifugación se lizaron con 1 ml de reactivo Trizol por pipeteo repetido.

Luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de complejos de nucleoproteínas, se agregaron 0,2 ml de cloroformo por cada mililitro de reactivo Trizol, las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa incolora y se precipitó el RNA con 0,5 ml de isopropanol por cada mililitro de Trizol usado. Las muestras se incubaron 30 minutos a -70°C y se centrifugaron por 10 minutos a 4°C. El botón de RNA se lavó con etanol 75%, se secó al aire y se resuspendió en agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC).

Se determinó su concentración y pureza por lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm, y se almacenó a -70°C hasta su uso en RT-PCR.

RT-PCR:

Un microgramo de RNA total se desnaturalizó 5 min a 70°C en buffer RT-PCR (0.02 M Tris-HCl a pH 7.6, 0.05 M KCl, 1.5 mM MgCl₂). La transcripción reversa se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C, en presencia de 10 pMol del oligonucleótido antisentido (denominado "4", y común a ambas isoformas de RNAm del receptor de GH), (Figura 1), 2 mmol/L de desoxi-NTPs, 200 U de transcriptasa reversa (MMLV, BRL, Gaithersburg, MD, USA) y 10 U de inhibidor placentario de RNAsas (hpRNAsin, US Biochem. Corp).

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) utiliza el oligonucleótido antisentido, común o 3' y los dos oligonucleótidos sentido o 5' para la amplificación específica del DNAc del receptor con y sin el exón 3

(oligonucleótidos "+3" y "-3"), (Figura 1). La reacción se llevó a cabo en buffer de PCR (0.05 M KCl, 0.037 M Tris-HCl a pH 9, 1.5 mM MgCl₂), con 2.5 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer, Cetus Corp, Norwalk, CT) y 2 mmol/L de desoxi-NTPs. Se realizaron 30 ciclos de PCR, el primero de los cuales constó de una desnaturalización larga de 5 minutos a 92° C. Los ciclos subsiguientes se realizaron con los siguientes parámetros: a) desnaturalización a 92°C por 15 segundos, b) alineación a 52°C por 30 segundos, y c) extensión a 72°C por 2 min. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 6% teñido con bromuro de etidio. La cuantificación de su proporción relativa se realizó mediante densitometría.

Análisis de resultados:

Se comparó la proporción relativa de las isoformas del RNAm de los receptores en cada etapa de la evolución del paciente (antes y después del tratamiento con Octreótido) mediante ANOVA

VI. CONSIDERACIONES ETICAS

El tratamiento de la acromegalia con Oetreótido es una medida terapéutica aceptada mundialmente para aquellos pacientes en los cuales el diferimiento de la cirugía hipofisaria (tratamiento definitivo) es muy prolongado, para pacientes que rechazan la opción quirúrgica o que por algún motivo la tengan contraindicada, para aquellos ya operados pero que presentan remanente tumoral o recidiva en tanto una nueva cirugía puede ofrecerse, o en aquellos casos en que se aguarda el efecto de la radioterapia como medida terapéutica.

Una vez seleccionados los pacientes que se incluyeron en el estudio, se les explicó en qué consiste esta medida terapéutica y cuáles son los posibles efectos adversos y colaterales secundarios al uso del medicamento.

Los pacientes que aceptaron firmaron una carta de consentimiento.

Asimismo se seleccionaron los controles sanos y se les explicó que la extracción de 30 ml de sangre de una vena del brazo no les produciría ningún beneficio, por tal motivo los mismos también firmaron una carta de consentimiento.

El proyecto contempló las normas éticas, el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud y la declaración de Helsinski de 1975, enmendada en 1983.

Se adjunta formato de la carta de consentimiento informado para pacientes y para controles sanos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ declaro haber sido informado que el tratamiento con Octreótido (Sandostatina [®]) que recibiré en tanto sea programada mi fecha quirúrgica y se completen los detalles pertinentes para la misma, además de mejorar sintomatología de mi enfermedad, y modificar el tamaño del tumor hipofisario que lo ocasiona, podrá producirme efectos secundarios tales como diarrea, distensión abdominal, litiasis vesicular, hipotiroidismo.

