

## **4.2 ESTUDIO 2: “Determinación de la proteína transportadora de la hormona de crecimiento (GHBP) en niños y adolescentes varones con talla baja y velocidad de crecimiento disminuida”**

### **4.2.1 Resumen**

La insensibilidad parcial a la acción de la GH se caracteriza por presentar unas concentraciones normales o elevadas de GH en respuesta a diferentes pruebas de estímulo junto con una disminución de IGF-I en ausencia de los rasgos dismórficos observados en el síndrome de Laron o insensibilidad completa a la acción de la GH.

Se ha descrito que algunos niños con talla baja idiopática presentan una insensibilidad parcial a la GH relacionada con polimorfismos o alteraciones leves en el receptor de la GH.

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar las concentraciones de GHBP en el suero de un grupo niños y adolescentes con talla baja y velocidad de crecimiento disminuida de diferente etiología (déficit de secreción de GH y talla baja idiopática) para descartar un estado de resistencia parcial a la GH como posible causa de su retraso de

crecimiento. Además se relacionó la actividad GHBP con diferentes parámetros auxológicos y hormonales.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad GHBP entre los niños de los tres grupos estudiados (déficit de GH, talla baja idiopática y controles). La GHBP presentó una relación negativa con el pico máximo de GH en respuesta a la clonidina y una relación positiva con la edad cronológica y con el IMC.

El 1.85 % de los niños con talla baja idiopática presentó una actividad GHBP inferior al 10% siendo estos susceptibles de presentar una insensibilidad a la acción de la GH.

#### **4.2.2 Introducción**

El segundo objetivo de esta tesis fue el estudio de la proteína transportadora de la hormona de crecimiento de alta afinidad en niños con talla baja. La oportunidad de realizar su determinación en este grupo de pacientes surgió tras la colaboración de nuestro laboratorio en un estudio multicéntrico para evaluar la eficacia diagnóstica de varios parámetros hormonales relacionados con el eje GH:IGF-I en el diagnóstico de insuficiencia de la hormona de crecimiento (1).

Uno de los motivos más frecuentes de consulta en endocrinología pediátrica es la talla baja. Se define como talla baja aquella situada por debajo del percentil 3 respecto a la curva de crecimiento de la población

de origen (2). En general, se deben estudiar también aquellos niños cuya velocidad de crecimiento se ha deteriorado de forma significativa, situándose por debajo del percentil 25. Según el origen de la talla baja, ésta se puede clasificar en variantes de la normalidad, trastornos primarios del crecimiento o retraso del crecimiento secundario a diferentes patologías. Dos variantes normales del crecimiento, el retraso constitucional del desarrollo y la talla baja familiar, son las causas más frecuentes de talla baja. Los trastornos primarios del crecimiento engloban una variedad de patologías que afectan al crecimiento desde una etapa muy temprana de la vida y suelen manifestarse clínicamente alrededor del nacimiento. Dentro de este grupo se sitúan las displasias óseas, como la acondroplasia y la osteogénesis imperfecta; las enfermedades metabólicas como las mucopolisacaridosis, las glucogenosis o la fenilcetonuria; diversos cuadros genéticos como el síndrome de Turner, uno de los más frecuentes, el síndrome de Noonan, el síndrome de Seckel o el de Silver Russell; y finalmente el retraso de crecimiento intrauterino. Respecto a los retrasos de crecimiento secundarios, existen numerosas enfermedades sistémicas que pueden retrasar el crecimiento, la mayoría de ellas son cuadros clínicos graves que suelen ser crónicos, como son los síndromes de malabsorción por enfermedad celíaca, la insuficiencia renal, los trastornos hematológicos, los procesos tumorales sobretodo localizados en el sistema nervioso central, las alteraciones pulmonares como la fibrosis quística, etc. Dentro de las alteraciones endocrinas cabe destacar las alteraciones del eje somatotropo (déficit de secreción de GH, insensibilidad a la GH, insuficiencia de IGF-I), el hipotiroidismo, pseudohipoparatiroidismo, diabetes mellitus mal controlada, hipercortisolismo o algunas formas de

raquitismo. Finalmente, hablamos de talla baja idiopática cuando su etiología o patogenia no pueden ser precisadas.

Los niños que presentan talla baja idiopática tienen un retraso del crecimiento a pesar de tener una respuesta normal en la secreción de GH a diferentes test de estímulo. Las causas de su talla baja se desconocen y algunos investigadores la han atribuido a alteraciones en la secreción espontánea de GH (3,4), mientras que otros no han encontrado un patrón de secreción alterado(5).

Recientemente, se ha atribuido como posible causa del retraso de crecimiento observado en algunos niños con talla baja idiopática, la presencia de una forma parcial de insensibilidad a la acción de la GH. En este sentido, algunos autores han encontrado que algunos niños con talla baja idiopática presentan concentraciones de GHBP disminuidas. Sin embargo, en la literatura los resultados de diferentes grupos son contradictorios a este respecto (6,7,8,9).

Uno de los objetivos de este estudio fue evaluar las concentraciones de GHBP en el suero de un grupo niños y adolescentes con talla baja y velocidad de crecimiento disminuida de diferente etiología (déficit de GH y talla baja idiopática) para descartar un estado parcial de resistencia a la GH como posible causa de su retraso de crecimiento. Además, se han relacionado las concentraciones de GHBP con distintos parámetros auxológicos y hormonales y se han comparado los resultados obtenidos con un grupo de niños con crecimiento normal.

### 4.2.3 Sujetos y metodos

- **Sujetos**

Se evaluaron 79 varones con una edad cronológica (EC) entre 2,7 y 17,3 años con talla baja y velocidad de crecimiento disminuidas. La talla era igual o inferior al 3<sup>er</sup> percentil para la EC, y la velocidad de crecimiento (VC) medida en los 12 meses anteriores, se encontraba por debajo del 25<sup>o</sup> percentil para la EC (10,11). El peso se encontraba en el intervalo de  $\pm 2$  DE para la edad estatural (EE). En este grupo, 50 eran prepuberales (estadio I de Tanner), y 29 se encontraban en estadios iniciales del desarrollo puberal (estadios II y III de Tanner). La evaluación incluyó una historia clínica y una exploración física completas. Se excluyeron los pacientes con síndromes genéticos, displasias esqueléticas, enfermedades intercurrentes agudas o crónicas, antecedentes de radiación cráneo-espinal o sometidos a algún tratamiento farmacológico crónico que pudiese afectar su crecimiento. Se descartó la existencia de enteropatía por gluten mediante la determinación de anticuerpos antigliadina y antiendomiso y se confirmó analíticamente la presencia de eutiroidismo.

Adicionalmente, se evaluó un grupo de 15 varones de talla y crecimiento normales (CN), de EC entre 2,4 y 13,4 años, 12 prepuberales y 3 en estadios precoces de desarrollo pubertal (Tanner II y III). Estos niños fueron seleccionados en las consultas externas de Pediatría de todos los hospitales participantes después de descartar problemas psicológicos o físicos. Su talla estaba por encima del 10<sup>o</sup> percentil para la talla media de

sus padres y la VC superaba el 25º percentil para la EC. La edad ósea (EO) no difería más de 2 años de la EC y el peso corporal también se encontraba entre  $\pm 2$  DE para la EE.

Se calculó el índice de masa corporal (IMC) dividiendo el peso en kilogramos por la talla en metros al cuadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Los índices de desviaciones estándar (standard deviation score) (SDS) del IMC se calcularon en función de los valores de niños españoles de la misma edad y sexo(12). La edad ósea se evaluó según el método TW2-RUS(13).

- **Protocolo del estudio**

En el estudio participaron las Unidades de Endocrinología Pediátrica de nueve hospitales españoles. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de cada hospital participante y se obtuvo el consentimiento informado de los padres de todos los niños, tanto los de talla normal como de talla baja.

En todos los niños con talla baja se realizaron dos pruebas farmacológicas de estimulación de la secreción de GH en días distintos, entre las 8 y 9 horas y después de una noche en ayunas. Las pruebas de estimulación consistieron en la administración de clonidina ( $150 \mu\text{g}/\text{m}^2$  de superficie corporal por vía oral y extracciones de sangre a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 minutos) y la prueba de hipoglucemia insulínica (HI) (0,1 U/Kg de peso corporal i.v. y extracciones de sangre a los tiempos -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min.) En el grupo de talla de crecimiento

normales sólo se realizó una prueba de estimulación (clonidina por vía oral). Por otro lado, se tomaron dos muestras de orina de 24 horas recogidas en dos días diferentes que se conservaron a 4° C durante la recolección. Se anotó el volumen total y se añadieron 30 µL de albúmina sérica bovina (BSA) al 30 % a las alícuotas de 5 mL de cada muestra antes de la congelación a -80°C.

Las alícuotas congeladas de todas las muestras de suero y de orina se enviaron a un Laboratorio Central donde se efectuaron las siguientes determinaciones: concentración sérica de GH en todas las muestras de las pruebas de estimulación; e IGF-I, IGFBP-3, GHBP y testosterona en las muestras basales de cada prueba de estimulación (dos determinaciones en cada niño con talla baja y una en cada niño de crecimiento normal). Se calculó la excreción de GH en las dos muestras de orina.

Los niños y adolescentes de talla baja fueron clasificados en función de la respuesta de la GH a las pruebas de estimulación de acuerdo con los valores obtenidos en el Laboratorio Central en: 1) deficitarios en GH (DGH), cuando las concentraciones plasmáticas máximas de GH eran inferiores a 7,5 µg/L en las dos pruebas de estimulación, y 2) talla baja idiopática (TBI), cuando se obtuvo una respuesta de GH > 7,5 µg/L en, al menos, una de las dos pruebas. Entre los pacientes con DGH, dos presentaban déficit hipofisario múltiple y los otros 23 un DGH idiopático aislado.

- **Análisis hormonales**

La GH sérica se cuantificó mediante un análisis inmunoradiométrico en fase sólida (Tandem-R HGH, Hybritech, Lieja, Bélgica) que emplea un estándar calibrado frente al patrón HS2243E. Dicho análisis tiene una sensibilidad de 0,2 µg/L, con coeficientes de variación (CV) interanálisis del 8% y 6% a concentraciones de GH de 6,2 y 15,7 µg/L respectivamente. Se cuantificó el IGF-I en suero empleando un RIA con bloqueo de las IGFbps (125I-IGF-I KIT, BioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia), mientras que la IGFbp-3 se cuantificó con un radioinmunoanálisis (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, EE.UU.). Los CV interanálisis oscilaron entre el 5,3% y el 6,3% para el IGF-I y entre el 5,7% y el 6,5% para la IGFbp-3. La testosterona sérica se cuantificó mediante un radioinmunoanálisis (Spectria, Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia), y la GH en orina se midió mediante un análisis inmunoradiométrico con un CV interserie < 8,1% (125I-hGH U COATRIA, BioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia).

La actividad de la GHBP se determinó mediante el método de filtración en gel con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) descrito en el estudio 1 de los resultados de esta memoria. No fue necesario corregir los resultados teniendo en cuenta la GH endógena, pues la concentración de ésta fue inferior a 7 µg/L en todas las muestras analizadas. Los CV interanálisis fueron del 8,4% y el 9,8% con niveles del 40,9% y 19,2% de actividad de la GHBP(14).

- **Análisis estadístico**

Los datos de IGF-I y de IGFBP-3 se expresaron como SDS para varones de la misma edad (índice Z), comparados con datos normativos proporcionados por Blum y cols(15) y el Nichols Institute Diagnostics, respectivamente. Cuando se disponía de determinaciones por duplicado realizadas en muestras de días diferentes, se consideró el promedio de ambas determinaciones. Se comprobó la normalidad de la distribución de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Si los datos no presentaban una distribución gaussiana, se transformaron con el fin de obtener la mejor aproximación a una distribución normal. Se aplicó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA one way) para determinar las posibles diferencias entre los tres grupos (DGH, TBI y CN), seguida de la prueba de Tukey para ajustar con respecto a comparaciones múltiples. Se estudiaron las relaciones entre los diferentes parámetros auxológicos y las variables hormonales mediante análisis de regresión simple. Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

#### **4.2.4 Resultados**

- **Datos auxológicos**

En la tabla 1 se muestran los datos auxológicos de los tres grupos de niños. No existían diferencias en la edad cronológica (EC) ni en la edad ósea (EO) entre los grupos. Un hallazgo destacable es que aunque los valores de la talla y de la talla diana expresados en SDS no difirieron entre los dos grupos de talla baja, la VC estandarizada era menor en los pacientes DGH que en los sujetos con TBI. El IMC estandarizado era significativamente menor en el grupo con TBI.

- **Resultados hormonales**

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados hormonales expresados en valores absolutos. La respuesta de la GH a la prueba de la clonidina fue menor en el grupo DGH, tanto en los niños prepuberales como en los que iniciaban su pubertad.

Los valores de IGF-I expresados en SDS difirieron significativamente en los tres grupos ( $p= 0,001$ ). Ello obedeció a una disminución significativa de la concentración de IGF-I estandarizada en los niños con DGH [promedio (DE): -1,75 (1,98) SDS] en comparación con los de TBI [-0,68 (1,21) SDS] y CN [-0,13 (0,76) SDS]. Los valores estandarizados de IGFBP-3 también se caracterizaron por una diferencia estadísticamente

significativa entre los dos grupos con talla baja [DGH: -0,84 (1,64) SDS frente a TBI: -0,03 (0,83) SDS;  $p = 0,01$ ], pero no con el grupo CN.

El resto de los parámetros bioquímicos estudiados en valores absolutos uGH, GHBP y testosterona no difirieron entre los tres grupos diagnósticos (tablas 2 y 3 ).

- **Análisis de regresión simple**

En la tabla 4 se muestran los principales resultados de los análisis de regresión lineal simple realizados. Los valores de IGF-I SDS se correlacionaron significativamente con la talla-SDS, VC-SDS e IGFBP-3. La GHBP se correlacionó significativamente con la EC, el IMC-SDS e inversamente con el pico máximo de GH en respuesta a la clonidina. El pico de respuesta máxima de la GH a la clonidina se correlacionó negativamente con el IMC y positivamente con el pico de respuesta máxima a la hipoglucemia insulínica e IGFBP-3. Los valores de IGF-I se correlacionaron significativamente con la IGFBP-3, uGH y testosterona. Los valores de IGFBP-3 se correlacionaron de forma significativa con los de uGH y testosterona y la uGH se correlacionó con la testosterona. Otras correlaciones estadísticamente significativas entre parámetros hormonales y variables auxológicas no estandarizadas bien conocidas se han omitido.

- **Niños con concentraciones de GHBP bajas**

En el grupo de niños con TBI, un solo sujeto presentó una actividad media de la GHBP sérica determinada en dos días distintos por debajo del límite de corte del 10% (9,2%) (16), mientras que otros dos niños tuvieron una baja actividad media de la GHBP sérica en el límite bajo de la normalidad (10,5% y 11,4%). Estos 3 niños presentaban una VC estandarizada inferior a 2 SDS por debajo de la media. Además, dos niños clasificados como DGH presentaban una disminución de la actividad media de la GHBP (11,3% y 11,7%).

#### **4.2.5 Discusión**

Los esfuerzos por encontrar un defecto que pueda explicar el retraso de crecimiento observado en los niños con talla baja idiopática, principalmente a través de valorar los diferentes componentes del eje GH:IGF-I, no siempre han tenido éxito. El hallazgo de concentraciones de GHBP bajas en algunas series (6,7,17,18) de niños con talla baja idiopática ha ofrecido nuevas perspectivas para el diagnóstico etiológico de los niños con este retraso de crecimiento. Estas concentraciones bajas de GHBP, pueden reflejar una disminución de los receptores tisulares y se han relacionado con estados de resistencia parcial a la acción de la GH.

Esta hipótesis se ha visto reforzada por los hallazgos de Goddard y cols (19,20), que han demostrado la existencia de mutaciones en el gen del receptor de la GH en el 29 % de niños con talla baja idiopática y GHBP

baja. Sin embargo, en estos pacientes, las mutaciones no se acompañan invariablemente de una disminución de la concentración de GHBP sino que también pueden observarse GHBP normales e incluso altas (20).

Savage y cols(16), han definido diversos puntos de corte para distintos parámetros auxológicos y bioquímicos con la finalidad de poder distinguir aquellos pacientes que presentan un síndrome de insensibilidad a la GH de los que no la presentan. Entre ellos se encuentra un valor de actividad GHBP del 10%, utilizando el mismo método de determinación de la actividad GHBP que el que hemos empleado en nuestro estudio. En nuestra serie sólo un niño con talla baja idiopática ha presentado una actividad GHBP por debajo del 10 % y representa el 1,85% de los niños con talla baja idiopática incluidos en nuestro estudio. Esta proporción es semejante a la observada por Goddard y cols (20), que demuestran en un 2% de su amplia serie los niños con talla baja idiopática, la existencia de alteraciones heterocigotas del gen del GHR, que a su vez se han relacionado con la insensibilidad a la GH. Saenger y cols(21) también han destacado que la presencia de defectos heterocigotos en el gen del GHR no son una causa frecuente de talla baja idiopática.

