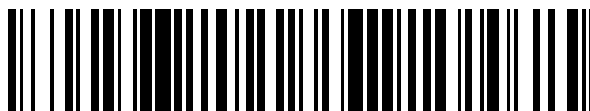


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 348**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/27 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2011** **PCT/US2011/022052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011** **WO11139391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2011** **E 11777722 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2563398**

54 Título: **Déficit de receptores de la hormona del crecimiento como causa de una reducción significativa de la señalización pro-envejecimiento, del cáncer y de la diabetes**

30 Prioridad:

28.04.2010 US 328812 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(100.0%)
USC Stevens Hughes Center Suite EEB 131 3740
McClintock Ave.
Los Angeles, CA 90089-2561, US**

72 Inventor/es:

**LONGO, VALTER D. y
GUEVARA, JAIME**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 632 348 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Déficit de receptores de la hormona del crecimiento como causa de una reducción significativa de la señalización pro-envejecimiento, del cáncer y de la diabetes

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a métodos para reducir los efectos nocivos del envejecimiento, el daño oxidativo y la quimioterapia en un sujeto y prevenir y/o aliviar un síntoma de enfermedades relacionadas con la edad.

2. Antecedentes de la técnica

CHANGHAN LEE ET AL Cancer Research, vol. 70, N.º 4,15 de febrero de 2010 (2010-02-15), páginas 1564-1572, demuestran el uso de un anticuerpo dirigido contra un receptor de IGF-1 en quimioterapia en un sujeto. También mide el nivel de IGF-1 en el sujeto después de la inyección del anticuerpo y ciclofosfamida (la ciclofosfamida se usa para tratar cánceres y trastornos autoinmunitarios). La reducción de la actividad de la hormona del crecimiento (GH) y de la señalización del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) o de sus ortólogos en organismos inferiores, y la activación de los factores de la transcripción de resistencia al estrés y enzimas antioxidantes contribuyen a prolongar la vida útil y la protección contra daños o enfermedades dependientes de la edad (1-15). Las vías que normalmente regulan el crecimiento y el metabolismo también promueven el envejecimiento y la inestabilidad genómica, una correspondencia que se conserva en eucariotas y mamíferos simples (7, 16-18). En levaduras, las mutaciones que prolongan el período de vida en genes tales como *SCH9*, el homólogo del S6K de mamíferos, protegen contra la inestabilidad genómica dependiente de la edad (19, 20). De forma similar, las mutaciones en la vía de señalización de la insulina/IGF-1 aumentan el período de vida y reducen el crecimiento celular anormal en los gusanos y los ratones deficientes en GH e IGF-1 no solo tienen una vida larga, sino que también presentan un retraso en la ocurrencia de mutaciones y enfermedad neoplásica dependientes de la edad (5, 6, 21-25). Entre las mutaciones más frecuentemente detectadas en los cánceres humanos están las que activan las dos principales proteínas de señalización de fases posteriores del receptor IGF-1: Ras y Akt, y las del propio receptor IGF-1 (26, 27). Esto concuerda con un papel potencial de la vía de señalización del IGF-1 en la promoción de mutaciones dependientes de la edad que conducen a la tumorigénesis y a proto-oncogenes mutados que exacerban la generación de mutaciones (28). Se ha propuesto que las funciones promotoras del crecimiento y anti-apoptóticas de la vía del IGF-1 son las que subyacen a su supuesto papel en el desarrollo y progresión del cáncer (29). Sin embargo, esta relación no está respaldada por estudios poblacionales en humanos, lo que sugiere solo una modesta asociación entre altas concentraciones de IGF-1 y un mayor riesgo de ciertos cánceres (29, 30). La GH también puede promover la resistencia a la insulina. Por ejemplo, la resistencia a la insulina dependiente de la edad se reduce en ratones deficientes en GH (31-34) y la terapia de sustitución de GH puede exacerbar la resistencia a la insulina en individuos deficientes en GH (35, 36), aparentemente porque causa un cambio del metabolismo de la glucosa a la lipólisis (37).

Aunque se conoce la ventaja de inducir bajos niveles de GH y/o IGF-1 en un sujeto en el tratamiento de varias dolencias tales como la acromegalia, la extensión de los beneficios de modificar los niveles de GH y/o IGF-1 en un sujeto requiere un desarrollo más detallado. Por consiguiente, existe la necesidad de métodos adicionales para aliviar los síntomas de la enfermedad utilizando la modificación de la GH y del IGF-1

SUMARIO DE LA INVENCION

Frente a este antecedente de la técnica anterior, la presente divulgación describe en al menos una realización un método para inhibir el desarrollo de un síntoma de envejecimiento en un sujeto. El método comprende identificar un sujeto que no sufre acromegalia de menos de 70 años de edad con niveles de IGF-1 en el cuartil más alto de una población y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto de modo que los niveles de IGF-1 se reduzcan al nivel medio para esa población. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto.

La presente invención proporciona una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 para uso en un método para reducir los efectos secundarios de quimioterapia en un sujeto como se establece en las reivindicaciones. El método comprende identificar un sujeto sometido a quimioterapia y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto. Generalmente, se controlarán los síntomas relacionados con la quimioterapia y los niveles de IGF-1 en el sujeto.

La presente divulgación describe un método para aliviar un síntoma de daño oxidativo en un sujeto. El método comprende identificar un sujeto con un nivel de IGF-1 en la mitad superior de los niveles normales de IGF-1 en cuanto a edad y sexo en comparación con la población general (excluyendo a los sujetos diagnosticados con acromegalia) y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del

eje GH/IGF-1 al sujeto con el fin de que los niveles disminuyan por debajo del nivel medio. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto.

En otra realización, la presente divulgación describe un método para inhibir el desarrollo de un síntoma de envejecimiento. El método comprende identificar un sujeto con un nivel de IGF-1 en la mitad superior de los niveles normales de IGF-1 en cuanto a edad y sexo en comparación con la población general (por ejemplo, excluyendo a los sujetos diagnosticados con acromegalia) y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto con el fin de que los niveles disminuyan por debajo del nivel medio. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto.

En otra realización, la presente divulgación describe un método para inhibir el desarrollo de un síntoma de cáncer o el riesgo de desarrollar cáncer en un sujeto. El método comprende identificar un sujeto con un nivel de IGF-1 en la mitad superior de los niveles normales de IGF-1 en cuanto a edad y sexo en comparación con el promedio de la población general (por ejemplo, excluyendo a los sujetos diagnosticados con acromegalia) y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto con el fin de que los niveles disminuyan por debajo del nivel medio. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto.

En otra realización, la presente divulgación describe un método para inhibir el desarrollo de un síntoma de diabetes en un sujeto. El método comprende identificar un sujeto con un nivel de IGF-1 en la mitad superior de los niveles normales de IGF-1 en cuanto a edad y sexo en comparación con el promedio de la población general (por ejemplo, excluyendo a los sujetos diagnosticados con acromegalia) y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto con el fin de que los niveles disminuyan por debajo del nivel medio. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto.

En otra realización más, la presente divulgación describe un método para reducir el daño oxidativo en diversas células eucariotas. El método comprende identificar una célula eucariota predispuesta al daño oxidativo y administrar después una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto.

Algunas de las ventajas de varias realizaciones de la invención en seres humanos se ensayaron haciendo un seguimiento durante 22 años de 99 sujetos ecuatorianos con mutaciones en el gen del receptor de la hormona del crecimiento que conduce a GHRD (déficit de receptores de la hormona del crecimiento) y a un déficit significativo de IGF-1. Esta información se combinó con encuestas para identificar la causa y la edad de muerte de los sujetos con GHRD que murieron antes de este período. Sorprendentemente, entre los individuos con GHRD solo hubo un caso de malignidad no letal y ningún caso de diabetes, frente a la incidencia esperada de estas enfermedades en sus parientes de edad coincidente. Como se expone a continuación, una posible explicación de la bajísima incidencia de cáncer proviene de estudios in vitro que revelaron un efecto del suero de sujetos con GHRD tanto en la reducción de las roturas de ADN como en el aumento de la apoptosis de las células epiteliales mamarias humanas primarias (HMEC) expuestas a peróxido de hidrógeno. Se observa una reducción de las concentraciones de insulina (1,4 μ U/ml frente a 4,4 μ U/ml) y un índice muy bajo en el modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) (0,33 frente a 0,95) en individuos con GHRD, lo que indica una mayor sensibilidad a la insulina, lo que podría explicar la ausencia de diabetes en estos sujetos. La incubación de HMEC (células epiteliales mamarias) con suero de GHRD también provocó una reducción de la expresión de Ras, PKA y TOR y la regulación positiva de SOD2, cambios implicados en la protección celular y la extensión del período de vida en organismos modelo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 proporciona datos de la cohorte de GHRD ecuatoriana utilizada en parte del estudio que se expone a continuación: (A) Distribución por edades de 90 sujetos ecuatorianos con GHRD y la población general ecuatoriana. (B) Genotipos de la cohorte ecuatoriana con GHRD. Todos los sujetos con GHRD fueron identificados en base a la baja estatura y niveles muy bajos de IGF-1. Un individuo con el fenotipo GHRD es heterocigótico para la mutación E180. El término "indeterminado" se refiere a sujetos cuyos genotipos no han sido confirmados. (C) Supervivencia de la cohorte GHRD. (D, E) Causa de la muerte (D) y porcentaje de cánceres por grupo de edad (E) en sujetos de control y con GHRD. (F) Porcentaje de cáncer y diabetes tipo II en sujetos control y con GHRD. Los datos se muestran como un porcentaje de todas las enfermedades diagnosticadas/descritas. [^], 1 caso de cáncer y [#], no se ha registrado ningún caso de diabetes. (G) Prevalencia de obesidad y prevalencia de diabetes tipo II en Ecuador y en la cohorte GHRD. [#], no se ha registrado ningún caso de diabetes. La prevalencia de la obesidad en Ecuador se basa en los informes de la OMS (48), mientras que para los sujetos con GHRD se calculó sobre la base de IMC > 30 kg/m². La prevalencia de la diabetes tipo II en Ecuador se obtuvo del estudio de Shaw S.E. et al (49). (H, I) Niveles séricos de insulina en ayunas (H) y el índice del modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) (I) en parientes y sujetos con GHRD. Los datos representan la media $\pm$ EEM para 13 muestras de control y 16 de GHRD, * p < 0,05.

La FIGURA 2 proporciona datos que muestran que la señalización reducida de IGF-1 protege contra el daño del ADN y favorece la apoptosis de células dañadas: (A) Micrografías representativas del daño del ADN en células

epiteliales tratadas con H₂O₂ durante 1 hora o 24 horas. (B, C) Momento de la cola Olive para medir roturas de ADN en células epiteliales tratadas con H₂O₂ durante 1 hora (B) o 24 horas (C). Los datos representan la media $\pm$ EEM. Se analizaron al menos 6 muestras de suero por grupo y se analizaron 100 - 200 células por muestra. (D) Actividad LDH en células epiteliales incubadas con suero de control o suero GHRD y tratadas con H₂O₂ durante 24 horas. Los datos representan la media $\pm$ EEM. Se ensayaron 6 muestras de suero por grupo por triplicado. (E) Activación de caspasas en células epiteliales incubadas con suero control o suero GHRD y tratadas con H₂O₂ durante 6 horas. Los datos se calculan como porcentaje del control no tratado y representan la media $\pm$ EEM. Se ensayaron 6 muestras de suero por grupo. (F) Momento de la cola Olive para medir el daño basal del ADN en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) R+ (sobrexpresión de IGF-1R) o R- (déficit de IGF-1R). Los datos representan la media $\pm$ EEM. (G) Transferencia Western representativa que muestra el estado de fosforilación de Akt (Ser 473) y FoxO1 (Ser 256) en células R+ y R-. (H) Actividad de FoxO en células R+ y R- transfectadas con un plásmido indicador de luciferasa. (I) Lista de genes diana de FoxO significativamente regulados positiva en células epiteliales humanas incubadas en suero GHRD frente al suero de control, *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,0001.

La FIGURA 3 proporciona datos que muestran los efectos protectores de la señalización reducida pro-crecimiento en levaduras y mamíferos: (A) confirmación por RT-PCR de la regulación positiva de SOD2 y regulación negativa de N-Ras, PKA y TOR en células epiteliales humanas incubadas en suero GHRD. (B) Supervivencia cronológica de levaduras de tipo silvestre (WT, *Wild-Type*) y triple mutante *ras2Δ*, *sch9Δ*, *tor1Δ*. (C) Frecuencia de mutación en el tiempo en el gen *CAN1* (medido como mutantes Can^r /10⁶ células). (D) Supervivencia cronológica de levaduras WT y triple mutante *ras2Δ*, *sch9Δ*, *tor1Δ* en respuesta a estrés oxidativo inducido por H₂O₂. (E) Frecuencia de mutación en el tiempo en el gen *CAN1* (medido como mutante Can^r/10⁶ células) en respuesta a estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Los datos representan la media $\pm$ EEM, n = 5. * p <0,05, **p<0,01 en comparación con las células no tratadas WT. (F) Representación esquemática de vías de señalización del factor de crecimiento conservadas en mamíferos y levaduras;

Las FIGURAS 4A-E proporcionan un cuestionario utilizado para la recogida de datos de entrevistas. Al menos 2 miembros de la familia debían estar presentes en el momento de la entrevista. Solo se incluyeron en el estudio las causas de muerte confirmada por al menos 2 parientes. El genotipo de los sujetos con GHRD fallecidos se infirió basándose en el fenotipo clínico y la información de la genealogía proporcionada por los parientes;

La FIGURA 5 proporciona la secuencia de nucleótidos y aminoácidos (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) de la sustitución de la base E180 A por G que da como resultado un sitio de corte y empalme alternativo en el gen GHR para la cohorte GHRD ecuatoriana;

La FIGURA 6 proporciona mediciones de IGF en suero. Los niveles de IGF-1 e IGF-2 se midieron en suero de 13 parientes y 16 sujetos con GHRD por ELISA. ***p<0,0001;

La FIGURA 7 proporciona porcentajes de diferentes muertes relacionadas con cáncer en parientes no afectados de sujetos con GHRD;

La FIGURA 8 proporciona niveles de glucosa en suero en ayunas en sujetos de control y con GHRD;

La FIGURA 9 proporciona actividad LDH en fibroblastos embrionarios de ratón incubados en suero de control o GHRD y tratados con H₂O₂. **p<0,001, ***p<0,0001;

La Figura 10 proporciona una tabla que muestra una lista de genes con diferencias significativas en la expresión entre células epiteliales incubadas en suero control o GHRD;

La FIGURA 11 muestra el agrupamiento funcional de genes con diferencias significativas en la expresión entre células epiteliales incubadas en suero control o GHRD;

La FIGURA 12 proporciona una tabla que muestra genes en los cuatro grupos funcionales superiores con diferencias significativas en la expresión identificadas mediante análisis de microchips de ADN;

La FIGURA 13A proporciona un gráfico del peso corporal de ratones inmunizados con hormona del crecimiento humano (huGH) (20 machos y 20 hembras) frente al tiempo. El menor peso corporal en estos ratones indica que los ratones han generado anticuerpos inhibidores contra la GH humana;

La FIGURA 13B proporciona una imagen que muestra la actividad anti-huGH en el suero de ratones inmunizados usados para transferir la GH humano inmovilizada (transferencia de ranura); 34 de 40 ratones inmunizados con huGH mostraron una actividad fuerte;

La FIGURA 14A proporciona gráficos del peso corporal de ratones con inmunización a corto plazo (STI) con la GH humano (puntas de flecha medio rellenas) después del tratamiento con ciclofosfamida (ciclofosfamida (CP) i.p., 300 mg/kg, indicada por la punta de flecha rellena) (simulado significa tratados con tampón y no con quimioterapia);

La FIGURA 14B proporciona un histograma del hemograma completo (CBC) 7 días después del tratamiento con CP (los datos se presentan como porcentaje del valor previo a la quimioterapia);

La FIGURA 15 muestra la eficacia del antagonista del receptor de la hormona del crecimiento. Los fibroblastos de células L de ratón que expresan GHR se suspendieron en suero durante 24 horas, después se trataron con hormona del crecimiento (GH) 5 mM durante 5 minutos con o sin un pretratamiento con antagonista de la hormona del crecimiento (GHA) 50 nM durante 30 min. La señal de phospho stat5 refleja la actividad del receptor de la hormona del crecimiento;

La FIGURA 16 proporciona un gráfico de un experimento en el cual las células madre humanas de fluido amniótico fueron pretratadas con un anticuerpo inhibidor que bloquea el receptor de IGF-1 antes del tratamiento con diferentes dosis del fármaco de quimioterapia ciclofosfamida en las dosis indicadas; y

La FIGURA 17 proporciona un gráfico de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de 24 horas del tratamiento de células gliales primarias con el inhibidor de IGF-1 IGFBP1 y IGFBP1 las protege contra el daño oxidativo.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Se hará ahora referencia en detalle a composiciones, realizaciones y métodos actualmente preferidos de la presente invención, que constituyen los mejores modos de poner en práctica la invención actualmente conocida por los inventores. Las cifras no son necesariamente a escala. Sin embargo, debe entenderse que las realizaciones divulgadas son ilustrativas de la invención y que pueden realizarse en diversas formas alternativas. Por lo tanto, los detalles específicos divulgados en la presente memoria descriptiva no deben interpretarse como limitativos, sino meramente como una base representativa de cualquier aspecto de la invención y/o como una base representativa para enseñar a un experto en la técnica a emplear diversamente la presente invención.

Excepto en los ejemplos, o cuando se indique expresamente de otro modo, todas las cantidades numéricas en esta memoria descriptiva que indican cantidades de material o condiciones de reacción y/o uso deben entenderse como modificadas por la palabra “aproximadamente” al describir el alcance más amplio de la invención. Se prefiere generalmente la práctica dentro de los límites numéricos establecidos. La descripción de un grupo o clase de materiales como adecuado o preferido para un propósito dado en relación con la invención implica que las mezclas de cualquiera de dos o más de los miembros del grupo o clase son igualmente adecuadas o preferidas; la descripción de los constituyentes en términos químicos se refiere a los constituyentes en el momento de la adición a cualquier combinación especificada en la descripción y no excluye necesariamente las interacciones químicas entre los constituyentes de una mezcla una vez mezclada; la primera definición de un acrónimo u otra abreviatura se aplica a todos los usos posteriores en la presente memoria de la misma abreviatura y se aplica *mutatis mutandis* a las variaciones gramaticales normales de la abreviatura definida inicialmente; y, a menos que se indique expresamente lo contrario, la medición de una propiedad se determina por la misma técnica a la que se hace referencia anteriormente o posteriormente para la misma propiedad.

