

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Síntesis y secreción de la hormona de crecimiento en la
diabetes experimental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Concepción González Márquez

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5318225490

T 577.17
GON
sin

SINTESIS Y SECRECION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

EN LA DIABETES EXPERIMENTAL

Tesis presentada para optar
al grado de DOCTOR EN CIENCIAS
por la Licenciada CONCEPCION
GONZALEZ MARQUEZ.

Madrid, 1.979



R36758

A mis padres

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Endocrinología Experimental del Instituto "Gregorio Marañón" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) con la ayuda de una beca del "Plan de Formación de Personal Investigador" del Ministerio de Educación y Ciencia.

Quiero expresar mi gratitud más sincera a la Doctora Jolin Buzo, bajo cuya dirección ha sido realizada la presente tesis y sin cuya orientación, dedicación y constante ayuda no habría sido posible la realización de la misma.

Agradezco al Doctor Pando su colaboración en los experimentos de incorporación de aminoácidos.

También quiero hacer constar mi especial gratitud por su colaboración y eficaz ayuda técnica a la Srta. González, así como a todas las compañeras y compañeros del laboratorio. También debo expresar mi reconocimiento a la Srta. Sánchez por su eficacia e interés en la mecanografía de esta tesis.

INDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	10
<u>I. INTRODUCCION GENERAL</u>	12
<u>A. HORMONA DE CRECIMIENTO</u>	15
<u>1. Consideraciones históricas</u>	15
<u>2. Naturaleza química de la hormona de crecimiento</u>	17
<u>3. Acciones metabólicas de la hormona de crecimiento</u>	18
<u>4. Efectos sobre el metabolismo intermedio</u>	22
<u>5. Factores que regulan la secreción de hormona de crecimiento</u>	25
<u>6. Efectos de otras hormonas sobre la secreción de hormona de crecimiento</u>	28
<u>a) hormonas tiroideas</u>	29
<u>b) esteroides gonadales</u>	30
<u>c) esteroides adrenales</u>	32
<u>B. DIABETES - GENERALIDADES</u>	32
<u>1. Naturaleza química de la insulina</u>	34
<u>2. Secreción de insulina y metabolitos que la regulan</u>	35
<u>3. Acciones metabólicas de la insulina</u>	37
<u>4. Diabetes experimental - Generalidades</u>	38
<u>5. Inducción de la diabetes experimental</u>	40
<u>6. Alteraciones endocrinas en la diabetes</u>	44

a) <u>eje hipófisis - tiroides</u>	44
b) <u>eje hipófisis - adrenales</u>	47
c) <u>eje hipófisis - gónadas</u>	48
d) <u>crecimiento</u>	49
<u>II MATERIALES Y METODOS</u>	53
<u>A. TRATAMIENTOS</u>	55
1. <u>Diabetes</u>	55
2. <u>Hipotiroidismo</u>	55
3. <u>Estímulo de la secreción de GH</u> <u>(prueba del pentobarbital)</u>	57
<u>B. DETERMINACIONES QUIMICAS</u>	58
1. <u>Valoración de glucosa en plasma</u> <u>y orina</u>	58
2. <u>Determinación de la GH hipofisaria por electroforesis en gel de</u> <u>poliacrilamida</u>	59
<u>C. DETERMINACIONES RADIOINMUNOLOGICAS</u>	64
1. <u>Generalidades</u>	64
2. <u>Radioinmunoensayo de GH de rata</u>	74
<u>D. CINETICA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA</u>	80
1. <u>Vida media</u>	81
2. <u>Velocidad de aclaramiento (MCR)</u>	81
3. <u>Velocidad de secreción (SR)</u>	82
4. <u>Fraccionamiento en Sephadex</u> <u>G-100 de la GH en plasma</u>	83
a) <u>GH endógena</u>	83

b) <u>GH-I¹²⁵ administrada por vía intravenosa</u>	83
<u>E. ESTUDIO IN VITRO DE LA SINTESIS HIPOFISARIA DE GH</u>	84
<u>F. METODOS ESTADISTICOS</u>	86
<u>1. Medidas dentro de un grupo</u>	86
a) <u>Media (\bar{x})</u>	86
b) <u>Desviación standard (D.S.)</u>	87
<u>2. Comprobación que los datos de un grupo pertenecen a la misma población estadística</u>	87
<u>3. Comparación entre los valores medios</u>	88
a) <u>entre dos grupos</u>	88
b) <u>comparación entre los valores medios de varios grupos</u>	89
<u>4. Regresión</u>	92
<u>5. Correlación</u>	93
<u>III. RESULTADOS</u>	94
<u>A. VARIACIONES DIURNAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA E HIPOFISIS EN RATAS</u>	95
<u>B. EFECTOS DE LA DIABETES EN RATAS</u>	98
<u>C. EFECTOS COMPARATIVOS DEL HIPOTIROIDISMO INDUCIDO POR C₁₀⁴ PROPILTICOURACILO (PTU) O TIROIDECTOMIA, Y DE LA DIABETES SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL CONTENIDO DE GH EN PLASMA E HIPOFISIS</u>	108

<u>D. EFECTOS DE LA INSULINA EN RATAS DIABETICAS</u>	111
<u>E. DETERMINACION DEL PARALELISMO EXISTENTE ENTRE DILUCIONES SUCESIVAS DEL PLASMA DE RATA CONTROL Y DIABETICA Y DE UNA SOLUCION DE r-GH PURIFICADA DE RATA</u>	117
<u>F. FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-100 DE LA GH EN PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DIABETICAS</u>	120
1. <u>Administración intravenosa de r-GH-I¹²⁵</u>	120
2. <u>GH endógena</u>	130
<u>G. CINETICA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA</u>	131
a) <u>Vida media</u>	138
b) <u>Velocidad de aclaramiento (MCR)</u>	140
c) <u>Velocidad de secreción (SR)</u>	144
<u>H. CONCENTRACION PLASMATICA DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN RESPUESTA A LA ESTIMULACION CON PENTOBARBITAL</u>	144
<u>I. SINTESIS DE GH EN HIPOFISIS INCUBADAS IN VITRO</u>	151
<u>IV DISCUSION</u>	157
<u>A. VARIACIONES DIURNAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA E HIPOFISIS</u>	158
<u>B. EFECTOS DE LA DIABETES EN RATAS</u>	160

<u>C. EFECTOS COMPARATIVOS DEL HIPOTIROIDISMO INDUCIDO POR ClO_4^-, PROPILTIOURACILO (PTU) O TIROIDECTOMIA, Y DE LA DIABETES SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL CONTENIDO DE GH EN PLASMA E HIPOFISIS</u>	168
<u>D. EFECTOS DE LA INSULINA EN RATAS DIABETICAS</u>	171
<u>E. DETERMINACION DEL PARALELISMO EXISTENTE ENTRE DILUCIONES SUCESIVAS DEL PLASMA DE RATA CONTROL Y DIABETICA Y DE UNA SOLUCION DE r-GH PURIFICADA DE RATA</u>	175
<u>F. FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-100 DE LA GH EN PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DIABETICAS</u>	180
<u>Administración intravenosa de r-GH-I¹²⁵</u>	181
<u>GH endógena</u>	185
<u>G. CINETICA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA</u>	190
<u>Vida media</u>	191
<u>Velocidad de aclaramiento (MCR)</u>	194
<u>Velocidad de secreción (SR)</u>	197
<u>H. CONCENTRACION PLASMATICA DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN RESPUESTA A LA ESTIMULACION CON PENTOBARBITAL</u>	201
<u>I. SINTESIS DE GH EN HIPOFISIS INCUBADAS IN VITRO</u>	205
<u>V CONCLUSIONES</u>	209

VI BIBLIOGRAFIA 220

Clave de abreviaturas

Ac	Anticuerpo
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
Ag	Antígeno
B	Hormona ligada al anticuerpo
Bl	Blancos
B _o	Ceros
BSA	Albúmina sérica bovina
c.p.m.	Cuentas por minuto
D.S	Desviación standard
EDTA	Etilen diamino tetracetico
F	Hormona marcada libre
GH	Hormona de crecimiento
GHRF	Hormona hipotalámica estimulante de la secreción de GH
GHIF	Hormona hipotalámica inhibidora de la secreción de GH
I	Insulina
I ¹²⁵	Iodo radioactivo
LID	Dieta pobre en iodo
PB	Pentobarbital
PBS	Buffer fosfosalino
PTU	6-propil 2-tiouracilo
RIA	Radioinmunoensayo
RPB	% de radioactividad referida a los ceros
r.p.m.	Revoluciones por minuto
STZ	Streptozotocin
T ₄	Tetraiodotironina o tiroxina
T ₃	Triiodotironina
TSH	Hormona tirotrona

TRH	Hormona hipotalámica liberadora de TSH
Thx	Tiroidectomía
UI	Unidades de Insulina

I. INTRODUCCION GENERAL
=====

I. INTRODUCCION GENERAL

El crecimiento, diferenciación y desarrollo de un organismo depende tanto de los reguladores internos inherentes al individuo como de influencias externas. Entre estas últimas, el aporte de oxígeno y de sustancias nutritivas son de gran importancia, mientras que aquellos procesos que lesionan determinados tejidos o deterioran el sistema gastrointestinal, cardiovascular, pulmonar o renal, tienen influencias desfavorables sobre el crecimiento total o sobre una parte del mismo.

Aún es más espectacular, el papel de los reguladores intrínsecos sobre el crecimiento y diferenciación celular dentro de un esquema ordenado, desde la época de formación del cigoto hasta la madurez plena del adulto. Entre estos, los factores genéticos, innatos en las células, y las hormonas son reguladores importantes del crecimiento. El patrón genético o "genotipo" determina el plan de crecimiento, desarrollo y constitución biológica del individuo, mientras que las hormonas, a través de sus acciones biológicas, lo modulan.

Desde el punto de vista biológico, el crecimiento y desarrollo de un organismo se puede medir por varios índices. Según Weiss (1955) estos criterios son: reproducción, crecimiento lineal, ganancia de peso, aumento de masa orgánica, síntesis de proteínas y síntesis de otros componentes estructurales diferentes a las proteínas.

Cada uno de estos parámetros presentan diferentes patrones según la especie. En ratas existe un crecimiento continuo a lo largo de la vida, aunque a una velocidad progresivamente menos intensa. En humanos, por el contrario, existen dos períodos de crecimiento intenso. El primero durante la infancia, el cual se

puede considerarse como una continuación del crecimiento fetal, y el segundo durante la pubertad. Dentro de una determinada especie, existen diferencias del crecimiento entre sexos que parecen deberse a los esteroides gonadales. El crecimiento final de un individuo depende tanto de la velocidad de este proceso como de la duración del mismo, lo que viene determinado por el momento de fusión de las epífisis.

El crecimiento somático y desarrollo dependen muy directamente de cada una de las siguientes hormonas: hormona hipofisaria de crecimiento (GH), insulina, hormonas tiroideas (T_4 y T_3) andrógenos y estrógenos. Cada una de ellas estimula el anabolismo proteico y aumentan la retención de nitrógeno, fósforo y calcio necesarios para el armazón proteico y óseo. Quedan aún muchos puntos por aclarar sobre el mecanismo(s) de acción de estas hormonas sobre estos procesos, pero el resultado final es un crecimiento acelerado que finaliza con el cierre de las epífisis. Es muy probable que cada una de las hormonas mencionadas manifiesten sus efectos en diferente momento de la vida y a distinto nivel.

A nivel celular, el crecimiento se puede reducir a dos de sus funciones más elementales, división celular y síntesis de proteínas (Enesco y LeBlond 1962, Winick y Noble 1965). Boivin y Vendreley (1948) propusieron por vez primera la constancia del DNA en un núcleo diploide en una especie determinada, lo que fue posteriormente confirmado por Mirsky y Ris (1949). Esta constancia del DNA es de gran utilidad en los estudios de los patrones de crecimiento celular, ya que el aumento del contenido de DNA es índice de aumento de celularidad (hiperplasia) (Davidson y Leslie 1950). El aumento del contenido total de proteínas representa otro aspecto del crecimiento de un tejido,

y ello repercute en un aumento del tamaño de la célula (hipertrofia). En ratas, existen dos tipos de poblaciones de células con diferentes características de crecimiento. En una predomina el aumento de tamaño, contribuyendo así al del tejido u órgano al que pertenece; mientras que en el otro tipo de población el crecimiento tisular tiene lugar principalmente por un aumento del número de células. Aquellos tejidos, cuyo crecimiento se realiza tanto por una hiperplasia como por una hipertrofia celular, el período de crecimiento se divide en tres etapas (Enesco y LeBlond 1962). El primero, se caracteriza por una proliferación celular muy intensa, en el segundo coexisten la división celular, a una velocidad progresivamente decreciente, junto con la iniciación del aumento del tamaño de la célula, caracterizándose el tercer período por un aumento creciente del último proceso.

Sin embargo cada especie, y aún cada tejido en un mismo individuo, presentan patrones de crecimiento claramente definidos. En ratas, la síntesis de DNA en cerebro y pulmón finaliza hacia los 22 días de edad (Winick y Noble 1965), mientras que en músculo continúa hasta la pubertad (Cheek y cols. 1968) En humanos, aunque no están claramente establecidos los patrones de crecimiento para cada tejido, se sabe que en cerebro, la síntesis del DNA cesa entre los 12 y 18 meses (Winick y cols. 1970). El tejido linfóide prolifera por un aumento del número de células, junto con un aumento discreto de la masa celular.

A. HORMONA DE CRECIMIENTO

1. Consideraciones históricas

Desde muy pronto, el enanismo como un retraso desproporcionado

nal del crecimiento llamó la atención de los endocrinólogos interesados en el campo del crecimiento y desarrollo, y hubo una serie de trabajos que señalaron a la hipófisis como la causa responsable de esta alteración. En 1910 Crowe y cols. observaron los efectos de la hipofisectomía en perros y llegaron a la conclusión que la falta de hipófisis era incompatible con la vida, a la vez que citaban a Caselli como la primera persona que en 1900 había descrito alteraciones en perros hipofisectomizados. En 1912 Aschner identificó a la hipófisis anterior como la región responsable del crecimiento, y Smith (1916, 1930) al realizar y perfeccionar la técnica de hipofisectomía en ratas, indicó que la secreción de algún factor hipofisario era en cierto modo el responsable del crecimiento somático. Las ratas hipofisectomizadas, además de sufrir una parada del crecimiento, presentaban una falta de desarrollo sexual junto con una involución de la glándula tiroides.

Merecen especial interés los trabajos de Evans y Long (1921, 1922) al demostrar los efectos de los extractos hipofisarios bovinos sobre el crecimiento de ratas hembras adultas y de animales hipofisectomizados. Estos resultados estimularon la realización de numerosos estudios por los que se confirmó plenamente que los extractos hipofisarios estimulaban el crecimiento y el aumento de peso tanto en animales hipofisectomizados como en normales (Evans y cols. 1948; Li y cols. 1949), a la vez que despertaron el interés por conocer el modo en que los extractos hipofisarios actuaban sobre el metabolismo para inducir el crecimiento.

Teel y Cushing (1930) observaron que el gigantismo producido en perros por inyección de los extractos hipofisarios, iba acompañado de una disminución en la concentración de nitró

geno en sangre y de la excreción urinaria de nitrógeno y fósforo, lo que parecía sugerir que los extractos aumentaban el almacenamiento de nitrógeno en los tejidos. El análisis de los carcas de estos animales evidenció, que el aumento de peso estaba producido por un acúmulo de nuevas proteínas y agua en los tejidos, y no por un aumento de los depósitos grasos (Bierring y Nielsen 1932, Lee y Ayres 1936, Lee y Shaffer 1934, Li y Evans 1948). El efecto de los extractos sobre el crecimiento no se podía explicar por un aumento en el consumo de comida, ya que Lee y Shaffer (1934) encontraron un efecto positivo de dichos extractos sobre el crecimiento en animales que consumían la misma ingesta que los controles. Por otra parte numerosos trabajos revisados por Rusell (1957), pusieron de manifiesto que los animales hipofisectomizados en ayunas pierden gran cantidad de proteínas y presentan una excreción muy elevada de nitrógeno en orina. Los extractos hipofisarios, y la hormona de crecimiento, disminuían asimismo la concentración plasmática de aminoácidos y urea (Li y Evans 1948, Long 1943). Estos resultados llevaron a la conclusión de que la hormona de crecimiento inducía crecimiento y retención de nitrógeno por disminuir la velocidad de ruptura de las proteínas tisulares. En efecto, posteriormente Barlett y Gaebler (1952) confirmaron que la hormona de crecimiento estimula la síntesis de proteínas e inhibe su catabolismo, llegando a resultados similares otros autores (Rusell 1955).

2. Naturaleza química de la hormona de crecimiento

La naturaleza química de la hormona de crecimiento ha sido estudiada principalmente por el grupo de Li (1968) utilizando técnicas de ultracentrifugación, electroforesis, cromatografía, electrodiálisis, distribución en contracorriente y aná

lisis de los residuos terminales, llegando a la conclusión de que se trata de una holoproteína de peso molecular 21.500 dalton, compuesta de 188 aas y de punto isoeléctrico 4.9. Posteriormente en 1972, estos mismos autores llegaron a la conclusión de que la hormona estaba formada por dos aminoácidos más de los inicialmente descritos, dando asimismo otro orden en la posición de alguno de ellos.

Como resultado de los estudios encaminados a determinar el fragmento de GH en el que reside la actividad biológica, se llegó a la conclusión de que no se requiere la integridad de la molécula para producir la mayor parte de los efectos metabólicos de la hormona. Parece que la hormona contiene un núcleo activo o secuencia de aminoácidos responsable de la actividad biológica. En estudios realizados con fragmentos de GH, de estructura conocida, se ha visto que la actividad reside en las 2/3 partes del n-terminal (Kostyo 1974) siendo los fragmentos del C-terminal biológicamente inactivos. El papel de estos fragmentos parece que es proteger la estabilidad de la hormona en plasma. Su poder antigénico se comenzó a estudiar en 1958, siendo capaz de producir anticuerpos específicos, lo cual constituye la base de los actuales métodos de valoración.

3. Acciones metabólicas de la hormona de crecimiento

Basándose en el hecho de que para un crecimiento normal se requiere la presencia de GH, sería lógico esperar una gran secreción hormonal en los períodos de crecimiento activo, que disminuiría gradualmente a medida que transcurren los años, lo cual es cierto sólo en determinados casos. En el feto humano, la hormona de crecimiento se detecta en plasma a los 70 días de gestación y aumenta gradualmente hasta alcanzar un máximo

entre los 124-164 días (Kaplan y Grumbach 1972) observándose niveles del rango de una acromegalia activa; posteriormente los niveles circulantes descienden progresivamente hasta el momento del parto, donde los valores sobrepasan incluso a los encontrados en adultos. En rata, se ha medido el contenido hipofisario de GH, pudiéndose detectar por vez primera a los 19 días de gestación, posteriormente los niveles aumentan hasta alcanzar un máximo a los 10 días del nacimiento (Birge y cols. 1967).

El patrón de secreción a lo largo de las 24 horas del día no presenta diferencias entre niños y adultos, aunque la secreción hormonal en el período del sueño es mucho más acusada en individuos jóvenes (Carlson y cols. 1972, Finkelstein y cols. 1972), y desciende gradualmente a medida que avanzan los años, de tal modo que hacia los 60 años no existe prácticamente variaciones en la secreción en relación con el sueño, siendo precisamente estas diferencias lo que justifica los niveles más altos de la hormona encontrados en jóvenes.

La hormona de crecimiento posee también una función reguladora sobre otros procesos metabólicos además del crecimiento, ya que interviene en la regulación del metabolismo graso, hidrocarbonado, proteico y en el de ácidos nucleicos. De todas las hormonas adenohipofisarias, la hormona de crecimiento, es la única que parece no requerir la mediación de un órgano diana específico para ejercer sus efectos. Los tejidos en los que principalmente ejerce su acción hormonal son a nivel de músculo, hígado, hueso y tejido adiposo.

La acción de la GH sobre el tejido óseo se refleja en el crecimiento del esqueleto. Este último hecho se realiza a través de la incorporación de sulfato que penetra en los condrocitos del cartílago en desarrollo, los cuales a su vez lo incor-

poran a sulfato de condroitina, que constituye el centro del mucopolisacárido del cartílago. El aumento de la incorporación de sulfato, demostrable tanto in vivo como in vitro, representa un baremo de la acción de la hormona de crecimiento. El análisis de este parámetro planteó serios problemas al observarse, que la adición de hormona de crecimiento a fragmentos de cartílagos de mamíferos incubados in vitro no estimulaba la incorporación de sulfato si el tejido procedía de ratas hipofisectomizadas (Salmon y Daughaday 1956, 1957). Por otra parte, el suero procedente de ratas normales producía dicho estímulo sin la adición de la hormona, no consiguiéndose ningún efecto positivo si el suero era de animales hipofisectomizados. Estos y otros resultados llevaron a Salmon y Daughaday a la conclusión de que la acción de la hormona de crecimiento sobre la síntesis del sulfato de condroitina, está mediada por un componente no dializable del suero, y que la naturaleza de este componente era muy probablemente peptídica. Dicho componente, al que llamaron factor de sulfatación o somatomedina, se supone que se sintetiza en el hígado bajo el influjo de la hormona de crecimiento, desde donde se libera posteriormente a la sangre. Por tanto, ello explicaría el que el factor de sulfatación no esté presente en el plasma del animal hipofisectomizado, pero que se puede formar si dichos animales se tratan con hormona de crecimiento. De manera análoga, se eleva el nivel de este factor en plasma por el tratamiento con hormona de crecimiento de los pacientes con enanismo hipofisario.

Además del efecto del factor de sulfatación sobre la incorporación de sulfato, participa en numerosos aspectos anabólicos. Por ejemplo, estimula la incorporación de leucina a la condromucoproteína, de uridina al RNA y de timidina al DNA, y es posible que el efecto de sulfatación se deba fundamentalmente a su acción estimulante sobre la síntesis de la parte pro-

teica de los complejos mucopolisacárido-proteína de la matriz del esqueleto. De cualquier modo, hay datos suficientes, para considerar a la somatomedina como una segunda hormona que controla la acción de la hormona de crecimiento sobre el tejido esquelético. En humanos, se han aislado las somatomedinas A, B, y C. En el tejido adiposo, la somatomedina estimula la entrada y posterior oxidación de glucosa en la célula, e inhibe in vitro la descarga de glicerol previamente estimulada por epinefrina. En este último aspecto, una unidad de somatomedina es equivalente en su acción a 30-50 μ U de insulina (Hall y Uthne 1971). por lo que las somatomedinas son "insulin-like factor" (es decir moléculas equivalentes en su acción a la insulina). Incluso se ha llegado a postular, que de toda la actividad insulínica presente en el plasma, aquella que no es suprimible con anticuerpos anti-insulina correspondería a la familia de las somatomedinas (Hall y Uthne 1971).

Además de la GH, otras hormonas como la insulina o las hormonas tiroideas actúan sobre el crecimiento y desarrollo óseo. La tiroidectomía en los primeros días de la vida disminuye el crecimiento y la maduración del hueso (Salmon 1938, Scow y Simpson 1945). Estos efectos están causados tanto por la falta de estas hormonas como por la repercusión que ello conlleva a nivel hipofisario, ya que la ausencia de hormonas tiroideas induce degranulación y disminución del número de las somatotropas adenohipofisarias productoras de GH (Contopoulos 1958, Koneff y cols. 1949). En contraste con los cambios óseos de las ratas hipofisectomizadas, las tiroidectomizadas presentan cierto grado de proliferación y erosión de los osteoclastos en la placa epifisial. El tratamiento de los animales tiroidectomizados con T_4 restaura el crecimiento y la maduración del esqueleto (Ray y cols. 1950, Salmon 1938), debiéndose estos efectos parcialmente a la restauración de

la actividad adenohipofisaria (Koneff y cols. 1949). La respuesta del animal tiroidectomizado a la hormona de crecimiento, es distinta que al tratamiento con hormonas tiroideas, ya que la GH induce sólo un aumento en el crecimiento, pero no en la maduración. Los efectos individuales de la hormona de crecimiento y la tiroxina sobre el crecimiento se pusieron de manifiesto en ratas tiroidectomizadas al nacimiento e hipofisectomizadas a los 20 días de edad (Ray y cols. 1954, Simpson y cols. 1950). En estos animales, la tiroxina tiene un efecto estimulador importante sobre la maduración, y un efecto pequeño sobre el crecimiento, mientras que la GH estimula tanto el crecimiento como la condrogénesis. El tratamiento combinado de ambas hormonas produce una respuesta máxima en cada uno de los parámetros.

En cuanto al efecto de la insulina, parece que con independencia al de la hormona de crecimiento, tiene un papel en la síntesis de la matriz proteica del hueso, y es capaz de aumentar la condrogénesis inducida por la hormona de crecimiento.

Otras hormonas como el ACTH, corticoides, estrógenos y testosterona afectan también el crecimiento óseo. Generalmente, el ACTH, los corticoides y los estrógenos inhiben el crecimiento, mientras que la testosterona lo aumenta ligeramente para lo cual requiere la presencia de una hipófisis funcionando.

4. Efectos sobre el metabolismo intermediario

Teniendo en cuenta la complejidad del proceso de crecimiento, no es de extrañar que la GH tenga otros parámetros de actividad, además de su efecto sobre el crecimiento esquelético.

Uno de ellos es sobre el equilibrio de nitrógeno. En 1957, Russell demostró que la administración de GH a animales en ayunas, reducía la concentración plasmática de aminoácidos, lo que correspondía a un aumento de la captación de éstos por los tejidos y su posterior incorporación a proteínas. Noall y cols. (1957) y Riggs y Walker (1960) utilizando el ácido aminoisobutírico, un aminoácido no metabolizable, demostraron su paso desde el plasma a los tejidos, lo cual tenía lugar 1-2 horas después de la administración de la hormona. Existen pruebas que parecen demostrar que el efecto de la GH e insulina sobre la captación de aminoácidos por los tejidos está mediado por mecanismos diferentes. El efecto de cada una de estas hormonas no es sobre todos los aminoácidos naturales, siendo de interés, el hecho de que el grupo de aminoácidos afectados por la hormona de crecimiento no es el mismo que el estimulado por la insulina. Por otra parte, la acción in vitro de la insulina sobre el transporte de aminoácidos, no está inhibida por la presencia de teofilina en el medio de incubación (Rillema y cols. 1973) a diferencia de lo que ocurre con el efecto de la GH (Payne y Kostyo 1970), de lo que parece deducirse que el nivel de nucleótido cíclico no es mediador en la acción de la insulina sobre este proceso metabólico. Esto indica que existen diferencias fundamentales en el modo de acción de ambas hormonas sobre el transporte de aminoácidos.

La acción metabólica más importante de la hormona de crecimiento sobre la síntesis proteica, es mantener la velocidad de replicación de las proteínas, lo que hace que tenga lugar el crecimiento celular. En un sistema in vitro, concentraciones de GH tan bajas como 1 µg/ml inducen un aumento de la velocidad de incorporación de aminoácidos a proteínas entre un 30 y un 50 %.

En cuanto al efecto de la hormona de crecimiento sobre el metabolismo de ácidos nucleicos, se sabe que la hipofisectomía lleva consigo un descenso de la síntesis de RNA en hígado, lo que va acompañado de una disminución en el número de ribosomas así como de la cantidad de RNA mensajero y de transferencia. La administración de GH a ratas hipofisectomizadas revierte los efectos antes mencionados sobre la síntesis de RNA, aumentando posteriormente la síntesis de proteínas como resultado del incremento en la formación de RNA mensajero.

El efecto principal de la GH sobre el metabolismo graso es una movilización de los depósitos grasos periféricos. Ello va asociado a un incremento del catabolismo de las grasas, lo que puede ponerse de manifiesto por un descenso del cociente respiratorio y por un aumento de la cetogénesis. La grasa movilizada pasa al plasma como ácidos grasos no esterificados; en humanos dicho nivel se duplica a la hora de la inyección de 1 mg de GH. Se cree que los niveles fisiológicos endógenos de GH, no son de gran relevancia como reguladores de la lipólisis.

El papel de la GH sobre el metabolismo de carbohidratos es importante. Tras la inyección de GH, hay un período inicial en el cual se produce un descenso del nivel de glucosa en sangre (Altszuler y cols. 1968, Goodman 1965, 1968), mientras que un tratamiento prolongado con la hormona provoca un aumento de la liberación de glucosa hepática, debido a un aumento de la gluconeogénesis.

Por otra parte, la GH disminuye la tolerancia a la glucosa lo que se evidencia tras la administración i.v. del carbohidrato. Ello es consecuencia de una disminución tanto del transporte de la glucosa al tejido muscular y adiposo, así

como de una disminución de la fosforilación de la glucosa que penetra en el músculo. La consecuencia final es una hiperglucemia, normalmente transitoria, ya que se produce una liberación de insulina como respuesta a los altos niveles de glucosa en plasma, y en parte como respuesta al estímulo que la GH ejerce sobre la secreción de insulina. Hay algo paradójico en todo esto, ya que la hormona de crecimiento por una parte estimula la secreción de insulina, mientras que por otro lado inhibe su acción sobre el metabolismo de la glucosa, lo que hace que la GH posea una acción diabética. Si se administra GH a perros durante un tiempo suficientemente largo y en cantidad suficiente, al provocar una secreción excesiva de insulina, las células β sufren un daño grave que puede ser incluso irreparable, pudiendo aparecer una diabetes persistente acompañada de cetosis (Altzuler y cols. 1968, Campbell 1955, Young 1953).

5. Factores que regulan la secreción de hormona de crecimiento

Tras el desarrollo del radioinmunoensayo, el cual permite medir niveles de GH en plasma, se ha podido saber que la secreción de GH es una función muy lábil que responde a ciclos neurales intrínsecos como el sueño (Takahashi y cols. 1968). Un brusco aumento de la secreción de GH ocurre durante la primera hora de sueño profundo y puede durar 2 ó 3 horas; si este tipo de sueño se evita o se pospone, la secreción de GH es igualmente evitada o pospuesta (Hunter y Rigal 1966, Quabbe y cols. 1966) La secreción de GH responde asimismo a otros estímulos como la ingesta, la infusión de arginina, el ejercicio, estímulos psicológicos y stresantes, así como a factores metabólicos y hormonales, todo lo cual apoya la idea que el sistema nervioso está involucrado en la secreción de hormona de crecimiento a través de la mediación de uno o más factores hipotalámicos.

En primates, la hipoglucemia es un factor que desencadena la secreción de GH. En humanos basta un ligero descenso de la glucosa plasmática, aún dentro del rango de la normalidad, para que se produzca la descarga de hormona de crecimiento. Parece ser que como estímulo para la secreción, es más importante un descenso brusco que el nivel específico al que desciende (Glick 1970). Aunque la secreción ocurre de modo intermitente e irregular, sus efectos biológicos a nivel de tejidos se cree que son tamponados a través de la somatomedina.

Dado el importante papel de la hormona de crecimiento en la síntesis de proteínas, es lógico el que éstas y los aminoácidos desencadenen un aumento en la secreción de GH (Rabinowitz y cols. 1968). En efecto, tanto la administración de dosis farmacológicas de arginina, histidina, lisina, fenilalanina, leucina, valina, metionina y treonina, como los cambios que ocurren tras una ingesta rica en proteínas provocan un aumento de la secreción de hormona de crecimiento. La infusión de arginina como medida de la capacidad secretora hipofisaria es una prueba de gran utilidad clínica, ya que dicha infusión carece de efectos tóxicos.

Los lípidos y otros metabolitos grasos juegan escaso papel en la regulación de la secreción de hormona de crecimiento, ya que sólo en concentraciones farmacológicas son capaces de inhibirla (Kipnis y cols. 1969).

En 1945 Young señaló por vez primera la similitud entre las alteraciones metabólicas que ocurren en el ayuno y las que se inducen tras la administración de GH. Levin y Farber (1952) propusieron que durante el ayuno se incrementa la secreción de una hormona hipofisaria responsable de la movilización de los depósitos grasos, y fueron Goodman y Knobil (1959) quienes atribuye

ron a la GH dicho papel. Sin embargo, Glick (1969) no encontró variaciones de los niveles de GH durante el ayuno, aunque anteriormente Roth y cols. (1963, 1964) habían demostrado en humanos un aumento de la concentración de GH en plasma tras el ayuno prolongado o en la malnutrición. En otras especies de animales (conejo, rata, mono) el comportamiento de la GH durante el ayuno es semejante al de humanos, mientras que en cabras no se han detectado variaciones de los niveles circulantes de GH con el ayuno de 7 días.

Según Kipnis y cols. (1969) la secreción de GH durante el ayuno es un hecho secundario, ya que la adaptación metabólica en esta situación es muy similar en todas las especies de mamíferos estudiadas, mientras que el patrón de secreción varía según la especie. El cambio hormonal que se da en todas las especies estudiadas en situación de ayuno es un descenso de los niveles plasmáticos de insulina, y dicha hormona es el agente antilipolítico más potente que se conoce (Kipnis y cols. 1969).

Otro factor que modifica la secreción de hormona de crecimiento es el stress, ya sea este de tipo físico como psicológico. Pero mientras en humanos, ambos tipos de stress provocan la secreción de GH (Brown y Reichlin 1972, Glick 1969), en rata y ratón provocan un brusco descenso de los niveles plasmáticos de la hormona, afectando a veces incluso al contenido hipofisario de ella (Cerchia y cols. 1971, Schalch y Reichlin 1968, Takahashi y cols. 1971). La repercusión de estas variaciones sobre la totalidad del organismo se desconoce. En algunos casos de stress crónico, las alteraciones en la secreción de GH pueden ser irreversibles, como lo demuestra el hecho que niños criados en ambientes desagradables o inadecuados desarrollan una inhibición irreversible de la secreción de GH y de la respuesta a estímulos típicos como a la hipoglucemia o a la infu-

sión de arginina (Powell y cols. 1967). Por el contrario, en ratas en situaciones similares, es decir bajo stress crónico, existe una hipersecreción de la hormona (Schalch y Reichlin 1966, Takahashi y cols. 1971).

Casi todos los factores que estimulan la secreción de GH en el hombre y otras especies, en ratas tienen un efecto contrario. Es de interés el señalar que así como la anestesia con éter disminuye los niveles circulantes de GH en ratas, el pentobarbital los aumenta, hecho que se ha aprovechado para montar una prueba de la reserva hipofisaria de GH en estos animales (Schalch y Reichlin 1966, Takahashi y cols. 1971 Howard y Martin 1971, Kokka y cols. 1972).

Por otra parte, las células somatotropas hipofisarias productoras de GH se hallan bajo el control de dos factores hipotalámicos, uno estimulador de la secreción, GHRF, y otro inhibidor de ella, GHIF, llamado también somatostatina (Ling y cols. 1973). Ambos son de naturaleza proteica, siendo peptidos de pequeño tamaño. Según algunos autores (Youdaev y cols. 1973), el factor de liberación GHRF es un tripeptido, mientras que otros mantienen que es un decapeptido (Schally y cols. 1971), por el contrario parece que está bien demostrado que el GHIF posee 13 aminoácidos en su secuencia. La somatostatina es capaz de inhibir la secreción de GH en humanos, rata, mono, perro y en pacientes con acromegalia (Krulich y Cann 1969). También disminuye la respuesta del TSH al TRH, así como la secreción pancreática de insulina y glucagón. La importancia del GHIF en la fisiología de la regulación de la secreción de GH se desconoce.

6. Efectos de otras hormonas sobre la secreción de hormona de crecimiento.

a) hormonas tiroideas

La tiroidectomía en un animal joven en fase de crecimiento induce una disminución o incluso una inhibición total de la velocidad de crecimiento. Ello se debe principalmente a que una carencia intensa de hormonas tiroideas produce degranulación de las células somatotropas hipofisarias, llegando incluso a disminuir su número. Este hecho que fue descrito por vez primera en 1917 por Kojima, ha sido confirmado por numerosos autores (Evans y cols. 1964, Contopoulos y cols. 1963). Posteriormente, la introducción del RIA de GH ha permitido evidenciar que los niveles circulantes de GH en plasma del animal tiroidectomizado son más bajos que los de las ratas controles de la misma edad (Eisenberg y cols. 1972, Montes y cols. 1977). El tratamiento con dosis pequeñas de hormonas tiroideas, 0.20 µg/100 g/día, revierte los efectos de la tiroidectomía sobre el crecimiento, al normalizar tanto el contenido hipofisario así como la concentración plasmática de la hormona (Hervás y cols. 1976, Montes y cols. 1977).

El tratamiento con hormona de crecimiento aunque aumenta el crecimiento de las ratas tiroidectomizadas, no llega sin embargo a normalizarlo, quizás porque ello da lugar a la formación de anticuerpos anti-GH, por la falta directa de hormonas tiroideas, o por la repercusión que ello tiene sobre la secreción de una hormona como la insulina tan implicada en el proceso de crecimiento (Jolin y cols. 1974, Jolin y Montes, 1974). En humanos hipotiroideos, tanto en niños como en adultos, está disminuida la secreción de GH en respuesta a estímulos como el de la arginina o la hipoglucemia; alteraciones que se mejoran o corrigen por el tratamiento de los enfermos con hormonas tiroideas.

Por otra parte, la incorporación in vitro de aminoácidos marcados a hormona de crecimiento está disminuida en hipófisis procedentes de animales tiroidectomizados (Matsuzaki 1970, Suzuki y Shibasaki 1970, Ieri 1971). Estas alteraciones se corrigen por el tratamiento de los animales con hormonas tiroideas, pero no por la presencia de la hormona en el medio de incubación.

El conjunto de estos resultados, apoyan la idea de que las hormonas tiroideas actúan sobre la hipófisis anterior para regular la síntesis de hormona de crecimiento, aunque su lugar de acción no está claramente definido, pudiendo ser a nivel de hipófisis o sobre el sistema neurosecretor afectando el factor de liberación de la GH (GHRF).

b) esteroides gonadales

El contenido de GH en hipófisis de ratas antes de la pubertad es el mismo en ambos sexos, posteriormente el contenido sigue aumentando en machos, mientras en hembras permanece constante (Daughaday y cols. 1970). Contrariamente a lo que ocurre en hipófisis, los niveles circulantes de GH en machos son aproximadamente la mitad que en hembras (Schalch y Reichlin 1966). Estos resultados sugieren por una parte que aunque el pool de GH en hipófisis de hembras es pequeño, es sin embargo más dinámico que en machos, y que muy posiblemente en cada sexo son las hormonas gonadales las que cambian el patrón de secreción de GH de la niñez al de la edad adulta.

Datos clínicos apoyan la idea de que los esteroides gonadales afectan la síntesis y secreción hipofisaria de GH. Se sabe desde muy antiguo que la administración de estrógenos a pacientes con acromegalia tiene un carácter beneficioso sobre la

enfermedad (Reichlin 1966), lo que parece deberse a que estas hormonas de algún modo interfieren con las acciones periféricas de la GH, quizás bloqueando la producción del factor de sulfatación (Wiedmann 1972). Los primeros resultados que parecían apoyar la idea de que los estrógenos tienen un efecto estimulador sobre la secreción de GH fueron los de Frantz y Rabkin (1965), al demostrar que los niveles circulantes de GH eran más altos en hembras que en varones. Los trabajos de Merrimée y cols. (1969) demostraron que el tratamiento con dosis fisiológicas de estrógenos aumentan la secreción de GH en respuesta al ejercicio o a la infusión de arginina, y que la respuesta de GH a ambos estímulos está aumentada en la mitad del ciclo menstrual. Estos datos llevaron a la creencia de que los estrógenos sensibilizan la hipófisis a los mecanismos que estimulan la secreción de hormona de crecimiento.

Por otra parte, Daughaday y cols. (1970) observaron que la castración en ratas hembras aumenta el contenido hipofisario de GH al valor encontrado en machos, mientras que dicha operación en estos tiene el efecto contrario. Encontrando además que el contenido de GH en hipófisis aumenta en hembras tratadas con testosterona. Sin embargo, los experimentos encaminados a estudiar la biosíntesis de GH en hipófisis procedentes de cada uno de los sexos no han encontrado diferencias entre ambos tejidos (McLeod 1969). Recientemente Malacara y cols. (1972) encontraron que dosis de progesterona tan pequeñas como 0.2 µg/100 g aumentan la secreción de GH en respuesta a la administración de extractos hipotalámicos, lo que iría de acuerdo con la observación de que en humanos los estrógenos incrementan la secreción de GH en respuesta a aquellos estímulos que favorecen su secreción. Por otra parte, Deller (1970) y Martin y cols. (1968) han demostrado que los estrógenos aumentan los niveles circulantes de GH en ratas, así como

la respuesta a la hipoglucemia.

c) esteroides adrenales

En cuanto al papel de los esteroides adrenales sobre el crecimiento, o sobre la síntesis y secreción de GH por la hipófisis, se conoce poco. Lewis y cols. (1965) han encontrado un aumento del contenido de GH en hipófisis de animales tratados con corticosterona, pero dado que su crecimiento estaba muy deteriorado, llegaron a la conclusión que el aumento del contenido hipofisario de GH era consecuencia de que estuviera inhibida la secreción de la hormona, más que de un aumento de su síntesis. Por otra parte, está claramente demostrado que la adrenalectomía en ratas disminuye la velocidad de crecimiento (Fregly y cols. 1960, Jolin y cols. 1974). Pero dado las grandes alteraciones metabólicas y hormonales que se inducen por esta operación, no es posible concluir cual de ellas pueda ser la causa más directamente responsable de las alteraciones del crecimiento que se observan en los animales adrenalectomizados.

B. DIABETES. - GENERALIDADES

La enfermedad hoy conocida como "diabetes mellitus" fue descrita por vez primera por Avicena, quien dió una descripción completa de este síndrome, caracterizado por una fuerte poliuria y polidipsia así como por una pérdida de peso corporal a pesar de una gran ingesta. También señaló la susceptibilidad de estos enfermos a las infecciones. La diabetes mellitus, el mal de orina del siglo XVIII, conlleva alteraciones profundas del metabolismo, cuya característica más llamativa es el fallo en la utilización de los hidratos de carbono; esto se refleja por una concentración anormalmente

alta de glucosa en sangre (hiperglucemia) y una reducción del contenido de glucógeno en hígado y músculo. La diabetes no sólo afecta al metabolismo de los hidratos de carbono, ya que el organismo al recurrir a las proteínas y grasas como fuente de energía, hace que aumente la excreción de nitrógeno no proteico, con el consiguiente desgaste de tejidos, y que se produzca cetoacidosis y acumulación de cuerpos cetónicos (ácido acetoacético, acetona y β -hidroxibutirato) en sangre y orina.

A pesar de conocerse la enfermedad desde hacía mucho tiempo, se tardó mucho en identificar la causa que la producía. En 1889 se inició una nueva etapa cuando Minkowski realizó la extirpación del páncreas en perro, observando la aparición inesperada de los síntomas de la "diabetes mellitus". Este descubrimiento tuvo una importancia crucial ya que demostraba que el origen de la diabetes podía estar en alguna anomalía del páncreas.

Fue en 1869, cuando Langerhans al estudiar la anatomía macroscópica del páncreas, advirtió la existencia de gránulos de zimógeno, que debido a que se tornaban negros con ácido ósmico, dedujo erróneamente que eran gránulos de grasa, encontró asimismo pequeños grupos de células carentes de dichos gránulos. En 1893 Laguesse advirtió la importancia potencial de estos grupos de células a las que denominó islotes de Langerhans, nombre por los que se les conoce actualmente. Pero aún entonces se siguió pensando que la relación del páncreas con la diabetes podía deberse a que este órgano eliminara alguna impureza. Fue Laguesse quien pensó en la posibilidad de que estos islotes manifestaran una secreción interna, y parece que fue el primero en utilizar los términos exocrino y endocrino para describir los tejidos con secreción interna o externa.

Basándose en sus granulaciones y propiedades tintoriales, las células del páncreas pueden dividirse en 4 tipos, α , β , δ , γ . Del 60 al 90 % son células β secretoras de insulina que contienen gránulos que se tiñen de azul con el colorante azul de anilina. El resto son células α que segregan glucagón y contienen gránulos que se tiñen de rojo con el colorante de Mallory. El número de gránulos de las células β es paralelo al contenido de insulina del páncreas. Los estímulos que causan la secreción de insulina originan la degranulación de estas células. La función de las células γ y δ se desconoce. Las células δ no siempre existen, y las γ se cree que son precursoras de las α o de las β .

1. Naturaleza química de la insulina

La insulina es una proteína pequeña constituida por dos cadenas de aminoácidos, A y B, enlazadas por dos puentes disulfuro en las posiciones 7 y 20 de la cadena A, y en las 7 y 19 de la B (Ryle y cols. 1955). La cadena A contiene 19 aminoácidos (Sanger y Thompson 1953) y la B 30 (Sanger y Tuppy 1951). Existe además otro puente disulfuro en la cadena A entre las posiciones 6 y 11. Los aminoácidos comprendidos en el anillo de la cadena A y los próximos a la posición C-terminal de la cadena B, son las zonas generalmente implicadas en los procesos de diferenciación molecular entre especies. Existen pequeñas diferencias en los aminoácidos que componen la molécula de insulina entre especies diferentes, pero ellas no son generalmente suficientes para afectar la actividad biológica de la insulina particular en una especie heteróloga, aunque sí para que sea antigénica. El estado de agregación de las moléculas de insulina varía con la temperatura, pH y contenido de zinc. En el rango de pH 4-7 la hormona es insoluble, por el contrario los pH extremos y la fuerza iónica baja favorece la

disociación molecular. En 1967 Steiner y cols. demostraron que la insulina se formaba a partir de un precursor de gran peso molecular, proinsulina, consistente en una sola cadena polipeptídica de escasa actividad biológica, que por proteólisis origina cantidades equimoleculares de insulina y péptido C. La insulina, proinsulina y el péptido C circulan de forma libre en el plasma. Existe además en la circulación plasmática una actividad biológica semejante a la de la insulina, cuyo poder biológico es 10 veces superior al de la hormona, y cuya actividad no es suprimible con anticuerpo anti-insulina, y se conoce con el nombre de NSILA (no insulin like activity), y parece que no es de origen pancreático.

2. Secreción de insulina y metabolitos que la regulan

La secreción de insulina hay que considerarla en condiciones basales o en respuesta a determinados estímulos. La secreción en el estado basal es un reflejo del estado metabólico en que se halla el islote. En cambio, la descarga de la hormona como respuesta a un estímulo sigue un comportamiento bifásico (Fussgänger y cols. 1964, Grodsky y cols. 1970, Pfeiffer y cols. 1970), cuya respuesta depende de la duración del estímulo y de su intensidad. El primer pico de secreción corresponde a la descarga de insulina almacenada, siendo una curva dosis-respuesta de tipo sigmoidal, típica de un sistema saturable. El segundo pico de secreción es dependiente de la síntesis de la hormona (Grodsky y cols. 1970).

Los principales sustratos que regulan la secreción de insulina pertenecen a cada uno de los tres metabolismos sobre los que la hormona influye, hidrocarbonado, graso y proteico. La glucosa y la fructosa son los azúcares principales que regulan la secreción de insulina, pero puesto que, durante el pro

ceso de absorción la mayor parte de la fructosa pasa a glucosa, es ésta en definitiva el principal metabolito hidrocarbonado que regula la secreción de insulina. La glucosa interacciona con las células β en tres fases secuenciales. En la primera fase, hay un reconocimiento de la molécula de glucosa por parte del glucoreceptor, la segunda implica el metabolismo específico de la glucosa, actuando en la tercera como fuente de energía.

Tras la absorción intestinal de la glucosa se produce la descarga de varias hormonas gastrointestinales como la gastrina, secretina, colecistoquinina, pancreozimina y enteroglucagón, siendo todas ellas capaces de aumentar la secreción de insulina. La utilidad fisiológica de este mecanismo parece que es avisar al páncreas para que responda con una secreción intensa de insulina desde el momento en que se inicia la absorción de la glucosa.

Referente al metabolismo proteico, la mayoría de los aminoácidos estimulan la secreción de insulina, aunque el más potente es la leucina (Fajans y cols. 1963, Floyd y cols. 1963, Knopf y cols. 1963) Se desconoce el mecanismo a través del cual los aminoácidos ejercen este efecto, pero se sabe que los aminoácidos no metabolizables también lo ejercen, lo que parece indicar que no es necesario la metabolización del aminoácido para que este ejerza su posterior acción.

Los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos incrementan los niveles circulantes de insulina en animales de experimentación (Lambert y cols. 1969, Balasse y cols. 1967, Madison y cols. 1964, Pi-Sunyer 1970), mientras que en humanos no parece que sean importantes reguladores de la secreción de insulina ya que

se requiere concentraciones muy elevadas de ellos para poner de manifiesto un efecto positivo (Balasse y cols. 1968, Pelkonen y cols. 1968, Schalch y cols. 1965).

Factores hormonales como los glucocorticoides, hormona de crecimiento (Campbell y cols. 1966, Luft y cols. 1969) y esteroides sexuales incrementan los niveles circulantes de insulina (Costrini y cols. 1969)

3. Acciones metabólicas de la insulina

Aunque la insulina tiene un gran protagonismo en el conjunto total del organismo, sus efectos sin embargo se magnifican más en tejidos como el hígado, músculo y tejido adiposo. En hígado la acción principal de la insulina es estimulando la síntesis de glucógeno, mientras que en el músculo o el tejido adiposo su acción principal es sobre la síntesis proteica y de triglicéridos, respectivamente. Ello no implica naturalmente que la hormona no tenga otras acciones en cada uno de estos tejidos.

El efecto de la insulina sobre el metabolismo hepático ha sido estudiado por Steiner (1966) en ratas diabéticas alloxánicas. A los 40 min. de la administración de insulina se evidencia ya un aumento de la actividad glucógeno sintetasa, lo cual es previo a la formación de glucosa-6-P. En las primeras 12 horas se registra un aumento de peso del órgano a expensa de glucógeno y agua. Las enzimas implicadas en la lipogénesis no aumentan hasta después de transcurridas 24 h de la administración de la insulina, a cuyo tiempo ya se detecta un aumento de la actividad DNA polimerasa, que se intensifica a las 72 h. La actividad de la RNA polimerasa aumenta a las 2 h después de la terapia con la hormona, la cual a las 12 h es doble de la

encontrada en ratas diabéticas no tratadas.

En el tejido adiposo la insulina aumenta la formación de triglicéridos, bien a partir de los ácidos grasos o favoreciendo la entrada de glucosa a la célula y la formación de α -glicerol-P, que al conjugarse con los ácidos grasos da lugar a la formación de triglicéridos. En este tejido la insulina favorece asimismo la formación de ATP, DNA y m-RNA. En el músculo, la insulina activa la síntesis de proteínas y de glucógeno más que la de triglicéridos.

El papel del músculo y del tejido adiposo es importante en aquellas situaciones en que el organismo no dispone de glucosa o de suficiente insulina que permitan su adecuada metabolización. En ambos casos, el tejido adiposo suministra ácidos grasos, los cuales se oxidan en el músculo con el consiguiente suministro de energía.

4. Diabetes experimental - Generalidades

El mejor modo de apreciar lo que significa la insulina en la economía del organismo, es estudiar los trastornos metabólicos en el animal insulinoprivo. Ello no afecta únicamente al metabolismo hidrocarbonado, sino que se ve asimismo afectado el graso, proteico, electrolítico, así como el metabolismo del agua. Las repercusiones de la falta de insulina afectan también al sistema nervioso central, al respiratorio, cardiovascular, excretor y gastrointestinal. Los reajustes metabólicos que tienen lugar en el animal diabético son muy semejantes a los que sufre el animal ayunado. La diabetes va acompañada de cambios metabólicos que son cualitativamente similares a los encontrados en situación de malnutrición, de aquí que muchos autores consideren a la diabetes como una forma de malnu-

trición celular, donde existe un gran catabolismo a pesar de la gran cantidad de glucosa plasmática, situación que ha sido calificada como de inanición en medio de la abundancia.

El primer metabolismo afectado por la falta de insulina es el hidrocarbonado, ya que un descenso de la utilización de glucosa por los tejidos periféricos, preferentemente por el músculo y el tejido adiposo contribuye al desarrollo de la hiperglucemia, a lo cual cooperan el hígado y el tejido muscular al aumentar la velocidad de glucogenolisis. Un aumento de la gluconeogénesis contribuye también al aumento del azúcar sanguíneo. La elevación de los niveles de glucosa plasmática hace que se sobrepase el dintel renal para la glucosa, con lo cual el azúcar es eliminado en orina arrastrando consigo electrolitos y agua, lo que constituye la causa de la poliuria en la diabetes, siendo éste el primer síntoma de la enfermedad. La pérdida de agua y electrolitos en orina conduce a una deshidratación lo que da como resultado una hemoconcentración, lo cual afecta de modo indirecto al sistema circulatorio, ya que se reduce el volumen sanguíneo circulante. La disminución del volumen plasmático afecta el transporte de oxígeno a los tejidos, por lo que se da un predominio del metabolismo anaerobio con el consiguiente aumento de ácido láctico en sangre, siendo la consecuencia final el coma y la muerte. La falta de insulina y el descenso en la utilización de glucosa por el tejido adiposo origina la movilización de los depósitos grasos del organismo, lo que da lugar a una hipertrigliceridemia a la vez que los ácidos grasos libres se sintetizan como lipoproteínas de baja densidad en el hígado. El contenido graso del hígado se oxida sólo hasta el estado de acetyl CoA, que por condensación de dos moléculas origina ácido acetoacético, el cual por posterior reducción forma β -hidroxibutirato, pudiendo observarse un aumento de la concentración de estos metabolitos

en la vena hepática. El gran incremento de los cuerpos cetónicos tiene dos graves consecuencias, primero una fuerte acidosis metabólica y en segundo lugar el que a medida que la cetonuria sobrepasa el dintel renal, aparecen en orina los cuerpos cetónicos, existiendo a la par una pérdida de sodio.

Por otra parte, la falta de insulina y la incapacidad del organismo para utilizar la glucosa hace que haya un descenso de la síntesis de proteínas, a la par que aumenta su catabolismo. Como consecuencia de la proteolisis, los aminoácidos llegan a través del torrente circulatorio al hígado donde son desaminados oxidativamente, contribuyendo los restos carbonados a la formación de glucosa, a la par que los grupos NH_2 cooperan a la formación de urea, la cual al ser excretada constituye una pérdida neta de nitrógeno corporal. Todas estas alteraciones van acompañadas de pérdida de potasio y otros iones intracelulares. La progresiva pérdida de agua causa una deshidratación celular, lo que favorece a su vez los procesos catabólicos y contribuye a la difusión de electrolitos desde el interior de la célula al líquido extracelular.

5. Inducción de la diabetes experimental

El conocimiento de los efectos de la insulina, así como los de su deprivación en el organismo procede de dos vertientes, de los estudios clínicos (diabetes mellitus humana), y de los realizados en animales de experimentación (diabetes experimental). Nuestra atención se centrará en la diabetes experimental, ya que la presente tesis tiene por objeto el estudio de algunas de las alteraciones endocrinas en ratas diabéticas.

Los animales pueden padecer una diabetes espontánea o in-

ducida. En ambos casos se pueden presentar algunas o todas las alteraciones metabólicas de la enfermedad. Sin embargo, han fracasado todos los intentos de inducir las microangiopatías vasculares típicas de la diabetes humana (Lukens 1950), y por otro lado aunque Foglia y cols. (1948) y Mann y Goddard (1950) han descrito lesiones renales en ratas diabéticas, ellas son muy diferentes a las del tipo glomeruloesclerosis capilar de la diabetes humana, por lo cual hay que señalar que la diabetes que sufren los animales no es del todo semejante a la diabetes mellitus humana.