En nuestro estudio, no hemos encontrado diferencias significativas en las concentraciones de GHBP entre los tres grupos diagnósticos: déficit de GH, talla baja idiopática y grupo control. Estos resultados son semejantes a los observados por Attie y cols, que no encuentran diferencias en las concentraciones de GHBP entre los mismos grupos de niños con talla baja, y en el que la mayoría de los pacientes estudiados

presentaban concentraciones de GHBP normales (8); pero están en controversia con los resultados publicados por otros autores que encuentran concentraciones significativamente más bajas (6,7,17,18).

Respecto a las concentraciones de GHBP en los niños con déficit de GH también existen resultados contradictorios. Varios autores han encontrado concentraciones bajas de GHBP en niños con déficit de GH (22,23), mientras que otros las han encontrado normales (24,25), incluso en estos pacientes, el tratamiento con GH no tiene efectos sobre el nivel de GHBP. Por todo ello se cree que las concentraciones de GHBP son independientes de las concentraciones de GH. Al igual que otros autores, nosotros hemos encontrado una relación inversa entre la actividad GHBP con el pico máximo de respuesta de la GH a la clonidina. Esta relación negativa se ha especulado que se debe a los cambios de la concentración de GH con relación a la GHBP y no al revés, es decir, la secreción de GH se modula en función de las concentraciones de GHBP de cada individuo (8,26).

Finalmente, en nuestro estudio, la actividad de la GHBP mostró una relación positiva con el IMC y la edad cronológica lo que concuerda con la clara regulación ontogénica y nutricional de esta proteína transportadora (27-31).

En resumen, el hallazgo de unas concentraciones bajas de GHBP puede ser un marcador útil de la insensibilidad a la GH en niños con talla baja idiopática, si bien de los resultados de este estudio se desprende que afecta a un porcentaje muy pequeño de niños con talla baja idiopática.

Además, se ha de tener en cuenta que la presencia de mutaciones leves o polimorfismos heterocigotos pueden cursar con valores de GHBP normales e incluso elevadas y que sólo en una pequeña proporción de los niños con talla baja idiopática se encuentran dichas mutaciones.

#### 4.2.6 Bibliografía

1. Audí L, Llopis MA, Granada ML, Hermoso F, del Valle J, Rodríguez-Arno MD, Bel J, Luzuriaga C, Gallego E, Marín F. Baja sensibilidad del IGF-I, la GHBP-3 y la GH urinaria en el diagnóstico de la insuficiencia de la hormona del crecimiento en niños y adolescentes varones con talla baja y velocidad de crecimiento disminuida. *Med Clin* 2001; 116:6-11.
2. Mahoney P. Evaluating the child with short stature. *Pediatr Clin North Am* 1987; 34: 825-849.
3. Albertson-Wikland K, Rosberg S. Analysis of 24-hour growth hormone profiles in children: relation to growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:493-500.
4. Kerrigan JR, Martha PM, Blizzard RM, Christie CM, Rogol AD. Variations of pulsatile growth hormone release in healthy short prepubertal boys. *Pediatr Res* 1990; 28:11-14.
5. Veldhuis JD, Blizzard RM, Rogol AD, Martha PM, Kirkland Jr JL, Sherman BM. Genentech Collaborative Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 766-773.
6. Carlsson LMS, Attie KM, Compton PG, Vitangcol RV, Merimee TJ, and the National Cooperative Growth Study. Reduced concentration of serum growth hormone-binding protein in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1325-30.
7. Fontoura M, Mugnier E, Brauner R, Rappaport R, Postel-Vinay MC. Effect of growth hormone on the low level of growth hormone binding protein idiopathic short stature. *Clin Endocrinol* 1992;37:249-53.
8. Attie KM, Julius JR, Stoppani C, Rundle AC for the National Cooperative Growth Study. National Cooperative Growth Study substudy VI: The clinical utility of growth-hormone-binding protein, insulin-like growth factor I, and

- insulin-like growth factor-binding protein 3 measurements. *J Pediatrics* 1997; 131 :s56-s60.
9. Johnston LB, Savage MO. Partial growth hormone insensitivity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999; 12: Suppl 1: 251-257.
  10. Tanner JM, Whitehouse RH. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity and stages for puberty. *Arch Dis Child* 1976; 51:170-179
  11. Tanner JM. Physical growth and development. En: Farfar JO, Arneil GC, editores. *Textbook of Pediatrics*. Churchill Livingstone, Londres, 1973.
  12. Hernández JM, Castellet J, Narvaíza JL, Rincón JM, Ruíz J, Sánchez E, et al. *Curvas y Tablas de Crecimiento*. Garsí, Madrid, 1988
  13. Tanner JM, Whitehouse RH, Cameron N, Marshall WA, Healy MJR, Goldstein H. Assessment of skeletal maturity and prediction of adult height (TW2 Method). 2ª edición. London Academic Press Ltd, Londres, 1983
  14. Llopis MA, Granada ML, Audí L, Sanmartí A, Bel J, Sánchez-Planell L, et al. Analytical performance and clinical usefulness of two binding assays for growth hormone binding protein (GHBP) measurement: high performance liquid chromatography (HPLC)-gel filtration and dextran-coated charcoal adsorption. *Clin Chim Acta* 1997; 267:167-181
  15. Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gauggel E, Zeisel HJ, Bierich JR. A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:1292-1298
  16. Savage MO, Blum WF, Ranke MB, Postel-Vinay MC, Cotterill AM, Hall K, Chatelain PG, Preece MA, Rosenfeld RG. Clinical features and endocrine status in patients with growth hormone insensitivity (Laron syndrome). *J Clin Endocrinol metab* 1993; 77: 1465-1471.
  17. Dávila N, Moreira-Andrés M, Alcañiz J, Barceló B. Serum growth hormone-binding protein is decreased in prepubertal children with idiopathic short stature. *J Endocrinol Invest* 1996; 19: 348-352
  18. Kratzsch J, Schreiber G, Selisko T, Keller E, Pflaum CD, Strasburger CJ. Measurement of serum exon 3-retaining growth hormone-binding protein in children and adolescent by radioimmunoassay. *Horm Res* 1997; 48: 252-257

19. Goddard AD, Covello R, Louh SM, Clackson T, Attie KM, Gesundeith N, et al. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. *N Engl J Med* 1995; 333:1093-1098
20. Goddard AD, Dowd P, Chernausek S, Geffner M, Gertner J, Hintz R, Hopwood N, Kaplan S, Plotnick L, Rogol A, Rosenfield R, Saenger P, Mauras N, Hershkopf R, Angulo M, Attie K. Partial growth-hormone insensitivity: the role of growth-hormone receptor mutations in idiopathic short stature. *J Pediatr* 1997; 131:s51-55
21. Saenger P. Partial growth hormone insensitivity-idiopathic short stature is not always idiopathic. *Acta Paediatr Suppl* 1999; 88: 194-198.
22. Leger J, Noel M, Czernichow, Postel-Vinay MC: Progressive normalization of growth hormone-binding protein and IGF-I levels in treated growth hormone-deficient children. *Pediatr Res* 1995;37:731-735.
23. Postel-Vinay MC, Tar T, Hocquette F, Clot JP, Fontoura M, Brauner R, Rappaport R: Human plasma growth hormone (GH)-binding proteins are regulated by GH and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:197-202.
24. Hochberg Z, Barkey RJ, Even L, Peleg I, Youdim MB, Amit T: The effect of human growth hormone therapy on GH binding protein in GH-deficient children. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;125:23-27
25. Martha PM, Reiter EO, Davila 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;75:1464-1469.
26. Martha PM, Rogol AD, Blizzard RM, Shaw MA, Baumann G. Growth hormone-binding protein activity is inversely related to 24-hour growth hormone release in normal boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:175-181.
27. Holl RW, Snehotta R, Siegler B, Scherbaum W, Heinze E. Binding Protein for human growth hormone: Effects of age and weight. *Horm Res* 1991;35:190-197.
28. Silbergeld A, Lazar L, Erster B, Keret R, Tepper R, Laron Z. Serum growth hormone binding protein activity in healthy neonates, children and young

- adults: correlation with age, height and weight. Clin Endocrinol 1989;31:295-303.
29. Hochberg Z, Hertz P, Colin V, Ish-Shalom S, Yeshurun D, Yodium M, et al. The distal axis of growth hormone (GH) in nutritional disorders: GH-binding protein, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptors in obesity and anorexia nervosa. Metabolism 1992; 41:106-112
  30. Postel-Vinay MC, Saab C, Gourmelen M. Nutritional status and growth hormone-binding protein. Horm Res 1995; 44:177-181
  31. Llopis MA, Granada ML, Cuatrecasas G, Formiguera X, Sánchez-Planell L, Sanmartí A, Alastrué A, Rull M, Corominas A, Foz M. GH binding protein (GHBP) directly depends on serum leptin levels in adults with different nutritional status. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 2006-2011.

	DGH (n=25)	TBI (n=54)	CN (n=15)
Edad cronológica (EC) (años)	11.2 (3.7)	10.6 (3.5)	9.0 (2.9)
Edad ósea (EO) (años)	9.4 (4.0)	9.0 (3.4)	8.8 (3.5)
Talla-SDS	-2.64 (0.63)	-2.59 (0.60)	-1.18 (0.36) <sup>a</sup>
Velocidad de crecimiento-SDS	-2.82 (1.41) <sup>a</sup>	-1.60 (2.3) <sup>a</sup>	0.02 (1.37)
IMC-SDS	-0.28 (0.93)	-0.95 (0.69) <sup>a</sup>	-0.26 (0.77)

DGH= deficit de GH; TBI= talla baja idiopática; CN= crecimiento normal

IMC= índice de masa corporal

a:  $p < 0.0001$  frente a otros grupos

**Tabla 1:** Datos auxológicos (media(DE)) agrupados según las concentraciones máximas de la GH  $< o \geq 7,5$  ng/mL (DGH or TBI) tras dos pruebas de estimulación.

	<b>DGH</b> <b>(n=15)</b>	<b>TBI</b> <b>(n=35)</b>	<b>CN</b> <b>(n=12)</b>
Pico de GH (clon) (µg/L)	3.9 (1.9) <sup>a</sup>	12.7 (7.4)	11.4 (7.1)
IGF-I (µg/L)	102.4 (68.8)	129.2 (41.3)	124.4 (40.7)
IGFBP-3 (mg/L)	2.03 (0.81) <sup>b</sup>	2.48 (0.50)	2.20 (0.60)
GHBP (%)	19.49(6.27)	18.43(4.15)	18.32(4.79)
uGH (ng/24 h)	3.20 (2.43)	3.88 (2.40)	3.20 (1.32)

DGH= Déficit de GH; TBI= Talla baja Idiopática; CN= Crecimiento normal

a:  $p < 0.0001$  frente a otros grupos

b:  $p < 0.001$  frente a TBI

**Tabla 2:** Resultados hormonales en los niños prepuberales (media(DE)).

	<b>DGH (n=10)</b>	<b>TBI (n=19)</b>	<b>CN (n=3)</b>
Pico GH (clon) (µg/L)	3.8 (1.3) <sup>a</sup>	13.6 (6.7)	9.4 (2.5)
IGF-I (µg/L)	230.2 (107.1)	220.2 (103.1)	296.0(104.2)
IGFBP-3 (mg/L)	2.95 (0.51)	2.91 (0.58)	3.33 (0.57)
GHBP(%)	21.25(7.61)	19.02(5.14)	21.77(2.22)
uGH (ng/24 h)	7.59 (5.15)	6.09 (3.00)	10.38 (2.37)

DGH= Deficit de GH; TBI=Talla baja idiopática; CN=Crecimiento normal

a: p<0.0001 frente a otros grupos

n.r.: no realizado

**Tabla 3:** Resultados hormonales en los niños puberales (estadios II y III de Tanner de desarrollo puberal) (media (DE)).

		<i>r</i>	<i>p</i>
Talla SDS	IGF-I SDS	0.24	0.0172
IMC SDS	GHBP (%)	0.32	0.0013
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Pico GH (clon)(µg/L)	-0.26	0.01
Velocidad de crecimiento SDS	IGF-I SDS	0.37	0.0002
Edad cronológica (años)	GHBP (%)	0.23	0.0237
Pico GH (clon)(µg/L)	IGFBP-3 (mg/L)	0.21	0.042
Pico GH (clon)(µg/L)	GHBP (%)	-0.25	0.013
IGF-I (µg/L)	IGFBP-3 (mg/L)	0.58	<0.0001
IGF-I (µg/L)	uGH (ng/24 h)	0.44	<0.0001
IGFBP-3 (mg/L)	UGH (ng/24 h)	0.33	0.0017
IGF-I SDS	IGFBP-3 SDS	0.70	<0.0001

**Tabla 4.** Análisis de regresión lineal simple entre parámetros auxológicos y determinaciones hormonales, y entre determinaciones hormonales en toda la población estudiada (sólo se han incluido algunas de las relaciones estadísticamente significativas).

## **4.2 ESTUDIO 3: “La proteína transportadora de la hormona de crecimiento depende directamente de las concentraciones de leptina en adultos con diferentes estados nutricionales”**

### **4.3.1 Resumen**

El estado nutricional de un individuo es el principal regulador de las concentraciones de GHBP en el adulto. Sin embargo, por el momento se desconoce el mecanismo subyacente a esta regulación. La leptina es un péptido también regulado nutricionalmente, y se ha especulado que podría estar implicado en la regulación de la secreción de GH en ratas, sugiriendo que puede ser la señal que conectaría el tejido adiposo y el eje GH:IGF-I.

Tanto las concentraciones de GHBP como las de leptina en el ser humano se encuentran aumentadas en los estados de sobrepeso y obesidad, mientras que están disminuidas en los pacientes con peso bajo y en estados de desnutrición.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar si existe una relación entre la GHBP y la leptina en humanos, y si esta última puede ser el nexo de unión entre nutrición y GHBP.

Para valorar la relación entre GHBP y leptina, se estudió un grupo de 128 adultos con distintos estados nutricionales, desde la anorexia nerviosa grave hasta la obesidad mórbida extrema que no presentaban patología primaria del eje GH:IGF-I. Estos pacientes fueron clasificados de manera arbitraria en 8 categorías diferentes según su índice de masa corporal (IMC). Los pacientes con bajo peso correspondían a pacientes con anorexia nerviosa con diferentes grados de pérdida ponderal: extrema ( $\text{IMC} \leq 14,5 \text{ Kg/m}^2$ ), importante ( $\text{IMC} > 14,5 \text{ e } < 16 \text{ Kg/m}^2$ ) y moderada ( $\text{IMC} \geq 16 \text{ e } < 18 \text{ Kg/m}^2$ ). Por encima del peso normal se distinguió entre sobrepeso ( $\text{IMC} \geq 27 \text{ e } < 30 \text{ Kg/m}^2$ ), obesidad simple ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ e } < 40 \text{ Kg/m}^2$ ), obesidad mórbida ( $\text{IMC} \geq 40 \text{ e } < 50 \text{ Kg/m}^2$ ) y obesidad supermórbida ( $\text{IMC} \geq 50 \text{ e } < 80 \text{ Kg/m}^2$ ).

Las concentraciones de leptina presentan un marcado dimorfismo sexual siendo significativamente mayores en mujeres que en hombres para un mismo índice de masa corporal. Para obviar esta diferencia y poder analizar conjuntamente las concentraciones de leptina obtenidas en hombres y mujeres, se expresaron en desviaciones estándar respecto a un grupo normoponderal para cada sexo (SDS-leptina).

En este estudio hemos encontrado que tanto la GHBP como la leptina aumentan significativamente en función del IMC desde valores bajos en los grupos de bajo peso a valores altos en los grupos de obesidad. Sin embargo los valores máximos tanto de GHBP como de leptina se

alcanzaron ya en la obesidad simple y se mantuvieron a pesar de los grandes aumentos del IMC observados en la obesidad mórbida y

supermórbida. Del mismo modo en los diferentes grupos de bajo peso la disminución progresiva del IMC no se acompañaba de disminuciones paralelas tanto en las concentraciones de GHBP como de la leptina.

Además, se observó una fuerte correlación entre la GHBP y SDS-leptina ( $r=0.8$ ;  $p<0.0001$ ). Para descartar que esta relación fuera debida a la relación que presentan ambas con el IMC, se realizó un análisis de regresión múltiple que reveló que la SDS-leptina es un determinante significativo de la GHBP, contribuyendo a explicar el 64% de la variación de esta última, mientras que el IMC no contribuyó más a explicar los cambios en la GHBP.