Además, se hace de mi conocimiento que se me harán controles clínicos cada 15 días durante el lapso en que reciba el mencionado tratamiento y que mensualmente se me controlará con un ultrasonido abdominal a fin de poder detectar precozmente las citadas complicaciones vesiculares.

Asimismo se me informó que al iniciar los estudios y luego de 2 meses de recibir Octreótido se me extraerán 30 ml de sangre de una vena del brazo en cada ocasión, para determinación de hormonas hipofisarias y para un protocolo de investigación.

Me han asegurado que en cualquier momento en que lo desee podré salir de este protocolo sin que ello me ocasionare ningún perjuicio en mi atención médica integral.

Firma del paciente:

Firma del testigo:

Aclaración: _____

Vínculo: _____

México D.F. a los ____ días del mes de _____ de 199__.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONTROLES SANOS

Yo, _____, declaro que he asentido en que se me extraigan 30 ml de sangre de una vena del brazo en una sola oportunidad, la cual será utilizada en un protocolo de investigación.

Dicha extracción no me ocasionará ningún beneficio, pero tampoco ningún perjuicio, por lo que libremente he decidido colaborar con dicho protocolo de investigación.

Firma del control sano:

Firma del testigo:

Aclaración: _____

Vínculo: _____

México, DF, a los ____ días del mes de _____ de 199__.

VI. RESULTADOS

Las dosis de Octreótido fueron administradas tal como se describe en materiales y métodos. Durante el período de tratamiento, las determinaciones de laboratorio se hicieron 30 minutos después de una dosis habitual matutina de Octreótido.

Los controles sanos, presentaron valores normales en todas las determinaciones de laboratorio efectuadas. Debido al bajo número de sujetos sanos estudiados (igual número que de pacientes), no se tomó al promedio de los mismos como valor normal, sino que se utilizaron los valores de referencia del Laboratorio de Determinaciones Hormonales del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, los cuales están ajustados a la población Mexicana.

Manifestaciones clínicas:

Los efectos clínicos de la administración de Octreótido a corto plazo (hasta 6 meses) en pacientes acromegálicos ha sido previamente reportado por Ezzat et al (45), quienes encontraron que entre 50 y 75% de los pacientes presentaba mejoría en la cefalea, fatiga, dolores articulares, acné quístico y sudoración. En el presente estudio los tres pacientes estudiados respondieron clínicamente a la administración del Octreótido disminuyendo el tamaño de las manos, pies, nariz y lengua. Dos de

ellos manifestaron abolición de la cefalea y el tercero mejoría de la misma, y en los tres casos hubo disminución en las artalgias y la sudoración. Ver Tabla 1.

Ninguno de los tres pacientes presentó efectos indeseables durante los dos meses de tratamiento, y los controles periódicos con el ultrasonido abdominal no mostraron cambios en relación a la aparición de lodo o litiasis vesicular.

Resultados de Resonancia Magnética Nuclear Hipofisaria:

Los pacientes 1 y 3 presentaban imagen de microadenoma hipofisario, ambos de localización intrasellar; el paciente 2 tenía un macroadenoma hipofisario con erosión del piso de la silla turca y presencia de extensión suprasellar, pero sin compromiso del quiasma óptico, así como tampoco de los senos cavernosos.

No se evidenciaron otras anomalías en el parénquima circundante.

Determinaciones de laboratorio:

En la tabla 2 se muestran los parámetros bioquímicos que resultaron significativamente diferentes antes y después del tratamiento. Uno de los pacientes estudiados era diabético, por lo cual no se le efectuó carga de glucosa oral. En los tres casos hubo disminución en las concentraciones de GII, la que se hizo más manifiesta luego de la prueba de supresión con glucosa oral.

En cuanto a las concentraciones de IGF-I, el paciente 1 disminuyó significativamente su nivel llegando a un valor normal en relación a su edad y sexo; en el segundo paciente, se observa un incremento mínimo (< 1%) de dicho parámetro, el cual es menor que la variación interensayo del método (4.4%). En el

tercer paciente hubo disminución del 19% en el valor de la IGF-I sin llegar a normalizarla.

En los tres pacientes hubo disminución significativa en las concentraciones de IGF-BP3, pero en ningún caso descendió al valor normal para su edad.