La diabetes aparece de forma espontánea en animales cuyo habitat es su medio natural, aunque con una frecuencia variable de una especie a otra (Meier 1960). Así, uno de 200 perros la padecen, mientras que en gatos la frecuencia es de uno cada 800. En animales de laboratorio como la rata egipcia de la arena (Schmidt-Nielsen y cols. 1964), en el ratón híbrido de Wellesley (Like y cols. 1965) y en el ratón espinoso (Pictet y cols. 1967) se han dado casos de diabetes espontánea.

La diabetes ya sea experimental o espontánea puede ser de dos tipos: pancreática, en la que existe una disminución total o parcial de la liberación de insulina, y la extrapancreática que es la producida por una disminución de la efectividad periférica de la insulina. La diabetes experimental pancreática se puede inducir por varios métodos. La pancretectomía total requiere quitar el 99.5 % del tejido glandular. Esta operación origina una diabetes intensa (Scow, 1957), y si no se trata a los animales con insulina mueren en coma diabético en 48 h. Esta operación es difícil en ratas, ya que el páncreas está extendido difusamente sobre los ligamentos gastropélico y mesoduodenal (Scow 1957), además un 5 % de ella está ligada al conducto biliar, por lo que aproximadamente el

50 % de las ratas operadas presentan obstrucción biliar. Estos animales son fácilmente identificables por la presencia de bilis en la orina y por los niveles altos de fosfolípidos y colesterol en sangre. Dos horas después de producirse la pancretectomía, la glucosa, los cuerpos cetónicos y los lípidos totales están elevados de modo significativo (Chernick y cols. 1959). La elevación de los cuerpos cetónicos y de los lípidos es posterior a que el nivel de glucosa en plasma alcance niveles diabéticos. A las 10 h de la operación, la concentración de glucosa circulante alcanza un plateau, los lípidos lo alcanzan a las 25 h, mientras que los cuerpos cetónicos continúan elevándose durante los dos días siguientes.

Por otra parte, aparece un gran acúmulo de grasa en hígado y riñón, siendo el contenido graso de estos órganos preferentemente triglicéridos. El estudio morfológico del hígado de las ratas intensamente diabéticas, muestra que la grasa se localiza preferentemente en las células hepáticas, mientras que en la sección longitudinal del riñón se observa que tanto la corteza como la banda exterior de la médula presentan un color blanquecino. La tinción con aceite "red 0" de Wilson, demuestra la existencia de grandes cantidades de grasa en estas zonas, y en menor cuantía en la zona medular (Scow y Chernick 1960).

El extirpar sólo el 85 % del tejido pancreático induce una diabetes menos intensa, la cual se puede intensificar por la administración de una dieta hipercalórica (polvo de tiroi-des, GH y ACTH). Con ello las células β que quedan después de la operación están sometidas a una hiperfunción que puede llevarlas a su degeneración.

La diabetes por pancretectomía, en grado más o menos in-

tenso, tienē graves inconvenientes ya que los animales no sólo sufren la falta de insulina, sino también de glucagón y gastrina, así como de los agentes humorales y enzimas producidos por el páncreas exocrino. La diabetes pancreática también puede producirse por la ligadura del conducto pancreático, pero para que sea efectiva es necesario someter al animal a una dieta rica en carbohidratos.

Por último, se puede producir diabetes por la destrucción selectiva de las células β del páncreas por agentes químicos. Las sustancias más utilizadas son el alloxan y recientemente el streptozotocin. Ambos son agentes citotóxicos que actúan produciendo necrosis de las células β , lo que ocasiona alteración de la glucemia en tres fases (Dunn 1943, Schein y cols. 1971). Primero existe una hiperglucemia breve por un aumento de la glucogenolisis hepática, seguida de una hipoglucemia transitoria producida por la liberación de la insulina almacenada en las células β dañadas, y por último por una hiperglucemia permanente. La utilidad del streptozotocin es que su efecto citotóxico es específico sobre las células β del páncreas y parece que no tiene efectos secundarios (Mansford 1968).

La diabetes extrapancreática es la producida por una disminución de la efectividad periférica de la insulina. Hormonas como el ACTH, GH, glucocorticoides y glucagón disminuyen el efecto hipoglucémico de la insulina, por lo que en aquellas situaciones en las que existan niveles altos de algunas de estas hormonas se produce una hiperglucemia. Si esta situación se prolonga, los altos niveles de glucosa en plasma estimulan de una forma constante la secreción de insulina, lo que puede resultar en una degeneración, por hiperfunción, de las células β del páncreas. Por otro lado, la administración de anticuer-

pos anti-insulina lógicamente da lugar a valores altos de glucosa en plasma, lo cual conduciría en definitiva al desarrollo de la diabetes (Armin y cols. 1960).

Otras causas que producen diabetes son las de tipo nervioso. Las interacciones entre el sistema nervioso y el endocrino están bien establecidas, y así alteraciones en cada uno de estos sistemas repercute en el otro. Aunque no se conoce el mecanismo por el que ciertas lesiones cerebrales alteran el metabolismo hidrocarbonado, ello ha constituido el objetivo de muchos estudios desde que Claude Bernard (1849) demostrara por vez primera que la punción en el suelo del cuarto ventrículo producía hiperglucemia. Por otra parte, Zunz y La Berre (1928) observaron que la estimulación de centros superiores estimulaba la secreción de insulina. Las observaciones de Cannon (1920) al demostrar que las excitaciones emocionales producían glucosuria, junto con la demostración de que la excitación directa en el hipotálamo inducía hiperglucemia, dió origen a un intenso estudio sobre la búsqueda del centro cerebral "diabetógeno". Posteriormente Anderson y Haymaker (1949) vieron que la decerebración del puente o del cerebro medio inducía en ratas no sólo una hiperglucemia inmediata sino una intolerancia a la glucosa.

6. Alteraciones endocrinas en la diabetes

a) eje hipófisis-tiroides

Los estudios realizados sobre el efecto de la diabetes, humana o experimental, sobre la actividad de la glándula tiroides son escasos, pero todos ellos parecen indicar que el nivel funcional de esta glándula está reducido en situaciones de deficit de insulina, mientras que por el contrario la insu-

lina tiene un efecto estimulador. Así, Nataf y Chaikoff (1965) demostraron que la insulina, como única hormona en el medio de incubación, estimulaba la captación de iodo por el tejido, así como su incorporación a iodoaminoácidos con la formación de tirosinas y tironinas iodadas, en el tejido tiroideo procedente de fetos de ratas, en un estadillo de la gestación en el que aún no tiene capacidad para ello. La adición de TSH al medio de incubación tiene un efecto positivo sobre los parámetros citados (Nataf y Chaikoff 1965, Singh y Chaikoff 1966), efecto que se potencia por la insulina. Por otra parte, Tong (1967) ha encontrado que el efecto del TSH sobre la captación de aminoácidos marcados y su incorporación a proteínas en células procedentes de tiroides bovinos, es secundaria a la acción de la hormona sobre la captación y metabolización de la glucosa. Dosis de 2-deoxi-glucosa que impiden la metabolización de la glucosa, disminuyen el efecto estimulador del TSH sobre la captación de aminoácidos y la síntesis de proteínas.

Por el contrario, la falta de niveles normales de insulina, inducida por pancretectomía o por la administración de alloxan o streptozotocin, disminuye en ratas la actividad del tejido tiroideo (Bennet y Koneff 1946, Foglia 1945, Serif y Sihotang 1962, Pericás y Jolin 1977). En efecto, tanto el peso del tiroides como la capacidad de captar iodo y metabolizarlo está disminuida en el animal diabético, siendo asimismo menor la velocidad de secreción de los compuestos iodados en glándulas diabéticas que en las controles. Aunque parte de estas alteraciones pueden deberse a que exista un defecto a nivel de tiroides en los animales deficientes en insulina, sin embargo la causa principal de esta hipofunción tiroidea se debe muy principalmente a que mantienen niveles circulantes de TSH en plasma bajos. En efecto, tanto en condiciones basales como en respuesta al hipotiroidismo, las concentraciones de TSH en plas

ma del animal diabético son significativamente más bajas que la de los controles (Pericás y Jolin 1977, Jolin y Gonzalez 1978).

Mientras que los niveles de TSH en plasma del animal diabético son consistentemente más bajos que en el normal, el contenido de TSH en hipófisis es dependiente de la duración y muy probablemente de la intensidad de la diabetes. A tiempos relativamente cortos, 15 días después de la administración de streptozotocin, el contenido de TSH en hipófisis de las ratas diabéticas es prácticamente el mismo que en los controles, sufriendo una disminución a tiempos más largos (Montoya y cols. 1978).

La secreción hipofisaria de TSH está regulada por la acción inhibitoria que las hormonas tiroideas (T_4 y T_3) ejercen a nivel de hipófisis y por el efecto estimulador que sobre esta glándula tiene la hormona hipotalámica estimuladora de la secreción de TSH (TRH). La secreción de TSH será por tanto la resultante de la suma de estas dos fuerzas contrapuestas. El hecho de que la secreción de TSH del animal diabético-tiroidectomizado sea menor que la de los controles-tiroidectomizados, hecho que no parece deberse a una diferencia de la acción de la T_4 sobre la secreción de TSH entre ambos grupos, sugiere que estas diferencias están ocasionadas porque la hipófisis del animal diabético está bajo un menor efecto estimulador del TRH. En efecto, se ha encontrado por una parte que el contenido de TRH en el hipotálamo de la rata diabética es menor que en el control, y que la secreción de TSH del animal diabético-tiroidectomizado se inhibe por dosis de T_4 más bajas que en la rata tiroidectomizada-control (Montoya y cols. 1978, Gonzalez y cols. en prensa).

El conjunto de estos resultados parecen indicar, que aun que la falta de insulina puede repercutir a nivel de tiroides y muy probablemente a nivel de hipófisis, existe un primer defecto a nivel hipotalámico, lo que sin duda condiciona a que todo el sistema trabaje a un nivel más bajo del normal.

b) eje hipófisis-adrenales

El efecto de la diabetes sobre este sistema no está claramente definido. En humanos, los resultados parece que son contradictorios, ya que mientras Jacobson (1958), Lederer y Bataille (1966) y Mirouze (1962) llegan a la conclusión de que la diabetes no afecta la actividad funcional de este eje, Pfeiffer y cols. (1962) y Lentle (1964) encuentran un ritmo diurno de la secreción de ACTH inverso al normal, y unos niveles de cortisol en plasma similares al Cushing.

En ratas, se conoce desde hace mucho tiempo que tanto la pancreatectomía como la diabetes inducida por alloxan o streptozotocin, induce un aumento del peso de las adrenales (Foglia 1945, Bennet y Koneff 1946, Devecersky y Frawley 1963). Como este efecto no tiene lugar en el animal hipofisectomizado y el suministro oral de glucosa tampoco repercute sobre el peso de las adrenales, se llegó a la conclusión de que el aumento ponderal de esta glándula estaba causado por las alteraciones metabólicas inducidas por la falta de insulina. Posteriormente, L'Age y cols. (1974) encontraron que la administración de ACTH producía un aumento de los niveles de corticosterona en plasma más intenso en la rata alloxanizada que en los controles, siendo asimismo más intensa la respuesta adrenal al stress en el animal diabético que en el normal. Además, el aumento de corticosterona en plasma en respuesta al stress se bloquea con dosis más bajas de dexametasona en la rata normal que en la

diabética, presentando éstas asimismo un retraso en la respuesta.

Estos resultados indican por una parte, que las adrenales de los animales diabéticos son muy sensibles al aumento de ACTH endógeno inducido por el stress o a la administración exógena de la hormona, y que muy posiblemente la secreción de ACTH como respuesta al stress sea más intensa en el animal diabético que en el normal.

c) eje hipófisis-gónadas

En humanos, la diabetes va acompañada de alteraciones en la función reproductora. El tratamiento con insulina, corrige en parte estas alteraciones, sin embargo, el embarazo y el parto en mujeres diabéticas presenta algunas complicaciones (aborto, muerte fetal, toxemia) (White y Hunt. 1943, Gray 1953). De igual modo en el varón diabético, son frecuentes las lesiones testiculares, impotencia y reducción de la excreción urinaria de gonadotrofinas y de metabolitos derivados de la testosterona (Schoffling y cols. 1963)

En animales de experimentación, en concreto en rata, las alteraciones en la función reproductora son similares a las halladas en humanos. Existe una reducción en el peso de los testículos (Foglia y cols. 1963), cambios degenerativos en los túbulos seminíferos (Irisawa y cols. 1966, Schoffling y cols. 1963) y una menor capacidad del tejido testicular para sintetizar testosterona (Foglia y cols. 1969): Estos cambios pueden deberse en parte a una menor secreción hipofisaria de FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante) (Irisawa y cols. 1966, Foglia y cols. 1969). Posteriormente Howland y Zebrowski (1972) hallaron una reducción en plasma de

ambas hormonas a los 8 días de ser producida la diabetes, aunque existió la duda, si la reducción era debido a la carencia de insulina, o bien era consecuencia de los numerosos efectos tóxicos secundarios que produce el alloxan. En 1972 Frank y cols. usando ratas hembras diabéticas y en un intento de determinar si el efecto gonadal es primario, o bien es consecuencia de la menor producción y/o descarga de gonadotrofinas, se demostró que los animales diabéticos tenían niveles circulantes normales de gonadotrofinas, en cambio, los ovarios tenían una capacidad reducida para responder a la administración exógena de sus hormonas troficas. Otros autores como Farina y cols. (1971) han observado también una pérdida de sensibilidad del tejido ovárico. Otra posible alternativa, es que aunque los niveles de gonadotrofinas medidos por inmunoreacción no estén alterados en la diabetes, sin embargo, el poder biológico de ambas hormonas podría estar modificado (Howland y Zebroski 1974). Ya que ambas hormonas son de naturaleza glucoproteica, es posible que un cambio en la porción hidrocarbonada fuera suficiente para explicar una alteración en la actividad biológica, ya que se sabe que el metabolismo hidrocarbonado en hipófisis es dependiente de insulina (Goodner y Freinkel 1961).

d) crecimiento

Uno de los primeros hechos que se observa en los animales insulinoprivos es un descenso de la velocidad de crecimiento, e incluso una pérdida de peso en aquellos que sufren una diabetes de grado intenso (Steiner 1966). Asimismo, está reducido el crecimiento en niños con diabetes no controlada. La importancia de la insulina sobre el crecimiento se puso de manifiesto por los trabajos de Lukens y cols. (1950, 1955), quienes observaron que la GH no tiene efecto sobre el crecimiento o la retención de nitrógeno en gatos pancreatectomizados, evidencián

dose un efecto positivo de la hormona sobre ambos parámetros, cuando la GH se administraba conjuntamente con insulina. Los resultados de Salter y Best (1953, 1957), al demostrar que la insulina estimula el crecimiento de ratas hipofisectomizadas, dieron un gran impulso a la teoría del papel preponderante de la insulina sobre el de la GH en el crecimiento.

El efecto de la diabetes sobre el crecimiento se puede explicar, en parte, por las alteraciones que la falta de insulina induce a nivel hipofisario. Lawrence y cols. (1958) y Hazelwood (1964) encontraron que el tamaño de las hipófisis de las ratas diabéticas es menor que en los controles, estando asimismo disminuido el contenido de GH en ellas. En efecto, vieron que mientras los extractos hipofisarios procedentes de animales normales podían estimular el crecimiento de ratas hipofisectomizadas, dicho efecto era muy reducido cuando los extractos hipofisarios procedían de ratas diabéticas. La valoración por bioensayo del contenido de GH en hipófisis evidenció que el valor de este parámetro en ratas diabéticas, cuatro semanas después de la administración de alloxan, era 16 veces más pequeño que el de hipófisis normales. Posteriormente, Murakami y cols. (1973) observaron que las células adenohipofisarias productoras de GH en ratas diabéticas por la administración de streptozotocín, presentaban alteraciones morfológicas selectivas que indicaban un proceso degenerativo, siendo este efecto revertido por la administración de insulina, lo que descartaba que ello fuese una consecuencia del agente diabetógeno.

A pesar de la demostración de que la diabetes disminuye el contenido de GH en hipófisis, sin embargo, los niveles circulantes de la hormona en plasma de los sujetos diabéticos son semejantes o superiores al de los normales (Guest 1953,

Pond 1970, Hansen y cols. 1970). Es posible que ello esté causado por una disminución de la velocidad de aclaramiento metabólico de la hormona en la diabetes humana (Taylor y cols. 1969, Sperling y cols. 1973). En animales experimentales existen pocos datos que nos permitan concluir de una forma clara si los niveles circulantes de GH en plasma están o no afectados en la diabetes.

Hoy en día se admite que los efectos anabólicos de la GH sobre el crecimiento tisular está mediada por un factor(s) perteneciente a la familia de las somatomedinas, denominado factor de sulfatación por Salmon y Daughaday (1957). Pues bien, Van den Braden (1974) e Yde (1964) encuentran que el factor de sulfatación está disminuído tanto en cinco casos de diabetes juvenil como en diabéticos adultos. Igualmente, la actividad de este factor en el plasma de ratas diabéticas por alloxan es más bajo que en las normales (Salmon 1960).

La diabetes va asociada con cambios metabólicos algunos de los cuales son cualitativamente similares a los encontrados en la malnutrición, por lo cual se suele establecer comparaciones entre ambas situaciones. Pues bien, análogamente a lo que se encuentra en la diabetes, los niños malnutridos presentan una disminución de la velocidad de crecimiento, y a pesar de que mantienen niveles de GH en plasma normales o elevados (Williams y Porte 1974), presentan una disminución de la concentración del factor de sulfatación en plasma.

Otra situación que presenta alteraciones semejantes a las de la diabetes, es el ayuno. La concentración de GH en plasma está claramente demostrado que está aumentada en sujetos ayunados, sin embargo, los resultados obtenidos en ratas son contradictorios. Así, Campbell y cols. (1977), Meites y Fiel (1965)

y Dickerman y cols. (1969), encuentran una reducción de la GH en plasma, que explican por una menor estimulación del factor hipotalámico estimulador de la secreción de GH (Schalch y Reichlin 1966), mientras que por el contrario, Trenkle (1970) demostró un aumento en los niveles circulantes y en el contenido hipofisario de GH en ratas ayunadas de ambos sexos.

La consideración de algunos de estos puntos nos han llevado a la realización de la presente tesis, cuyo objetivo es un intento de llegar a conocer si la falta de insulina o las alteraciones metabólicas que ello implica afectan a la síntesis y secreción de la hormona de crecimiento, así como a su metabolismo periférico.

II. MATERIALES Y METODOS
=====

II. MATERIALES Y METODOS

En todos los experimentos incluidos en esta tesis, se han utilizado como animales de experimentación ratas de raza Wistar procedentes del criadero de nuestro laboratorio. Con objeto de eliminar las alteraciones endocrinas que el ciclo menstrual lleva consigo, hemos utilizado animales machos. En cada experimento, los animales incluidos en cada uno de los grupos fueron aproximadamente de la misma edad y peso. El reparto en grupos de los animales se hizo al azar. Para reducir al máximo las variaciones ambientales y conocido el hecho de que las variaciones de luz y temperatura afectan enormemente el metabolismo de la rata, los animales recibían luz artificial desde las 7:00 a las 19 horas, permaneciendo en oscuridad otras 12 horas. La temperatura a que estuvieron sometidos fue de 22-24 ° C ya que es la óptima para esta raza de animales.

Las ratas recibieron una dieta de gránulos (piensos Sanders para ratas) y dos veces por semana carne y lechuga fresca. La comida se suministró a la misma hora del día durante el período de experimentación. Como bebida recibieron agua destilada.

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación con guillotina. La sangre del cuerpo y de la cabeza se dejó gotear en un tubo que contenía 0.1 ml de heparina amorfa disuelta en buffer salino al 1 %. Posteriormente se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 30' y se procedió a la separación del plasma. Tras la decapitación del animal se extrajo rápidamente la adenohipófisis que fue pesada en una balanza de precisión y homogenada en 0.5 ml de agua destilada. Tanto el homogenado hipofisario como el plasma fueron almacenados a -20° C para posteriores determinaciones.

A. TRATAMIENTO

1. Diabetes

Se usó como agente diabético streptozotocin (Michigan, Kalamazoo, USA) disuelto en buffer citrato pH = 4.4. Dada la inestabilidad del streptozotocin (STZ) en solución, ésta se preparó en el momento de la inyección. La dosis empleada osciló de 6-7.5 mg por 100 gramos de peso corporal. Con objeto de conseguir un mayor efecto diabético, los animales sufrieron un ayuno previo de 18-24 horas.

En aquellos experimentos en que los animales estuvieron tratados con insulina (Novo) la hormona se inyectó en 1 ml de buffer salino.

2. Hipotiroidismo

Para tiroidectomizar a los animales seguimos la técnica descrita por Zarrow y cols. (1964). Se anestesió al animal con éter etílico en un recipiente cerrado y se le colocó en una tabla de operaciones mostrando la cara ventral del cuello, el cual se mantenía extendido tirando de los incisivos. En esta posición, se prosiguió la anestesia introduciendo el hocico del animal en un cono de plástico con algodón humedecido en éter. Posteriormente se realizó una incisión en la línea media a lo largo del cuello y se separó la piel, la fascia y las glándulas submaxilares. Cuidadosamente se separaron los músculos pretiroideos a través de la línea media ventral sujetándolos por medio de unos hilos tractores, hasta dejar libre la tráquea y la glándula tiroidea. Con ayuda de unas pinzas finas se disecionó cada uno de los lados de la glándula procediendo a continuación a levantar el tejido separándolo completamente de

la tráquea obteniendo los dos lóbulos y el istmo intactos. Después de realizar la operación se limpió cuidadosamente la tráquea de todo resto de tejido tiroideo y se cerró la incisión uniendo la piel con puntos de sutura.

En los roedores, la tiroidectomía quirúrgica se acompaña de una extirpación completa o casi total del tejido paratiroideo, la insuficiencia resultante de hormona paratiroidea se subsana con un suplemento de calcio en la dieta, no habiéndose observado en ningún caso la aparición de tetania. Antes de que los animales se recuperen de la anestesia se les administró 2 gotas de vitamina D. Para comprobar la eficiencia de la tiroidectomía se siguió la curva de peso de los animales eliminando aquellos en los que no se interrumpió el crecimiento.

Los animales tiroidectomizados recibieron una dieta de bajo contenido en iodo (LID), la cual es rica en calorías y equilibrada en principios inmediatos y vitaminas. Esta dieta está basada en la utilizada por Remington y Levine (1936), Remington (1937). Su composición es la siguiente:

Harina de maiz	6.000 gr
Levadura de cerveza	1.000 gr
Gluten de trigo	2.500 gr
ClNa	100 gr
CO ₃ Ca	100 gr
H ₂ O destilada	s.c

El iodo contenido en esta dieta oscila entre 0.05 y 0.09 µg/gr. Una rata de 100 gramos de peso ingiere de 10 a 12 gramos de comida al día, con lo cual recibe diariamente de 0.5 a 1 µg de iodo.

Cuando el hipotiroidismo se indujo por administración de propiltiouracilo (PTU), la concentración usada fue de 3 mg/100 gramos de peso corporal. La dosis se administró diariamente dividida en dos mitades y por vía intraperitoneal. La solución se preparó disolviendo la cantidad adecuada de PTU en agua destilada a la que se añadió unas gotas de sosa para facilitar la disolución del propiltiouracilo.

Como agente bociógeno se utilizó también perclorato a la concentración de 20 mg/100 gramos de peso corporal. Se administró igualmente por vía intraperitoneal y dividada en dos mitades al igual que el PTU.

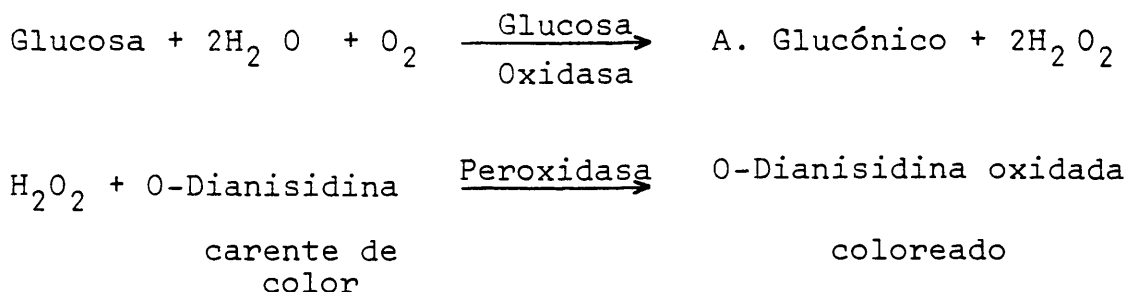
3. Estímulo de la secreción de GH (prueba del pentobarbital)

Con objeto de estudiar la reserva hipofisaria en hormona de crecimiento, los animales fueron sometidos a estímulo con pentobarbital (Nembutal, Abbot) (Howard y Martin 1971). El animal tras ser anestesiado con éter, se le practicó una incisión en la línea media del cuello y después de separar la piel y los músculos, se extrajo sangre de la yugular mediante una jeringa heparinizada, esta toma se consideró como muestra basal para la determinación de los niveles de GH en plasma. Dada la inestabilidad del pentobarbital en solución, ésta se preparó en el momento de su uso. El pentobarbital a la concentración de 1.5 y 3 mg/0.2 ml de salino/100 gramos de peso corporal, se inyectó en la vena femoral de una de las extremidades inferiores tras un período de ayuno de 12-24 horas. A los 5' de la inyección se extrajo sangre de la otra yugular mediante una jeringa heparinizada y a los 10' se sangró el animal de la vena cava. Una vez muerto el animal, rápidamente se extrajo la adenohipófisis.

B. DETERMINACIONES QUIMICAS

1. Valoración de glucosa en plasma y orina

El método se basa en la reacción colorimétrica llevada a cabo por la glucosa oxidasa, enzima capaz de oxidar la glucosa a ácido glucónico y agua oxigenada, la cual en presencia de peroxidasa oxida un cromógeno reducido a la forma oxidada que es coloreada. La reacción es la siguiente:



Realizando la reacción al aire en cantidades abundantes de cromógeno reducido y en presencia de los enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa, el color que aparece (cromo oxidado) depende de la concentración de glucosa existente en la muestra. El reactivo usado es el Glucostat (Worthingtong Biochemical Corporation U.S.A.) el cual es poco estable en solución y se colorea lentamente dando lugar a blancos altos, debido probablemente a la oxidación aerobia del cromógeno por la peroxidasa (Sols y de la Fuente 1957), por esta razón el reactivo se prepara en el momento de usarlo pipeteando 1 ml de agua destilada a los tubos que contienen el cromógeno y el enzima, el contenido de ambos viales junto con 3 ml de buffer pH = 7.4 se lleva hasta un volumen de 100 ml con agua destilada.

Como metodología seguimos la técnica de Hugget y Nixon (1957) precipitando previamente las proteínas plasmáticas si-

guiendo el método de Somogyi (1956) con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.3 N y SO_4Zn al 5 %. Se usaron 0.7 ml de agua destilada y 0.1 ml de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y de SO_4Zn . A continuación, se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 15', se decantó el sobrenadante y se guardó para la determinación de glucosa. Las concentraciones de glucosa usadas para la realización de la curva standard donde se leerán los problemas son: 6.25, 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ preparadas partiendo de una solución stock de glucosa al 1 % en ácido benzoico. Una vez precipitadas las proteínas, se pipetea 0.1 ml de cada sobrenadante, de los distintos puntos de la standard o de agua destilada (blancos) a distintos tubos. A continuación, todos ellos reciben 0.1 ml de buffer fosfato 0.2 N, posteriormente y a intervalos iguales los tubos reciben 1 ml de la mezcla de reacción y se incuban a 37°C durante 1 hora, pasada la cual y en mismo orden en que se introdujeron en el baño, se sacan deteniendo la reacción con una gota de ClH 2N. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Gilford a $415 \text{ m}\mu$ frente a agua destilada.

2. Determinación de la GH hipofisaria por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para la determinación de las proteínas se sometieron los homogenados hipofisarios a electroforesis en gel de poliacrilamida. Para preparar un gel de poliacrilamida es necesario partir de 3 soluciones: la primera contiene buffer tris-Clorhídrico al pH adecuado, la segunda acrilamida y bisacrilamida según el tamaño del poro deseado y la tercera contiene el catalizador de la reacción (persulfato amónico). El tipo de gel usado en todos los experimentos ha sido al 7.25 % de acrilamida. Para ello hemos partido de las siguientes soluciones:

SOLUCION I

ClH 48 ml
 TRIS 36.6 gr
 TEMED 0.23 ml
 H₂O hasta 100 ml
 pH 8.9

SOLUCION II

Acrilamida 28.0 gr
 Bisacrilamida 0.735 gr
 H₂O hasta 100 ml

SOLUCION III

Persulfato amonico 0.14 gr
 H₂O hasta 100 ml

Las soluciones I y II se conservan inalteradas guardadas durante meses en nevera. La solución de persulfato amónico se prepara en el momento de usarla. A partir de las soluciones I, II y III se forma la solución final que consta:

SOLUCION FINAL

1 parte de I
 2 partes de II
 1 parte de agua destilada
 4 partes de solución de persulfato

Para la preparación de los geles se utilizaron cilindros de vidrio de 6 mm de diámetro por 8 cm de longitud, que fueron cerrados en uno de sus extremos con papel parafinado. Se colocan los tubos en una gradilla de modo que queden totalmente verticales, se hace gelificar en su interior aproximadamente 1.5 ml de solución final. Posteriormente se cubre la superficie con agua destilada para facilitar la gelificación, la cual tiene lugar a temperatura ambiente a las 2 ó 3 horas. Una vez

gelificados se aplicó la muestra que consistió en 0.2 ml del homogenado hipofisario en agua destilada al 40 % de sacarosa.

Para la separación electroforética de las proteínas se usó buffer Trisglicina pH = 8.6 preparado en el momento de su uso a partir de una solución stock que consta de:

Tris	6.0 gr
Glicina	28.8 gr
H ₂ O	hasta 1 litro

Se usó el mismo buffer en las dos cubas de electroforesis. En la cuba superior se añadió 1 ml de azul de bromofenol al 0.001 % que sirve como indicador del frente de electroforesis, la cual se llevó a cabo con una intensidad de corriente de 4 mA por gel durante 60 minutos. Al concluir la electroforesis se sacan con cuidado los cilindros de vidrio y se tiñen durante 3 minutos con amido negro (amido negro 1 gr. ácido acético al 7 % llevado a 100 ml). Con objeto de eliminar el exceso de colorante se lavan durante 24 horas con una solución de metanol-agua-acético en proporción 5-5-1. A continuación se hacen sucesivos lavados con acético al 10 % hasta conseguir que el fondo quede desteñido pudiendo así observar las bandas de proteínas teñidas de azul. Aparecen tres bandas mayoritarias de proteínas que de mayor a menor movilidad electroforética corresponde a prolactina, albúmina y hormona de crecimiento (Jones y cols 1965). La intensidad de color correspondiente a una banda es proporcional a su concentración de proteína y dentro de un rango de concentración proteica sigue la ley de Beer, pudiéndose así comparar dos muestras diferentes de la misma proteína. Para la cuantificación del colorante contenido en las bandas del gel se utilizó un espectrofotómetro Gilford provisto de un transportador de geles con una luz monocromática de 600 m μ ,

DILUCIONES HIPOFISIS CONTROL

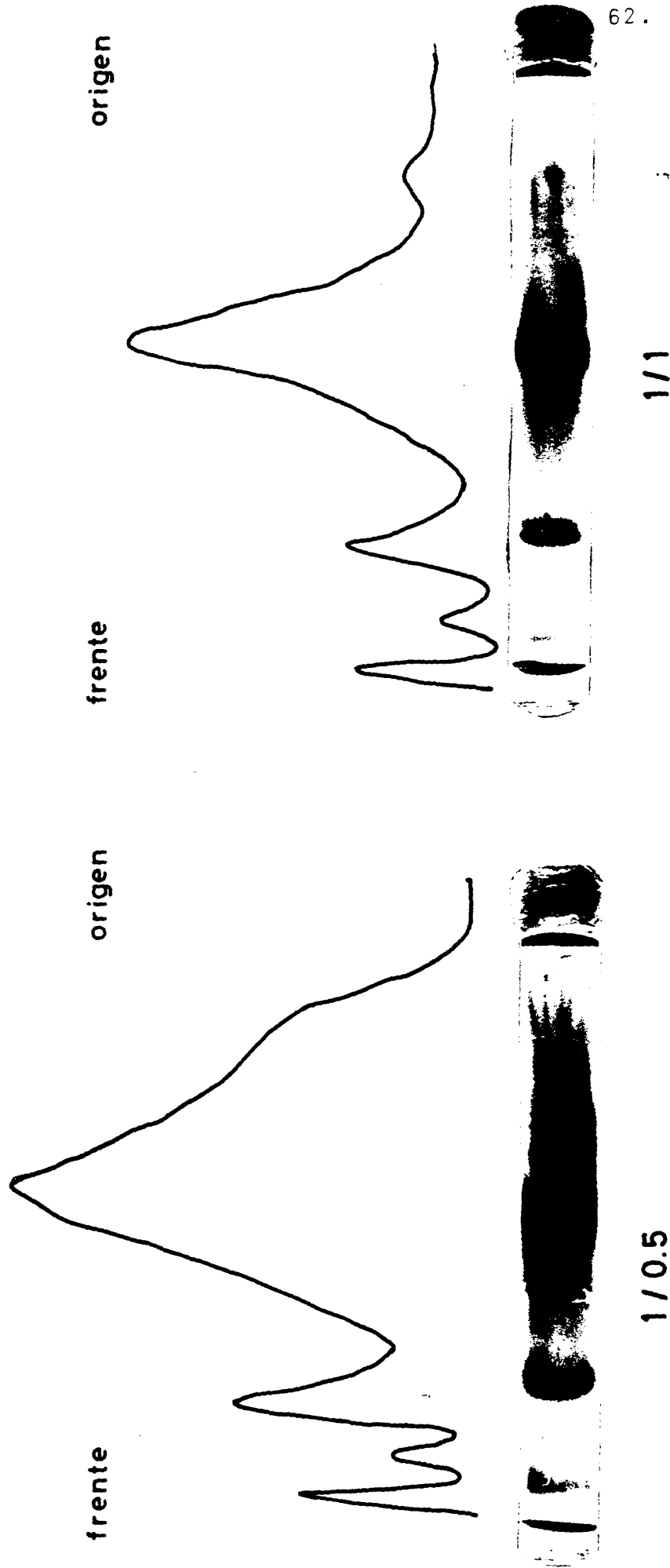
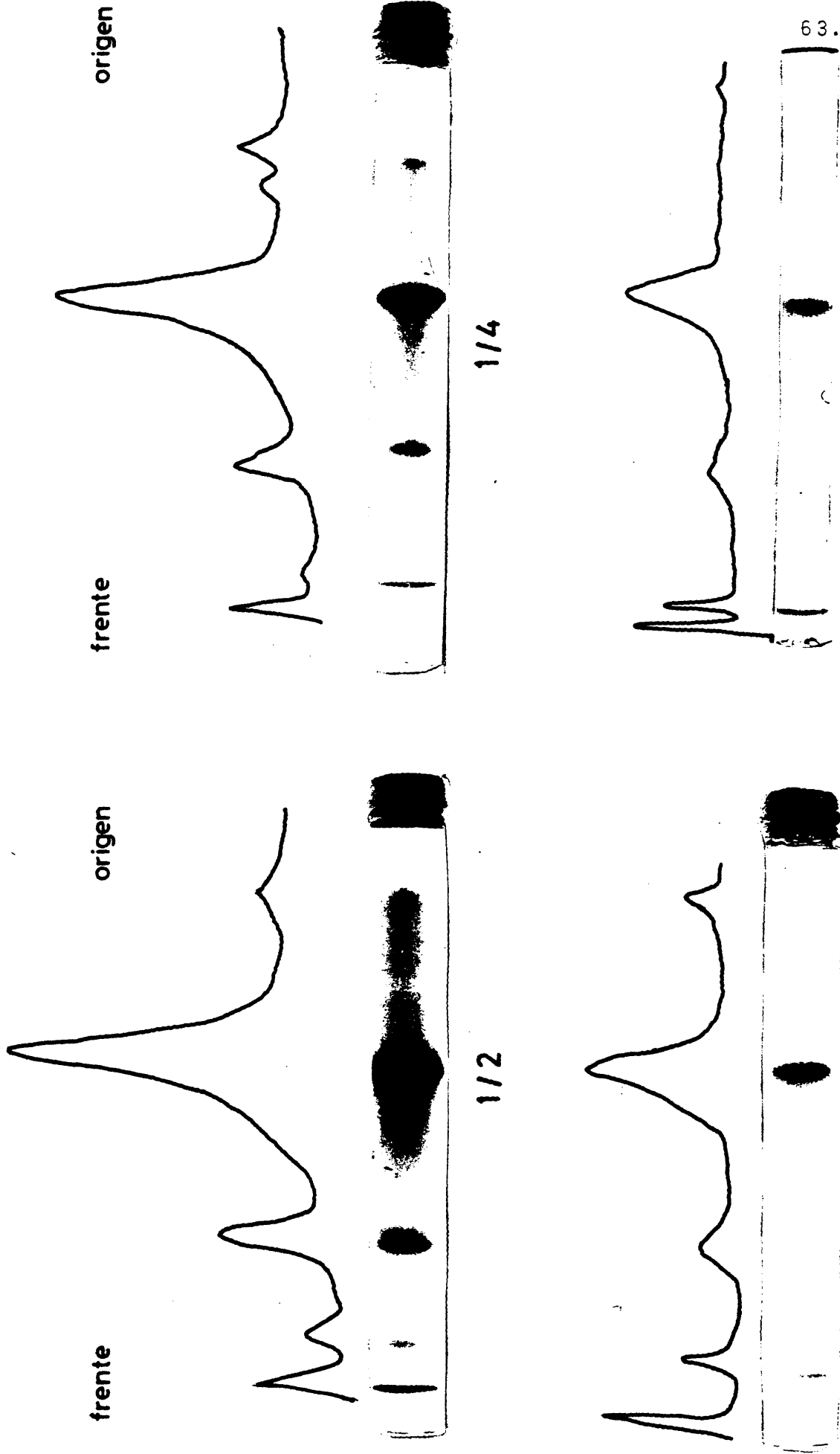


Fig. 1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de diferentes diluciones de un homogenado hipofisario de rata control. Aspecto de los geles teñidos con amido negro y espectrofotometría cuantitativa de los mismos leídos a 600 m μ .

DILUCIONES HIPOFISIS CONTROL



1/8

1/16

Fig. 2.-Electroforesis en gel de poliacrila mida de diferentes diluciones de un homogenado hipofisario de rata control. Aspecto de los geles teñidos con amido negro y espectrofotometría cuantitativa de los mismos leídos a 600 m μ .

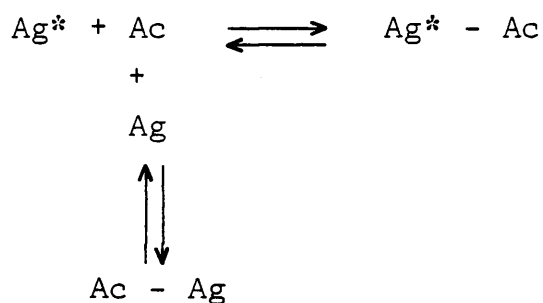
así se obtiene una gráfica donde aparecen tres picos correspondientes a las zonas de máxima absorción de las bandas de GH, albúmina y prolactina. El área limitada por cada uno de los picos de máxima absorción medida con un planímetro y expresado en cm^2 puede utilizarse como dato numérico del contenido en proteína.

Diluciones sucesivas de una misma hipófisis control, fueron sometidas a electroforesis. En las figuras 1 y 2 se representa las bandas hormonales correspondientes a cada gel así como su perfil tras la lectura en el espectrofotómetro.

C. DETERMINACIONES RADIOINMUNOLOGICAS

1. Generalidades

El radioinmunoensayo (RIA) se basa en la inhibición competitiva de un antígeno marcado (Ag^*) y un antígeno no marcado (Ag) con su correspondiente anticuerpo específico (Berson y Yalow 1959, Hales y Randle 1963). El principio básico del radioinmunoensayo puede esquematizarse en la siguiente reacción:



La hormona que actúa de antígeno al unirse al anticuerpo forma el complejo antígeno-anticuerpo. Dicho complejo puede ser radioactivo ($\text{Ag}^* - \text{Ac}$) o no radioactivo ($\text{Ag} - \text{Ac}$) dependiendo de que lo que se una al anticuerpo sea el antígeno marcado o

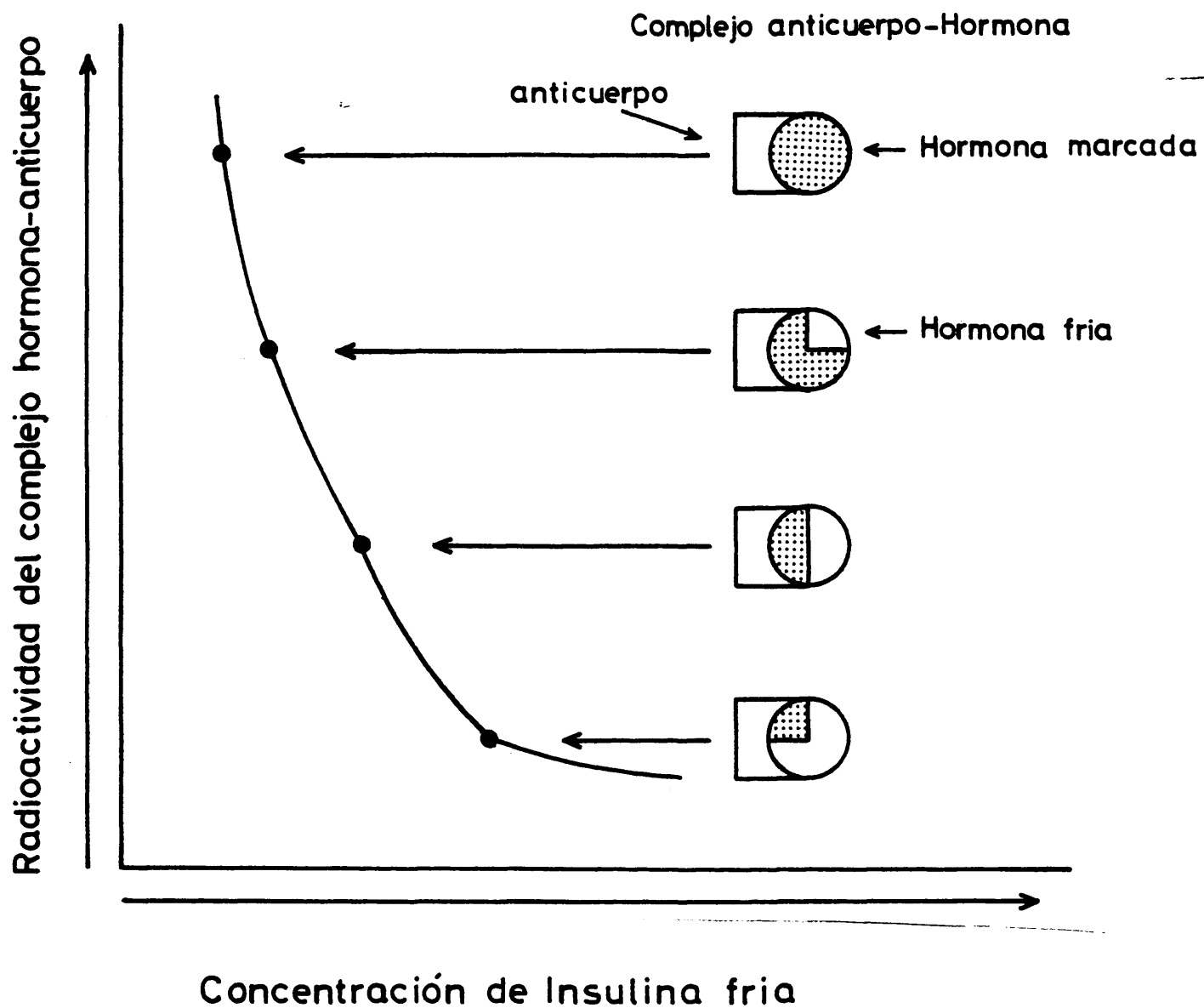
el no marcado. El radioinmunoensayo aprovecha la propiedad de la hormona no marcada en plasma o en otras soluciones de competir con la hormona marcada en su unión al anticuerpo específico. Si denominamos a la hormona libre marcada F (free) y al complejo (Ag* - Ac) B (bound), el cociente B/F disminuye a medida que aumenta la concentración de hormona no marcada, también denominada hormona fría (Fig. 3).

Por lo tanto, para la realización de un RIA son necesarios: un anticuerpo específico, hormona marcada y hormona no marcada para la preparación de la curva standard. El radioinmunoensayo requiere también un método de separación del complejo antígeno-anticuerpo ya que no precipita espontáneamente dada la baja concentración de las sustancias reaccionantes.

Anticuerpos

Son gamma-globulinas aisladas de animales que han respondido inmunitariamente con la producción de anticuerpos específicos frente a la hormona que les ha sido inyectada. Para que un anticuerpo sea específico en un radioinmunoensayo se requiere que a una dilución muy alta tenga gran afinidad por la hormona y sea realmente específico (Odell y cols 1969).

Para obtener la dilución óptima a la que se debe usar en un RIA un antisuero, este debe ser titulado. Para ello se estudia la capacidad de ligazón en un amplio margen de diluciones en presencia de hormona marcada y en presencia o en ausencia de hormona fría. Finalizada la titulación se representa gráficamente poniendo en abscisas las diluciones del antisuero y en ordenadas el % de hormona ligada (RPB). Se considera como dilución óptima para utilizar en el ensayo aquella que con una misma cantidad de hormona fría produce el mayor desplazamiento manteniendo una elevada capacidad de ligazón (Fig. 4).



Principio básico del radioinmunoensayo descrito por Berson y Yalow.

BERSON, S.A. and YALOW, R.S.: Diabetes 14: 549-572 ; 1965

Fig. 3

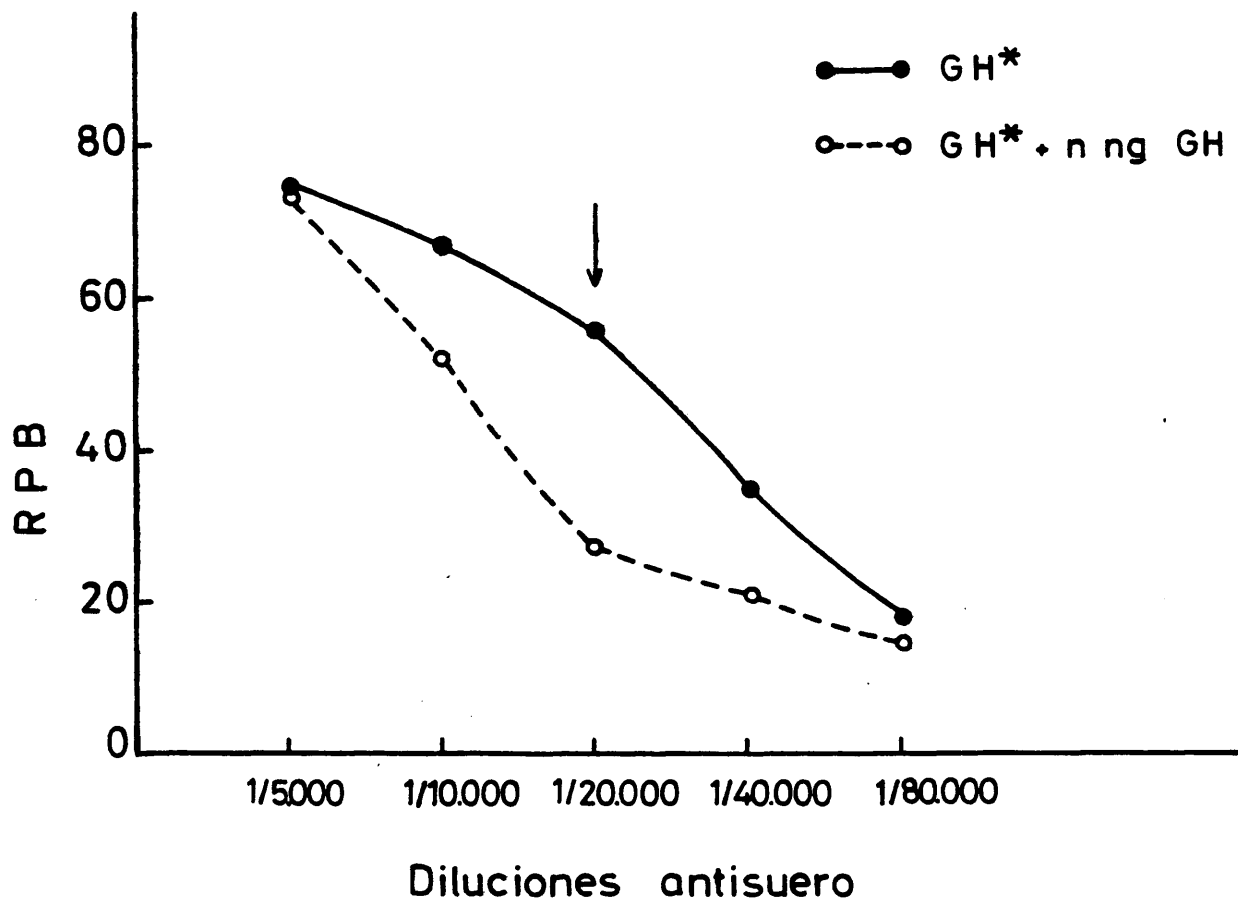


Fig. 4. - Curva de titulación del antisuero.

Hormona marcada

Para obtener la hormona marcada con un isótopo radioactivo se ha seguido el método de Greenwood y cols., (1963). Como isótopo radioactivo se ha usado el I^{125} que mediante el tratamiento con Cloramina T se oxida a iodo molecular incorporándose a los residuos tirosilo de las proteínas (Geschwind y Li 1958). La reacción se detiene añadiendo un exceso de metabisulfito sódico.

Con el fin de evitar daños estructurales en la proteína por la presencia del agente oxidante, se ha de controlar la cantidad de éste y el tiempo de la reacción. Cada hormona tiene un tiempo de reacción y una cantidad de oxidante característicos. Una vez detenida la reacción se procede a la separación de la hormona marcada del resto de los reactivos. Para ello se realiza una cromatografía en Sephadex G-50 (Paul y Odell, 1964). Cada vez que se vaya a utilizar la hormona marcada se debe purificar con objeto de eliminar la hormona dañada y el iodo libre, para lo cual se realiza una cromatografía en columna de Sephadex G-100.

Curva standard y otros elementos del RIA

Todo radioinmunoensayo debe constar de una curva standard donde se leerá la concentración hormonal de los problemas.

La curva standard consta de una serie de puntos que contienen cantidades crecientes de hormona fría frente a una misma cantidad de hormona marcada. Los diferentes puntos de la standard se obtienen a través de sucesivas diluciones partiendo de una solución de concentración conocida e igualando posteriormente los volúmenes con el buffer diluyente del RIA.

En todo RIA además de la curva standard deben existir una serie de puntos a los que denominamos ceros (B_0) que contienen únicamente hormona marcada y antisuero, es decir, carecen de hormona fría, y representan la radioactividad máxima ligada al anticuerpo. Deben existir además unos blancos (B_1) que no contienen ni antisuero ni hormona fría, pero sí hormona marcada y representan la ligazón inespecífica existente que debe restarse al resto de los tubos. Por último, deben existir unos "standard de contaje" o "contaje de radioactividad" que nos da la radioactividad que ponemos en el ensayo en forma de hormona marcada.

La curva standard, blancos, ceros, "standard de contaje" y los problemas deben recibir igual tratamiento durante el ensayo para una mayor validez de los resultados.

Desarrollo de la reacción

Una vez pipeteados la curva standard, los ceros, blancos, "standard de contaje" y los problemas, se procede al desarrollo de la reacción para lo cual se adicionan la hormona marcada (previamente purificada) y el antisuero (a la dilución apropiada) procediendo a continuación a la incubación.

En esta reacción existen dos posibilidades (Galskov 1972):

1º) Se adicionan a la vez la hormona marcada y el antisuero, compitiendo durante la incubación la hormona marcada y la fría por los sitios de unión al anticuerpo de modo proporcional a su concentración en el medio de reacción (ej. TSH)

2º) Se adiciona primero el antisuero y tras un período de

incubación la hormona fría ocupa parte de los sitios de unión al anticuerpo, a continuación se adiciona la hormona marcada que pasará a ocupar los lugares que permanecen libres (ej. GH)

Separación del complejo antígeno-anticuerpo

Existen varias técnicas para la separación del complejo antígeno-anticuerpo de la hormona libre, como son: métodos electroforéticos, adsorción de la hormona libre en fase sólida, filtración en gel, precipitación del complejo con un 2º anticuerpo (Utiger y cols 1962). Nosotros hemos utilizado esta última metódica.

La precipitación del complejo con un 2º anticuerpo consiste en la utilización de antisuero obtenido contra la gamma-globulina de la especie animal en que se obtuvo el anticuerpo anti-hormona. De esta forma se consigue que el complejo aumente de tamaño con la consiguiente insolubilización y puede ser separado por filtración o centrifugación.

Para elegir la concentración óptima de antigamma-globulina es preciso realizar una titulación, para lo cual se usan cantidades crecientes de antigamma-globulina frente a una misma concentración de hormona marcada, en presencia del antisuero específico. Se obtiene una curva de titulación en que a cantidades crecientes de antigamma-globulina corresponde mayor radioactividad en el precipitado, hasta alcanzar un plateau. La cantidad menor de antigamma-globulina que corresponde a la iniciación del plateau es la que debe usarse en el ensayo.

Representación gráfica de la curva standard

Si se representa en abscisas el logaritmo de la concentra

ción de hormona y en ordenadas el cociente B/F, siendo B = hormona marcada ligada al anticuerpo y F = hormona marcada libre, se obtiene una representación hiperbólica de gran curvatura, donde es difícil la lectura de los resultados. Para subsanar esta dificultad se han realizado varias transformaciones. Nosotros hemos utilizado:

a) RPB = Relative Percent Bound

$$\text{RPB} = \frac{B^* - B_1^*}{B_0^* - B_1^*} \times 100$$

siendo B* = radioactividad ligada a las standard o problemas.