Estos resultados sugieren que existe un mecanismo fisiológico que implica a ambas GHBP y leptina, pudiendo especular que la leptina puede ser la señal que induce los cambios en la expresión de la GHBP/GHR relacionados con la nutrición.

#### **4.3.2 Artículo**

## Growth Hormone-Binding Protein Directly Depends on Serum Leptin Levels in Adults with Different Nutritional Status\*

M. A. LLOPIS, M. L. GRANADA, G. CUATRECASAS, X. FORMIGUERA,  
L. SÁNCHEZ-PLANELL, A. SANMARTÍ, A. ALASTRUÉ, M. RULL,  
A. COROMINAS, AND M. FOZ

Departments of Clinical Biochemistry (M.A.L.L., M.L.G., A.C.), Endocrinology (G.C., A.S.), Eating Disorders Unit (X.F., M.F.), Psychiatry (L.S.-P.), and General Surgery (A.A., M.R.), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain

### ABSTRACT

The aim of this work was to assess the relationship between GH-binding protein (GHBP) and leptin. Both peptides are nutritionally regulated, but the recent implication of a role for leptin in the GH axis requires further study.

To avoid the sexual dimorphism in leptin values, we performed leptin standardization according to gender (SD score-leptin). The relationship between SD score-leptin and GHBP was studied in 128 adults with different nutritional status [8 groups according to body mass index (BMI), ranging from severely underweight anorexia nervosa to highly morbid obesity].

Both GHBP and SD score-leptin significantly increased according

to BMI within the range from 18–27 kg/m<sup>2</sup>, whereas no significant differences were found among underweight groups (BMI, <18 kg/m<sup>2</sup>) or among obesity grades (BMI, >27 kg/m<sup>2</sup>).

We found a strong correlation between GHBP and SD score-leptin ( $r = 0.8$ ;  $P < 0.0001$ ). Multiple regression analysis revealed SD score-leptin to be a significant determinant of GHBP, accounting for 64% of the variation, whereas BMI did not contribute further to explaining changes in GHBP. This suggests a physiological pathway involving both GHBP (the soluble fraction of GH receptor) and leptin. Thus, we might speculate that leptin could be the signal that induces the related nutritional changes observed in GHBP/GH receptor expression. (*J Clin Endocrinol Metab* 83: 2006–2011, 1998)

**N**UTRITIONAL status plays an important role in the regulation of the GH axis, because GH secretion is markedly influenced by body composition (1). A component of this axis, the specific high affinity binding protein for GH (GHBP) in humans, derives from GH membrane receptors by proteolytic cleavage and is identical to the extracellular binding domain of this receptor (2, 3). Thus, serum GHBP activity provides an indirect measure of GH receptor status.

During adult life, serum GHBP levels remain relatively constant, but vary widely from individual to individual, related basically to their nourishment status. Thus, undernutrition situations such as anorexia nervosa are associated with elevated GH secretion and low GHBP activity and suggest GH resistance (4–6), whereas obesity is accompanied by low GH secretion and elevated GHBP levels (6–9). Moreover, a direct relationship between body mass index (BMI) and GHBP activity has consistently been reported, even among normal weight subjects (10, 11). However, the mechanism underlying the strong link among nutritional status, GH secretion, and GHBP remains unknown.

Leptin, the protein of the adipocyte-specific (*ob*) gene produced in adipose tissue, has been implicated in the regulation

of appetite and whole body energy balance (12, 13). In humans, a strong relationship between serum leptin levels and measurements of body fatness has been demonstrated (14–17). Recent evidence suggests that leptin plays a role in GH secretion regulation and might be the signal connecting the GH axis with adipose tissue in rats (18). To date, only four studies analyzing the relationship between leptin and GHBP have been conducted in humans: normal weight adults (19), depressed adult patients (20), prepubertal children (21), and obese pubertal children and adolescents (22). The purpose of this paper was to study the connection between GHBP and leptin in adults with a wide range of BMI to ascertain whether serum leptin levels might be a factor linking nutrition with serum GHBP activity.

### Subjects and Methods

One hundred and twenty-eight adults (95 women and 33 men; age range, 17–68 yr; BMI range, 12.6–77.4) were studied. Thirty-four were anorexia nervosa patients whose weight had remained unchanged within 3 months before the study. These patients with anorexia nervosa were divided into 3 groups: group I (BMI,  $\leq 14.5$  kg/m<sup>2</sup>) consisted of 7 patients who were severely underweight, group II (BMI,  $>14.5$  kg/m<sup>2</sup> and  $<16$  kg/m<sup>2</sup>) consisted of 8 underweight patients, and group III (BMI,  $\geq 16$  kg/m<sup>2</sup> and  $<18$  kg/m<sup>2</sup>) consisted of 19 patients with partial weight recovery. Forty-eight were normal weight (group IV; BMI,  $\geq 18$  kg/m<sup>2</sup> and  $<27$  kg/m<sup>2</sup>), and 12 were overweight (group V; BMI,  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> and  $<30$  kg/m<sup>2</sup>) healthy adults. Thirty-four patients with long lasting obesity were studied before entering a weight reduction program; 13 were simple obese (group VI; BMI,  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> and  $<40$  kg/m<sup>2</sup>), 11 were morbidly obese (group VII; BMI,  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> and  $<50$  kg/m<sup>2</sup>), and 10 were highly morbidly obese (group VIII; BMI,  $\geq 50$  kg/m<sup>2</sup>; Table 1).

Received November 14, 1997; Revision received March 5, 1998. Accepted March 11, 1998.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. M. Foz, Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, C/Canyet s.n, Badalona 08916, Spain.

\* This work was supported by Grants 94/0034-02 and 95/0735 from the Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social, National Health Service, Spain.

TABLE 1. Characteristics of the eight groups of subjects

	Group I: BMI $\leq 14.5$ (severely underweight)	Group II: BMI 14.6-15.9 (underweight)	Group III: BMI 16-17.9 (partly weight-recovered)	Group IV: BMI 18-26.9 (normal weight)	Group V: BMI 27-29.9 (overweight)	Group VI: BMI 30-38.9 (simple obese)	Group VII: BMI 40-49.9 (morbidly obese)	Group VIII: BMI 50-80 (highly morbidly obese)
No. (women/men)	7 (6/1)	8 (8/0)	19 (16/3)	48 (32/16)	12 (7/5)	13 (8/5)	11 (10/1)	10 (8/2)
Age (yr)	21.1 $\pm$ 1.2 (17-25)	21.1 $\pm$ 0.9 (18-25)	23.1 $\pm$ 1.5 (17-43)	37.6 $\pm$ 1.6 (19-67)	44.7 $\pm$ 3.0 (28-60)	46.1 $\pm$ 4.3 (18-68)	39.5 $\pm$ 2.6 (28-53)	36.7 $\pm$ 4.1 (18-55)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	13.9 $\pm$ 0.2 (12.6-14.5)	15.3 $\pm$ 0.2 (14.7-15.8)	16.7 $\pm$ 0.1 (16-17.7)	23.1 $\pm$ 0.4 (18.3-26.8)	28.2 $\pm$ 0.2 (27.2-29.3)	34.4 $\pm$ 0.8 (30.3-39.2)	44.5 $\pm$ 0.8 (40.6-49.3)	58.6 $\pm$ 2.8 (50.7-77.4)
GHBP (%)	10.1 $\pm$ 2.5 (2.7-20.3)	15.2 $\pm$ 2.2 (8.3-23.9)	16.5 $\pm$ 1.6 (9.3-26.9)	30.1 $\pm$ 1.4 (10.8-55)	37.3 $\pm$ 2.0 (24.2-47.7)	43.6 $\pm$ 1.7 (32.8-51.4)	42.9 $\pm$ 2.6 (34.1-58.3)	45.7 $\pm$ 3.7 (33.4-54.8)
Leptin (ng/mL) <sup>a</sup>								
Women	1.3 $\pm$ 1.1 (1.0-2.2)	1.6 $\pm$ 1.2 (1.0-4.2)	2.5 $\pm$ 1.2 (0.7-5.8)	10.4 $\pm$ 1.1 (2.4-37.6)	19.7 $\pm$ 1.2 (8.9-29.7)	31.8 $\pm$ 1.2 (17.5-80.2)	51.4 $\pm$ 1.1 (30.5-115.7)	47.9 $\pm$ 1.2 (22.5-81.8)
Men	2.4	2.0 $\pm$ 1.4 (1.1-2.9)	2.0 $\pm$ 1.4 (1.1-2.9)	3.7 $\pm$ 1.1 (1.2-9.2)	6.2 $\pm$ 1.3 (3.5-16.2)	14.6 $\pm$ 1.3 (7.1-26.9)	8.2	19.1 $\pm$ 1.9 (10.2-36.1)
Log (leptin)								
Women	0.26 $\pm$ 0.14 (0.00-0.78)	0.48 $\pm$ 0.2 (0.00-1.43)	0.91 $\pm$ 0.15 (0.36-1.75)	2.34 $\pm$ 0.11 (0.87-3.63)	2.98 $\pm$ 0.16 (2.18-3.39)	3.46 $\pm$ 0.16 (2.86-4.38)	3.94 $\pm$ 0.13 (3.41-4.75)	3.87 $\pm$ 0.16 (3.11-4.40)
Men	0.88	0.71 $\pm$ 0.31 (0.09-1.06)	0.71 $\pm$ 0.31 (0.18-2.22)	1.3 $\pm$ 0.12 (0.18-2.22)	1.82 $\pm$ 0.28 (1.25-2.78)	2.68 $\pm$ 0.25 (1.96-3.29)	2.1	2.95 $\pm$ 0.63 (2.32-3.58)
SD score-leptin	-2.88 $\pm$ 0.38 (-3.62-(-1.4))	-2.87 $\pm$ 0.30 (-3.62-(-1.4))	-2.06 $\pm$ 0.23 (-4.17-(-0.48))	-0.00 $\pm$ 0.14 (-2.27-1.98)	1.00 $\pm$ 0.26 (-0.25-2.97)	2.12 $\pm$ 0.28 (0.8-3.99)	2.88 $\pm$ 0.2 (1.6-3.71)	2.54 $\pm$ 0.3 (1.19-4.58)

Values are the mean  $\pm$  SEM, with the range in parentheses.  
<sup>a</sup> Geometric mean (log back-transformed mean).

A baseline blood sample was drawn after an overnight fast in patients and controls for GH, GHBP, and leptin measurements (GHBP was not available in 19). After extraction, blood samples were maintained at room temperature and centrifuged within 4 h. Serum was stored at -20 C until assayed.

#### Hormone assays

Serum leptin concentrations were measured by a commercial RIA (Linco Research, St. Louis, MO). The intraassay coefficient of variations (CVs) ranged from 3.4-8.3%, and interassay CVs ranged from 3.6-6.2%. Serum GH concentrations were measured using a solid phase, two-site chemiluminescent enzyme immunometric assay for use with the Immulite Automated Analyzer (Immulite hGH, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA), which uses standards calibrated against the International Standard 80/505. The assay has sensitivity of 0.05 ng/mL, with interassay CVs ranging from 5.5-6.5%.

#### GHBP measurement

GHBP activity was measured by the high performance liquid chromatography-gel filtration method of Tar *et al.* (23). Briefly, recombinant human (h) GH (Humatrope, Eli Lilly Co., Indianapolis, IN) was radiolabeled with [<sup>125</sup>I]Na using the chloramine-T method modified by Lesniak *et al.* (24), and purified weekly by gel filtration chromatography. Serum (100  $\mu$ L) was incubated overnight at 4 C with 100  $\mu$ L potassium phosphate buffer and 0.1% BSA containing monomeric [<sup>125</sup>I]hGH (0.5 ng). A parallel incubation was carried out in the presence of an excess of recombinant hGH (2  $\mu$ g) to evaluate nonspecific binding. The entire incubation mixture was injected into an high performance liquid chromatograph (model series 2, Perkin-Elmer, Norwalk, CT) with a Protein Pack 300 sw column (Waters, Millipore, Milford, MA; 0.75  $\times$  30 cm) to separate bound and free [<sup>125</sup>I]hGH. The eluate was collected in 30-s fractions, and radioactivity was counted in an automatic  $\gamma$ -counter (GAMBYT, CR-20, Diagnostic Products Corp.). Binding of [<sup>125</sup>I]hGH was expressed as the radioactivity in individual peak II divided by the sum of the radioactivity in peaks I, II, and III. Binding to peak II-BP was given as a percentage of specific binding, calculated as the difference between total (incubation without unlabeled hGH) and nonspecific (incubation with excess hGH) binding. Interassay CVs were 8.4% and 9.8% at levels of 40.9% and 19.2% GHBP activity, respectively. GHBP activity was corrected for endogenous GH interference at serum GH concentrations above 7 ng/mL (25).

#### Calculations and statistical analysis

BMI was calculated dividing weight (kilograms) by height (meters)<sup>2</sup>. All statistical analyses were made with the statistical software package SPSS, version 6.0.1 (SPSS, Chicago, IL). Data were first tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test of normality. Leptin concentrations were not normally distributed, so they were logarithmically transformed before analysis (log leptin).

To overcome gender differences in leptin concentrations, individual leptin values were standardized according to sex-matched leptin levels observed in the normal weight group as follows: SD score-leptin = [(log (observed leptin) - log (geometric mean))/SD]. For men: SD score-leptin = (log observed leptin - log 3.7)/0.49; for women: SD score-leptin = (log observed leptin - log 10.4)/0.65.

One-way ANOVA was used to assess potential differences among groups followed by Scheffe's F test for multiple comparisons. Bivariate correlations and multiple linear regression analyses were performed to test the relationship among GHBP, log (leptin), SD score of leptin, and BMI. All data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

#### Hormone results

Hormone results obtained in all groups studied are shown in Table 1. In the normal weight group, no differences were found in GHBP activity according to gender, but serum lep-

tin concentrations in men were significantly lower than those in women ( $P < 0.0001$ ).

Figure 1A shows the mean  $\pm$  SE GHBP activity in all groups studied. One-way ANOVA revealed significantly decreased GHBP activity in the underweight groups (groups I, II, and III) compared to the others, whereas no differences were found among them. GHBP activity was significantly lower in normal weight subjects (group IV) compared to obese patients (groups VI, VII, and VIII), but did not differ from that in overweight subjects (group V). No differences were observed in GHBP activity among groups with BMI above 27 kg/m<sup>2</sup> (groups V, VI, VII, and VIII).

Mean  $\pm$  SE SD score-leptin results in all groups are shown in Fig. 1B. One-way ANOVA showed significantly decreased SD score-leptin in the underweight groups (groups I, II, and III) compared to the others, whereas no differences were found among them. The SD score-leptin was significantly lower in normal weight subjects (group IV) compared to those in obese patients (groups VI, VII, and VIII), but did not differ from that in overweight subjects (group V). No dif-

ferences were observed in SD score-leptin among groups with BMI above 27 kg/m<sup>2</sup> (groups V, VI, VII, and VIII).

#### Correlation analyses

Bivariate correlation analyses showed a positive correlation between serum GHBP activity and BMI ( $r = 0.71$ ;  $P < 0.0001$ ) and between SD score-leptin and BMI ( $r = 0.78$ ;  $P < 0.0001$ ; Fig. 2, A and B). Moreover, GHBP activity correlated significantly with log leptin concentrations ( $r = 0.77$ ;  $P < 0.0001$ ), but when sexual dimorphism was avoided (SD score-leptin), a stronger correlation was found ( $r = 0.8$ ;  $P < 0.0001$ ; Fig. 3).

Multiple regression analysis revealed that changes in SD score-leptin were significant determinants of changes in GHBP, whereas the contribution of BMI was not significant (Table 2). The same observations were found when logarithmically transformed leptin concentrations were separately analyzed by gender.

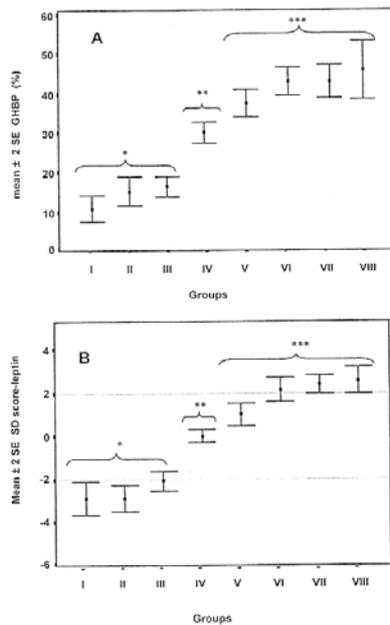


FIG. 1. Serum GHBP activity (A) and SD score-leptin (B) in all subjects studied: group I, severely underweight (BMI,  $\leq 14.5$  kg/m<sup>2</sup>; n = 7); group II, underweight (BMI,  $> 14.5$  and  $< 16$  kg/m<sup>2</sup>) (n = 8); group III, partly weight recovered (BMI,  $\geq 16$  and  $< 18$  kg/m<sup>2</sup>; n = 19); group IV, normal weight (BMI,  $\geq 18$  and  $< 27$  kg/m<sup>2</sup>; n = 48); group V, overweight (BMI,  $\geq 27$  and  $< 30$  kg/m<sup>2</sup>; n = 12); group VI, simple obese (BMI,  $\geq 30$  and  $< 40$  kg/m<sup>2</sup>; n = 13); group VII, morbidly obese (BMI,  $\geq 40$  and  $< 50$  kg/m<sup>2</sup>; n = 11); and group VIII, highly morbidly obese (BMI,  $\geq 50$  kg/m<sup>2</sup>; n = 10). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$  vs. other groups and  $P = NS$  among them; \*\*,  $P < 0.05$  vs. groups VI, VII, and VIII and  $P = NS$  vs. group V; \*\*\*,  $P = NS$  among them.