La insulina basal no presentó cambios con el tratamiento en ninguno de los pacientes. Luego de la prueba de supresión con glucosa oral se observa el incremento esperado en las concentraciones de insulina a los 90 minutos. Sin embargo dicho incremento resulta ostensiblemente mayor luego del tratamiento con Octreótido.

Por otro lado, la glucosa post-Octreótido resultó diagnóstica de intolerancia a los carbohidratos en los dos pacientes no diabéticos, tal como lo establecen los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Este fenómeno no se presentaba antes del tratamiento.

Los parámetros bioquímicos efectuados, pero que no se detallan en la tabla 2 no se modificaron con el tratamiento y resultaron normales. Es de destacar que ninguna de las hormonas hipofisarias resultó alterada (datos no mostrados).

Extracción del RNA total:

Se efectuó según las condiciones referidas. Se verificó su integridad mediante un gel de agarosa al 1%, se cuantificó su concentración y pureza mediante lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm. Se congeló a -70°C hasta su

utilización en RT-PCR, procesándose las muestras de cada paciente en condiciones basales y luego de la administración del Octreótido en un mismo ensayo.

RT-PCR:

Se estandarizó el método a las condiciones climáticas y ambientales de la Ciudad de México. Todas las determinaciones se realizaron con los mismos reactivos para evitar cambios en la interpretación.

Las dos isoformas del RNA del GHR fueron encontradas en las células sanguíneas tanto de los controles sanos como de los pacientes acromegálicos.

Antes de la administración del Octreótido hubo un predominio de la forma del RNA del GHR que contiene al exón 3 (+3), pero luego de la administración del mismo se pierde ese predominio de la forma +3, lo que hace que en el ensayo competitivo la banda correspondiente en el gel de agarosa sea más manifiesta (ver figura 2).

Las modificaciones en las concentraciones de insulina y glucosa no se correlacionaron con los cambios en la expresión del RNA del GHR .

VIII. DISCUSION

Según nuestro entendimiento, este es el primer estudio que se realiza utilizando Octreótido en pacientes acromegálicos vírgenes de tratamiento, y tampoco existen estudios previos en los cuales se intente modificar el ambiente metabólico acromegálico "in vivo" para observar cambios en las isoformas del GHR.

La concentración de la GH disminuyó considerablemente, sobre todo luego de la supresión con glucosa, lo cual indica que el octreótido, como efecto final, disminuye la concentración de la hormona, produciendo un cambio metabólico en el paciente que se refleja a simple vista en la mejoría clínica de los pacientes estudiados. Debido a la disminución en la concentración de la GH, la IGF-I, por efecto de retroalimentación negativa debería disminuir en todos los casos, lo cual no sucede en uno de los pacientes.

La proteína transportadora de IGF-I, IGF-BP3, se considera actualmente el parámetro por excelencia para diagnóstico y control de la evolución de los pacientes acromegálicos tratados debido a que refleja más fielmente las concentraciones de IGF-I circulante. El valor de esta proteína transportadora, disminuyó en los tres pacientes. Si correlacionamos este hallazgo de laboratorio con los cambios clínicos observados, vemos que efectivamente este parámetro refleja más confiablemente la mejoría en los cambios metabólicos observados.

Obtuvimos cambios en la proporción de la expresión del GHR, lo cual apoya la idea de que la regulación de dicho receptor puede ser modificada por

cambios metabólicos del sujeto en cuestión, ya que éstos cambios se aunaron a una disminución en las concentraciones de la GH.

Considerando que la eficacia de amplificación del cebador ("primer") "-3" es un 20% menor que la del "+3", se puede concluir que la forma que no contiene al exón 3 es la que predomina luego de la administración del octreótido.

Por el momento nos es imposible correlacionar los cambios a nivel molecular con los cambios a nivel bioquímico, sin embargo es probable que los cambios metabólicos en el entorno celular, conlleven a cambios en la transcripción del receptor.