También se debe entender que esta invención no está limitada a las realizaciones y métodos específicos descritos a continuación, ya que los componentes y/o condiciones específicos pueden, por supuesto, variar. Además, la terminología utilizada en la presente memoria se utiliza solo con el propósito de describir realizaciones particulares de la presente invención y no pretende ser limitativa de ninguna manera.

También debe señalarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular “un” y “una”, “el” y “la” comprenden los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, se pretende que la referencia a un componente en singular comprenda una pluralidad de componentes.

El término “sujeto” se refiere a un ser humano o animal, incluyendo todos los mamíferos tales como primates (particularmente primates superiores), ovejas, perros, roedores (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, cabra, cerdo, gato, conejo y vaca. Un sujeto se refiere a veces aquí como un “paciente.”

El término “cáncer” se refiere a una enfermedad o trastorno caracterizado por la división incontrolada de células y la capacidad de estas células para propagarse, ya sea por crecimiento directo en tejido adyacente a través de invasión, o por implantación en sitios distantes por metástasis. Ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer primario, cáncer metastásico, carcinoma, linfoma, leucemia, sarcoma, mesotelioma, glioma, germinoma, coriocarcinoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer endometrial, cáncer de ovarios, melanoma, cáncer cerebral, cáncer testicular, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer tiroideo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de colon, cáncer de recto, mieloma, neuroblastoma, feocromocitoma y retinoblastoma.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una dosificación suficiente para reducir el nivel de IGF-1 en el sujeto. Dichas dosificaciones se pueden administrar por cualquier ruta conveniente, incluyendo, pero sin limitarse a, oral, parenteral, transdérmica, sublingual o intrarrectal.

La expresión “eje GH/IGF-1” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al sistema endocrino que regula la secreción de GH y los niveles circulantes de IGF-1. La hormona del crecimiento (GH) es secretada por células somatotróficas en el lóbulo anterior de la hipófisis. En los núcleos neurosecretores del hipotálamo, la hormona del crecimiento estimula el hígado y otros tejidos periféricos para secretar el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1). Los péptidos liberados por los núcleos neurosecretores del hipotálamo controlan la secreción de la hormona del crecimiento. Solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 20040121407 proporciona una descripción del eje GH/IGF-1.

La expresión “estrés oxidativo” se refiere a un estado biológico en el que hay una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno de tal manera que un sistema biológico es incapaz de desintoxicar eficazmente los productos intermedios reactivos o reparar el daño resultante.

5 La expresión “daño oxidativo” se refiere al daño en un tejido o compuestos biológicos (es decir, ADN) causado por estrés oxidativo.

El término “población” se refiere a un grupo de sujetos de los cuales se toman muestras para la medición estadística. Por ejemplo, una población puede ser un grupo de sujetos que se caracteriza por estar dentro de un intervalo de edad predeterminado, un grupo de todos los hombres, un grupo de todas las mujeres, el grupo de todas las personas de los Estados Unidos y similares.

En una realización de la presente divulgación se proporciona un método para inhibir el desarrollo de un síntoma de envejecimiento (por ejemplo, un síntoma de una enfermedad relacionada con la edad). El método comprende identificar un sujeto que no sufre acromegalia de menos de 70 años de edad con unos niveles de IGF-1 en el cuartil superior de una población y después administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto de modo que los niveles de IGF-1 se reduzcan hasta el nivel medio para esa población. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto.

20 La presente invención proporciona una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 para su uso en un método para aliviar un síntoma de quimioterapia en un sujeto que tiene cáncer según se establece en las reivindicaciones. Se sabe que la quimioterapia causa varios efectos secundarios nocivos, algunos de los cuales son causados por el daño oxidativo. Ejemplos de efectos secundarios incluyen pérdida de peso, pérdida de cabello, trastornos gastrointestinales, alteración de los parámetros químicos y de la composición de la sangre, inmunosupresión y similares. El método de esta realización comprende identificar un sujeto sometido a quimioterapia y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto, así como los síntomas relacionados con la quimioterapia.

30 En otra realización de la presente divulgación se proporciona un método para reducir el daño oxidativo en un sujeto. El método comprende identificar un sujeto predispuesto a daño oxidativo. Más concretamente, se identifica un sujeto con un nivel de IGF-1 en la mitad superior de los niveles normales de IGF-1 en cuanto a edad y sexo en comparación con la media de la población general (excluyendo a los sujetos diagnosticados con acromegalia) y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 con el fin de que los niveles disminuyan por debajo del nivel medio. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto, así como los síntomas relacionados con el daño oxidativo.

40 Se sabe que el daño oxidativo ocurre en diversas situaciones biológicas en las que la presente realización es útil. Por ejemplo, este daño ocurre en sujetos sometidos a quimioterapia, en sujetos predispuestos o que presentan síntomas de diabetes, en sujetos predispuestos o que presentan síntomas de ictus y en sujetos predispuestos al cáncer.

45 En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método para inhibir un síntoma de envejecimiento y/o el inicio de enfermedades relacionadas con la edad (incluyendo enfermedad de Alzheimer e ictus). El método comprende identificar un sujeto con un nivel de IGF-1 en la mitad superior de los niveles normales de IGF-1 en cuanto a edad y sexo en comparación con la media de la población general (por ejemplo, excluyendo a los sujetos diagnosticados con acromegalia) y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto con el fin de que los niveles disminuyan por debajo del nivel medio. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto.

50 En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método para inhibir el desarrollo de un síntoma de cáncer o el riesgo de cáncer en un sujeto. El método comprende identificar un sujeto con un nivel de IGF-1 en la mitad superior de los niveles normales de IGF-1 en cuanto a edad y sexo en comparación con la media de la población general (por ejemplo, excluyendo a los sujetos diagnosticados con acromegalia) y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto con el fin de que los niveles disminuyan por debajo del nivel medio. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto.

60 En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método para inhibir el desarrollo de un síntoma de diabetes o el riesgo de diabetes en un sujeto. El método comprende identificar un sujeto con un nivel de IGF-1 en la mitad superior de los niveles normales de IGF-1 en cuanto a edad y sexo en comparación con la media de la población general (por ejemplo, excluyendo a los sujetos diagnosticados con acromegalia) y a continuación administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto con el fin de que los niveles disminuyan por debajo del nivel medio. Generalmente, se controlarán los niveles de IGF-1 e insulina en el sujeto.

En otra realización más de la presente divulgación, se proporciona un método para reducir el daño oxidativo en diversas células eucariotas. El método comprende identificar una célula eucariota predispuesta a daño oxidativo y administrar a continuación una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 al sujeto.

En varias de las realizaciones expuestas anteriormente, los niveles de IGF-1 y/o GH se miden para controlar y ajustar la dosificación para el sujeto. Los niveles de IGF-1 y GH se miden por cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos usados para medir el nivel de IGH-1 en un sujeto incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayo (RIA), ELISA (por ejemplo, kits ELISA comercialmente disponibles de Diagnostic Systems Laboratory, Inc., Webster, TX), inmunoensayos quimioluminiscentes comercialmente disponible en el Nichols Institute Diagnostic, San Juan Capistrano, CA).

Como se ha expuesto anteriormente, la presente invención utiliza una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 tal como se expone en las reivindicaciones. Las composiciones que inhiben el eje GH/IGF-1 son conocidas y directamente útiles en las realizaciones expuestas anteriormente. En una variación, la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 comprende un antagonista del receptor de la hormona del crecimiento. Ejemplos de antagonistas del receptor de la hormona del crecimiento se exponen en las patentes US-5.849.535; US-6.004.931; US-6.057.292; US-6.136.563; US-7.470.779; US-7.470.779; US-7.524.813 y US-6.583.115. Las composiciones expuestas en estas patentes son generalmente variantes de la hormona del crecimiento, que incluyen varias sustituciones de aminoácidos. Más concretamente, la variante de la hormona del crecimiento humano incluye la siguiente sustitución de aminoácidos: G120R. Más concretamente aún, la variante de la hormona del crecimiento humano incluye al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en H18D, H21N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T y G120R. Más concretamente incluso, la variante de la hormona del crecimiento humano incluye las siguientes sustituciones de aminoácidos: H18D, H21N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T y G120R. También debe señalarse que estas variantes de la hormona del crecimiento se estabilizan generalmente, por ejemplo, por pegilación. Un ejemplo específico particularmente útil de un antagonista del receptor de la hormona del crecimiento es Pegvisomant™ comercializado por Pfizer Inc. Pegvisomant™ es un análogo recombinante de 191 aminoácidos de la proteína GH que tiene grupos de polietilenglicol añadidos (es decir, pegilación).

En otra variación de la divulgación, la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 comprende un antagonista del receptor IGF-1.

En otra variación de la divulgación, la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 comprende un compuesto que inhibe la producción de hormona del crecimiento. Generalmente, estos compuestos actúan sobre la porción anterior de la hipófisis. Los compuestos comercialmente disponibles son variaciones sintéticas de la somatostatina natural. Ejemplos de estos sustitutos sintéticos incluyen octreotida (disponible como sandostatina de Novartis Pharmaceuticals) y lanreótido (disponible como somatulina de Ipsen).

En otra variación adicional de la divulgación, la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 comprende un antagonista del receptor de la hormona liberadora de GH (GHRH). Un ejemplo de tal antagonista es MZ-5-156 (véase Effects of growth hormone-releasing hormone and its agonistic and antagonistic analogs in cancer and non-cancerous cell lines, N. Barabutis et al, International Journal of Oncology, 36: 1285-1289, 2010).

En otra variación de la divulgación, la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 comprende un anticuerpo de hormona del crecimiento. Más concretamente, los anticuerpos anti-hormona del crecimiento incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales que se dirigen a la GH (véase Fig. 13a, 13b, 14a, 14b), GHR (Figura 17) o al receptor de IGF-1 (IGF-1R). Más concretamente, los anticuerpos monoclonales incluyen inmunoglobulinas (por ejemplo, subtipos IgG1 e IgG2). Ejemplos de fármacos que incorporan estas inmunoglobulinas incluyen IMC-A12, R1507, AMG-479 (véase la referencia a continuación), SCH-717454 y CP-751.871 como se expone en el artículo Early drug development of inhibitors of the insulin-like growth factor-I receptor pathway: Lessons from the first clinical trials, by J. Rodon et al, Mol Cancer Ther 2008;7(9). Septiembre de 2008, páginas 2575-2588. Más concretamente, los anticuerpos anti-hormona del crecimiento incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales que se dirigen a la hormona del crecimiento. AMG 479, un anticuerpo monoclonal anti-receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1, completamente humano, que inhibe el crecimiento y la supervivencia de las células de carcinoma pancreático (Mol Cancer Ther May 2009 8:1095-1105.)

En otra variación más de la divulgación, la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 comprende una combinación de dos o más de las selecciones posibles expuestas anteriormente.

La dosis de la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 es tal que el nivel medido de IGF-1 en plasma es inferior al nivel basal del sujeto (valor antes del tratamiento). Deben evitarse valores muy bajos de IGF-1 ya que tales niveles bajos tienen efectos secundarios relacionados. En una variación, la dosis se ajusta de tal manera que el IGF-1 plasmático del sujeto es del 20 al 60 por ciento del nivel basal del sujeto. En otra variación, la dosis se ajusta de tal manera que el IGF-1 plasmático del sujeto es de 30 a 55 por ciento del nivel basal del sujeto. En otra variación más, la dosis se ajusta de tal manera que el IGF-1 plasmático de los sujetos es de 40 a 50 por ciento del nivel basal del sujeto. Los valores normales para la concentración de IGF-1 dependen en cierta medida de la edad y del sexo. Un

valor normal para el nivel de IGF-1 en una persona en el intervalo de 25 a 39 años es de aproximadamente 114 a 492 nanogramos/ml (ng/ml), para una persona de 40 a 54 años el intervalo normal es de 90 a 360 ng/ml y para una persona de más de 55 años de edad, el intervalo es de 71 - 290 ng/ml. En los ancianos, los valores son significativamente más bajos, mientras que los más jóvenes pueden tener valores más altos. En general, puesto que muchas de las composiciones inhibitoras del eje GH/IGF-1 se usan actualmente para tratar varias dolencias, puede utilizarse una dosis inicial en el contexto de las realizaciones expuestas anteriormente. La dosificación se ajusta después para alcanzar el nivel objetivo de IGF-1 en plasma. Más concretamente, la dosis se ajusta por ajuste incremental en incrementos que son del 20 % al 60 % de la dosis inicial. Más concretamente aún, la dosis se ajusta por ajuste incremental en incrementos que son del 30 % al 55 % de la dosis inicial. Más concretamente incluso, la dosis se ajusta mediante ajuste incremental en incrementos que son del 45 % al 50 % de la dosis inicial.

En el caso de Pegvisomant™, la dosificación recomendada para el tratamiento de la acromegalia puede utilizarse de acuerdo con el protocolo de dosificación inicial. Por lo tanto, se usa una dosis de carga subcutánea de 40 mg seguida de inyecciones diarias de 10 mg. La dosis puede aumentar o disminuir en incrementos de 5 mg para lograr los niveles de IGF-1 establecidos anteriormente.

En otra realización, se proporciona un kit que abarca uno o más de los métodos expuestos anteriormente. El kit incluye un envase que tiene una o más dosis de una composición inhibitora del eje GH/IGF-1 como se establece en las reivindicaciones. El kit también incluye instrucciones que indican que la composición inhibitora del eje GH/IGF-1 debe proporcionarse a un sujeto (es decir, un sujeto con un riesgo aumentado de cáncer o un sujeto con un riesgo aumentado de desarrollar diabetes o un sujeto al inicio del daño oxidativo) de acuerdo con los métodos y pautas posológicas expuestas anteriormente. Más concretamente, el kit incluye un envase para contener una muestra de sangre extraída del sujeto que se usará para controlar los niveles de IGF-1 (y/o insulina en el caso de la diabetes).

Los experimentos expuestos a continuación confirman que la relación fundamental entre la vía pro-crecimiento y la inestabilidad genómica dependiente de la edad observada en estudios en levaduras, gusanos y ratones se conserva en los seres humanos, lo que se ha demostrado en el seguimiento de 22 años de una cohorte ecuatoriana con déficit de receptores de la hormona del crecimiento y de IGF-1 y la investigación del efecto de estos déficits en la respuesta celular al estrés y en los marcadores de cáncer y diabetes.

RESULTADOS

Cohorte ecuatoriana

Los sujetos del estudio fueron 99 individuos con déficit de receptores de la hormona de crecimiento (GHRD) que han sido seguidos por uno de los autores (J.G-A) en el Instituto de Endocrinología, Metabolismo y Reproducción (IEMYR) en Ecuador desde 1988. De éstos, 9 sujetos murieron durante el seguimiento. La distribución de edad de los 90 sujetos con GHRD vivos y la población de control de Ecuador se muestra en la Fig. 1A (38). Utilizando un cuestionario (Figuras 4A-E), se recogieron datos de mortalidad de 53 sujetos con GHRD adicionales que fallecieron antes de 1988 y se obtuvo información sobre enfermedades y causas de la muerte de 1606 parientes de primer a cuarto grado (parientes) no afectados de los sujetos con GHRD. La cohorte GHRD (99 sujetos) fue identificada en base a la marcada baja estatura de los sujetos (39-41) y confirmado por genotipificación (Fig. 1 B). La mayoría de los sujetos con GHRD de esta cohorte eran homocigotos para una mutación del sitio de corte y empalme de A por G en la posición 180 del exón 6 del gen del receptor de la hormona del crecimiento (GHR) (Fig. 1B, Fig. 5). Esta mutación, denominada E180, da como resultado una proteína que carece de 8 aminoácidos en su dominio extracelular y posiblemente está mal plegada y degradada (Fig. 5) (42). Dos sujetos con GHRD fueron homocigotos para la mutación R43X, lo que da como resultado una proteína GHR truncada debido a un codón de parada prematuro (Fig. 1 B) (43) y dos sujetos con GHRD eran heterocigotos E180/R43X (Fig. 1 B). Se cree que la mutación E180 ha sido introducida en esta región por los conversos españoles que emigraron al sur del Ecuador a principios de 1500 y su predominio se atribuye al alto nivel de consanguinidad en esta cohorte (44, 45). La mutación R43X ocurre en un punto dinucleotídico CpG dinámico y ha sido descrita en sujetos de todo el mundo (46).

Para confirmar el déficit de IGF en esta cohorte, medimos las concentraciones de IGF-1 y IGF-2 (Figura 6) en 13 sujetos control y 16 con GHRD con edades comprendidas entre 20 y 50 años, incluidos aquellos cuyo suero se utilizó posteriormente para los estudios *in vitro*. El IGF-1 sérico variaba de 29 a 310 ng/ml (media 144) entre los sujetos control, pero fue ≤ 20 ng/ml en todos los sujetos con GHRD. El IGF-2 sérico variaba de 341 a 735 ng/ml (media 473) entre los sujetos control, pero estaba por debajo de 164 ng/ml en todos los sujetos con GHRD (Fig. 6). No hubo superposición en el intervalo de los valores séricos de IGF-1 e IGF-2 séricos entre sujetos con GHRD y sujetos control ($p < 0,0001$) (Fig. 6).

Se ha observado una elevada mortalidad por enfermedades comunes de la infancia en la cohorte GHRD (Fig. 1) (47). Debido a esto, solo consideramos individuos que sobrevivieron a por lo menos 10 años para un análisis más profundo de las enfermedades en esta cohorte. De las 30 muertes entre sujetos con GHRD (datos del seguimiento y de las entrevistas) mayores de 10 años, 9 fueron debidas a enfermedades relacionadas con la edad (8 enfermedades cardíacas, 1 ictus) y 21 fueron debidas a otras causas (enfermedad de Chagas, causas

desconocidas). En comparación con los individuos control, los sujetos con GHRD fallecieron mucho más frecuentemente por accidentes, causas relacionadas con el alcohol y trastornos convulsivos (Fig. 1 D).

El cáncer no fue una causa de muerte en sujetos con GHRD de cualquier grupo de edad (Fig. 1 E); sin embargo, representó aproximadamente el 20 % de las muertes y el 17 % de todas las enfermedades de los parientes (Fig. 1D, F). Entre las muertes en cada grupo de edad, la proporción de cáncer fue menor en los sujetos con GHRD que en los parientes (basado en la distribución hipergeométrica exacta implementada en StatXact 7, CytelSoftware Corporation, $p = 0,003$). De todos los sujetos con GHRD seguidos desde 1988, solo uno fue diagnosticado de cáncer, un tumor epitelial seroso papilar del ovario en 2008. Después de la cirugía y el tratamiento, permanece libre de cáncer. El cáncer de estómago fue la causa predominante de mortalidad relacionada con cáncer en los parientes (Fig. 7), lo cual concuerda con la alta incidencia de este cáncer en Ecuador (48).