B₁* = radioactividad ligada a los blancos

B₀* = radioactividad ligada a los ceros

Si representamos de nuevo en abscisas el logaritmo de la concentración standard y en ordenadas el RPB se obtiene una curva sigmoide, en la que sólo una parte es recta. Con el fin de linearizarlo más aún, se utiliza:

b) Logit

$$\text{Logit} = \ln \frac{\text{RPB}}{100} - \text{RPB}$$

que llevado de nuevo al eje de ordenadas se obtiene una representación lineal que permite la aplicación de los métodos estadísticos desarrollados para regresiones lineales (Fig. 5). Una vez representada la curva standard y conocido el RPB o el Logit de cada problema podremos localizarlo dentro de la curva patrón y conocer así la concentración hormonal en la muestra. Estos cálculos los realizamos automáticamente en una calculadora

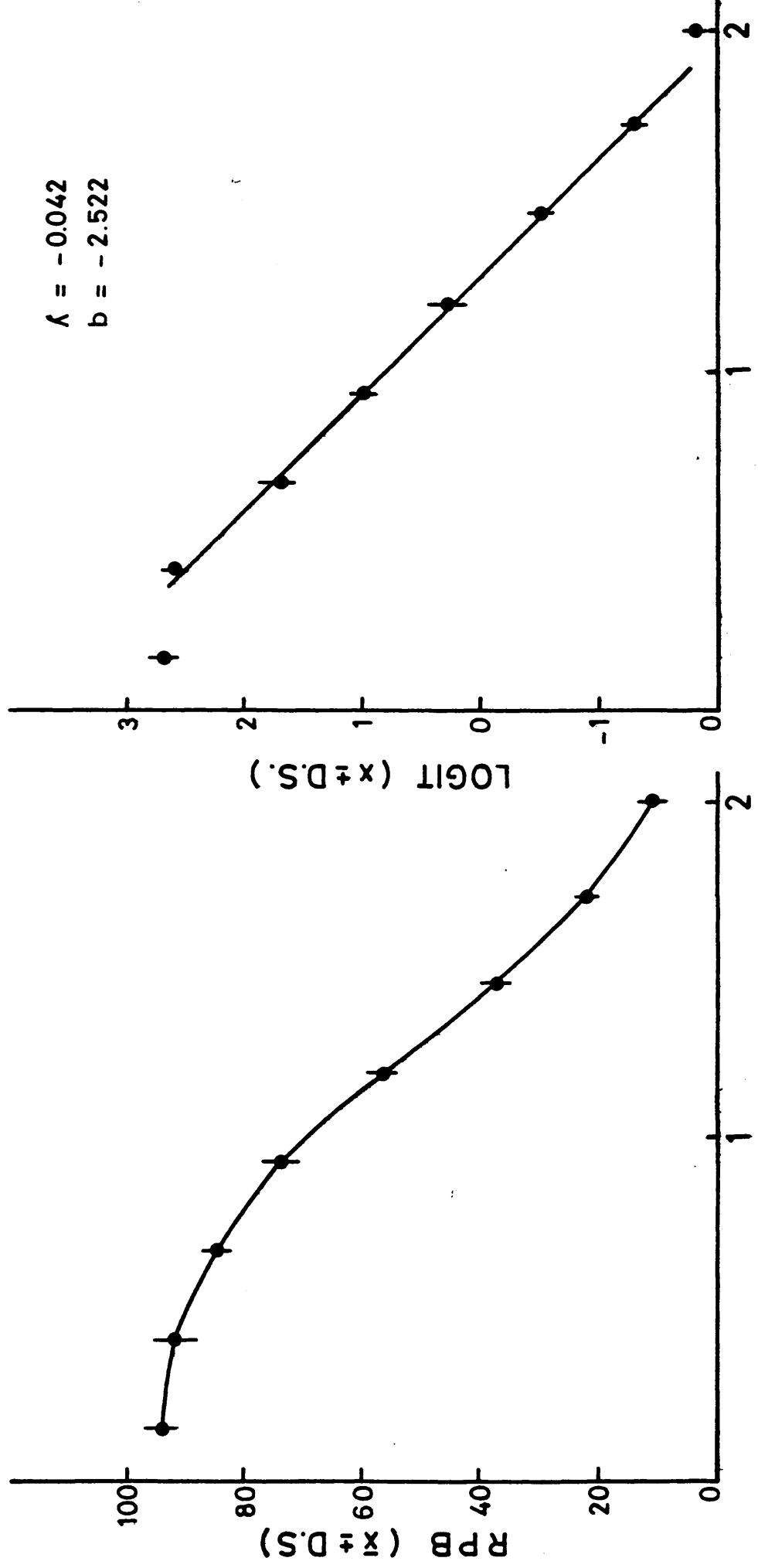


Fig. 5.- Curva standard de R-GH

Olivetti P-802.

Validación del método

La validez de un radioinmunoensayo viene dado por una serie de parámetros (Galskow 1972) que son:

1ª) Sensibilidad

Se define como la concentración mínima de hormona fría de tectable, significativamente diferente de los ceros. Se calcula mediante

$$t = \frac{c.p.m._0 - c.p.m._{min}}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n_{min}} \right)}}$$

Donde s^2 = estimación de la varianza a lo largo de la curva standard

$c.p.m._0$ y $c.p.m._{min}$ = valores medios de los ceros y de la concentración menor de la standard que es significativamente diferente de los ceros.

n_0 y n_{min} = número de muestras usadas en la determinación de $c.p.m.$ y $c.p.m._{min}$

2ª) Precisión

Un radioinmunoensayo será tanto más preciso cuanto menor sea la varianza de los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones de una misma muestra. Viene representado por

el índice de precisión

$$\lambda = \frac{\sqrt{s^2}}{b}$$

De donde s = varianza residual

b = pendiente de la parte lineal de la curva standard

3º) Especificidad

Se define como el grado mínimo aceptable de unión del anticuerpo a una sustancia distinta del antígeno que se desea medir.

4º) Exactitud

La exactitud se define como el grado en que la media de un n° infinito de medidas de una sustancia está de acuerdo con la cantidad exacta de la sustancia presente (Midgley 1969)

5º) Reproducibilidad

Se define como el grado en que una medida es semejante a otra medida repetida (Midgley 1969). La evaluación de la reproducibilidad es una valoración de la estabilidad y similitud de las condiciones experimentales.

2. Radioinmunoensayo de GH de rata

1º) Utilizamos el Kit que suministra el National Institute Arthritis and Metabolic Diseases (NIAMD), Rat Pituitary Program (NIH) (Bethesda, Maryland, U.S.A.) que consta de los siguientes reactivos:

- Hormona de crecimiento de rata (R-GH) altamente purificada para marcaje.
- R-GH para solución standard
- Suero anti-R-GH obtenido en monos.

2º)

- a) I^{125} especial para la iodación de proteínas procedentes de Radiochemical Center, Amersham (England)
- b) Cloramina T, de Fluka A.C. Buchs S.G.
- c) Metabisulfito sódico de Merch Co.
- d) Sephadex G-50 y G-100, de Pharmacia Fine Chemicals (Upsala)
- e) EDTA, de Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri (U.S.A.)
- f) Albúmina sérica bovina (BSA) en polvo, fracción V, de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (U.S.A.).
- g) Suero de mono no inmune, suministrado por el Centro de Virus de Majadahonda (Madrid).
- h) Antigamma-globulina de mono obtenida en cabra, suministrada por Antibodies Incorporated (U.S.A.).
- i) Soluciones tampón:
 - PBS 0.5 M pH = 7.6
 - PBS 0.05M pH = 7.6
 - 1 % BSA-PBS con EDTA 0.025 M pH = 7.6 (buffer diluyente del RIA)
 - Veronal 0.05 M pH = 8.6 (buffer eluyente)

Marcaje de R-GH con I^{125}

A una fracción de 25 μ g de R-GH altamente purificada se le añaden 2 mCi de I^{125} en 20 μ l y 25 μ l de buffer PBS 0.5 M. Posteriormente se adicionan 25 μ l de Cloramina T (21 mg en 6 ml de PBS 0.05 M) preparada en el momento. Tras la adición de la Cloramina T se agita el vial durante 60 segundos, transcurridos los cuales se añaden 100 μ l de Metabisulfito sódico (10 mg en 6 ml de PBS 0.05 M) también recién preparado.

Posteriormente se toma la mezcla de reacción con una micro pipeta y se pasa por una columna de Sephadex G-50 de 0.9 x 14cm, que ha sido previamente preparada, equilibrando 1 gr de gel en 2 % BSA-PBS con objeto de que el Sephadex se sature de proteína y así evitar que luego se pegue la hormona marcada. A continuación se lava con Veronal 0.05 M y por último se empaqueta en cámara fría. Tras depositar la mezcla de reacción en la columna, se recogen fracciones de 0.5 ml, la elución se hace con Veronal 0.05 M. Las fracciones se recogen en tubos que contienen 100 μ l de 2 % BSA-PBS. A continuación se cuenta la radioactividad en alícuotas de 10 μ l y se representa la radioactividad correspondiente a cada fracción (Fig. 6). El primer pico de la curva corresponde a la hormona marcada. Los eluidos que corresponden a la parte superior descendente de este pico, se diluyen 5 veces con 2 % de BSA-PBS y se guardan en fracciones de 0.5 ml a -20° C. El 2^o pico corresponde al I no incorporado a la hormona.

Repurificación de la hormona marcada

Inmediatamente antes del RIA, la hormona marcada debe ser repurificada con objeto de separar la hormona marcada de la dañada y del I^{125} .

La purificación se realiza en una columna de Sephadex G-100 de 1.2 x 40 cm que previamente ha sido preparada con 4 gr de gel en 2 % BSA-PBS durante 48 horas, al cabo de las cuales se lava con Veronal 0.05 M y se empaqueta en la cámara fría. Una de las fracciones de 0.5 ml de R-GH* una vez descongelada se eluye en la columna con Veronal 0.05 M, recogiendo fracciones de 1.5 ml en tubos que contienen 100 μ l de 2 % BSA-PBS. A continuación se cogen alícuotas de 150 μ l de cada fracción y se cuentan, representando posteriormente la radioactividad correspondiente a cada fracción (Fig. 7) Con los eluidos correspondien

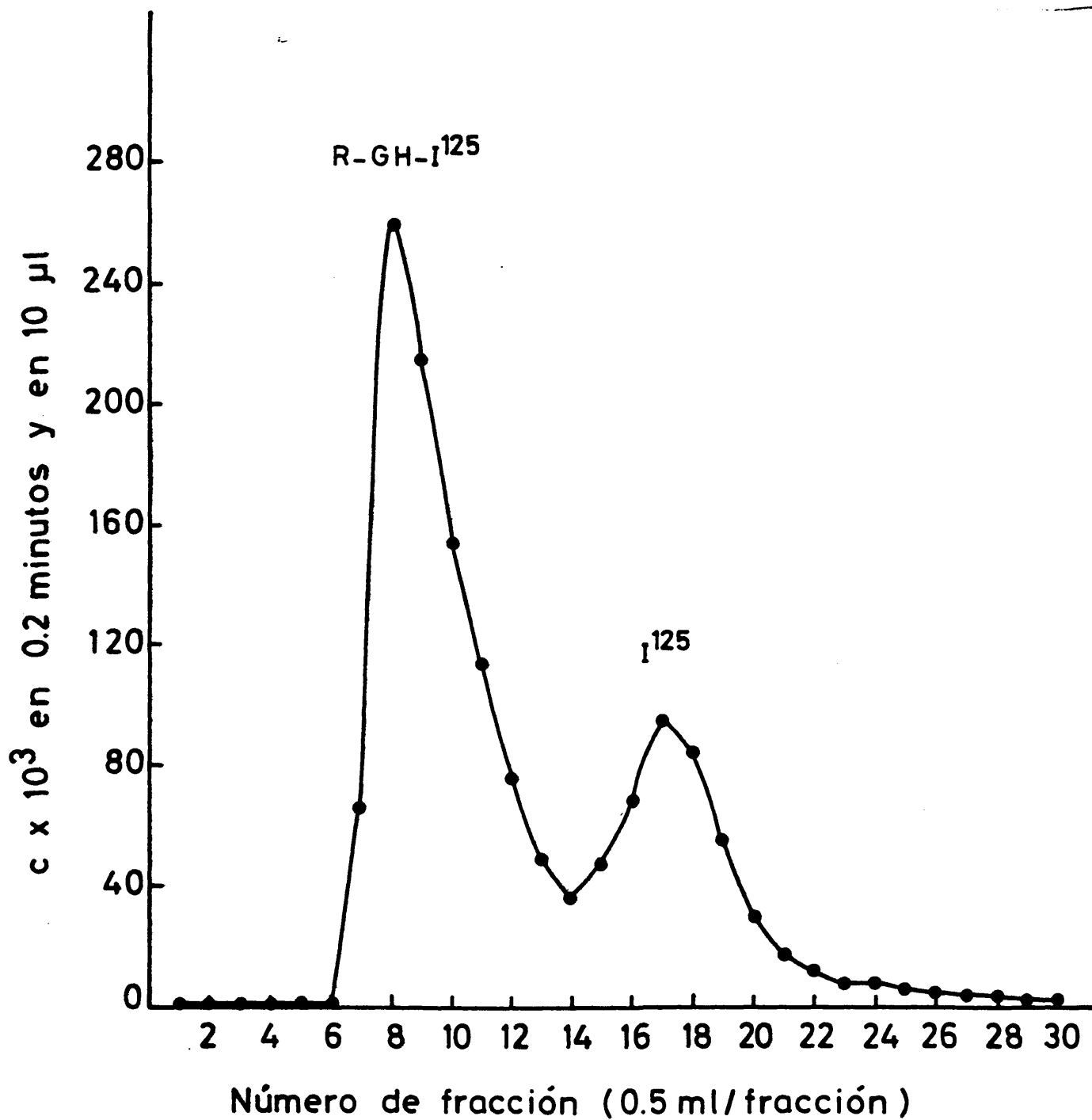


Fig. 6.- Purificación del marcaje de R-GH con I^{125}

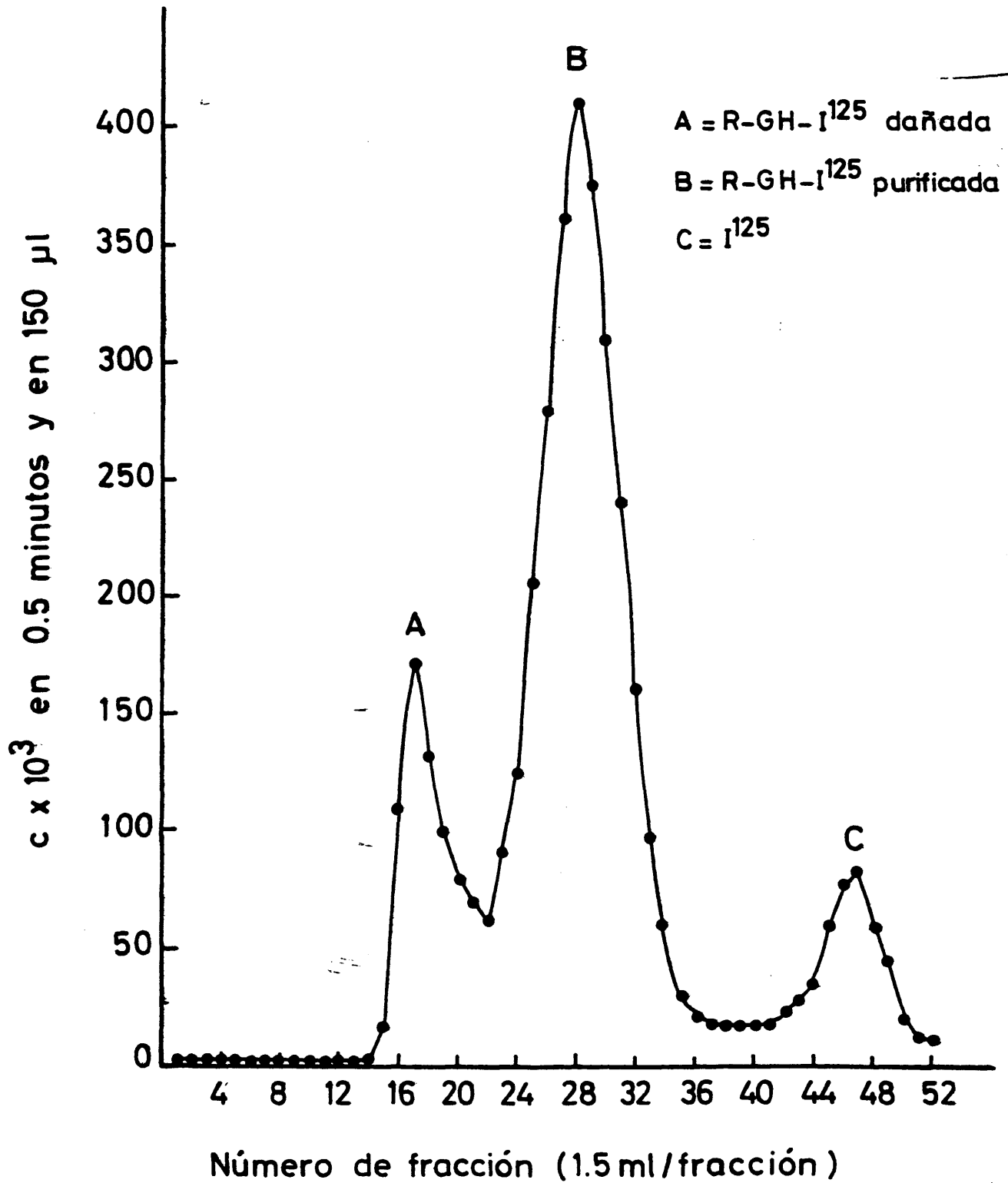


Fig. 7.- Repurificación de R-GH-I¹²⁵ previa al RIA.

tes a la parte superior descendente del 2º pico de proteína marcada se forma un pool para su posterior utilización en el RIA. El primer pico corresponde a la R-GH* dañada y el tercero es el I^{125} inorgánico procedente de la desiodación durante el almacenamiento.

Preparación de la curva standard

A partir de una solución stock de R-GH (200 ng/ml) se obtienen las soluciones para los diferentes puntos de la curva, que son, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, y 0.156 ng en 0.1 ml de buffer diluyente (1 % BSA-PBS con EDTA 0.025 M pH = 7.6). Se preparan además los tubos correspondientes a los puntos "ceros" y "blancos" a los que se pipetea 0.1 ml de buffer diluyente, estos tubos recibirán los mismos reactivos que los puntos de la curva standard y los problemas, salvo los blancos que recibirán la mezcla de reacción exenta del antisuero anti-R-GH (1º anticuerpo). Todos los tubos se almacenan a -20º C hasta la realización del ensayo.

Realización del ensayo

Se utilizaron tubos de vidrio de 8 x 90 mm o de cristal de poliestireno de 11 x 70 mm a los que se añadió 0.1 ml bien de los problemas o de las diluciones de R-GH standard previamente preparada. A continuación se añadió a cada tubo 0.3 ml de buffer diluyente que contiene suero de mono no inmunizado, a la dilución 1/100 y antisuero anti-R-GH según la titulación obtenida. Posteriormente se agitan los tubos y se incuban en estufa a 37 º C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, se añadieron 0.1 ml por tubo de una dilución de R-GH* en el buffer diluyente de modo que cada tubo reciba de 8.000 a 10.000 c.p.m. Se agitaron los tubos y se continuó la incubación a 37 º C durante

18 horas. Finalizada la incubación en caliente se adicionaron 0.1 ml por tubo de antigamma-globulina a la dilución conveniente y tras ser agitados los tubos se guardaron en nevera a 4°C durante 24 horas. Al finalizar este tiempo se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 45 minutos, se aspiró el sobrenadante y se contó la radioactividad del precipitado.

D. CINETICA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA

Se usó r-GH-I¹²⁵ con una actividad específica de 70 µc/µg. Los animales tras ser anestesiados con éter recibieron una única inyección de GH* en 0.5 ml de salino al 1 % de BSA. La hormona previamente purificada se inyectó en la vena femoral de una de las extremidades inferiores. La radioactividad administrada osciló entre 800.000 - 1.100.000 c.p.m/0.5 ml. Los tiempos de extacción fueron: 2, 5, 10, 15, 20 y 60 minutos. Cada animal se usó sólo para la determinación de tres tiempos. Un grupo de animales recibieron únicamente 0.5 ml de buffer salino obteniendo muestras a los tiempos antes señalados estimando de ese modo el efecto que la anestesia produce sobre los niveles endógenos de la hormona. Con objeto de corregir los datos ante la posible degradación de la hormona exógena por el plasma, una alícuota de GH* fue incubada a 37°C con un plasma control o con un plasma procedente de un animal diabético, a continuación se tomaron muestras de 0.1 ml a todos los tiempos desde los 2 a los 60 minutos.

Los parámetros estudiados fueron: vida media, velocidad de aclaramiento (MCR) y velocidad de secreción (SR). Todas estas determinaciones, están basadas en el supuesto de que la GH-I¹²⁵ y la GH endógena se metabolizan de igual forma. Igualmente hay que admitir que durante el período de experimentación

existe un estado estacionario para la hormona endógena. A continuación pasaremos a estudiar cada uno de los parámetros antes mencionados.

1. Vida media

Tras una inyección de GH*, el perfil de la curva de desaparición de la radioactividad en plasma frente al tiempo no es lineal a pesar del uso de coordenadas semilogarítmicas. Ajustándonos a la porción rectilínea de la curva y extrapolando la radioactividad a tiempo cero, el tiempo "t" en que dicha radioactividad se ha reducido a la mitad representa la vida media de la hormona en estudio

2. Velocidad de aclaramiento (MCR)

Según Frohman y Bernardis (1970), el MCR se define como el volumen de plasma que queda libre de radioactividad por unidad de tiempo. Hemos calculado el MCR de acuerdo con la fórmula de Kohler y cols (1968)

$$\text{MCR (ml/min)} = \frac{R}{\int_0^{\infty} x \, dt}$$

Donde R es la dosis de hormona exógena inyectada y x es la concentración plasmática de radioactividad precipitable inmunológicamente. El parámetro $\int_0^{\infty} x \, dt$ puede también calcularse hallando el área determinada por la curva de desaparición de la radioactividad frente al tiempo usando un sistema de coordenadas lineales. Para hallar dicho área es necesario extrapolar la curva hasta el punto de corte con el eje de abscisas.

Para la inmunoprecipitación se usaron alícuotas de 0.1 ml de cada una de las muestras que tras realizar el primer conteo recibieron 0.1 ml del primer anticuerpo anti-GH especial para inmunoprecipitación, suministrado por el NIH que fue usado a una dilución final 1/3000. Tras una incubación a 37° C durante 18-24 horas se les añadió 0.1 ml del 2º anticuerpo a una concentración superior a la utilizada en el radioinmunoensayo (RIA) con objeto de asegurar la máxima precipitación del complejo GH*-1º anticuerpo. Tras una incubación a 4° C durante 24 horas, se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 45 minutos y la radioactividad del precipitado se expresó como % del primer conteo. Al igual que en el RIA se dispusieron de unos tubos "blancos" carentes de 1º anticuerpo, con objeto de determinar la ligazón inespecífica, la cual fue del 2-2.5 %.

Paralelamente a la inmunoprecipitación, se realizó una precipitación de la GH-I¹²⁵ con ácido tricloroacético (TCA). Una alícuota de 0.2 ml de plasma recibió 0.5 ml de plasma stock de animal normal con el fin de aumentar las proteínas y facilitar la precipitación. A continuación se realizó el primer conteo. Las proteínas se precipitaron con 2 ml de ácido tricloroacético al 10 % en agua destilada y se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 10' al cabo de los cuales se decantó el sobrenadante. Este lavado se hizo dos veces y la radioactividad del precipitado se expresó como % del primer conteo.

3. Velocidad de secreción (SR)

La velocidad de secreción se calcula

$$SR \text{ (ng/min)} = MCR \cdot i$$

donde i es la concentración de hormona endógena determina-

da por radioinmunoensayo.

4. Fraccionamiento en Sephadex G-100 de la GH en plasma

a) GH endógena

Se provocó mediante inyección con pentobarbital (3 mg/100 gramos de peso corporal) la descarga hipofisaria de hormona de crecimiento. A los 10' de la inyección se sacrificó el animal sangrándole de la vena cava y tras la obtención del plasma, un volumen de 2 ml se sometió a cromatografía en columna de Sephadex G-100 de 1.2 x 40 cm usando como buffer eluyente Veronal 0.05 M. Se recogieron 50 fracciones de 1.5 ml de las que se usaron 0.1 ml por duplicado para la determinación de hormona de crecimiento por RIA.

b) GH-I¹²⁵ administrada por vía intravenosa

Los animales fueron inyectados con GH-I¹²⁵ recién purificada. Tras ser anestesiado el animal con éter, se inyectó la GH* en una de las extremidades inferiores en un volumen de 1 ml de salino con una radioactividad de 2.000.000 - 3.000.000 c.p.m. Tras la inyección se sacaron muestras de sangre a diferentes tiempos con una jeringa heparinizada. Los tiempos de extracción fueron 2, 5, 10, 15, 20, 40 y 60 minutos después de la inyección de la hormona. En unos casos todas las muestras se tomaron del mismo animal, sacando sangre de las yugulares y la última toma de la cava, en otras ocasiones de cada animal se obtuvieron únicamente dos o tres muestras. La sangre se recogió en tubos que contenían 0.1 ml de heparina amorfa y posteriormente fueron centrifugados a 3.000 r.p.m. durante 30' con objeto de obtener una buena separación del plasma. Una vez separados los plasmas correspondientes a cada tiempo de extracción se almacenaron en nevera y se fueron pasando de uno en uno por una columna de

Sephadex G-100 de 1.2 x 40 cm que previamente había sido lavada da con 2 % BSA-PBS. Como buffer eluyente se usó Veronal 0.05 M. Se recogieron 50 fracciones de cada plasma, con un volumen por fracción de 1.5 ml. Los tubos en que se recogieron contenían 0.1 ml de 2 % BSA-PBS. Posteriormente se contó la radioactividad correspondiente a cada fracción y se representó gráficamente observando el patrón de elución de cada uno de los tiempos. Los volúmenes plasmáticos usados en la elución variaron de 0.5-1.5 ml dependiendo de la disponibilidad de plasma. De cada una de las muestras aplicadas en la columna se contaron 0.1 ml con objeto de conocer la radioactividad total aplicada, expresando posteriormente como % la radioactividad correspondiente a cada uno de los picos.

Con el fin de estudiar en qué modo el almacenamiento en nevera influye posteriormente sobre el patrón observado, un mismo plasma fue sometido a cromatografía recién extraído del animal, a las 24 o a las 48 horas de haber estado en nevera, observando que el patrón no variaba entre su extracción reciente o tras haber permanecido 48 horas en nevera a 4^o C.

E. ESTUDIO IN VITRO DE LA SINTESIS HIPOFISARIA DE GH

Medio de incubación

Como medio de incubación hemos utilizado una solución de Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) que consiste en un sistema tampón CO₂-Bicarbonato semejante al del organismo. Para su preparación hemos partido de las siguientes soluciones (De Luca y Cohen 1964)

1.	ClNa	0.90 %
2.	ClK	1.15 %
3.	Cl ₂ Ca	1.22 %
4.	PO ₄ H ₂ K	2.11 %
5.	SO ₄ Mg.7H ₂ O	3.82 %
6.	CO ₃ HNa	1.30 %

La solución final se forma a expensas de las antes mencionadas mezclándolas en la siguiente proporción:

100 partes	1	1 parte	4
4 partes	2	1 parte	5
3 partes	3	21 partes de	6

Se gasea la solución durante 10 minutos con una mezcla de 5 % CO₂ y 95 % de O₂. Una vez gaseada, se guarda tapada en hielo o en nevera hasta el momento de su uso. Debido a que la síntesis de proteínas está aumentada en las hipófisis cuando se añade glucosa al medio (Lee y cols 1968) pusimos este metabolito en una concentración de 250 mg por 100 ml de KRB.

En cada uno de los viales de incubación se pipetearon 0.5 ml del medio KRB con glucosa (KRBG) por cada adenohipófisis. Para estudiar la incorporación de aminoácidos a proteínas adenohipofisarias añadimos al medio 0.2 µCi de leucina marcada con H³ (en las posiciones 4 y 5, actividad específica 60 Ci/mmol. Amershan) por cada hipófisis. Los viales conteniendo el medio de incubación, se guardaron en frío y tapados hasta el sacrificio de los animales. Tras la adición del tejido se comenzó la incubación.

Incubación

Los viales conteniendo una hipófisis por vial, se cierran herméticamente con tapones de goma y se llevan a un baño en agitación Dubnoff a una temperatura constante de 37°C. Cada vial se gasea durante 15 minutos con 5 % CO₂ y 95 % O₂ mediante agujas a través de los tapones. Luego se someten a una agitación de 100 ciclos por segundo hasta el final de la incubación.

Siempre se llevó a cabo un período de preincubación de 1 ho

ra con el fin de eliminar las células rotas durante la manipulación del tejido. Al finalizar el mismo, se cambia el medio por otro nuevo que contendrá las sustancias a ensayar y se vuelve a gasear de nuevo de la misma forma. Cada vez que se abre un vial durante la incubación para cambiar el medio por los requerimientos experimentales, se vuelve a gasear antes de continuar el experimento. Desde la adición de la leucina $-H^3$ hasta que se consideró finalizada la incubación transcurrieron 3 horas, finalizadas las cuales, el medio se separó y cada hipófisis fue homogenada en 0.5 ml de agua destilada.

A continuación, con objeto de distinguir de toda radioactividad existente en la hipófisis la correspondiente a la hormona de crecimiento sintetizada "de novo", se realizó una inmunoprecipitación (dilución final primer anticuerpo 1/3000) utilizando 0.1 ml de cada homogenado hipofisario y 0.1 ml del medio de incubación con el fin de estudiar si la hormona marcada recién sintetizada ha sido liberada al medio.

F. METODOS ESTADISTICOS

1. Medidas dentro de un grupo

a) Media (\bar{x})

Es la suma de todos los datos de un grupo (x_i), dividido por el número de ellos (N)

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

b) Desviación standard (DS)

Es la raíz cuadrada de la varianza (s^2). Siendo la varianza, la suma de los cuadrados de las diferencias de cada uno de los datos y la media del grupo ($\sum (x_i - \bar{x})^2$), dividida por el número de datos menos la unidad ($N - 1$)

Luego:

$$D.S = s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

$\sum (x_i - \bar{x})^2$ se denomina en la literatura anglosajona "sum of squares", al referirnos posteriormente a ella la designaremos como s.sq

2. Comprobación que los datos de un grupo pertenecen a la misma población estadística

Cuando dentro de un grupo, uno o varios de los datos se separan aparentemente del valor medio y se quiere comprobar si pertenecen o no a la misma población estadística de los datos restantes, se aplica el test de X^2 (Moore y cols 1951).

En función del número total de datos que aparentemente se separan del valor medio, se determina el valor de X^2 en las tablas correspondientes.

Entonces se calcula: $\bar{x} \pm \sqrt{X^2} \cdot D.S$

Así obtenemos los límites entre los que estarán comprendidos los datos pertenecientes a una misma población. Los datos no comprendidos entre los valores $(\bar{x} \pm \sqrt{X^2} \cdot D.S)$ deben descartarse y se repiten los cálculos prescindiendo de ellos.

3. Comparación entre los valores medios

a) Entre dos grupos

Para comprobar si dos medias son iguales o diferentes, procedemos del siguiente modo:

i) Fijamos un nivel de significatividad de 0.05, es decir que sólo existe un 5 % de probabilidades de que la diferencia entre las medias se deba a la casualidad

ii) Calculamos el valor de t por el test de Student

El valor de t viene dado por:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p \sqrt{(1/N_1) + (1/N_2)}}$$

Donde: \bar{x}_1 = media del primer grupo

\bar{x}_2 = media del segundo grupos

N_1 = número de datos del primer grupo

N_2 = número de datos del segundo grupo

s_p = raíz cuadrada de la varianza ponderada

$$s_p = \frac{(N_1 - 1) s_1^2 + (N_2 - 1) s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}$$

Siendo: s_1^2 = varianza del primer grupo

s_2^2 = varianza del segundo grupo

-Si $N_1 = N_2 = N$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\sum (x_{1,n} - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_{2,n} - \bar{x}_2)^2}{N(N-1)}}$$

- Si $N_1 \neq N_2$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}\right) \left(\frac{\sum(x_{1,n} - \bar{x}_1)^2 + \sum(x_{2,n} - \bar{x}_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}\right)}}$$

iii) Buscamos en las tablas de Student el valor de p para t calculada, tomando como grados de libertad $N_1 + N_2 - 2$. Si $p > 0.05$, aceptamos que las dos medidas pertenecen a la misma población, es decir que son iguales y si $p < 0.05$, aceptamos que son diferentes estadísticamente.

b) Comparación entre los valores medios de varios grupos

Si tenemos varios grupos de datos y queremos conocer si existen diferencias significativas entre algunas de las medias, es necesario ver mediante un análisis de varianza si dicha comparación se puede realizar. Para ello procedemos del siguiente modo (Downie y Heath 1971)

i) Fijamos un nivel de significatividad en un 5 %

ii) Presuponemos que todos los datos pertenecen a una sola población y tomándolos como un conjunto calculamos el "sum of squares" al que llamamos s.sq._T.

Luego su varianza será:

$$V = \frac{s.sq._T}{N - 1}$$

Siendo N = número total de datos

$N - 1$ = grados de libertad

iii) Por otro lado, suponemos que los datos están incluidos en los diferentes grupos y calculamos el s.sq. entre estos grupos, al que llamamos s.sq._E.

La varianza entonces es:

$$V_E = \frac{s.sq.E}{K - 1}$$

Donde: K = número de grupos

K - 1 = grados de libertad entre grupos

iv) Entonces basándonos en i y ii) deducimos el s.sq. debido a la variabilidad de los datos dentro de los grupos que será:

$$s.sq.D. = s.sq.T. - s.sq.E.$$

Donde:

$$V_D = \frac{s.sq_T - s.sq_E}{(N-1) - (K-1)} = \frac{s.sq_T - s.sq.E}{N-K}$$

Siendo:

N-K = grados de libertad dentro de grupos

v) Si V_E es mayor que V_D , implica que la variabilidad de los datos dentro de los grupos es menor que la existente entre los distintos grupos y entonces, es posible que existan diferencias entre las medias de algunos grupos.

Para conocer si estas diferencias son estadísticamente significativas, calculamos el valor de F:

$$F = \frac{V_E}{V_D}$$

Con $F_{\alpha}(K-1)$ y $(N-1)$, buscamos en las tablas de distribución de F de Snedecor, el valor de p , que nos dará el grado de significatividad entre los valores medios.

TEST DE TUKEY

Para averiguar las diferencias entre medias que son significativas, aplicamos el test de Tukey (Snedecor, 1956)

a) Primero colocamos en orden decreciente de valores absolutos, las diversas medias, y calculamos las diferencias entre ellas según el siguiente esquema:

$$\begin{array}{cccccc} \bar{x}_1 & \bar{x}_1 - \bar{x}_5 & \bar{x}_1 - \bar{x}_4 & \bar{x}_1 - \bar{x}_3 & \bar{x}_1 - \bar{x}_2 & \\ \bar{x}_2 & \bar{x}_2 - \bar{x}_5 & \bar{x}_2 - \bar{x}_4 & \bar{x}_2 - \bar{x}_3 & & \\ \bar{x}_3 & \bar{x}_3 - \bar{x}_5 & \bar{x}_3 - \bar{x}_4 & & & \\ \bar{x}_4 & \bar{x}_4 - \bar{x}_5 & & & & \\ \bar{x}_5 & & & & & \end{array}$$

b) Seguidamente calculamos el valor de D.

$$D = S_X \cdot Q$$

Siendo:

$$S_X = \sqrt{\frac{V_D}{C}} \quad \text{y} \quad C = \frac{N}{K}$$

Donde:

V_D = varianza intragrupo

N = número de datos

K = número de grupos

Q = Valor hallado en las tablas de distribución de Q , a partir de $(K-1)$ y $(N-K)$

c) Las diferencias entre medias, superiores al valor de D, son estadísticamente significativas al nivel indicado por F.

4. Regresión

En un conjunto de datos (población), interesa con frecuencia, conocer la recta que mejor se ajusta a ellos.

$$y = a + bx$$

Por lo que tiene que determinarse

a = ordenada en el origen

b = pendiente de la recta

a) Ordenada en el origen:

$$a = \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{N}$$

Siendo N = número de datos apareados

b) Pendiente de la recta = Coeficiente de regresión

Es una medida de la dependencia de dos variables, dando información de la relación existente entre ellas.

$$b = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \cdot \Sigma y}{N}}{\Sigma (x - \bar{x})^2}$$

5. Correlación

El grado de relación entre dos variables viene expresado por el coeficiente de correlación (r) y viene dado por la fórmula

$$r = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \cdot \Sigma y}{N}}{\sqrt{\Sigma (x - \bar{x})^2 \cdot \Sigma (y - \bar{y})^2}}$$

Posteriormente con r y $(N-2)$, buscamos en las tablas de correlación el valor de p . Si $p < 0.05$, implica que entre ambas variables existe una relación, aunque no necesariamente de causalidad, ya que ambas pueden depender a su vez de una tercera variable.

NOTA: Hemos evitado desarrollar las fórmulas, para una exposición más breve. Los cálculos se realizaron en una programadora Olivetti 101.

III. RESULTADOS
=====

III. RESULTADOS

A. VARIACIONES DIURNAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA E HIPOFISIS EN RATAS.

Puesto que la secreción hipofisaria de hormona de crecimiento es una función muy labil (Glick, 1968) y presenta brotes incontrolados de secreción a lo largo del día (Glick y Golsmith 1968) nuestro primer intento fue determinar los niveles de GH en plasma e hipófisis a lo largo de las 24 hrs del día, en condiciones de reposo, lo cual nos permitiría establecer el tiempo más conveniente en el que se deberían sacrificar los animales en posteriores experimentos.

En este estudio, se utilizaron 102 ratas macho procedentes de un mismo destete, de 30 a 35 días de edad, y cuyo peso corporal osciló entre 80 y 95 gr. Los animales se colocaron en jaulas comunes, en número de 10 a 14 por cada una, estando sometidas durante 20 días a condiciones uniformes de humedad y temperatura ($22 \pm 2^{\circ} \text{C}$), así como a un régimen de luz y oscuridad, manteniéndose la luz entre las 7.00 hr y las 19.00 hrs, y el de oscuridad durante las 12 hrs restantes. Tanto la comida como la bebida se les suministró ad libitum. Los animales durante la semana previa a su sacrificio, fueron diariamente manejados con objeto de habituarlos a ser manualmente tocados, y evitar en lo posible el stress en el momento del sacrificio. La víspera del día en que se debían sacrificar a los animales, éstos se separaron y distribuyeron en grupos de 8 a 10 ratas de peso homogéneo, los cuales se guillotinaron de forma sucesiva a las 3:00, 6:00, 12:00, 13:30, 15:00, 16:30, 18:00, 19:30, 21:00 y 24:00 hrs de un mismo día.

La Fig. 8 representa la concentración de GH en plasma, así

Variaciones diurnas del contenido de GH en plasma e hipófisis en ratas ♂

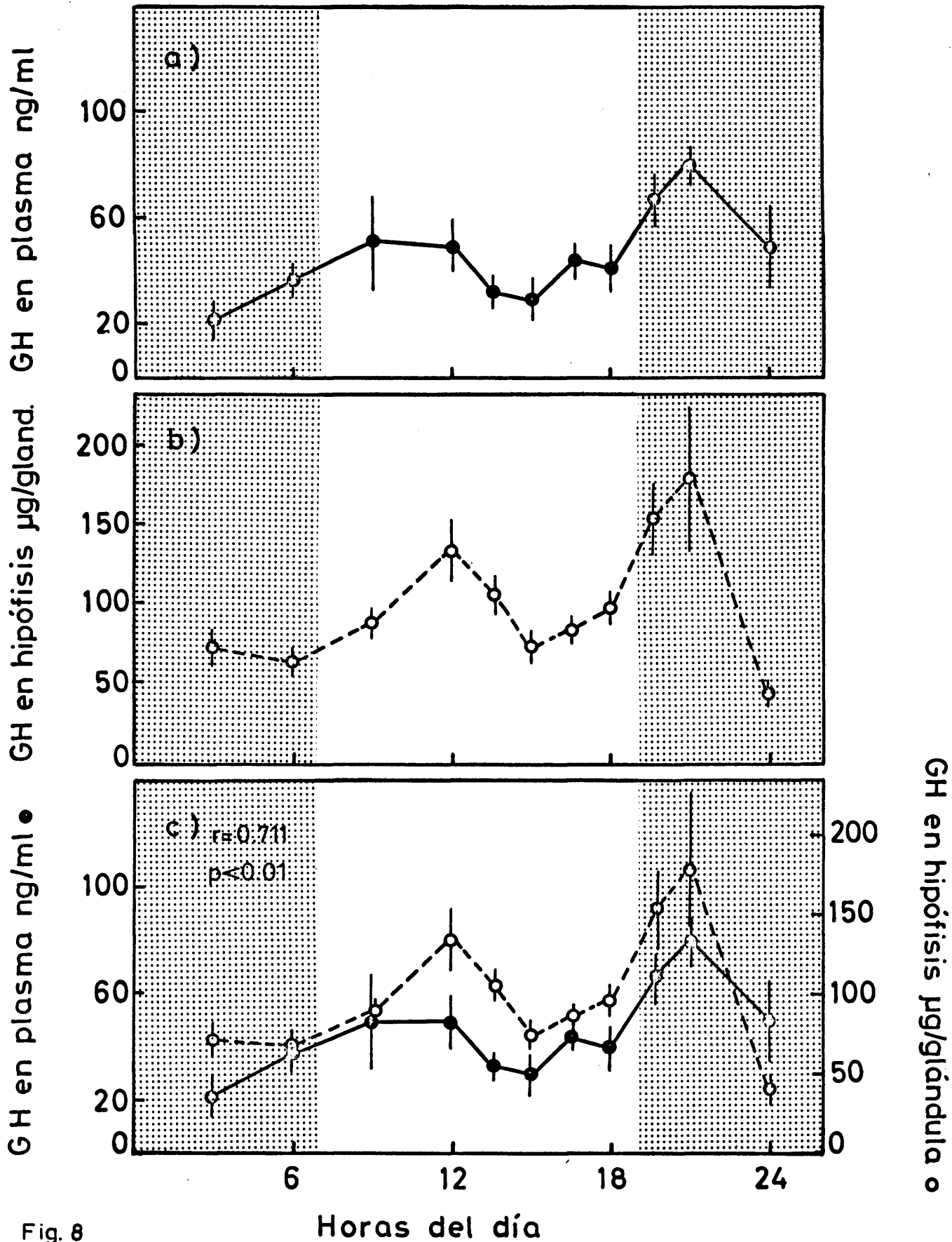


Fig. 8

a) niveles plasmáticos b) contenido hipofisario c) correlación plasma-hipófisis

como el contenido de GH en hipófisis de los grupos de ratas sacrificados a distintas horas de los períodos de luz y oscuridad del día. Con objeto de visualizar la correspondencia entre los valores de GH en plasma e hipófisis, se realizó una representación conjunta de ambas variables.

El valor medio de la concentración de GH en plasma a las 3:00 hrs fue de 22 ± 8 ng/ml, posteriormente aumentó progresivamente hasta las 9:00 hrs donde alcanzó un valor medio de 52 ± 14 ng/ml. Entre las 9:00 y el mediodía parece que el nivel medio de GH en plasma se mantiene en un valor constante, y a partir de entonces desciende progresivamente hasta llegar a un valor medio de 32 ± 6 ng/ml y 30 ± 8 ng/ml a las 13:30 y 15:00 hrs, respectivamente. Posteriormente, la concentración de GH en plasma aumenta, siendo el valor medio de ella a las 21:00 hrs de 80 ± 13 ng/ml, que es el más elevado que se observa a lo largo de las 24 horas. Seguidamente tiene lugar un nuevo descenso, siendo el valor medio de la GH en plasma a las 24:00 hrs de 50 ± 16 ng/ml. Se detecta por tanto dos períodos en los que tiene lugar una alta secreción de GH. El primero tiene lugar en el período de luz entre las 9:00 hrs y el mediodía, y el segundo en las primeras horas de iniciarse el de oscuridad, cuyo pico de máxima secreción tiene lugar a las 21:00 hrs.

Se realizaron dos análisis de varianza para valorar las diferencias entre los valores medios de GH correspondientes a los dos tiempos de mayor secreción, y los otros valores de GH en cada uno de los tiempos, así como con los valores medio de GH en plasma correspondientes a los momentos de más baja secreción, con objeto de ver si dichos valores se podían considerar como basales. El primer análisis evidenció que la concentración de GH en plasma a las 21:00 hrs era significativamente

más alto que la correspondiente a las 3:00, 6:00, 13:30, 15:00, 16:30, y 18:00 hrs ($F = 2.65$, $df, 10.69$ $p < 0.05$), no encontrándose diferencia entre los valores medios de GH obtenidos a las 9:00, 12:00, 19:30 y 21:00 hr. Cálculos similares con los valores de GH correspondientes a las 3:00, 6:00, 13:30 15:00, 16:30 y 18:00, puso de manifiesto la falta de significatividad entre ellos ($F = 1.70$; $df, 5.38$, n.s.), lo cual sugiere que se les puede considerar como el nivel basal de la GH en plasma a lo largo del día.

El contenido de hormona de crecimiento en hipófisis presentó fluctuaciones significativas a lo largo de ambos períodos. Los valores más altos se observan a las 12:00 y 21:00 hr, y los más bajos a las 3:00, 6:00, 15:00, 16:30 y 24:00 hr, no encontrándose diferencias significativas entre estos últimos. Por el contrario, el contenido de GH en glándula a las 12:00, 19:00 y 21:00 hr, entre cuyos valores no existen diferencias, son significativamente más altos que los valores correspondientes a cada uno de los otros tiempos ($F = 3.71$; $df, 10.87$ $p < 0.05$).

La comparación de los valores medios de GH en plasma con los del contenido de la hormona en hipófisis, en los grupos de animales sacrificados a las distintas horas del día, evidenció un comportamiento casi perfecto entre ambas variables, como lo demuestra el alto grado de correlación existente entre ambas variables ($r = 0.771$; $p < 0.01$).

B. EFECTOS DE LA DIABETES EN RATAS MACHOS

Esquema experimental

En este experimento usamos un total de 120 ratas con un

peso inicial comprendido entre 80 y 110 g. Los animales se distribuyeron en dos grandes grupos, uno de los cuales constituyó el grupo control, mientras que los animales del otro grupo se hicieron diabéticos por la administración de streptozotocin (STZ), 6 mg/100 g de peso corporal, después de 18 horas de ayuno. El STZ se preparó en buffer citrato, pH = 4.4, inmediatamente antes de su administración. Las ratas del grupo control fueron inyectadas con 1 ml de salino, con objeto de someterlas al stress del pinchazo e igualar en lo posible las condiciones experimentales. Ambos grupos de animales estuvieron sometidos a idénticas condiciones ambientales, estando alimentados ad libitum. El consumo de comida y bebida se midió durante algunos días del período de experimentación. Las ratas se pesaron dos veces por semana. Grupos de ratas controles y diabéticas se sacrificaron a los 2, 5, 10, 15, 20, 24 y 27 días después de la inyección de salino o STZ. Todos los animales diabéticos incluidos en este estudio presentaron una concentración de glucosa en plasma comprendida entre 442 y 516 mg/100 ml, y un crecimiento en 24 hr no superior a 1 gr.

Peso corporal y peso de algunas glándulas endocrinas

La inducción de la diabetes produjo un efecto inhibitor profundo sobre el peso corporal del animal, hecho que se pone de manifiesto a un tiempo tan corto como a 48 hr después de la administración del STZ. A partir de los 15 días de iniciarse la enfermedad, se observa una ligera recuperación del crecimiento, pero tanto a este tiempo como a cada uno de los períodos estudiados, el valor medio del peso corporal de las ratas diabéticas fue significativamente más bajo que el de los controles de la misma edad (Fig. 9).

En los animales controles, tanto el peso absoluto de la

Efecto de la diabetes sobre el crecimiento

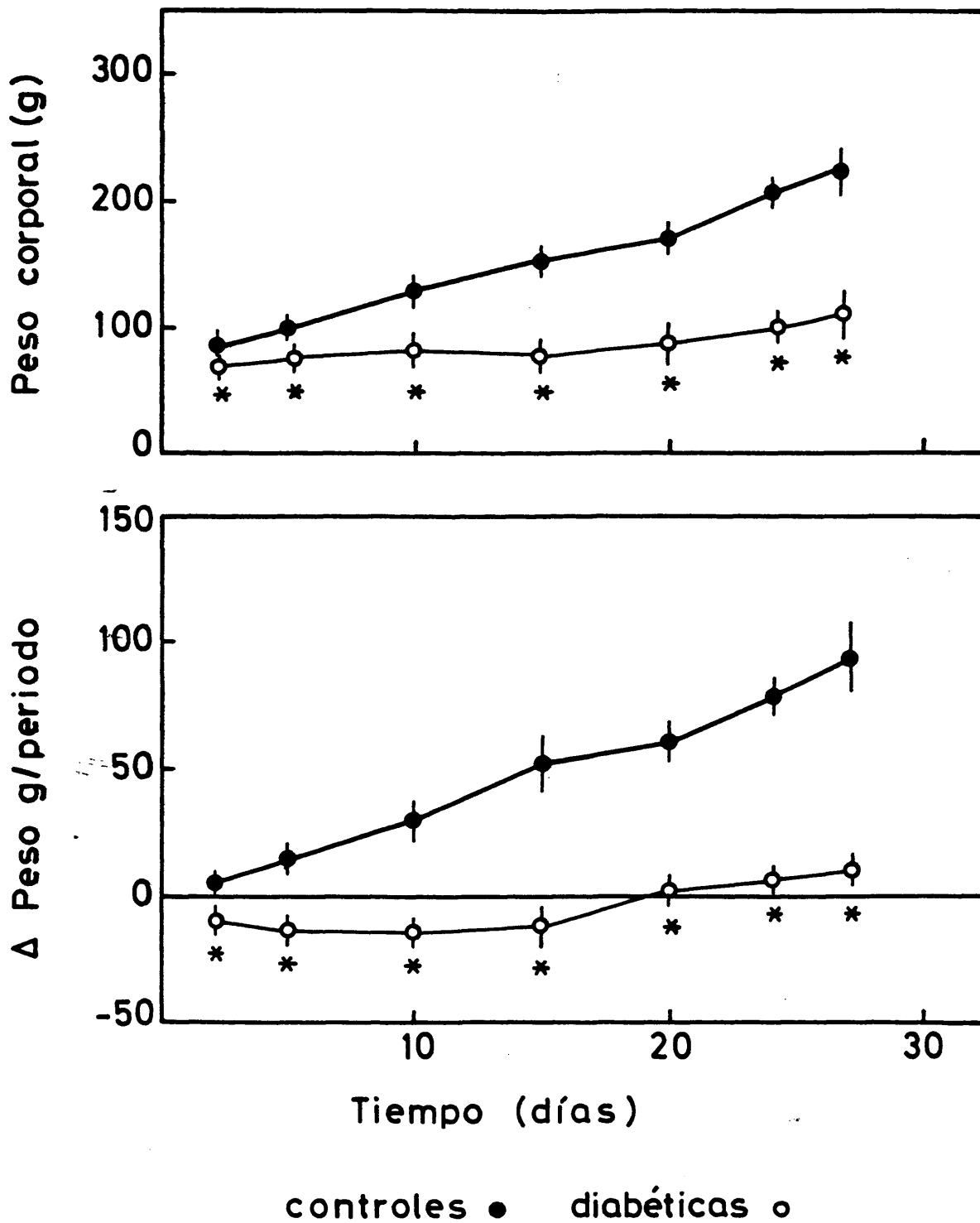


Fig. 9

hipófisis, como el del tiroides, adrenales y testículos, aumentan con el tiempo aunque no de una forma paralela a las variaciones del peso, y de la misma forma en cada una de las glándulas. Ello hace que, mientras no se encuentran diferencias significativas en el peso relativo de la hipófisis procedente de los distintos grupos de animales controles, el peso relativo del tiroides, adrenales y testículos se mantienen prácticamente constante entre los 2 y 15 días del período de estudio, pero posteriormente debido a que el ritmo de crecimiento de cada una de estas glándulas es menor que el del peso corporal hace que el peso relativo de ellas disminuya en los períodos más largos (Tabla 1).

La diabetes afectó el peso absoluto de la hipófisis así como el del tiroides testículos y adrenales, aunque no en el mismo sentido, encontrándose diferencias significativas entre el peso absoluto de cada una de estas glándulas y la de los correspondientes controles, en cada uno de los intervalos estudiados. En cuanto al comportamiento del peso relativo de cada una de estas glándulas es diferente en cada una de ellas. Mientras no se detectan diferencias significativas en el peso relativo de la hipófisis de las ratas diabéticas respecto a la de su grupo control, el peso relativo del tiroides del animal diabético es más pequeño que el de los controles en los grupos sacrificados entre los 2 y 15 días después de iniciarse la diabetes, diferencia que no se observa en los períodos más largos, como consecuencia de la gran diferencia existente en el peso corporal de los animales controles y diabéticos. Sin embargo, el peso de los testículos, tanto en valor absoluto como relativo, es significativamente más pequeño que el de los controles. Contrariamente a lo que ocurre en el peso de la hipófisis, tiroides y testículos, la diabetes induce una hiper-

TABLA 1

Efectos de la diabetes sobre el peso de algunas glándulas endocrinas

Períodos	Hipófisis		Tiroides		Testículos		Adrenales		
	mg	mg/100 g	mg	mg/100 g	gr	gr/100 g	mg	mg/100 g	
2 días	C	2.6±0.3	3.1±0.2	8.4±1.4	10.2±0.8	0.82±0.10	1.00±0.09	19.3±1.6	23.4±2.1
	D	2.4±0.1	3.2±0.1	6.0±0.9*	8.1±0.5*	0.62±0.17*	0.83±0.11*	20.2±1.8	27.2±1.9*
5 días	C	3.3±0.6	3.4±0.4	8.7±1.1	8.8±0.7	1.40±0.13	1.41±0.10	19.5±1.8	23.9±0.9
	D	2.6±0.5*	3.6±1.0	5.3±0.7*	6.7±0.6*	0.59±0.15*	0.74±0.16*	22.6±1.4*	28.5±1.3*
10 días	C	3.9±0.7	3.0±0.6	9.9±1.0	7.6±0.6	1.69±0.30	1.30±0.19	24.2±2.0	18.6±0.9
	D	2.5±0.8*	3.1±0.9*	4.9±1.3*	6.0±0.3*	0.50±0.22*	0.61±0.17*	25.7±1.8	32.9±1.4*
15 días	C	4.6±1.0	3.0±0.5	12.0±0.7	8.0±0.5	1.88±0.40	1.25±0.13	28.7±2.1	19.1±0.6
	D	2.4±0.7*	2.9±0.5	5.7±1.5*	6.8±0.9*	0.58±0.37*	0.71±0.14*	29.6±1.7	35.4±1.6*
20 días	C	6.0±1.3	3.5±0.9	14.2±0.9	7.1±0.6	1.93±0.41	1.12±0.18	31.4±2.6	18.7±2.8
	D	2.6±0.5*	3.0±0.2	6.0±1.8*	7.0±0.8	0.60±0.35*	0.72±0.20*	31.6±1.9	37.0±2.8*
24 días	C	5.9±0.8	2.7±0.5	14.9±1.6	7.5±0.3	2.40±0.38	1.17±0.23	32.8±1.9	16.6±1.7
	D	2.9±0.5*	3.0±0.2	6.3±1.0*	6.8±0.9	0.68±0.35*	0.68±0.35*	36.4±2.7*	34.0±1.3*
27 días	C	6.1±0.7	2.6±0.3	15.8±2.3	7.0±1.0	2.48±0.26	1.13±0.15	30.0±2.0	13.9±0.9
	D	3.1±0.8*	2.7±0.4	7.2±1.7*	6.3±0.8	0.76±0.16*	0.66±0.18*	38.1±5.2*	33.2±3.4*

Los valores son $\bar{x} \pm$ D.S.; *p < 0.05

trofia en las adrenales, lo cual hace que el peso absoluto de ellas en la rata diabética sea mayor que el de las controles a los 5, 24 y 27 días, mientras que el peso relativo de las adrenales de los animales diabéticos son consistentemente mayores que las de los animales controles.