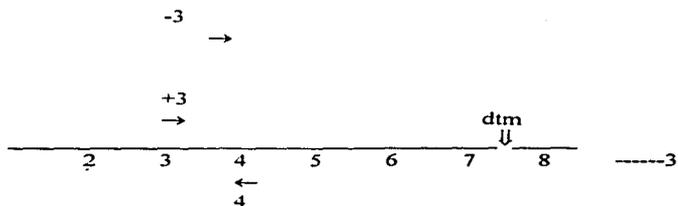
IX. CONCLUSIONES

- * El tratamiento con Octreótido produce cambios metabólicos que se reflejan favorablemente en los cambios clínicos observados en el paciente acromegálico.
- * Las dos isoformas del RNA del receptor de la hormona de crecimiento son detectables en las células sanguíneas de los controles sanos y de los pacientes acromegálicos.
- * La proporción entre ambas es variable en condiciones basales y luego de la administración del octreótido.
- * No se encontró relación entre la proporción de las isoformas del RNA del receptor de la hormona de crecimiento y las concentraciones de glucosa, insulina e IGF-I, probablemente debido al número reducido de pacientes estudiados.
- * La proporción entre ambas isoformas del RNA del receptor de la hormona de crecimiento varió luego de la administración del octreótido quizás porque éste modifica el ambiente metabólico acromegálico al disminuir las concentraciones de la hormona de crecimiento.

Este estudio, que tiene un número reducido de pacientes, no nos permite dilucidar si el estímulo para que estos cambios transcripcionales se lleven a cabo es la disminución en la concentración de la GH, la glucosa, la IGF-I, el incremento de la insulina o tal vez otro parámetro que no se ha investigado. Sin embargo abre el camino para investigaciones futuras que aclaren aspectos moleculares de la regulación hipotálamo-hipófiso-periferia en la acromegalia.

X. TABLAS. FIGURAS

DNAc del receptor de GH



Productos de PCR:

3	4	151 pb
2	4	126 pb

Figura 1

Diagrama de localización de los diferentes oligonucleótidos dentro del mapa exónico de la porción extracelular del receptor de GH y del tamaño de los productos de PCR.

dtm: dominio transmembrana, pb: pares de bases

PACIENTES

Tabla 1

	1	1	2	2	3	3
	<u>Pre-oct</u>	<u>Post-oct</u>	<u>Pre-oct</u>	<u>Post-oct</u>	<u>Pre-oct</u>	<u>Post-oct</u>
• Cefalea	+	-	+	-	-	-
• Lengua	+	-	+	-	+	-
• Artralgia	+	-	+	-	+	-
• Acrorecim.	+	-	+	-	+	-

Cambios clinicos relevantes luego de la aplicaci3n de Octre3tido.

PACIENTES

Tabla 2

	<u>1</u> <u>Preoct</u>	<u>1</u> <u>Postoct</u>	<u>2</u> <u>Preoct</u>	<u>2</u> <u>Postoct</u>	<u>3</u> <u>Preoct</u>	<u>3</u> <u>Postoct</u>
<u>GH</u> ng/ml						
• Basal	42	50	31	17	7.5	3.7
• 90 min	42	21	23	13	--	--
<u>Insulina</u> mUI/L						
• Basal	31.5	31	28	26	10	10
• 90 min	86.4	170	193	304	--	--
<u>Glucosa</u> mg/dl						
• Basal	78	106	98	108	156	140
• 90 min	81	167	135	170	--	--
<u>IGF-I</u> ng/ml	518	55	594	599	670	563
<u>IGFBP3</u> ng/ml	5525	4491	5891	4528	4486	3863
<u>GHR</u> <u>RNAm</u> (+3:-3)	2:1	1:2	2:1	1:2	2:1	1:2

Gel de agarosa

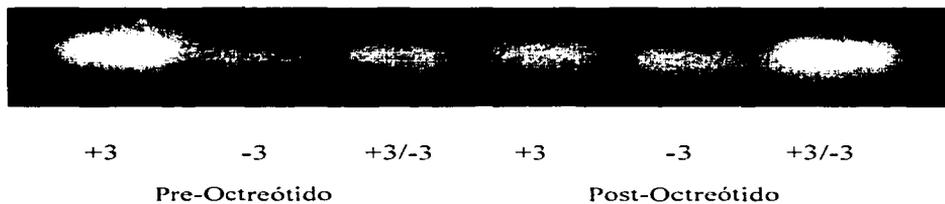


Figura 2

Gel de agarosa representativo de un paciente antes y después del tratamiento con el análogo de la somatostatina.