No se observó mortalidad ni morbilidad por diabetes tipo 2 en la cohorte GHRD, mientras que la diabetes es responsable del 5 % de las muertes y del 6 % de todas las enfermedades de los parientes (Fig. 1D, F), lo que concuerda con el 5 % de prevalencia de la diabetes en Ecuador (Fig. 1 G) (49). Estimamos la prevalencia de diabetes en la cohorte GHRD como $0/90 = 0\%$, con un intervalo de confianza de Clopper-Pearson exacto del 95 %: $0\% - 4\%$. Para probar si la prevalencia de la diabetes en la cohorte GHRD era diferente de la prevalencia de la población general del 5 %, se realizó una prueba exacta de la hipótesis nula de que con $p = 0,05$, basado en la distribución binomial, con la tasa de error tipo I, $\alpha = 0,05$. El valor P fue de 0,02, lo que indica que la prevalencia en la cohorte GHRD es inferior al 5 %. Este es un resultado especialmente sorprendente considerando la elevada prevalencia de obesidad entre estos individuos con GHRD (21 % en sujetos con GHRD frente al 13,4 % en la población general de Ecuador) (Fig. 1 G). Se ha descrito hipoglucemia en niños con déficits de GH y en sujetos jóvenes con GHRD (50-52). Por otra parte, se ha descrito que el déficit de GH en los adultos causa resistencia a la insulina y mayor mortalidad por enfermedad vascular (36, 53). Para investigar los mecanismos que podrían ser responsables de la ausencia de diabetes observada en la cohorte GHRD ecuatoriana, se midieron las concentraciones de glucosa en ayunas e insulina en 13 sujetos control y 16 sujetos con GHRD que consistían en sujetos masculinos y femeninos entre las edades de 20 y 50 años. No se observó ninguna diferencia significativa en las concentraciones de glucosa en ayunas entre ellos (Fig. 8). Sin embargo, la concentración media de insulina en el grupo con GHRD fue aproximadamente un tercio de la de los controles (Fig. 1H, $p < 0,05$) y el índice en el modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) (54) indicaba que los sujetos con GHRD (HOMA-IR = 0,34) eran mucho más sensibles a la insulina que los sujetos de control (HOMA-IR = 0,96) (Fig. 1I, $p < 0,05$) (55). Estos resultados concuerdan con el hallazgo de que los ratones con GHRD y otros modelos de ratón deficientes en GH tienen concentraciones de insulina séricas bajas y son sensibles a la insulina (31-34).

Aunque los sujetos con GHRD pueden presentar una elevada mortalidad por enfermedad cardíaca en comparación con parientes no afectados (Fig. 1 D), la mortalidad relativa por enfermedades vasculares (combinación de enfermedad cardíaca e ictus) parece ser similar a la de los parientes (33 % de muertes en parientes frente a 30 % de muertes en sujetos con GHRD) porque solo el 3 % de las muertes en sujetos con GHRD frente al 12 % en los parientes fueron debidas a ictus (Fig. 1 D). En consonancia con los estudios de una población humana con déficit aislado de hormona del crecimiento (IGHD) (56), nuestros datos sugieren que el GHRD no incrementa la mortalidad global de la enfermedad vascular, aunque puede aumentar la susceptibilidad a la enfermedad cardíaca y disminuir la susceptibilidad al ictus (Fig. 1 D).

La reducción de la señalización de IGF-1 protege contra el daño del ADN y favorece la apoptosis de las células dañadas.

El papel del IGF-1 en el desarrollo y progresión tumoral se ha atribuido a la promoción del crecimiento celular y la inhibición de la apoptosis en las células dañadas y precancerosas (29). Sin embargo, nuestros estudios en *S. cerevisiae* indican que los homólogos de los genes de la vía de señalización del crecimiento en mamíferos, incluyendo *TOR*, *S6K*, *RAS* y *PKA* promueven un aumento dependiente de la edad en las mutaciones del ADN por elevación de la producción de superóxido y promueven el daño del ADN independientemente del crecimiento celular (20). De hecho, el espectro de mutación en p53 de cánceres humanos es similar al de la levadura envejecida (19, 20, 28). Esto plantea la posibilidad de que la señalización de GH e IGF-1 puedan promover las mutaciones y cáncer no solo evitando la apoptosis de las células dañadas, sino también incrementando el daño en el ADN tanto en las células en división como en las células que no están en división. Para probar esta hipótesis, incubamos HMEC confluentes en medio suplementado con 15 % de suero de los controles o de los sujetos con GHRD (57, 58) durante 6 horas y a continuación se trataron con H_2O_2 durante 1 o 24 horas, seguido por el análisis cometa para detectar roturas de la cadena de ADN. Con el fin de prevenir la interferencia de factores de crecimiento o de la insulina, el medio no contenía suplementos de crecimiento durante el periodo de incubación de 6 horas. Debido a que las células se incubaron a más de 90 % de confluencia, el crecimiento celular durante los periodos de pre-incubación y de tratamiento con H_2O_2 fueron mínimos. Se analizaron independientemente seis muestras de suero de cada grupo. El análisis cometa indicó que las células incubadas en suero de sujetos con GHRD tenían menos roturas de ADN después del tratamiento con 700 μM de H_2O_2 durante 1 hora (Fig. 2A, B) o 24 horas (Fig. 2A, C), lo que sugiere que el suero de sujetos con GHRD puede proteger frente al daño oxidativo del ADN independientemente de la división celular. También incubamos células epiteliales confluentes en medio suplementado con suero de control, suero de GHRD o suero de GHRD suplementado con 200 ng/ml de IGF-1 durante 6 horas (los niveles normales de IGF-1 en

adultos humanos ecuatorianos varían entre 96-270 ng/ml (39). Aunque el H₂O₂ 100 µM tenía un efecto citotóxico similar en células incubadas en suero de GHRD y en las incubadas en suero de control o suero de GHRD + 200 ng/ml de IGF-1 (Fig. 2 D), el tratamiento con H₂O₂ 700 µM tuvo como resultado una mayor citotoxicidad en las células incubadas en suero de GHRD que en el suero de control (Fig. 2 D). Este efecto fue completamente invertido por la adición de 200 ng/ml de IGF-1 al suero de GHRD (Fig. 2 D). Las células de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) también fueron más susceptibles al aumento de la citotoxicidad en respuesta al H₂O₂ cuando se incubaban en suero de GHRD en lugar de suero de control (Fig. 9). Además, las HMEC incubadas en suero de GHRD y tratados con H₂O₂ mostraron mayor actividad caspasa que las células incubadas en el control de suero, lo que indica la activación de la apoptosis (Fig. 2 E), de acuerdo con el papel propuesto de la señalización del IGF-1 en el aumento de la incidencia de cáncer mediante la prevención de la apoptosis (29).

Para probar si la señalización del receptor de IGF-1 era responsable de la sensibilización de las células al daño oxidativo, se analizó el daño del ADN en células que carecían del receptor IGF-1 (células R-) o que sobreexpresaban el receptor IGF-1 humano (células R+) (60). Las células R+ tenían mayor ADN basal que células R- (Fig. 2 F). El análisis de transferencia Western confirmó el aumento previsto en la fosforilación de Akt (Thr 308) y FoxO1 (Ser 256) en células R+ en comparación con células R-, lo que indica que Akt era activado mientras que FoxO1 era inactivado en las células R+ (Fig. 2G) (61-63). El bajísimo nivel de la proteína FoxO1 total en las células R+ puede deberse a la fosforilación mediada por Akt de FoxO, lo que da lugar a su ubiquitinación y degradación proteosomal (Fig. 2 G) (64). La reducción de la actividad de FoxO en células R+ en comparación con las células R- que se transfectaron con un plásmido indicador de luciferasa de FoxO confirmó que FoxO era inactivado por la elevada señalización de IGF-1 en estas células (Fig. 2 H). Como los factores de transcripción de FoxO son conocidos por proteger contra el estrés oxidativo, así como por promover la apoptosis (62, 65, 66), planteamos la hipótesis de que el aumento de la actividad de FoxO podría explicar, en parte, los efectos protectores observados en células R- y en HMEC incubadas en suero de GHRD. De hecho, el análisis de microchips de ADN de células epiteliales incubadas en suero de control o GHRD mostró que de los 44 genes que estaban significativamente regulados positivamente en el grupo de suero de GHRD, 4 genes, incluyendo *SOD2*, eran dianas de FoxO (Fig. 2 I).

Efectos protectores de la reducción de la señalización pro-crecimiento en levaduras y mamíferos

En la tabla de la Figura 10 se presenta una lista completa de genes con expresión diferencial significativa en HMEC incubadas en suero de control o GHRD. El análisis de los patrones de expresión génica globales mediante el Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (67) reveló diferencias significativas en las vías involucradas en la regulación del ciclo celular, la expresión génica, el movimiento celular y la muerte celular, entre otros (Fig. 11-12). El IPA también indicó que los genes que regulan la apoptosis estaban regulados positivamente y que la señalización de Ras, PKA y Tor estaba regulada negativamente en células incubadas en suero de GHRD. El análisis por RT-PCR confirmó un nivel de ARNm en el estado de equilibrio 1,3 veces más alto que el de la MnSOD mitocondrial (*SOD2*) en células incubadas en suero de GHRD y también una reducción del 70 %, 50 % y 20 % en la expresión de N-Ras, PKA y TOR, respectivamente (Fig. 3 A). Ras, PKA y TOR/S6K son reguladores centrales de vías pro-envejecimiento y promotoras de enfermedades (68) y *SOD2* es un mediador clave de la protección celular contra el estrés oxidativo en organismos que van desde la levadura unicelular hasta mamíferos (2, 19, 20, 69-71).

Para analizar más detalladamente el papel de estos genes en el daño en el ADN dependiente de la edad y el estrés oxidativo, hemos generado una levadura triple mutante sin Ras, Tor1 y Sch9. Nuestros estudios anteriores han demostrado que los mutantes *sch9Δ* de levadura muestran alteraciones genómicas dependientes de la edad más bajas que las del tipo silvestre en parte debido a la reducción de la reparación del ADN dependiente de Polζ propenso a error (20). Hemos observado un mayor periodo de vida en células triple mutantes en comparación con las células de tipo silvestre (Fig. 3 B). Se analizó la inestabilidad genómica del ADN dependiente de la edad en las células *ras2Δ tor1Δ sch9Δ* y de tipo silvestre midiendo la frecuencia de las mutaciones del gen *CAN1*. El gen *CAN1* codifica una arginina permeasa de alta afinidad implicada en la captación de arginina, pero también de su análogo canavanina, que es tóxico para las células (19). Las mutaciones que inactivan *CAN1* adquieren la capacidad de formar una colonia en medio mínimo que contiene canavanina. La frecuencia de mutaciones dependientes de la edad en el gen *CAN1*, que son en su mayoría mutaciones puntuales, incluyendo una alta frecuencia de sustituciones de bases G por T (transversión) y C por T (transición) (19), fue mucho mayor en las células de tipo silvestre en comparación con los triples mutantes (Fig. 3 C). Mientras que las células de tipo silvestre eran susceptibles al tratamiento con H₂O₂, los mutantes *ras2Δ tor1Δ sch9Δ* casi no se vieron afectados a las concentraciones probadas (Fig. 3 D). Esto fue acompañado por un aumento significativo en las mutaciones dependientes de la edad y del estrés oxidativo en el tipo silvestre, pero no en los mutantes *ras2Δ tor1Δ sch9Δ* de vida más prolongada (Fig. 3 E). Estos resultados muestran que las células de levadura que carecen de homólogos de los genes regulados negativamente en HMEC expuestas a suero GHRD (Fig. 3 F), muestran una notable disminución en las mutaciones del ADN y un periodo de vida más prolongado.

ANÁLISIS

La incidencia reducida de patologías relacionadas con la edad en sujetos con GHRD concuerda con los estudios realizados en ratones que muestran que cerca del 50 % de los animales deficientes en GHRD o GH mueren sin

evidencia obvia de lesiones patológicas relacionadas con la edad, en comparación con solo aproximadamente el 10 % de sus hermanos de tipo silvestre, aunque los ratones con GHRD pueden vivir un 40 % más de tiempo (23) (14, 22, 23, 77). De acuerdo con los resultados presentados aquí, los ratones con GHRD muestran una menor incidencia (49 %) y la aparición tardía de neoplasias mortales en comparación con otros miembros de la camada de tipo silvestre, un aumento de la sensibilidad a la insulina y una reducción en el deterioro cognitivo dependiente de la edad (23, 24, 31). Se observan también fenotipos similares en ratones deficientes en GH (22, 32). Además, la reducción de la incidencia de cáncer en ratones con GHRD se asocia con una menor frecuencia de mutación en diversos tejidos (25).

A diferencia de los modelos en ratones, el GHRD no parece prolongar la vida humana, en gran parte porque el 70 % de las muertes en esta cohorte son causadas por causas no relacionadas con la edad, incluyendo trastornos convulsivos, toxicidad alcohólica, accidentes, cirrosis hepática y otras causas desconocidas frente a la distribución generalmente normal de las causas de muerte en la cohorte de parientes. La falta de mortalidad por cáncer pero la duración normal de la vida en sujetos con señalización de la hormona del crecimiento reducida en este estudio concuerdan con un estudio preliminar de Shevah y Laron en el que se describió la ausencia de cáncer en un grupo de 222 pacientes con déficits congénitos de IGF-1 (73) con el de Aguiar-Oliveira et al., que describieron una longevidad normal en 65 sujetos con déficit de GH (74). Al contrario que nuestro estudio, que se centra en los sujetos con GHRD con mutaciones específicas y los compara con parientes de la misma edad, en su estudio, Shevah y Laron compararon sujetos jóvenes en los que el déficit de IGF-1 se debía a muchas causas con controles mucho más mayores, lo que dificultó la interpretación de los datos. Sin embargo, en conjunto, estos dos estudios proporcionan una fuerte evidencia que sugiere una reducción de la incidencia de cáncer en sujetos con déficit de GHR e IGF-1 e indican que el IGF-1 podría servir como marcador para el cáncer dependiente de la edad, al menos en poblaciones específicas. Nuestros resultados también pueden proporcionar una explicación parcial de la sobrerrepresentación de mutaciones que provocan una pérdida parcial de la función en el gen del receptor de IGF-1 entre judíos Ashkenazi centenarios (75).

Los mecanismos que subyacen al papel pro-cáncer del IGF-1 pueden implicar no solo a su papel bien establecido en la promoción del crecimiento y la inhibición de la apoptosis (29, 76, 77), sino también a su efecto contraintuitivo sobre el aumento del daño del ADN independientemente del crecimiento, como sugieren nuestros estudios en levaduras. Tanto en levaduras como en mamíferos, la reducción de la señalización de TOR/S6K, RAS y AC/PKA hace que las células y el organismo sean resistentes a la mutagénesis dependiente del envejecimiento y del estrés oxidativo (2, 19, 20, 78-80). Este efecto parece depender, en parte, del aumento de la actividad de los factores de transcripción de resistencia al estrés y SOD2 (20, 65, 81). De hecho, los ratones que carecen de Cu/Zn SOD o MnSOD son susceptibles al aumento del daño del ADN y el cáncer (71). El efecto del suero de los sujetos con GHRD en la promoción de muchos de los cambios que promueven la longevidad en organismos modelo, incluyendo niveles reducidos de RAS, PKA y TOR y el aumento de la expresión de genes regulados por FOXO incluyendo SOD2, plantea la posibilidad de que los mecanismos anti-envejecimiento y anti-daño del ADN promovidos por la reducción de la señalización del crecimiento se conservan de la levadura a los seres humanos.

La ausencia de diabetes tipo 2 en la cohorte GHRD es particularmente interesante considerando que el fenotipo clínico de los sujetos con GHRD incluye la obesidad (82). La mayor sensibilidad a la insulina de los sujetos con GHRD, como se indica por las concentraciones reducidas de insulina y un índice HOMA-IR más bajo, podría explicar la ausencia de diabetes en esta cohorte. Aunque el aumento de la sensibilidad a la insulina se ha asociado con una mayor esperanza de vida en los modelos de ratón (83), algunos ratones de larga vida, incluyendo los ratones con el gen del receptor de insulina específico de grasa bloqueado (FIRKO), muestran una alteración de la señalización de insulina. Sin embargo, en este caso la pérdida de la señalización de la insulina está restringida al tejido adiposo y no está asociada con diabetes ni intolerancia a la glucosa (84). De forma similar, los ratones macho heterocigotos para el receptor IGF-1 muestran un aumento del 15 % en el período de vida aunque exhiben alteración de la tolerancia a la glucosa (6).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reclutamiento de los sujetos: Los sujetos con GHRD y sus parientes fueron reclutados para el estudio siguiendo los protocolos aprobados por el Instituto de Endocrinología, Metabolismo y Reproducción (IEMMYR) en Ecuador. Todos los participantes firmaron formularios de consentimiento informado antes de su participación en el estudio. Los datos sobre los sujetos con GHRD fallecidos se recogieron entrevistando a los miembros de la familia utilizando un cuestionario detallado (Fig.A - E). Al menos dos parientes debían estar presentes en el momento de la entrevista.