Contenido de hormona de crecimiento en hipófisis y plasma

En la Fig. 10 se representa el contenido de hormona de crecimiento en hipófisis y los niveles en plasma de la hormona en ratas diabéticas y controles incluidas en este experimento, medidos ambos por radioinmunoensayo, así como el contenido de GH en hipófisis (Fig. 11 y 12) medido por la valoración planimétrica del área obtenida al registrar la densidad óptica de geles de poliacrilamida en los que la separación de la GH hipofisaria se ha realizado por electroforesis.

En los animales controles en fase de crecimiento, el contenido de GH en hipófisis presenta un aumento entre los 2 y 5 días del período de experimentación, el cual va seguido de un valor prácticamente constante de este parámetro entre los 5 y 15 días, para presentar posteriormente un aumento progresivo en los períodos más largos.

La valoración de GH en hipófisis, tanto por RIA como por electroforesis, pone claramente de manifiesto que la falta de niveles normales de insulina disminuye el contenido de la hormona en hipófisis, hecho que se pone de manifiesto a un tiempo tan corto como a los 2 días después de la administración del agente diabetógeno. Entre los 10 y 15 días hay un descenso brusco en el contenido de GH en hipófisis, siendo en valor de GH en glándula en el último grupo de ratas significativamente más

Efectos de la diabetes en el contenido de GH en hipófisis y la concentración plasmática de la hormona

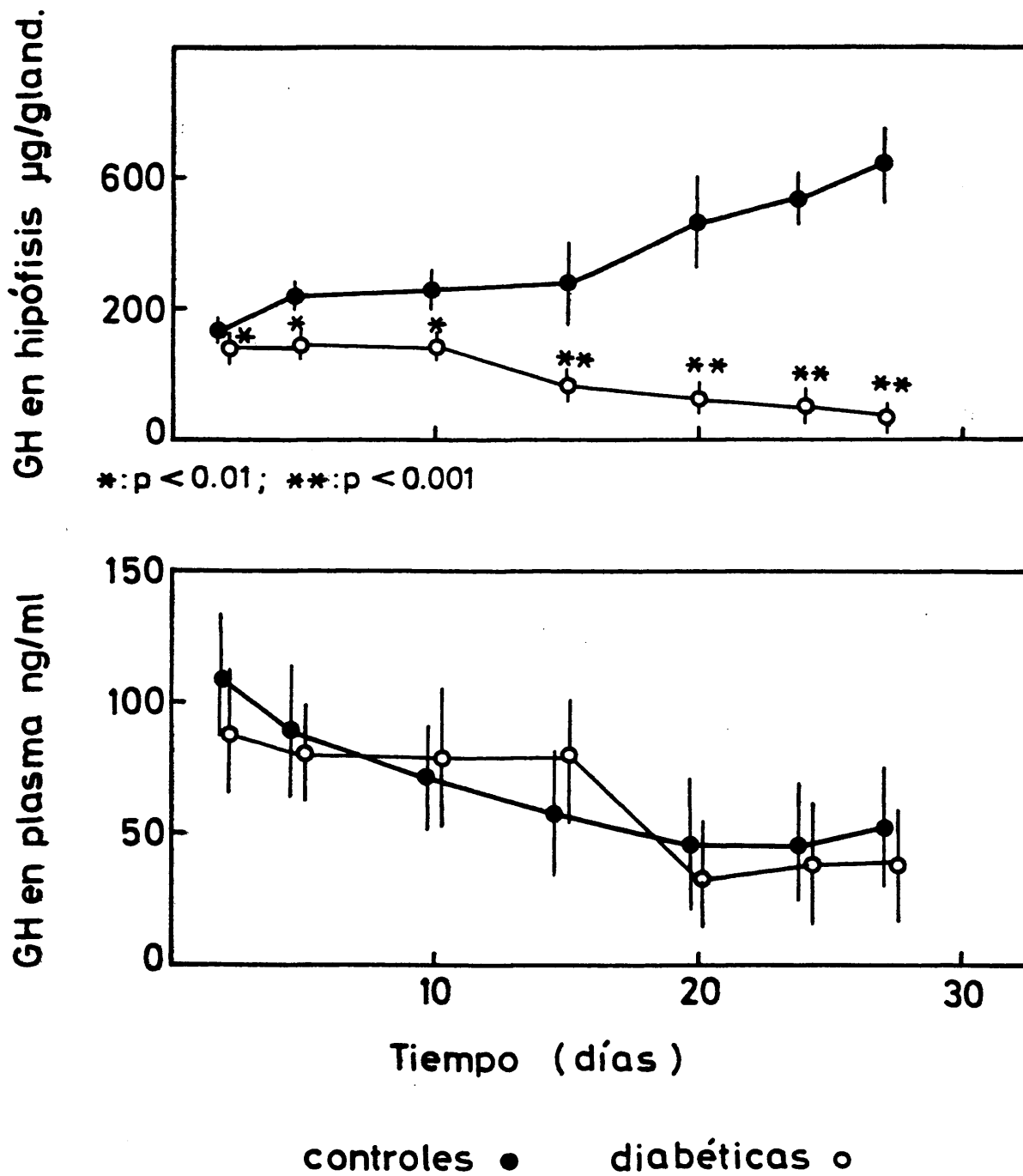


Fig. 10

bajo que el de los animales sacrificados a los 10 días ($p < 0.01$). Posteriormente, el contenido de GH en hipófisis presenta una disminución progresiva al aumentar el tiempo de diabetes.

La observación del patrón de GH en hipófisis, obtenido por la medida de la densidad óptica de geles de poliacrilamida, pone de manifiesto la existencia de diferencias no sólo cuantitativas sino también cualitativas entre los animales controles y diabéticos. Así, mientras en las ratas controles el pico correspondiente a la GH aparece bien definido, con una línea ascendente prácticamente igual a la descendente, el pico de GH en hipófisis de las ratas diabéticas, la línea descendente, que está más cerca del polo positivo de la electroforesis, presenta una deformación lo cual hace que la base del pico de la GH sea mucho más ancha en las hipófisis procedentes de ratas diabéticas que en las controles (Figs. 11 y 12). Dicho efecto se intensifica al aumentar el tiempo de diabetes.

La Fig. 10 representa los valores de GH en plasma en ratas diabéticas a distintos tiempos después de la administración del STZ, y de los controles de su misma edad. La concentración de GH en plasma presenta valores muy elevados en los controles correspondientes a los 2 y 5 días del período de experimentación, y posteriormente se evidencia una disminución progresiva, siendo el valor de este parámetro en los grupos de ratas sacrificados en los períodos comprendidos entre 15 y 27 días más bajo que el de los animales correspondientes a los 2 y 5 días, diferencias que presentan un nivel de significatividad del 1 % ($F = 10.176$, df , 5, 61). La concentración de GH en plasma de las ratas diabéticas no presenta valores diferentes al de los controles en los períodos comprendidos entre 2 y 20 días de diabetes, e incluso a los 24 y 27 días el nivel de GH

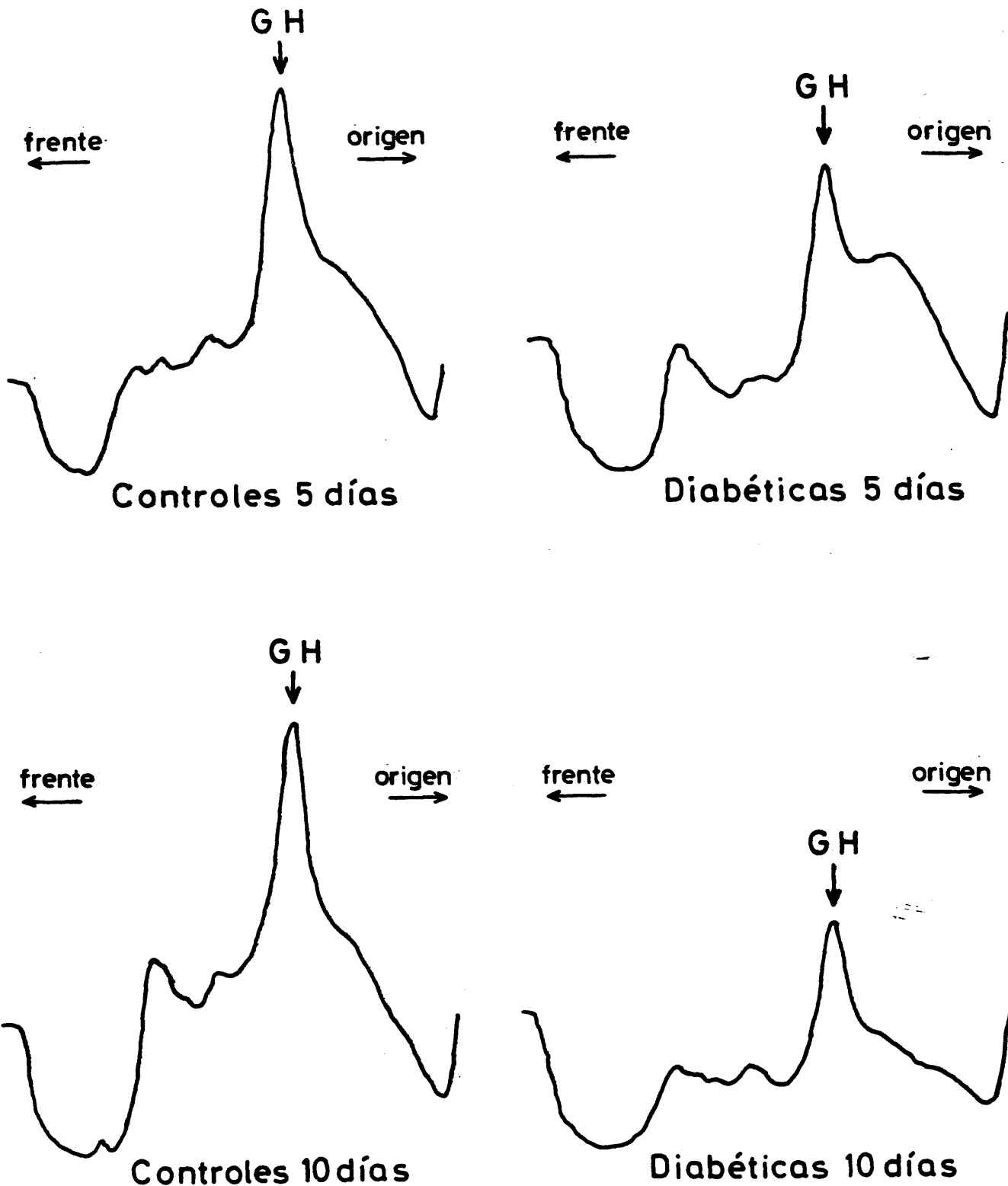


Fig.11.- Electroforesis en gel de poliacrilamida de homogenados hipofisarios de ratas diabéticas y controles. Aspecto de los geles teñidos con amido negro y espectrofotometría cuantitativa de los mismos leídos a 600 m μ .

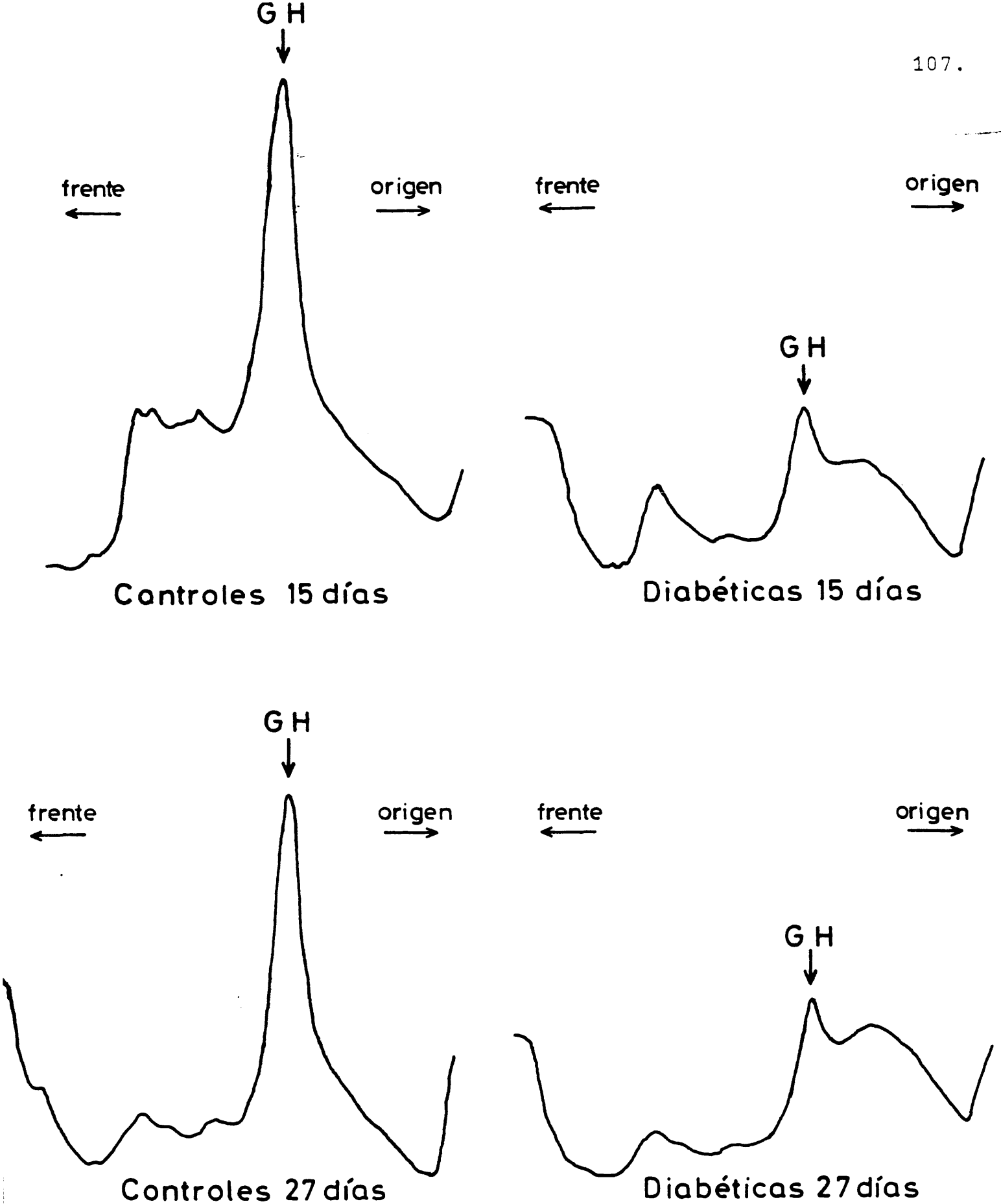


Fig. 12.-Electroforesis en gel de poliacrilamida de homogenados hipofisarios de ratas diabéticas y controles. Aspecto de los gels teñidos con amido negro y espectrofotometría cuantitativa de los mismos leídos a 600 m μ .

en plasma de las ratas diabéticas no difiere significativamente de sus correspondientes controles. La falta de significatividad de la GH en plasma entre los animales controles y diabéticos viene dada no sólo por la semejanza de los valores medios, sino asimismo por la dispersión de los datos de GH en cada uno de los grupos en cada período.

C. EFECTOS COMPARATIVOS DEL HIPOTIROIDISMO, INDUCIDO POR ClO_4 , PROPILTIOURACILO (PTU) O TIROIDECTOMIA, Y DE LA DIABETES SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL CONTENIDO DE GH EN PLASMA E HIPOFISIS.

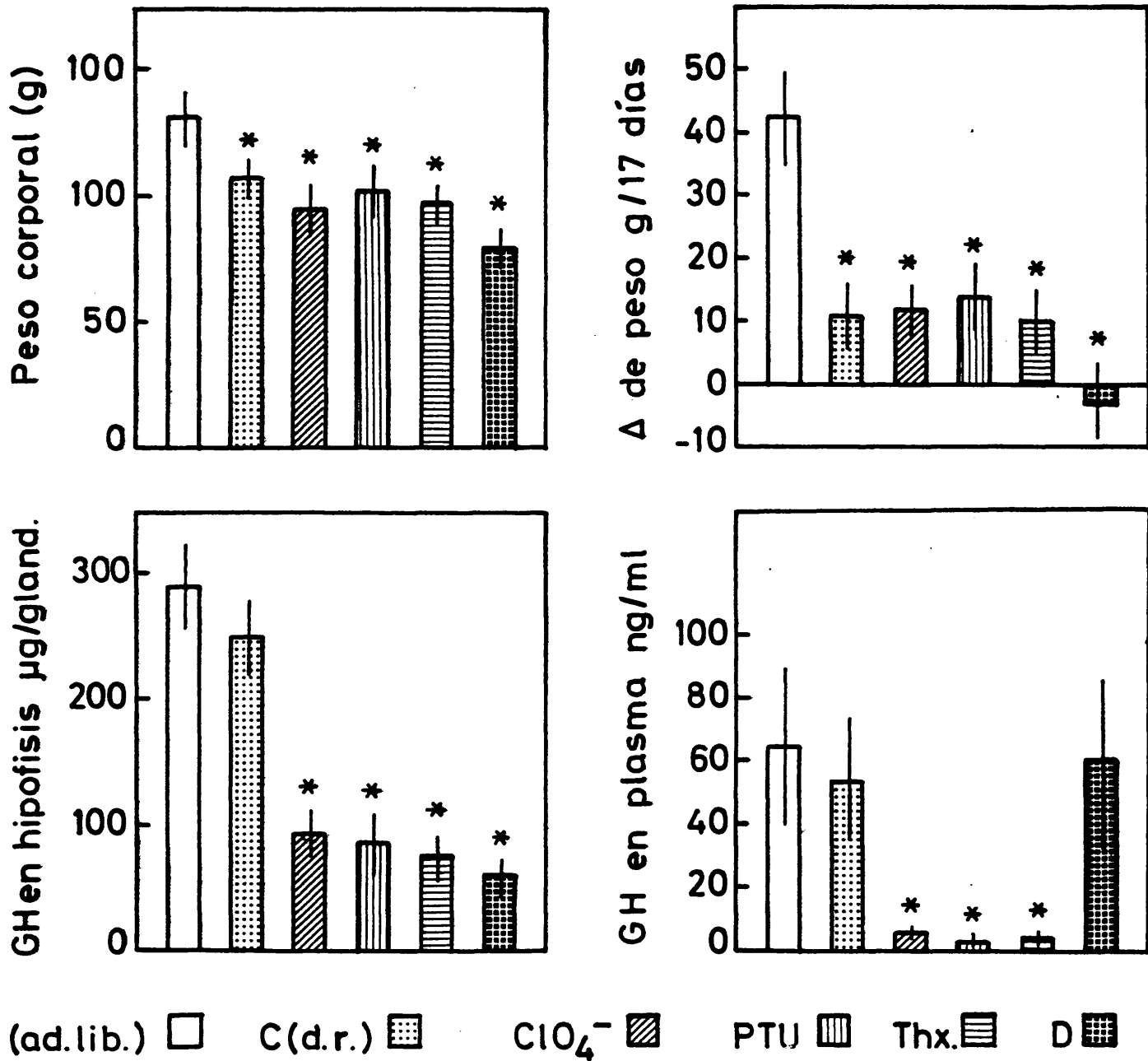
Esquema experimental

En este experimento usamos un total de 65 ratas con un peso inicial de 80 ± 19 g. Inicialmente los animales se distribuyeron en 6 grupos. En tres de ellos se indujo hipotiroidismo por la administración i.p. diaria de 20 mg de ClO_4 , 3 mg de PTU por 100 g de peso, o tiroidectomía. Las dosis diarias de ambos antitiroideos se administraron en dos mitades, una a las 9 a.m. y otra a las 7 p.m. Las ratas se tiroidectomizaron quirúrgicamente, y cada animal fue inyectado i.p. con 50 μCi de I^{131} para destruir el posible tejido tiroideo que hubiese podido quedar después de la operación. Los animales del cuarto grupo fueron hechos diabéticos por la administración intraperitoneal de 7 mg de STZ por 100 g de peso corporal, estando las ratas ayunadas previamente durante 24 h. Las ratas de los dos grupos restantes constituyeron grupos controles. Los animales de uno de ellos fueron alimentados ad libitum, mientras que a los otros se les disminuyó la dieta de forma que su crecimiento fuese similar al de los animales hipotiroideos o al del grupo de ratas diabéticas. El consumo de dieta de las ratas de este grupo fue de 8 gr/día, mientras que el de los controles alimentados ad libitum fue alrededor de 23 gr en 24 hr. El gra

do de hipotiroidismo de las ratas tiroidectomizadas o de las tratadas con cada uno de los bociógenos se determinó por la valoración de la concentración de hormona tirotrópica en plasma por radioinmunoensayo. El valor medio \pm D.S fue de 7.5 ± 1.3 $\mu\text{g/ml}$ para las tiroidectomizadas y el de las ratas tratadas con ClO_4^- o PTU de 5.8 ± 1.1 y 6.4 ± 0.9 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que las ratas controles mantenían un nivel de TSH en plasma de 0.53 ± 0.14 $\mu\text{g/ml}$. Los animales se sacrificaron 17 días después de iniciarse el tratamiento con cada uno de los antitiroideos, de la tiroidectomía, o de la administración del STZ. Las ratas diabéticas incluidas en este estudio presentaron una concentración de glucosa en plasma de 530 ± 19 $\text{mg}/100$ ml .

La Fig. 13 representa los principales resultados de este experimento. El hipotiroidismo inducido por tiroidectomía o por la administración de ClO_4^- o PTU indujo un retraso del crecimiento muy similar en cada uno de los tres casos, y el incremento de peso correspondiente a los 17 días del período de experimentación de los animales tratados con ClO_4^- o PTU fue 12 ± 5 g y 16.4 ± 4.8 g, respectivamente, mientras que el de las ratas Thx fue de 10.4 ± 6.1 g, el cual es significativamente menor que el de las ratas a PTU ($p < 0.05$). Los animales diabéticos mantuvieron prácticamente su peso inicial, presentando las variaciones del peso una disminución de -3 g en los 17 días. Como era de esperar las ratas controles alimentadas ad libitum tuvieron un crecimiento mucho más intenso que el de cada uno de los otros grupos, mientras que las ratas controles que recibieron una alimentación limitada tuvieron un crecimiento parecido al de cada uno de los grupos de ratas hipotiroideas, pero significativamente mayor que el de las ratas diabéticas, siendo significativa la diferencia entre el valor de ambos grupos al nivel del 1 %.

Efectos comparativos del hipotiroidismo y la diabetes sobre el crecimiento y el contenido de hormona de crecimiento en plasma e hipófisis



*: $p < 0.001$ vs. C. alimentadas ad. lib.

Fig. 13

El contenido de GH en hipófisis de las ratas controles con dieta limitada fue significativamente menor que el de los controles alimentados ad libitum ($p < 0.05$), no detectándose diferencias significativas en los niveles plasmáticos de GH entre ambos grupos. Tanto el hipotiroidismo, producido por la administración de antitiroideos como por tiroidectomía y la diabetes redujeron intensamente el contenido de GH en hipófisis, aunque dicho efecto fue más intenso en las ratas diabéticas, cuyo contenido de GH en hipófisis fue significativamente más bajo que el de cada uno de los grupos de ratas hipotiroideas. ($F = 6.319$, df , 3, 41; $p < 0.01$). Sin embargo, a pesar del descenso en el contenido de GH en hipófisis inducido por el hipotiroidismo o la diabetes, cada una de estas alteraciones repercutió de forma muy distinta en los niveles de GH en plasma. Así, mientras que la concentración plasmática de GH de cada uno de los tres grupos de ratas hipotiroideas fue mucho más baja que el de cada uno de los grupos controles, los animales diabéticos mantenían una concentración en plasma de la hormona mucho más alta que los animales hipotiroideos, cuyo valor era similar al del grupo control (Fig. 13).

D. EFECTOS DE LA INSULINA EN RATAS DIABETICAS

Los efectos de la diabetes sobre el peso corporal y el contenido de hormona de crecimiento en plasma e hipófisis, así como sobre los valores de otros parámetros, descritos en los anteriores experimentos nos indujeron a estudiar los efectos de distintas dosis de sustitución de insulina sobre cada uno de los parámetros citados del animal diabético.

Protocolo experimental

En este estudio usamos un total de 60 ratas con un peso

corporal de 150.9 ± 19.4 g. Cuarenta y ocho de ellas se hicieron diabéticas por la administración ip. de 7 mg de STZ por 100 g de peso corporal, tras 24 h de ayuno, mientras que los restantes animales fueron inyectados con salino, sometidos al mismo período de ayuno, y constituyeron el grupo control. Ocho días después de iniciarse la diabetes, las ratas se distribuyeron en 4 grupos, y los animales de cada uno de ellos fueron inyectados ip. con salino o con dosis crecientes de insulina, 1.0, 2.0, ó 3.0 U por día durante 7 días. Durante el tiempo que duró el tratamiento con salino o insulina los animales estuvieron alojados en jaulas metabólicas individuales, controlándose en los últimos 4 días que duró el período de experimentación la cantidad de dieta y agua consumida por día, así como el volumen de orina excretado en 24 h y su contenido en glucosa. Las ratas se sacrificaron 4 h después de la última inyección de salino o insulina.

Los resultados principales de este experimento aparecen representados en las Figs. 14 y 15 y en la Tabla 2. Los animales controles excretan un volumen de orina en 24 h de 8.1 ± 1.2 ml y una pérdida de glucosa por esta vía de 6.7 ± 1.4 mg por día, mientras que las ratas diabéticas con salino presentan una poliuria muy acusada (60.5 ± 5.0 ml/24 h), lo que va acompañado por una gran pérdida de glucosa por esta vía (243.1 ± 30.7 mg). De acuerdo con estos resultados que indican una alteración intensa del metabolismo hidrocarbonado, los animales diabéticos presentan una elevación intensa de la concentración de glucosa en plasma. Las diferencias en cada uno de estos parámetros entre las ratas controles y diabéticas, están justificadas por la diferencia entre los niveles de insulina en animales controles y diabéticos. La determinación de la concentración de insulina en plasma en cada uno de estos grupos evidenció que las ratas diabéticas presentan una insulina en plasma cuatro veces infe-

Efectos de la insulina sobre la excreción de
glucosa en orina

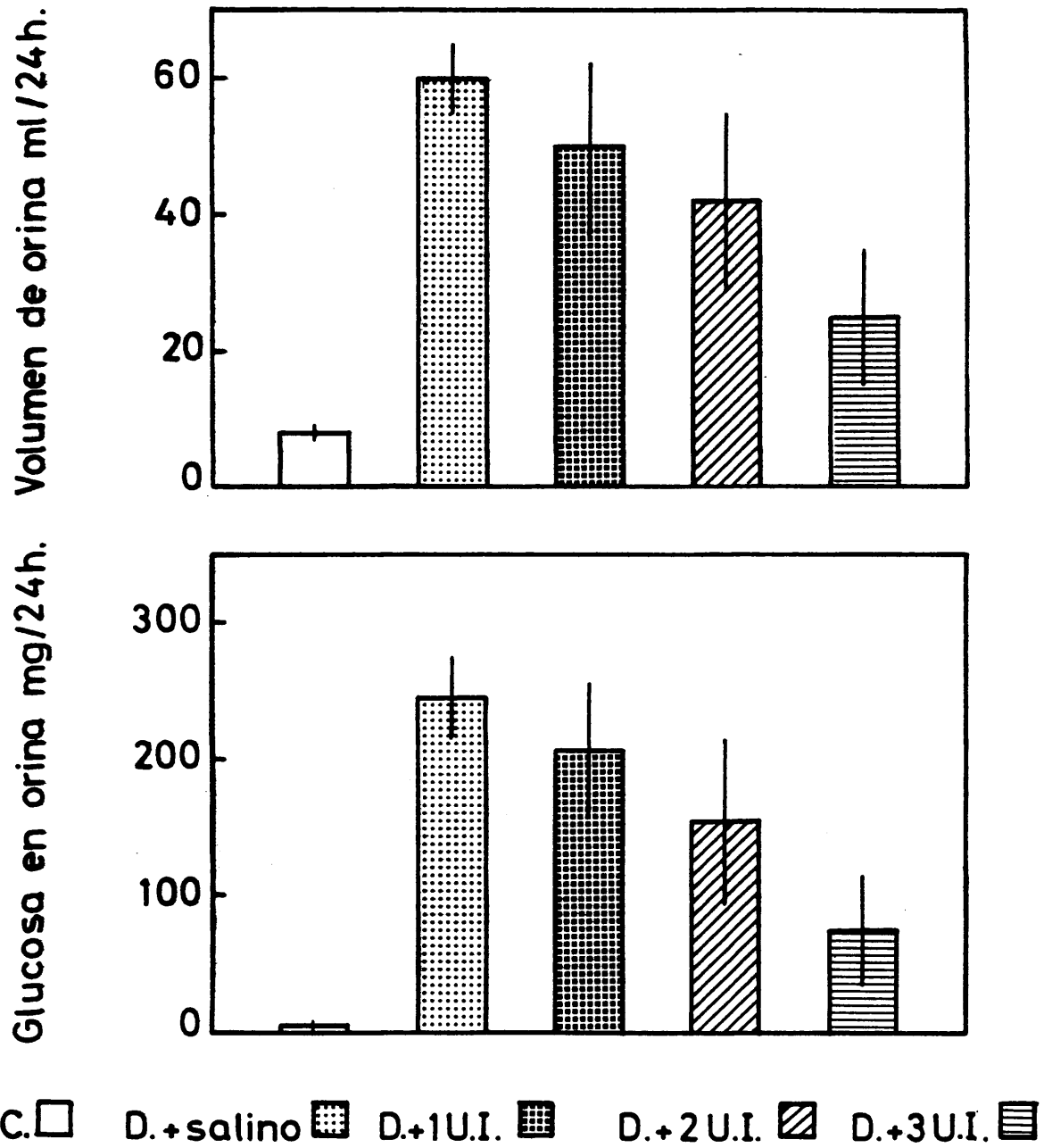


Fig.14

rior a la de los animales controles.

Los grupos de ratas tratadas con 1.0, 2.0 ó 3.0 U de insulina por 100 g de peso y día, durante 7 días, aunque presentan una disminución significativa de cada uno de estos parámetros respecto a los valores encontrados en animales diabéticos con salino, sin embargo no se observa una normalización de los valores medios de los parámetros considerados ni aún en el grupo de ratas diabéticas tratadas con la dosis más alta de la hormona.

Peso corporal, peso de algunas glándulas endocrinas y contenido de hormona de crecimiento en plasma e hipófisis

Como puede observarse en la Tabla 2, la diabetes indujo una disminución en el peso corporal, a la vez que afectó el del tiroides y produjo una hipertrofia en el de las adrenales. El tratamiento con dosis crecientes de insulina tuvo un efecto positivo sobre el peso corporal y el del tiroides, normalizándose el valor del primer parámetro en los animales que recibían 3 U, y el del tiroides incluso en las ratas con 2 U de la hormona. La hipertrofia adrenal de los animales diabéticos presentó una disminución progresiva en las ratas tratadas con dosis crecientes de insulina, normalizándose el valor de este parámetro en las ratas con 2 y 3 U de insulina.

Los cambios en el peso corporal de las ratas tratadas con dosis crecientes de insulina está justificada por los cambios en el contenido de GH encontrado en cada uno de los grupos. Como era de esperar, tanto el contenido de GH en hipófisis como su concentración en glándula están intensamente disminuido en el animal diabético respecto al valor de los controles, detectándose un aumento progresivo de este parámetro en las ratas

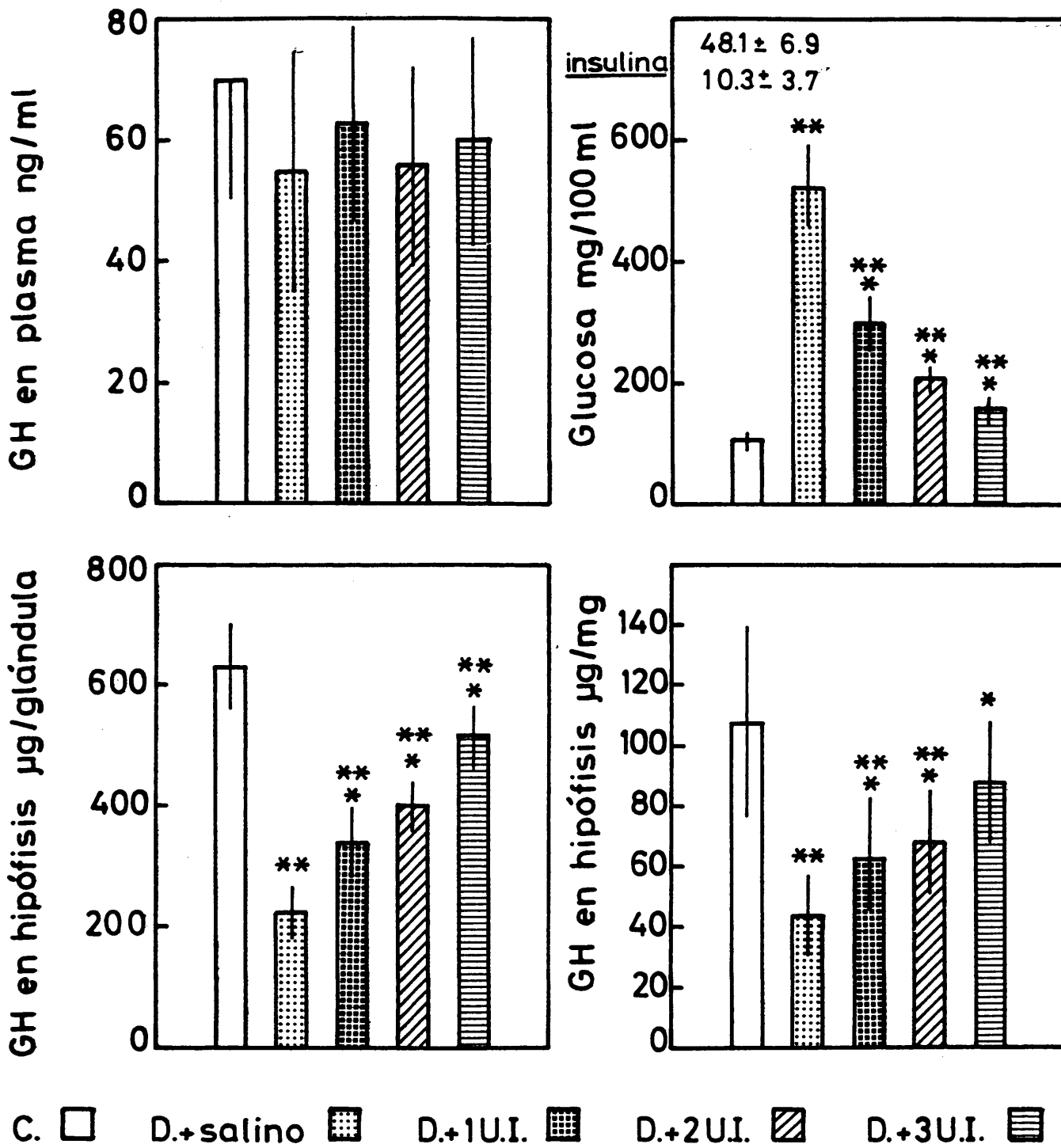
TABLA 2

Efectos de la insulina en ratas diabéticas

Grupos	nº de ratas	Δ de peso g/7 días	Hipófisis mg/100 g	Tiroides mg/100 g	Adrenales mg/100 g
C + salino	(12)	17.1 ± 2.4	2.9 ± 0.3	6.3 ± 0.8	17.5 ± 1.6
D + salino	(10)	-17.2 ± 10.0*	2.7 ± 0.2	3.2 ± 1.3*	29.8 ± 3.2*
D + 1 U I	(10)	5.8 ± 11.0**	2.7 ± 0.5	4.8 ± 1.1**	20.7 ± 1.7**
D + 2 U I	(12)	8.7 ± 6.2**	3.0 ± 0.2	5.9 ± 1.3**	19.3 ± 2.0**
D + 3 U I	(11)	13.8 ± 3.8**	3.3 ± 0.4	6.3 ± 1.0**	16.9 ± 2.1**

* : p < 0.05 vs C+ salino; **p < 0.05 vs D + salino

Los valores son $\bar{X} \pm D.S$



*: p < 0.01 vs. D.+salino; **: p < 0.01 vs. C.+salino

Fig. 15

tratadas con dosis crecientes de insulina. Sin embargo, a pesar de la gran diferencia en el contenido de GH en hipófisis de las ratas controles y el de cada uno de los otros grupos, la concentración de GH en plasma es muy semejante en cada uno de ellos como lo demuestra la falta de significatividad entre los valores medios de este parámetro entre los distintos grupos (Fig. 15).

E. DETERMINACION DEL PARALELISMO EXISTENTE ENTRE DILUCIONES SUCESIVAS DEL PLASMA DE RATA CONTROL Y DIABETICA Y DE UNA SOLUCION DE r-GH PURIFICADA DE RATA.

El hecho de que las ratas diabéticas con un contenido tan bajo de GH en hipófisis mantuviesen una concentración de GH en plasma dentro de los límites normales era un hecho aparentemente anormal, y nos planteó la cuestión de si existiría en el plasma de estos animales algún factor(s) que pudiese modificar la unión de la GH a su anticuerpo, por lo que las determinaciones de GH en plasma por RIA darían valores falsamente altos. Una primera aproximación al estudio de este problema fue observar la similitud inmunológica entre la GH purificada y la de la sustancia que estamos analizando en el plasma de dichos animales. Esto se realizó observando si existía o no paralelismo entre los puntos de la curva "standard" y las curvas formadas por diluciones sucesivas del plasma de ratas controles y diabéticas. El plasma diabético procedía de un animal inyectado 15 días antes con STZ.

Los resultados presentados en la Fig. 16 indican que el desplazamiento de la GH-I¹²⁵ unida a su anticuerpo por el plasma del animal diabético es idéntico al efectuado por el plasma de la rata control o de la GH purificada. Una comprobación más objetiva del paralelismo existente entre cada una de las curvas

Paralelismo de la curva patrón con diluciones
sucesivas de un plasma de rata control y diabética

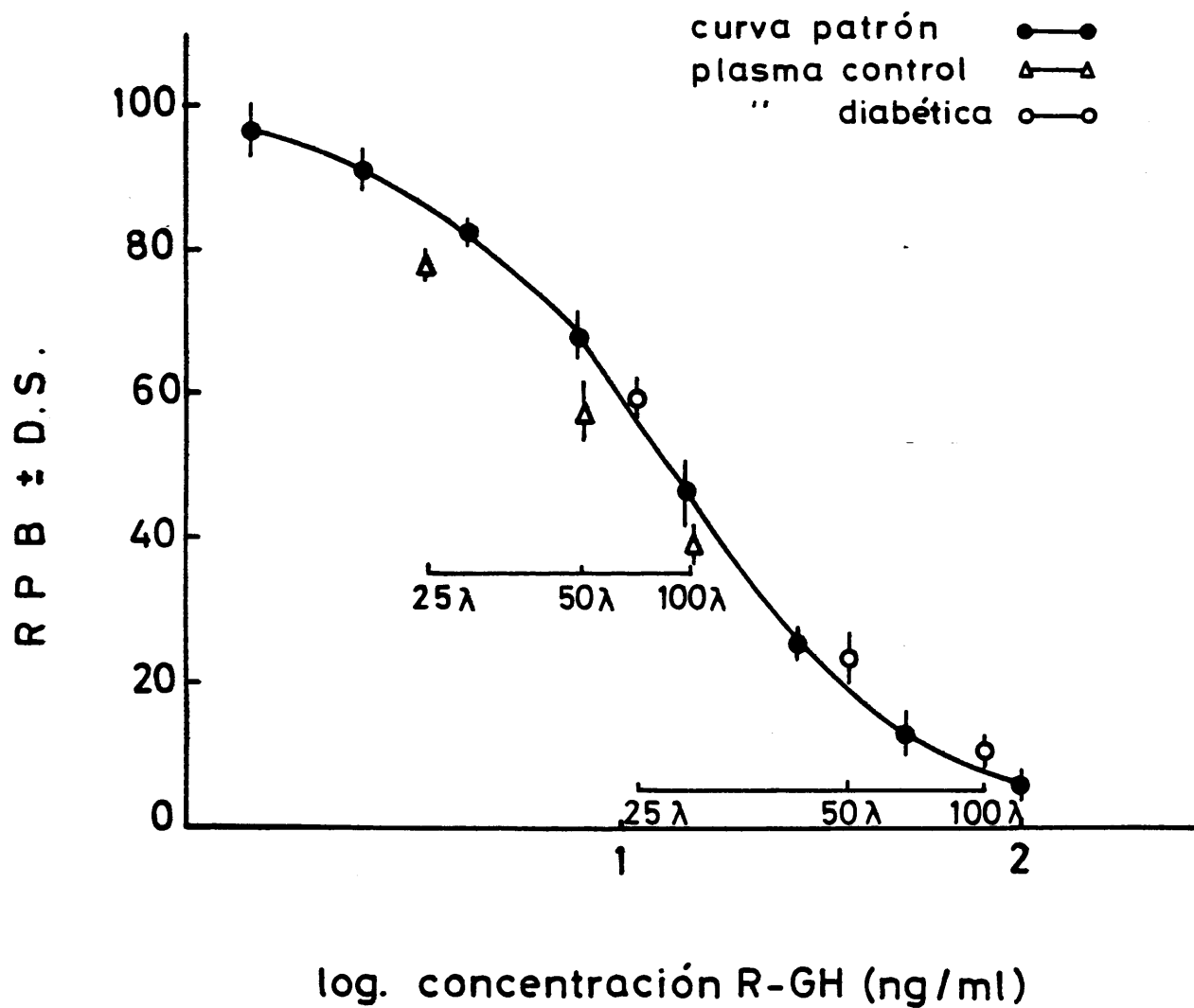


Fig.16

incluidas en la Fig. 16 se realizó mediante el cálculo de las ecuaciones de regresión lineal de las relaciones dosis-respuesta en su forma "logit", seguido de un análisis de regresión que nos permitió el cálculo de las pendientes y su desviación standard ($b \pm s_b$) de cada una de las tres relaciones dosis-respuesta. El valor de este parámetro para la curva standard fue de -2.9113 ± 0.1501 , mientras que el correspondiente a las diluciones del plasma control y diabético fueron -2.9151 ± 0.2310 y -2.9172 ± 0.0811 , respectivamente. La falta de significatividad de las diferencias entre cada una de las tres pendientes pone de manifiesto la existencia de paralelismo entre las tres curvas en estudio.

Ante estos resultados, el siguiente punto que nos planteamos estudiar fue ver si existían diferencias entre la velocidad de aclaramiento metabólico (MCR) de la GH en el plasma de ratas controles y diabéticas. La velocidad de aclaramiento metabólico de una hormona en plasma se define como el volumen de plasma que en la unidad de tiempo queda limpio de dicha hormona. Si el valor de este parámetro es más bajo en las ratas diabéticas que en las controles ello justificaría la falta de significatividad en los niveles circulantes de GH en plasma entre ambos grupos de animales.

Los primeros trabajos realizados con hormona de crecimiento humana (hGH) radioiodada pusieron de manifiesto que la hGH-I¹²⁵ al ser inyectada tanto en humanos como en ratas se unía a las proteínas séricas. Esto se interpretó que se debía a posibles alteraciones inducidas en la molécula de hGH por el proceso de radioiodación (Yalow, 1974). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que la hGH-I¹²⁵ al ser inyectada tanto en humanos (Beitins y cols. 1977) como en ratas (Antoniades

1975), da lugar a la formación de una forma de hGH de peso molecular más alto que el de la molécula de hGH administrada.

Estas observaciones bioquímicas han de tenerse en cuenta en situaciones como es la determinación del MCR de una hormona péptica. Existen dos métodos de amplio uso para la determinación del valor de este parámetro, administrando la hormona marcada por una única inyección i.v. o por infusión continua (Cameron y cols. 1969, Macgillivray y cols. 1970, Taylor y cols. 1972). En ambos casos, los cálculos se basan en la radioactividad inmunoprecipitable, y estos cálculos son válidos sólo si la hormona marcada es transportada y metabolizada exactamente como la hormona segregada endógenamente (Tait y Burstein 1964). Por lo tanto, fue necesario estudiar si el usar la r-GH-I¹²⁵ para la determinación del MCR es una técnica válida. Esto se realizó observando: 1) el patrón de elución de la r-GH-I¹²⁵ al fraccionarse en una columna de Sephadex G-100 el plasma de ratas controles y diabéticas a distintos tiempos después de la administración iv. de la hormona marcada y 2) el patrón de elución en Sephadex G-100 de la GH endógena en ambos grupos de animales.

F. FRACCIONAMIENTO EN SEPHADEX G-100 DE LA GH EN PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DIABÉTICAS

1. Administración intravenosa de r-GH-I¹²⁵

En la figura 7 de Materiales y Métodos, se representa el patrón de elución en Sephadex G-100 de la r-GH-I¹²⁵ que se usó en este estudio. La mayoría de la radioactividad eluida se recoge entre las fracciones 21-31, lo cual representa la forma monomera de la hormona (Beitins y cols 1977). Junto a este pico mayoritario, aparecen dos zonas de menor radioactividad, la pri-

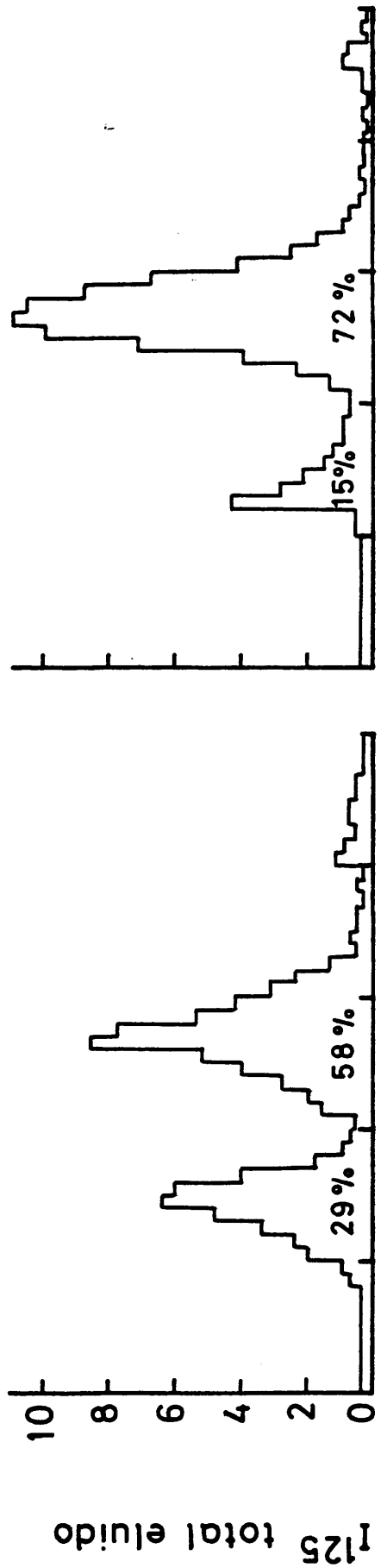
mera entre las fracciones 13-16, debida probablemente a la formación de agregados moleculares de la molécula de GH formados en el proceso de congelación y descongelación de la preparación, y la segunda entre las fracciones 41-48 y que corresponde a la zona en que eluye el I^{-125} . En todos los casos para inyectar a los animales sólo se usaron las fracciones correspondientes a la parte descendente del pico mayoritario, preferentemente las fracciones 27-30. El porcentaje de inmunoprecipitación en estas fracciones fue alrededor del 87 %.

Las Figs. 17, 18, 19, 20, 21 y 22 representan el patrón cromatográfico de ratas controles y diabéticas a los 2, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos después de la administración iv. de r-GH- I^{125} . La radioactividad de cada uno de los eluidos se representa como por ciento de la radioactividad en las 50 fracciones. A cada uno de los tiempos, se representa el patrón de elución de dos animales controles y diabéticos y dentro de un mismo grupo existen diferencias en la distribución de la radioactividad a lo largo del patrón de elución.