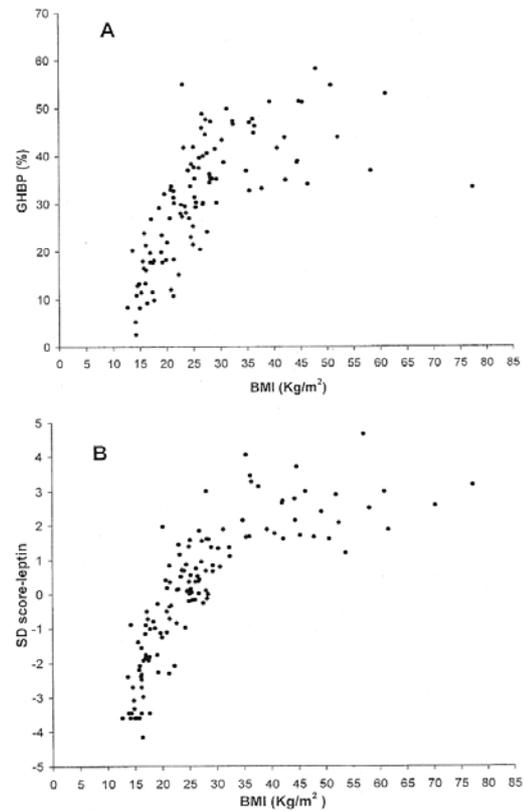


FIG. 2. Correlation between GHBP and BMI (A;  $r = 0.71$ ;  $P < 0.0001$ ) and between SD score-leptin and BMI (B;  $r = 0.77$ ;  $P < 0.0001$ ) in all subjects studied (n = 109).

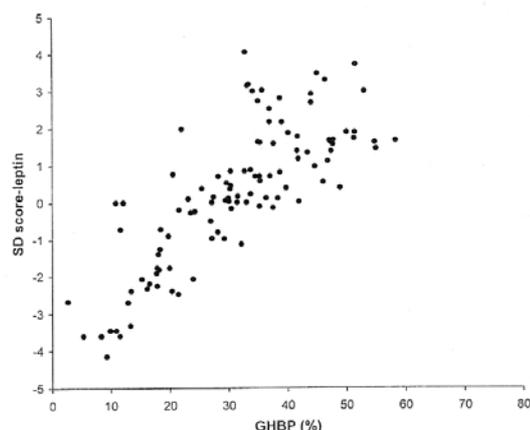


FIG. 3. Correlation between GHBP and SD score-leptin ( $r = 0.8$ ;  $P < 0.0001$ ) in all subjects studied ( $n = 109$ ).

TABLE 2. Multiple regression analysis with GHBP as dependent variable

Independent variable	Dependent variable: GHBP activity		
	$\beta$ (SE)	P value	% Change in $r^2$
Intercept ( $\alpha$ )	25.9 (2.8)	<0.00001	
BMI	0.16 (0.10)	NS	14.0
SD score-leptin	4.72 (0.62)	<0.00001	69.1
$r^2$	0.64		
Intercept ( $\alpha$ )	9.86 (2.14)	<0.00001	
BMI	0.06 (0.12)	NS	5.3
Log <sub>10</sub> leptin (women)	8.2 (1.17)	<0.00001	78.3
$r^2$	0.69		
Intercept ( $\alpha$ )	5.82 (6.05)	NS	
BMI	0.62 (0.34)	NS	36.5
Log <sub>10</sub> leptin (men)	6.08 (2.83)	0.04	42.8
$r^2$	0.56		

$\beta$ (SE): regression coefficient (standard error).

### Discussion

Despite the increasing knowledge of leptin physiology, the relationship between the GH axis and leptin has only recently been studied (18–22, 26–28). Carro *et al.* found that leptin antiserum administration to rats leads to a decrease in spontaneous GH secretion, and that leptin administration reverses the inhibitory effect of fasting; thus, they propose that leptin might act as a metabolic signal connecting the somatotroph axis with adipose tissue in rats (18). Both GHBP and leptin have been proposed as good markers of nutritional status (4–9, 29, 30). Both change acutely with feeding and fasting manipulation (4, 8, 16) and correlate strongly with body fatness measurements (10, 11, 14–17), but to date only four reports have studied the relationship among BMI, GHBP activity, and leptin in humans (19–22).

The relationship between body fatness and leptin concentrations is significantly influenced by gender in children and adults (14, 17, 27, 31, 32). In accordance with other studies, serum leptin levels in women in our normal weight group were almost 3-fold higher than those in men; thus, sex must

be taken into account when analyzing leptin data (14, 17, 19, 27, 28, 31, 32). Previous reports have found that gender influence can be overcome by correcting leptin levels according to body fat (15, 16, 27), but others have reported that this sexual dimorphism persists after body composition and fat distribution have been adjusted (14, 17, 27, 32). To perform statistical comparisons with GHBP, which is not significantly affected by gender (23), we standardized leptin concentrations according to sex (SD score-leptin) after logarithmic transformation of leptin data. Standardization is a common procedure in age-dependent hormone parameters, but has not yet been used to express male and female leptin levels together.

To our knowledge, no studies on GHBP and leptin in individuals with such a wide range of BMI including different degrees of underweight (ranging from severe underweight to partly weight recovered) and overweight (from overweight to highly morbid obesity) have been reported. As expected, we found that GHBP activity and SD score-leptin increased according to BMI. Both GHBP and SD score-leptin were significantly higher in obese groups than in normal weight adults or anorexic patients and were significantly lower in anorexic compared with normal weight subjects (4–9, 33). However, we found no further increase in GHBP or SD score-leptin above a BMI of 27 kg/m<sup>2</sup> despite almost triplicate BMI. Furthermore, we found no significant decrease in either GHBP or SD score-leptin among the underweight groups (BMI, <18 kg/m<sup>2</sup>). The fact that leptin levels remained unchanged in the underweight and obese groups supports the hypothesis that leptin is not merely a ponderostat (34). If leptin only informed of the size of the adipose tissue depot, we would expect a progressive increase in its levels parallel to the degree of obesity. Recently, a number of experimental studies have suggested that the relationship between leptin and energy balance does not depend on body fatness alone, but is much more complex, as supported by the close relationship between leptin and thermogenesis (35), the influence of selective micronutrients on leptin expression, and the circadian rhythmicity of leptin levels (29, 34).

In our study, SD score-leptin and GHBP correlated significantly with BMI, in agreement with the findings of others (10, 11, 14–17). Moreover, a stronger correlation was found between SD score-leptin and GHBP. Multiple regression analyses revealed that changes in SD score-leptin were significant determinants of GHBP variation, whereas BMI did not contribute further to accounting for changes in GHBP. Changes in SD score-leptin explained 64% of the variation in GHBP levels. Similar results were found when the relationship between GHBP and log leptin was analyzed separately in men and women. Our results concur with those of Bjarnason *et al.* (21), who reported a strong correlation between serum GHBP and leptin concentrations after adjustment for BMI in a group of normal prepubertal children. In the same report, in a group of short children born small for gestational age, serum GHBP correlated with serum leptin levels, whereas correlations between GHBP and BMI, and leptin and BMI were absent. Our results are also in agreement with those reported by Kratzsch *et al.* (22), who found an association between serum GHBP and leptin levels in a group of obese pubertal children and adolescents, which remained significant after

controlling for percent body fat. In contrast, Fisker *et al.* (19) and Deuschle *et al.* (20) found no significant correlation between GHBP and leptin when controlling for estimates of body fatness. However, in these reports the adult population studied was smaller than ours.

To date, the role of nutrition-induced alterations in GHBP levels, as well as the precise nutritional factor responsible for the GHBP/GH receptor change, remain unknown. From our findings, we speculate that leptin may be the signal linking nutrition and GHBP/receptor changes, which suggests a physiological pathway involving both GHBP and leptin. We concur with Jorgensen *et al.* (36), who speculated that GHBP/GH receptor levels may influence the balance or partitioning between the direct effects, those related to lipid and carbohydrate metabolism, and the insulin-like growth factor I (IGF-I)-mediated effects of GH. Low leptin levels observed in undernourished states might, therefore, account for the decreased production of GHBP/receptor and IGF-I, which, through reduced negative feedback, results in increased GH production (4–6, 30, 33). Thus, in undernutrition, direct metabolic actions of GH in terms of increased lipolysis and glucose sparing are enhanced so that available nutrients may be used instead of growth for energy production and other metabolic functions (4, 30, 36). The opposite occurs in overnutrition and obesity when nutrients are plentiful and can be used largely to promote energy storage and somatic growth. In these situations increased leptin levels could induce GHBP/GH receptor expression. This may explain the normal to high IGF-I levels found in overnutrition despite blunted GH secretion (7, 30). This higher GHBP/GH receptor and IGF-I levels are consistent with the accelerated growth rate observed in well nourished children despite low GH secretion (7, 10, 30), whereas during adulthood, diminished lipolytic GH activity might contribute to perpetuating obesity (36).

Other similarities between these peptides also lead us to think that they are closely linked. Leptin, GH, and other nutrition-related peptides such as tumor necrosis factor- $\alpha$  share some biochemical and structural analogies. These peptides are involved in the regulation of energy expenditure and body weight (37). Moreover, their receptors belong to the same cytokine receptor superfamily (38–40). These receptors have been found to have soluble isoforms in addition to the membrane-bound isoforms (40). Thus, leptin, GH, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and other cytokines circulate bound to specific binding proteins that modulate the availability of free hormones for their biological actions (2, 3, 41, 42). In this way, GHBP represents the soluble form of the GH receptor, and recently, the presence of leptin-binding proteins in serum, one of which appears to be the soluble leptin receptor Ob-Re, has been demonstrated (3, 41, 42). Further studies are required to clarify these relationships.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to Christine O'Hara for reviewing the English manuscript. Our thanks to Leonardo Pardo of the Department of Statistics of the Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, for statistical advice.

#### References

- Dieguez C, Casanueva FF. 1995 Influence of metabolic substrates and obesity on GH secretion. *Trends Endocrinol Metab.* 6:55–59.
- Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, et al. 1987 Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature.* 330:537–543.
- Sotiropoulos A, Goujon L, Simonin G, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Finidori J. 1993 Evidence for generation of growth hormone-binding protein through proteolysis of the growth hormone membrane receptor. *Endocrinology.* 132:1863–1865.
- Counts D, Gwirstman H, Carlsson L, Lesem M, Cutler G. 1992 The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab.* 75:762–767.
- Golden NH, Kreitzer P, Jacobson MS, et al. 1994 Disturbances in growth hormone secretion and action in adolescents with anorexia nervosa. *J Pediatr.* 125:655–660.
- Hochberg Z, Hertz P, Colin V, et al. 1992 The distal axis of growth hormone (GH) in nutritional disorders: GH-binding protein, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptors in obesity and anorexia nervosa. *Metabolism.* 41:106–112.
- Postel-Vinay MC, Saab C, Gourmelin M. 1995 Nutritional status and growth hormone-binding protein. *Horm Res.* 44:177–181.
- Rasmussen MH, Ho KYK, Kjems L, Hilsted J. 1996 Serum growth hormone-binding protein in obesity: effect of a short-term, very low caloric diet and diet-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:1519–1524.
- Roelen CA, Koppeschaar HP, Vries WR, et al. 1997 Visceral adipose tissue is associated with circulating high affinity growth hormone-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:760–764.
- Holl RW, Snehotta R, Siegler B, Scherbaum W, Heinze E. 1991 Binding protein for human growth hormone: effects of age and weight. *Horm Res.* 35:190–197.
- Martha PM, Rogol AD, Blizzard RM, Shaw MA, Baumann G. 1991 Growth hormone-binding protein activity is inversely related to 24-hour growth hormone release in normal boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 73:175–181.
- Considine RV, Considine EL, Williams CJ, et al. 1995 Evidence against either a premature stop codon or the absence of gene mRNA in human obesity. *J Clin Invest.* 95:2986–2988.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. 1995 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425–432.
- Rosebaum M, Nicolson M, Hirsh J, et al. 1996 Effects of gender, body composition and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:3424–3427.
- Maffei M, Haalas J, Ravussin E, et al. 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and obRNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1:1155–1161.
- Considine R, Sinha M, Heimann, et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 334:292–295.
- Ostlund RE, Yang JW, Klein S, Gingerich R. 1996 Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:3909–3913.
- Carro E, Señaris R, Considine RV, Casanueva FF, Dieguez C. 1997 Regulation of *in vivo* growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology.* 138:2203–2206.
- Fisker S, Vahl N, Hansen TB, et al. 1997 Serum leptin is increased in growth hormone-deficient adults: relationship to body composition and effects of placebo-controlled growth hormone therapy for 1 year. *Metabolism.* 46:812–817.
- Deuschle M, Blum WF, Englaro P, et al. 1996 Plasma leptin in depressed patients and healthy controls. *Horm Metab Res.* 28:714–717.
- Bjarnason R, Boguszewski M, Dahlgren J, et al. 1997 Leptin levels are strongly correlated with those of GH-binding protein in prepubertal children. *Eur Endocrinol.* 137:68–73.
- Kratzsch J, Dehmel B, Pulzer F, et al. 1997 Increased serum GHBP in obese pubertal children and adolescents: relationship to body composition, leptin and indicators of metabolic disturbances. *Int J Obes.* 21:1130–1136.
- Tar A, Hocquette JF, Souberbielle JC, Clop JP, Brauner R, Postel-Vinay MC. 1990 Evaluation of the growth hormone-binding proteins in human plasma using high pressure liquid chromatography gel filtration. *J Clin Endocrinol Metab.* 71:1202–1207.
- Lesniak MA, Roth J, Gorden P, Gavin JR. 1973 Human growth hormone radioreceptor assay using cultured human lymphocytes. *Nature.* 241:20–22.
- Llopis MA, Granada ML, Audi L, et al. 1997 Analytical performance and clinical usefulness of two binding assays for growth hormone binding protein (GHBP) measurement: high performance liquid chromatography (HPLC)-gel filtration and dextrin-coated charcoal adsorption. *Clin Chim Acta.* 267:167–181.
- Bianda TL, Clatz Y, Boeni-Schnetzler M, Froesch ER, Schmid C. 1997 Effects of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I on serum leptin in GH-deficient adults [Letter]. *Diabetologia.* 40:363–364.
- Gill MS, Toogood AA, O'Neil PA, et al. 1997 Relationship between growth

- hormone (GH) status, serum leptin and body composition in healthy and GH deficient elderly subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 47:161-167.
28. Nystrom F, Ekman B, Osterlund M, Lindstrom T, Ohman KP, Arnqvist HJ. 1997 Serum leptin concentrations in a normal population and in GH deficiency: negative correlation with testosterone in men and effects of GH treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 47:191-198.
  29. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. 1996 Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*. 45:1455-1462.
  30. Baumann G, Mercado M. 1993 Growth hormone-binding proteins in plasma. *Nutrition*. 9:546-553.
  31. Nagy TR, Gower BA, Trowbrige CA, Schewchuck RM, Goran ML. 1997 Effects of gender, ethnicity, body composition, and fat distribution on serum leptin concentrations in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:2148-2152.
  32. Kennedy A, Gettys TW, Watson P, et al. 1997 The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:1293-1300.
  33. Grinspoon S, Gulick T, Askari H, et al. 1996 Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:3861-3863.
  34. Remesar X, Rafecas I, Fernandez-Lopez JA, et al. 1997 Is leptin an insulin counter-regulatory hormone? *FEBS Lett*. 402:9-11.
  35. Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K, et al. 1997 Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:6386-6390.
  36. Jorgensen JOL, Pedersen SB, Borglum J, et al. 1995 Serum concentrations of insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding proteins 1 and 3 and growth hormone binding protein in obese women and the effects of growth hormone administration: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Endocrinol*. 133:65-70.
  37. Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I, et al. 1997 Leptin concentrations in relation to body mass index and tumor necrosis factor- $\alpha$  system in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:3408-3413.
  38. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. 1991 The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev*. 12:235-251.
  39. Madej T, Boguski MS, Bryant SH. 1995 Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett*. 373:13-18.
  40. Haeaney ML, Golde DW. 1993 Soluble hormone receptors. *Blood*. 82:1945-1948.
  41. Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB. 1996 Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes*. 45:1638-1643.
  42. Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, et al. 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest*. 98:1277-1282.