Genotipado: Las muestras de saliva se recogieron utilizando el kit de recogida de ADN Oragene OG-250 (DNA Genotek Inc., Ontario, Canadá) y se procesaron de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. El genotipado de la mutación E180 se realizó utilizando los siguientes cebadores:

SEQ ID NO 3: 5'-CATTGCCCTCAACTGGACTT-3' Directo

SEQ ID NO 4: 5'-CATTTTCCATTTAGTTTCATTTACT-3' Inverso (WT)

SEQ ID NO 5: 5'-CATTTTCCATTTAGTTTCATTTAC-3' Inverso (mutante)

- Análisis del suero: El IGF-1 y el IGF-2 séricos se midieron usando un ensayo basado en ELISA interno desarrollado en UCLA. Brevemente, las muestras de suero se extrajeron con ácido/etanol y se añadieron a placas de microvaloración de 96 pocillos (50 µl/pocillo) que se habían recubierto previamente con anticuerpos monoclonales anti-IGF-1 o anti-IGF-2 (sistemas R y D) a una concentración de 0,5 µg/pocillo. Después de 2 horas de incubación y posterior lavado, se añadieron 100 µl de conjugado estreptavidina-HRP a cada pocillo y se incubaron durante 20 minutos. Se añadieron 100 µl de sustrato OPD a cada pocillo y se incubaron adicionalmente durante 10 - 20 min. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ 2N y se midió la absorbancia a 490 nm con un lector de placas (Molecular Design). Los valores se calcularon comparando con los patrones de IGF-1 e IGF-2 conocidos. Se midieron los niveles de glucosa en ayunas con un analizador de glucosa de YSI Life Sciences y se midieron los niveles de insulina en ayunas con un kit ELISA de insulina humana de Millipore. La resistencia a la insulina se evaluó mediante el índice del modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) de los valores de glucosa en ayunas e insulina en ayunas y se calculó con la fórmula: glucosa en ayunas (mg/dl) x insulina en ayunas (µU/ml)/405 (54).
- Cultivo de células: Las HMEC se adquirieron en ScienCell Research Laboratories. Las células se cultivaron en medio de células epiteliales (ScienCell) a 37 °C y CO₂ 5 % en placas de cultivo revestidas con poli-L-lisina (Sigma). El medio de células epiteliales consistió en medio basal y un suplemento de crecimiento patentado suministrado por el fabricante. Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) primarios se adquirieron en ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron en DMEM/F12 (Invitrogen), suplementado con FBS al 15 % a 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células R+ y R- se obtuvieron del Dr. R. Baserga y se cultivaron en DMEM/F12 suplementado con FBS al 10 % a 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células se sembraron a una densidad de 4 x 10⁴ por pocillo para los ensayos Cometa y apoptosis, 8x10⁴ por pocillo para los ensayos de LDH o 2x10⁵ por pocillo para el análisis de microchips de ADN y transferencias Western en placas de 24, 96 y 6 pocillos respectivamente. Las células se cultivaron en medio basal de células epiteliales suplementado con un 15 % de suero control o suero de GHRD durante 6 horas seguido de tratamiento con H₂O₂ durante 1 hora (ensayos Cometa y de apoptosis) o 24 horas (ensayo Cometa y LDH). Para el análisis de microchips de ADN, las células se cultivaron en medio basal de células epiteliales (ScienCell) y suplementado con suero de control o de GHRD durante 6 horas y se procesó inmediatamente para la extracción de ARN con reactivo TRI de Ambion.
- Ensayo Cometa: El ensayo Cometa se realizó de acuerdo con el método descrito por Olive et al (85) usando el kit de ensayo Cometa de Trevigen. El daño del ADN se cuantificó por célula con el software Comet Score™. Se analizaron 100 - 200 células por muestra.
- Ensayo LDH: La actividad LDH se ensayó en medio de cultivo con el Ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96 de Promega de acuerdo con el protocolo del fabricante.
- Ensayo de apoptosis: Las caspasas activadas se cuantificaron con un lector de placas de fluorescencia con el Fluorescein CaspaTag Pan-Caspase Assay Kit (Chemicon) de acuerdo con el protocolo del fabricante.
- Actividad de FoxO: Se transfectaron 50.000 células/pocillo con 0,2 µg de plásmido indicador de luciferasa de FoxO con la secuencia de unión de FoxO consenso que dirige la expresión del gen luciferasa de la luciérnaga en placas de 24 pocillos. Como células de control interno se co-transfectaron con 0,02 µg de ADN plasmídico que codifica la luciferasa de Renilla bajo control del promotor CMV. Veinticuatro horas después de la transfección, se ensayó la actividad del promotor de FoxO usando el Dual-Luciferase Reporter Assay System de Promega de acuerdo con el protocolo del fabricante.
- Análisis de transferencia Western: Las células se lisaron en tampón RIPA y se ensayó la proteína total con BCA de Thermo Scientific. Se cargaron 15 µg de proteína total en geles SDS-PAGE al 10 % desnaturalizantes. Los anticuerpos primarios contra Phospho-Akt y Akt total (Thr 308) así como Phospho-FoxO1 y FoxO1 total (Ser 256) se obtuvieron en Cell Signaling Technologies. La β-tubulina se obtuvo en Santa Cruz Biotechnology Inc. El anticuerpo de conejo secundario se obtuvo en Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
- Análisis de microchips de ADN: El ARN se extrajo utilizando el reactivo TRI (Ambion) de acuerdo con el protocolo y se hibridó con chips BD-103-0603 de Illumina Beadchips (San Diego, CA). Los datos brutos se sometieron a normalización Z como se describe (86) y están disponibles en el repositorio Gene Expression Omnibus (GEO), número de acceso GSE21980. El enriquecimiento del conjunto de genes se ensayó con el método PAGE como se describe (67).
- Las figuras 11, 13 y 14 fueron seleccionadas basándose en los nombres y descripciones proporcionadas por Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Pathways Analysis; Redwood City, CA) y/o Ariadne Pathway Studio 7 (Ariadne Genomics).
- Levadura: La levadura tipo silvestre DBY746 (*MATα, leu2-3,112, his3Δ1, trp1-289, ura3-52, GAL⁺*) y su derivado *ras2::LEU2tor1::HIS3sch9::URA3*, originado por un reemplazo de genes de una etapa de acuerdo con Brachmann et al. (87), se hicieron crecer en SDC que contenía glucosa al 2 % y se suplementaron con aminoácidos como se ha descrito (88), así como un exceso de 4 veces de los suplementos de triptófano, leucina, uracilo e histidina. La vida

cronológica en medio SDC se controló midiendo las unidades formadoras de colonias (UFC), en placas YPD, todos los días. El número de UFC en el primer día se consideró como la supervivencia inicial (100 %) y se utilizó para determinar la mortalidad dependiente de la edad (89). La frecuencia de mutación espontánea se evaluó midiendo la frecuencia de mutaciones del gen *CAN1* (*YEL063C*). Las células se sembraron en placas de SDC-arginina selectivas en presencia de sulfato de L-canavanina [60 mg/l]. La frecuencia de mutación se expresó como la relación de colonias *Can^r* respecto a las células totales viables (90). La resistencia al estrés oxidativo también se evaluó en cultivos de levadura tratados crónicamente con H₂O₂ 1 mM en los días 1 y 3. El porcentaje de supervivencia y la frecuencia de mutación *can1* se midieron como se ha descrito anteriormente.

Análisis estadístico: Se utilizó la prueba t de dos colas de Student para analizar los datos de insulina, HOMA-IR y los datos celulares de ensayos en mamíferos (Cometa, LDH, ensayos de caspasa, RT-PCR y actividad FoxO) y experimentos en levaduras (supervivencia y frecuencia de mutación) usando GraphPad PrismV.

Experimentos de quimioterapia

Los resultados de un experimento en el cual la hormona del crecimiento humano se administra a ratones se exponen en la figura 13A. Esta figura proporciona una gráfica del peso corporal de ratones inmunizados con hormona del crecimiento humano (huGH) (20 machos y 20 hembras) en función del tiempo. Un menor peso corporal en estos ratones indica que los ratones han generado anticuerpos inhibidores contra la GH humana. La FIGURA 13B proporciona una imagen de una transferencia de ranura que muestra la actividad anti-huGH en el suero de ratones inmunizados para la transferencia de la GH humana inmovilizada. Se observa que 34 de 40 ratones inmunizados con huGH mostraron una fuerte actividad.

La FIGURA 14A proporciona gráficos del peso corporal de ratones con inmunización a corto plazo (STI) con la GH humana (puntas de flecha medio rellenas) después del tratamiento con ciclofosfamida (ciclofosfamida (CP) i.p., 300 mg/kg, indicada por puntas de flecha rellenas). La FIGURA 14B proporciona un histograma del hemograma completo (CBC) 7 días después del tratamiento con CP (los datos se presentan como porcentaje del valor previo a la quimioterapia); Las Figuras 14A y 14B muestran conjuntamente que la inmunización (y por lo tanto los anticuerpos producidos) proporcionan un efecto protector contra los efectos secundarios de la quimioterapia.

La FIGURA 15 muestra la eficacia del antagonista del receptor de la hormona del crecimiento. Los fibroblastos de células L de ratón que expresan GHR fueron privadas de suero durante 24 horas, después se trataron con hormona del crecimiento (GH) 5 mM durante 5 minutos con o sin un pretratamiento con antagonista de la hormona del crecimiento (GHA) 50 nM durante 30 min. La señal de phospho stat5 refleja la actividad del receptor de la hormona del crecimiento;

La FIGURA 16 proporciona un gráfico de un experimento en el cual las células madre humanas de fluido amniótico fueron pretratadas con un anticuerpo inhibidor que bloquea el receptor de IGF-1 antes del tratamiento con diferentes dosis del fármaco de quimioterapia ciclofosfamida en las dosis indicadas. Esta figura muestra que un anticuerpo que bloquea el receptor de la hormona del crecimiento protege a las células contra el daño oxidativo y la quimioterapia.

La FIGURA 17 proporciona un gráfico de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de 24 horas del tratamiento de células gliales primarias con el inhibidor de IGF I, proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 1 (IGFBP1) y con proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 2 (IGFBP2). Se observa que la IGFBP1 las protege contra el daño oxidativo. La IGFBP1 es un fuerte inhibidor de IGF-1. Otras IGFBP pueden incluso incrementar la señalización de IGF-1.

REFERENCIAS Y NOTAS

1. C. Kenyon, J. Chang, E. Gensch, A. Rudner, R. Tabtiang, A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461-464 (Dec 2, 1993).
2. P. Fabrizio, F. Pozza, S. D. Pletcher, C. M. Gendron, V. D. Longo, Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292, 288-290 (Apr 13, 2001).
3. M. Tatar et al., A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292, 107-110 (Apr 6, 2001).
4. D. J. Clancy et al., Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292, 104-106 (Apr 6, 2001).
5. K. T. Coschigano et al., Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* 144, 3799-3810 (Sep, 2003).
6. M. Holzenberger et al., IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182-187 (Jan 9, 2003).
7. V. D. Longo, C. E. Finch, Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* 299, 1342-1346 (Feb 28, 2003).

8. V. D. Longo, E. B. Gralla, J. S. Valentine, Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* 271, 12275-12280 (May 24, 1996).
9. V. D. Longo, Thesis. University of California, Los Angeles, (1997).
- 5 10. J. Z. Morris, H. A. Tissenbaum, G. Ruvkun, A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382, 536-539 (Aug 8, 1996).
11. K. Lin, J. B. Dorman, A. Rodan, C. Kenyon, daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278, 1319-1322 (Nov 14, 1997).
12. W. C. Orr, R. S. Sohal, Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263, 1128-1130 (Feb 25, 1994).
- 10 13. K. Flurkey, J. Papaconstantinou, D. E. Harrison, The Snell dwarf mutation Pit1(dw) can increase life span in mice. *Mech Ageing Dev* 123, 121-130 (Jan, 2002).
14. H. M. Brown-Borg, K. E. Borg, C. J. Meliska, A. Bartke, Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 384, 33 (Nov 7, 1996).
- 15 15. E. Cohen et al., Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell* 139, 1157-1169 (Dec 11, 2009).
16. V. D. Longo, L. L. Liou, J. S. Valentine, E. B. Gralla, Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch Biochem Biophys* 365, 131-142 (May 1, 1999).
17. C. Kenyon, A conserved regulatory system for aging. *Cell* 105, 165-168 (Apr 20, 2001).
- 20 18. V. D. Longo, Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. *Neurobiol Aging* 20, 479-486 (Sep-Oct, 1999).
19. F. Madia et al., Longevity mutation in SCH9 prevents recombination errors and premature genomic instability in a Werner/Bloom model system. *J Cell Biol* 180, 67-81 (Jan 14, 2008).
20. F. Madia et al., Oncogene homologue Sch9 promotes age-dependent mutations by a superoxide and Rev1/Polzeta-dependent mechanism. *J Cell Biol* 186, 509-523 (Aug 24, 2009).
- 25 21. J. M. Pinkston, D. Garigan, M. Hansen, C. Kenyon, Mutations that increase the life span of *C. elegans* inhibit tumor growth. *Science* 313, 971-975 (Aug 18, 2006).
22. Y. Ikeno, R. T. Bronson, G. B. Hubbard, S. Lee, A. Bartke, Delayed occurrence of fatal neoplastic diseases in ames dwarf mice: correlation to extended longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58, 291-296 (Apr, 2003).
- 30 23. Y. Ikeno et al., Reduced incidence and delayed occurrence of fatal neoplastic diseases in growth hormone receptor/binding protein knockout mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64, 522-529 (May, 2009).
24. A. Bartke, Insulin resistance and cognitive aging in long-lived and short-lived mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60, 133-134 (Jan, 2005).
25. A. M. Garcia et al., Effect of Ames dwarfism and caloric restriction on spontaneous DNA mutation frequency in different mouse tissues. *Mech Ageing Dev* 129, 528-533 (Sep, 2008).
- 35 26. P. Rodriguez-Viciana et al., Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 461-467 (2005).
27. A. Toker, M. Yoeli-Lerner, Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* 66, 3963-3966 (Apr 15, 2006).
- 40 28. V. D. Longo, M. R. Lieber, J. Vijg, Turning anti-ageing genes against cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 903-910 (Nov, 2008).
29. M. N. Pollak, E. S. Schernhammer, S. E. Hankinson, Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4, 505-518 (Jul, 2004).
30. A. G. Renehan et al., Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 363, 1346-1353 (Apr 24, 2004).
- 45 31. F. P. Dominici, G. Arostegui Diaz, A. Bartke, J. J. Kopchick, D. Turyn, Compensatory alterations of insulin signal transduction in liver of growth hormone receptor knockout mice. *J Endocrinol* 166, 579-590 (Sep, 2000).
32. F. P. Dominici, S. Hauck, D. P. Argentino, A. Bartke, D. Turyn, Increased insulin sensitivity and upregulation of insulin receptor, insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in liver of Ames dwarf mice. *J Endocrinol* 173, 81-94 (Apr, 2002).
- 50 33. M. M. Masternak, J. A. Panici, M. S. Bonkowski, L. F. Hughes, A. Bartke, Insulin sensitivity as a key mediator of growth hormone actions on longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64, 516-521 (May, 2009).
34. J. L. Liu et al., Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E405-413 (Sep, 2004).
- 55 35. P. V. Carroll et al., Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. *Growth Hormone Research Society Scientific Committee. J Clin Endocrinol Metab* 83, 382-395 (Feb, 1998).
36. J. O. Johansson, J. Fowelin, K. Landin, I. Lager, B. A. Bengtsson, Growth hormone-deficient adults are insulin-resistant. *Metabolism* 44, 1126-1129 (Sep, 1995).
- 60 37. M. Bramnert et al., Growth hormone replacement therapy induces insulin resistance by activating the glucose-fatty acid cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1455-1463 (Apr, 2003).
38. U.S., (Census Bureau, 2010).
39. J. Guevara-Aguirre, A. L. Rosenbloom, P. J. Fielder, F. B. Diamond, Jr., R. G. Rosenfeld, Growth hormone receptor deficiency in Ecuador: clinical and biochemical phenotype in two populations. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 417-423 (Feb, 1993).
- 65

40. A. L. Rosenbloom, J. Guevara Aguirre, R. G. Rosenfeld, P. J. Fielder, The little women of Loja--growth hormone-receptor deficiency in an inbred population of southern Ecuador. *N Engl J Med* 323, 1367-1374 (Nov 15, 1990).
- 5 41. L. K. Bachrach et al., Bone mineral, histomorphometry, and body composition in adults with growth hormone receptor deficiency. *J Bone Miner Res* 13, 415-421 (Mar, 1998).
42. M. A. Berg, J. Guevara-Aguirre, A. L. Rosenbloom, R. G. Rosenfeld, U. Francke, Mutation creating a new splice site in the growth hormone receptor genes of 37 Ecuadorean patients with Laron syndrome. *Hum Mutat* 1, 24-32 (1992).
- 10 43. S. Amselem et al., Recurrent nonsense mutations in the growth hormone receptor from patients with Laron dwarfism. *J Clin Invest* 87, 1098-1102 (Mar, 1991).
44. M. A. Berg et al., Receptor mutations and haplotypes in growth hormone receptor deficiency: a global survey and identification of the Ecuadorean E180splice mutation in an oriental Jewish patient. *Acta Paediatr Suppl* 399, 112-114 (Apr, 1994).
- 15 45. A. L. Rosenbloom, J. Guevara-Aguirre, Growth hormone receptor deficiency in South America: colonial history, molecular biology, and growth and metabolic insights. *J Pediatr Endocrinol Metab* 21, 1107-1109 (Dec, 2008).
46. M. A. Berg et al., Diverse growth hormone receptor gene mutations in Laron syndrome. *Am J Hum Genet* 52, 998-1005 (May, 1993).
- 20 47. J. Guevara-Aguirre et al., Growth hormone receptor deficiency (Laron syndrome): clinical and genetic characteristics. *Acta Paediatr Scand Suppl* 377, 96-103 (1991).
48. <http://www.who.int/en/>.
49. J. E. Shaw, R. A. Sicree, P. Z. Zimmet, Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87, 4-14 (Jan).
- 25 50. N. J. Hopwood, P. J. Forsman, F. M. Kenny, A. L. Drash, Hypoglycemia in hypopituitary children. *Am J Dis Child* 129, 918-926 (Aug, 1975).
51. M. W. Haymond, I. Karl, V. V. Weldon, A. S. Pagliara, The role of growth hormone and cortisone on glucose and gluconeogenic substrate regulation in fasted hypopituitary children. *J Clin Endocrinol Metab* 42, 846-856 (May, 1976).
- 30 52. Z. Laron, Y. Avitzur, B. Klinger, Carbohydrate metabolism in primary growth hormone resistance (Laron syndrome) before and during insulin-like growth factor-I treatment. *Metabolism* 44, 113-118 (Oct, 1995).
53. T. Rosen, B. A. Bengtsson, Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 336, 285-288 (Aug 4, 1990).
54. D. R. Matthews et al., Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419 (Jul, 1985).
- 35 55. *Materials and methods are available as supporting material on Science Online.*
56. M. H. Aguiar-Oliveira et al., Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 714-721 (Feb, 2010).
57. R. de Cabo et al., An in vitro model of caloric restriction. *Exp Gerontol* 38, 631-639 (Jun, 2003).
- 40 58. T. H. Ngo, R. J. Barnard, P. S. Leung, P. Cohen, W. J. Aronson, Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein-1 modulate prostate cancer cell growth and apoptosis: possible mediators for the effects of diet and exercise on cancer cell survival. *Endocrinology* 144, 2319-2324 (Jun, 2003).
59. A. Csiszar et al., Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. *Mech Ageing Dev* 130, 518-527 (Aug, 2009).
- 45 60. C. Sell et al., Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11217-11221 (Dec 1, 1993).
61. G. Rena, S. Guo, S. C. Cichy, T. G. Unterman, P. Cohen, Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* 274, 17179-17183 (Jun 11, 1999).
62. A. Brunet et al., Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868 (Mar 19, 1999).
- 50 63. D. R. Alessi et al., Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15, 6541-6551 (Dec 2, 1996).
64. H. Huang et al., Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1649-1654 (Feb 1, 2005).
- 55 65. G. J. Kops et al., Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316-321 (Sep 19, 2002).
66. P. F. Dijkers, R. H. Medema, J. W. Lammers, L. Koenderman, P. J. Coffey, Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 10, 1201-1204 (Oct 5, 2000).
67. S. Y. Kim, D. J. Volsky, PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC Bioinformatics* 6, 144 (2005).
- 60 68. L. Fontana, L. Partridge, V. D. Longo, Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 328, 321-326 (Apr 16).
69. L. Hlavata, T. Nystrom, Ras proteins control mitochondrial biogenesis and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)* 48, 725-730 (2003).
- 65 70. J. Urban et al., Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 26, 663-674 (Jun 8, 2007).