A un tiempo tan corto como 2 minutos después de la administración de GH*, la radioactividad aparece localizada principalmente en dos zonas, una que eluye entre las fracciones 22-31, que coincide con la zona de elución de la r-GH- I^{125} inyectada, y la otra que eluye entre las fracciones 11-19 y que corresponde a una forma de GH* de peso molecular superior que la r-GH- I^{125} administrada. El patrón de distribución de la radioactividad en las ratas controles es cualitativamente similar al de las diabéticas, observándose entre ellos sólo diferencias cuantitativas. Así, en el plasma de ratas controles el pico de mayor radioactividad corresponde al de la forma de GH* de mayor peso molecular, mientras que en las ratas diabéticas, el pico mayoritario es el que eluye en la forma más retrasada, entre

2 minutos

diabéticas



controles

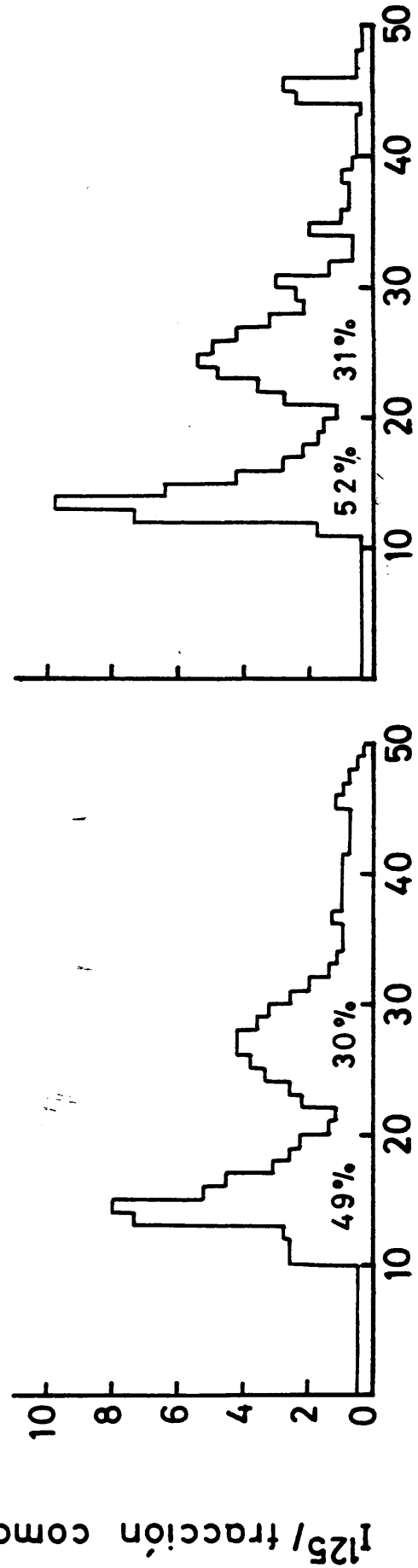
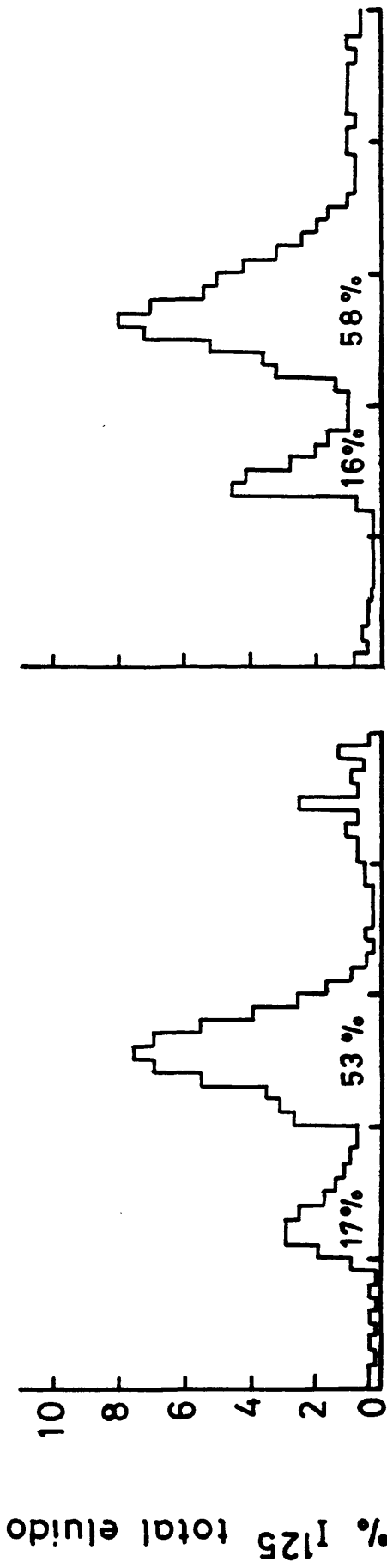


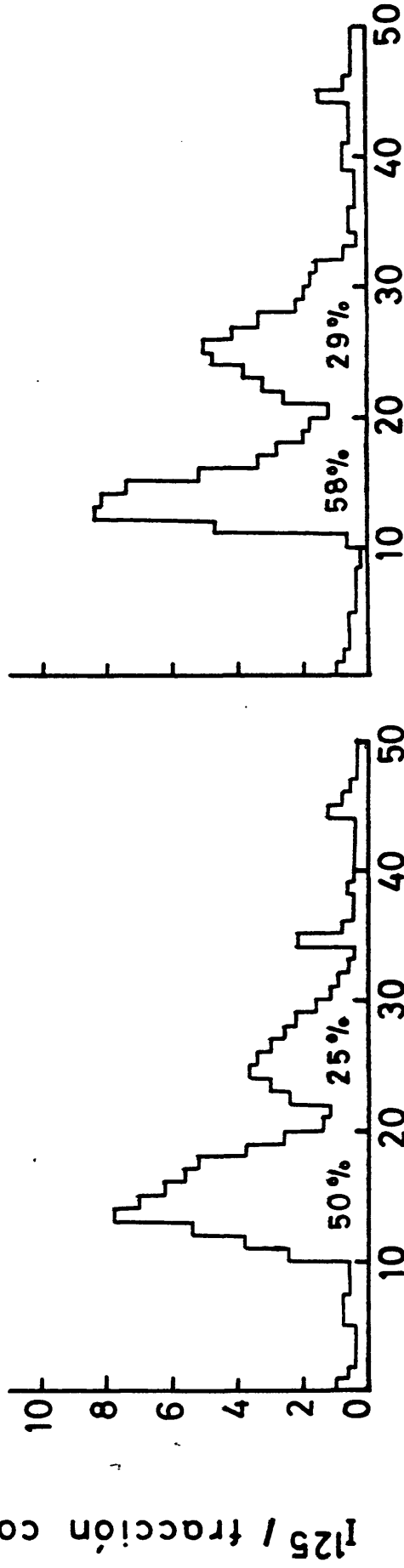
Fig.17.- Patrón cromatográfico en Sephadex G-100 del plasma de ratas de ratas controles y diabéticas inyectadas con r-GH-125. Cromatografía realizada con plasma extraído 2 minutos después de la inyección de GH*

5 minutos

diabéticas



controles

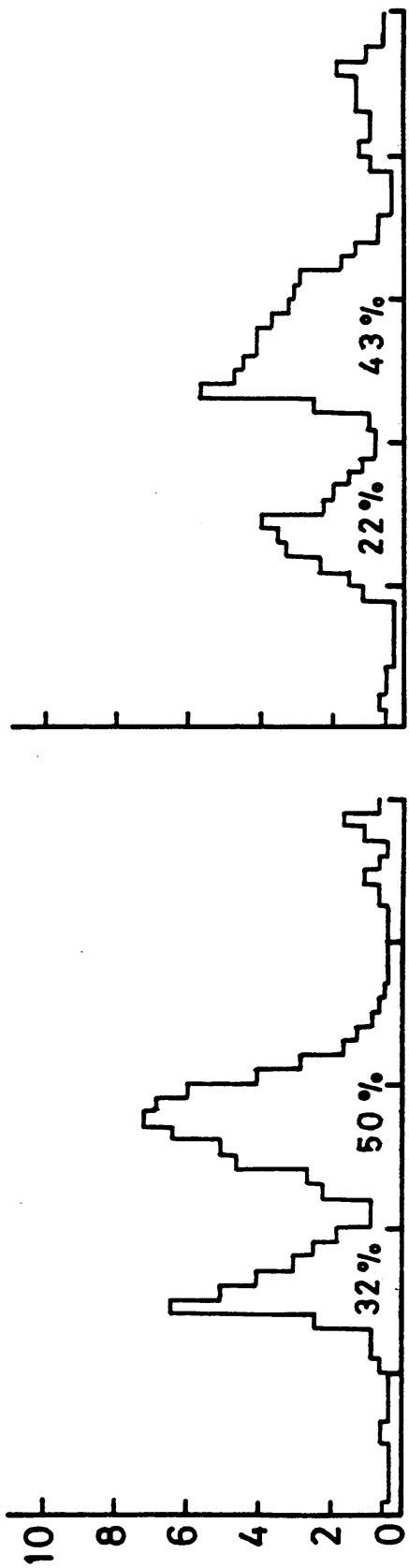


nº de fracciones

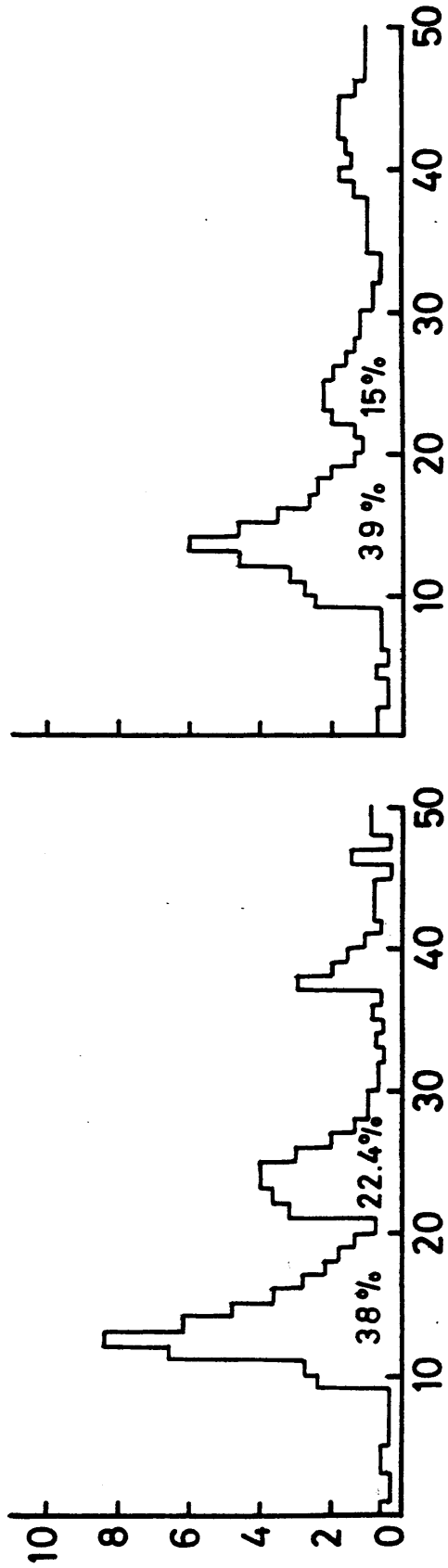
Fig. 18. - Patrón cromatográfico en Sephadex G-100 del plasma de ratas controles y diabéticas inyectadas con r-GH-1¹²⁵. Cromatografía realizada con plasma extraído 5 minutos después de la inyección de GH*

10 minutos

diabéticas



controles

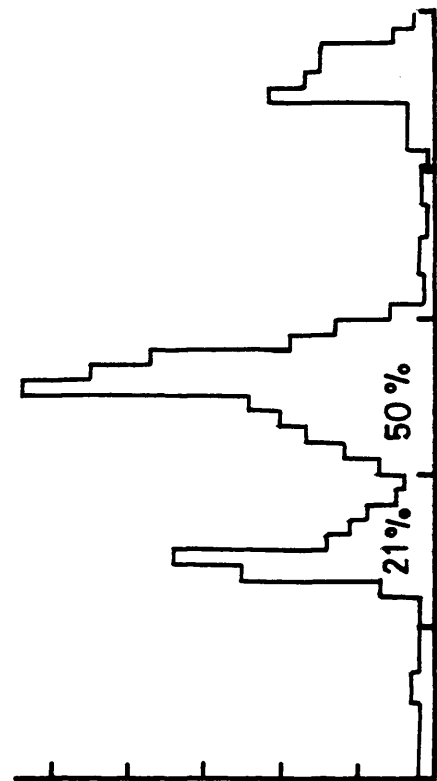
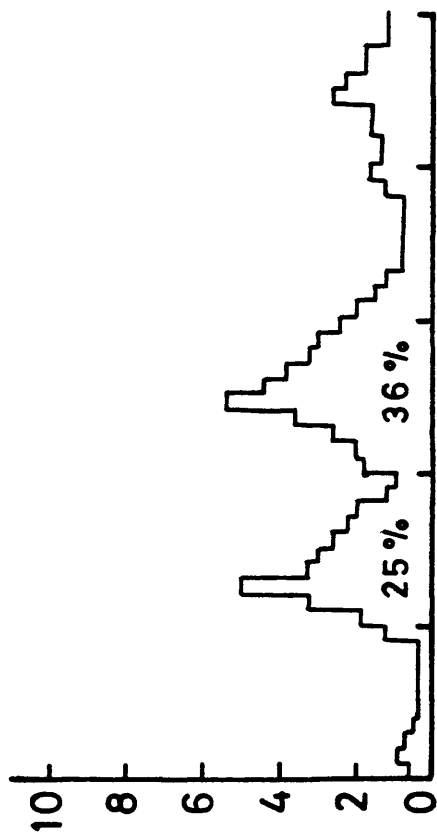


nº de fracciones

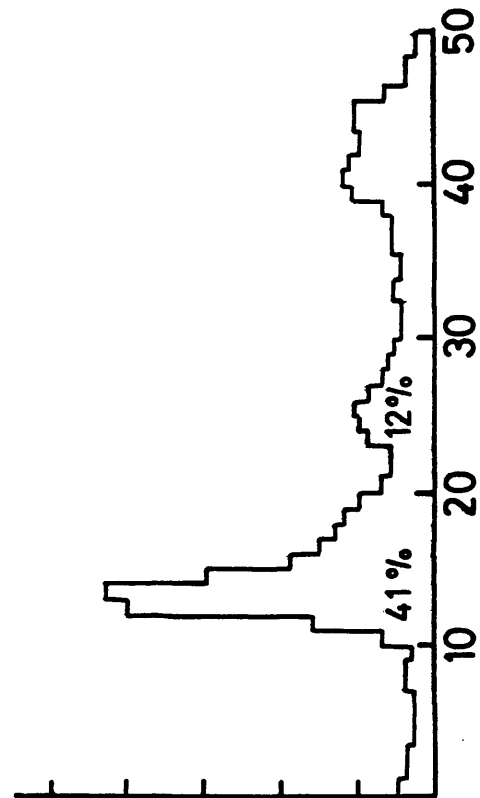
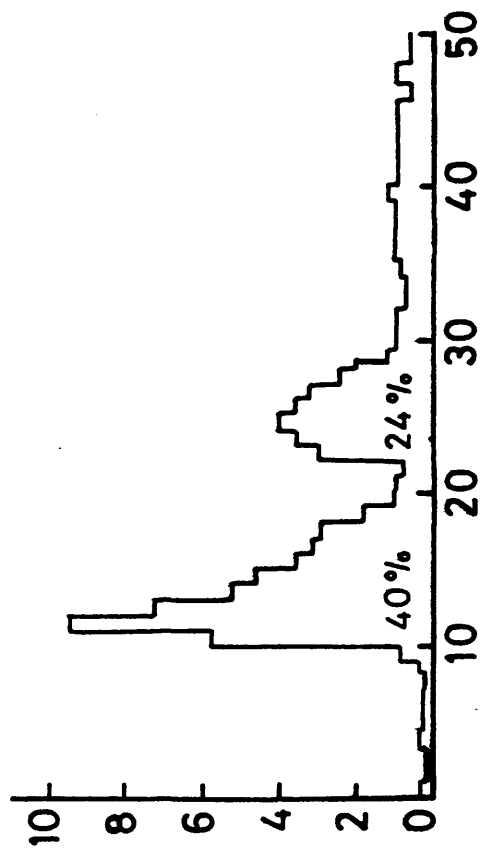
Fig.19.- Patrón cromatográfico en Sephadex G-100 del plasma de ratas controles y diabéticas inyectadas con r-GH-125. Cromatografía realizada con plasma extraído 10 minutos después de la inyección de GH*

20 minutos

diabéticas



controlés



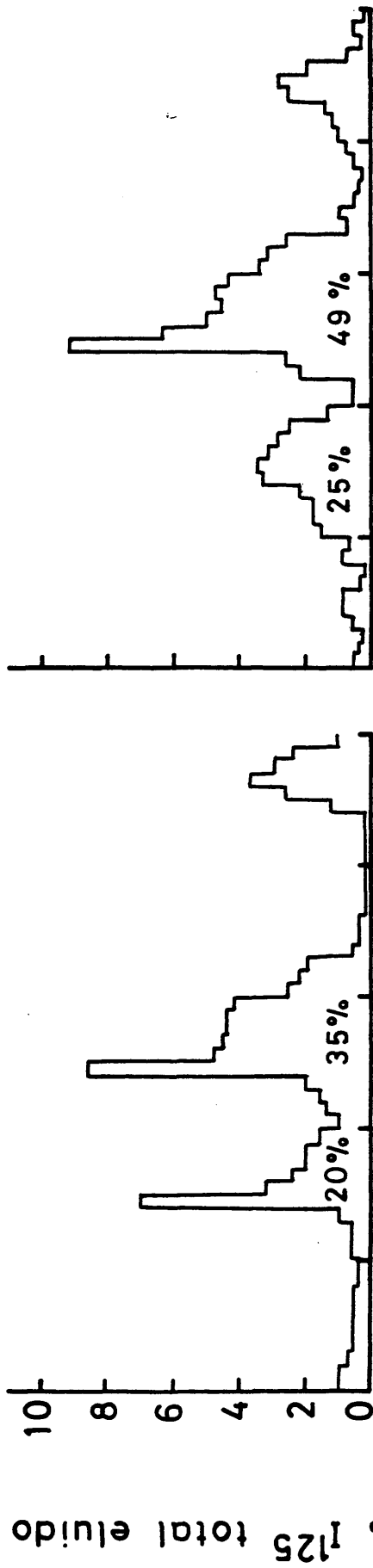
nº de fracciones

I^{125} / fracción como % I^{125} total eluido

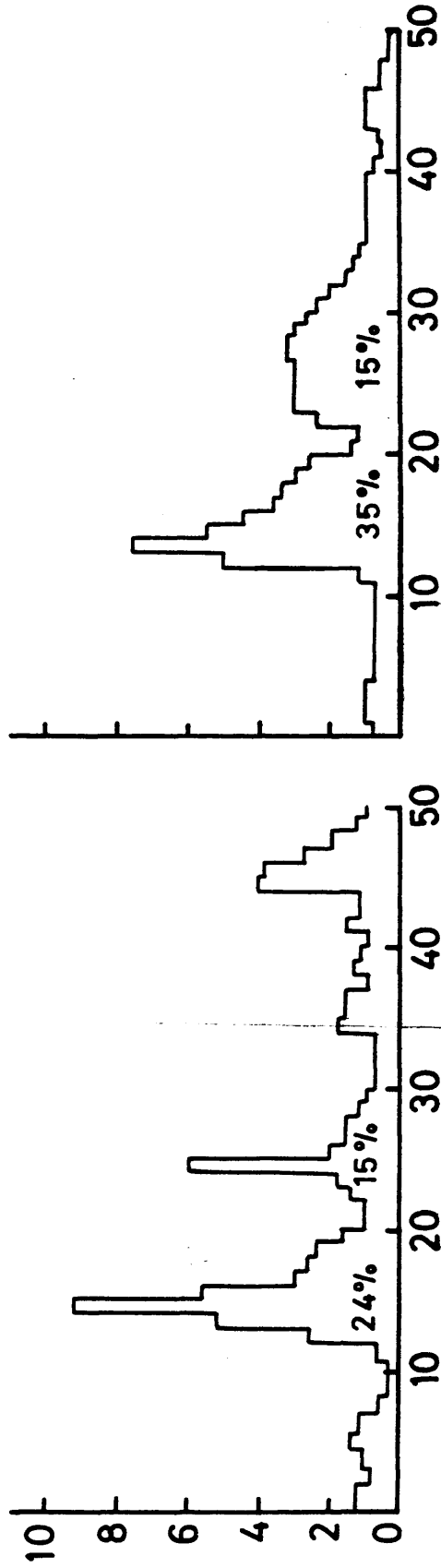
Fig.20. - Patrón cromatográfico en Sephadex G-100 del plasma de ratas controlés y diabéticas inyectadas con r-GH- I^{125} . Cromatografía realizada con plasma extraído 20 minutos después de la inyección de GH*

40 minutos

diabéticas



controles



nº de fracciones

Fig. 21.- Patrón cromatográfico en Sephadex G-100 del plasma de ratas controles y diabéticas inyectadas con r-GH-I¹²⁵. Cromatografía realizada con plasma extraído 40 minutos después de la inyección de GH*

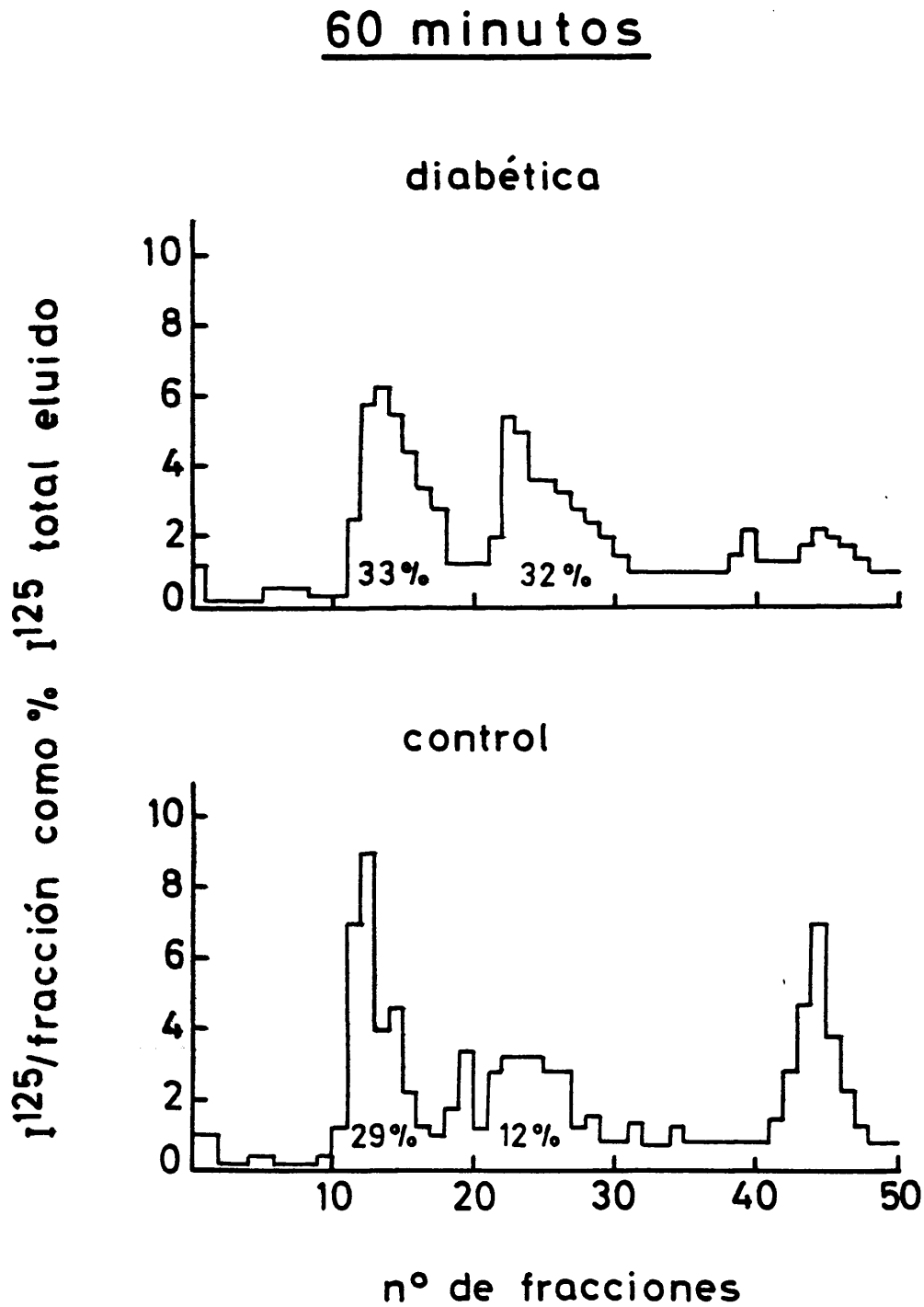


Fig.22.- Patrón cromatográfico en Sephadex G-100 del plasma de ratas controles y diabéticas inyectadas con r-GH- I^{125} . Cromatografía realizada con plasma extraído 60 minutos después de la inyección de GH*

las fracciones 22-31.

El patrón de elución a tiempos más largos después de la administración de la r-GH-I¹²⁵ es análogo al observado a los 2 minutos, un pico cuya posición corresponde al de elución de la forma monomera de la r-GH-I¹²⁵, y otro que eluye antes y que corresponde a una forma de peso molecular más alto. Asimismo, a todos los tiempos estudiados se observa que en el plasma de ratas controles el pico mayoritario es el correspondiente a la forma de GH de peso molecular más alto, mientras que en el plasma de ratas diabéticas la fracción predominante es la correspondiente a la forma monomera de la hormona. Unicamente a los 60 minutos de la administración de la GH* se igualan los porcentajes de la radioactividad correspondiente a ambos picos.

Por otra parte, la suma de los porcentajes de la radioactividad eluida en los dos picos a los 2 minutos de la administración de la hormona marcada varió en las ratas controles entre un 75 y 85 % y en las diabéticas entre el 85 y 90 %. Con el tiempo existe un descenso progresivo, y a los 40 minutos el valor de la suma de los % de los dos picos varió del 39 al 50 % en los controles y del 55 al 74 % en las diabéticas, observándose una caída más intensa de este valor a los 60 minutos. Sin embargo, el descenso de la radioactividad en ambos picos con el tiempo parece más acusada en las ratas controles que en las diabéticas.

Junto con el descenso en la radioactividad correspondiente a las dos zonas mayoritarias, al aumentar el tiempo, aumenta la radioactividad que eluye en zonas más retardadas que la correspondiente a la forma monomera de la hormona, es decir la radioactividad que eluye en la zona del I⁻¹²⁵.

En la Figura 23 se representa la relación existente entre

Valor medio \pm D.S. del cociente I^{125} 1er pico / I^{125} 2º pico a distintos tiempos después de la administración de r-GH- I^{125} en ratas controles (●) y diabéticas (○)

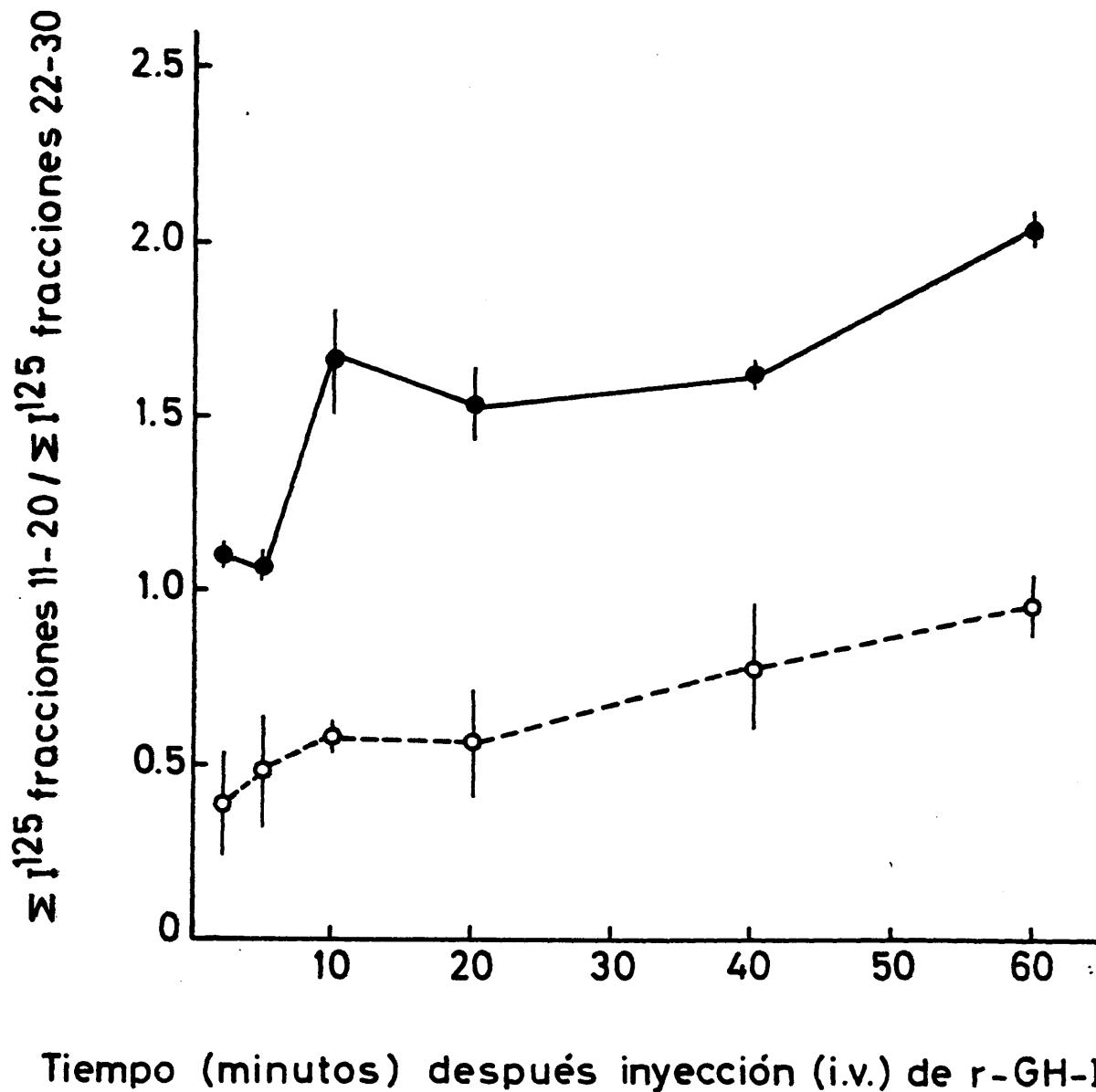


Fig. 23

la radioactividad que eluye en las fracciones correspondientes a la forma de GH de peso molecular alto y la radioactividad localizada en las fracciones donde eluye la forma monomera de la molécula de r-GH-I¹²⁵. A todos los tiempos estudiados, el valor de esta razón fue significativamente más alto en las ratas controles que en las diabéticas, a la vez que se evidencia que al aumentar el tiempo transcurrido entre que se inyecta la r-GH-I¹²⁵ y se toma la muestra de sangre se produce un aumento progresivo del valor de este cociente tanto en ratas controles como en diabéticas.

Por otra parte, cuando las fracciones correspondientes a cada uno de los picos se hicieron reaccionar con un anticuerpo específico para inmunoprecipitación (dilución inicial 1/500) la radioactividad precipitada fue del mismo orden, no encontrándose diferencias significativas en los porcentajes de inmunoprecipitación en función de que su elución estuviese localizada en uno u otro pico (Fig. 24).

2. GH endógena

En un intento de ver la distribución cromatográfica de la GH que es segregada endógenamente, y ante la posibilidad de que si se fraccionaba un plasma en que la concentración de GH estuviera dentro del rango de los valores basales, las cantidades de GH eluidas en cada una de las fracciones se hallarían fuera del límite de sensibilidad del radioinmunoensayo, es por lo cual se usó el plasma de rata control y diabética cuya secreción hipofisaria de GH se estimuló con pentobarbital. Se usó un grupo de ratas controles y diabéticas a los 16 días de haber inducido la enfermedad. Después de anestésiar ligeramente con éter, ambos grupos de ratas fueron inyectados con 3 mg de pentobarbital/100 gramos de peso corporal en la vena femoral de una

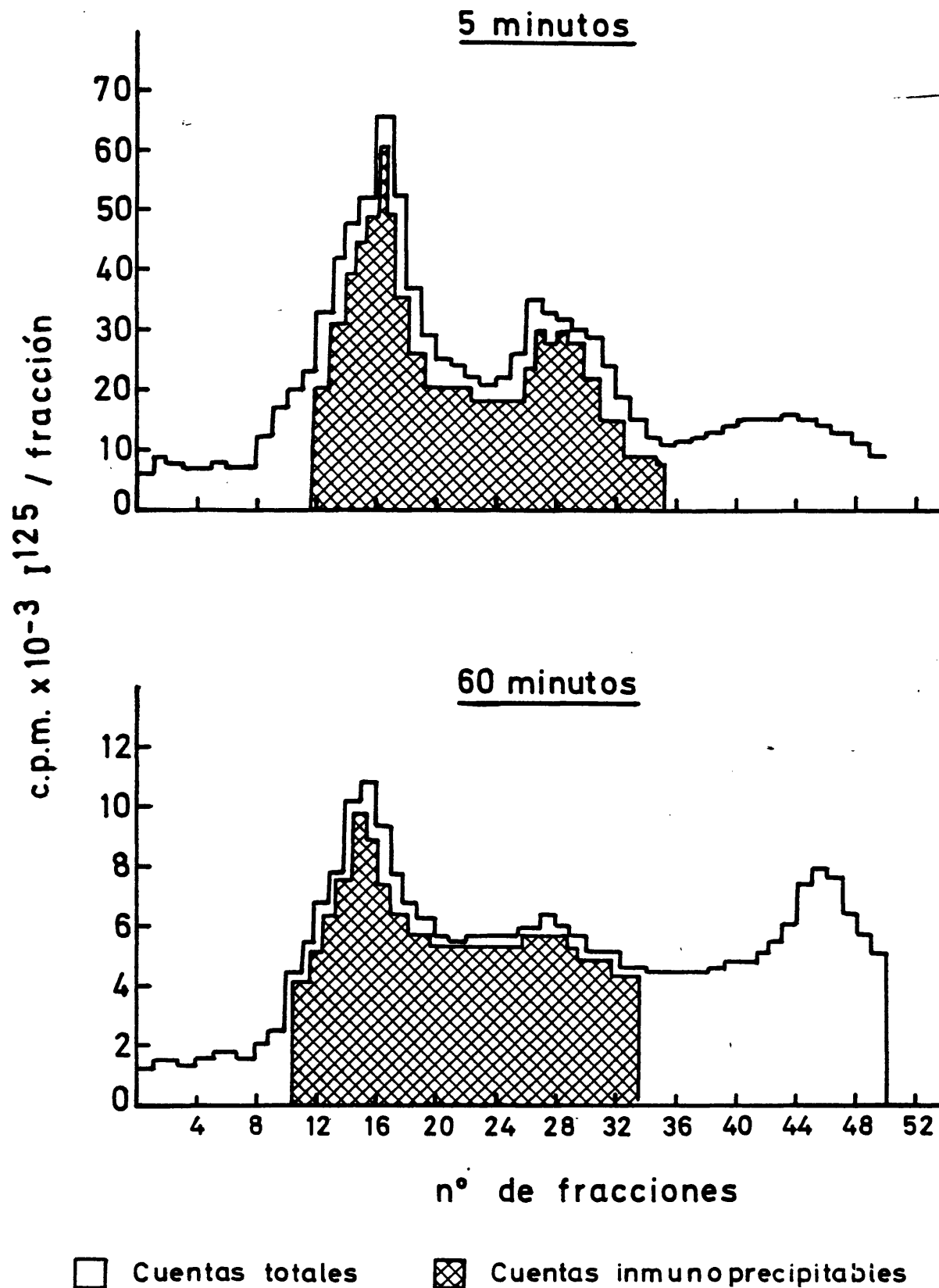


Fig.24.- Radioactividad total e inmunoprecipitable en los eluidos cromatograficos en Sephadex G-100 de un plasma control a los 5 y 60 minutos de la inyeccion de r-GH-I¹²⁵

de las extremidades inferiores. A los 10 minutos se extrajo sangre de la yugular mediante una jeringa heparinizada. El volumen de plasma puesto en la columna fue de 1.5 ml.

La Fig. 25 representa el contenido de GH en cada una de las fracciones, valorado por RIA, al eluir en Sephadex G-100 el plasma de rata control o diabética. En ambos tipos de plasmas, el patrón de elución presenta dos zonas en las que se detecta una mayor cantidad de GH; una de ellas comprendida entre las fracciones 11-18 y la otra que eluye más lentamente entre las fracciones 21-30. Tanto en plasma procedente de rata control como en el de diabética, la cantidad de GH que eluye en lo que sería la forma de GH de peso molecular más alto es superior que la correspondiente a lo que sería la forma monómera de la hormona. Es evidente que el contenido de GH en cada una de estas formas es más alto en el plasma diabético que en el control.

Estos datos sugieren que la GH endógena se distribuye en plasma de una forma similar a la de la r-GH-I¹²⁵. Aunque los resultados de estos estudios no son completamente comparables, ya que en el caso de la GH endógena solamente hemos observado el patrón de elución a un solo tiempo, mientras que en el estudio realizado con la hormona marcada hemos podido seguir los cambios cinéticos de cada una de las formas de la molécula de GH en plasma.

No obstante, parece claro que el patrón de distribución en plasma de la GH* es análogo al de la endógena, lo cual sugiere que la r-GH-I¹²⁵ es transportada en plasma de una forma similar a la de la GH endógena, lo cual nos indica que se puede usar la r-GH-I¹²⁵ para la determinación de la velocidad de aclaramiento metabólico de la hormona en plasma.

Fraccionamiento en sephadex G-100 de plasma de rata control y diabética cuya secreción de GH se estimuló con pentobarbital

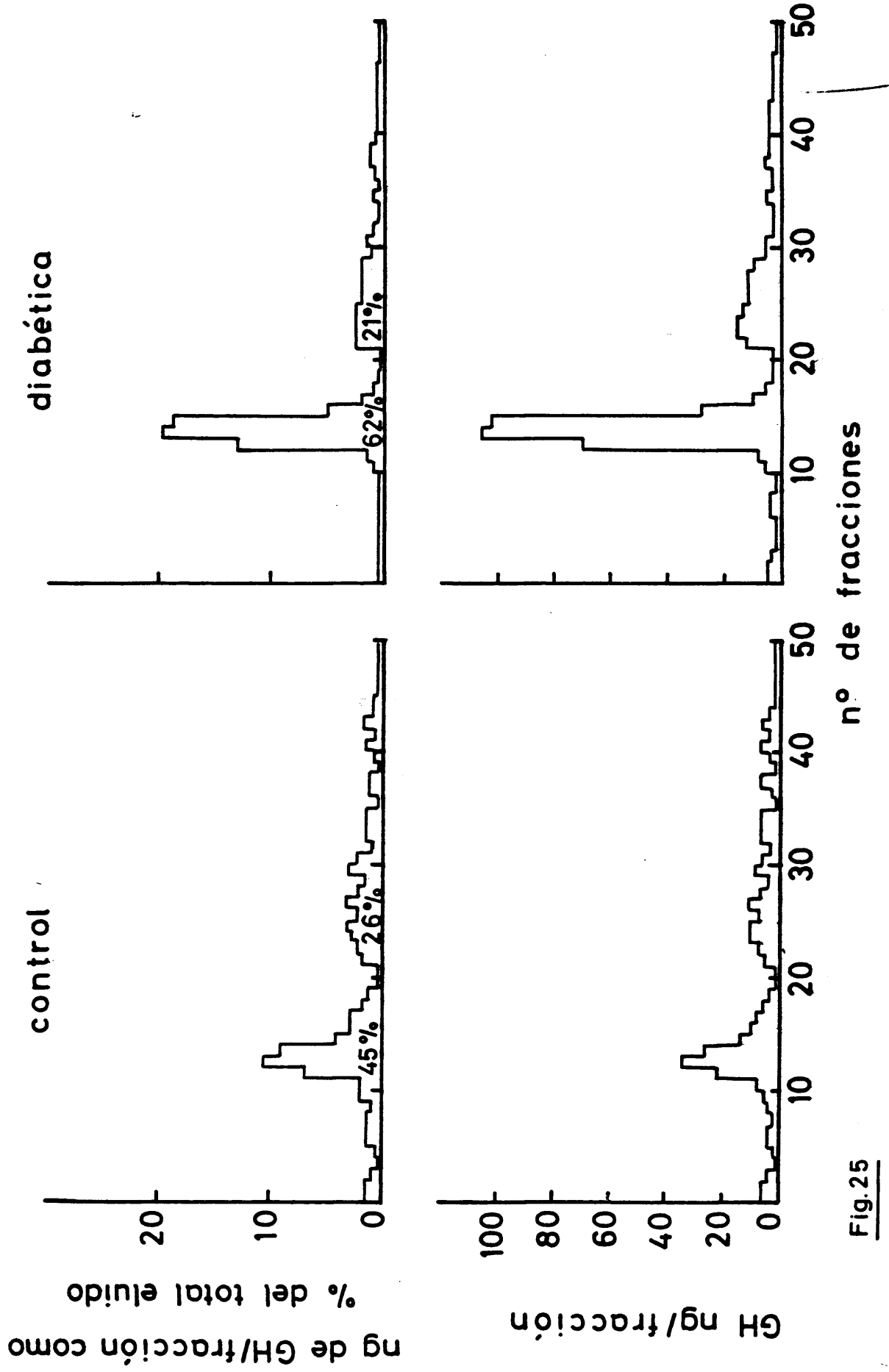


Fig.25

G. CINETICA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA

En resultados previos hemos podido observar que en el animal diabético a pesar de su reducido contenido hipofisario en hormona de crecimiento, sin embargo, en plasma no existe como sería de esperar una reducción significativa en los niveles circulantes. Dichos niveles, o bien no difieren de un control o incluso son superiores, aunque las diferencias no llegan a ser significativas dada la gran dispersión de valores obtenidos en la valoración de la GH en plasma. Con estos antecedentes nos propusimos estudiar la cinética de la hormona de crecimiento en plasma procedente de un control y de un diabético. Los niveles en plasma de una hormona cualquiera son el resultado de dos efectos contrapuestos, velocidad de degradación y velocidad de secreción por parte de su glándula productora, en nuestro caso adenohipófisis. Una secreción aumentada o una reducción en la velocidad de aclaramiento conducirían a niveles anormalmente altos dependiendo del grado de la alteración.

Protocolo experimental

Empleamos un total de 50 ratas macho, 20 se utilizaron como controles y las 30 restantes se hicieron diabéticas tras inyección de 6.5 mg/100 gramos de peso corporal, de streptozotocin. El período de diabetes osciló de 13-15 días, tiempo durante el cual los animales controles y diabéticos comieron y bebieron "ad libitum". La glucosa plasmática de los animales diabéticos osciló de 350-450 mg/100 ml y tuvieron una pérdida de peso corporal en el período en estudio de -2 gramos. La hormona r-GH marcada con I^{125} y recién purificada se les inyectó en 0.5 ml de buffer salino al 1 % de BSA, con el fin de evitar que la hormona marcada pudiera adherirse a las paredes de la jeringa. El hecho de usar hormona recién purificada es con

objeto de asegurarnos que la radioactividad inyectada corresponde a GH* y no es iodo inorgánico. El animal tras ser anestesiado con éter, se le inyectó la hormona marcada en la vena femoral de una de las extremidades inferiores y a partir de ese momento se empezó a contabilizar el tiempo. Las extracciones se hicieron mediante una jeringa heparinizada a los 2, 5, 10, 15, 20 y 60 minutos. La sangre extraída era colocada en frío hasta el momento de su centrifugación, la cual una vez finalizada y separado el plasma, era almacenado en nevera hasta el día del conteo para la realización de la inmunoprecipitación o del TCA, los cuales se llevaron a cabo cuando finalizó el experimento y se dispuso de la totalidad de los plasmas. El experimento se realizó en tres días, con lo cual desde la obtención de los primeros plasmas hasta la realización de la inmunoprecipitación transcurrieron únicamente tres días, es por ello que el "decay" de la hormona marcada en las muestras puede considerarse mínimo teniendo en cuenta la vida media del I^{125} . Con objeto de estudiar la degradación ejercida por el plasma sobre la hormona inyectada con la consiguiente pérdida de inmunoprecipitación, un plasma control y otro diabético se incubaron con GH* a 37° C, sacando muestras de 0.1 ml a todos los tiempos, desde los 2 a los 60 minutos. A los 60' la precipitación obtenida fue prácticamente del mismo orden que a los 2 minutos, existiendo únicamente un descenso en la radioactividad inmunoprecipitable del 2 %.

Resultados

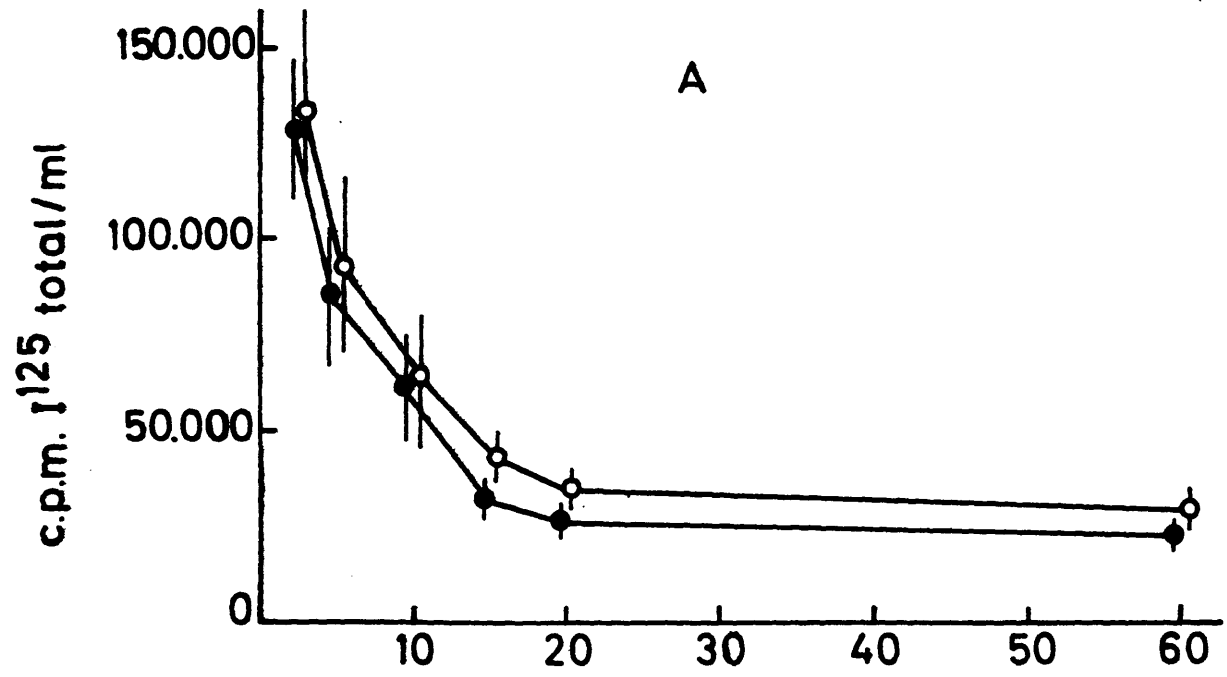
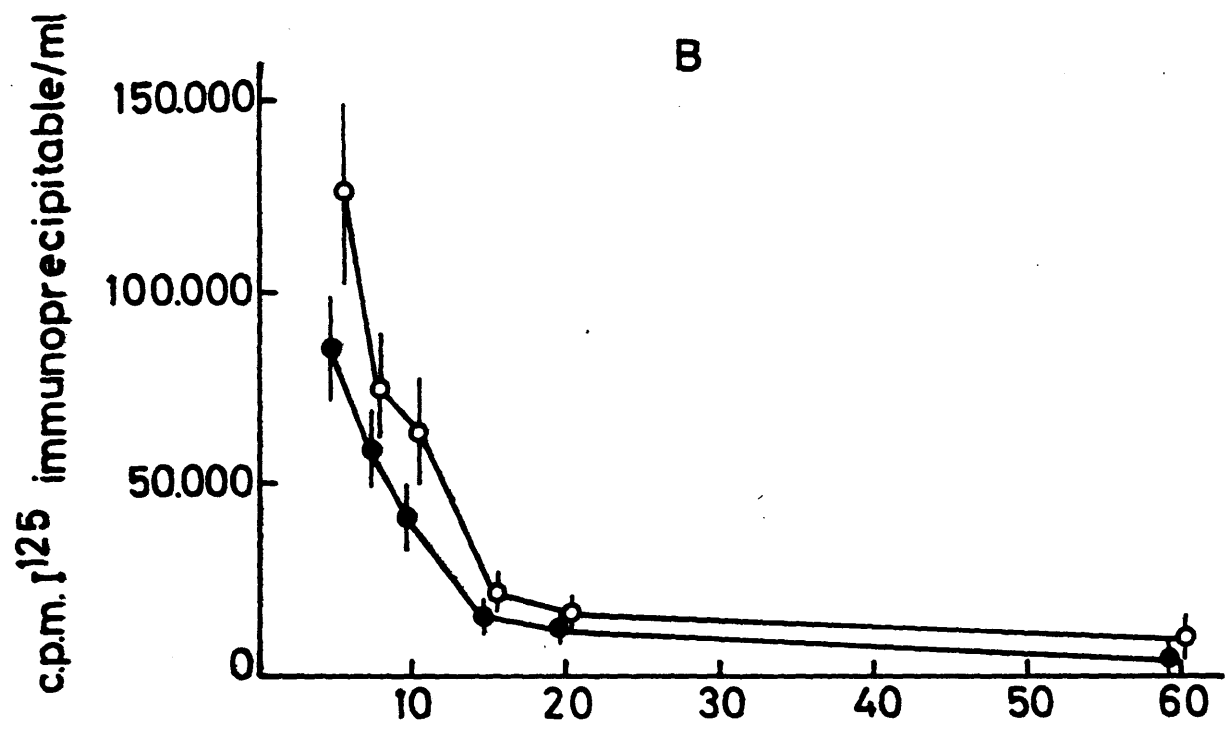
Para la posterior determinación de parámetros cinéticos como velocidad de aclaramiento (MCR) y secreción (SR) hay que partir de dos supuestos fundamentales: 1°) la hormona exógena es metabolizada de igual forma que la endógena, es decir, que

la iodación no imprime ningún carácter diferencial a la hormona y ambas, exógena y endógena son indistinguibles por parte del organismo y por tanto metabolizadas de igual forma. 2ª) durante el período de experimentación existe un estado estacionario para la hormona endógena. El primer condicionamiento es cierto como anteriormente hemos visto en el estudio de las patrones cromatográficos de la r-GH-I¹²⁵ en plasma o en los correspondientes a la hormona endógena. En cambio el segundo requisito no es del todo cierto al menos para una hormona como la GH cuyo control de secreción tiene un componente neural muy importante y presenta grandes oscilaciones con brotes incontrollados de secreción a lo largo del día. La elevación en los niveles circulantes de GH existentes durante el período de experimentación parecen no influir en el MCR, el cual parece ser independiente de la concentración plasmática. Este hecho no es un fenómeno exclusivo para la hormona de crecimiento, ya que se halla extendido a la mayoría de las hormonas proteicas.

En la Fig. 26 panel A se representa en coordenadas lineales la desaparición de la radioactividad en plasma frente al tiempo de extracción después de la inyección. Como puede observarse el descenso es lineal hasta los 15 ó 20 minutos y a partir de entonces sigue un perfil completamente diferente. El perfil observado en el descenso de la radioactividad en plasma es idéntico en controles y en diabéticos, aunque la curva de los animales insulinoprivos va por encima de la población control a pesar de que la radioactividad inyectada fue del mismo orden: 1.075.000 c.p.m./0.5 ml para controles y 1.027.000 c.p.m./0.5 ml para las diabéticas. La posible explicación, es que al tener los controles un peso corporal final medio de 138 gramos, el cual es superior al de los animales insulinoprivos (peso medio final 109 gramos), en igual cantidad de plasma

Velocidad de desaparición en plasma de la GH-I¹²⁵

(medias \pm D.S.)



Tiempo (minutos) después de la inyección (i.v.) de r-GH-I¹²⁵

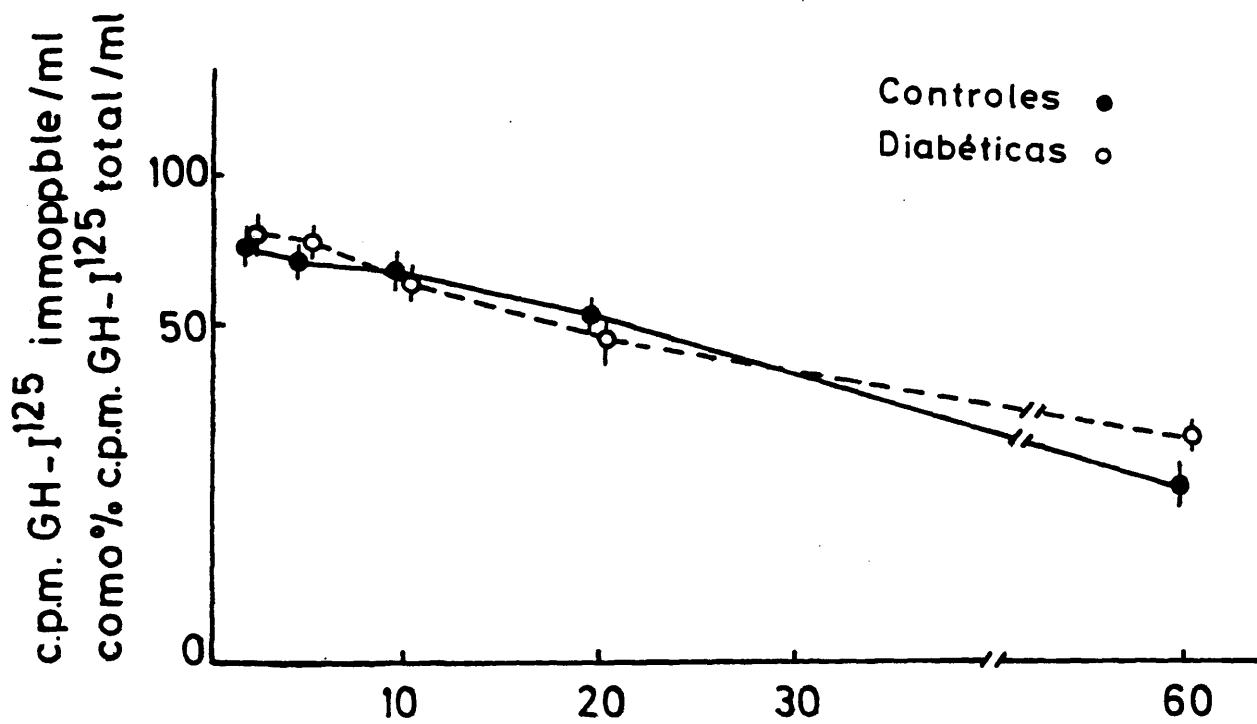
controles • diabéticas o

Fig. 26

(1ml) las diabéticas tendrían una radioactividad ligeramente superior. En la misma Fig. 26 panel B aparece la radioactividad inmunoprecipitable en 1 ml de plasma frente al tiempo después de la inyección de la hormona marcada. De nuevo, aunque las coordenadas son lineales, el perfil de la curva de desaparición sigue siendo el correspondiente a un sistema multiexponencial. Dicho perfil como posteriormente veremos no varía a pesar del uso de coordenadas semilogarítmicas. La radioactividad inicial en plasma previa a la inmunoprecipitación era también superior que la de los controles, debido posiblemente al menor peso corporal de los animales insulinoprivos. Sin embargo, el porcentaje de inmunoprecipitación fue del mismo orden en ambos grupos de animales como puede observarse en la Fig. 27, donde se representa el porcentaje de inmunoprecipitación/ml de plasma referido a la radioactividad existente en las alícuotas usadas para estudiar la desaparición de la radioactividad en plasma. El porcentaje de inmunoprecipitación descendió progresivamente a lo largo del tiempo y pasó de un valor a los 2' de 72.45 ± 5.08 % para controles y 74.84 ± 5.27 % para diabéticas, a un valor de 23.41 ± 3.59 % para controles y 27.57 ± 9.09 % para diabéticas a los 60' de la inyección (los valores son $\bar{x} \pm D.S$). La inmunoprecipitación todavía existente en el intervalo de 20-60 minutos podría atribuirse al retorno a la circulación de fragmentos hormonales que aún conservan capacidad de inmunoprecipitación. Aunque la inmunoprecipitación no fue medida en la inyección administrada a los animales, puede considerarse que es del mismo orden que la observada en las muestras obtenidas a los 2 minutos.

A continuación pasaremos a estudiar cada uno de los parámetros medidos:

a) Vida media



Tiempo (minutos) después inyección (i.v.) r-GH-I¹²⁵

Fig.27.- Variación a lo largo del tiempo del porcentaje de radioactividad inmunoprecipitable en ratas controles y diabéticas

En general la vida media de una hormona o de una sustancia cualquiera se define como el tiempo "t" en que la radioactividad del isótopo usado para marcar la sustancia en estudio ha quedado reducida a la mitad. Para dicho cálculo es necesario que la desaparición de la radioactividad con el tiempo sea lineal. Como puede observarse en la Fig. 28 panel A donde se representa la radioactividad en plasma previa a la realización de la inmunoprecipitación y expresado como % de la dosis inyectada, puede comprobarse que a pesar del uso de coordenadas semilogarítmicas de nuevo el perfil de desaparición sigue siendo el correspondiente a un sistema multiexponencial con un componente lineal que dura hasta los 15 ó 20 minutos. Si nos ceñimos a la porción lineal de la curva, podemos hacer un cálculo aproximado de la vida media, el valor obtenido fue del orden de 7 minutos, no existiendo prácticamente diferencias entre controles y diabéticas. Un valor del mismo orden (7 minutos en controles y 8 minutos en diabéticas) se obtiene si dicho cálculo se realiza sobre el perfil obtenido al representar la radioactividad inmunoprecipitable como porcentaje de la dosis inyectada (panel C Fig. 28). Resultados similares se obtienen realizando el cálculo de la vida media sobre la curva obtenida al representar la radioactividad precipitable con TCA (panel B Fig. 28). De nuevo se observa que el perfil es multiexponencial a pesar de que el TCA es un método mucho menos sensible que la inmunoprecipitación, ya que cualquier fragmento hormonal procedente de la degradación de la GH* puede ser precipitado.

b) Velocidad de aclaramiento (MCR)

La velocidad de aclaramiento se define como la cantidad de plasma que queda libre de hormona marcada en la unidad de

Velocidad de desaparición en plasma de la GH-I

141.

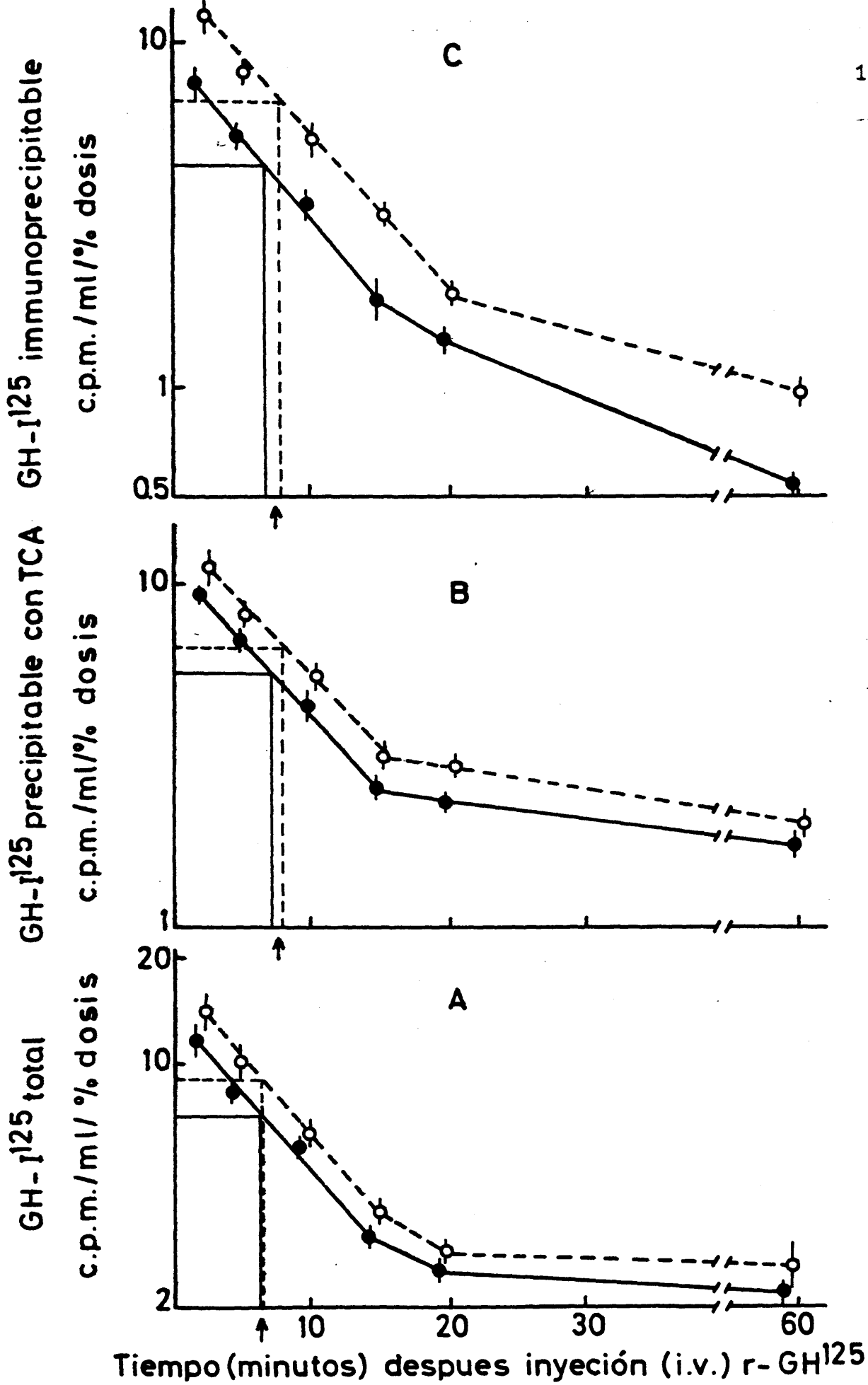


Fig. 28

Controles ● Diabéticas ○

tiempo. El cálculo del MCR es diferente según la metodología empleada para su determinación (infusión continua o una única inyección) y viene medido en ml/min. Nosotros hemos calculado el MCR de acuerdo con la fórmula de Kohler y cols (1968) aplicable sólo al caso en que se administra una única inyección.

$$\text{MCR (ml/min.)} = \frac{R}{\int_0^{\infty} x \, dt}$$

R es la dosis de hormona administrada (c.p.m.) y \underline{x} es la concentración de hormona exógena inmunoprecipitable. El parámetro $\int_0^{\infty} x \, dt$ puede calcularse hallando el área determinada por la curva de desaparición de la radioactividad inmunoprecipitable frente al tiempo, usando un sistema de coordenadas lineales. Siguiendo este criterio hallamos un MCR de 1.66 ± 0.17 ml/min. en controles y 1.24 ± 0.14 ml/min. en diabéticas (los valores son $\bar{x} \pm D.S$). Las diferencias entre ambos grupos fueron significativas $p < 0.001$. Con la finalidad de corregir el valor obtenido para la velocidad de aclaramiento ante el diferente tamaño y peso corporal existente entre ambos grupos de animales, el MCR fue referido a 100 gramos de peso corporal. Los valores obtenidos fueron 1.20 ml/min/100 gr en controles y 1.13 ml/min/100 gr en diabéticas, con lo cual desaparecieron las diferencias existentes. Si el MCR era expresado por 100 cm² de superficie corporal dado que la relación peso-superficie es

$$\text{Superficie} = (\text{Peso corporal})^{2/3} \times 10$$

Los valores hallados fueron: 0.62 ± 0.06 en controles y 0.54 ± 0.05 ml/min./100 cm² en diabéticas ($p < 0.05$)

Tabla n° 3

Velocidad de aclaramiento metabólico (MCR) y velocidad de secreción (SR) de la GH en ratas controles y diabéticas.