## **5. DiSCUSIÓN**

La identificación y caracterización de una proteína transportadora de la hormona de crecimiento relacionada con su receptor, en el suero, ha abierto nuevas perspectivas en la investigación de los receptores y la acción de la GH. La determinación de la concentración o actividad de la GHBP en suero ha tenido un notable interés clínico y fisiológico pues su estructura se corresponde con el dominio extracelular del receptor de la GH y su medida en el suero puede reflejar la de los receptores tisulares de GH, cuya accesibilidad es muy limitada.

Tras su descripción inicial<sup>2,3</sup> han aumentado de forma progresiva el número de publicaciones sobre esta proteína. Sin embargo, todavía existen muchas incógnitas respecto a su función, mecanismo y regulación de su producción. El papel exacto de la GHBP dentro del eje GH-IGF-I eje todavía se desconoce y por el momento la pregunta de si se trata de un componente pasivo que actúa simplemente como transporte de la GH o si por el contrario tiene un papel activo en la regulación del mismo, permanece sin respuesta. El hecho de que la GHBP se haya conservado a través de la evolución de los vertebrados (se ha encontrado GHBP en la sangre de teleósteos, reptiles, aves y mamíferos) y que se pueda generar mediante dos mecanismos diferentes sugiere que su función biológica ha de ser importante<sup>55</sup>.

Con la finalidad de contribuir al estudio de esta proteína, las investigaciones realizadas en esta tesis se han desarrollado dentro de las siguientes áreas: desarrollo y comparación de metodologías para su determinación; investigación de esta proteína en niños con distintos tipos de retraso de crecimiento en relación con los estados de insensibilidad a

la acción de la GH y por último, estudio de la estrecha relación que existe entre la GHBP y la nutrición, valorando la implicación de la leptina en dicha relación.

En esta discusión general se seguirá también el mismo esquema, pero se ha querido dar un enfoque global a los hallazgos más relevantes de esta tesis; más allá de las consideraciones específicas de cada grupo de resultados que ya se han realizado en las discusiones pertinentes de cada artículo.

- **Comparación de métodos**

Actualmente no existe un método definitivo para medir la concentración de GHBP en el suero. Su determinación no está exenta de dificultades técnicas y bajo las mismas situaciones clínicas se han referido datos discrepantes y equívocos. Los métodos para valorar la GHBP en suero pueden clasificarse dentro de dos grandes grupos; los métodos de unión, que miden la capacidad funcional de unión a la GH y los métodos que miden la GHBP inmunorreactiva.

Las concentraciones de GHBP halladas con los diferentes tipos de métodos inmunorreactivos varían del orden de tres a diez veces según los distintos autores, obteniéndose con ellos gran variedad de rangos de normalidad<sup>89,116,120,121,186,187</sup>. Entre las variables que pueden influir en estas discrepancias cabe destacar las que dependen de los diferentes diseños de los métodos, los diferentes estándares utilizados (GHBP

recombinante glicosilada o no), la especificidad del epítipo, la afinidad del anticuerpo y otras variables que influyen en la unión/disociación de la GH/GHBP como son la temperatura, la fuerza iónica de los tampones, etc. Por ello, a pesar de que las principales ventajas de los métodos inmunorreactivos radican en su capacidad de medir un gran número de muestras en cada serie analítica y en que no se ven afectados por la concentración endógena de la GH presente en la muestra se decidió comparar dos métodos de unión.

Puesto que nos interesaba determinar la GHBP funcionalmente activa, se escogieron dos métodos de unión que fueran técnicamente posibles de llevar a cabo en nuestro laboratorio. Los ensayos de unión, tras una primera fase común de incubación del suero con GH marcada radiactivamente, se diferencian en el método de separación de la GH marcada ligada a la GHBP, de la libre. Los métodos de separación elegidos fueron HPLC-filtración en gel<sup>13</sup>, y adsorción mediante carbón dextrano<sup>29</sup>. A pesar de que en la literatura se han publicado varios estudios en los que se ha empleado alguna de estas metodologías, antes de nuestra primera publicación (Resultados: estudio 1), no existían estudios comparativos de ambos métodos.

Con la finalidad de comparar diferentes características analíticas de los dos ensayos de unión se realizaron varios estudios de desplazamiento de la unión GHBP:GH-I<sup>125</sup>, incubando dos mezclas de sueros de actividades distintas de GHBP con cantidades crecientes de GH sin marcar. La capacidad de unión máxima y constante de afinidad de la GHBP derivadas de las curvas de desplazamiento y del análisis

Scatchard fueron similares entre ambos métodos. Los resultados obtenidos en las curvas de desplazamiento demostraron que la actividad GHBP medida debía corregirse en los dos métodos cuando la concentración de GH endógena fuera superior o igual a 7 ng/mL. Se han publicado concentraciones similares en diferentes estudios<sup>2,3,13,29</sup>

Un factor muy importante en los métodos de unión, es la calidad de la GH marcada radiactivamente sobre todo cuando ésta procede de diferentes marcajes<sup>189</sup>. En nuestro estudio, la pureza de la misma se aseguró semanalmente mediante cromatografía de filtración en gel con columnas de Sephacryl 200 HR (55 x 1.6 cm) y sólo se utilizó la GH-I<sup>125</sup> durante las cuatro semanas posteriores al marcaje.

En nuestro primer estudio fue necesario utilizar GH marcada radiactivamente procedente de cinco marcajes distintos y la imprecisión interserial se expresó como total, intra e intermarcaje. El material de control que se incluyó en cada serie correspondía a dos mezclas de sueros de pacientes obesos y adultos sanos, para realizar el estudio de imprecisión a dos niveles de actividad GHBP, alta y media respectivamente. Nuestros coeficientes de variación (CVs) interserial total e intermarcaje para ambos métodos fueron superiores al CV intramarcaje. Al comparar nuestros resultados de imprecisión, hemos hallado que nuestros CVs intramarcaje eran similares a CVs interseriales publicados por otros autores. Así, con el método de separación por HPLC, se han publicado trabajos en que para una actividad de GHBP del 32.2% o del 25.1 % se han encontrados CVs interseriales del 8%, mientras que para actividades de GHBP del 3.6% el coeficiente de

variación era del 18 %<sup>13,86</sup>. Lo mismo sucede con los CVs interseriales publicados con el método de separación mediante carbón dextrano que oscilan entre un 4.63% y un 16% según los autores<sup>29,116,138,139</sup>. Sin embargo, en la mayoría de ellos no se detalla si se trata de CVs interseriales correspondientes a uno o varios marcajes.

En nuestro estudio, los porcentajes de unión específica en valor absoluto fueron muy distintos para ambos métodos, debido a las diferencias en el modo de calcular el porcentaje de unión específica. Esto imposibilitaba la comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos. Sin embargo, cuando los resultados de ambos métodos se expresaron en porcentaje de unión relativa, los resultados fueron comparables. Del mismo modo, a pesar de que en apariencia el CV para el método CD era mayor, cuando los resultados se expresaron en forma de unión específica relativa no se obtuvieron diferencias significativas en las imprecisiones de ambos métodos. Además, se obtuvo una correlación significativa entre las actividades GHBP obtenidas con ambos métodos.

La ventaja principal del método de separación mediante HPLC y filtración en gel respecto al método de separación con carbón dextrano es que el primero tiene la capacidad de medir específicamente la GHBP de alta afinidad. Sin embargo, con el método de separación mediante carbón dextrano se mide la GHBP total presente en la muestra, tanto la de alta como la de baja afinidad. Este hecho era importante para nuestro trabajo pues sólo la GHBP de alta afinidad se ha relacionado con el receptor de la GH. Otro inconveniente de la separación mediante carbón dextrano

fue que la unión no específica en algunas muestras era muy elevada, impidiendo la obtención de resultados en alguna de ellas.

Por todo lo anterior, podemos concluir que a pesar de la mayor complejidad técnica, la separación mediante HPLC y filtración en gel es un método reproducible y específico y relativamente rápido, por lo que fue el método elegido para determinar la actividad de GHBP de alta afinidad en este trabajo.

- **GHBP como marcador de la sensibilidad a la acción a la GH en niños con talla baja**

Se habla de talla baja en un niño cuando ésta se sitúa por debajo del percentil 3 y la velocidad de crecimiento es inferior al percentil 25 respecto a su edad cronológica. La mayoría de los niños que tiene talla baja no presentan un déficit de secreción de GH, definido éste como la falta de respuesta de la GH a diferentes pruebas de estimulación<sup>190,191</sup>. Tras descartar otras causas conocidas de talla baja, estos pacientes se clasifican como talla baja idiopática, indicando así que la causa de su retraso de crecimiento se desconoce. Las causas del retraso de crecimiento observado en estos niños probablemente son heterogéneas. Algunos de estos pacientes tienen una secreción endógena de GH inadecuada bajo condiciones fisiológicas pero tienen una respuesta adecuada a las pruebas de estimulación<sup>192,193,194,195</sup>. Recientemente, se ha demostrado que algunos de estos niños con talla baja idiopática tendrían una insensibilidad parcial a la acción de la GH.

Este síndrome de insensibilidad parcial también denominado por algunos autores síndrome de insensibilidad atípica<sup>169</sup>, se caracteriza por la ausencia de rasgos dismórficos junto con una respuesta de la GH a las pruebas de estimulación normal o exagerada y concentraciones de IGF-I disminuidas. Los defectos genéticos subyacentes a los estados de insensibilidad parcial a la GH probablemente son heterogéneos debidos a defectos moleculares del GHR o alteraciones en uno o más mecanismos de transmisión de la señal<sup>164,196</sup>. La actividad de la GHBP plasmática suele estar disminuida aunque algunos casos puede ser normal o alta dependiendo del lugar de la mutación.

Las primeras evidencias de que el GHR estaba involucrado en este síndrome partieron de varios estudios realizados en niños con talla baja idiopática en que se demostraba la existencia de concentraciones bajas de GHBP<sup>165,166,167,168</sup>. Estudios posteriores han demostrado que sólo un 2 % de los niños con talla baja idiopática presentan mutaciones leves o polimorfismos en el gen del GHR<sup>197</sup>, sin embargo algunos de estos polimorfismos se encuentran con similar frecuencia en pacientes y controles. Finalmente, Johnston y cols<sup>196</sup> en un grupo de niños con talla baja idiopática y GHBP normal no encuentran ninguna mutación en el dominio intracelular del receptor de la GH, y recomienda realizar la determinación de GHBP en suero antes de iniciar estudios moleculares más complejos.

A raíz de los diferentes estudios realizados en la cohorte europea de pacientes con insensibilidad a la acción de la GH se ha avanzado mucho en el diagnóstico y caracterización de los estados de

insensibilidad parcial a la acción de la GH<sup>148,149</sup>. Savage y cols<sup>148</sup> han establecido unos criterios diagnósticos basados en parámetros auxológicos y bioquímicos entre los que se incluye la actividad GHBP medida por el método utilizado en nuestro estudio, HPLC y filtración en gel, considerando bajos los valores inferiores al 10 %.

En nuestro estudio el porcentaje de niños con talla baja idiopática que presentaron una GHBP inferior al 10 % fue del 1,85 %. Este porcentaje es similar al encontrado por Goddard y cols<sup>197</sup>.

Respecto a la relación positiva que hemos encontrado entre la edad cronológica y la actividad GHBP, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros autores<sup>13,29,86,87</sup>, pero en la literatura existen datos contradictorios a este respecto y no siempre se encuentra esta relación<sup>124, 137</sup>. Es posible que estas discrepancias se deban principalmente a la diferencia en los rangos de edades incluidos en los distintos grupos estudiados pues los cambios en las concentraciones de GHBP relacionados con la edad son más acusados en los primeros años de vida<sup>87,123</sup>.

En nuestro estudio, no hemos encontrado una correlación significativa entre la actividad GHBP y la talla expresada en desviaciones estandar (SDS). Este resultado coincide con los datos publicados por otros autores<sup>104, 198</sup>, pero se contradice con los publicados por Massa y cols<sup>123</sup> y Silbergeld y cols<sup>87</sup>, quienes encuentran una relación positiva entre actividad GHBP y talla SDS. Del mismo modo, en concordancia con los resultados observados por otros Attie y cols<sup>199</sup> no hemos encontrado

diferencias significativas en la actividad GHBP entre los niños con déficit de GH, talla baja idiopática y grupo control. Sin embargo respecto a la actividad de la GHBP en niños con déficit de GH se han publicado resultados contradictorios, habiéndose encontrado concentraciones disminuidas<sup>109,110,111</sup> e incluso elevadas<sup>112,113</sup>.

Las diferencias entre los distintos métodos de determinación de la GHBP y las variaciones en la concentración de GHBP según el estado nutricional pueden contribuir a explicar el hallazgo de estas discrepancias.

- **Implicación de la leptina en la regulación de las concentraciones de GH**

El descubrimiento de la leptina en el año 1994, proporcionó una pieza importante en el estudio de la obesidad. Esta hormona es un péptido de 167 aminoácidos (16 Kda), producido exclusivamente en el tejido adiposo<sup>200, 201</sup>. El ratón *ob/ob* tiene un déficit de leptina y se caracteriza por padecer obesidad, hiperfagia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipotermia e infertilidad. La administración de leptina a esos ratones corrige estos defectos. Los ratones *db/db* tienen un defecto en el receptor de la leptina y son resistentes a la acción de la misma, por ello su obesidad no se corrige con la administración de leptina<sup>202, 203</sup>.

En el ser humano, las concentraciones de leptina están aumentadas en la obesidad y disminuidas en la desnutrición. La existencia de niveles de

leptina aumentados en proporción al aumento de grasa corporal ha sugerido que la obesidad puede ser debida a la resistencia a la leptina<sup>201,204</sup>. En estudios en animales y en humanos se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la grasa corporal y la leptina plasmática, sugiriendo que esta última actúa como señal en el cerebro y en otros tejidos informando sobre los depósitos de grasa y la reserva energética<sup>201</sup>.

Al igual que el receptor de la GH, el receptor de la leptina pertenece a la familia de receptores de las citoquinas de clase I. El receptor de la leptina presenta varias formas moleculares, una de las cuales carece del dominio transmembrana y se ha sugerido que podría ser la fracción soluble del receptor, actuando como proteína transportadora de la leptina circulante<sup>204,205,206</sup>. En los individuos delgados el 50% de la leptina circula unida a proteínas. La fracción libre está aumentada en obesos, por ello se ha descartado la posibilidad de que la resistencia a la leptina fuese debida a un exceso de unión a proteínas transportadoras<sup>204,207</sup>.

La aparente ubicuidad de los receptores de leptina en tejidos periféricos sugiere que debe tener un papel importante en la regulación del metabolismo en los tejidos periféricos, independientemente de su acción central en hipotálamo<sup>204</sup>. Parece ser que la leptina no sólo está implicada en la regulación del peso corporal y balance energético, sino que desempeña también un papel importante en otras vías endocrinas, como las relacionadas con la reproducción<sup>208</sup>.

Recientemente, se han publicado algunos estudios que relacionan la leptina con el eje GH-IGF-I. En este sentido, Carro y cols<sup>209</sup> han encontrado que la administración de suero anti-leptina en ratas disminuye la secreción de GH y que la administración de leptina bloquea el efecto inhibitor del ayuno sobre la secreción de GH. Sin embargo, es importante destacar que la regulación del eje GH en ratas y ratones es muy diferente a la del hombre y por lo tanto los resultados obtenidos en distintas especies no son extrapolables.

Tanto la leptina como la GHBP están reguladas nutricionalmente<sup>99-103,203</sup>. En la desnutrición y en la obesidad los cambios en la concentración de leptina ocurren en paralelo a los cambios en la actividad GHBP<sup>99,102,201</sup> y ambas proteínas muestran una fuerte correlación con el IMC y otras medidas de grasa corporal<sup>101,103,200,201,210,211</sup>. Sin embargo, la relación entre GHBP, leptina e IMC no había sido estudiada en profundidad.

Se ha descrito que las concentraciones de leptina son más altas en mujeres que en hombres<sup>210, 211, 212</sup>. En nuestro estudio también se observó un marcado dimorfismo sexual en las concentraciones de leptina, por ello previamente al análisis de los resultados obtenidos, fue necesaria la estandarización de las concentraciones de leptina respecto al sexo para obviar estas diferencias.