71. R. A. Busuttil et al., Organ-specific increase in mutation accumulation and apoptosis rate in CuZn-superoxide dismutase-deficient mice. *Cancer Res* 65, 11271-11275 (Dec 15, 2005).
72. C. Chen, K. Umez, R. D. Kolodner, Chromosomal rearrangements occur in *S. cerevisiae* rfa1 mutator mutants due to mutagenic lesions processed by double-strand-break repair. *Mol Cell* 2, 9-22 (Jul, 1998).
73. O. Shevah, Z. Laron, Patients with congenital deficiency of IGF-I seem protected from the development of malignancies: a preliminary report. *Growth Horm IGF Res* 17, 54-57 (Feb, 2007).
74. M. H. Aguiar-Oliveira et al., Longevity in untreated congenital growth hormone deficiency due to a homozygous mutation in the GHRH receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 714-721 (Feb).
75. Y. Suh et al., Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3438-3442 (Mar 4, 2008).
76. M. Parrizas, D. LeRoith, Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 138, 1355-1358 (Mar, 1997).
77. M. A. Kennedy, S. G. Rakoczy, H. M. Brown-Borg, Long-living Ames dwarf mouse hepatocytes readily undergo apoptosis. *Exp Gerontol* 38, 997-1008 (Sep, 2003).
78. V. D. Longo, The Ras and Sch9 pathways regulate stress resistance and longevity. *Exp Gerontol* 38, 807-811 (Jul, 2003).
79. L. Hlavata, L. Nachin, P. Jezek, T. Nystrom, Elevated Ras/protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae* reduces proliferation rate and lifespan by two different reactive oxygen species-dependent routes. *Aging Cell* 7, 148-157 (Mar, 2008).
80. Y. Li, W. Xu, M. W. McBurney, V. D. Longo, SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab* 8, 38-48 (Jul, 2008).
81. P. Fabrizio et al., SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* 163, 35-46 (Jan, 2003).
82. D. I. T. W. Guevara-Aguirre J, Rosenbloom AL, Acosta M, Rosenfeld RG, paper presented at the 73rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington, DC, Bethesda, MD, 1991.
83. A. Bartke, Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology* 146, 3718-3723 (Sep, 2005).
84. M. Bluher, B. B. Kahn, C. R. Kahn, Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299, 572-574 (Jan 24, 2003).
85. P. L. Olive, J. P. Banath, The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1, 23-29 (2006).
86. C. Cheadle, M. P. Vawter, W. J. Freed, K. G. Becker, Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn* 5, 73-81 (May, 2003).
87. C. B. Brachmann et al., Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132 (Jan 30, 1998).
88. C. Kaiser, M. S., M. A., Methods in yeast genetics. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ed. 1994, 1994), vol. 234.
89. P. Fabrizio, V. D. Longo, The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2, 73-81 (Apr, 2003).
90. F. Madia, C. Gattazzo, P. Fabrizio, V. D. Longo, A simple model system for age-dependent DNA damage and cancer. *Mech Ageing Dev* 128, 45-49 (Jan, 2007).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University of Southern California

<120> DÉFICIT DE RECEPTORES DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO COMO CAUSA DE UNA REDUCCIÓN SIGNIFICATIVA DE LA SEÑALIZACIÓN PRO-ENVEJECIMIENTO, DEL CÁNCER Y DE LA DIABETES

<130> USC0109PCT

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

caatacaaaag aggtaaatga aactaaatgg aaaatggtaa
ga 42

5 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met
1 5
 10 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador inverso para el genotipado del gen GHR de tipo silvestre
 <400> 3
 cattgccctc aactggactt 20
 20 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador inverso para el genotipado del gen GHR de tipo silvestre
 <400> 4
 cattttccat ttagtttcat ttact 25
 30 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador inverso para el genotipado del gen GHR mutante
 40 <400> 5
 cattttccat ttagtttcat ttac 24

REIVINDICACIONES

1. Una composición inhibidora del eje GH/IGF-1, para su uso en un método para aliviar un efecto secundario de quimioterapia en un sujeto, comprendiendo el método:

identificar un sujeto sometido a quimioterapia;

administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1 y medir el nivel de IGF-1 en el sujeto;

en la que la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 comprende una variante de la hormona del crecimiento humano que incluye al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en H18D, H21N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T y G120R o un análogo recombinante de 191 aminoácidos de la proteína GH que tiene grupos de polietilenglicol añadidos.

2. La composición inhibidora del eje GH/IGF-1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la variante de la hormona del crecimiento humano incluye las sustituciones de aminoácidos H18D, H21N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T y G120R.

3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el efecto secundario de quimioterapia que se alivia se selecciona del grupo que consiste en pérdida de peso, pérdida de cabello, trastornos gastrointestinales, alteración de los parámetros químicos y de la composición de la sangre e inmunosupresión.

4. Un kit para su uso en un método para aliviar un efecto secundario de quimioterapia en un sujeto, comprendiendo el kit:

una o más dosis de una composición inhibidora del eje GH/IGF-1, comprendiendo la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 una variante de la hormona del crecimiento humano que incluye al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en H18D, H21N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T y G120R o un análogo recombinante de 191 aminoácidos de la proteína GH que tiene grupos de polietilenglicol añadidos;

instrucciones que indican que la composición inhibidora del eje GH/IGF-1 debe proporcionarse a un sujeto sometido a quimioterapia y

un envase para contener una muestra de sangre extraída del sujeto que se utiliza para controlar los niveles de IGF-1 y/o insulina en el caso de diabetes.

5. El kit de la reivindicación 4, en el que la variante de la hormona del crecimiento humano incluye las sustituciones de aminoácidos H18D, H21N, R167N, K168A, D171S, K172R, E174S, I179T y G120R.

6. El kit de la reivindicación 4 o de la reivindicación 5, en el que el efecto secundario de quimioterapia que se alivia se selecciona del grupo que consiste en pérdida de peso, pérdida de cabello, trastornos gastrointestinales, alteración de los parámetros químicos y de la composición de la sangre e inmunosupresión.

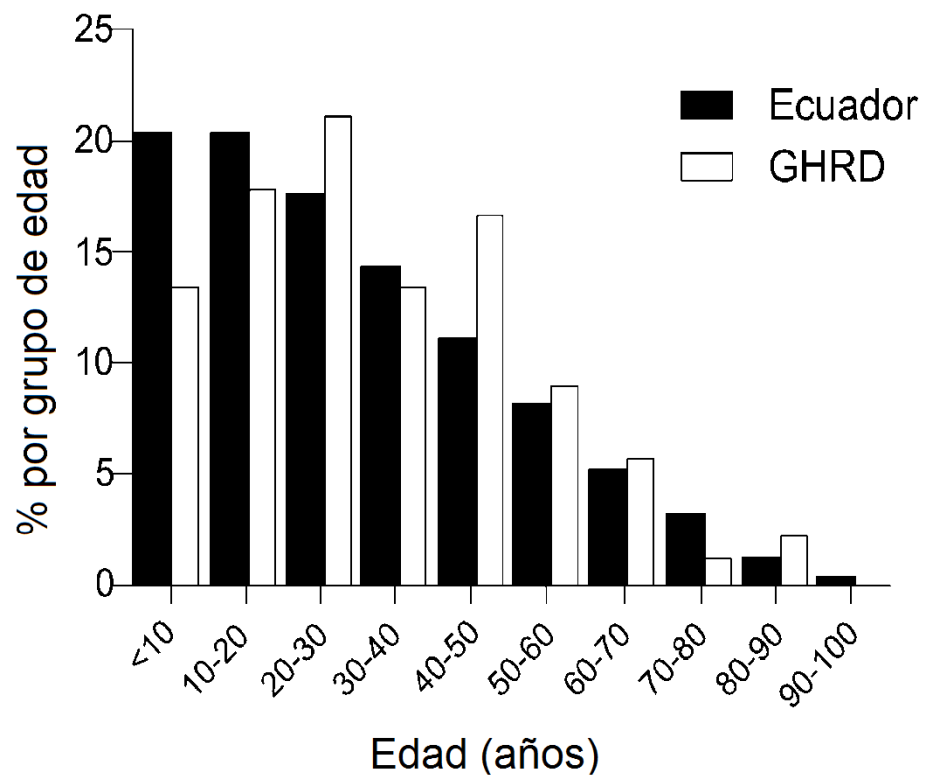


Fig. 1A

Genotipo	Número
E180/E180	81
E180/R43X	2
E180/?	1
R43X/R43X	2
Indeterminado	13

Fig. 1B

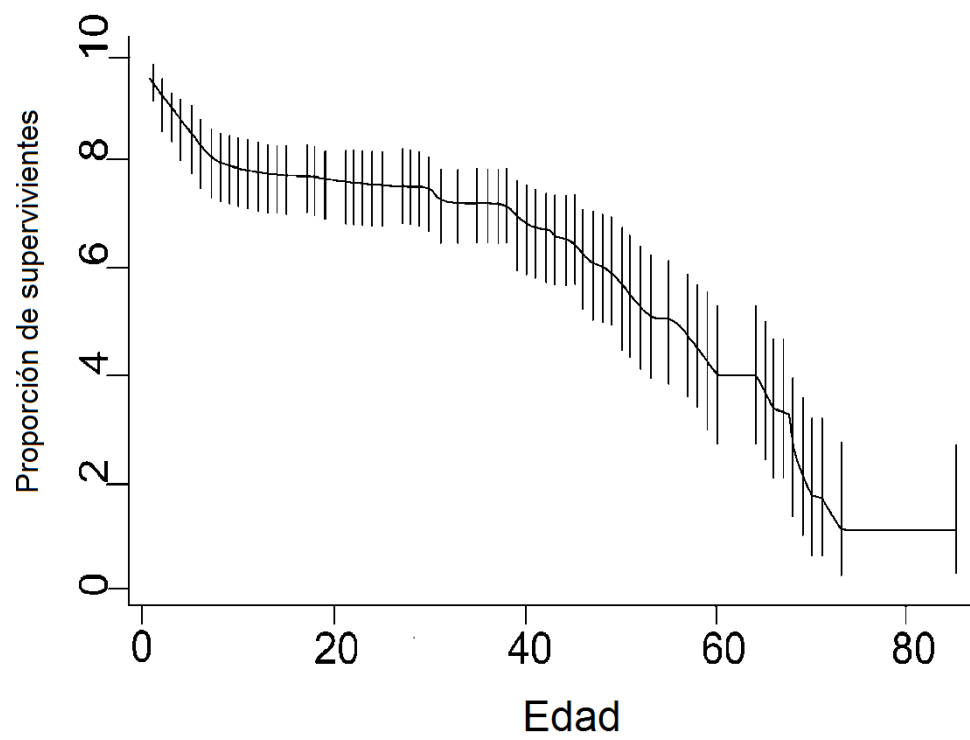


Fig. 1C

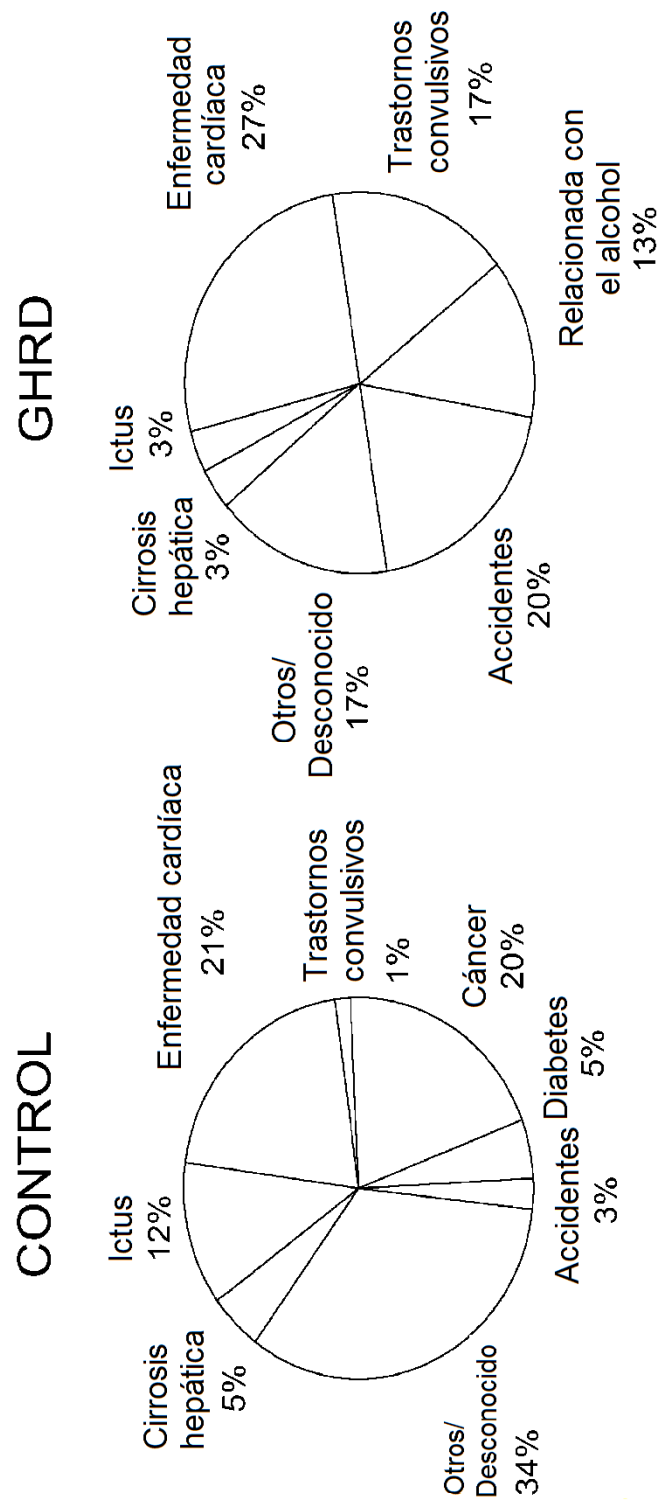


Fig. 1D

Edad	Control		GHRD	
	Total Muertes	Muertes por cáncer (%)	Total Muertes	Muertes por cáncer
10-30 años	60	3 (5)	5	0
30-50 años	208	46 (22,1)	12	0
50-70 años	370	84 (22,7)	12	0
70-90 años	446	89 (20)	1	0