	MCR	SR
	ml/min/100g	ng/min
	ml/min/100cm ²	
Controles*	1.66 ± 0.17	15.94 ± 6.22
Diabéticas*	1.24 ± 0.14	33.89 ± 4.23
P	< 0.001	< 0.001
	n.s	< 0.05
Controles**	1.16 ± 0.09	13.1 ± 1.9
Controles	0.64 - 0.72	10.8

Frohman y Bernardis
Endocrinology 86:305,1970

Strosser y Mialhe
Horm. Metab. Res. 7:275,1975

* Medias ± D. S.

** Medias ± E. S.

c) Velocidad de secreción (SR)

Una vez conocido el parámetro MCR, la velocidad de secreción se calcula según la fórmula:

$$SR(\text{ng}/\text{min}) = \text{MCR} \cdot i$$

Donde i son los niveles plasmáticos de hormona endógena medidos por RIA. Los valores obtenidos para la secreción fueron 15.94 ± 6.22 ng/min. en la población control y 33.89 ± 4.23 para los diabéticos, las diferencias obtenidas fueron significativas ($p < 0.001$). En la tabla nº 3 se resumen los valores hallados para la velocidad de aclaramiento y secreción en ambos grupos de animales junto con datos de la literatura sobre la medida de los parámetros cinéticos en estudio en animales controles.

H. CONCENTRACION PLASMATICA DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN RESPUESTA A LA ESTIMULACION CON PENTOBARBITAL

De los estudios sobre vida media, velocidad de aclaramiento y velocidad de secreción de la hormona de crecimiento en plasma de animales controles y diabéticos, los dos primeros parámetros fueron del mismo orden en ambos grupos de animales, por el contrario, la secreción estaba aumentada en los animales insulinoprivos en comparación con la población control. Ello fue lo que nos llevó a estudiar la secreción hipofisaria de GH in vivo en ambos grupos de animales, usando como sustancia estimulante de la descarga hormonal el pentobarbital (PB), agente anestésico que origina la secreción de la hormona de crecimiento almacenada en hipófisis, incrementándose por consiguiente los niveles circulantes (Howard y Martín 1971).

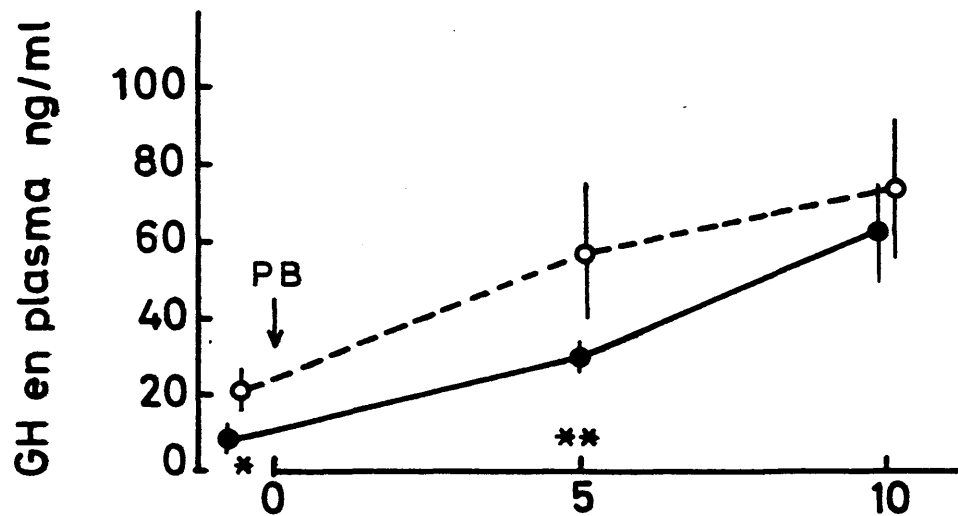
Protocolo experimental

Se dispuso de un total de 15 ratas macho procedentes del mismo destete con un peso inicial al comienzo del experimento de 100-150 gramos. Cinco animales se tomaron como controles a los que se les inyectó 1 ml de salino, mientras que a los 10 restantes se hicieron diabéticos tras la inyección de 6.5 mg/100 gramos de peso corporal de streptozotocin, habiendo permanecido ambos grupos 24 horas en ayunas con objeto de someter a todos los animales al mismo tipo de stress. Ambos grupos permanecieron en condiciones idénticas de luz y temperatura, permitiéndoles comer y beber "ad libitum". A los 16 días de haber inducido la diabetes, se realizó el test de estimulación inyectando 3 mg/100 gramos de peso corporal del agente anestésico (Nembutal Sodium, Abbot) en 0.2 ml de salino, habiendo sufrido los animales un ayuno previo de 12-18 horas.

Tras una ligera anestesia con éter, se obtuvo mediante una jeringa heparinizada sangre de una de las yugulares, dicha toma se consideró como muestra a tiempo cero o muestra basal para la posterior determinación de la concentración plasmática de GH. La solución de pentobarbital preparada en el momento de su uso, se inyectó en la vena femoral de una de las extremidades inferiores a la par que se empezó a contabilizar el tiempo. La muestra obtenida a los 5 minutos se extrajo de la otra yugular, y la correspondiente a los 10 minutos se obtuvo sangrando al animal de la vena cava.

Los parámetros estudiados en plasma fueron, hormona de crecimiento y glucosa. La concentración plasmática de glucosa fue: 134.88 ± 5.57 en controles y 428.68 ± 17.97 mg/100 ml en diabéticas (los valores son $\bar{x} \pm$ D.S). En la Fig. 29 panel superior,

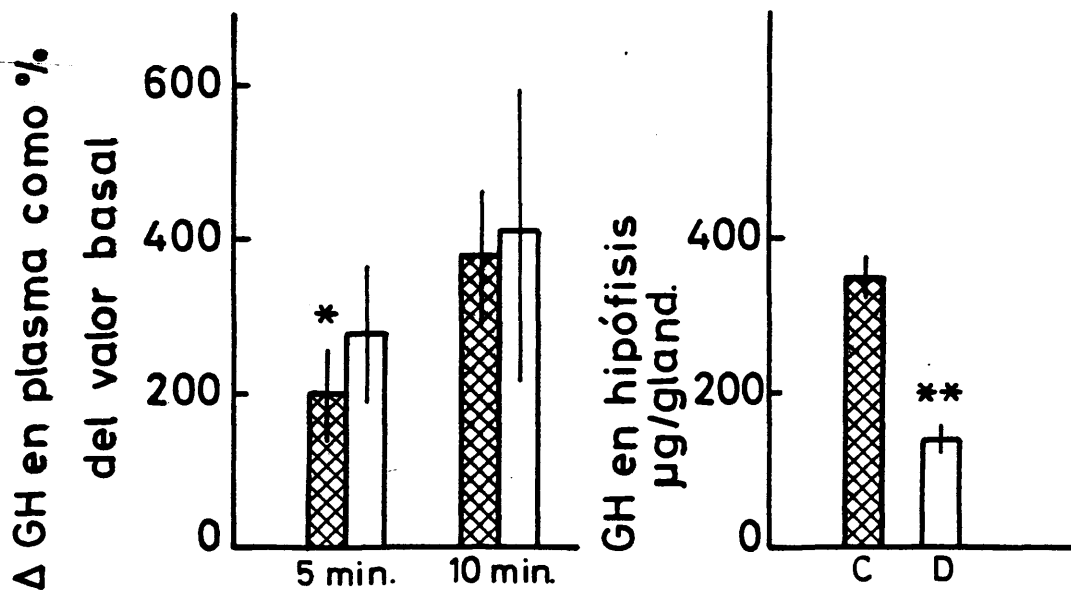
Estimulo de la secrecion de GH con pentobarbital (3 mg/100g) en ratas controles y diabéticas



*: $p < 0.02$
 **: $p < 0.001$

Tiempo (minutos)

C ● D ○



Medias ± D.S.

C

D

*: $p < 0.01$
 **: $p < 0.001$

Fig. 29

aparecen las concentraciones de GH en plasma (ng/ml) en controles y diabéticas en las muestras basales así como a los 5 y 10 minutos de la inyección del pentobarbital. Hay que señalar que para la elaboración de esta gráfica sólo se han utilizado aquellos animales que respondieron al agente anestésico. La concentración plasmática de GH en las muestras basales, a los 5 y 10 minutos para los animales controles fueron 10.28 ± 5.13 , 29.93 ± 1.02 , y 64.13 ± 21.89 respectivamente, estos mismos valores en la población diabética fueron 21.35 ± 11.70 , 58.70 ± 28.82 y 72.50 ± 44.63 . Puede observarse que en ambos grupos de animales existe un aumento progresivo en los niveles circulantes de GH a medida que transcurre el tiempo después de la inyección del pentobarbital, sin embargo existieron diferencias significativas entre ambos grupos a tiempo cero (muestra basal) y a los 5 minutos ($p < 0.02$ y $p < 0.01$) respectivamente. Con objeto de subsanar la diferencia existente en los valores basales entre ambos grupos de animales, el incremento en los niveles circulantes de GH para cada uno de los tiempos (5 y 10 minutos) fue expresado como porcentaje de su respectivo valor basal para lo cual hallamos la diferencia existente entre cada concentración y su propio nivel basal y dicha diferencia se expresó como % del valor obtenido a tiempo cero (valor basal). Los resultados obtenidos se reflejan en la figura 29 panel inferior izquierdo, como puede observarse el aumento en la concentración plasmática de GH fue significativamente superior en los animales diabéticos a los 5' pero no a los 10' aunque de nuevo en los animales diabéticos había un ligero incremento en comparación con la población control. Finalmente en el panel inferior derecho de la misma figura se muestra el contenido hipofisario de GH valorado por RIA, observando una reducción significativa en dicho contenido en los animales insulinoprivos, fenómeno que se repite consistentemente en todos los experimentos

realizados en la presente tesis.

Ante la posibilidad de haber empleado una dosis de pentobarbital excesivamente alta que pudiera haber enmascarado las diferencias en la respuesta entre ambos grupos de animales, se realizó un nuevo experimento siguiendo la metódica antes descrita pero usando 1.5 mg/100 gramos de peso corporal de pentobarbital en 0.2 ml de salino. Se usaron 20 ratas macho, ocho animales se destinaron como controles y el resto se hicieron diabéticos tras la inyección de 6.5 mg/100 gramos de peso corporal de streptozotocin. Transcurridos los 16 días de diabetes, controles e insulinoprivos fueron sometidos al test de estimulación con el agente anestésico a la concentración antes mencionada. Además de la glucosa plasmática (99 ± 17.64 en controles y 350.31 ± 61.09 mg/100 ml de diabéticos) se siguió la curva de peso corporal como indicador del grado de diabetes, observando que transcurridos los 16 días, los controles ganaron 70.28 ± 9.08 gr frente a -1.77 ± 10.81 gramos para los diabéticos (los valores son $\bar{x} \pm$ D.S). Como en el caso anterior y para la posterior elaboración de los datos sólo se utilizaron aquellos animales que respondieron a la estimulación. En la Fig. 30 panel superior se representa la concentración circulante de GH (ng/ml) en controles y diabéticos. Los valores obtenidos en las muestras basales así como a los 5 y 10 minutos fueron: 9.78 ± 3.08 , 12.11 ± 1.23 y 19.23 ± 6.90 para controles y 16.74 ± 10.99 , 61.59 ± 31.62 y 30.80 ± 9.03 para diabéticos, las diferencias fueron únicamente estadísticamente significativas a los 5 minutos. Hay que señalar el diferente comportamiento en la respuesta existente entre controles y diabéticas, ya que en los primeros, la respuesta es mantenida hasta los 10 minutos y por el contrario en los insulinoprivos se observa un brusco aumento en los 5' descendiendo a continuación el valor

Estimulo de la secreción de GH con pentobarbital

(1.5mg/100g) en ratas controles y diabéticas

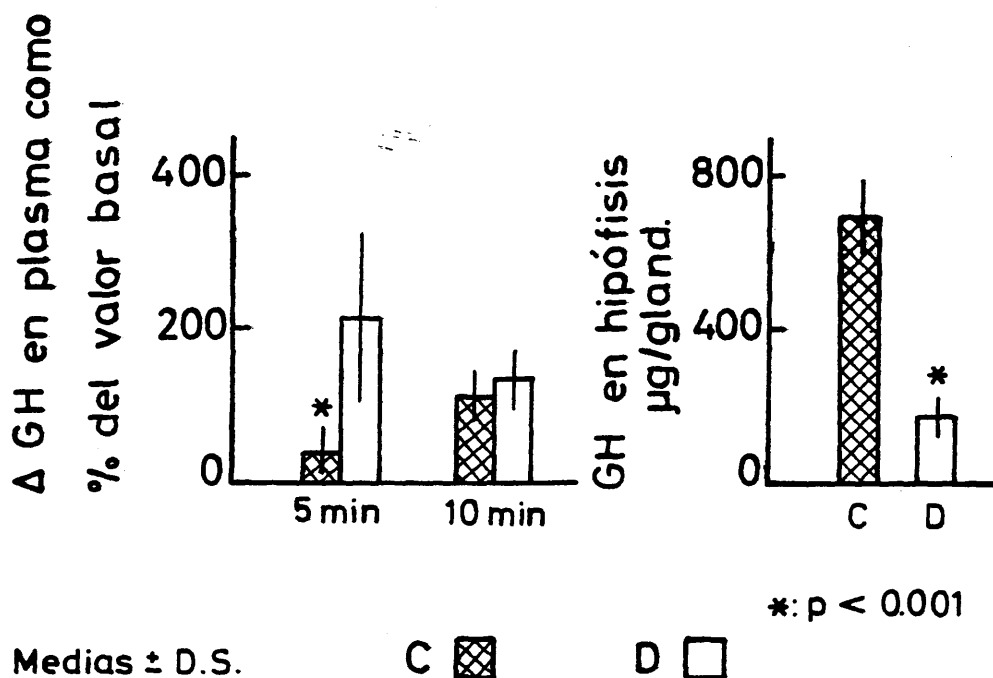
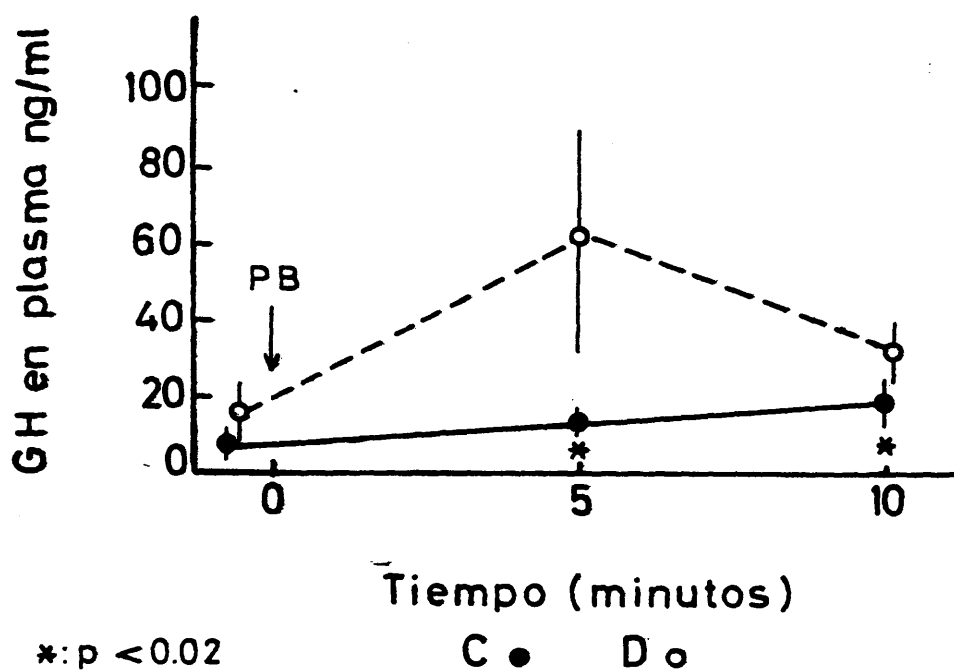
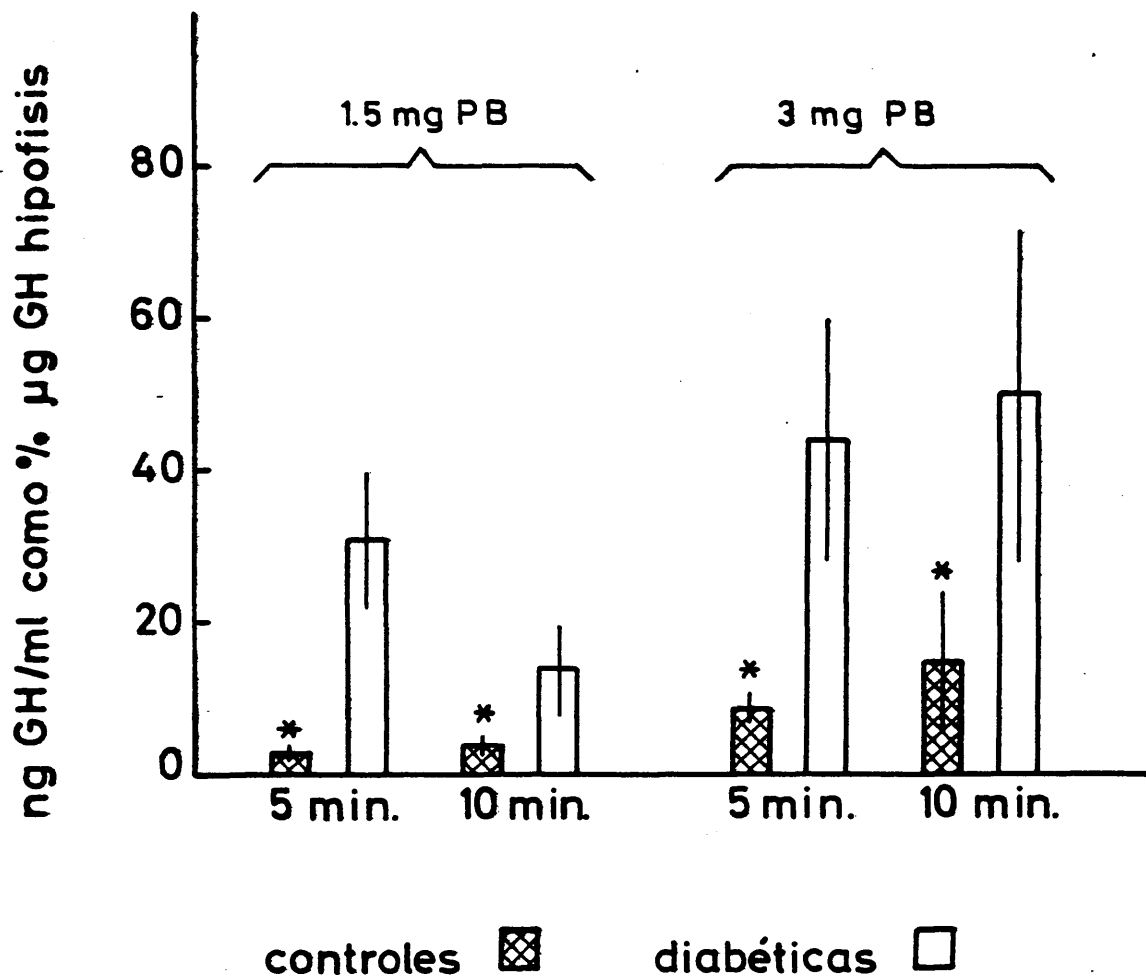


Fig. 30

Relación entre el contenido de GH en plasma e hipofisis en ratas controles y diabéticas inyectadas con pentobarbital



Medias \pm D.S.

*: $p < 0.001$

Fig. 31

en la concentración circulante de GH a los 10' aunque sin embargo, dicho nivel sigue siendo superior al observado en la muestra a tiempo cero. En la misma figura 30 panel inferior izquierdo se recoge el incremento en los niveles circulantes de GH como porcentaje del valor basal siguiendo el mismo criterio anteriormente descrito. De nuevo se confirma la mayor respuesta existente a los 5 minutos en los animales diabéticos, siendo de nuevo las diferencias estadísticamente significativas, por el contrario y como en el caso anterior dichas diferencias no se observaron a los 10 minutos. Valorado el contenido hipofisario de GH de nuevo se confirmó la reducción existente en la diabetes. Por último, en la figura 31 se resumen los resultados obtenidos en ambos experimentos, expresando los niveles circulantes de GH en función de su respectivo contenido hipofisario. Puede observarse que en relación a dicho contenido el aumento en la concentración circulante de GH fue en todos los casos y para cada una de las dosis muy superior en los diabéticos dado su reducido contenido hipofisario, observándose además una estrecha relación entre dosis empleada y aumento en la concentración plasmática de hormona de crecimiento.

I. SINTESIS DE GH EN HIPOFISIS INCUBADAS IN VITRO

En los experimentos anteriormente descritos hemos observado consistentemente que las hipófisis de las ratas diabéticas presentan un contenido reducido de hormona de crecimiento en comparación con el tejido procedente de animales controles. En este experimento quisimos observar de una forma directa el efecto de la diabetes sobre la síntesis hipofisaria de hormona de crecimiento. Esto se realizó midiendo la incorporación de un aminoácido marcado a la GH en hipófisis precedentes de ratas controles o de animales diabéticos tratados con insulina o con salino.

Protocolo experimental

Se usó un total de 15 animales cuyo peso inicial fue aproximadamente de 98 gramos. Diez de ellos se hicieron diabéticos tras la administración de 7 mg de STZ por 100 gramos de peso corporal, después de un ayuno previo de 24 horas.

Dos días después de haber sido provocada la enfermedad, cinco de las ratas diabéticas recibieron una inyección diaria de 3 U de insulina, tratamiento que se prolongó durante 15 días. Los restantes animales diabéticos así como los controles fueron inyectados a diario con salino durante el mismo período de tiempo. Todos los animales estuvieron sometidos a las mismas condiciones ambientales permitiéndoles comer y beber "ad libitum". Al finalizar el período de experimentación, las ratas fueron sacrificadas por decapitación con guillotina. Una vez extraída la hipófisis, ésta fue colocada en un medio salino. Posteriormente cada adenohipófisis fue introducida en un vial que contenía 0.5 ml de Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) y 1.25 mg de glucosa. En estas condiciones, los viales se colocaron en un baño Dubnoff en agitación donde permanecieron durante 1 hora a 37° C. Durante el primer cuarto de hora se gasearon los viales con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂. Este período se consideró de preincubación y tiene por objeto eliminar las células rotas durante la manipulación del tejido. A continuación, tras descartar ese medio, se agregó a cada vial 0.5 ml de KRB que contenían 0.2 µCi de leucina -H³. Tras gasear durante 15 minutos con la misma mezcla que anteriormente se mencionó, los viales fueron incubados por espacio de 3 horas a 37 ° C en idénticas condiciones a las del período de preincubación. Finalizadas las 3 horas para eliminar el medio incluido en el tejido, las adenohipófisis fueron lavadas con salino y posteriormente homogenadas en 0.5 ml de

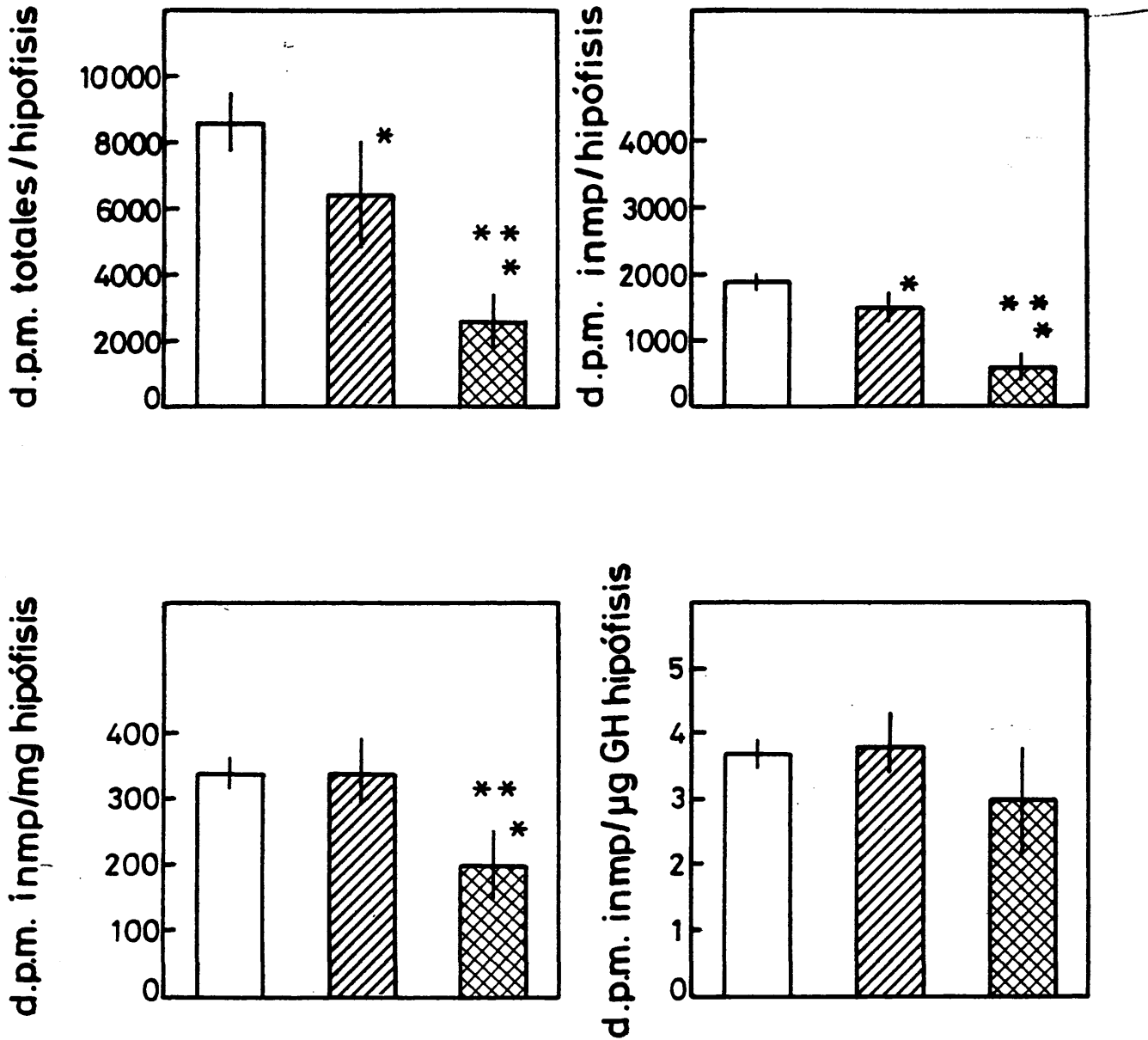
agua destilada, midiéndose la radioactividad en una alícuota tanto del medio de incubación como del homogenado. Con objeto de conocer la radioactividad incorporada a la molécula de GH, 0.1 ml de cada medio o de cada homogenado hipofisario se hicieron reaccionar con un exceso de anticuerpo anti-rat-GH y de 2º anticuerpo para conseguir una mayor precipitación del complejo antígeno-anticuerpo. El primer anticuerpo se utilizó a una dilución final 1/3000. Posteriormente los viales se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 60 minutos, determinándose la radioactividad del precipitado como % de la existente antes de realizar la inmunoprecipitación.

Resultados

Al finalizar el período de experimentación, los animales diabéticos presentaron una pérdida de peso corporal ($\bar{x} \pm D.S$) de -3.2 ± 9.2 g, mientras que las ratas controles en este tiempo incrementaron su peso en 118.3 ± 5.6 g. El tratamiento con insulina aunque no normalizó el peso de los animales diabéticos tuvo sin embargo un efecto positivo sobre él, ya que el incremento de peso en este grupo fue de 44.2 ± 6.0 g. Además, las ratas diabéticas + salino presentaron elevados niveles de glucosa en plasma (510 ± 78 mg/100 ml), mientras que los animales diabéticos + insulina, una hora después de la administración de la hormona, presentaron una glucosa plasmática de 152 ± 20 mg/100ml.

Como puede observarse en la Fig. 32, panel superior izquierdo, la radioactividad total incorporada fue significativamente más alta en las adenohipófisis procedentes de los controles que en cada uno de los otros dos grupos restantes ($F = 22.48$; d.f: 2.13; $p < 0.001$), siendo asimismo superior la radioactividad existente en hipófisis de animales diabéticos + insulina compa-

Síntesis hipofisaria de GH in vitro



$P < 0.001$

- * vs. C
- ** vs. D+I

□ Controles
 ▨ Diabéticas + 3 U.I.
 ▩ Diabéticas + salino

inmp = radioactividad inmunoprecipitable

Los valores son $\bar{x} \pm D.S.$

Fig. 32

rada con la observada en hipófisis procedentes de ratas diabéticas + salino ($p < 0.001$). Como consecuencia de la diferente incorporación de leucina $-H^3$ a la adenohipófisis de cada uno de los grupos, el medio de incubación correspondiente al tejido de los animales diabéticos + salino tenía una radioactividad superior (169813 ± 5864 d.p.m./0.5 ml) que la contenida en el medio de cada uno de los otros dos grupos (154433 ± 7018 y 153111 ± 11008 d.p.m./0.5 ml) entre los cuales no hubo diferencias. En el panel superior derecho de la misma figura, se representa la radioactividad inmunoprecipitable unida al anticuerpo específico de la GH en cada uno de los grupos. Este valor fue más alto en el tejido de las ratas controles que en cada uno de los dos grupos ($F = 73.92$; d.f: 2, 13; $p < 0.001$) siendo a su vez dicha radioactividad superior en las ratas diabéticas + insulina que la correspondiente al grupo de ratas diabéticas + salino ($p < 0.001$). No obstante el porcentaje de radioactividad inmunoprecipitable (radioactividad inmunoprecipitable en el tejido como % de la radioactividad total incorporada a él) fue de 21.6 ± 1.6 en controles y 22.1 ± 4.7 y 23.4 ± 2.1 en hipófisis procedentes de ratas diabéticas + insulina y diabéticas + salino respectivamente. Como era de esperar la radioactividad inmunoprecipitable del medio fue muy pequeña y del orden de 3.77 ± 0.53 % en controles, 4.28 ± 0.07 para diabéticas + insulina y 4.87 ± 0.14 % en los animales diabéticos + salino. Este último valor fue significativamente superior respecto a los dos grupos restantes ($F = 10.09$; d.f 2,13; $p < 0.001$). Este aumento de la radioactividad inmunoprecipitable del medio correspondiente a las ratas diabéticas + salino, no justifica la menor incorporación de leucina $-H^3$ a la molécula de GH encontrada en este grupo respecto a los controles o diabéticos + insulina.

Cuando la radioactividad inmunoprecipitable del tejido se

calcula en relación al peso hipofisario de cada uno de los grupos (Fig. 32, panel inferior izquierdo), de nuevo se evidencia una menor incorporación de leucina - H^3 a GH en el tejido de los animales diabéticos + salino en comparación con los otros grupos, entre cuyos valores medios no hubo diferencia. Sin embargo, cuando la leucina - H^3 incorporada a GH se relaciona con el contenido de GH en glándula se halla una relación muy semejante en los tres grupos experimentales. Ello queda justificado por el diferente contenido de GH en glándula de cada uno de los grupos, 352 ± 14 para controles, 350 ± 27 en diabéticas + insulina y 189.9 ± 32.6 $\mu\text{g}/\text{hipófisis}$ en diabéticas + salino (los valores son medias \pm D.S).

IV. DISCUSSION
=====

A. VARIACIONES DIURNAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA E HIPOFISIS EN RATAS

Los resultados del experimento en el que se determinó la concentración de GH en plasma, así como el contenido de la hormona en hipófisis, en grupos de ratas sacrificados en distintos momentos de los períodos de luz y oscuridad del día, ponen de manifiesto la existencia de una gran fluctuación de estas variables a lo largo de las 24 hr del día en ratas machos adultas. (Fig. 8).

El nivel de GH en plasma en muestras tomadas por decapitación de los animales, tuvo valores bajos desde las 3:00 hasta las 6:00 hr, y se elevó posteriormente presentando niveles prácticamente constantes entre las 9:00 y 12:00 hr. Posteriormente sufre un descenso al cual corresponden los valores obtenidos entre las 13:00 y las 18:00 hr, seguidamente se observa una nueva elevación, detectándose los valores más altos de GH durante el día a las 21:00 hr. Se observan por tanto dos tiempos de máxima secreción de GH, uno durante el período de luz y el otro durante el de oscuridad.

El patrón de secreción de GH en ratas machos observado en este estudio no es enteramente coincidente al obtenido por Tannenbaum y cols (1976). Estos autores detectan 6 ó 7 picos de brotes de secreción a lo largo del día, que presentan una periodicidad de 3:30 hr, los cuales alcanzan valores superiores a 200 ng/ml. La diferencia en el número de picos observado en nuestro estudio y en el de los citados autores, puede deberse a la diferencia existente en la frecuencia con que se han tomado las muestras en cada uno de los estudios. Tannesbaum y cols. determinaron la concentración de GH en plasma en muestras toma-

das cada 15 minutos, y nosotros con una periodicidad de 1:30-3:00 hr, lo cual puede hacer que hallamos perdido determinados impulsos de la secreción hormonal.

En cuanto a la diferencia en los valores de GH en plasma entre ambos trabajos puede deberse principalmente a dos causas. Primero a la diferencia de peso corporal de las ratas usadas en cada uno de los estudios, mientras nuestros animales presentaban un peso medio de alrededor de 200 gr, los de Tannenbaum y cols eran mucho más grandes, pesando entre 300 y 400 gr. Existe un segundo factor que posiblemente explique la diferencia de la concentración de GH en plasma entre ambos trabajos. En nuestro estudio cada una de las muestras de sangre se obtuvo por decapitación de un animal, mientras que en el trabajo citado, realizaron sucesivas tomas de sangre, por punción orbital, en un mismo animal, o sea a cada animal se le sacó sangre cada 15 minutos a lo largo de las 24 hr del día. Puesto que el volumen sanguíneo es alrededor del 8 % del peso corporal, no cabe duda que la toma de repetidas muestras de sangre de un mismo animal ha debido de inducir un cambio homeostático, el cual puede haber sido responsable de los valores tan altos de GH en plasma observado por estos autores. Análogas diferencias en la concentración de GH en plasma se observa en el ratón, las cuales, Sinha y cols. (1977) concluyen que se deben a que la toma de sangre sea por decapitación o en muestras seriadas procedentes del mismo animal. Estos resultados enfatizan la necesidad de tomar suficientes precauciones en el diseño experimental, en el que el procedimiento mismo pueda alterar profundamente el patrón natural de la secreción de una hormona. Los resultados sobre el perfil de secreción de GH a lo largo del día en ratas machos adultas son conflictivos (Takahashi y cols. 1971, Dunn y cols. 1974, Tannenbaum y Martin 1976). Diferencias en edad, peso corporal, manejo de los animales, procedimiento de la toma de muestra y otras variables

podrían explicar las diferencias en el perfil natural de GH a lo largo del día, encontrada por los distintos autores.

En el contenido de GH en hipófisis se evidencia asimismo cambios a lo largo del día. La diferencia de GH en hipófisis en ratas sacrificadas a distintos tiempos a lo largo del día parece que no puede estar justificada por los brotes de secreción de la hormona, ya que la magnitud de las variaciones de la hormona en plasma (ng/ml) son relativamente pequeñas, y no debería alterar perceptiblemente el contenido de la hormona en la glándula ($\mu\text{g}/\text{hipófisis}$). Pero dado la estrecha correlación existente entre la concentración de GH en plasma y su contenido en hipófisis, se sugiere que muy posiblemente cada período de máxima secreción hormonal pueda ser coincidente con el de máxima capacidad de síntesis de la hormona por las células somatotropas adenohipofisarias.

La observación de los valores de GH en plasma nos decidió a sacrificar a los animales de los experimentos posteriores entre las 9:00 y las 11:00 hr. Este tiempo presentaba las siguientes ventajas: primero, en este período la GH en plasma presenta valores más constantes; segundo, los valores de GH en este intervalo son altos, situación en la que es más fácil detectar diferencias en este patrón entre distintos grupos experimentales, y por último, presenta la ventaja de disponer cómodamente del tiempo necesario para la toma de muestra de los distintos tejidos, así como de su preparación y almacenamiento.

B. EFECTOS DE LA DIABETES EN RATAS MACHOS

Características de la diabetes inducida por streptozotocin

El STZ es un derivado N-nitroso de la glucosamina cuyo efeco

to diabetógeno se atribuyó en un principio a que producía degranulación en las células β del páncreas (Arison y cols. 1967, Rakieten y cols. 1963), y posteriormente se ha demostrado que produce una necrosis selectiva en dichas células (Junod y cols. 1967, Chang y Schneider 1971). Karunanayake y cols. (1976) han estudiado el metabolismo del STZ, usando el compuesto marcado con C^{14} en tres posiciones diferentes, en ratas con cánulas implantadas en la uretra y en el conducto biliar. La orina recogida en la primera hora contenía la proporción más alta de radioactividad, que varió entre un 34 y 40 % según la posición del C^{14} , y en las primeras 6 h el porcentaje de radioactividad excretado en orina fue del 70 %, mientras que en bilis fue sólo del 3 %.

En nuestros experimentos, los animales inyectados con 7 mg de STZ por 100 g de peso corporal presentaron todas las características del síndrome diabético. Tanto el consumo de comida como el de bebida de las ratas diabéticas fue muy superior al de los controles (32 ± 3 g vs 23 ± 1.9 g, $p < 0.01$; 60 ml vs. 12 ml/24 h, $p < 0.001$). El volumen de orina en este mismo período en las ratas diabéticas fue 6 veces superior al de los controles, y la excreción de glucosa en orina en ellos presentó una relación estrecha con el grado de poliuria, existiendo un alto grado de correlación entre ambas variables ($r = 0.883$, $n = 23$, $p < 0.001$). La glucosa plasmática presenta valores muy elevados en todos los animales inyectados con STZ.

Sin embargo cuando intentamos establecer un diferente grado de diabetes por la administración de 6 ó 7.5 mg de STZ por 100 g de peso corporal, encontramos que ni la glucosa en plasma ni el crecimiento permiten establecer una diferencia en la intensidad de la diabetes inducida, ya que los valores de los dos parámetros en cada uno de los grupos son muy parecidos. Esto

quizá pueda explicarse por los resultados de Junod y cols. (1969). Estos autores exploraron la interrelación de la dosis de STZ administrada en ratas y la respuesta diabetogénica medida por el volumen de orina, la excreción de glucosa por esta vía, hiperglucemia, crecimiento y la concentración de insulina inmunoreactiva en plasma y su contenido en páncreas. Encontraron que las ratas inyectadas con 4.5, 5.5 y 6.5 mg de STZ/100 g de peso presentaban una concentración de glucosa plasmática y niveles de insulina circulantes muy semejantes entre sí, mientras que el contenido de insulina en páncreas desciende progresivamente al aumentar la dosis de STZ administrada. El crecimiento corporal está igualmente inhibido en los animales que recibían 5.5 ó 6.5 mg de STZ, mientras que el de las ratas con 4.5 mg, aunque más bajo que el de las ratas normales, era más alto que el de los otros grupos. Estos autores llegan a la conclusión que el mejor índice para medir el grado de diabetes es el contenido de insulina en páncreas.

A pesar de que cada una de estas alteraciones se puede evidenciar en cada animal diabético, sin embargo, la intensidad de ellas en cada uno de los grupos experimentales, y aún en cada uno de los individuos pertenecientes a un mismo grupo, aunque muy similares no son cuantitativamente idénticas. Ello queda reflejado en la gran variabilidad que presentan los valores de glucosa en plasma, poliuria, glucosuria y crecimiento en un mismo grupo experimental. Pensamos que la gran variabilidad de los distintos índices diabetogénos en los distintos animales que componen un mismo grupo pueden estar originadas por varias causas. Primero, el estado de postabsorción puede haber sido diferente en cada uno de los animales que han tenido libre acceso a la comida durante el período previo al tiempo de ayuno. En algunos, el ayuno puede haber sido realmente el del tiempo fijado

en cada experimento, pero en otros podría ser mucho más prolongado, lo cual podría afectar y diferenciar la absorción del agente diabético en cada uno de los animales. Pero además, las diferencias cuantitativas en el grado de diabetes inducida, puede quizá explicarse en parte por el hecho de que el STZ se administra con arreglo al peso corporal del animal. Este criterio sería correcto en el caso de que el tamaño del páncreas, y sobre todo el número de sus islotes creciera en proporción directa al peso del animal. Es decir, que una rata de 300 g de peso tuviera un páncreas cuyo contenido en células β fuese 3 veces el existente en la glándula de un animal de 100 g. Nosotros no hemos encontrado en la literatura datos que nos orienten en este sentido, pero por nuestra experiencia, hemos observado que tras la administración de 7 mg ó 10.5 mg de STZ a ratas de 100 ó 150 g de peso, respectivamente, murieron el 20 ó 25 % de las ratas durante un período de diabetes de 15 ó 20 días. Sin embargo, cuando siguiendo igual criterio hemos querido hacer diabéticos a animales de 300 g por la administración de 21 mg de STZ, el 50 % de ellos murieron dentro de las primeras 48 h, encontrándose un alto contenido de grasa en hígado y presentando el plasma un aspecto oleaginoso muy intenso. Estos hechos parecen indicar que la diabetes inducida en los animales de más peso había sido más intensa que la de los más jóvenes, lo que sugiere que el tamaño del páncreas y sobre todo el contenido de sus islotes no sean enteramente paralelos al peso corporal.

El tratamiento de las ratas diabéticas con insulina mejoró cada una de las alteraciones inducidas por la diabetes. Las ratas diabéticas tratadas con 1.0, 2.0 ó 3.0 U de insulina presentaron una disminución progresiva del volumen de orina, la excreción de glucosa en orina y de los niveles plasmáticos de glucosa, sin embargo ninguno de estos parámetros se normalizaron ni

aún en los animales tratados con la dosis más alta de la hormona. Por el contrario, el incremento de peso corporal que fue negativo en los animales diabéticos, el tratamiento con 1.0 U de insulina por 100 g de peso y día tuvo un efecto positivo aunque no lo normalizó, hecho que se evidenció sólo en los animales tratados con 3 U de la hormona.

Efectos de la diabetes sobre el crecimiento y el contenido de GH en plasma e hipófisis.

Es sabido desde hace mucho tiempo de la diabetes induce grandes alteraciones en otros componentes del sistema endocrino. En efecto, está bien demostrado que la falta de niveles normales de insulina o las alteraciones metabólicas que ello lleva consigo induce una hipofunción de los sistemas hipófisis-gónadas (Houssay y Foglia, 1946) e hipófisis-tiroides (Jolin y cols., 1978) mientras produce una hiperfunción en el sistema hipófisis adrenal. La causa principal de la hipofunción de cada uno de dos sistemas citados parece estar a nivel hipofisario, aunque ello no descarta la existencia de alteraciones a nivel hipotalámico o de las glándulas dianas de las gonadotrofinas y de la hormona tirotrópica. En efecto, las ratas diabéticas por alloxan o STZ presentan una disminución de la síntesis y secreción de las gonadotrofinas hipofisarias (Houssay y Foglia, 1946) y de la hormona tirotrópica (Pericás y Jolin, 1977, Jolin y Gonzalez, 1978), habiéndose demostrado además que el contenido de TRH hipotalámico es más bajo en el animal con niveles deficientes de insulina que en ratas normales (Montoya y cols., 1978). En contraposición a estos efectos de la diabetes, el sistema hipófisis-adrenal está estimulado en esta situación. L'Age y cols. (1974) han demostrado que las ratas diabéticas por la administración de alloxan presentan una alteración del ritmo circa-

diano de corticoides, lo que se evidencia por un aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona durante la mañana, tiempo en el que se observan los niveles más bajos en situación normal, y en respuesta a un stress de tipo medio o intenso o a la administración de ACTH, los animales diabéticos presentan una secreción de corticosterona mucho más alta de la de los animales controles. Estos resultados, parecen indicar que las glándulas adrenales del animal diabético tienen una gran sensibilidad al estímulo ejercido por su hormona trófica. Pero del hecho que las ratas diabéticas requieren dosis más altas de dexametasona para disminuir o normalizar la secreción de ACTH, medida por su efecto sobre la secreción de corticoides en respuesta al stress, hace pensar que la diabetes altera las características de los componentes ACTH-corticoides, elevando el "set-point" del mecanismo de feed-back de este sistema.

Además de estas alteraciones, la diabetes afecta profundamente el crecimiento y desarrollo. Las ratas controles en fase de crecimiento presentan un aumento progresivo del peso corporal al aumentar la edad, existiendo una correlación positiva entre ambos parámetros ($p < 0.001$). Sin embargo, las ratas diabéticas por la administración de 7 mg de STZ por 100 g de peso, presentan un peso corporal medio que se mantiene prácticamente invariable en los distintos intervalos después de iniciarse la diabetes, incluidos en este estudio (Fig. 9). Según Steiner, (1966) en ratas las variaciones de peso corporal constituyen un buen índice del grado de diabetes inducida. Así, mientras que el incremento de peso en un animal normal es de alrededor de 3 gr por día, el de una rata con una diabetes de tipo medio es de 0.5 gr, produciéndose una inhibición del crecimiento progresivamente más profunda en los animales con una diabetes de tipo medio o intensa.

Paralelamente a las diferencias existentes entre el peso corporal de las ratas diabéticas y controles en cada uno de los períodos incluidos en este estudio, el contenido de GH en hipófisis en las ratas diabéticas es significativamente más bajo que el de los respectivos grupos controles (Fig. 10). En los animales controles se observa un aumento progresivo del contenido de GH en hipófisis al aumentar la edad del animal, mientras que las ratas diabéticas presentan una disminución progresiva en dicho contenido al aumentar el tiempo de diabetes, de forma que el contenido hipofisario en GH en las ratas sacrificadas 27 días después de la administración del STZ fue aproximadamente un 10 % del correspondiente a su grupo control. A un tiempo tan corto como 2 días después de iniciarse el estado diabético, el contenido hipofisario en hormona de crecimiento de las ratas diabéticas respecto al de los controles presenta un nivel de significatividad del 5 %. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lawrence, Contopoulos y Simpson (1958). Estos autores, valoraron la GH por bioensayo y encontraron que el contenido de GH en hipófisis en las ratas diabéticas 7 semanas después de la administración de alloxan era 16 veces más baja que el valor encontrado en los controles.

Contrariamente a lo que cabría esperar de las diferencias existentes en el peso corporal y en el contenido de GH en hipófisis entre los animales controles y diabéticos, estos últimos presentan una concentración de GH en plasma muy similar a la de los controles (Fig. 10), sin que en ninguno de los experimentos realizados a lo largo de tres años, se haya podido poner de manifiesto diferencias significativas en el valor de este parámetro entre ratas diabéticas y controles. Nuestros resultados obtenidos por radioinmunoensayo no concuerdan con los obtenidos por bioensayo por Lawrence y cols. (1958). Estos autores encuentran que la potencia del plasma para inducir un aumento del peso cor

poral de ratas hipofisectomizadas es mucho más intensa cuando el plasma de la rata donante procedía de animales normales que cuando era de ratas diabéticas. Por otra parte, la anchura del cartílago proximal de la tibia del animal hipofisectomizado ($170 \pm 3 \mu$, media \pm es), presenta un aumento significativo en aquellos animales inyectados con plasma procedente de ratas controles ($210 \pm 9 \mu$), mientras que el tratamiento de las ratas hipofisectomizadas con plasma procedente de ratas diabéticas no cambia significativamente el valor de este parámetro ($176 \pm 4 \mu$). Estos autores llegan a la conclusión de que la diabetes disminuye la actividad biológica del plasma para promover el crecimiento en el animal hipofisectomizado, así como para estimular la anchura del cartílago de la tibia. De nuestros resultados y de los obtenidos por Lawrence y cols. parece deducirse que los valores de la concentración de GH en plasma obtenidos por RIA o por bioensayo no son coincidentes. No cabe duda que ambos ensayos son diferentes, el bioensayo mide la actividad biológica de la hormona mientras que el radioinmunoensayo mide su capacidad inmunológica.

Además de la valoración por RIA de la hormona de crecimiento en hipófisis, se determinó mediante geles de poliacrilamida la banda correspondiente a la GH, para lo cual se corrió un pool de homogenados hipofisarios de cada uno de los grupos experimentales. Como puede observarse (Figs. 11 y 12) a los 5 días de haber inducido la enfermedad ya se observan diferencias entre controles y diabéticos en la banda correspondiente a la hormona de crecimiento, diferencias que se van acentuando a medida que transcurre la enfermedad. Las diferencias entre ambos grupos no son sólo cuantitativas sino también cualitativas, ya que en controles el pico correspondiente a la GH está bien definido, mientras que en diabéticas posee una deformación debido a la aparición

de un componente de mayor movilidad electroforética que se acentúa a medida que transcurre el tiempo después de la inyección del STZ siendo muy patente en los grupos diabéticos de 15 y 27 días. Posiblemente dicho componente sea el reflejo de una heterogeneidad hormonal existente a nivel hipofisario (Frohman y cols., 1972)

C. EFECTOS COMPARATIVOS DEL HIPOTIROIDISMO INDUCIDO POR PERCLO-RATO (ClO_4^-), PROPILTIOURACILO (PTU) O TIROIDECTOMIA Y LA DIABETES SOBRE EL CRECIMIENTO

Las anomalías existentes entre los resultados del contenido de GH en hipófisis y de la concentración de la hormona en plasma, así como entre los resultados de GH en plasma obtenidos por bioensayo o por RIA, nos llevó a realizar un estudio comparativo del efecto de la diabetes y del hipotiroidismo sobre la secreción hipofisaria de GH. El hipotiroidismo es una situación donde está bien establecida que la falta intensa de hormonas tiroideas circulantes disminuye el contenido de GH en hipófisis así como los niveles plasmáticos de la hormona medidos por RIA (Daughaday y cols., 1968, Peake y cols., 1973)

Como era de esperar el hipotiroidismo inducido por tiroidec_otomía o por el tratamiento con PTU o ClO_4K , indujo un retraso del crecimiento, el cual fue muy similar en cada uno de los tres grupos. Consecuentemente a la inhibición en la síntesis y secreción de hormonas tiroideas inducida por cada uno de estos tratamientos se observa un aumento en la secreción hipofisaria de TSH en cada uno de los grupos de ratas hipotiroideas, cuyos animales presentan una concentración plasmática de TSH significativamente más alta que la encontrada en las ratas controles ($p < 0.001$), no existiendo diferencias significativas en el va-

lor de este parámetro entre los distintos grupos de animales hipotiroideos, lo cual lleva a la conclusión que el hipotiroidismo desarrollado por cada uno de los tres tratamientos es del mismo grado.

La comparación del peso final, así como de las variaciones del peso correspondientes a los 17 días del período de experimentación de cada uno de los grupos de ratas hipotiroideas y de los animales diabéticos con respecto a los valores de las ratas controles alimentadas ad libitum, pone claramente de manifiesto que tanto el hipotiroidismo como la diabetes afectan profundamente el crecimiento. Sin embargo, las ratas hipotiroideas presentan un crecimiento lento pero positivo a lo largo del período de experimentación, en cambio, los animales diabéticos sufren una disminución del peso corporal. Estos resultados nos llevan a concluir que la diabetes afecta al crecimiento de una forma más intensa que el hipotiroidismo (Fig. 13).

La falta de niveles normales de hormonas tiroideas circulantes así como de insulina reduce intensamente el contenido de GH en hipófisis. Pero puesto que el valor de este parámetro es significativamente más bajo en las ratas diabéticas que en los animales tiroidectomizados o en los tratados con cada uno de los antitiroideos ($p < 0.05$), ello nos lleva a concluir que en nuestras condiciones experimentales el grado de diabetes inducido afecta el contenido de GH en hipófisis de una forma más intensa que el hipotiroidismo.

Sin embargo, la comparación de la relación del contenido de GH en hipófisis y la concentración plasmática de la hormona de los animales diabéticos y de los hipotiroideos, sugiere la existencia de grandes diferencias entre estas dos situaciones

(Fig. 13). En el hipotiroidismo, una reducción del contenido de GH en hipófisis disminuye la secreción hipofisaria de la hormona, lo que está apoyado por el hecho de que las ratas hipotiroidicas mantienen niveles bajos de GH circulantes (Eisenberg y cols., 1972, Hervás y cols., 1975, Montes y cols., 1977). Sin embargo, en la diabetes la relación entre el contenido de GH en hipófisis y los niveles plasmáticos de la hormona presentan una relación distinta a la observada en el hipotiroidismo. Los animales diabéticos, con un pool bajo de GH en hipófisis, son capaces de mantener niveles aparentemente normales de GH en plasma, lo que parece indicar que el proceso de secreción está muy estimulado en este síndrome.

Por otra parte, puesto que la diabetes es una situación que ha sido calificada por Claude Bernard (1849) como de hambre en medio de la abundancia, es por lo que en este experimento hemos comparado los efectos de la diabetes sobre el contenido de GH en hipófisis y los niveles de la hormona en plasma con los de las ratas sometidas a una alimentación reducida de forma que su crecimiento fuese lo más parecido posible al de las ratas diabéticas. Esto no se consiguió completamente, puesto que si bien estos animales mantenían un crecimiento mucho más reducido que el de los controles alimentados ad libitum, este era sin embargo superior al de las ratas diabéticas. No obstante, la comparación de los resultados de ambos grupos nos llevan a la conclusión de que el mantener a un animal normal con una cantidad de dieta que era aproximadamente $1/3$ de la consumida por un control, aunque disminuye de forma significativa el contenido de GH en hipófisis respecto al valor de los controles, lo hace de una forma mucho menos intensa que la inducida por la falta de niveles normales de insulina. Por otra parte, no se detectan diferencias entre los niveles de GH en plasma de ambos grupos.