XI. BIBLIOGRAFIA

- 1) Baumann G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocrine Reviews* 1991; 12:424-49.
- 2) Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, DeVries BC. A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:134-41.
- 3) Herrington AC, Ymer S, Stevenson J. Identification and characterization of specific binding proteins for growth hormone in normal human sera. *J Clin Invest* 1986; 77:1817-23.
- 4) Mercado M, Baumann G. Growth hormone-binding proteins. *The Endocrinologist* 1993; 3:268-77.
- 5) Baumann G, Lowman HB, Mercado M, Wells JA. The stoichiometry of growth hormone-binding protein complexes in human plasma: comparison with cell surface receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:1113-18.
- 6) Baumann G, Vance ML, Shaw MA, Thorner M. Plasma transport of human growth hormone *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:470-3.
- 7) Leung DW, Spencer SA, Cachianes G. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 1987; 330:537-43.
- 8) Cunningham BC, Ullsch M, de Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 1991; 254:821-25.

- 9) Veldhuis JD, Johnson ML, Faunt LM, Mercado M, Baumann G. Influence of the high affinity growth hormone (GH) binding protein on plasma profiles of free and bound GH and on the apparent half-life of GH. *J Clin Invest* 1993; 91:629-41.
- 10) Baumann G, Amburn KD, Buchanan TA. The effect of circulating growth hormone-binding protein on metabolic clearance, distribution and degradation of human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:657-60.
- 11) Mannon DA, Winer LM, Shaw MA, Baumann G. Plasma growth hormone binding proteins: effects on growth hormone binding to receptors and on growth hormone action. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:30-4.
- 12) Lewis UJ, Dunn JT, Bonewald LF, Seavey BK, VanderLaan EF. *J Biol Chem* 1978; 253:2679-87.
- 13) Baumann G, Shaw MA. Plasma transport of the 20,000 dalton variant of human growth hormone (20K): evidence for a 20K specific binding site. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:1339-43.
- 14) Roupas P, Herington AC. Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 61:1-12.
- 15) McCarter J, Shaw MA, Winer LA, Baumann G. The 20,000 Da variant of human growth hormone does not bind to growth hormone receptors in human liver. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 73:11-14.
- 16) Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin-growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991; 12:235-51.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 17) Mercado M, Dávila N, McLeod J, Baumann G. Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:731-35.
- 18) Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Amselem S, Goossens M. Expression and binding properties of two isoform of the human growth hormone receptor. *FEBS* 1993; 319:16-20.
- 19) Urbanek Margrit, MacLeod J, Cooke EN, Liebhaber SA. Expression of a human growth hormone (hGH) receptor isoform is predicted by tissue-specific alternative splicing of exon 3 of the hGH receptor gene transcript. *Mol Endo* 1992; 6:279-87.
- 20) Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, DeVries BC. A specific growth hormone binding protein in human plasma: initial characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:134-41.
- 21) Mercado M, Baumann G. Growth hormone binding proteins. *The Endocrinologist* 1993; 3: 268-77.
- 22) Postel Vinay MC, Tar A, Hocquette JF. Human growth hormone (GH)-binding proteins are regulated by GH and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:197-202.
- 23) Hochberg Z, barkey RJ, Even L, Peleg Y, Youdim MBH, Amit T. The effect of human growth hormone therapy on GH binding protein in GH deficient children. *Acta Endocrinol* 1991; 125:23-27.