Hasta el momento no se ha realizado un estudio en que se evalúe la relación entre GHBP y leptina en un grupo tan numeroso de pacientes con un intervalo tan amplio de IMC (12.6-77.4 Kg/m<sup>2</sup>). Como cabía esperar, en concordancia con los resultados publicados por otros

autores, ambas GHBP y SDS-Leptina presentaron una correlación positiva con IMC y fueron significativamente más altas en los grupos de obesos comparados con los de peso normal o los de los pacientes con anorexia nerviosa<sup>100,101,102,201,210,211</sup>. Del mismo modo los grupos de pacientes anoréxicos tenían unas concentraciones de GHBP y SDS-Leptina significativamente más bajas que los sujetos normales o los obesos<sup>98,99,100,213</sup>. Sin embargo, un hallazgo destacable fue que esta relación de la actividad GHBP y de la SDS-Leptina con el IMC sólo se cumplía en individuos con un rango de IMC entre 18 y 27 Kg/m<sup>2</sup>. En el sobrepeso y en los grupos con diferentes grados de obesidad esta relación no se mantenía y no se observaron aumentos significativos de GHBP y leptina a pesar de los incrementos en el IMC. Entre los grupos de bajo peso, tampoco se observaron diferencias significativas. Estudios recientes se ha sugerido que la relación entre la leptina y el balance energético no sólo depende de la grasa corporal, sino que es mucho más compleja. En este sentido se ha descrito una estrecha relación entre leptina y termogénesis<sup>214</sup>, una influencia selectiva sobre la expresión de la leptina por parte de algunos micronutrientes y la existencia de un ritmo circadiano en las concentraciones séricas de leptina<sup>203,215</sup>. El hecho de que en nuestro estudio, las concentraciones de leptina permanezcan invariables en los grupos con peso disminuido o entre los grupos de obesidad apoya la hipótesis de que la leptina no actúa sólo como un ponderostato que informa al organismo del tamaño de los depósitos de tejido adiposo<sup>215</sup>.

En nuestro estudio encontramos una relación positiva entre la actividad GHBP y la SDS-Leptina, como cabía esperar pues ambos péptidos se

relacionaban con el IMC, pero nos sorprendió que la relación entre ellos fue mayor que la que presentaban individualmente con el IMC. Para profundizar en esta relación, realizamos un análisis de regresión múltiple, utilizando la GHBP como variable dependiente y SDS-Leptina e IMC como variables independientes, que demostró que los cambios en las concentraciones de SDS-Leptina determinaron de forma significativa los cambios en la actividad GHBP y que contribuyeron a explicar el 64% de la variación en la actividad GHBP, sin embargo los cambios en el IMC no contribuyeron a explicar estos cambios, sugiriendo que la leptina puede representar un papel activo en la regulación de la concentración de GHBP.

En el momento en que se planteó este trabajo, en la literatura, sólo cuatro estudios realizados en seres humanos habían analizado la relación entre GHBP y leptina <sup>216,217,218,219</sup>. Sólo en dos de ellos la estrecha relación que se encuentra entre GHBP y leptina persistía a pesar de controlar el efecto de las variaciones de la grasa corporal mediante análisis multivariante: Bjarnason y cols <sup>216</sup> en dos grupos de niños prepuberales con talla normal y talla baja, Kratsch y cols<sup>217</sup> en un grupo de niños puberales y adolescentes obesos. Por el contrario Deuschle y cols<sup>218</sup> y Fisker y cols<sup>219</sup> no encuentran esta relación cuando controlan las medidas de grasa corporal. Sin embargo en estos estudios la población adulta estudiada fue menor.

Actualmente, el papel de los cambios en la GHBP relacionados con la nutrición, así como el factor nutricional concreto responsable de los cambios en la expresión de GHBP/GHR, se desconoce. A la luz de

nuestros hallazgos podemos especular que la leptina puede ser la señal que une la nutrición con los cambios en la expresión de GHBP/GHR, sugiriendo una vía fisiológica común en la que participan ambas proteínas, GHBP y leptina. Así, la leptina, podría actuar informando al organismo de la “suficiencia” de nutrientes, poniendo en marcha una serie de mecanismos de adaptación que incluirían otros cambios observados en la parte distal de eje GH-IGF-I, en relación sobre todo con la sensibilidad de los diferentes tejidos a la acción de la GH.

Desde un punto de vista de supervivencia, durante los períodos de privación de alimentos puede resultar ventajoso utilizar los nutrientes disponibles para la producción de energía y otras funciones vitales. Por el contrario, cuando hay un exceso de nutrientes, estos se pueden utilizar para el almacenamiento de energía y para funciones menos vitales como el crecimiento. Del mismo modo que Jorgensen y cols <sup>81</sup>, nosotros creemos que las concentraciones de GHBP/GHR pueden influenciar el balance o reparto entre las acciones directas de la GH, relacionadas con el metabolismo lipídico e hidrocarbonado y las acciones indirectas, mediadas por el IGF-I, relacionadas con el crecimiento.

En función de nuestros resultados, hemos especulado que en los estados de desnutrición, las concentraciones bajas de leptina informarían al organismo de la falta de nutrientes para que disminuya la producción de GHBP/GHR y la síntesis de IGF-I. La disminución del retrocontrol negativo que ejerce este último sobre la secreción de GH, sería la causa de las concentraciones de GH elevadas que se observan en estas situaciones<sup>98,99,100,212,213</sup>. En estos estados de desnutrición, las acciones

metabólicas directas de la GH, como son la lipólisis o disponibilidad de glucosa están aumentadas de forma que los nutrientes disponibles sean utilizados para la producción de energía y otras funciones metabólicas vitales<sup>80,81,99</sup>. Lo contrario ocurriría en los estados de sobrealimentación y obesidad cuando hay nutrientes suficientes para ser utilizados favoreciendo el crecimiento somático y el almacenamiento de energía. En estas situaciones, el aumento en las concentraciones de leptina podrían inducir el aumento de las concentraciones de GHBP/GHR. Esto puede explicar la existencia de concentraciones normales o altas de IGF-I a pesar de que la secreción de GH está disminuida . Las concentraciones elevadas de GHBP/GHR y de IGF-I estarían en concordancia con el aumento de la velocidad de crecimiento que se observa en los niños obesos, bien nutridos, a pesar de las concentraciones disminuidas de GH <sup>81,101</sup> , mientras que durante la vida adulta, una vez finalizada la etapa de crecimiento, la disminución de la actividad lipolítica de la GH puede contribuir a perpetuar el estado de obesidad <sup>81</sup> .

## **6.CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. La medición de GHBP mediante el método de unión y separación mediante HPLC y filtración en gel, permite evaluar la actividad funcional de la GHBP plasmática; por lo tanto es una herramienta útil para el estudio de la función y regulación de la GHBP en humanos.
2. El método de separación mediante HPLC y filtración en gel, a pesar de ser mucho más laborioso que el método de separación con carbón dextrano permite medir específicamente la GHBP de alta afinidad, que es la que está relacionada con el receptor de la GH.
3. La GHBP es un parámetro útil en el diagnóstico de niños con talla baja idiopática. El hallazgo de una actividad baja de GHBP contribuye al diagnóstico de la insensibilidad parcial a la acción de la GH.
4. La GHBP y la leptina tienen una relación positiva con el índice de masa corporal. Sin embargo, esta relación desaparece en las alteraciones nutricionales extremas, tanto en la anorexia nerviosa con desnutrición grave como en la obesidad mórbida.

5. Las variaciones en las concentraciones de GHBP observadas en individuos con distintos estados nutricionales dependen directamente de la concentración de leptina.
6. La leptina puede ser la señal que induce los cambios de la expresión de la GHBP/Receptor de la GH relacionados con la nutrición.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- 
- <sup>1</sup> Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis:2001. *Endocr Rev.* 2001;22:53-74.
- <sup>2</sup> 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: 134-141.
- <sup>3</sup> Herington AC, Ymer S, Stevenson J. Identification and characterization of specific binding proteins for growth hormone in normal human sera. *J Clin Invest* 1986;77:1817-1823.
- <sup>4</sup> Gordon PH, Goss J, O'Connor D, Pitt-Rivers R. Nature of the circulating thyroid hormone-plasma protein complex. *Nature* 1952;169:19-20.
- <sup>5</sup> Zapf J, Waldvogel M, Froesch ER: Binding of nonsuppressible insulin-like activity to human serum. Evidence for carrier protein. *Arch Biochem Biophys* 1975; 168: 638-45.
- <sup>6</sup> Hintz RL, Liu F. Demonstration of specific plasma protein binding sites for somatomedin. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45: 988-995.
- <sup>7</sup> Gordon P, Hendricks CM, Roth J. Evidence for "big" and "little" components of human plasma and pituitary growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36: 178-184.

- 
- <sup>8</sup> Stolar MW, Baumann G. Big growth hormone forms in human plasma: immunochemical evidence for their pituitary origin. *Metabolism* 1986; 35: 75-77.
- <sup>9</sup> Peeters S, Friesen HG: A growth hormone binding factor in the serum of pregnant mice. *Endocrinology* 1977; 101: 1164-1183.
- <sup>10</sup> Ymer SI, Stevenson JL, Herington AC. Identification of a rabbit liver cytosolic binding protein for human growth hormone. *Biochem J* 1984; 221: 617-622.
- <sup>11</sup> Herington AC, Ymer S, Roupas P, Stevenson J. Growth hormone-binding proteins in high-speed cytosols of multiple tissues of the rabbit. *Biochem Biophys Acta* 1986; 881: 236-240.
- <sup>12</sup> Baumann G, Shaw MA. A second, lower affinity growth hormone binding protein in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70: 680-686.
- <sup>13</sup> Tar A, Hocquette JF, Souberbielle JC, Clot JP, Brauner R, Postal-Vinay MC . Evaluation of the growth hormone-binding proteins in human plasma using high pressure liquid chromatography gel filtration. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1202-1207.
- <sup>14</sup> Barnard R, Waters MJ. Serum and liver cytosolic growth-hormone-binding proteins are antigenically identical with liver membrane "receptor" types 1 and 2. *Biochem J* 1986; 237: 885-892.

- 
- <sup>15</sup> Daughaday WH, Trivedi B. Absence of serum growth hormone receptors in patients with growth hormone receptor deficiency (Laron dwarfism ). Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 4636-4640.
- <sup>16</sup> Baumann G, Shaw MA, Winter RJ. Absence of serum growth hormone receptors in Laron-type dwarfism . J Clin Endocrinol Metab 1987; 65: 814-816.
- <sup>17</sup> Leung DW, Spencer SA, Cachianes G et al. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. Nature 1987; 330:537-543.
- <sup>18</sup> Baumann G, Shaw M, Amburn K. Regulation of plasma growth hormone-binding proteins in health and disease. Metabolism 1989; 38:683-689.
- <sup>19</sup> 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: 1339-1343.
- <sup>20</sup> Kratzsch J, Selisko T, Birkenmeier G. Identification of transformed  $\alpha_2$ -macroglobulin as a growth hormone-binding protein in human blood. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 585-590.
- <sup>21</sup> Birkenmeyer G, Kampfer I, Kratzsch J, Scellenberger W. Human leptin forms complexes with alpha 2-macroglobulin which are recognized by alfa 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor related protein. Eur J Endocrinol 1998; 139:224-230.

- 
- <sup>22</sup> Herington AC, Smith AI, Wallace C, Stevenson JL. Partial purification from human serum of a specific binding protein for human growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 139: 150-155.
- <sup>23</sup> Fuh G, Mulkerrin MG, Bass S, et al. The human growth hormone receptor. Secretion from *Escherichia Coli* and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain. *J Biol Chem* 1990; 265: 3111-3115.
- <sup>24</sup> deVos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 1992; 255: 306-312.
- <sup>25</sup> Billestrup N, Allevato G, Norstedt G, Moldrup A, Nielsen JH. Identification of intracellular domains in the growth hormone receptor involved in signal transduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;206:205-209
- <sup>26</sup> Cunningham BC, Ultsch 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: 821-825.
- <sup>27</sup> Holl RW, Snehotta R, Siegler B, Scherbaum W, Heinze E. Binding Protein for human growth hormone: Effects of age and weight. *Horm Res* 1991;35:190-197.
- <sup>28</sup> Barnard R, Quick KP, Waters MJ. Characterization of growth hormone binding protein of human serum using a panel of monoclonal antibodies. *J*

---

Endocrinol 1989;123:327.

<sup>29</sup> Amit T, Barkey RJ, Youdim M, Hochberg Z. A new and convenient assay of growth hormone binding protein activity in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:474-79.

<sup>30</sup> 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: 629-641.

<sup>31</sup> Baumann G, Davila N, Shaw MA, Jay R, Liebhaber S, Cooke EN. Binding of human growth hormone variant (hGH-V, placental GH) to growth hormone binding protein in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 1175-1179.

<sup>32</sup> Godowsky PJ, Leung DW, Meachan LR et al. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 8083-8087.

<sup>33</sup> Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991;12:235-251.

<sup>34</sup> Carter-Su C, Schwartz, Smit SL. Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu Rev Physiol* 1996; 58: 187-207

- 
- <sup>35</sup> Kelly PA, Postel-Vinay MC, Finidori J, et al. Growth hormone receptor structure, dimerization and function. *Acta Paedr* 1994 [Suppl 399]:107-111.
- <sup>36</sup> Haeaney ML, Golde DW. Soluble hormone receptors. *Blood* 1993; 82:1945-1948.
- <sup>37</sup> Baumann G. Growth hormone binding to a circulating receptor fragment-the concept of receptor shedding and receptor splicing. *Exp Clin Endocrinol* 1995; 103: 2-6.
- <sup>38</sup> Baumann G. Editorial: Growth Hormone binding protein-errant receptor or active player?. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 136: 377-378.
- <sup>39</sup> Rowlinson SW, Behncken SN, Rowland JE, et al. Activation of chimeric and full-length growth hormone receptors by growth hormone receptor monoclonal antibodies. A specific conformational change may be required for full-length receptor signaling. *J Biol Chem* 1998;273:5307-5314
- <sup>40</sup> Argetsinger LS, Carter-Su. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev* 1996; 76: 1089-1107.
- <sup>41</sup> Urbanek M, MacLeod JN, 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 Endocrinol* 1992; 6: 279-287.
- <sup>42</sup> Esposito N, Paterlini P, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Finidori J. Expression of two

---

isoforms of the human growth hormone receptor in normal liver and hepatocarcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 1994;103:13-20.

<sup>43</sup> Mercado M, Davila N, McLeod JF, Baumann G. Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78: 731-735.

<sup>44</sup> Stallings-Mann ML, Ludwiczak RL, Klinger KW, Rottman F, Alternative splicing of exon 3 of the human growth hormone receptor is the result of an unusual genetic polymorphism. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93:12394-12399.

<sup>45</sup> Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Anselem S, Goossens M. Expression and binding properties of two isoforms of the human growth hormone receptor. *FEBS Lett* 1993; 3: 1199-1205.

<sup>46</sup> Kratzsch J, Wu Z, Kiess W, et al. The exon 3-retaining and the exon 3-deleted forms of the growth hormone binding protein (GHBP) in human serum are regulated differently. *Clin Endocrinol* 2001;54: 61-68.

<sup>47</sup> Dastot F, Duquesnoy P, Sobrier ML, Goossens M, Amselem S Evolutionary divergence of the truncated growth hormone receptor isoform in its ability to generate a soluble growth hormone binding protein. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 137:79-84

<sup>48</sup> Amit T, Bergman T, Dastot F, Youdim MB, Amselem S, Hochberg Z. A membrane-fixed, truncated isoform of the human growth hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3813-3817

- 
- <sup>49</sup> Dastot F, Sobrier ML, Duquesnoy P, Duriez B, Goossens M, Amselem S. Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 ;93:10723-10728 .
- <sup>50</sup> Ross RJ, Esposito N, Shen XY et al. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol Endocrinol* 1997;11:265-273
- <sup>51</sup> Fisker S, Kristensen K, Rosenfalck AM et al. Gene expression of a truncated and the full-length growth hormone (GH) receptor in subcutaneous fat and skeletal muscle in GH-deficient adults: impact of GH treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 792-796.
- <sup>52</sup> Amit T, Yodium MBH, Hochberg Z. Does serum growth hormone (GH) binding protein reflect human GH receptor function? *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 927-932.
- <sup>53</sup> Sadeghi H, Wang BS, Lumanglas A, Logan JS, Baumbach WR: Identification of the origin of the growth hormone binding protein in rat serum. *Mol Endocrinol* 1990; 1799-1805.
- <sup>54</sup> Edens A, Southard JN, Talamantes F. Mouse growth hormone-binding protein and growth hormone receptor transcripts are produced from a single gene by alternative splicing. *Endocrinology* 1994; 135: 2802-2805.