Fig. 1E

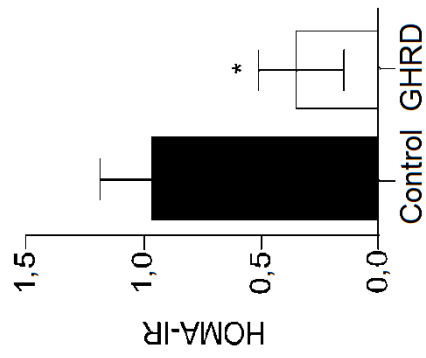


Fig. 1I

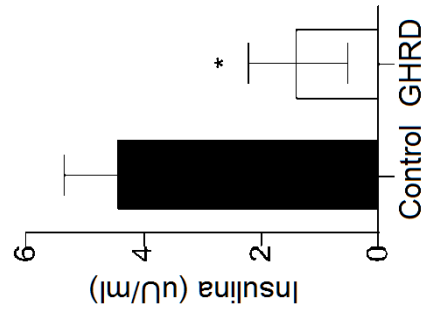


Fig. 1H

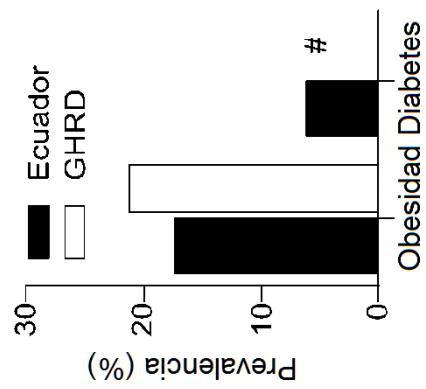


Fig. 1G

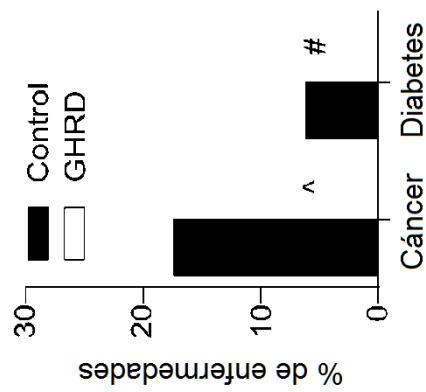


Fig. 1F

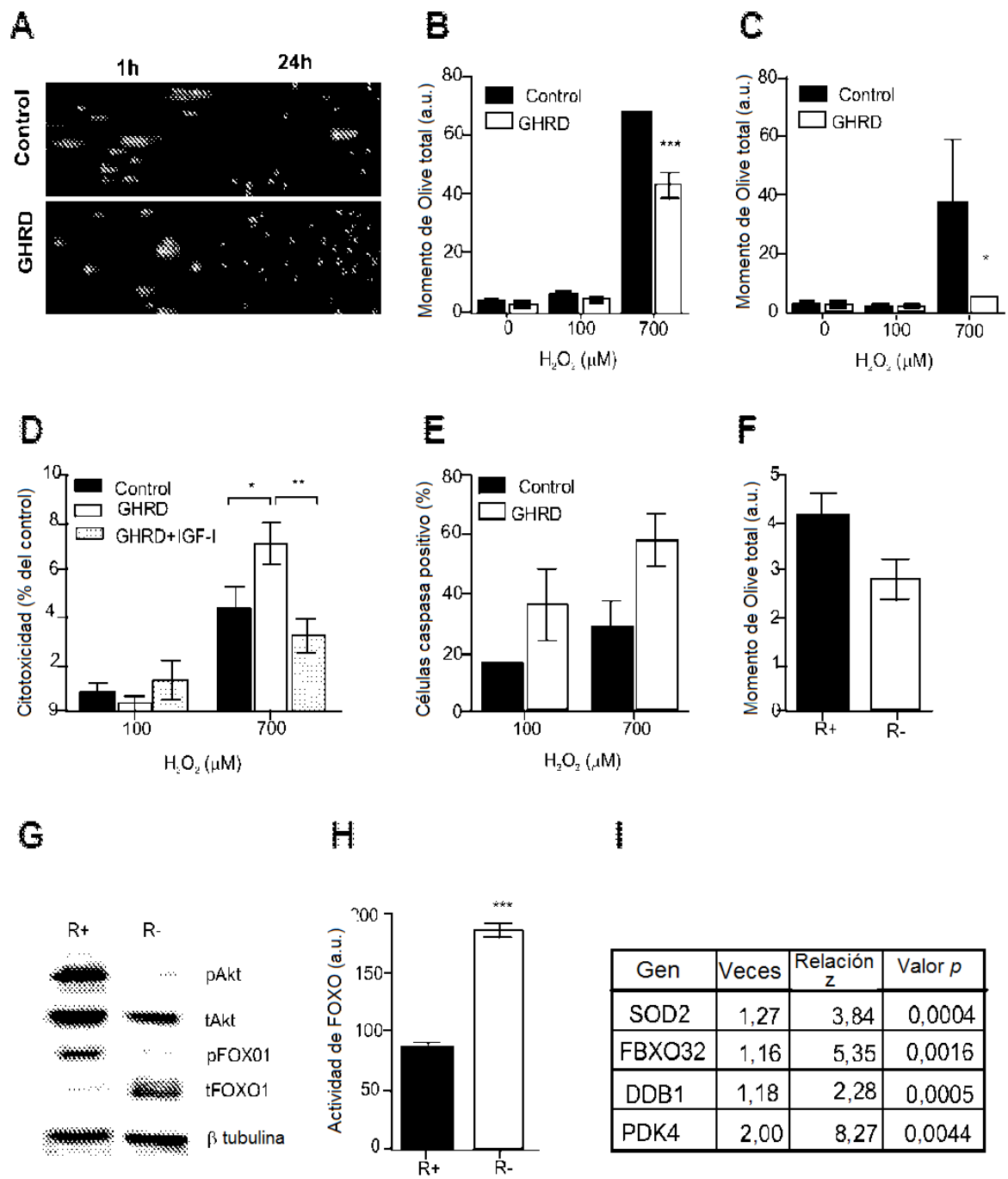


Fig. 2

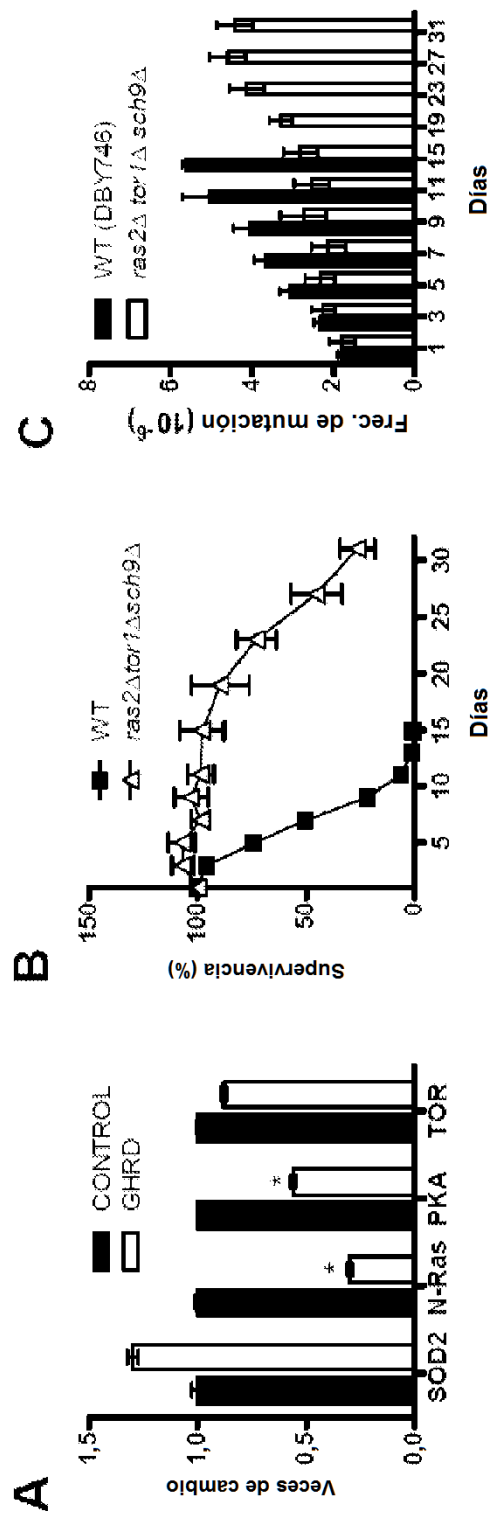


Fig. 3

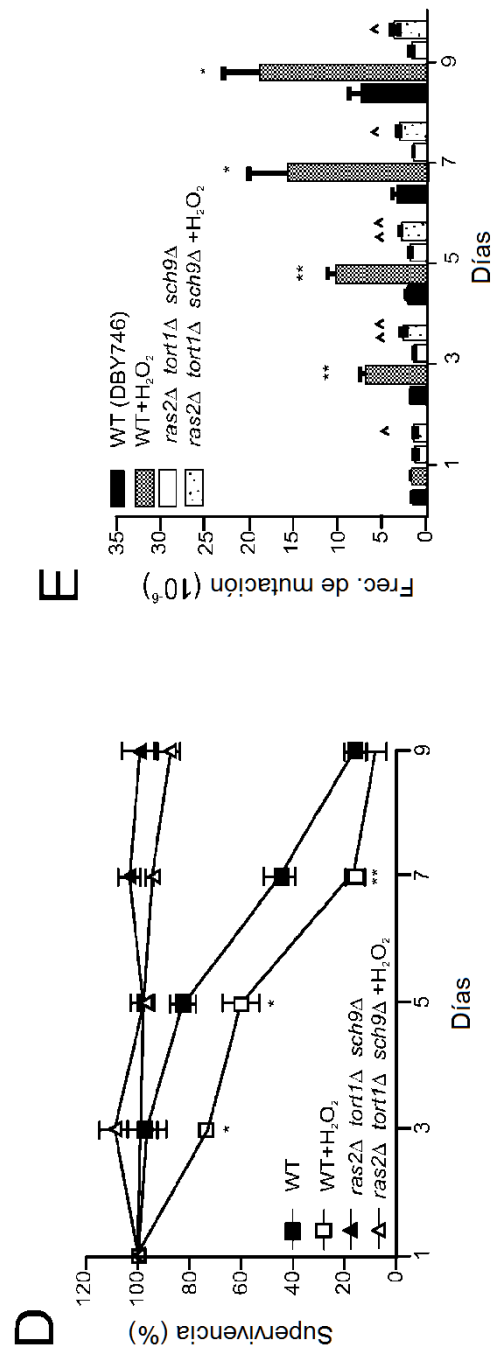


Fig. 3

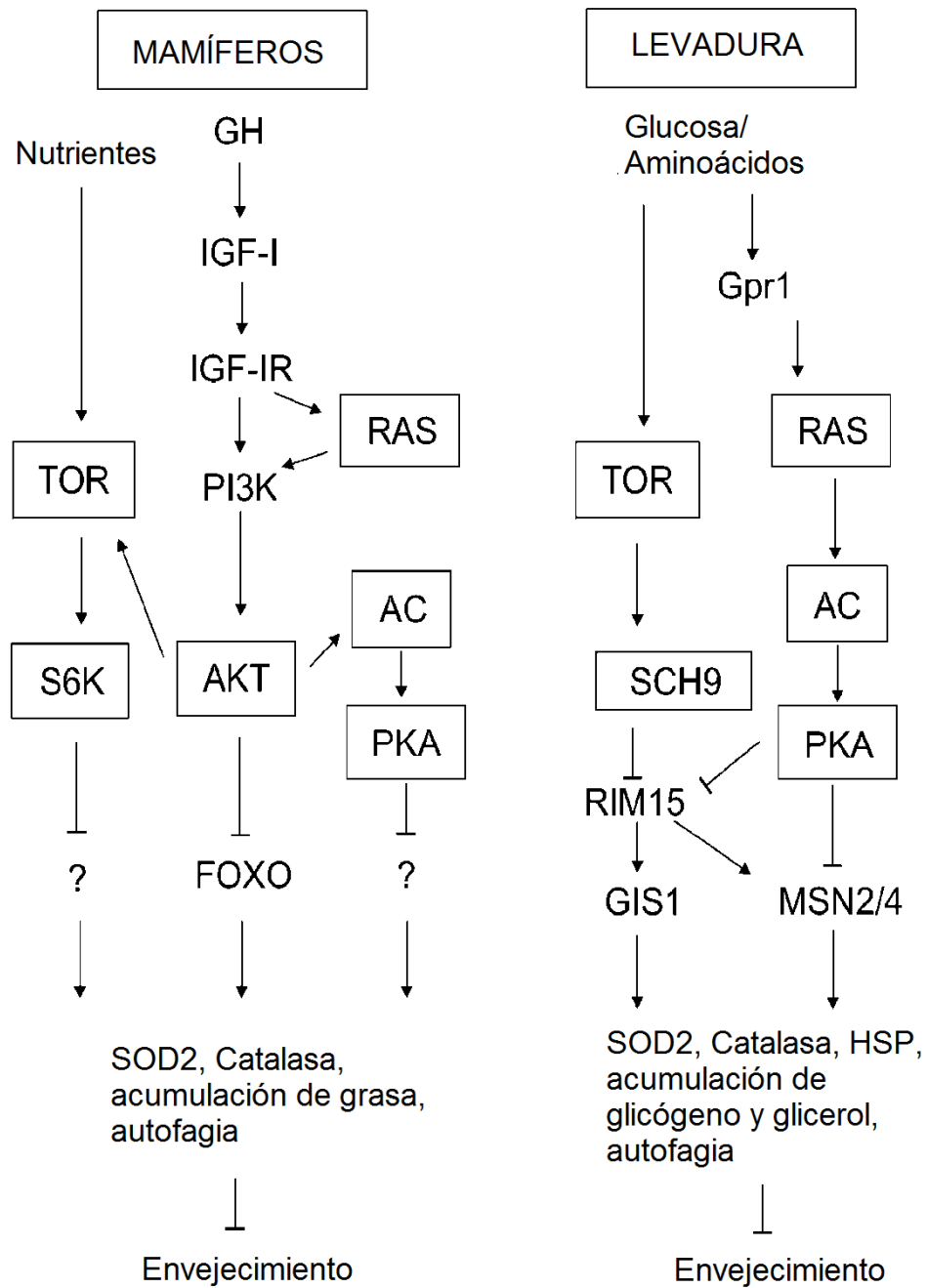


Fig. 3F

CARLS-001		CUESTIONARIO	
FORMULARIO A01: DATOS DEMOGRÁFICOS			
FECHA ENTREVISTA			ENTREVISTADO POR W E G A
NOMBRE: _____			
INICIALES DEL SUJETO		CÓDIGO DEL SUJETO	
F.N.		EDAD	
SEXO: H ☐ M ☐		ETNICIDAD: _____	
SUJETO			
GHRD ☐		PARIENTE ☐	
		CONTROL ☐	
MUTACIÓN SS-E180			
GENOTIPADO ☐		NO GENOTIPADO ☐	
MUESTRA OBTENIDA PARA ADN: SI ☐ NO ☐		PORTADOR ☐ NO PORTADOR ☐	
		EL	
LUGAR DE NACIMIENTO			
PAÍS: _____		PROVINCIA: _____	
CANTÓN: _____		CIUDAD: _____	
PUEBLO: _____		BARRIO: _____	
NACIDO EN			
HOSPITAL ☐		CLÍNICA ☐	
		CENTRO DE SALUD ☐	
		HOGAR ☐	
NOMBRE DEL CENTRO _____			
DIRECCIÓN ACTUAL DESDE:			
PROVINCIA: _____		CANTÓN: _____	
CIUDAD: _____		PUEBLO: _____	
DETALLES: _____			
CALLE: _____		NÚMERO: _____	
Nº TELÉFONO: _____		Nº MÓVIL: _____	
		OTROS Nº: _____	
FORMACIÓN			
EDUCACIÓN PRIMARIA ☐		EDUCACIÓN SECUNDARIA ☐	
		EST. UNIVERSITARIOS ☐	
		ANALFABETO ☐	
HÁBITOS			
TABACO ☐ UNIDADES/DÍA _____		ALCOHOL SI ☐ POR SEMANA: _____	
		NO ☐ _____	
DESDE CUÁNDO 5-10 a ☐ 10-20 a ☐ 20-30 a ☐		DESDE CUÁNDO 5-10 a ☐ 10-20 a ☐ 20-30 a ☐	
LUGAR DE TRABAJO (LT)		TRABAJO: HORAS A LA SEMANA (HS)	
LT: _____		HS: _____	
		DÍA/NOCHE: _____	
RELACIÓN CON EL SUJETO CON GHRD			
GHRD ☐ 1er GRADO ☐ 2º GRADO ☐ 3er grado ☐		GENEALOGÍA: SÍ ☐ NO ☐	

Fig. 4A

CARLS-001 FORMULARIO A02: AUXOLOGÍA			
FECHA ENTREVISTA: d d m m m a a a a a		ENTREVISTADO POR M E C Á	
NOMBRE: _____			
INICIALES DEL SUJETO		CÓDIGO DEL SUJETO	
SEXO: H ☐ M ☐			
SUJETO			
GHRD ☐		PARIENTE ☐	
CONTROL ☐			
MUTACIÓN SS-E180			
GENOTIPADO ☐		NO GENOTIPADO ☐	
PORTADOR ☐		NO PORTADOR ☐	
MUESTRA OBTENIDA PARA ADN: SI ☐ NO ☐		EL d d m m m a a a a a	
ESTATURA (centímetros - cm) Media de 3 mediciones 1ª 2ª 3ª Media			
PESO (kilogramos - kg)		BRAZOS EXTENDIDOS (cm)	
LONGITUD DE LA MANO (cm)		LONGITUD DEL PIE (cm)	
PERÍMETRO DE LA CINTURA		PERÍMETRO DE LA CADERA	
PRESIÓN ARTERIAL (Sistólica/Diastólica - mmHg) /		FRECUENCIA CARDÍACA (latidos por minuto)	
Bicipital (Bc)		Tricipital (Tr)	
Subescapular (Ss)		Supraillaco (Si)	
TIPO DE OBESIDAD			
GENERALIZADA ☐		GINOIDE ☐	
ANDROIDE ☐			

Fig. 4B

CARLS-001 FORMULARIO A03: CÁNCER EN EL SUJETO															
FECHA ENTREVISTA				d d m m a a a a				ENTREVISTADO POR				M E S A			
NOMBRE: _____															
INICIALES DEL SUJETO								CÓDIGO DEL SUJETO							
SEXO H ☐ M ☐															
TIPO DE CÁNCER															
01. VÉJIGA		02. ÓSEO		03. CEREBRO		04. MAMA		05. COLON		06. VESÍCULA BILIAR		07. LEUCEMIA			
08. HÍGADO		09. PULMÓN		10. OVARIOS		11. PRÓSTATA		12. PIEL		13. ESTÓMAGO		14. TESTÍCULOS			
15. GARGANTA		16. TIROIDES		17. ÚTERO		18. _____		19. _____		20. _____		21. _____			
FECHA DEL DIAGNÓSTICO				d d m m a a a a				CENTRO DEL DIAGNÓSTICO: _____							
OBSERVACIONES: _____															
TRATAMIENTO															
CIRUGÍA		☐		QUIMIOTERAPIA		☐		RADIOTERAPIA		☐		OTROS		☐	
COMENTARIOS: _____															
☐ VIVO ☐ FALLECIDO DEBIDO A CÁNCER A LA EDAD DE: _____															
OTROS DETALLES: _____															
QUERATOSIS ACTÍNICA: SI ☐ NO ☐															
CARA		☐		NÚMERO		☐		DETALLES:		_____					
CUELLO		☐		NÚMERO		☐		DETALLES:		_____					
TÓRAX		☐		NÚMERO		☐		DETALLES:		_____					
EXTREMO.		☐		NÚMERO		☐		DETALLES:		_____					
DIAGNÓSTICO Y DETALLES DE OTRAS ENFERMEDADES															
DIAGNÓSTICO 1: _____															
DIAGNÓSTICO 2: _____															
DIAGNÓSTICO 3: _____															
DIAGNÓSTICO 4: _____															
DIAGNÓSTICO 5: _____															

Fig. 4C

CARLS-001 FORMULARIO A04: CÁNCER EN LOS PARIENTES DEL SUJETO															
FECHA ENTREVISTA								ENTREVISTADO POR							
NOMBRE: _____															
INICIALES DEL SUJETO				CÓDIGO DEL SUJETO											
SEXO H ☐ M ☐															
TIPO DE CÁNCER															
01. VEJIGA		02. ÓSEO		03. CEREBRO		04. MAMA		05. COLON		06. VESÍCULA BILIAR		07. LEUCEMIA			
08. HÍGADO		09. PULMÓN		10. OVARIOS		11. PRÓSTATA		12. PIEL		13. ESTÓMAGO		14. TESTÍCULOS			
15. GARGANTA		16. TIROIDES		17. ÚTERO		18. _____		19. _____		20. _____		21. _____			
PARIENTES CON CÁNCER (Ver Código de tipo)															
Sí ☐		NO ☐		Padre		Número de código		Fallecido ☐		Vivo ☐					
Detalles: _____															
Sí ☐		NO ☐		Madre		Número de código		Fallecido ☐		Vivo ☐					
Detalles: _____															
Sí ☐		NO ☐		Hermano 1		Número de código		Fallecido ☐		Vivo ☐					
Detalles: _____															
Sí ☐		NO ☐		Hermano 2		Número de código		Fallecido ☐		Vivo ☐					
Detalles: _____															
Sí ☐		NO ☐		Hermano 3		Número de código		Fallecido ☐		Vivo ☐					
Detalles: _____															
Sí ☐		NO ☐		Pariente ()		Número de código		Fallecido ☐		Vivo ☐					
Detalles: _____															
Sí ☐		NO ☐		Pariente ()		Número de código		Fallecido ☐		Vivo ☐					
Detalles: _____															
Sí ☐		NO ☐		Pariente ()		Número de código		Fallecido ☐		Vivo ☐					
Detalles: _____															
Sí ☐		NO ☐		Pariente ()		Número de código		Fallecido ☐		Vivo ☐					
Detalles: _____															

Fig. 4D

CARLS-001 FORMULARIO A05: ENFERMEDADES EN PARIENTES DEL SUJETO	
FECHA ENTREVISTA d d m m m a a a a a	ENTREVISTADO POR
NOMBRE _____	
INICIALES DEL SUJETO CÓDIGO DEL SUJETO SEXO: H M EDAD: d d m m a a	

ETNICIDAD _____

Fig. 4E

(Sitio de la sustitución A por G en el codón 180 del gen GHR)