- 24)Martha PM Jr, Reiter EO, Dávila N, Shaw MA, Holcombe JH, Baumann G. Serum growth hormone (GH) binding protein/receptor: an important determinant of GH responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1464-69.
- 25)Mercado M, Carlsson L, Vitangcol Baumann G. Growth hormone binding protein determination in human plasma: a comparison of immunofunctional and growth hormone binding assays. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1291-94.
- 26)Kratzsch J, Blum WF, Ventz M, Selisko T, Birkenmeyer G, Keller E. Growth hormone-binding protein-related immunoreactivity in the serum of patients with acromegaly is regulated inversely by growth hormone concentration. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:306-12.
- 27)Baumann G. Acromegaly. *Endocr Metab Clin North Amer* 1987; 16,3:685-703.
- 28)Melmed S. Acromegaly. *NE J M* 1990; 322:966-75.
- 29)Asa SL, Scheithauer BW, Bilbao JM, Horvath E, Ryan N, Kovacs K, Randall RV, Laws ER, Singer W, Linfoot JA, Thorner M, Vale W. A case for hypothalamic acromegaly: a clinicopathological study of six patients with hypothalamic gangliocytomas producing growth hormone-releasing factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58:796-803.
- 30)Sano T, Asa SL, Kovacs K. Growth hormone-releasing hormone-producing tumors: clinical, biochemical, and morphological manifestations. *Endocr Rev* 1988; 9:357-73.
- 31)Melmed S, Ziel FH, Braunstein GD, Downs T, Frohman LA. Medical management of acromegaly due to ectopic production of growth hormone-

- releasing hormone by a carcinoid tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:395-99.
- 32)Ezzat S, Asa SL, Stefaneanu L, Whittom R, Smyth HS, Horvath E, Kovacs K, Frohman LA. Somatotroph hyperplasia without pituitary adenoma associated with a long standing growth hormone-releasing hormone-producing bronchial carcinoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:555-60.
- 33)Melmed S, Ho K, Klibanski A, reichlin S, Thorner M. recent advances in pathogenesis, diagnosis, and management of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3395-3402.
- 34)Valcavi R, Zini M, Volta C, Ghizzoni L, azzarito C, Bernasconi S, Portioli Y. Effects of oral glucose administration on spontaneous and growth hormone (GH)-releasing hormone-stimulated GH release in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1152-57.
- 35)Frohman LA. therapeutic options in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72:1175-81.
- 36)Flogstad AK, Halse J, Grass P, Abisch E, Djoseland O, Kutz K, Bodd E, Jervell J. A comparison of octreotide, bromocriptine, or a combination of both drugs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:461-65.
- 37)Ezzat S, Horvath E, Harris AG, Kovacs K. Morphological effects of octreotide on growth hormone-producing pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:113-18.

- 38) Newman CB, Melmed S, Snyder P, Young WF, Boyajy LD, Levy R, Stewart WN, Klibanski A, Molitch ME, Gagel RF, Boyd AE, Sheeler L, Cook D, Malarkey WB, Jackson IMD, Vance ML, Thorner MO, Ho PJ, Jaffe CA, Frohman LA, Kleinberg DL. Safety and efficacy of long term octreotide therapy of acromegaly: results of a multicenter trial in 103 patients-A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2768-76.
- 39) Shi YF, Zhu XF, Harris AG, Zhang JX, Dai Q. Prospective study of the long term effects of somatostatin analog (octreotide) on gallbladder function and gallstone formation in Chinese acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:32-7.
- 40) Mercado M, Carlsson L, Vitangeel R, Baumann G. Growth hormone-binding protein determination in plasma: a comparison of immunofunctional and growth hormone-binding assays. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1291-4.
- 41) Kratzsch J, Blum WF, Ventz M, Selisko T, Bitkenmeyer G, Keller E. Growth hormone-binding protein-related immunoreactivity in the serum of patients with acromegaly is regulated inversely by growth hormone concentration. *Eur J Endocrinology* 1995; 132:306-12.
- 42) Roelen CAM, Donker GH, Thijssen JHH, Koppeschaar HPF, Blankenstein MA. High affinity growth hormone binding protein in plasma of patients with acromegaly and the effect of octreotide treatment. *Clinical Endocrinology* 1991; 37:373-8.

- 43)Hernández I, Zárate A, Söderlund D, Mendoza V, Zúñiga S, Mercado M.
Efecto del octreótido en las isoformas de GH y GHBP en acromegalia.
Presentación en el Congreso de la Sociedad Mexicana de Nutrición y
Endocrinología. Guanajuato, Gto. Noviembre de 1995.
- 44)Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid
guanidinium thiocyanate. *Biochem.* 1987; 162:156-59.
- 45)Ezzat S, Snyder PJ, Young WF, et al. Octreotide treatment of acromegaly: a
randomized, multicenter study. *Ann Intern Med.* 1992; 117:711-18.