D. EFECTOS DE LA INSULINA EN RATAS DIABETICAS

Los resultados presentados en los dos experimentos previamente descritos, demuestran claramente que la diabetes experimental inducida por streptozotocin en ratas, cuando éstas están en fase de crecimiento, induce una parada intensa en el crecimiento así como del contenido hipofisario de GH. Como el STZ, agente empleado para inducir la diabetes, parece tener efectos tóxicos a nivel renal (Sadof, 1970; Loftus y cols., 1974), y posiblemente a otros niveles, creímos de interés el estudiar los efectos de la administración de insulina sobre el crecimiento y el contenido de GH en hipófisis de las ratas diabéticas. Si el tratamiento de estos animales con insulina no mejora o corrige estas alteraciones, ello querría decir que ellas eran irreversibles, y que podían estar causadas en parte por la falta de niveles normales de insulina, pero no descartaría el que pudiesen estar inducidas directamente por el agente diabético. Si por el contrario, las alteraciones del crecimiento y del contenido de GH en hipófisis observadas en las ratas tratadas con STZ, se mejoraban o normalizaban por el tratamiento con insulina, ello querría decir que dichas alteraciones son el resultado de la falta de niveles normales de la hormona, o de las alteraciones metabólicas o endocrinas que ello lleva consigo.

Los resultados presentados en la Fig. 14, demuestran claramente que los animales diabéticos con salino presentan una poliuria muy acusada lo que va acompañado por una gran pérdida de glucosa por esta vía. La cantidad de glucosa excretada en 24 horas por las ratas diabéticas fue 35 veces superior al valor de este parámetro en los controles. El tratamiento con 1.0, 2.0 ó 3.0 U de insulina por 100 g de peso corporal y día durante 7 días indujo una disminución progresiva del volumen de orina así como de su contenido de glucosa, sin embargo, ninguno de estos

parámetros se normaliza ni aún por el tratamiento con la dosis más alta de la hormona. De acuerdo con estos resultados la concentración de glucosa desciende significativamente en cada uno de los grupos de ratas diabéticas tratadas con dosis progresivamente más altas de la hormona, sin que el valor de este parámetro llegue a normalizarse en ninguno de los grupos.

Por otra parte, los resultados presentados en la Tabla 2, ponen de manifiesto que los efectos contrapuestos de la diabetes sobre el peso del tiroides y de las adrenales se corrigen por la administración diaria de 2 ó 3 U de insulina, como lo demuestra la falta de significatividad entre el peso de estas glándulas de los grupos tratados con las referidas dosis de insulina y los de las ratas controles.

En este estudio, los animales diabéticos presentaron una gran pérdida de peso corporal, lo cual puede explicarse por la gran movilización de grasas así como del aumentado catabolismo proteico que tiene lugar en ellos. El catabolismo de las proteínas proporcionará al hígado los aminoácidos necesarios para que tenga lugar una gluconeogénesis aumentada, lo cual contribuirá a mantener los altos niveles de glucosa en plasma de estos animales (Fig. 14). El tratamiento con 1 U de insulina indujo un aumento significativo del peso corporal frente al valor del grupo de los animales diabéticos con salino ($p < 0.001$), hecho que se intensifica al aumentar la dosis de insulina administrada, presentando las ratas diabéticas con 3 U de insulina una velocidad de crecimiento análoga a la del grupo control.

Paralelamente a los cambios inducidos por la diabetes y por el tratamiento con insulina sobre el crecimiento, se observa una intensa disminución del contenido de GH en hipófisis en las ratas diabéticas y una recuperación hacia la normalización

del valor de este parámetro por el tratamiento con insulina. En efecto, las ratas diabéticas presentan una disminución significativa del contenido de GH en hipófisis respecto al valor del grupo control, tanto si la GH en hipófisis se expresa en μg por glándula como si se hace en μg por mg de tejido. El tratamiento con 1 U de insulina produjo un aumento significativo del contenido de GH en hipófisis respecto al valor de las ratas diabéticas con salino ($p < 0.001$), incrementándose el valor de este parámetro en los grupos de ratas diabéticas que recibían 2.0 y 3.0 U de la hormona. Sin embargo, ni aún con la dosis más alta de la hormona se consigue una normalización del valor de este parámetro (Fig. 15).

Nuevamente se evidencia en este experimento, que a pesar de las diferencias entre el contenido de GH en hipófisis de los animales diabéticos y el de los controles, o el de cada uno de los grupos de ratas diabéticas tratadas con distintas dosis de insulina, los animales diabéticos mantienen unos niveles de GH circulantes análogos al de las ratas controles o al de cada uno de los grupos tratados con dosis crecientes de insulina (Fig. 15). Esta última observación, señala el papel que posee la insulina sobre el crecimiento, ya que del hecho de que los animales diabéticos tratados con insulina y los no tratados mantengan prácticamente los mismos niveles circulantes de GH, existiendo sin embargo grandes diferencias en el crecimiento a favor de los que recibieron insulina, es indicativo del papel que esta hormona juega sobre el crecimiento y sobre el anabolismo en general.

Hemos de tener en cuenta que la acción última de la GH sobre el crecimiento se halla mediada a través de la (s) somatomedina (s) (el llamado primitivamente factor de sulfatación por Salmon Daughaday), por lo tanto unos niveles normales o elevados de GH en plasma no son siempre origen de un crecimiento normal o acelerado. Existen situaciones como el enanismo tipo Laron,

donde a pesar de los altos niveles circulantes de GH existe un notable retraso en el crecimiento (Daughaday y cols., 1969), posteriormente se ha sabido que dichos pacientes mantienen una reducida actividad somatomedina en suero (Daughaday 1975, Daughaday y cols., 1969, Kostrup y cols., 1975). Aunque en un principio se postuló que el fallo residía en la falta de actividad biológica en la molécula de GH (Laron y cols., 1966), sin embargo, pudo comprobarse que la actividad somatomedina medible en plasma de dichos pacientes tampoco respondía a la administración de GH exógena (Laron y cols., 1971). Se concluyó que en dichos pacientes el retraso en el crecimiento residiría en la carencia de receptores para hormona de crecimiento o en un defecto en la generación de somatomedina (Daughaday y cols., 1972). El enanismo tipo Laron representa un caso típico de correlación negativa entre GH y crecimiento. Una situación semejante de baja actividad somatomedina a pesar de la elevada concentración plasmática de GH, es la malnutrición infantil (Van den Brade 1975, Schimpff y cols., 1974, Grant y cols., 1973, Pimstone y cols., 1966), sin embargo, en esta situación la causa reside en la presencia en plasma de un inhibidor de la somatomedina que impide la incorporación de sulfato al cartílago. Con la realimentación aumenta la actividad somatomedina medible en plasma y disminuyen los niveles circulantes de GH.

Aunque en un principio se creyó que la actividad somatomedina presente en suero se hallaba únicamente bajo el control de GH, hoy se sabe que hormonas como la insulina ejercen su control sobre el crecimiento directa e indirectamente a través de la generación de somatomedina, ya que en hígado perfundido, la adición al medio de insulina incrementa la actividad somatomedina presente (Daughaday y cols., 1975). Únicamente la insulina en dosis farmacológicas es capaz de estimular de modo directo la incor

poración de sulfato al cartílago (Salmon 1970).

Volviendo a nuestros datos, podemos postular que a pesar de no existir diferencias en los niveles circulantes de GH entre los animales diabéticos que recibieron insulina y los que recibieron únicamente salino, sin embargo, el hecho de que los primeros mostraran un crecimiento proporcional a la dosis de insulina empleada es atribuible a dos factores: primero, aumento de todos los procesos anabólicos y en concreto del anabolismo proteico con el consiguiente incremento en la síntesis hipofisaria de GH (Fig. 15) y segundo, como consecuencia del tratamiento con insulina es posible por los datos presentes en la literatura que la actividad somatomedina presente en plasma halla también aumentado con su consiguiente acción sobre el crecimiento.

E. DETERMINACION DEL PARALELISMO EXISTENTE ENTRE DILUCIONES SUCESIVAS DEL PLASMA DE RATA CONTROL Y DIABETICA Y DE UNA SOLUCION DE r-GH PURIFICADA DE RATA.

Los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos en los que se estudió los efectos de la diabetes sobre la función hipofisaria, ponen claramente de manifiesto que las ratas diabéticas por STZ presentan una reducción del contenido de GH en hipófisis, hecho que se intensifica al aumentar el período de diabetes (Fig. 10). El descenso en el contenido de GH en la hipófisis de las ratas diabéticas se evidencia tanto si el valor de este parámetro se determina por RIA como si su cuantificación se realiza por densitometría de los geles de poliacrilamida en los que la separación de la GH se realizó por electroforesis de los homogenados hipofisarios. Además, los resultados obtenidos por ambas técnicas coinciden con los datos obtenidos por bioensayo, ya que Lawrence y cols., (1958) encontraron que las ratas

diabéticas por alloxan a las 7 semanas después de la administración del agente diabetógeno, presentaban un contenido de GH bioensayable 16 veces más bajo que el de los animales controles.

Por otra parte, las ratas diabéticas por STZ a pesar del bajo contenido de GH en hipófisis presentan una concentración plasmática de GH radioinmunoensayable dentro del rango de los valores normales. Incluso a los 27 días después de la administración del STZ, cuando el contenido de GH en hipófisis de las ratas diabéticas es aproximadamente 20 veces más bajo que el de los controles, no se encuentran diferencias significativas entre los niveles de GH en plasma de ambos grupos de animales. De estos hechos, se deduce que la diabetes experimental afecta intensamente el contenido de GH en hipófisis sin alterar los niveles circulantes de la hormona, a diferencia de lo que ocurre en el hipotiroidismo, donde junto a un descenso del contenido hipofisario de la hormona se evidencia una caída de su concentración plasmática. Pero además, existe una segunda aparente anomalía. Mientras que en nuestras condiciones experimentales, los niveles circulantes de GH radioinmunoensayable de las ratas diabéticas por STZ son aparentemente normales, los de los animales diabéticos por alloxan determinados por bioensayo, son significativamente más bajos que los de las ratas controles (Lawrence y cols., 1958).

La falta de concordancia entre los niveles de GH en plasma de las ratas diabéticas por STZ o alloxan, pudiera deberse a la distinta forma de inducir la diabetes, aunque parece más probable que ello se deba a la forma en que se ha valorado la hormona en cada uno de los grupos. En las ratas diabéticas por alloxan se determinó la actividad biológica de la hormona, y en las diabéticas por STZ la actividad inmunológica, y es posible

que ambas actividades no vayan en paralelo.

Ante estos hechos, el que las ratas diabéticas con un contenido bajo de GH en hipófisis mantengan niveles aparentemente normales de la hormona en plasma, junto con la falta de concordancia en los valores de la hormona en plasma obtenidos por bioensayo o por RIA, nos planteó la cuestión de si existiría en el plasma de las ratas diabéticas algún factor(s) que pudiese modificar la unión de la hormona a su anticuerpo, con lo cual las determinaciones de GH en plasma por RIA daría valores falsamente altos. Una primera aproximación al estudio de este problema fue estudiar si existía o no similitud inmunológica entre la GH purificada que constituye la curva standard y la de la sustancia que estamos analizando en el plasma cuya concentración queremos determinar. La concentración de la hormona en plasma, hipófisis o en otros fluidos se determina comparando el desplazamiento producido por la GH contenida en las muestras con el que produce la GH purificada de las standards sobre la unión de la hormona marcada a su anticuerpo específico. Para establecer esta comparación se requiere que la GH de las standard y la de las muestras reaccionen idénticamente con el anticuerpo, y que bajo las condiciones del ensayo ninguna otra sustancia presente en la muestra pueda afectar la unión de la GH-I¹²⁵ al anticuerpo, o su desplazamiento por la hormona endógena. La existencia en las muestras de algún factor(s) que de alguna forma influye en cada una de estas reacciones, puede afectar los resultados dando valores aparentemente altos o aparentemente bajos.

En la práctica, la comparación inmunológica de la GH que forma las standards y la de las muestras, se realiza observando si existe paralelismo en el desplazamiento de la GH-I¹²⁵ unida a su anticuerpo por diluciones seriadas de la GH purificada y

en nuestro caso del plasma procedente de ratas controles y diabéticas. Los resultados presentados en la Fig. 16, ponen de manifiesto que existe un claro paralelismo entre los puntos de la curva standard y las diluciones seriadas del plasma de ambos tipos de animales. Se obtuvo una comparación más objetiva del paralelismo existente entre las tres curvas presentadas en la citada figura mediante la comparación estadística de las pendientes ($b \pm s_b$) de cada una de las curvas, después de transformar los datos en su forma "logit" y realizar un análisis de regresión con los puntos de cada una de ellas. El valor de $b \pm s_b$ de la curva standard fue de -2.91 ± 0.15 , mientras que el valor de este parámetro para las curvas del plasma control o diabético fueron -2.92 ± 0.23 y -2.91 ± 0.08 , respectivamente. La falta de significatividad entre las pendientes de cada una de las curvas ($p > 0.05$) pone de manifiesto que son paralelas entre sí.

Por otra parte, puede observarse que mientras las diluciones sucesivas del plasma procedente de la rata control presenta paralelismo con los puntos de la curva standard de GH de más baja concentración, el plasma del animal diabético la presenta con los puntos de la curva patrón que corresponden a soluciones más concentradas, lo que indica que el plasma de la rata diabética tiene una concentración más alta de GH que el control.

La existencia de paralelismo entre los puntos de la curva standard y las diluciones seriadas de la muestra, es una condición necesaria pero no suficiente para demostrar la similitud inmunológica de la r-GH purificada de las standards y de la sustancia, con capacidad para desplazar la r-GH-I¹²⁵ de su unión al anticuerpo, en el plasma de las ratas diabéticas. Si en estos plasmas existiera un factor(s) que por un mecanismo determinado interfiriera en la unión r-GH-I¹²⁵-anticuerpo, y al diluir seriadamente las muestras y consecuentemente la concentración del hipotético factor(s)

éste quedara en un rango de concentraciones en las cuales la interferencia fuese proporcional a la concentración, entonces la presencia de un factor de este tipo no cambiaría la forma de la curva, por lo que mediante la prueba de paralelismo no se podría poner de manifiesto su presencia. Solamente en el caso de que al diluir las muestras, y por tanto la concentración del factor de interferencia, éste quedara en un rango de concentraciones para las cuales la curva dosis-interferencia no fuese lineal, se podría evidenciar su presencia por este método.

Los resultados de la Fig. 16 sólo nos dice que existe paralelismo entre los puntos de la curva standard y las diluciones seriadas del plasma del animal diabético, pero ello no descarta la posible existencia en estas muestras de algún factor que esté interfiriendo en la unión de la hormona marcada al anticuerpo, lo cual podría explicar el que el plasma de las ratas diabéticas presenten valores aparentemente altos de GH circulante.

Puesto que el plasma de las ratas diabéticas tienen un alto contenido de componentes grasos, pensamos que estos podrían interferir en la valoración de GH por RIA. Sustancias como los ácidos grasos libres interfieren en el RIA de triiodotironina (T_3) dando valores falsamente altos de la hormona, debido a que compiten con el anticuerpo por la unión a la T_3 (Liewendahl y cols., 1976). Para verificar si la grasa del plasma de los animales diabéticos interfería en el RIA de GH, intentamos ver si el eliminar los componentes grasos de las muestras modificaba los valores de la hormona en plasma determinados por RIA. Para ello aplicamos dos métodos, bien liofilizar las muestras y tratarlas seguidamente con solventes orgánicos, o separar los componentes grasos mediante la centrifugación de las muestras a 105.000 g durante 18 horas. En ambos casos como control interno del método,

agregamos a los plasmas un pequeño volumen de r-GH-I¹²⁵, encontrando que en cada uno de los casos sólo era inmunoprecipitable un 50 ó 60 % de la radioactividad presente en las muestras.

Estos resultados, sugerían que en estos procesos la hormona endógena al igual que la marcada podría sufrir ciertas transformaciones que podían alterar su comportamiento en el RIA. De acuerdo con estos resultados, Bala y cols. (1970) han encontrado que el patrón cromatográfico en Sephadex G-100 de la GH inmunoensayable de un plasma fresco es distinto del patrón de ese mismo plasma después de ser liofilizado. La liofilización de las muestras favorece tanto la formación de moléculas de GH de peso molecular superior al de la forma monómera como el de otras formas de peso molecular más bajos que eluyen en la columna de Sephadex en fracciones más retrasadas que las correspondientes a la forma monómera de la hormona. Condliffe y Edelhoch (1968) encuentran que la GH bovina se inestabiliza durante el proceso de liofilización lo que le hace perder sus propiedades fluorescentes, lo cual va acompañado de una pérdida de la actividad hormonal. Al no disponer por el momento de un método que permita separar los componentes grasos del plasma sin dañar a las proteínas, nos desvió del estudio de este problema, el cual por su interés pensamos abordar en un futuro inmediato.

F. PATRON CROMATOGRAFICO DE LA GH EN PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DIABETICAS.

Son cada vez más frecuentes los datos en la literatura que demuestran la heterogenidad de las hormonas polipeptídicas, lo cual se evidencia por el hecho de encontrar la presencia de más de un pico de hormona inmunoreactiva al fraccionar el plasma u homogenados hipofisarios en gel de Sephadex. Tal heterogenidad se ha descrito para la insulina (Roth y cols., 1968, Rubenstein

y cols., 1968), la hormona paratiroidea (Berson y Yalow, 1971), la gastrina (Yalow y Berson, 1971) el ACTH (Yalow y Berson, 1973) y la hormona de crecimiento humana (h-GH) (Bala y cols., 1974). Actualmente se acepta que la GH existe en más de una forma molecular en los extractos hipofisarios humanos, de rata y otras especies (Yalow, 1974, Friesen y cols., 1970, Frohman y cols., 1970), así como en el suero de individuos normales, pacientes acromegálicos, o en la hipoglucemia insulínica (Bala y cols., 1974).

Los estudios con hormonas polipetídicas marcadas con un isótopo del iodo, en especial con h-GH-I¹²⁵ pusieron de manifiesto que la radioactividad aparece distribuida en distintas fracciones del plasma, lo que inicialmente se interpretó como el resultado de posibles alteraciones que podía sufrir la molécula de h-GH durante el proceso de iodación (Yalow, 1974). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado claramente que la h-GH-I¹²⁵ al ser inyectada tanto en humanos como en ratas da lugar a la aparición de formas de la molécula de peso molecular más alto que el de la forma de la molécula inyectada (Beintins y cols., 1977, Antoniades, 1975). Esto hace que el estudio del metabolismo periférico de las hormonas proteicas presente problemas metodológicos que dificultan la interpretación de los resultados. Pero además, algunos autores extrapolan los resultados obtenidos con hormonas heterólogas a situaciones fisiológicas concretas. Así, en los dos estudios que sobre el metabolismo periférico de la GH en ratas existen actualmente en la literatura, se han realizado con h-GH-I¹²⁵. Peeters y cols., (1977) usa la h-GH-I¹²⁵ para estudiar el metabolismo periférico de la GH en el ratón durante el embarazo, y Antoniades (1975) realiza un estudio del metabolismo de la GH en ratas, en el que igualmente usa h-GH marcada. Esto es llamativo, sobre todo con una hormona

como la GH que presenta tan alta especificidad de especie.

Estas observaciones son de gran interés y hay que tenerlas en cuenta sobre todo en situaciones como en las que se requiere determinar la velocidad de aclaramiento metabólico (MCR) de una hormona proteica. La determinación del MCR se realiza por la administración de una única inyección intravenosa de la hormona marcada o por infusión continua y posteriormente se determina la radioactividad inmunoprecipitable en plasma a distintos tiempos después de la administración de la hormona. Los cálculos basados en la radioactividad inmunoprecipitable son válidos sólo si la hormona marcada es transportadora y metabolizada exactamente como la hormona que se segrega endógenamente.

El objetivo de este estudio, fue examinar la validez del uso de la hormona de crecimiento de rata radioiodada (r-GH-I¹²⁵) para determinar el MCR de la GH tanto en ratas controles como en las diabéticas. Esto se realizó comparando el patrón de elución en Sephadex del plasma de ambos tipos de animales a distintos tiempos después de ser inyectados con r-GH-I¹²⁵ con el patrón de elución en la misma columna del plasma de ratas controles y diabéticas cuya secreción endógena de GH se había estimulado por la administración i.v. de pentobarbital. En el primer caso, se determinó la radioactividad total e inmunoprecipitable en cada uno de los eluidos, y en el segundo caso se determinó por RIA el contenido de GH en cada fracción.

En primer lugar examinamos los cambios seguidos por la r-GH-I¹²⁵ con que se inyectó a las ratas. En todos los estudios sólo se empleó las fracciones correspondientes a la parte descendente del pico de la forma monomérica de r-GH-I¹²⁵ la cual eluye entre las fracciones 21 y 30, y en todos los casos la hormona marcada se purificó inmediatamente antes de ser inyectada. Esto tiene

por objeto él administrar exclusivamente dicha forma, de modo que cualquier componente que posteriormente se detecte en el plasma de los animales corresponda a transformaciones que dicha forma pueda sufrir, y poder por tanto descartar el que sean debidas a contaminaciones de la muestra administrada. Por otra parte, hemos evitado el congelar, almacenar o descongelar las muestras, lo que posiblemente puede afectar la distribución de la r-GH-I¹²⁵ monomérica en otros componentes, realizando todos los estudios cromatográficos lo más pronto posible después de centrifugar las muestras de sangre en una centrífuga refrigerada.

Como puede verse por los resultados que aparecen en las Figs. 17, 18, 19, 20, 21 y 22, a todos los tiempos y tanto en ratas controles como en las diabéticas, la radioactividad aparece distribuida principalmente en dos zonas, una con igual localización que el de la r-GH-I¹²⁵ inyectada y otra que eluye entre las fracciones 10 y 18. Como en las columnas de Sephadex las moléculas de peso superior eluyen antes que las de peso molecular más bajo, es por lo que se considera que la forma de r-GH-I¹²⁵ que eluye entre las fracciones 10-18 tiene un peso molecular mayor que el de la forma que eluye en las fracciones más retardadas.

Esta distribución de la r-GH-I¹²⁵ se evidencia ya a los 2 minutos después de la administración de la hormona marcada, a dicho tiempo la forma mayoritaria es la de peso molecular más alto en los controles mientras que en las diabéticas la forma que predomina es la monomérica. Análoga distribución se observa en los patrones de elución de las muestras de plasma correspondientes a tiempos más largos después de la administración de la hormona marcada. Tanto a los 5 como a los 10, 20, 40 y 60 minutos no existen diferencias cualitativas entre los patrones de elución de las ratas controles y diabéticas, ya que a cada uno

de estos tiempos y en los dos tipos de plasma, la radioactividad aparece distribuida preferentemente en dos regiones del patrón de elución bien definidas, sin embargo, en cada uno de estos tiempos en las ratas controles la forma mayoritaria es la de peso molecular más alto, mientras que en las diabéticas es la forma monomérica.

Esto queda reflejado en los resultados presentados en la Fig. 23. Es evidente que el valor del cociente entre la radioactividad del primer pico en relación con la del segundo es mayor en las ratas controles que en las diabéticas. El valor de dicho cociente en ambos tipos de animales aumenta con el tiempo. Este último hecho puede indicar que al aumentar el tiempo, dentro del intervalo estudiado, al menos, hay una tendencia a ir incrementándose la forma de r-GH-I¹²⁵ de mayor peso molecular a expensas de la forma monomérica, aunque ello podría ser asimismo el resultado de que la vida media de la forma monomérica fuese más corta que la de la forma de peso molecular más alto.

Por otro lado, existe una clara diferencia entre los patrones correspondientes a los 2 minutos y los obtenidos a tiempos más largos. En los primeros, ambos componentes aparecen bien definidos y no aparece prácticamente radioactividad en otras zonas del patrón cromatográfico, salvo la correspondiente a la de elución del I-¹²⁵. Pero a medida que aumenta el tiempo, sobre todo a los 40 y 60 minutos, va apareciendo radioactividad en las fracciones que eluyen más retardadamente que el pico de la forma monomérica. Este hecho puede deberse a la formación de fragmentos proteicos procedentes de la degradación hormonal.

Los estudios de inmunoprecipitación (Fig. 24) indican que la radioactividad correspondiente a la forma monomérica de la r-GH-I¹²⁵ tiene el mismo porcentaje de inmunoprecipitación que

el de las fracciones donde eluye la forma de la hormona de peso molecular más alto. Estos resultados, no concuerdan con los obtenidos por Antoniades (1975), ya que este autor encuentra que al inyectar h-GH-I¹²⁵ a ratas, la radioactividad de la forma monomérica presenta un porcentaje de inmunoprecipitación alrededor del 85 %, mientras que la que eluye en las fracciones más adelantadas presentan una inmunoprecipitación sólo del 40 %. Estas diferencias pueden deberse a que en cada estudio se ha usado hormona marcada de distinta procedencia, pero ello puede deberse asimismo a que el anticuerpo que nosotros hemos empleado tenga una capacidad de inmunoprecipitación más alta, o que hayamos empleado una concentración más alta, por lo cual no hemos podido detectar diferencias en el porcentaje de radioactividad inmunoprecipitable entre cada uno de los picos. La misma dilución de anticuerpo se empleó posteriormente en el experimento en el que se midió la velocidad de aclaramiento metabólico de la hormona en ratas controles y diabéticas.

El hecho de que en nuestras condiciones experimentales la radioactividad de cada una de las formas de r-GH-I¹²⁵ tuviese el mismo porcentaje de inmunoprecipitación fue una gran ventaja, ya que ello nos permitió el cálculo de la vida media, el MCR y de la velocidad de secreción (SR) de la hormona, midiendo la radioactividad inmunoprecipitable en plasma, de no ser así, nos hubiésemos visto obligados a determinar el valor de cada uno de estos parámetros cinéticos para cada uno de los componentes en ratas controles y diabéticas.

Posteriormente estudiamos si la GH inmunoreactiva, determinada por RIA, está en más de una forma molecular en el plasma de ratas controles y diabéticas. Al fraccionar el plasma de ambos tipos de animales, cuya secreción endógena de GH se había estimulado con pentobarbital, en columna de Sephadex G-100, se

detectan dos zonas en las que se evidencia la presencia de GH inmunoreactiva (Fig. 26). Existe una zona localizada entre las fracciones 10-18, con un alto contenido de GH, y otra que eluye entre las fracciones 22-30, de un contenido de GH mucho más bajo que el de la anterior. Los resultados indican claramente que no existen diferencias cualitativas en el patrón cromatográfico de la GH inmunoreactiva del plasma de las ratas controles y diabéticas. La única diferencia que se pone de manifiesto es una cantidad mayor de GH en las fracciones que corresponden a la forma de la hormona de peso molecular más alto en el plasma de las ratas diabéticas que en el de las controles.

El establecer una comparación del patrón cromatográfico de la hormona endógena con el de la hormona radioactiva es difícil. En los estudios con r-GH-I¹²⁵, se ha podido seguir los cambios cinéticos que tienen lugar en plasma, después de la administración de una única dosis de la hormona, mientras que cuando hemos determinado el patrón cromatográfico de la hormona endógena, no cabe duda que la hormona que se detecta en plasma corresponde a una secreción continuada de la misma por la hipófisis.

La comparación de los patrones cromatográficos de la GH endógena con el de la r-GH-I¹²⁵, en ratas controles y diabéticas, pone de manifiesto que no existen diferencias cualitativas entre ellos, ya que en ambos tipos de animales, tanto la hormona endógena como la radioactiva se distribuyen en dos zonas, una localizada entre las fracciones 10 y 18, y otra entre la 22 y 30. Sin embargo, existen grandes diferencias cuantitativas entre ambos patrones, sobre todo en ratas diabéticas. Es evidente, que en ambos tipos de ratas, casi toda la GH endógena se encuentra localizada en una zona que corresponde a la forma de

la hormona de peso molecular más alto, aunque la cantidad de GH detectada en esta forma es mayor en el plasma de las ratas diabéticas que en el de las controles. Por el contrario, el patrón cromatográfico de la r-GH-I¹²⁵, a los 5 minutos después de la administración de la hormona (Fig. 18), tiempo que corresponde a cuando se determinó la GH endógena después del estímulo con pentobarbital, pone de manifiesto que en el plasma de las ratas controles, el porcentaje de radioactividad eluido en las fracciones 10-18, es de alrededor del 52 %, un valor bastante aproximado al de la GH endógena (45 %) cuando ésta se expresa como porcentaje de la GH total de cada una de las fracciones recogidas. Por el contrario, en el plasma de las ratas diabéticas, el porcentaje de radioactividad eluido entre las fracciones 10-18 fue de alrededor del 17 %, un valor mucho más pequeño que el porcentaje de GH endógena recogido en estas mismas fracciones (62 %). Estos resultados indican claramente que se detectan grandes diferencias cuantitativas entre el patrón cromatográfico de la GH endógena y el de la hormona marcada en el plasma de las ratas diabéticas, mientras que en el de los controles ambos patrones son bastante parecidos.

En un intento de explicar estas diferencias entre el patrón cromatográfico de la GH endógena y el de la r-GH-I¹²⁵ en el plasma de las ratas diabéticas, podemos hacer las siguientes consideraciones. Tanto en humanos como en ratas, la administración de GH-I* da lugar a la aparición en plasma de distintas formas de GH marcadas (Beintins y cols., 1977, Antoniasdes, 1975), no existiendo acuerdo entre los distintos autores si la forma de GH-I* de peso molecular alto representa un polímero de distintas moléculas de la forma monomérica, o si es el resultado de la unión de esta última forma de la molécula de GH a proteínas plasmáticas. Análogas consideraciones se pueden

hacer extensivas a la GH endógena (Bala y cols., 1970). Si en efecto, la forma de GH de peso molecular más alto que el de la forma monomérica de la hormona fuese el resultado de la unión de esta forma de GH a determinadas proteínas plasmáticas, la formación de este tipo de moléculas deberá depender del contenido de dichas proteínas en plasma así como de su capacidad de saturación con la hormona. Por otra parte, diferencias en el contenido endógeno de la hormona, entre distintas situaciones experimentales, pueden dar lugar a una aparente disminución en la formación de este compuesto de peso molecular alto en los estudios sobre el metabolismo periférico de la hormona realizados con la hormona marcada como única medida.

Aunque no existen datos en la literatura respecto a si la diabetes por STZ en ratas, altera la concentración o la capacidad de ligazón de las proteínas plasmáticas que transportan la GH, se sabe que existen ciertos cambios en la albúmina sérica en el ratón genéticamente diabético. Kawaguchi y Matsushita, (1975) estudiaron el patrón electroforético de la albúmina sérica en el ratón en ayunas y en estado postprandial, situaciones que presentan patrones diferentes, así como en el ratón diabético. El plasma de estos animales carece de las bandas 3-4, tanto en ayunas como cuando están alimentados. La aparición de estas bandas tiene lugar por el tratamiento con insulina, lo que sugiere el que ellas puedan estar relacionadas con la insulina, o con algunas de las alteraciones metabólicas o endocrinas que ello lleva consigo.

Sin embargo, puesto que cuando hemos medido el contenido de GH en los eluidos cromatográficos, el plasma de las ratas diabéticas, a los 15 días después de la administración de STZ, tiene una cantidad mayor de GH en las fracciones que corresponden a la forma de la hormona de peso molecular alto que en el

plasma de los animales normales, ello parece indicar que la diabetes, al menos a este tiempo, no parece inducir cambios en la proteína transportadora de GH en plasma. Más bien estos resultados parecen sugerir que en las ratas diabéticas esta proteína pueda estar prácticamente saturada con lo cual disminuiría su capacidad para ligar nuevas moléculas de la hormona, lo que daría lugar a que en el patrón cromatográfico de la r-GH-I¹²⁵ se encuentre la hormona marcada preferentemente en la forma monomérica.

Por otra parte, en los estudios de inmunoprecipitación, en donde la dilución final del anticuerpo es de 1/3000, la radioactividad de cada uno de los dos picos presenta igual porcentaje de inmunoprecipitación, lo que no descarta que en el RIA, donde el anticuerpo además de ser más puro se usa a una dilución final mucho mayor (1/120000), exista la posibilidad de que la proteína al ligar a la GH tanto fría como a la marcada pueda afectar las determinaciones de la hormona por este método. Estas consideraciones evidencian la necesidad de realizar estudios más profundos para establecer las características de esta unión, así como la posibilidad de que estas proteínas plasmáticas compitan con el anticuerpo por su unión a la GH.

El significado fisiológico de la existencia en plasma de más de una clase de molécula de GH depende de las propiedades biológicas de cada uno de estos componentes, lo cual actualmente no se conoce, además ello plantea la necesidad de investigar algunos aspectos de la secreción y función de la hormona de crecimiento. Una hipótesis del posible papel fisiológico de estas proteínas plasmáticas pudiera ser el que actúen como control extrahipofisario de los niveles de GH en plasma, haciendo el papel de buffer para minimizar las frecuentes y grandes fluctua

ciones de la concentración de GH en plasma ocasionadas por los frecuentes brotes de la secreción hipofisaria de GH.

Este estudio no tuvo otro objetivo que el de ver si la r-GH-I¹²⁵ se podía usar para la determinación del MCR de la hormona de crecimiento. El hecho de que tanto la hormona endógena como la r-GH-I¹²⁵ presenten patrones cromatográficos en Sephadex semejantes, así como el que la radioactividad de cada uno de estos picos presenten igual porcentaje de inmunoprecipitación, indican que este método puede dar una valoración aceptable del MCR de la hormona de crecimiento en ratas controles y diabéticas.

G. CINETICA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN PLASMA

El estudio cinético de la GH en plasma se realizó con el propósito de comprobar si algunos parámetros cinéticos como la velocidad de aclaramiento metabólico o la velocidad de secreción de la hormona se hallaban alterados en el animal diabético. De ser así, una reducción en el MCR o una velocidad de secreción aumentada justificarían los niveles plasmáticos de GH hallados en el animal insulinooprivo. En los experimentos realizados en esta tesis hemos podido comprobar que la diabetes reduce de modo significativo el contenido de GH en hipófisis, y que este descenso se acentúa al aumentar el tiempo de la enfermedad. Sin embargo, la reducción del contenido de GH en hipófisis no va acompañado del correspondiente descenso de los niveles circulantes de la hormona, los cuales son semejantes al de los animales controles. En la diabetes humana, aunque no existen datos del contenido de GH en hipófisis, los niveles circulantes de la hormona son semejantes o superiores al de los sujetos normales, lo cual no concuerda con el crecimiento retardado existente en niños diabéticos (Drash y cols., 1968, Lunbaek y cols., 1970). No

existe concordancia en la literatura sobre cual de los parámetros cinéticos de la GH se halla alterado, según Lipman y cols., (1972) y Sperling y cols., (1973), los sujetos diabéticos presentan un MCR reducido comparado con el de la población control, lo cual indicaría una mayor permanencia de la hormona en plasma. Por el contrario, Navalesi y cols., (1975) encuentran que la velocidad de secreción hipofisaria de GH es mayor en los sujetos diabéticos que en los normales.

Tras la inyección de una sola dosis de GH-I* la desaparición de la radioactividad en plasma, en un sistema de coordenadas semilogarítmicas, no es lineal sino que sigue una curva de tipo multiexponencial, lo cual indica que se trata de un sistema compartimentado. Este fenómeno se ha descrito tanto para la GH-I* humana (Cameron y cols., 1969), así como para otras hormonas como el FSH (Coble y cols., 1969), LH (Kohler y cols., 1968), insulina (Arnould y cols., 1967) y el lactógeno placentario (Kaplan y cols., 1968). Respecto a la forma de la curva que representa la desaparición de la GH-I* en el plasma humano, existen discrepancias entre los resultados obtenidos por distintos autores. Así, Parker y Utiger (1962) y Boucher (1962) estudiaron en humanos la velocidad de desaparición de la GH-I* administrada, tomando muestras de sangre entre los 10 y 100 minutos, y describieron la existencia de una curva exponencial simple, con una vida media para la GH de 17 a 34 minutos. Por el contrario, Laron y cols., (1965) y Conti y cols., (1962) realizaron estudios similares, tomando frecuentes muestras de sangre durante un tiempo más largo que el de los estudios anteriores, encontraron que la curva de desaparición de GH-I* presentaba dos fases bien definidas. La primera caracterizada por una gran velocidad de la desaparición de la radioactividad en plasma, lo que atribuyeron al tiempo de distribución de la hormona inyectada, y

una segunda fase mucho más lenta que interpretaron como la de metabolización de la hormona. Las discrepancias existentes entre los resultados de estos autores parece deberse a que para definir un sistema multiexponencial deben tomarse frecuentes muestras de sangre durante un período lo suficientemente largo que permita conocer la curva de desaparición lo más completa posible.

Los datos presentados en la Fig. 28 ponen de manifiesto que tras la administración de una sola dosis de r-GH-I¹²⁵ a ratas controles o diabéticas, la curva de desaparición tanto de la radioactividad total, como de la precipitable por TCA o la inmunoprecipitable, representadas en un sistema de coordenadas semi-logarítmicas, no es lineal, sino que análogamente a los resultados obtenidos en humanos (Conti y cols., 1962) se evidencian dos fases perfectamente diferenciadas. La primera comprendida entre los 2 y 15 minutos después de la administración de la hormona marcada, y que se caracteriza por que en ella tiene lugar una rápida desaparición de la radioactividad total, así como de la precipitable por TCA o la inmunoprecipitable; y una segunda fase comprendida entre los 15 y 60 minutos, en donde la velocidad de desaparición es mucho más lenta que en la primera.

Una posible explicación de la disminución de la velocidad de desaparición de la radioactividad en plasma durante la segunda fase, es el que a estos tiempos estén presentes en el plasma fragmentos de la molécula de r-GH-I¹²⁵, los cuales aunque pueden conservar su capacidad inmunológica, pueden tener una velocidad de desaparición en plasma más lenta que la de la molécula de r-GH-I¹²⁵. Esta idea está apoyada por la observación de que en los patrones cromatográficos en Sephadex G-100 de los plasmas de ratas controles y diabéticas (Figs. 17, 18, 19, 20, 21 y

22) se evidencia un aumento progresivo en el porcentaje de radioactividad correspondiente a las fracciones que eluyen más retardadamente que la forma monomérica de la r-GH-I¹²⁵, al aumentar el tiempo comprendido entre la administración de la hormona marcada y el de la toma de la muestra de sangre. Así, en el patrón de elución de los plasmas correspondientes a los 2 minutos, la radioactividad que se recoge en las dos formas mayoritarias de la molécula de GH-I¹²⁵ está comprendida entre el 79 y 80 %, lo que significa que la radioactividad que eluye más retardadamente es algo menor del 13-20 % (ya que parte de ella eluye como I⁻¹²⁵). Mientras que a los 60 minutos, la radioactividad que eluye en las fracciones situadas después de la forma monomérica de la GH es algo menor del 45-59 %, valores superiores a los encontrados a tiempos más cortos.

Si para el cálculo de la vida media de la hormona sólo nos ajustamos a la parte lineal de la curva de desaparición de la radioactividad en plasma, se obtiene un valor de este parámetro para las ratas controles de 7.0 ± 1.5 min. y de 8.0 ± 1.1 para las diabéticas. Aunque el valor de la vida media de la r-GH-I¹²⁵ en plasma es ligeramente más larga en las ratas diabéticas que en las controles, sin embargo la diferencia entre el valor de cada uno de los grupos no fue significativa. El valor de la vida media de la GH encontrada en nuestros controles concuerda con los datos obtenidos por Frohman y Bernardis (1970) los cuales hallaron un valor comprendido entre 5 y 7 minutos, cuando lo determinaron tras la administración de una única inyección de r-GH-I¹³¹, o calculado tras la administración de una dosis de 40 µg de r-GH. A su vez son concordantes con el valor dado por Schalch y Reichlin (1966). Sin embargo, Peake y cols. (1968) obtuvieron una vida media para la GH del orden de 15 minutos, midiendo la velocidad de desaparición de la hormona tras la

extirpación de un tumor hipofisario productor de GH. Estos autores, al igual que los anteriormente citados, señalan la no linealidad de la curva que representa la velocidad de desaparición de la GH en plasma, lo que atribuyeron a que posiblemente la extracción del tumor había sido incompleta. El valor de la vida media de la GH en ratas diabéticas no podemos compararla con la obtenida por otros autores, ya que no existen datos en la literatura sobre ella.

Dado el carácter multiexponencial de la curva de desaparición de la radioactividad en plasma, los datos de la vida media de la GH calculados únicamente sobre la primera parte lineal de la curva pueden ser objeto de crítica, y tiene mucho menos peso que el valor de otros parámetros cinéticos como el MCR y la velocidad de secreción de la hormona.

La GH purificada, marcada con un isótopo radioactivo del yodo, se puede emplear como un marcador metabólico in vivo, solamente en el caso de que se demuestre que esta molécula se comporta igual que la de la hormona no marcada en el sistema en estudio, en nuestro caso en la determinación del MCR. Las premisas de que la r-GH-I¹²⁵ es transportada en el plasma y retirada de él a la misma velocidad que la endógena son críticas para la validez de este estudio. Ambos supuestos parecen que se cumplen para la GH, ya que por una parte según vimos en el apartado anterior tanto la r-GH-I¹²⁵ como la hormona endógena presentan el mismo patrón cromatográfico al fraccionar los plasmas en Sephadex G-100. Este estudio indicó que una fracción tanto de la hormona marcada como de la endógena aparece en el plasma con un tamaño molecular semejante al de la forma monomérica de la hormona, mientras que otra fracción de la r-GH-I¹²⁵ y de la endógena cuya naturaleza no está bien definida, presenta un peso molecu-

lar más alto. Por otra parte, el supuesto de que la GH marcada y endógena desaparezcan del plasma a la misma velocidad, parece estar justificado por los resultados de Frohman y Bernardis, (1970). Estos autores encontraron que el valor del MCR determinado después de una única inyección de r-GH-I¹²⁵ es semejante al valorado después de la administración de una dosis de 40 µg de GH hipofisaria. Este fenómeno es extensible a otras hormonas como la LH (Kohler y cols., 1968). Por otra parte, el valor del MCR de la GH parece que es independiente del método empleado para su determinación, es decir de que la hormona se administre por una única inyección o por infusión continua (Frohman y Bernardis, 1970).

En el caso de la GH, cuya secreción hipofisaria presenta brotes incontrolados, lo que da lugar a que la concentración de la hormona en plasma presente grandes fluctuaciones, es preciso demostrar que la elevación de los niveles plasmáticos de la hormona no afecta el valor del MCR. Es decir, que la velocidad de aclaramiento de la hormona es independiente de los niveles circulantes de ella. Este requisito está ampliamente demostrado tanto en ratas (Frohman y Bernardis, 1970) como en humanos (Taylor y cols., 1969), especies en donde más se ha estudiado estos parámetros cinéticos.

En ratas, ya hemos hecho referencia a que el valor del MCR es independiente de que la medida de este parámetro se realice tras la administración de una dosis trazadora de r-GH-I¹²⁵ o de 40 µg de GH hipofisaria. En humanos, Taylor y cols., (1969) demostraron que el valor del MCR en sujetos acromegálicos o en normales, cuyos niveles circulantes de GH se habían elevado por la administración de GH, no difería del correspondiente a sujetos normales. Estos hechos sugieren por una parte, que la velo-

cidad de aclaramiento de la GH es independiente de los niveles circulantes de la hormona, y el que los mecanismos implicados en la retirada de la hormona del plasma no sean saturables a concentraciones fisiológicas de la hormona. Este hecho, puede ser considerado como un sistema de control mediante el cual tiene lugar un rápido ajuste de las concentraciones plasmáticas de la hormona cuando ello sea necesario. Este hecho se ha descrito para otras hormonas como la insulina (Stern y cols., 1968), FSH (Coble y cols., 1969) y LH (Kohler y cols., 1968). Por otra parte, puesto que los animales diabéticos presentan elevados niveles de glucosa en plasma, es de interés considerar que Lipman y cols., (1972), al estudiar el MCR y la secreción hipofisaria de GH en sujetos diabéticos, observaron que la elevación de la glucosa plasmática, mediante su infusión continua, no alteraba el valor del MCR de la hormona.

En nuestra situación experimental, encontramos que el valor del MCR (ml/min) en las ratas diabéticas es de 1.24 ± 0.14 , mientras que en las controles el valor de este parámetro es de 1.66 ± 0.17 , cifra significativamente mayor que la de las ratas diabéticas ($p < 0.001$) (Tabla 3). En humanos, McGillivray y cols., (1969) han encontrado que existe una correlación positiva entre el valor del MCR y el área (m^2) de la superficie corporal, por lo cual en humanos los datos de este parámetro se expresan referidos a dicha superficie. Sin embargo, en ratas no existe ningún trabajo que demuestre que el MCR de la GH está relacionado con el peso o con la superficie corporal. Strosser y Mialhe (1975) determinaron el MCR de la GH en ratas de 4 y 15 días de edad, así como en animales adultos, cuyo peso corporal era de 10 g, 25 g y 200 g, respectivamente. El valor del MCR referido a 100 g de peso (ml/min/100 g) fue de 0.68 ± 0.16 para las ratas de 4 días, 0.64 ± 0.09 para las de 15 días y de 0.72 ± 0.08 para

las adultas. Estos autores concluyen que en ratas, el valor del MCR de la GH es independiente de la edad y del peso del animal. Pero si el MCR de estos grupos de animales se calcula en ml/min., se encuentra que a los 4 días la velocidad de aclaramiento es de 0.068 ml/min., a los 15 días de 0.15 ml/min., y de 1.44 ml/min. en las ratas adultas. Es decir, que las ratas adultas presentan una capacidad de retirar la GH del plasma 21 veces superior al de las ratas de 4 días, y 9 veces mayor que las ratas de 15 días.

Si nuestros datos experimentales del MCR se refieren a la superficie corporal, de nuevo se encuentra que las ratas controles tienen una velocidad de aclaramiento de la GH en plasma más alta que la de las ratas diabéticas ($p < 0.05$). Si los datos se expresan referidos a 100 g de peso, aunque el valor de las controles es algo superior al de las diabéticas, las diferencias entre ambos grupos dejan de ser significativas. Es evidente que la forma en la cual se exprese el valor del MCR de la GH puede afectar la interpretación de los resultados. Teniendo esto en cuenta junto con el hecho de que la vida media de la GH en las ratas diabéticas no es significativamente diferente de la existente en controles, nos inclinamos a creer que estos animales con una diabetes de grado medio y a los 15 días de padecer este síndrome, no presentan grandes alteraciones en este parámetro cinético.

El cálculo de la velocidad de secreción de una hormona viene dado por el producto de la velocidad de aclaramiento metabólico de la hormona en estudio y su concentración en plasma. Un requisito necesario para la validez de este estudio es que se mantenga un estado estacionario en los niveles plasmáticos de la hormona durante todo el tiempo que dura el experimento, es decir, que exista una relación constante entre la velocidad de

secreción y la velocidad de metabolización y degradación de la hormona endógena durante este período.

Este condicionamiento es difícil de conseguir en el caso de una hormona como la GH, cuya concentración en plasma presenta grandes y frecuentes fluctuaciones. Para tratar de conseguir en nuestras condiciones experimentales un "steady-state" de la concentración de GH en plasma, tuvimos gran precaución de que los animales de cada uno de los grupos estuviesen sometidos a las mismas condiciones experimentales, como es el realizar esta prueba en cada uno de los animales a la misma hora del día o el administrar la GH marcada en el mismo volumen de salino.

En nuestro estudio, la concentración plasmática de GH a cada uno de los tiempos se mantuvo constante tanto en las ratas controles como en las diabéticas, pero se evidenció claramente que a todos los tiempos las ratas diabéticas mantenían niveles de GH en plasma más altos que las controles. Así, a los 2 minutos las ratas controles mantenían unos niveles de GH en plasma de 13.2 ± 7.1 ng/ml mientras que en diabéticas era de 30.4 ± 14.8 ng/ml; a los 10 minutos el de las ratas controles era de 13.9 ± 5.0 ng/ml y el de las diabéticas 25.3 ± 12.0 . Detectándose diferencias análogas entre los niveles de GH de ratas controles y diabéticas a cada uno de los otros tiempos.

Estas diferencias en la concentración plasmática de la GH entre las ratas controles y diabéticas hicieron que a pesar de que el MCR (ml/min) de las ratas diabéticas es más bajo que el de los controles, el producto resultante de multiplicar por la concentración plasmática de la hormona, sea más alto en las ratas diabéticas que en las controles (Tabla 3). El valor medio de la velocidad de secreción de 15.9 ± 6.2 ng/min. encontrado en nues-

tros animales controles concuerda con el valor de este parámetro dado por Frohman y Bernardis y Strosser y Mialhe, quienes encontraron un valor medio \pm es de 13.1 ± 1.9 ng/min y 10.8 ± 2.1 , respectivamente.

Partiendo de estos valores se puede calcular la secreción hipofisaria de GH a lo largo del día, la cual sería en nuestros animales controles de $22.9 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ y de $18.9 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ y $15.6 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ en el caso de los animales antes citados. Posiblemente este valor de la secreción hipofisaria de GH a lo largo del día sea inferior al valor real, ya que en los tres estudios la medida de estos parámetros cinéticos se ha realizado en ratas anestesiadas, lo cual afecta la secreción hipofisaria de la hormona. El valor de la secreción hipofisaria de GH en las ratas diabéticas fue de $33.9 \text{ ng}/\text{min.}$, dicho valor no podemos contrastarlo con el de otros autores ya que no hemos encontrado datos en la literatura sobre él. Partiendo de este valor, el cálculo de la secreción hipofisaria de GH fue de $48.8 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ en estos animales. Estos resultados indican claramente que en nuestras condiciones experimentales, las ratas diabéticas presentan una secreción hipofisaria de GH más alta que la de los controles.

Sin embargo, es posible que el valor de este parámetro no refleje lo que realmente ocurre en condicionales basales. La metódica seguida tanto por nosotros como por Frohman y Bernardis y Strosser y Mialhe para la determinación de estos parámetros cinéticos implica el tener que administrar la hormona radioactiva así como el realizar tomas de muestras de sangre a intervalos muy cortos por vía intravenosa, lo que requiere que los animales tengan que estar bajo anestesia. Es sabido que la anestesia afecta la secreción de GH, y que muy posiblemente este efecto no tenga la misma intensidad en ratas controles y diabéticas,

lo cual parece deducirse de la comparación de los valores de GH dependiendo que el plasma proceda de animales sacrificados por guillotina o bajo anestesia.

En efecto, en los experimentos B, C y D (Figs 10, 13, 15), en los que las ratas se sacrificaron por el primer procedimiento mencionado, se encuentra que las ratas controles presentan una concentración de GH en plasma de alrededor de 70 ng/ml, valor muy parecido al de los animales diabéticos (68 ng/ml). Sin embargo, en este experimento en el que la concentración de GH corresponde al de un animal bajo anestesia, el valor de este pa rámetro en los controles es de alrededor de 10 ng/ml, mientras que el de las diabéticas es de 30 ng/ml. Estos resultados indican que en las ratas controles la anestesia induce una reducción del nivel de GH en plasma del 80 %, en cambio en las diabéticas la reducción fue sólo del 50 %. Estas consideraciones parecen indicar que no es conveniente extrapolar el valor de la velocidad de secreción de la GH obtenido en ratas anestesiadas a una situación como es la basal. Pero además, el hecho de que la anes tesia disminuye la secreción de GH con distinta intensidad en ratas controles y diabéticas, indica por una parte, que el éter influye sobre los mecanismos implicados en la secreción de GH, y que la respuesta de estos mecanismos a la anestesia es distinta en el animal control y diabético.

En un intento de realizar un cálculo aproximado de lo que puede ser el valor de la velocidad de secreción hipofisaria de GH en condiciones basales, hemos usado para el cálculo de este parámetro los valores de la concentración de GH en plasma de ratas controles y diabéticas sacrificadas con guillotina. El va lor así obtenido es de 82 ± 7.9 ng/ min., para los animales con troles y de 73 ± 10 ng/min. para los diabéticos. Partiendo de

estos valores, el cálculo de la secreción hipofisaria de GH a lo largo del día en las ratas controles y diabéticas es de 118 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ y de 107 $\mu\text{g}/24\text{ h}$, respectivamente. El hecho de que las ratas hipofisectomizadas requieran dosis de 100 μg de GH por día para mantener un crecimiento normal (datos de nuestro laboratorio) hace pensar, que estos valores de la secreción de GH en las ratas controles y diabéticas están muy próximos a lo que debe ser el valor real de este parámetro.

El conjunto de estos resultados indican que en el animal diabético, con una diabetes de tipo medio y a los 15 días de producir la enfermedad, bajo el efecto de la anestesia presenta una secreción hipofisaria de GH más alta que las ratas controles, pero en condiciones basales la secreción de GH de las ratas diabéticas, aunque no significativamente, es más baja que la de las controles. Por otra parte, el valor del MCR, tanto si se expresa en valor absoluto como referido a la superficie corporal es significativamente más bajo en las ratas diabéticas que en las controles. La conjunción de estos resultados, nos lleva a la creencia de que bajo nuestras condiciones experimentales, un aumento de la secreción hipofisaria de GH y una disminución significativa de la velocidad de aclaramiento metabólico (en valor absoluto o referido a superficie corporal) de la hormona pueden ser responsables de que los animales diabéticos con un contenido bajo de GH en hipófisis mantengan no obstante valores de GH en plasma dentro del rango de la normalidad.

H. CONCENTRACION PLASMATICA DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN RESPUESTA A LA ESTIMULACION CON PENTOBARBITAL

En los experimentos anteriormente descritos, se han determinado los niveles basales de GH en ratas controles y diabéti-

cas. En este estudio nos planteamos examinar la dinámica de la secreción de GH en respuesta a un estímulo.

La respuesta en la secreción hipofisaria de GH frente a determinados estímulos varía de una especie a otra. Así, mientras que la infusión de arginina, la hipoglucemia inducida por insulina, o la administración de vasopresina son de gran utilidad como pruebas funcionales de la secreción de GH en humanos, en ratas, ninguno de estos estímulos es efectivo (Glick, 1969). Actualmente, el único agente conocido capaz de descargar la secreción hipofisaria de GH es el pentobarbital. (Howard y Martin 1971). El PB estimula la secreción de GH tanto si se administra in vivo, como en hipófisis incubadas in vitro, por lo cual se cree que su efecto es a nivel hipofisario (Howard y Martin 1972), sin embargo esto no descarta el que tenga un efecto a nivel hipotalámico.

En este experimento, como en el que se midió los parámetros cinéticos de la GH, en los que por razones metodológicas los animales debían de estar bajo anestesia, de nuevo encontramos que las ratas diabéticas, a tiempo 0, antes de la administración i.v. del PB, mantienen niveles de GH en plasma significativamente más altos que los animales controles (Fig. 29 y 30). Es evidente que la administración intravenosa de 3 mg de PB por 100 g de peso, estimuló la secreción de GH tanto en ratas controles como en diabéticas. Esta acción del PB en ratas diabéticas no había sido observada anteriormente. La respuesta en la secreción de GH a 3 mg de PB es cualitativamente la misma en ratas controles que en diabéticas, aunque estas últimas a los 5 minutos presentan niveles de GH en plasma significativamente más altos que los controles. Con objeto de corregir el hecho de que ambos grupos presentan diferentes niveles basales de la hormona, el incremento de GH a cada uno de los tiempos se calculó

como por ciento del valor basal en los dos grupos. En este caso, se sigue observando que a los 5 minutos las ratas diabéticas presentan una respuesta al pentobarbital mayor que los animales controles.