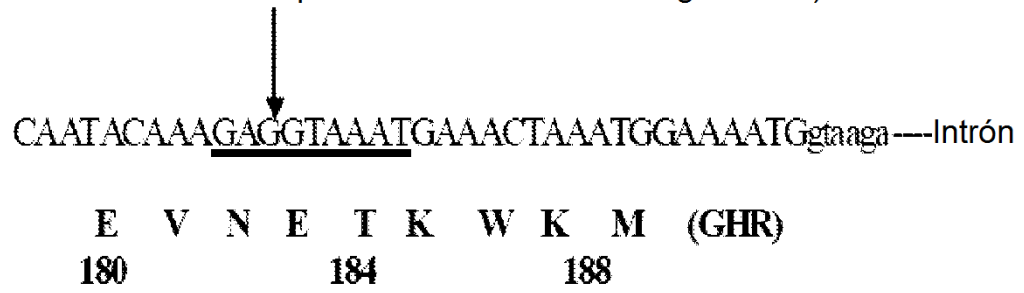


Fig. 5

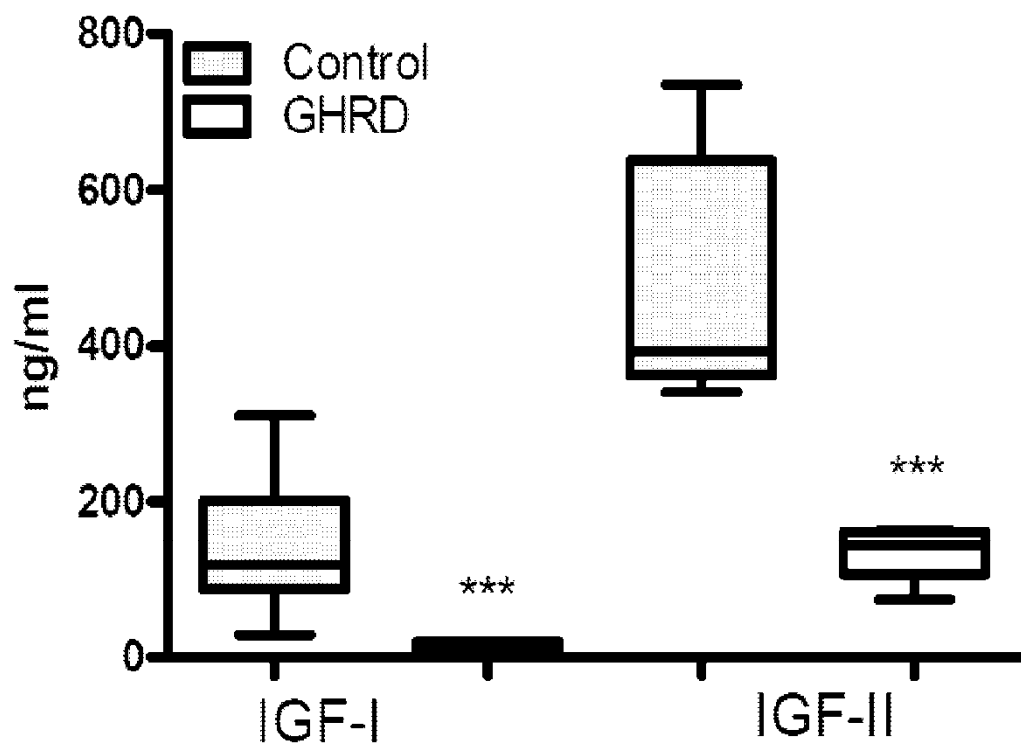


Fig. 6

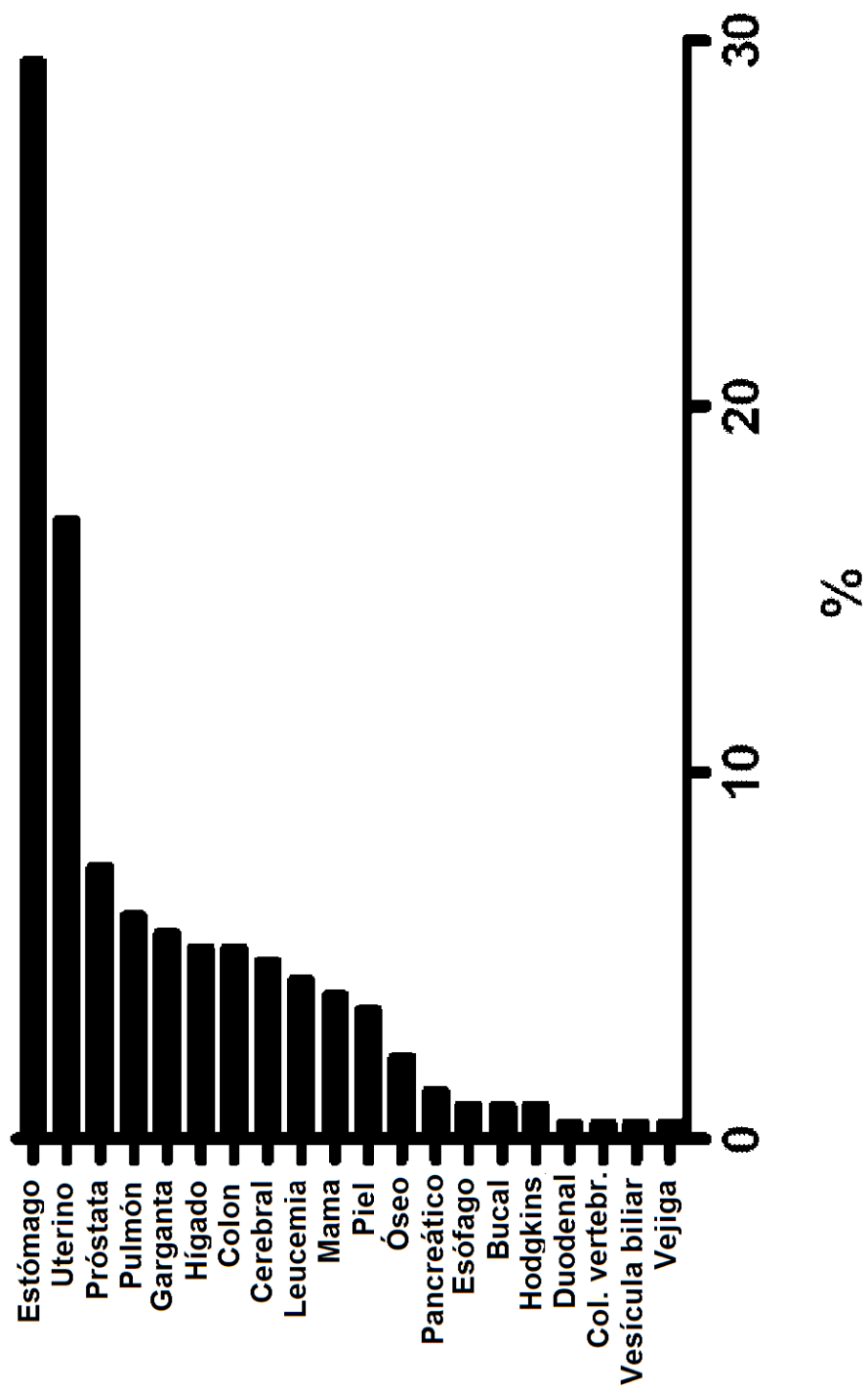


Fig. 7

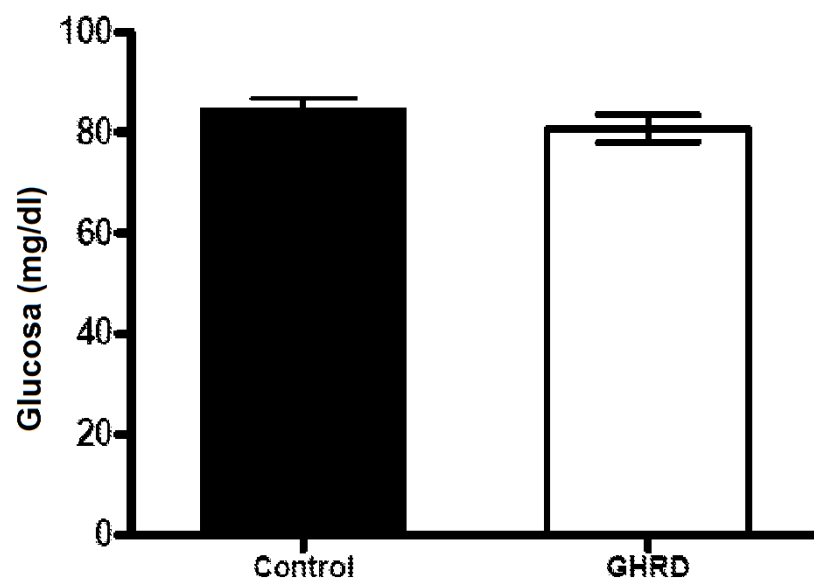


Fig. 8

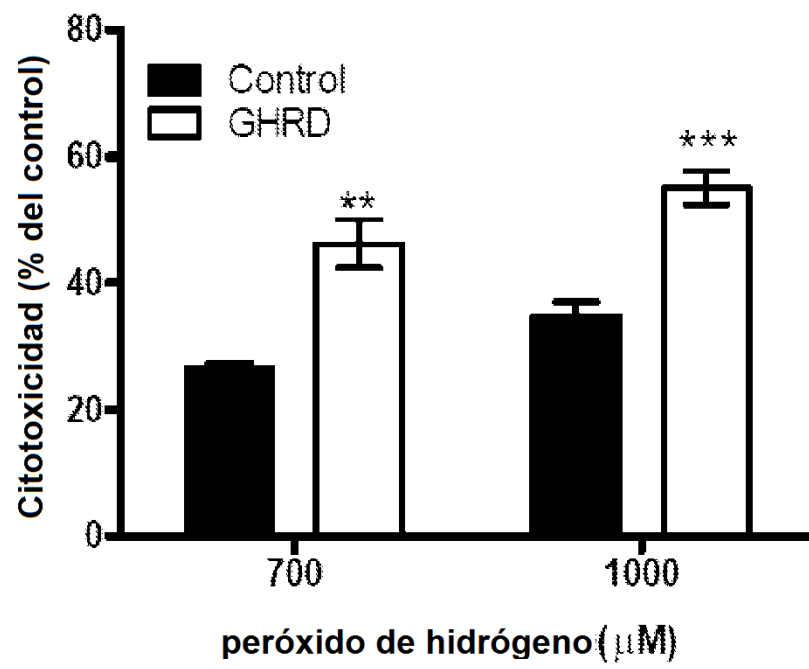


Fig. 9

ES 2 632 348 T3

ID DIANA	(factor de cambio) GHRD-Control	(relac. z) GHRD- Control
PKK4	2,1	8,0
PIK3IP1	2,0	7,4
RAD21	1,6	6,0
UGCG	1,5	5,3
FBXO32	1,5	4,8
LOC387763	1,5	4,7
DAB2	1,4	4,4
LBH	1,4	4,1
DAB2	1,4	4,2
PTK2	1,4	4,3
MAFF	1,4	4,0
MMP10	1,4	3,8
NFKB1Z	1,4	4,1
SERINC3	1,4	4,2
WEE1	1,4	3,8
PPTC7	1,4	3,6
MMP7	1,4	3,9
MMP7	1,3	3,6
SDCBP2	1,3	3,9
SOX9	1,3	3,7
SOD2	1,3	3,6
PFKFB3	1,3	3,5
ATP2B4	1,3	3,3
DKK1	1,3	3,7
ITSN1	1,3	3,1
CTDSP2	1,3	3,0
TSC22D1	1,3	2,9
ILK1	1,3	3,1
C4ORF34	1,3	3,1
PLEKHA1	1,3	3,1
SNF1LK	1,3	2,9
RAF9A	1,3	3,0
ZAK	1,3	2,7
TAX1BP1	1,2	2,8
CDK8	1,2	2,5
ATP2B4	1,2	2,5
C16ORF72	1,2	2,3
AVP11	1,2	2,3
ELF2	1,2	2,1
ATG2B	1,2	1,9
KIAA0174	1,2	2,0
IRF6	1,1	2,0
DDI1	1,1	1,9
SH3GLB1	1,1	1,8
MOC51	-1,1	-1,6
RUNDC1	-1,1	-2,0
FCXK1	-1,1	-1,6
TUBB	-1,2	-1,7
C21ORF57	-1,2	-2,2
FST	-1,2	-2,2
DKC1	-1,2	-2,3
COMMD4	-1,2	-2,4
LOC728734	-1,2	-2,4
RRP12	-1,2	-2,5
PLEKHG3	-1,2	-2,2
C12ORF31	-1,2	-2,3
LLGL1	-1,2	-2,7
EXOSC6	-1,2	-2,4
FAHD1	-1,2	-2,5
YPS72	-1,2	-2,6
UBE2G2	-1,2	-2,6
ZNF562	-1,2	-2,8
KIAA0020	-1,2	-2,9
CSNK1G2	-1,2	-2,7
LOC654121	-1,3	-3,0
SH3RF2	-1,3	-3,0
HDDC2	-1,3	-2,9
LZTR1	-1,3	-3,2
HSPC159	-1,6	-5,5