- 
- <sup>55</sup> Baumann G. Growth hormone binding protein 2001. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001; 14:355-375.
- <sup>56</sup> Sotiropoulos A, Goujon L, Simonin G, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Finidori J. Evidence for generation of growth hormone-binding protein through proteolysis of the growth hormone membrane receptor. *Endocrinology* 1993; 132:1863-1865.
- <sup>57</sup> Alele J, Jiang J, Goldsmith JF, et al. Blockage of growth hormone receptor shedding by a metalloprotease inhibitor. *Endocrinology* 1998 139: 1927-1935.
- <sup>58</sup> Zhang Y, Jiang J, Black RA, Baumann G, Frank SJ. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: The metalloprotease TACE/ADAM-17 is critical for (PMA-induced) growth hormone receptor proteolysis and GHBP generation. *Endocrinology* 2000; 141: 4342-4348.
- <sup>59</sup> Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor- necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 1997; 385: 729-733.
- <sup>60</sup> Peschon JJ , Slack JL, Reddy P, et al. Essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 1998; 282:1281-1284.
- <sup>61</sup> Amit T, Bar-Am O, Dastot F, Yodium MBH, Amselem S, Hochberg Z. The human growth hormone (GH) receptor and its truncated isoform: sulphhydryl group inactivation in the study of receptor internalization and GH-binding protein release. *Endocrinology* 1999;140:266-272.

- 
- <sup>62</sup> Conte F, Salles JP, Raynal P, et al. Identification o a region critical for proteolysis of the human growth hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 851-857.
- <sup>63</sup> Werther GA, Haynes KM, Waters MJ. Growth hormone (GH) receptors are expressed on human fetal mesenchymal tissues-Identification of messenger ribonucleic acid an GH-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1638-1646.
- <sup>64</sup> Delahaye-Zervas MC, Mertani HC, Martini JF, Nichole-Fekete C, Morel G, Postel-Vinay MC. Growth hormone receptor gene expression in human digestive tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78: 1473-1480.
- <sup>65</sup> Mertani HC, Delahaye-Zervas MC, Martini JF, Postel-Vinay MC, Morel G. Localization of growth hormone receptor messenger RNA in human tissues. *Endocrine* 1995; 3: 135-142.
- <sup>66</sup> Baruch Y, Amit T, Hertz P, Enat, Yodium MBH, Hochberg Z. Decreased serum growth hormone-binding protein in patients with liver cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73: 777-780
- <sup>67</sup> Hattori N, Shimatsu A, Kato Y, Imura H. Growth hormone and growth hormone binding protein in human urine. *Kidney Int* 1990;37:951-954.
- <sup>68</sup> Maheshwari H, Lillioja S, Castillo CE, Mercado M, Baumann G. Growth hormone in human lymph. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3582-3584.

- 
- <sup>69</sup> Herade I, Tsulsumi O, Memoeda M et al. Comparative concentrations of growth hormone-binding protein in maternal circulation, fetal circulation, and amniotic fluid. *Endocr J* 1997;44:111-116.
- <sup>70</sup> Amit T, Dirnfeld M, Barkey RJ, et al. Growth hormone-binding protein (GH-BP) levels in follicular fluid from human preovulatory follicles: Correlation with serum GH-BP levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 33-39.
- <sup>71</sup> Mercado, Baumann G. A growth hormone/prolactin binding protein in human milk. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1637-1641.
- <sup>72</sup> Baumann G, Amburn K, Shaw MA. The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man. *Endocrinology* 1988; 122: 976-984.
- <sup>73</sup> Baumann G., Vance ML, Shaw M, Thorner M. Plasma transport of human growth hormone in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 470-473.
- <sup>74</sup> Baumann G, Shaw MA, Buchanan TA. In vivo kinetics of a covalent growth hormone-binding protein complex. *Metabolism* 1989; 38: 330-333.
- <sup>75</sup> Clark RG, Mortensen DL, Carlsson LM, al. Recombinant human growth hormone (GH)-binding protein enhances the growth-promoting activity of human GH in the rat. *Endocrinology* 1996;137:4308-4315.

- 
- <sup>76</sup> Lim L, Spencer SA, McKay P, Waters MJ. Regulation of growth hormone (GH) bioactivity by a recombinant human GH-binding protein. *Endocrinology* 1990; 127: 1287-1291.
- <sup>77</sup> Mannor DA, Shaw MA, Winer LM, Baumann G. Plasma growth hormone binding proteins: effect on growth hormone binding to receptors and on growth hormone action. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 30-34.
- <sup>78</sup> Tzanela M, Wagner C, Tannenbaum GS. Recombinant human growth hormone-binding protein fails to enhance the *in vivo* bioactivity of human growth hormone in normal rats. *Endocrinology* 1997 ;138: 5316-5324.
- <sup>79</sup> Mullis PE, Eble A, Wagner JK, Holl RW, Silbergeld A, Laron Z. Effect of different serum concentrations of growth hormone-binding protein (GHBP) on the regulation of GH receptor/GHBP gene transcription in a human hepatoma cell line. *Horm Res* 1997;47:73-80.
- <sup>80</sup> Mullis PE, Wagner JK, Eble A, Nuoffer JM, Postel-Vinay MC. Regulation of human growth hormone receptor gene transcription by human growth hormone binding protein. *Mol Cell Endocrinol* 1997 ;131:89-96.
- <sup>81</sup> Jorgensen JOL, Pedersen SB, Borglum J, Frystyk J, Ho KYH, Christiansen JS, et al. Serum concentrations of insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding proteins 1 and 3 and growth hormone binding protein in obese women and the effects of growth hormone administration: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Endocrinol* 1995; 133: 65-70.

- 
- <sup>82</sup> Postel-Vinay MC. Growth hormone receptor/binding protein-clinical implications. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996; 9: 279-283.
- <sup>83</sup> Hermansson M, Wickelgren RB, Hammarqvist F, et al. Measurement of human growth hormone receptor messenger ribonucleic acid by a quantitative polymerase chain reaction-based assay: demonstration of reduced expression after elective surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 421-428.
- <sup>84</sup> Massa GG. Regulation of growth hormone-binding protein. *Acta paediatr Suppl* 1996; 417: 102-104.
- <sup>85</sup> Harrison SM, Barnard R, Ho KY, Rajkovic I, Waters MJ. Control of growth hormone (GH) binding protein release from human hepatoma cells expressing full-length GH receptor. *Endocrinology* 1995; 136:651-659.
- <sup>86</sup> Massa G, Zegher F, Vanderschueren-Lodeweyckx M. Serum growth hormone-binding proteins in the human fetus and infant. *Pediatr Res* 1992;32:69-72.
- <sup>87</sup> Silbergeld A, Lazar L, Erster B, Keret R, Tepper R, Laron Z. Serum growth hormone binding protein activity in healthy neonates, children and young adults: correlation with age, height and weight. *Clin Endocrinol* 1989;31:295-303.
- <sup>88</sup> Baumann G, Shaw MA, Amburn K. Circulating growth hormone binding proteins. *J Endocrinol Invest* 1994; 17: 67-81.

- 
- <sup>89</sup> Mercado M, Carlsson L, Vitangcol R, Baumann G. Growth hormone-binding protein determination in plasma: A comparison of immunofunctional and growth hormone-binding assays. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1291-1294.
- <sup>90</sup> Maheswari H, Sherma L, Baumann G. Decline of plasma growth hormone binding protein in old age. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:995-997.
- <sup>91</sup> Daughaday WH, Trivedi B, Andrews B. The ontogeny of serum GH binding protein in man: a possible indicator of hepatic GH receptor development. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:1072-1074.
- <sup>92</sup> Hattori N, Kurahachi H, Ikekubo K, et al. Effects of sex and age on serum GH binding protein levels in normal adults. *Clin Endocrinol* 1991; 35: 295-297.
- <sup>93</sup> Hochberg Z, Amit T, Zadik Z. Twenty-hour profile of plasma growth hormone binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72. 236-239.
- <sup>94</sup> Snow KJ, Shaw MA, Winer LM, Baumann G. Diurnal pattern of plasma growth hormone binding protein in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1990: 70, 417-420.
- <sup>95</sup> Carlsson L, Rosberg S, Vitangcol RV, Wong WLT, Albertsson-Wikland K. Analyses of 24-hour plasma profiles of growth hormone (GH)- binding protein, GH/GH-binding protein and GH in healthy children. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:356-361.

- 
- <sup>96</sup> Martha P, Rogol A, Carlsson LMS, Gesundheit N, Blizzard R. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. I. Serum growth hormone-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:452-457.
- <sup>97</sup> Glander L, Bjarnason R, Carlsson LMS, Albertsson-Wikland K. Growth hormone-binding protein levels over one year in healthy prepubertal children: intraindividual variation and correlation with height velocity. *Pediatr Res* 1998; 43: 256-261.
- <sup>98</sup> Golden NH, Kreitzer P, Jacobson MS et al. Disturbances in growth hormone secretion and action in adolescents with anorexia nervosa. *J Pediatr* 1994;125:655-660.
- <sup>99</sup> Counts D, Gwirstman H, Carlsson L, Lesem M, Cutler G. The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:762-767.
- <sup>100</sup> Hochberg Z, Hertz P, Colin V, et al. The distal axis of growth hormone (GH) in nutritional disorders: GH-binding protein, insulin-like growth factor-I (IGF-I), and IGF-I receptors in obesity and anorexia nervosa. *Metabolism* 1992;41:106-112.
- <sup>101</sup> Postel-Vinay MC, Saab C, Gourmelen M. Nutritional status and growth hormone-binding protein. *Horm Res* 1995;44:177-181.

- 
- <sup>102</sup> Rasmussen MH, Ho KYK, Kjems L, Hilsted J. Serum growth hormone-binding protein in obesity: Effect of a short-term, very low caloric diet and diet-induced weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1519-1524.
- <sup>103</sup> Roelen CA, Koppeschaar HP, Vries WR et al. Visceral adipose tissue is associated with circulating high affinity growth hormone-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:760-764.
- <sup>104</sup> Martha PM, Rogol AD, Blizzard RM, Shaw MA, Baumann G. Growth hormone-binding protein activity is inversely related to 24-hour growth hormone release in normal boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:175-181.
- <sup>105</sup> Fisker S, Vahl N, Jørgensen JOL, Christiansen JS, Ørskov H. Abdominal fat determines growth hormone-binding protein levels in healthy nonobese adults. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 123-128.
- <sup>106</sup> Hochberg Z, Barkey RJ, Even L, Peleg I, Youdim MB, Amit T. The effect of human growth hormone therapy on GH binding protein in GH-deficient children. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;125:23-27
- <sup>107</sup> Martha PM, Reiter EO, Davila 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;75:1464-1469.
- <sup>108</sup> Davila N, Alcaniz J, Salto L, Estrada J, Barcelo B, Baumann G. Serum growth hormone-binding protein is unchanged in adult panhypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1347-1350.

- 
- <sup>109</sup> Postel-Vinay MC, Tar T, Hocquette F, et al: Human plasma growth hormone (GH)-binding proteins are regulated by GH and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:197-202.
- <sup>110</sup> Leger J, Noel M, Czernichow, Postel-Vinay MC. Progressive normalization of growth hormone-binding protein and IGF-I levels in treated growth hormone-deficient children. *Pediatr Res* 1995;37:731-735.
- <sup>111</sup> Tauber M, De Bouet Du Portal H, Sallerin-Caute B, Rochiccioli P, Bastide R. Differential regulation of serum growth hormone (GH)-binding protein during continuous infusion *versus* daily injection of recombinant human GH in GH-deficient children. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1135-1139.
- <sup>112</sup> Roelen CA, Koppeschaar HP, de Vries WR et al. High-affinity growth hormone binding protein, insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 in adults with growth hormone deficiency. *Eur J Endocrinol* 1996;135:82-86.
- <sup>113</sup> Fisker S, Vahl N, Hansen TB, et al Growth hormone (GH) substitution for one year normalizes elevated GH-binding protein levels in GH-deficient adults secondary to a reduction in body fat. A placebo-controlled trial. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8:105-112.
- <sup>114</sup> Florkowski CM, Barnard R, Livesey JH, Veveris T, Espiner EA, Donald RA. Growth hormone binding protein correlates strongly with leptin and percentage body fat in GH-deficient adults, increased by GH replacement but does not predict IGF-I response. *Growth Horm IGF Res* 1999; 9:35-40.

- 
- <sup>115</sup> Roelen CA, Koppeschaar HP, de Vries WR et al. High-affinity growth hormone (GH)-binding protein (GHBP), body fat mass, and insulin-like growth factor-binding protein-3 predict the GHBP response to GH therapy in adult GH deficiency syndrome. *Metabolism* 1999; 48: 314-318.
- <sup>116</sup> Kratzsch J, Blum WF, Ventz M, Selisko T, Birkenmeyer G, Keller E. Growth hormone binding protein-related immunoreactivity in the serum patients with acromegaly is regulated inversely by growth hormone concentration. *Eur J Endocrinol* 1995;132:306-312.
- <sup>117</sup> Roelen CA, Donker GH, Thijssen JH, Koppeschar HP, Blankestijn MA. High affinity growth hormone binding protein in plasma of patients with acromegaly and the effect of octreotide treatment. *Clin Endocrinol* 1992; 37: 373-378.
- <sup>118</sup> Amit T, Ish-Shalom S, Glaser B, Yodanis MB, Hochberg Z. Growth hormone-binding protein in patients with acromegaly. *Horm Res* 1992; 37: 205-211.
- <sup>119</sup> Fisker S, Kaal A, Montini M, Pedroncelli A, Pagani G, Orskov H. Growth hormone binding protein and growth hormone availability in acromegalic patients treated with long-acting octreotide (Sandostatin-LAR). *Eur J Endocr* 1997; 136: 61-66.
- <sup>120</sup> Ho KY, Valiontis E, Waters M, Rajkovic I. Regulation of growth hormone binding protein in man: Comparison of gel chromatography and immunoprecipitation methods. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:302-308.

- 
- <sup>121</sup> Rajkovic I, Valiontis E, Ho KY . Direct quantification of growth hormone binding protein in human serum by a ligand immunofunctional assay: Comparison with immunoprecipitation and chromatographic methods. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:772-777.
- <sup>122</sup> Juul A, Fisker S, Scheike T, et al. Serum levels of growth hormone binding protein in children with normal and precocious puberty: relation to age, gender, body composition and gonadal steroids. *Clin Endocrinol* 2000; 52: 165-172.
- <sup>123</sup> Massa G, Bouillon R, Vanderschueren-Lodeweyckx M. Serum levels of growth hormone-binding protein and insulin-like growth factor-I during puberty. *Clin Endocrinol* 1992;37:175-180.
- <sup>124</sup> Argente J, Barrios V, Pozo J, et al. Normative data for insulin-like growth factors (IGFs) , IGF-binding proteins, and growth hormone-binding protein in a healthy Spanish pediatric population: age- and sex-related changes. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1522-1528.
- <sup>125</sup> DiMartini-Nardi J, Wu R, Varner R, Wong WLT, Saenger P. The effect of luteinizing hormone-releasing hormone analog for central precocious puberty on growth hormone (GH) an GH-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 664-668.
- <sup>126</sup> Eshet R, Silbergeld A, Kauli R, Lazar L, Laron Z. GH and GHBP activity and not IGF-I and its receptor activity express growth velocity reduction during treatment of central precocious puberty by a superactive GnRH analogue. *Isr J Med Sci* 1994; 30: 592-595.

- 
- <sup>127</sup> Ip T-P, Hoffman DM, O'Sullivan AJ, Leung K-C, Ho KKY. Do androgens regulate growth hormone-binding protein in adult man? *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1278-1282.
- <sup>128</sup> Massa G, Igout A, Rombauts L, Frankenne F, Vanderschueren-Lodeweyckx M. Effect of oestrogen status on serum levels of growth hormone-binding protein and insulin-like growth factor I in non-pregnant and pregnant women. *Clin Endocrinol* 1993; 39: 569-575.
- <sup>129</sup> Bondanelli M, Margutti, Ambrosio MR, et al . Blood growth hormone-binding protein levels in premenopausal and postmenopausal women: Roles of body weight and estrogen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1973-1980.
- <sup>130</sup> Weissberger AJ, Ho KKY, Lazarus L. Contrasting effects of oral and transdermal routes of estrogen replacement therapy on 24-hour growth hormone (GH) secretion, insulin-like growth factor I and GH-binding protein in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 374-381.
- <sup>131</sup> Massa G, Bouillon R, Vanderschueren-Lodeweyckx M. Serum growth hormone-binding protein and insulin-like growth factor I levels in Turner syndrome before and during treatment with recombinant human growth and ethinyl-oestradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1298-1302
- <sup>132</sup> Kelly J, Rajkovic I, O'Sullivan A, Sernia C, Ho KY. Effects of different oral estrogen formulations on insulin-like growth factor-I, growth hormone and

---

growth hormone binding protein in post-menopausal women. *Clin Endocrinol* 1993;39:561-567.