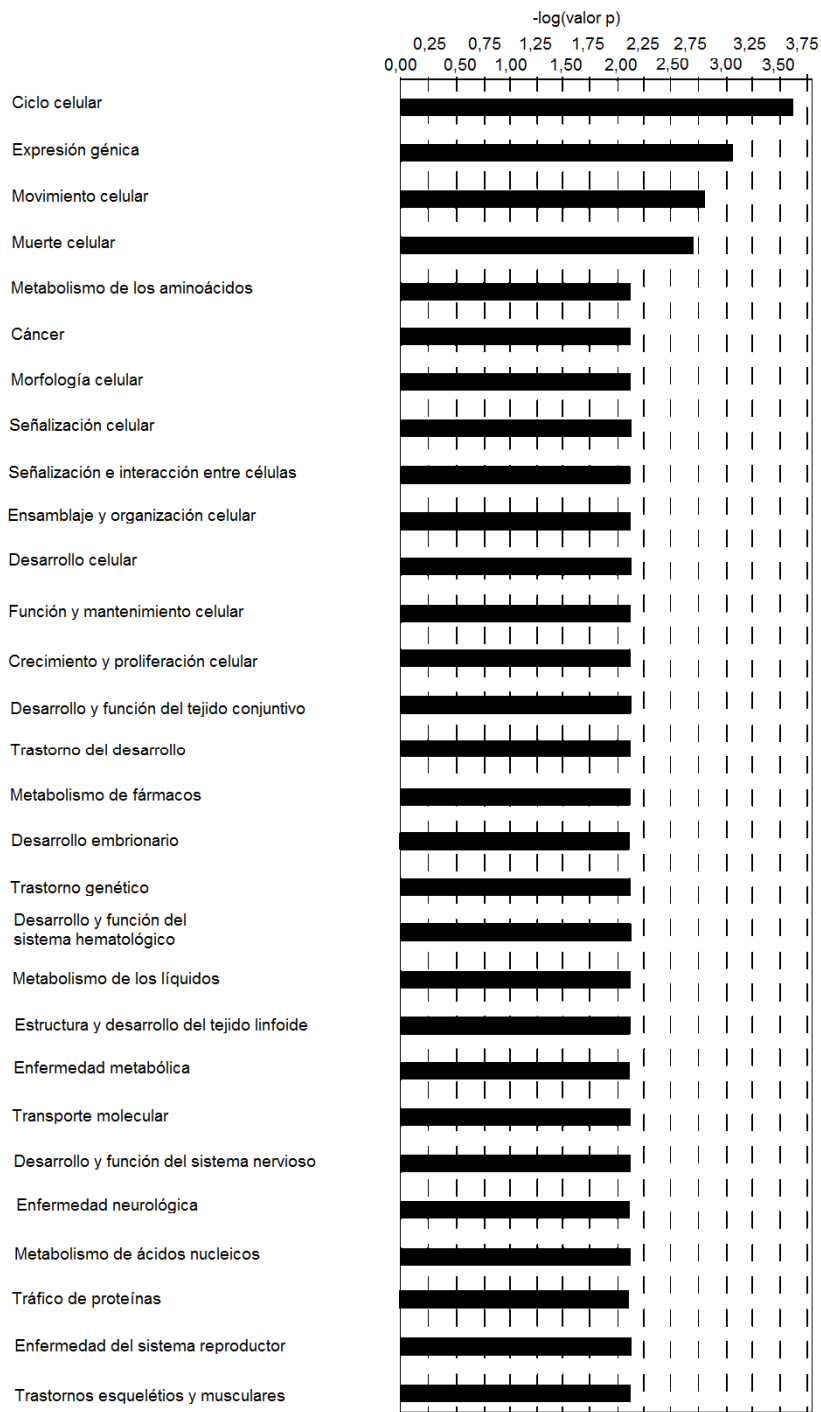


Fig. 11

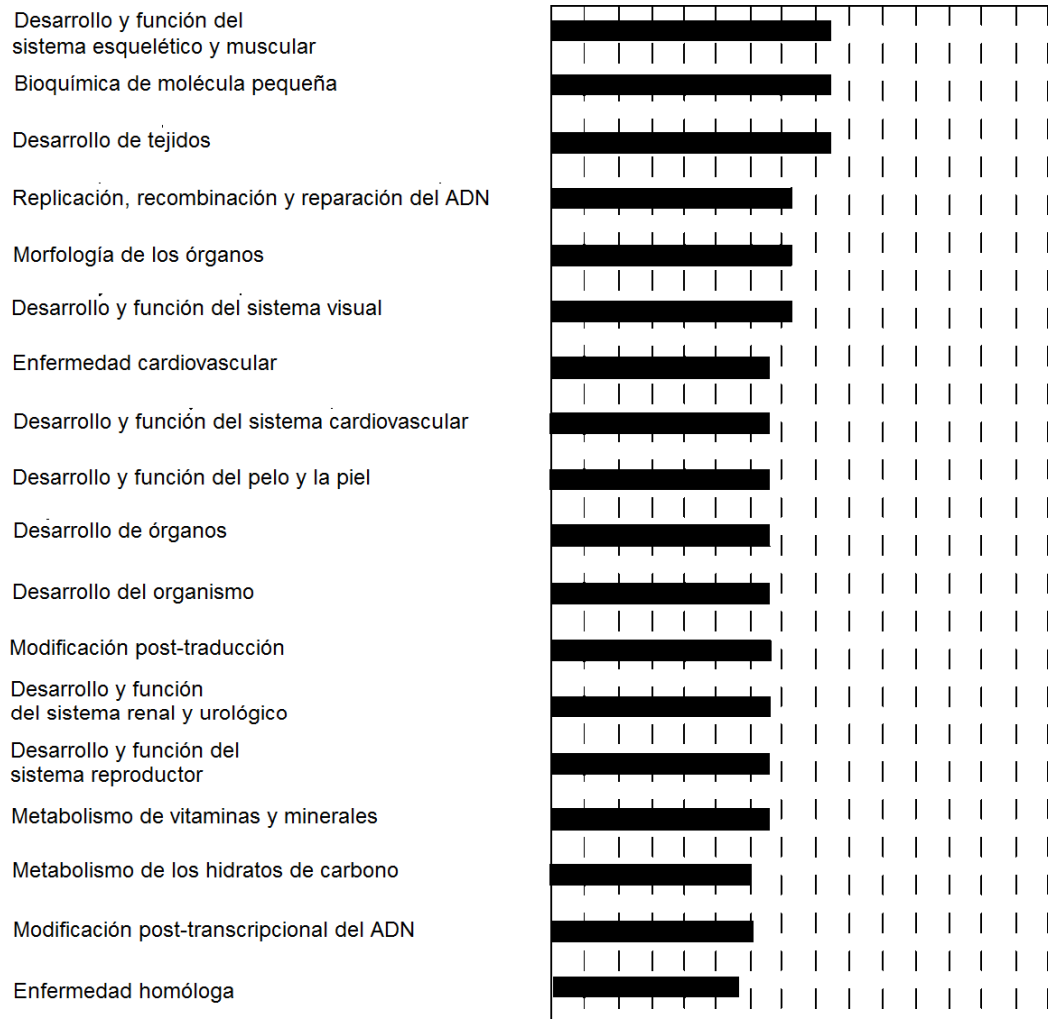


Fig. 11

GEN	NOMBRE OFICIAL	ID GEN
DD81	proteína de unión al ADN específica del daño 1	1642
LATS2	supresor de tumores grandes, homólogo (Drosophila)	26524
NRG1	neurregulina 1	3084
WEE1	homólogo de WEE1 (S. Pombe)	7466
SOX9	SRY (región del cromosoma Y determinante del sexo)-caja 9	6662
CREBBP	proteína de unión a CREB	1387
RAN	RAN, miembro de la familia de oncogenes RAS	5901
IRF1	factor regulador del interferón 1	3659
NFKB1A	inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa en linfocitos B, alfa	4792
NFKB1Z	inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa en linfocitos B, zeta	64332
PRKAR2A	proteína quinasa, dependiente de AMPc, reguladora, tipo II, alfa	5576
TIAM1	proteína inductora de la invasión y la metástasis en el linfoma de linfocitos T	7074
DAB2	homólogo 2 desactivado, fosfoproteína sensible a mitógenos	1601
GRB7	proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 7	2686
UGCG	UDP-glucosa ceramida glucosiltransferasa	7357
TAX1BP1	proteína de unión 1 a Tax1 (virus de la leucemia de linfocitos T humanos tipo 1)	6687
HSPA9	proteína de choque térmico de 70kDa (mortalina)	3313
TXNDC5	proteína que contiene el dominio de tioredoxina 5 (retículo endoplasmático)	81567

Fig. 12

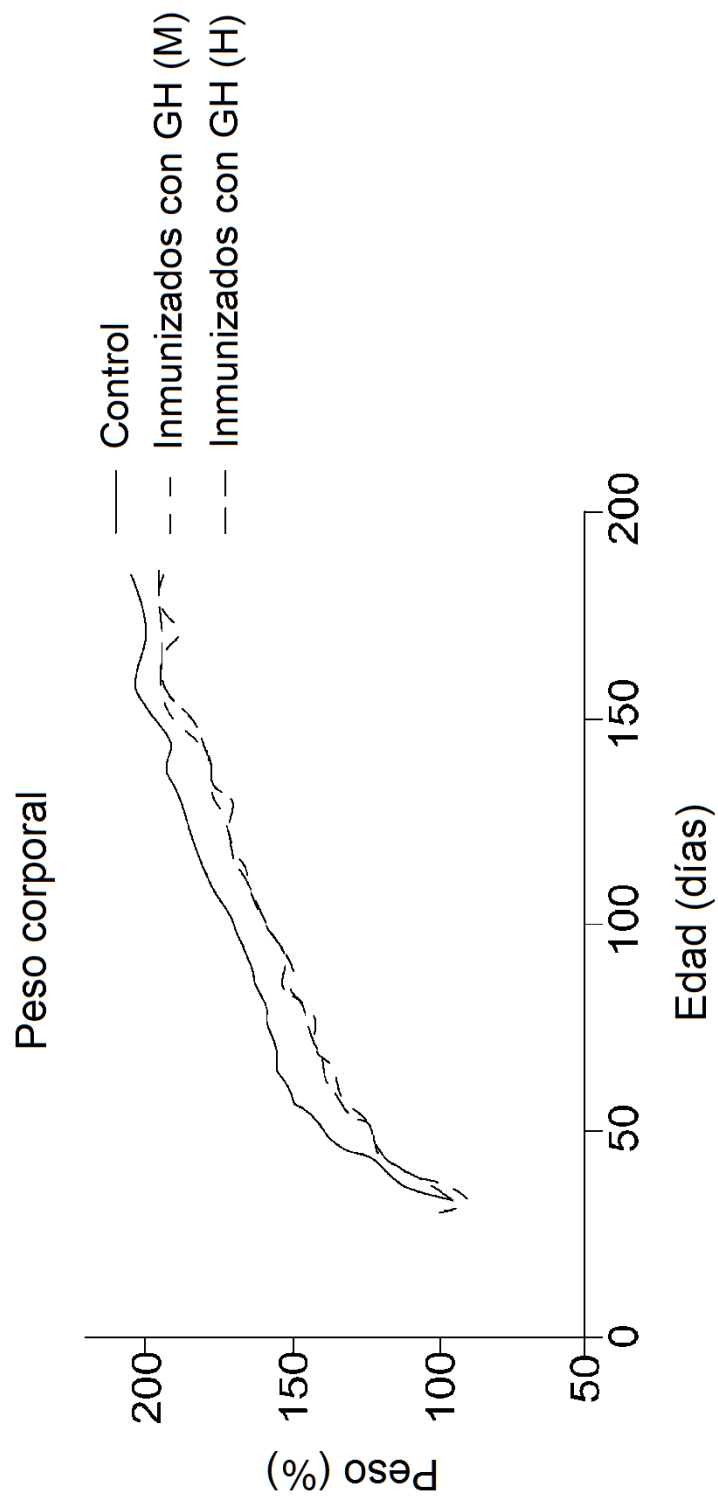


Fig. 13A

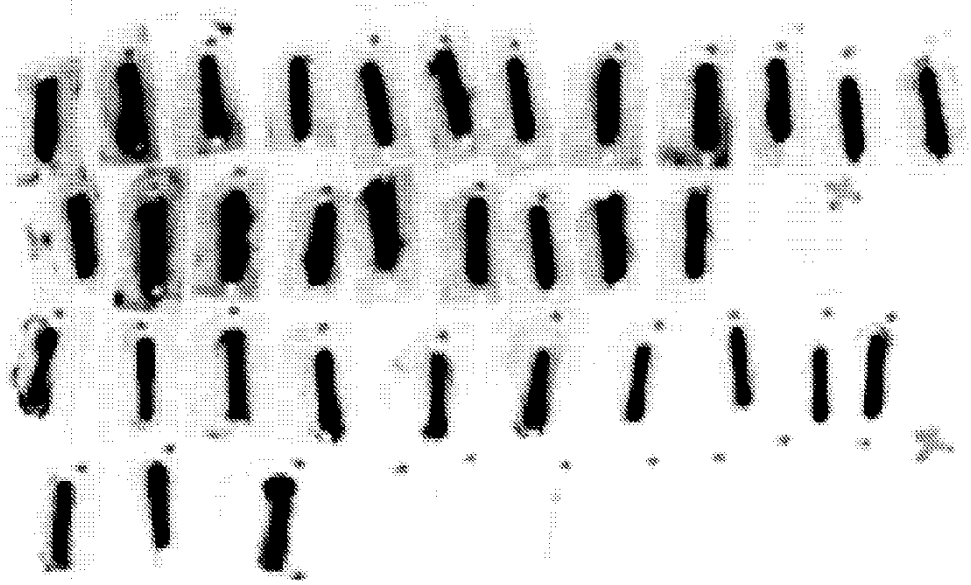


Fig. 13B

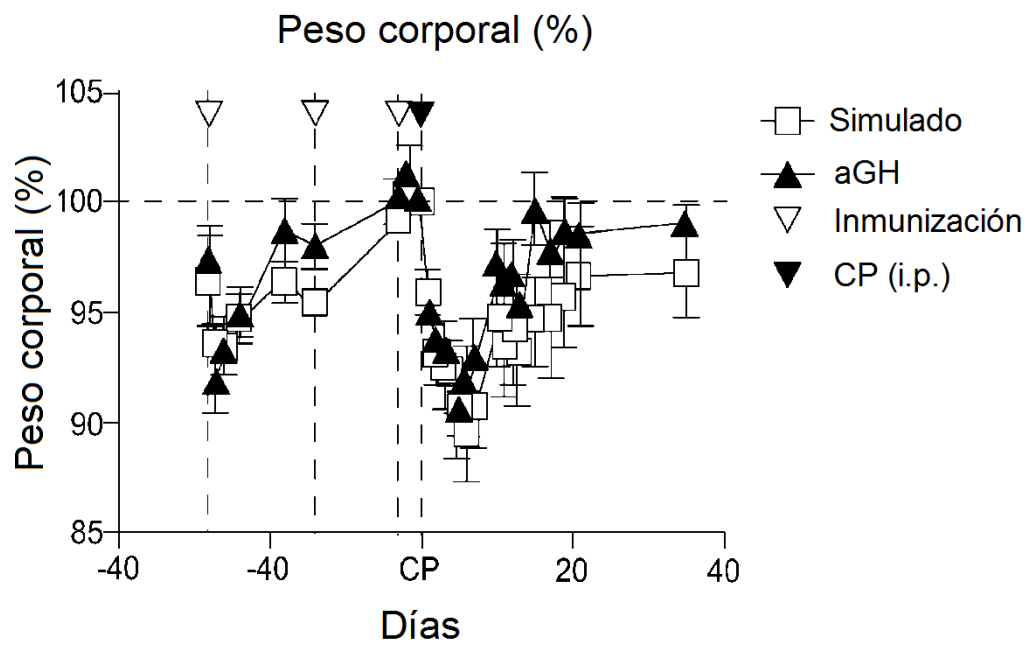


Fig. 14A

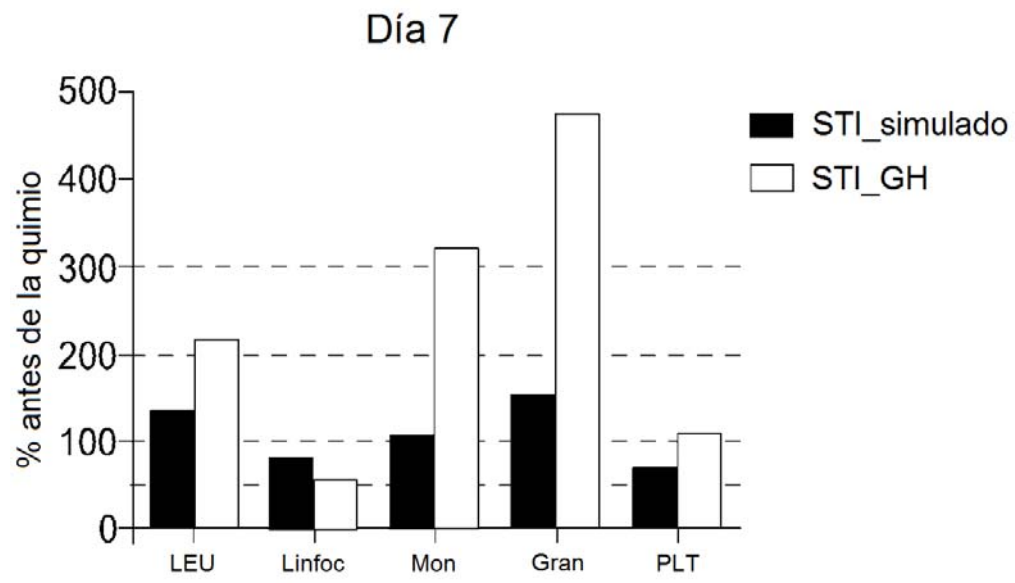


Fig. 14B

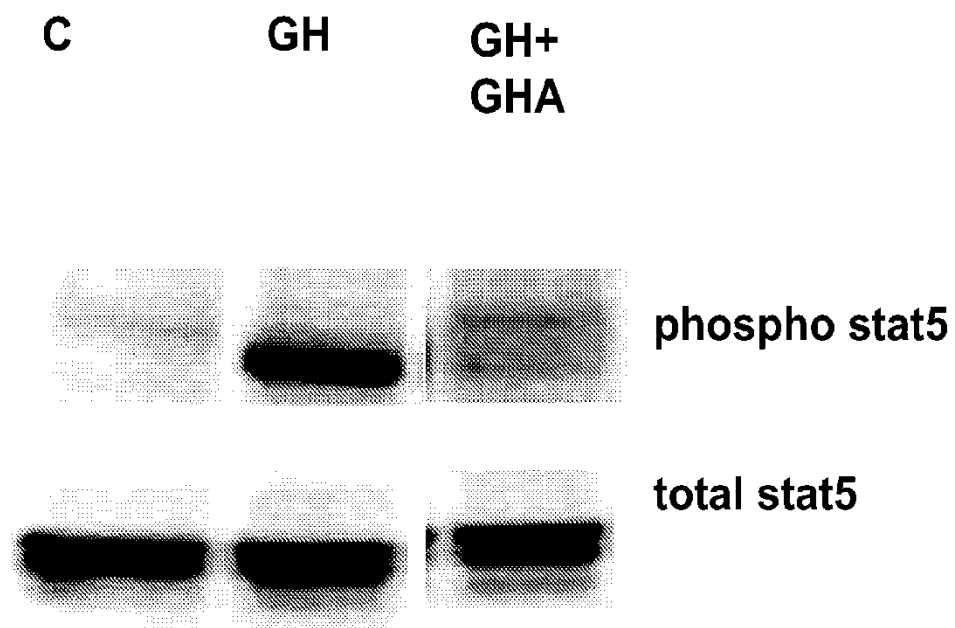


Fig. 15

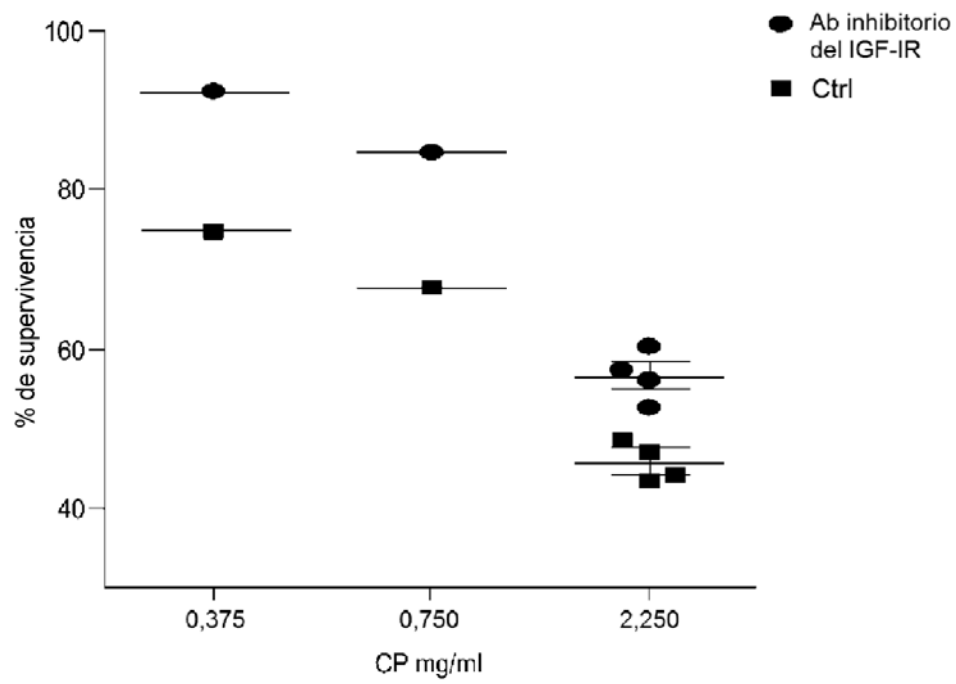


Fig. 16

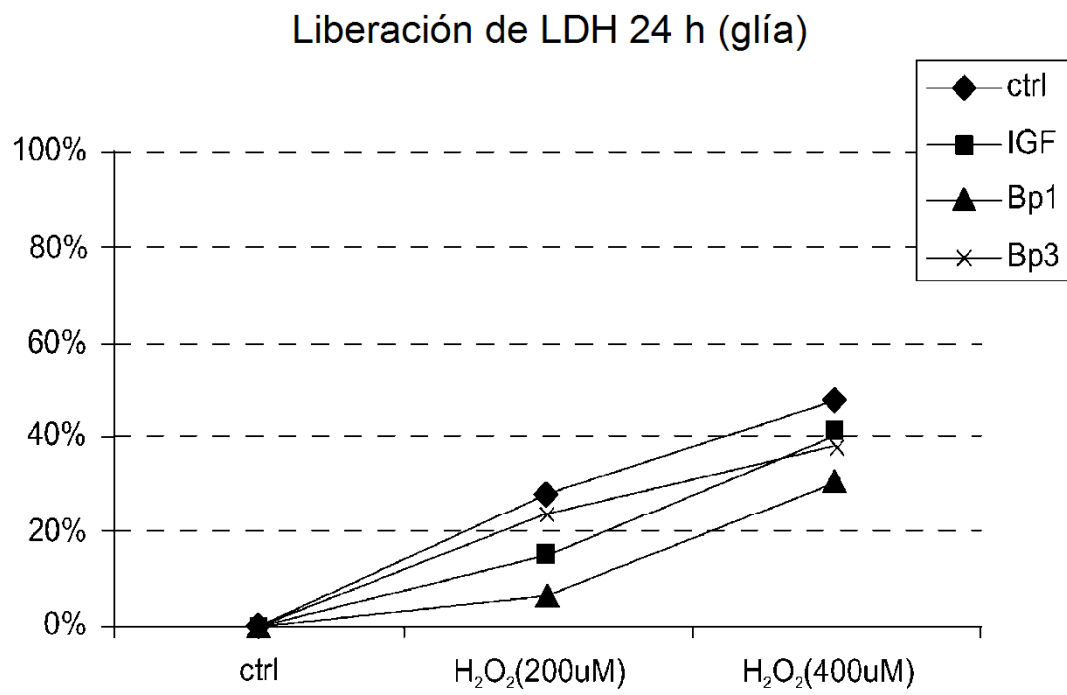


Fig. 17