<sup>133</sup> Smith WC, Talamantes F. Gestational profile and affinity cross-linking of the mouse serum growth hormone-binding protein. *Endocrinology* 1988; 123: 1489-1494.

<sup>134</sup> Amit T, Hertz P, Ish-Shalom S, et al. Effects of hypo or hyper-thyroidism on growth hormone-binding protein. *Clin Endocrinol* 1991; 35: 159-162.

<sup>135</sup> Miell JP, Taylor AM, Zini M, Maheshwari HG, Ross RJM, Valcavi R. Effect of hypothyroidism on insulin-like growth factors (IGFs) and growth hormone- and IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 950-955.

<sup>136</sup> Mullis PE, Eble A, Marti U, Burgi U, Postel-Vinay MC. Regulation of human growth hormone receptor gene transcription by triiodothyronine (T<sub>3</sub>). *Mol Cell Endocrinol* 1999; 147: 17-25.

<sup>137</sup> Massa G, Bouillon R, Vanderschueren-Lodeweyckx M. Serum levels of growth hormone-binding protein and insulin-like growth factor I in children and adolescents with type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 239-243.

<sup>138</sup> Bereket A, Lang CH, Blethen SL, et al. Effect of insulin on the Insulin-like growth factor system in children with new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1312-1317.

- 
- <sup>139</sup> Menon R, Arslanian S, May B, Cutfield W, Sperling M. Diminished growth hormone-binding protein in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:934-938.
- <sup>140</sup> Nam SY, Kim KR, Song YD, Lim SK, Lee HC, Huh KB. GH-binding protein in obese men with varying glucose tolerance: relationship to body fat distribution, insulin secretion and GH-IGF-I axis. *Eur J Endocrinol* 1999; 140:159-163.
- <sup>141</sup> Hoffman RP, Vicini P, Sivitz WI, Cobelli C. Pubertal adolescent male-female differences in insulin sensitivity and glucose effectiveness determined by the one compartment minimal model. *Pediatr Res* 2000;48: 384-388.
- <sup>142</sup> Fernandez-Real JM, Granada ML, Ruzafa A, Casamitjana R, Ricart W. Insulin sensitivity and secretion influence the relationship between growth hormone-binding protein and leptin. *Clin Endocrinol* 2000; 52: 159-164.
- <sup>143</sup> Laron Z, Blum WF, Chatelain PG, et al. Classification of growth hormone insensitivity syndrome. *J Pediatr* 1993; 122-141.
- <sup>144</sup> Rosenfeld RG, Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J. Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocrine Rev* 1994; 15:369-391.
- <sup>145</sup> Laron Z, Pertzalan A, Manheimer S. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone, a new inborn error of metabolism? *Isr J Med Sci* 1966; 2: 152-155.

- 
- <sup>146</sup> Laron Z, Klinger B. Laron syndrome: clinical features, molecular pathology and treatment. *Horm Res* 1994; 42: 198-202.
- <sup>147</sup> Guevara-Aguirre J, Rosenbloom AL, Fielder PJ, Diamond Jr FB, Rosenfeld RG. Growth hormone receptor deficiency in Ecuador: clinical and biochemical phenotype in two populations. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 417-423.
- <sup>148</sup> Savage MO, Blum WF, Ranke MB, et al. Clinical features and endocrine status in patients with growth hormone insensitivity (Laron syndrome). *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1465-1471.
- <sup>149</sup> Woods KA, Dastot F, Preece MA, et al. Phenotype: Genotype relationships in growth hormone insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3529-3535.
- <sup>150</sup> Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, et al. Characterization of the human growth receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:8083-8087.
- <sup>151</sup> Anselem S, Duquesnoy P, Atree et al. Laron dwarfism and mutations for the growth hormone receptor. *New Engl J Med* 1989; 31:989-995.
- <sup>152</sup> Duquesnoy P, Sobrier M, Duriez B, Dastot F, Buchanan C, Savage M. A single amino acid substitution in the extracellular domain of the human growth hormone (GH) receptor confers familial GH resistance (Laron

---

Syndrome) with positive GH-binding activity by abolishing receptor homodimerization. *EMBO J* 1994; 13: 1386-1395.

<sup>153</sup> Buchanan CR, Maheshwari HG, Norman MR, Morell DJ, Preece MA. Laron-type dwarfism with apparently normal high affinity serum growth hormone-binding protein. *Clin Endocrinol* 1991;35:179-185.

<sup>154</sup> Woods KA, Fraser NC, Postel-Vinay MC, Savage MO, Clark AJL. A homozygous splice site mutation affecting the intracellular domain of the growth hormone receptor resulting in Laron syndrome with elevated growth hormone binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1686-1690

<sup>155</sup> Silbergeld A, Dastot F, Klinger B, et al. Intronic mutation in the growth hormone (GH) receptor gene from a girl with Laron syndrome and extremely high serum GH binding protein: extended phenotypic study in a very large pedigree. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1997; 10: 265-274.

<sup>156</sup> Ayling RM, Ross R, Towner P, et al. A dominant-negative mutation of the growth hormone receptor causes familial short stature. *Nat Genet* 1997;16:13-14.

<sup>157</sup> Iida K, Takahashi Y, Kaji H, et al. Growth hormone (GH) insensitivity syndrome with high serum GH-binding protein levels caused by a heterozygous splice site mutation of the GH receptor gene producing a lack of intracellular domain. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 531-537.

- 
- <sup>158</sup> Mercado M, Baumann G. Growth hormone-binding proteins. *The Endocrinologist* 1993; 3: 268-277.
- <sup>159</sup> Baumann G, Shaw MA, Merime TJ. Low levels of high-affinity growth hormone-binding protein in African pygmies. *N Engl J Med* 1989; 320: 1705-1709.
- <sup>160</sup> Merimee TJ, Baumann G, Daughaday WH. Growth hormone binding proteins: studies in pygmies and normal statured subjects II. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:1183-1188.
- <sup>161</sup> Baumann G, Shaw MA, Brumbaugh RC, Schwartz J: Short stature and decreased serum growth hormone-binding protein in the Mountain Ok people of Papua New Guinea. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 1346-1349.
- <sup>162</sup> Davila N, Shea BT, Omoto K, Mercado M, Misawa S, Baumann G. Growth hormone binding protein, insuline-like growth factor-I and short stature in two pygmie populations from the Philippines. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002; 15:269-276.
- <sup>163</sup> Clavano-Harding AB, Ambler GR, Cowell CT, et al. Initial characterization of GH-IGF-I axis and nutritional status of the Ati Negritos of the Philipines. *Clin Endocrinol* 1999; 51: 741-747.
- <sup>164</sup> Goddard AD, Covello R, Louh SM, et al. Mutations of the growth hormone receptor in children with idiopathic short stature. *N Engl J Med* 1995;333:1093-8.

- 
- <sup>165</sup> Fontoura M, Mugnier E, Brauner R, Rappaport R, Postel-Vinay MC. Effect of growth hormone on the low level of growth hormone binding protein idiopathic short stature. *Clin Endocrinol* 1992;37:249-53.
- <sup>166</sup> Carlsson LMS, Attie KM, Compton PG, Vitangcol RV, Merimee TJ, and the National Cooperative Growth Study. Reduced concentration of serum growth hormone-binding protein in children with idiopathic short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1325-30.
- <sup>167</sup> Mauras N, Carlsson LMS, Murphy S, Merimee TJ. Growth hormone-binding protein levels: Studies of children with short stature. *Metabolism* 1994;43:357-59.
- <sup>168</sup> Attie KM, Carlsson LMS, Rundle AC, Sherman BM. Evidence for partial growth hormone insensitivity among patients with idiopathic short stature. *J Pediatr* 1995;127:244-50.
- <sup>169</sup> Burren CP, Woods KA, Rose SJ, Tauber M, Price D, Heinrich U, et al. Clinical and endocrine characteristics in atypical and classical growth hormone insensitivity syndrome. *Horm Res* 2001; 55: 125-130.
- <sup>170</sup> Savage MO, Carlsson LMS, Chatelain PG, Ranke MB, Rosenfeld RG. Growth hormone insensitivity syndromes. *Acta Paediatr* 1995; Suppl 411:87-90.

- 
- <sup>171</sup> Ross RJ, Miell JP, Holly JM, et al. Levels of GH binding activity, IGFBP-1, insulin, blood glucose and cortisol in intensive care patients. *Clin endocrinol* 1991; 35: 361-367.
- <sup>172</sup> Balcells J, Moreno A, Audi L, Roqueta J, Iglesias J, Carrascosa A. Growth hormone/insulin like- growth factors axis in children undergoing cardiac surgery. *Crit Care Med* 2001; 29: 1234-1238.
- <sup>173</sup> Baruch Y, Amit T, Hertz P, Enat R, Yodium M, Hochberg Z. Decreased serum growth hormone-binding protein in patients with liver cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 777-780.
- <sup>174</sup> Shen XY, Holt RG, Miell JP et al. Cirrhotic liver expresses low levels of the full-length and truncated growth hormone receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2532-2538.
- <sup>175</sup> Donaghy AJ, Delhanty PJ, Ho KK, Williams R, Baxter RC. Regulation of growth hormone receptor/binding protein, insulin-like growth factor ternary complex system in human cirrhosis. *J Hepatol* 2002; 36: 751-758.
- <sup>176</sup> Postel- Vinay MC, Tar A, Crosnier H, et al. Growth hormone binding protein activity is low in uremic children. *Pediatr Nephrol* 1991; 5: 245-547.
- <sup>177</sup> Tönshoff B, Cronin MJ, Reichert M, et al. Reduced concentrations of serum growth hormone (GH)-binding protein in children with chronic renal failure: correlation with GH-insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:1007-1013.

- 
- <sup>178</sup> Lieberman SA, Butterfield GE, Harrison D, Hoffman AR. Anabolic effects of recombinant insulin-growth factor-I in cachectic patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78: 404-410.
- <sup>179</sup> Bentham J, Rodriguez-Arno J, Ross RJ. Acquired growth hormone resistance in patients with hypercatabolism. *Horm Res* 1993; 40: 87-91.
- <sup>180</sup> Jenkins RC, Ross RJ. Acquired growth hormone resistance in catabolic states. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996;10: 411-419.
- <sup>181</sup> Baumann G, Mercado M. Growth hormone-binding proteins in plasma. *Nutrition* 1993;9: 546-553.
- <sup>182</sup> Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the Insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 1994;15: 80-101.
- <sup>183</sup> Carlsson LMS, Mercado M, Baumann G, et al. Assays systems for the growth hormone binding protein. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;206:312-315.
- <sup>184</sup> Roelen CAM, Donker GH, Thijssen JHH, Blanckenstein MA. A method for measuring the binding affinity and capacity of growth hormone binding protein in human serum using FPLC to separate bound and free ligand. *J Liquid Chromatog* 1992;15:1259-1263.
- <sup>185</sup> Baumann G, Shaw MA, Amburn K. A rapid and simple assay for growth hormone-binding protein activity in human plasma. *Acta Endocrinol* 1988; 119: 529-535.

- 
- <sup>186</sup> Carlsson LMS, Rowland AM, Clark RG, Gesundheit N, Wong WLT. Ligand-mediated immunofunctional assay for quantitation of growth hormone-binding protein in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1216-1223.
- <sup>187</sup> Fisker S, Frysty J, Skriver L, Vestbo E, Ho KY, Orskov H. A simple, rapid immunometric assay for determination of functional and growth hormone-occupied growth hormone-binding protein in human serum. *Eur J Clin Invest* 1996;26:779-785.
- <sup>188</sup> Kratzsch J, Schreiber G, Selisko T, Keller E, Pflaum CD, Strasburger CJ. Measurement of serum exon 3-retaining growth hormone-binding protein in children and adolescents by radioimmunoassay. *Horm Res* 1997; 48: 252-257.
- <sup>189</sup> Ho KY, Valiontis E, Waters M, Rajkovic I. Regulation of Growth hormone binding protein in man: Comparison of gel chromatography and immunoprecipitation methods. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:302-308.
- <sup>190</sup> Shalet SM, Toogood A, Rahim A, Brennan BM. The diagnosis of growth hormone deficiency in children and adults. *Endocr Rev* 1998; 19:203-223.
- <sup>191</sup> Rosenfeld RG, Albertson-Wikland K, Cassorla F, et al. Diagnostic controversy: the diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1532-1540.

- 
- <sup>192</sup> Zadik Z, Chalew SA, Raiti S, Kowarski AA. Do short children secrete insufficient growth hormone? *Pediatrics* 1985; 76:355-360.
- <sup>193</sup> Spiliotis BE, August GP, Hung W et al. Growth hormone neurosecretory dysfunction: a treatable cause of short stature. *JAMA* 1984; 251: 2223-2230.
- <sup>194</sup> Albertson-Wikland K, Rosberg S. Analysis of 24-hour growth hormone profiles in children: relation to growth. *J Clin Endocrin Metab* 1988; 67:493-500.
- <sup>195</sup> Kerrigan JR, Martha PM, Blizzard RM, Christie CM, Rogol AD. Variations of pulsatile growth hormone release in healthy short prepubertal boys. *Pediatr Res* 1990; 28:11-14.
- <sup>196</sup> Johnston LB, Savage MO. Partial growth hormone insensitivity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999; 12: Suppl 1: 251-257.
- <sup>197</sup> Goddard AD, Dowd P, Chernausk S, et al. Partial growth-hormone insensitivity: the role of growth-hormone receptor mutations in idiopathic short stature. *J Pediatr* 1997; 131:s51-55
- <sup>198</sup> Horikawa R, Tanaka T, Kokai Y, et al. Growth hormone-binding protein measurements in normal children and children with short stature using ligand-mediated immunofunctional assay. *Clin Pediatr Endocrinol* 1994;3:35-43.
- <sup>199</sup> Attie KM, Julius JR, Stoppani C, Rundle AC for the National Cooperative Growth Study. National Cooperative Growth Study substudy VI: The clinical

---

utility of growth-hormone-binding protein, insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 3 measurements. *J Pediatrics* 1997; 131 :s56-s60.

<sup>200</sup> Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-432.

<sup>201</sup> Considine R, Sinha M, Heiman et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334:292-295.

<sup>202</sup> Chen H, Charlat O, Tartaglia L, et al. Evidence that the diabetes gene is the leptin receptor- identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84: 491-495.

<sup>203</sup> Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996; 45:1455-1462.

<sup>204</sup> Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 1996; 98:1277-1282.

<sup>205</sup> Liu C, Liu Xj, Barry G, Ling N, Maki RA, Souza EB. Expression and characterization of a putative high affinity human soluble leptin receptor. *Endocrinology* 1997;138:3548-3554.

- 
- <sup>206</sup> Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 6093-6096.
- <sup>207</sup> Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes* 1996; 45:1638-1643.
- <sup>208</sup> Barash IA, Cheung CC, Weigle DS et al. Leptin is a signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137: 3144-3147.
- <sup>209</sup> Carro E, Señaris R, Consodine RV, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of *in vivo* growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 1997; 138: 2203-2206.
- <sup>210</sup> Rosebaum M, Nicolson M, Hirsh J et al. Effects of gender, body composition and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3424-3427.
- <sup>211</sup> Ostlund RE, Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3909-3913.
- <sup>212</sup> Nagy TR, Gower BA, Trowbrige CA, Schewchuck RM, Goran MI. Effects of gender, ethnicity, body composition, and fat distribution on serum leptin concentrations in children. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2148-2152.
- <sup>213</sup> Grinspoon S, Gulick, Askari H et al. Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 3861-3863.

- 
- <sup>214</sup> Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K et al. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6386-6390.
- <sup>215</sup> Remesar X, Rafecas I, Fernández-López JA, et al. Is leptin an insulin counter-regulatory hormone? *FEBS Lett* 1997; 402: 9-11.
- <sup>216</sup> Bjarnason R, Boguszawski M, Dahlgren J et al. Leptin levels are strongly correlated with those of GH-binding protein in prepubertal children. *Eur J Endocrinol* 1997; 137: 68-73.
- <sup>217</sup> Kratzsch J, Dehmel B, Pulzer F et al. Increased serum GHBP in obese pubertal children and adolescents: relationship to body composition, leptin and indicators of metabolic disturbances. *Int J Obes* 1997; 21:1130-1136.
- <sup>218</sup> Deuschle M, Blum WF, Englaro P, et al. Plasma leptin in depressed patients and healthy controls. *Horm Metab Res* 1996; 28: 714-717.
- <sup>219</sup> Fisker S, Vahl N, Hansen TB, et al. Serum leptin is increased on growth hormone-deficient adults: relationship to body composition and effects of placebo-controlled growth hormone therapy for 1 year. *Metabolism* 1997; 46:812-817.