Ante la posibilidad de que 3 mg de PB fuese una dosis excesivamente alta que pudiera haber enmascarado las posibles diferencias en el patrón de secreción entre ambos grupos de animales, realizamos un segundo experimento en el que seguimos la misma metodología que en el anterior, con la diferencia de que la cantidad inyectada de PB fue de 1.5 mg por 100 g de peso. Como puede observarse en la Fig. 30 existen diferencias en el patrón de la secreción de GH, entre las ratas controles y diabéticas en respuesta a esta dosis de PB. En los animales controles, la secreción de GH aumentó progresivamente con el tiempo, de forma que la concentración de la hormona en plasma que en nivel basal fue de 9.8 ± 3 ng/ml pasó a ser de 12.1 ± 1.2 ng/ml y 19.2 ± 6.9 ng/ml a los 5 y 10 minutos después de la administración del PB. Los animales diabéticos, por el contrario, presentaron a los 5 minutos una intensa secreción de GH (61.6 ± 21.6 ng/ml), para posteriormente descender a los 10 minutos a una concentración plasmática de GH de 30.8 ± 9.0 ng/ml, este último valor es significativamente más alto que el de los controles (19.2 ± 6.9 ng/ml; $p < 0.02$). Cuando el incremento de la concentración de GH a cada uno de los tiempos se expresa como por ciento del valor basal, se encuentra que sólo son significativas las diferencias entre ambos grupos a los 5 minutos.

Estos resultados indican que existen ciertas diferencias entre el patrón de la secreción de GH en ratas controles y diabéticas en respuesta al pentobarbital. Así, mientras las ratas controles presentan un moderado pero progresivo aumento de la

secreción de GH respecto al tiempo, tanto en respuesta a la administración de 1.5 mg como de 3 mg de PB, la secreción de GH de las ratas diabéticas a los 5 minutos presenta la misma intensidad de respuesta a la administración de 1.5 mg o de 3 mg de este agente, con la diferencia que en las ratas inyectadas con 3 mg esta respuesta a los 10 minutos es aún superior a la observada a los 5 minutos, en cambio los animales inyectados con 1.5 mg de PB no mantienen la misma intensidad en la respuesta a tiempos más largos. Hay que hacer notar que la mayor respuesta de la secreción de GH al PB en el animal diabético tiene lugar a pesar de que estos animales debido su menor peso corporal (98 ± 14 en diabéticos vs. 139 ± 9 en controles, $p < 0.001$), recibieron realmente una dosis más baja del pentobarbital.

El hecho de que las ratas diabéticas presenten una secreción de GH en respuesta al PB más intensa que los controles tiene lugar a pesar de que el contenido de GH en hipófisis de los animales diabéticos es más bajo que el de los controles. Por otra parte, cuando la concentración de GH en plasma se expresó como por ciento del contenido de la hormona en glándula (Fig. 31), se observa que las ratas controles presentan una secreción de GH frente a 1.5 ó 3 mg de PB, más intensa a los 10 que a los 5 minutos, y a cada uno de estos tiempos existe una relación lineal entre la respuesta de la secreción hipofisaria de GH y la dosis de PB administrada. Por el contrario, en las ratas diabéticas inyectadas con 3 mg de PB, el porcentaje hallado es el mismo a los 5 que a los 10 minutos, mientras que en los animales que recibieron 1.5 mg de PB, la concentración de GH en plasma en relación con el contenido hipofisario de la hormona es más alto a los 5 que a los 10 minutos, aunque a cada uno de estos tiempos existe una relación lineal dosis-respuesta.

El conjunto de estos resultados indica que los mecanismos implicados en la secreción hipofisaria de GH en las ratas diabéticas son más sensibles a un estímulo como el pentobarbital que los animales controles. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en humanos. En efecto, los enfermos con diabetes juvenil presentan una secreción de GH significativamente más alta que los sujetos normales en respuesta a estímulos como la infusión de arginina o glucagón (Taylor y cols., 1969, Boden y cols., 1968) o al ejercicio físico (Hansen, 1970). El patrón de secreción de GH a lo largo del día en los sujetos diabéticos muestra brotes de secreción más intensos y frecuentes que el de los individuos normales (Johansen y cols., 1969). Por otra parte, nuestros resultados indican que el "test" del pentobarbital que Howard y Martin describieron como un modo de medir la reserva hipofisaria de GH no siempre es prueba de ello, ya que las ratas diabéticas con un contenido de GH en hipófisis inferior al de los controles, presentan sin embargo una secreción de GH en respuesta al pentobarbital más intensa.

I. SINTESIS DE GH EN HIPOFISIS INCUBADAS IN VITRO

Son numerosos los trabajos en la literatura encaminados a estudiar la síntesis hipofisaria de GH midiendo la incorporación de un aminoácido marcado a la hormona. Sin embargo, se han empleado distintas metodías para aislar y cuantificar la cantidad de GH sintetizada de novo. Así, MacLeod y cols., (1968) en un estudio sobre la síntesis hipofisaria de GH y prolactina aislaron cada una de las hormonas recién sintetizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida. Sin embargo, Burek y cols., (1970) han encontrado que la hormona así aislada no aparece como una sola banda, lo que atribuyeron a que en hipófisis existe una población heterogénea de moléculas de GH, ya que si la hor-

mona era elúida del gel, tratada con sodio dodecil sulfato y vuelta a someter a electroforesis existía una reducción del 30 % en la banda correspondiente a la hormona de crecimiento (Meldolesi y cols., 1972). Otros autores como Burek y Frohman, (1970) aislaron y cuantificaron la hormona sintetizada de novo haciendo reaccionar la GH* con un anticuerpo específico. Nosotros pudimos utilizar este método ya que disponíamos del anticuerpo específico anti-GH para realizar los estudios de inmunoprecipitación.

Por otra parte, la síntesis de GH* in vitro presenta una relación lineal frente al tiempo, dicha relación se mantiene por espacio de 6 horas (Burek y Frohman, 1970, Meldolesi y cols., 1968) aunque a un tiempo tan corto como 30 minutos se puede evidenciar ya la formación de GH*. Sin embargo, ante la posibilidad de que este proceso estuviese alterado en la hipófisis de los animales diabéticos, elegimos 3 horas para realizar nuestros experimentos.

Nuestros resultados indican que el tejido hipofisario de las ratas controles incorporan más leucina-H³ que el de las ratas diabéticas tratadas con salino o con insulina, aunque la insulina tuvo un efecto positivo sobre este proceso. Indudablemente sólo parte del aminoácido marcado se incorporaría a la molécula de GH y parte iría a formar parte de otras proteínas adenohipofisarias. En nuestras condiciones experimentales, la radioactividad precipitable con el anticuerpo anti-GH fue superior en el tejido hipofisario de los animales controles que en el procedente de ratas diabéticas tratadas con salino, en estos últimos animales, dicha radioactividad era a su vez inferior respecto al grupo de ratas diabéticas que recibieron insulina. Estos resultados parecen indicar que la síntesis de novo de GH

es independiente del contenido endógeno de la hormona en glándula, ya que las ratas controles con un contenido de GH doble al existente en ratas diabéticas presentaron sin embargo una capacidad de síntesis de GH más alta. Es difícil decidir sobre la forma de presentar estos resultados. Indudablemente si la GH-leucina- H^3 se refiere al peso del tejido se observa que el valor de esta relación es más bajo en el caso de las ratas diabéticas que en cada uno de los otros dos grupos. Sin embargo, debido al hecho de que las hipófisis procedentes de las ratas diabéticas presentan un contenido más bajo de GH que el de los restantes grupos, al relacionar la radioactividad inmunoprecipitable del tejido con dicho contenido hormonal, desaparecen las diferencias entre cada uno de los grupos en estudio. (Fig. 32).

Nuestros resultados no nos permiten discernir si el fallo del tejido hipofisario de las ratas diabéticas reside a nivel de captación del aminoácido por el tejido o a nivel de síntesis proteica, aunque es posible que ambos mecanismos puedan estar involucrados. Para aclarar este punto pensamos estudiar en un futuro el proceso de captación utilizando un aminoácido marcado no metabolizable como el ácido aminoisobutírico. Consideramos también que sería de gran interés el estudio de la síntesis de GH en glándulas procedentes de ratas controles y diabéticas a distintos tiempos, lo cual nos permitiría conocer la cinética de la síntesis de GH en el tejido de ambos grupos experimentales. Hay que señalar que este sistema in vitro permite a su vez estudiar el proceso de secreción de la hormona, el cual puede estar alterado en un sentido o en otro en el estado diabético, lo que parece estar apoyado por el hecho de que la radioactividad inmunoprecipitable hallada en el medio donde permaneció el tejido procedente de ratas diabéticas sea superior a la observada en los otros grupos experimentales, dicha observación podría

indicar que el proceso de secreción está aumentado en el estado diabético. Sin embargo, estos datos son preliminares y es necesario proseguir en su estudio con objeto de confirmarlos de nuevo y tratar de averiguar sus causas.

V. CONCLUSIONES

=====

Conclusiones

1^a) En los organismos pluricelulares constituidos por células altamente especializadas existen dos sistemas, nervioso y endocrino, los cuales por medio de impulsos nerviosos o de sustancias especializadas (hormonas) ejercen su acción sobre los correspondientes órganos afectores. Ambos sistemas están estrechamente relacionados, de forma que cada uno de ellos es dependiente del otro, constituyendo en conjunto el sistema neuroendocrino. La interrelación más estrecha entre ambos sistemas tiene su sede principal en el complejo hipotálamo-hipófisis. El comportamiento global del organismo está por tanto integrado por los estímulos nerviosos y hormonales que actúan sobre los diferentes órganos o tejidos, los cuales ejercen sus funciones peculiares en función de la información que reciben.

En situación de reposo, los componentes de ambos sistemas trabajan conjuntamente para mantener la estabilidad del organismo. Las alteraciones en el medio externo o en el propio medio interno del organismo desencadenan una serie de procesos que tienden a restablecer el equilibrio general o a instaurarlo a otro nivel. Dentro del propio sistema endocrino existe una coordinación funcional entre los distintos componentes que lo constituyen. Las hormonas hipotalámicas transportadas por los vasos porta-hipofisarios regulan la secreción de las hormonas adenohipofisarias, que a su vez controlan el funcionamiento de las glándulas periféricas. La integración entre las hormonas adenohipofisarias y las segregadas por las glándulas periféricas tiene lugar a través de mecanismos homeostáticos, entre los cuales los de retroacción negativa ocupan un lugar importante. En este tipo de mecanismo, el control se consigue por medio de una ordenación jerárquica: hipotálamo → hipófisis anterior → glándula endocrina periférica → célula afectora, pudiéndose ejercer el mecanismo de retroacción a nivel

de hipófisis, de hipotálamo o en ambos niveles.

El grado de actividad de un eje endocrino, tal como se ha definido, puede alterarse al cambiar la actividad funcional de una glándula endocrina ajena a él. Así, en situación de stress donde está muy estimulada la secreción de ACTH se produce una inhibición del 60-70 % en la secreción de TSH como respuesta a la tiroidectomía (Fortier y cols. 1970). En ausencia de niveles normales de insulina se produce una disminución en el "set-point" del mecanismo de feed-back" existente entre las hormonas tiroideas y la hormona tirotrópica (González y cols., en prensa). Esto nos lleva a considerar que en un mismo proceso endocrino pueden estar involucradas más de una hormona, y que en todo estudio de acción hormonal hay que considerar el balance e interacción de las posibles hormonas que pueden estar implicadas en un mismo proceso fisiológico. El definir cualitativa y cuantitativamente esta participación es sin duda uno de los aspectos más difíciles e importantes de la endocrinología.

En este contexto, la finalidad principal de la presente tesis fue llegar a conocer lo más ampliamente posible cómo la insulina influye sobre el sistema hipotálamo-hipófisis en cuanto a secreción de hormona de crecimiento, para tratar de comprender el mecanismo por el cual la insulina resulta indispensable para el crecimiento normal del animal en desarrollo. Un mejor conocimiento de esta interrelación puede ser importante para comprender en qué modo la hormona de crecimiento y la insulina actúan sobre el crecimiento.

Una forma de aproximarnos a la resolución de estos problemas, fue estudiar los cambios que la falta de niveles normales de insulina inducen sobre crecimiento, así como sobre el conte-

nido de GH en plasma e hipófisis. Para poder llevar a cabo la investigación propuesta, fue esencial poder medir las variaciones cuantitativas de GH tanto en plasma e hipófisis de los animales experimentales. Para ello, dispusimos de todo el material necesario para el desarrollo del radioinmunoensayo de GH en rata, que nos fue suministrado gratuitamente por el Instituto de la Salud Pública de los Estados Unidos.

Una vez montado el RIA de GH en rata, realizamos un estudio preliminar para conocer las variaciones de hormona de crecimiento en plasma e hipófisis a lo largo del día, lo cual nos permitiría escoger el tiempo más conveniente para el sacrificio de los animales, así como el determinar las características de una población de datos de GH, como eran valor medio y grado de dispersión de los mismos. Los resultados de este experimento pusieron de manifiesto que la secreción hipofisaria de GH en ratas macho no es constante a lo largo del día. El estudio de los niveles de GH en plasma indica que existen dos fases secretoras de la hormona, la primera comprendida entre las 9 y las 12 del mediodía, y otra mucho más intensa que tiene lugar entre las 19:30 y las 21 horas, mientras que entre la medianoche y las 6 hrs y entre las 13:30 y las 16:30 se observan los niveles más bajos. El contenido de GH en hipófisis presenta asimismo valores más altos durante dos períodos del día, los cuales coinciden con la elevación de los niveles circulantes de la hormona en plasma. El hecho de que entre las 9 y las 11 horas los niveles de GH se mantienen constantes, nos decidió a elegir este intervalo como el más conveniente para realizar el sacrificio de los animales. Por otra parte, estos resultados evidenciaron que los datos de GH en plasma en un mismo grupo experimental, cuyos animales habían estado sometidos a idénticas condiciones ambientales, se caracterizaban por presentar una gran dispersión.

A continuación, iniciamos el estudio propiamente dicho de las alteraciones causadas por la falta de insulina, o de las consecuencias metabólicas que ello implica, sobre el crecimiento y la función hipofisaria en cuanto a síntesis y secreción de GH, cuyas principales conclusiones se exponen a continuación:

2º) La disminución en la disponibilidad de insulina en la rata, influye sobre el peso corporal así como sobre el contenido de hormona de crecimiento en hipófisis. Los animales diabéticos a las 48 horas de la administración del STZ presentan un contenido de GH en hipófisis menor que el existente en controles, intensificándose las diferencias a medida que avanza la enfermedad. Junto con estas alteraciones se observa una atrofia de los testículos y del tiroides, por el contrario, las adrenales de las ratas diabéticas son de mayor tamaño. Es fácil comprender la gran variedad de alteraciones fisiológicas y metabólicas que la falta de insulina induce sobre el organismo.

3º) El efecto de la diabetes sobre el contenido de GH en hipófisis se puede explicar por los resultados del experimento en que se estudió la incorporación de leucina- H^3 a hipófisis incubadas in vitro, en el que la GH sintetizada de novo se cuantificó por inmunoprecipitación. Los resultados de este experimento, demostraron que el tejido hipofisario procedente de la rata diabética tiene una capacidad reducida para sintetizar GH- H^3 respecto al tejido del animal control.

4º) El efecto de la administración de insulina sobre el contenido de GH en hipófisis de ratas diabéticas pone de manifiesto el efecto positivo que sobre este parámetro ejerce la insulina, siendo este efecto tanto más intenso cuanto más alta es la dosis

de hormona administrada. Sin embargo, el conjunto de estos resultados no permiten concluir si el efecto positivo de la insulina sobre el contenido hipofisario de GH es el resultado de un aumento en la capacidad de las células somatotropas para sintetizar GH, de un aumento en el número de dichas células, o bien una combinación de ambos.

5^a) A pesar de la falta de disponibilidad de niveles normales de insulina, las ratas diabéticas mantienen niveles circulantes de GH medidos por RIA, al menos hasta los 27 días después de la administración del STZ, dentro del rango de la normalidad. Por ello, se concluye que las alteraciones en el crecimiento observadas en este síndrome, no están causadas por una reducción en los niveles circulantes de GH. No hemos de olvidar que el RIA mide la capacidad inmunológica de la hormona en estudio y no su actividad biológica y puede darse el caso de que ambas no vayan en el mismo sentido.

6^a) Dado que no existen diferencias significativas en los niveles plasmáticos de GH en las ratas diabéticas tratadas con salino o con dosis crecientes de insulina (1.2 ó 3 U de insulina/100 gramos de peso), y puesto que el tratamiento con insulina produjo un aumento de peso en el animal diabético proporcional a la dosis de hormona administrada, se concluye que la hormona de crecimiento requiere la presencia de insulina para ejercer sus efectos biológicos sobre el crecimiento.

Estas dos últimas conclusiones están de acuerdo con los resultados de Phillips y Young (1976) y Daughaday y cols. (1975). Los primeros autores hallaron que los niveles circulantes de somatomedina en las ratas diabéticas a las 48 horas de la administración del STZ, no sólo eran inferiores que los de la pobla-

ción control, sino que incluso se hallaban por debajo de los existentes en ratas hipofisectomizadas. Por otra parte, Daughaday y cols. (1975) observaron que la GH requería la presencia de insulina para ejercer su acción a nivel hepático sobre la formación de somatomedina.

Tanto el hipotiroidismo como la diabetes son situaciones en las que se produce una reducción en el contenido hipofisario de GH. Sin embargo, mientras que el animal hipotiroideo mantiene niveles bajos de hormona circulante, los observados en ratas diabéticas son semejantes a los existentes en el grupo control. Tratando de comprender el mecanismo por el cual el animal diabético a pesar de su bajo contenido de GH en hipófisis mantiene sin embargo niveles normales en plasma, estudiamos por una parte la capacidad inmunológica de la sustancia que estamos valorando por RIA, así como ciertos parámetros cinéticos de la GH en plasma de ratas controles y diabéticas.

7^o) Los resultados del experimento en que se estudió la capacidad inmunológica de la GH en plasma pusieron de manifiesto que diluciones sucesivas del plasma de rata control y diabética producían un desplazamiento de la GH-I¹²⁵ unida al anticuerpo proporcional a la cantidad de plasma añadido al medio, y la relación dosis-respuesta de cada uno de los plasmas era paralela entre sí y paralela a la curva patrón. Lo que indica que tanto en el plasma del animal control como en el del diabético, hay una sustancia que tiene un comportamiento inmunológico análogo al de la GH purificada que constituye la curva standard.

Teniendo en cuenta que los niveles de una hormona en plasma son el resultado de la velocidad con que la hormona pasa

desde su glándula productora al plasma, así como de la velocidad con que la hormona es retirada de la circulación a través de los procesos de metabolización y degradación de la misma, realizamos un estudio para determinar tanto la velocidad de secreción hipofisaria de GH como la de aclaramiento metabólico de la hormona, con la esperanza de que la alteración en alguno de éstos parámetros cinéticos pudiese justificar los niveles normales de GH hallados en el animal insulinooprivo. La técnica seguida en este estudio fue medir la cantidad de GH* inmunoprecipitable en plasma a distintos tiempos después de la administración de una única inyección intravenosa de GH*. El empleo de los valores de la radioactividad inmunoprecipitable en plasma para el cálculo del MCR, exigía que la GH* sufriera en plasma las mismas transformaciones que la GH endógena. Para comprobar este punto, se estudió el patrón cromatográfico en Sephadex G-100 de la GH endógena y de la GH marcada. Estos resultados, indicaron que tanto en ratas controles como en diabéticas, la hormona endógena y la radioactiva aparecen distribuidas en dos zonas, una que coincide con el lugar donde eluye la GH* durante el proceso de purificación y otra que corresponde a una forma de mayor peso molecular y que eluye con anterioridad. Actualmente se desconoce si esta forma es el resultado de una polimerización de la forma monómera de GH o si representa la unión a una proteína plasmática. Esta distribución de la GH en plasma, tanto de la endógena como de la radioactiva plantea serios problemas a los cuales nos hemos referido en la discusión y que sin duda serán objeto de una investigación futura. El hecho de que ambas formas de GH al reaccionar con el anticuerpo a la dilución usada para inmunoprecipitación presentaran el mismo porcentaje de inmunoprecipitación, nos permitió usar esta técnica para el cálculo de los parámetros cinéticos.

8^a) Encontramos que dependiendo del modo en que se expresase la velocidad de aclaramiento de la GH en plasma, este parámetro era inferior en las ratas diabéticas que en los controles, lo cual puede explicar al menos en parte que en condiciones basales no se encuentren diferencias entre los niveles circulantes de GH en ratas controles y diabéticas. Si la reducción en el MCR hubiera sido suficiente para explicar la mayor permanencia de la hormona en el plasma del animal diabético, ello debería quedar reflejado en el cálculo de la vida media. El valor hallado para dicho parámetro fue de 7 minutos en controles y 8 minutos en diabéticas, diferencias que no fueron significativas.

9^a) Los estudios en que por razones metodológicas las ratas tenían que estar bajo anestesia, se observó que en estas condiciones los niveles circulantes de GH en ratas diabéticas son superiores a los observados en el grupo control. La anestesia por éter, bien a través del stress que induce o por algún mecanismo desconocido disminuye la secreción hipofisaria de GH y este efecto es más intenso en los animales controles que en los diabéticos.

10^a) El cálculo de la velocidad de secreción hipofisaria de GH viene dado por el producto del MCR y la concentración endógena de la hormona en plasma. El hecho de que bajo anestesia, las ratas diabéticas presenten niveles de GH en plasma más altos que en controles, hizo que el valor de este parámetro fuese superior en los animales insulinoprivos que en los controles. De estos resultados se concluyó que bajo el stress de la anestesia la falta de disponibilidad de insulina aumenta la secreción hipofisaria de GH. Se desconoce el mecanismo por el que en esta situación la secreción se halla aumentada, pero dado que la se-

creción hipofisaria de GH se halla bajo el control hipotalámico de dos factores de acción contrapuesta, uno estimulador y otro inhibidor (somatostatina), es posible que la carencia de niveles normales de insulina altere el nivel al cual actúan ambos factores, bien favoreciendo la actividad del factor estimulador, disminuyendo la del inhibidor o bien favoreciendo ambas situaciones.

En un intento de obtener un valor aproximado de lo que sería la secreción hipofisaria de GH en condiciones basales, utilizamos los valores endógenos de GH de un gran número de ratas controles y diabéticas sacrificadas con guillotina, en estas condiciones encontramos que la secreción hipofisaria de GH en el animal diabético era ligeramente inferior a la del animal control aunque las diferencias no eran significativas.

11^a) De acuerdo con la anterior conclusión, observamos que bajo anestesia, la respuesta en la secreción hipofisaria de GH al pentobarbital es significativamente mayor en los animales diabéticos que en los controles. Estos resultados, nos llevan a concluir que el tejido hipofisario del animal diabético presenta una mayor sensibilidad a los estímulos que inducen la secreción de GH que el de los animales controles. Hemos de tener en cuenta que como de nuevo los animales se hallaban bajo anestesia con éter, la mayor respuesta observada en el animal insulinooprivo puede ser el resultado de dos efectos: el menor descenso en los niveles circulantes ocasionado por el éter junto con el aumento en dichos niveles originado por la inyección de pentobarbital.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la falta de niveles normales de insulina, o alguna de las alteracio-

nes metabólicas que ello conlleva, tiene serias repercusiones sobre la síntesis hipofisaria de hormona de crecimiento y sobre algunos de los efectos periféricos de la hormona. Durante su realización, han surgido una serie de problemas que estimulan a proseguir en este estudio y a profundizar en el campo de la interrelación y coordinación entre hormona de crecimiento e insulina sobre el crecimiento y desarrollo.

VI. BIBLIOGRAFIA
=====

- Altszuler, N., Steele, R. Rathgel, I. y de Bodo, R. C.
In Growth hormone, Proceeding of the First International
Symposium, edited by A. Pecile and E. E. Muller. Amsterdam:
Excerpta Medica Foundation, p. 309, 1968.
- Anderson, E. y Haymaker, W. Proc. Am Diabetes Assoc. 9: 47, 1949.
- Antoniades, H. N. Endocrinology, 96:799, 1975.
- Arison, R. N., Ciaccio, E. I., Glitzer, M. S., Casaro, A. B.,
y Pruss, M. P. Diabetes 16: 51, 1967.
- Armin, J., Grand, R. T. y Wright, P. H. J. Physiol. 153: 146,
1960.
- Arnuold, Y., Cantraine, F., Coms, H. A., Delcroix, C. y Frank-
son, J. R. M. Arch. Int. Pharmacodyn 166: 225, 1967.
- Aschner, B. Arch. Ges. Physiol, 146: 1, 1912.
- Bala, R. M., Ferguson, K. A. y Beck, J. C. Endocrinology, 87:
506, 1970.
- Balasse, E., Couturier, E. y Franckson, J. R. M. Diabetologia
3: 488, 1967.
- Balasse, E. y Doms, H. A. Rev. Franc. Etudes Clin. Biol. 13:
62, 1968.
- Barlett, P. D., y Gaebler, O. H. J. Biol. Chem. 196: 11, 1952.
- Beitins, I. Z., Rattazzi, M. C. y MaGlillivray, M. H. Endocri-
nology, 101: 350, 1977.
- Bennet, L. L. y Koneff, A. A. Anat. Rec. 96: 1, 1946.
- Bernard, C. Compt. Rend. Soc. Bio. 1: 14, 1849.
- Berson, S. A. y Yalow, R. S. J. Biol. Invest. 38: 1996, 1959.
- Berson, S. A. y Yalow, R. S. Am J. Med. 30: 623, 1971.
- Bierring, E. y Nielsen. Biochem. J. 26: 1015, 1932.

- Birge, C. A., Peake, G. T., Mariz, I. y Daughaday, W. H. Endocrinology, 81: 195, 1967.
- Bivens, D. H., Lebovitz, H. E. y Feldman, J. M. N. Engl. J. Med. 289: 236, 1976.
- Boden, G. J., Soeldner, S., Gleasen, R. W. y Marble, A. J. Clin. Invest., 47: 729, 1968.
- Boivin, A., Vendreley, R., y cols. C. R. Acad. Sci. (Paris) 226: 1061, 1948.
- Boucher, B. J. Nature, (London) 210: 1288, 1966.
- Burek, C. L. y Frohman, L. A. Endocrinology, 86: 1361, 1970.
- Brown, G. H. y Reichlin, S. Psychosomat. Med. 34: 45, 1972.
- Cameron, D. P., Burger, H. G., Catt, K. J. y Doig, A. J. Clin. Invest. 48: 1600, 1969.
- Campbell, J. The hypophyseal Growth hormone, Nature and Actions. Edited by R. W. Smith, Jr., O. H. Gaebler and C. N. H. Long. New York: Mc Graw-Hill, p. 270, 1955.
- Campbell, J. y Rastogi, K. S. Diabetes, 15: 749, 1966.
- Campbell, G. A., Kurcz, M. Marshall, S. y Meites, J. Endocrinology, 100: 580, 1977.
- Cannon, W. B. Bodily Changes in Pain Hunger and Rage. D. Appleton, Co., New York, 1920.
- Carlson, H. E., GIBLIN, J. C., Gorden, P. y Snyder, F. J. Clin. Endocrinol. Metab. 34: 1102, 1972.
- Cerchia, G. M., Moss, G. S., Popivichi, P. A. Butler, E. y Siegel, D. C. Endocrinology, 88: 138, 1971.
- Coble, Y. D., Jr., Kohler, P. O., Carguille, C. M. y Ross, G. T. J. Clin. Invest. 48: 359, 1969.
- Condliffe, P. G., y Edelhoeh, H. In Growth Hormone. Proceedings

of the First International Symposium. Milan, Italia. 1967. p. 38. Edited by A. Pecile and E. E. Muller. Excerpta Medica Foundation.

- Conti, C., Negri, M., Isidori, A., Recchia, O. y Sereno, L. Folia Endocrinol. (Roma) 15: 721, 1962.
- Contopoulos, A. N., Simpson, M. E. y Koneff, A. A. Endocrinology, 63: 642, 1958.
- Contopoulos, A. N. y Koneff, A. A. Acta Endocrinologica, 42: 275, 1963.
- Costrini, N. V., Jacobson, M. y Kalkhoff, R.K. Diabetes, 18: 322, 1969.
- Crowe, S. I., Cushing, H. y Homans, J. Bull. Johns Hopkins Hosp. 21: 127, 1910.
- Chambers, J. W. y Brown, G. M. Endocrinology, 98: 420, 1976.
- Chang, A. Y. y Schneider, D. I. Diabetes, 20: 71, 1971.
- Cheek, D. B., Brasel, J. A. y cols. In Human Growth. Cheek, D. B. (ed), Philadelphia Lea and Febiger, 1968.
- Chernick y Scow, R. O. Diabetes, 8: 132, 1959.
- Christensen, N. J. Diabetes, 23: 1, 1978.
- Daughaday, W. H., Peake, G. T., Birge, C. A. y Mariz, I. K. In Pecile A., and E. Muller (eds), Excerpta Medica, Amsterdam, 1958, p. 238.
- Daughaday, W. H., Laron, Z., Pertzalan, A., y Heins, J. N. Tras. Assoc. Am. Physicians, 82: 129, 1969.
- Daughaday, W. H., Peake, G. T. y Machlin, L. J. In hypophysiotropic hormones of the hypothalamus. Edited by J. Meites. Baltimore. Williams and Wilkins. p. 151, 1970.
- Daughaday, W. H. y Garland, J. T. Growth and Growth Hormone. Proc. 2nd Int. Symp. on Growth Hormone, 1971. Milan Pecile, A.,

- and Mullen, E. E., Eds. ICS, 244: 408 Amsterdam, Excerpta Med. 1972, p. 511.
- Daughaday, W. H. Adv. Metab. Disor., 8: 159, 1975.
 - Daughaday, W. H., Phillips, L. S., y Mueller, M. C. Endocrinology, 98: 1214, 1976.
 - Davidson, J. N. y Leslie, I. Cancer Res. 10: 587, 1950.
 - Drash, A., Field, J. B., Graves, L. Y., Kenny, F. M., Mintz, D., y Vazquez, A. M. Pediat. Res., 2: 94, 1968.
 - Deller, J. J., Jr. Am. J. Med. Sci. 259: 292, 1970.
 - DeLuca, H. F., y Cohen, P. P. In Manometric Techniques, edited by W. W. Umbreit, R. H. Burris and J. F. Stauffer, p. 131, Burgess Publishing Company. Mineapolis, Minnesota. 1964.
 - Devecerski, M. S. y Frawley, T. F. Endocrinology, 73: 386, 1963.
 - Dickerman, E., Negro-Vilar, A. y Meites, J. Endocrinology, 84: 814, 1969.
 - Downie, N. M. y Heath, R. W. Ed. Del Castillo, S. A. Madrid, 1971, pag. 232.
 - Dunn, J. S. y McLetchien, G. B. Lancet, 2: 384, 1943.
 - Dunn, J. D., Schindler, W. J., Hutchins, M. D., Scheving, L. E. y Turpen, C. Neuroendocrinology, 13: 69, 1973/74.
 - Durand, D., Martin, J. B. y Brazeau, P. Endocrinology, 100: 722, 1977.
 - Eisenberg, R. M., Sorrentino, S. y Knigge, K. M. Neuroendocrinology, 10: 58, 1972.
 - Enesco, M. y LeBlond, C. P. J. Embryiol. Exptl. Morphol. 10: 530, 1962.
 - Evans, H. M. y Long. J. A. Anat. Record, 21: 61, 1921.

- Evans, H. M. y Long, J. A. *Anat. Record*, 23: 19, 1922.
- Evans, H. M., Simpson, M. E. y Li, C. H. *Growth*, 12: 15, 1948.
- Evans, E. S., Rosenberg, L. L., Evans, H. B. y Koneff, A. A. *Endocrinology*, 74: 770, 1964.
- Fajans, S. S., Knof, R. F., Floyd, Jr. J. C., Power, L. y Conn, J. W. *J. Clin. Invest.* 42: 216, 1963.
- Farina, J. M. S., Chieri, R. A., Basabe, J. C., Foglia, V. G. *Fert. Steril*, 22: 794, 1971.
- Farquhar, M. G. *Trans NY Acad. Sci.*, 23: 346, 1961.
- Finkelstein, J. W., Roffwarg, H. P., Boyar, R. M. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35: 665, 1972.
- Foglia, V. G. *Rev. Soc. Argen. Biol.* 21: 45, 1945.
- Foglia, V. G., Mancini, R. E. y Cardeza, A. F. *Rev. Soc. Argen. Biol.* 24: 114, 1948.
- Foglia, V. G., Borhelli, R. F., Chieri, R. A., Fernández-Collazo, E. L., Spinder, I., Weseley, O. *Diabetes*, 12: 231, 1963.
- Foglia, V. G., Rosner, J. M., Cattaneo de Peralta Ramos, M., Lema, B. E. *Horm. Metab. Res.* 1: 72, 1969.
- Fussganger, R. D., Hinz, M., Goberna, R. Karsten, C., Pfeiffer E. F. y Raptis. *Horm. Metab. Res. Suppl.* 1: 34, 1964.
- Fuxe, K. *Acta Physiol. Scand.* (Supp 247) 64: 39, 1965.
- Fuxe, K. y Hokfelt, T. In Stutusky, F. (ed) *Neurosecretion*, IV International Symposium of Neurosecretion, Springer-Verlag Berlin, 1967, p. 165.
- Floyd, J. C., Jr., Fajans, S. S., Knopf, R. F. y Conn, J. W. *J. Clin. Invest.*, 42: 1714, 1963.
- Frank, T. Y. L., Hsien, S. L. y Donald, C. J. *Endocrinology*, 91: 1172, 1972.

- Frantz, A. C. y Rabkin, M. T. J. Clin. Endocrinol. Metab., 25: 1470, 1965.
- Fregly, M. J., Baker, M. I. y Gennaro, Jr. J. F. Am. J. Physiol. 198: 4, 1960.
- Friesen, H., Guyda, H. y Hardy, J. J. Clin. Endocrinol. Metab. 31: 611, 1970.
- Frohman, L. A. y Bernardis, L. L. Endocrinology, 86: 305, 1970.
- Frohman, L. A., Burek, L. y Stachura, M. E. Endocrinology, 91: 262, 1972.
- Galskov, A. Acta Endocrinologica, v. 69, supl 162, 1972.
- Geschwind, I. I., y Li, C. H. Endocrinology, 63: 449, 1958.
- Goodman, H. M., y Knobil, E. Endocrinology, 65: 451, 1959.
- Goodman, H. M. Endocrinology, 76: 216, 1965.
- Goodman, H. M. Ann. N. Y. Aca. Sci. 148: 419, 1968.
- Goodman, A. D., Tanenbaum, R. y Rabinowitz, D. J. Clin. Endocrinol. Metab. 35: 868, 1972.
- Goodner, C. J., Freinkel, N. J. Clin. Invest. 40: 261, 1961.
- Guest, C. M. Diabetes, 2: 415, 1953.
- Glick, S. M. y Goldsmith, S. In Pecile, A. y E.E. Muller (eds) Growth Hormone. Excerpta Medica, Amsterdam, 1968, p 84.
- Glick, S. M. Ann. N. Y. Acad. Sci. 148: 471, 1968.
- Glick, S. M. In: Frontiers in Neuroendocrinology edited by W. F. Gannong and L. Martin. London. Oxford. p. 141, 1969.
- Glick, S. M. J. Clin. Endocrinol. Metab. 30: 619, 1970.
- Grant, D. B., Hambley, J., Becker, D. y Pimstone, B. L. Arch. Dis. Child. 48: 596, 1973.
- Gray, Ch. H. Ciba Found. Coll. Endocr. 6: 318, 1953.

- Greenwood, F. C., Hunter, W. M. y Glover, J. S. *Biochem. J.* 89: 114, 1963.
- Grodsky, G. M., Landahl, H., Curry, D. y Bennett, L. In: *Structure and Metabolism of the pancreatic islets*, edited by S. Falkmer, B. Hellman, and I. B. Taljedal. Oxford Pergamon Press. p. 409, 1970.
- Hales, C. N. y Randle, P.J. *Biochem. J.*, 88: 137, 1963.
- Hall, K. y Uthne, K. *Acta Med. Scand.* 190: 137, 1971.
- Hansen, Aa.P. *J. Clin. Invest.* 49: 1467, 1970.
- Hansen, Aa.P. y Johansen, K. *Diabetologia*, 6: 27, 1970
- Hazelwood, R. L. y Hazelwood, B. S. *Am J. Physiol*, 206: 1137, 1964.
- Hertelendy, F. y Kipnis, D. M. *Endocrinology*, 92, 402, 1973.
- Hervás, F., Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F. *Endocrinology*, 97: 91, 1975.
- Hervás, F. Morreale de Escobar, G. y Escobar del Rey, F. *Endocrinology*, 98: 77, 1976.
- Houssay, B. A. y Foglia, V. G. *Rev. Soc. Argent. Biol*, 22: 329, 1946.
- Howard, N. y Martin, J. M. *Endocrinology*, 88: 497, 1971.
- Howland, B. E. y Zebrowski, E. J. *J. Reprod. Fert.*, 31: 115, 1972.
- Howard, N. y Martin, J. M. *Endocrinology*, 91: 1513, 1972.
- Hugget, A. St. y Nixon, D. A. *Lancet*, 2: 368, 1957.
- Hunter, W. M. y Rigal, W. M. *J. Endocrinol*, 34: 147, 1966.
- Ieiri, T. *Jap. J. Physiol.* 21: 551, 1971.
- Irisawa, S. Shirai, M. Matsushita, S., Kagayama, M. Ichijo, S. *Tohokn, J. Exp. Med.*, 88: 311, 1966.
- Jacobson, T. *Acta Endocrinol (Kbh) suppl.* 41: 29, 1958.

- Johansen, K. y Hansen, Aa. P. Brit. Med. J. 2: 356, 1969.
- Jolin, T. y Montes, A. Hormone Res., 5: 199, 1974.
- Jolin, T. y Montes, A. Endocrinology, 94: 1502, 1974.
- Jolin, T., Tarin, M. J. y García, M. D. Acta Endocrinologica 75: 734, 1974.
- Jolin, T y González, C. Acta Endocrinologica, 88: 506, 1978.
- Jones, A. E., Fisher, J. N., Lewis, V. J. y Vanderlaan, W. P. Endocrinology, 76: 578, 1965.
- Junod, A., Lambert, A. E., Orci, L. Picthet, R., Gonet, A. E. y Renold, A. E. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 126: 201, 1967.
- Junod, A., Lambert, A. E., Stauffacher, W. y Renold, A. E. J. Clin. Invest., 48: 2129, 1969.
- Kaplan, S. L. y Grumbach, M. M. Excerpta Med. Found. Intern. Congr. Ser. 244 p. 382, 1972.
- Kaplan, S. L., Gurrpide, E, Seiarra, J. J. y Grumbach, M. M. J. Clin. Endocr., 28: 1450, 1968.
- Kaplan, S. L., Grumbach, M. M. y Shepard, T. H. J. Clin. Invest., 51: 3080, 1972.
- Karunanayake, E. H., Hearse, D. J. y Mellows, G. Diabetologia, 12: 483, 1976.
- Kawaguchi, T. y Matsushita, H. Endocrinology, 96: 409, 1975.
- Kipnis, D. M., Hertelendy, F. y Machlin, L. J. In Progress in Endocrinology, edited by C. Gual. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation, p. 601, 1969.
- Kohler, P. O., Ross, G. T. y Odell, W. D. J. Clin. Invest., 47: 38, 1968.
- Kojima, M. Quart, J. Expel. Physio., 11: 320, 1917.

- Kokka, N., García, J. F., George, R. y Elliot, W. H. *Endocrinology*, 90: 735, 1972.
- Koneff, A. A., Scow, R. O., Simpson, M. E., C. H. Li, y Evans, H. M. *Anat. Record.*, 104, 465, 1949.
- Kostrup, K. W., Andersen, H. y Hanssen, F. K. *Acta Paediatr. Scand.* 64: 613, 1975.
- Kostyo, J. L. *Metab.*, 23: 885, 1974.
- Knopf, R. F., Fajans, S. S., Floyd, Jr., K. C. y Conn, J. W. *J. Clin. Endocrinol.*, 23: 579, 1963.
- Krulich, L. y Mc Cann, S. M. *Endocrinology*, 85: 319, 1969.
- L'Age, M., Langholz, J., Fechner, W. y Salzmann, H. *Endocrinology*, 95: 769, 1974.
- Lal, S., Tolis, G., Martin, J. B., Brown, G. M. y Guyda., H. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 41: 703, 1975.
- Lambert, A. E., Jeanrenaud, B., Junod, A. y Renold, A. E. *Biochem. Biophys. Acta.*, 184: 540, 1969.
- Laron, Z., Mannheimer, S. y Guttman, S. *Natur*, (London) 207, 298, 1965.
- Laron, Z., Pertzalan, A. y Mannheimer, S. *Isr. J. Med. Sci.*, 2: 152, 1966.
- Laron, Z., Pertzalan, A., Karp, M. Kowaldo-Silbergeld, A., y Daughaday, W. H. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33: 332, 1971.
- Lawrence, A. M., Contopoulos, A. N. y Simpson, M. E. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 99: 35, 1958.
- Lee, M. O. y Schaffer, N. K. *J. Natr.*, 7: 337, 1934.
- Lee, M. O. y Ayres, G. B. *Endocrinology*, 20: 489, 1936.
- Lee, K. L., Bowers, C. Y. y Neal Miller, O. *Endocrinology*, 83: 754, 1968.

- Lederer, J. y Bataille, J. *Ann. Endocrinol.*, 27: 228, 1966.
- Lentle, B. C., y Thomas, J. P. *Lancet*, 3: 544, 1964.
- Levin, L. y Farber, R. F. *Recent Progr. Hormone Res.*, 7: 399, 1952.
- Lewis, V. J., Cheever, E. V. y VanderLaan, W. P. *Endocrinology*, 76: 362, 1965.
- Li, C. H. y Evans, H. M. *Recent Progr. Hormone Res.*, 3: 3, 1948.
- Li, C. H., Simpson, M. E. y Evans, H. M. *Growth*, 13: 171, 1949.
- Li, C. H. In *Growth Hormone* (A. Pecile and E. E. Muller eds. Amsterdam, p. 3) 1968.
- Li, C. H. In *Growth hormone* (A. Pecile y E. E. Muller eds. *Excerpta Medica Amst.* p. 17, 1972.)
- Liewendahl, K. y Helenius, T. *Clinica Chimica Acta*, 72: 301, 1976.
- Like, A. A., Steike, J., Jones, E. E. y Cahill, G. F. *Am. J. Pathol.*, 46: 621, 1965.
- Ling, N., Burgus, R., Rivier, J., Vale, W. y Brazeau, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50: 127, 1973.
- Lipman, R. L., Taylor, A. L., Conly, P. y Mintz, D. H. *Diabetes*, 21: 175, 1972.
- Loftus, L., Cuppage, F. E. y Hoogstraten, B. J. *Lab. Med.*, 84: 407, 1974.
- Long, C. N. H. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 43: 383, 1943.
- Luft, R., Cerasi, E. y Werner, S. *Hormone Metab. Res.* 1: 111, 1969.
- Lukens, F. D. *Proc. Am. Diabetes Assoc.* 10: 103, 1950.
- Lukens, F. D. W. y Mc Cann, S. *Nature and Actions*. New York:

Mc Graw, 225, 1955.

- Lundbaek, K., Christensen, N. J., Jensen, V. A., Johansen, K., Olsen, T. S., Hansen, Aa. P., Ørskov, H. y Osterby, R. Lancet, 2: 131, 1970.
- MacGillivray, M. H., Frohman, L. A. y Doe, J. J. Clin. Endocrinol. Metab., 30: 632, 1970.
- MacLeod, R. M. y Abad, A. Endocrinology, 83: 799, 1968.
- MacLeod, R. M. Endocrinology, 85: 916, 1969.
- Madison, L. L., Mebane, D., Unger, R. H. y Lochner, A. J. Clin. Invest., 43: 408, 1964.
- Malacara, J. M., Valverde, R. y Reichlin, S. Endocrinology, 91: 1189, 1972.
- Mann, G. V. y Goddard, J. W. Amer. J. Path. 27: 857, 1950.
- Mansford, K. R. L. y Opie, L. Lancet, 1: 670, 1968.
- Martin, L. G., Clark, J. W. y Connor, T. B. J. Clin. Endocrinol. Metab., 28: 425, 1968.
- Martin, J. B., Kontor, J. y Mead, P. Endocrinology, 92: 1354, 1973.
- Martin, J. B. In Raiti, S. (ed) Proceeding of the NIH Symposium on Growth Hormone, NIH Publication, n. 74-612, 1974, p. 223.
- Martin, J. B. In Martin, L. y Gannong, W. F. (eds), Frontiers in Neuroendocrinology, vol. 4, Raven Press, 1976, p. 129.
- Martin, J. B., Durand, D., Gurd, W., Faille, G. Andet, J. y Brazeau, P. Endocrinology, 102, 106, 1978.
- Matsuzaki, S. Endocrinol. Japon., 17: 379, 1970'
- Meier, H. Diabetes, 9: 485, 1960.
- Meites, J. y Fiel, N. J. Endocrinology, 77: 455, 1965.
- Meldolesi, J., Marini, D. y Demonte Marini, M. L. Endocrinology,

- 91: 802, 1972.
- Merimee, T. J., Fineberg, S. E. y Tyson, J. E. *Metabolism*, 18: 916, 1969.
 - Midgley, A. R. Fr., Niswender, G. D. y Rebar, R. W. *Acta Endocrinologica* supl. 142, p. 163, 1969.
 - Mirouze, J., Cristol, P., Jaffiol, C., Badach, A. y Stingher, A. *Ann. Endocrinol.*, 23: 481, 1962.
 - Mirsky, A. E. y Ris, H. *Nature*, 163: 666, 1949.
 - Montes, A., Hervás, F. y Jolin, T. *Hormone Research*, 8: 148, 1977.
 - Montoya, E., González, C., Lamas, L. y Jolin, T. *Acta Endocrinologica*, 88: 721, 1978.
 - Moore, F. J., Cramer, F. B. y Knawels, R. C. *The Blakistan, Co., New York*, 1951.
 - Murakami, B., Shimada, T. y Miyamoto, T. *Endocrinologia*, 62: 257, 1973.
 - Navalesi, R., Pilo, A y Vigneri, R. *Diabetes*, 24: 317, 1975.
 - Nataf, B. M. y Chaikoff, I. L. *Biochem. Biophys. Acta*, 111:422, 1965.
 - Noall, M. W., Riggs, T. R., Walker, L. M. y Christensen, H. N. *Science*, 126: 1002, 1957.
 - Odell, W. D., Abraham, G., Raud, H. R. Swerdcoff, R. S. y Fisher, D. A. *Acta Endocrinologica Supl.* 142: 54, 1969.
 - Parker, M. L., Utiger, R. D. y Daughaday, W. H. *J. Clin. Invest.* 41: 262, 1962.
 - Paul, W. E. y Odell, W. D. *Nature*, (London) 203: 979, 1964.
 - Payne, S. G. y Kostyo, J. L. *Endocrinology*, 87: 1186, 1970.
 - Peake, G. T., Mariz, I. K. y Daughaday, W. H. *Endocrinology*,

- 83: 714, 1968.
- Peake, G. T., Birge, C. A. y Daughaday, W. H. *Endocrinology*, 92: 487, 1973.
 - Peeters, S. y Friesen, H. G. *Endocrinology*, 101: 1164, 1977.
 - Pelkonen, R., Miettinen, T. A., Taskinen, M. R. y Nikkida, E. A. *Diabetes*, 17: 76, 1968.
 - Pericás, I. y Jolin, T. *Acta Endocrinologica*, 86: 128, 1977.
 - Pichet, R. L., Orci, L., Gonet, A. E., Roniller, C. y Renold, A. *Diabetologia*, 3: 188, 1967.
 - Pimstone, B. L., Wittmann, W., Hansen, J. D. L. y Murray, P. *Lancet*, 2: 779, 1966.
 - Pi-Sunyer, F. X., Campbell, R. G. y Hashim, S. A. *Metabolism*, 19: 263, 1970.
 - Pond, H. *Med. J.*, 46: 616, 1970.
 - Powell, G. F., Brasel, J. A. y R. M. Blizzard. *New Engl. J. Med.*, 276: 1271, 1967.
 - Pfeiffer, E. F. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 90: 855, 1962.
 - Pfeiffer, E. F., Fussganger, R., Hinz, M. y Raptis, S. In: *The structure and Metabolism of the pancreatic islets*, edited by S. Falkmer, B. Hellman, and I-B Taljedal. Oxford: Pergamon Press, p. 423, 1970.
 - Quabbe, H. J., Schilling, E. y Helge, H. J. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 26: 1173, 1966.
 - Rabinowitz, D., Merimee, T. J., Nelson, J. K., Schultz, R. B. y Burgess, J. A. In *Growth hormone*, edited by A. Pecile and E. E. Muller. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation. *Inter. Congr. Ser.*, 158: p. 105, 1968.
 - Rakienten, N., Rakienten, M. L., Nadkarni, M. V. *Cancer Chemoter.*

- Rep., 29: 91, 1963.
- Ray, R. D., Asling, C. W., Simpson, M. E. y Evans, H. M. Anat. Record, 107: 253, 1950.
 - Ray, R. D., Asling, C. W., Walder, D. E., Simpson, M. E., Li, C. H. y Evans, H. M. J. Bone Joint Surg. 30A: 94, 1954.
 - Reichlin, S. In the pituitary gland, edited by G. W. Harris and B. T. Donovan, 270: 1966.
 - Remington, M. S. y Levine, H. The J. Nutrition, 11: 343, 1936.
 - Remington, R. E. J. Nutrition, 13: 223, 1937.
 - Riggs, T. R. y Walker, L. M. J. Biol. Chem., 235: 3603, 1960.
 - Rillema, J. A., Kostyo, J. L. y Gimpel, L. P. Biochem. Biophys. Acta, 297: 527, 1973.
 - Roth, J., Glick, S. M., Yallow, R. S. y Berson, S. A. Metabolism., 12: 577, 1963.
 - Roth, J., Glick, S. M., Yallow, R. S. y Berson, S. A. Diabetes, 13: 355, 1964.
 - Roth, J., Gordon, P. y Pastan, I. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61: 138, 1968.
 - Rubenstein, A. H., Cho, S y Steiner, D. F. Lancet, 1: 1353, 1968.
 - Russell, J. A. Federation Proc., 14: 696, 1955.
 - Russell, J. A. Am. J. Clin. Nutr. 5: 404, 1957.
 - Ryle, A. P., Sanyer, F., Smith, L. F. y Kitai, R. Biochem. J. 60: 541, 1955.
 - Sadof, L. Cancer Chemother, Rep., 54: 457, 1970.
 - Salmon, T. N. Endocrinology, 23: 446, 1938.
 - Salmon, Jr., W. D. y Daughaday, W. H. J. Clin. Invest. 35: 733,

1956.

- Salmon, Jr., W. D. y Daughaday, W. H. J. Lab. Clin. Med., 49: 825, 1957.
- Salmon, W. D. J. Lab. Clin. Med., 56: 682, 1960.
- Salmon, W. D. J. Lab. Clin. Med., 56: 673, 1970.
- Salter, J. M. y Best, C. H. Federation Proc., 12: 122, 1953.
- Salter, J. M. y Best, C. H. Canad. J. Biochem. Physiol., 35: 913, 1957.
- Salter, J. M. y Best, C. H. Brit. Med. J., 2: 353, 1957.
- Sanger, F. y Tuppy, H. Biochem. J., 49: 463, 1951.
- Sanger, F. y Thompson, E. O. P. Biochem. J., 53: 366, 1953.
- Sanger, F. y Thompson, E. O. P. Biochem. J., 53: 353, 1953.
- Serif, G. S. y Sihotang, K. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 109: 950, 1962.
- Simpson, M. E., Asling, C. W. y Evans, H. M. Yale J. Biol. Med., 23: 1, 1950.
- Singh, V. N., y Cahikoff, I. L. Endocrinology, 78: 339, 1966.
- Sinha, Y. N., Salocks, C. B., Wickes, M. A. y Vanderlaan, W. P. Endocrinology, 100: 786, 1977.
- Sols, A. y De la Fuente, G. Rev. Esp. Fisiol., 13: 231, 1957.
- Somogyi, M. J. Biol. Chem. 160: 69, 1936.
- Suzuki, M. y Shibasaki. Endocrinol. Exper., 4: 187, 1970.
- Schalch, D. S. y D. M. Kipnis. J. Clin. Invest. 44: 2010, 1965.
- Schalch, D. S. y Reichlin, S. Endocrinology, 79: 275, 1966.
- Schalch, D. S. y Reichlin, S. In Growth hormone, edited by A. Pecile and E. E. Muller. Amsterdam. Excerpta Medica Foundation. Inter. Congr. Ser. 158 p. 211, 1968.

- Schally, A. V., Baba, Y., Nair, R. M. G. y Bennet. C. D. J. Biol. Chem. 246: 6647, 1971.
- Schmidt-Nielsen, K., Haines, H. B. y Hachel, D. B. Science, 143: 689, 1964.
- Schein, P. S., Alberti, K. G. y Williamson, D. H. Endocrinology, 89: 827, 1971.
- Schimpff, R. M., Donnadieu, M., Gourmelen, M y Girard, F. Horm. Metab. Res. 6: 494, 1974.
- Schoffling, K., Federlin, K., Ditschuneit, H., Pfeiffer, E. F. Diabetes, 12: 519, 1963.
- Scow, R. O. y Simpson, M. E. Anat. Record, 91: 209, 1945.
- Scow, R. O. Endocrinology, 60: 359, 1957.
- Scow, R. O. y Chernick, S. S. Recent. Progr. Hormone Res., 497: 1960.
- Smith, P. E. Science, 44: 280, 1916.
- Smith, P. E. Am. J. Anat., 45: 205, 1930.
- Smythe, G. A. y Lazarus, L. J. Clin. Invest. 54: 116, 1974.
- Snedecor, G. W. The Iowa State University Press. Amer. Iowa, U.S.A., 1956.
- Sperling, M. A., Wollensen, F. y Delamater, P. V. Diabetologia, 9: 380, 1973.
- Steiner, D. F. Vitam. Horm. 24: 1, 1966.
- Steiner, D. F. y Oyer, P. E. Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A., 57: 473, 1967.
- Stern, M. P., Farquhar, J. W., Silvers, A. y Reaven, G. M. J. Clin. Invest., 47: 1947, 1968.
- Strosser, M. Th. y Mialhe, P. Horm. Metab. Res., 7: 275, 1975.

- Tait, J. F. J. Clin. Endocr. 23: 1285, 1963.
- Tait, J. F. y Burstein, S. In Pincus, G., K. V. Thismann y E. B. Astwood (eds). The Hormones, vol. 5. Academic Press, New York, 1964, p. 441.
- Takahashi, Y., Kipnis, D. M. y Daughaday, W. H. J. Clin. Invest., 47: 2079, 1968.
- Tadahashi, Y., Daughaday, W. H. y Kipnis, D. M. Endocrinology, 88: 909, 1971.
- Tannenbaum, G. S. y Martin, J. B. Endocrinology, 98: 562, 1976.
- Tannenbaum, G. S. Martin, J. B. y Colle, E. Endocrinology, 99: 720, 1976.
- Taylor, A. L., Finster, J. L. y Mintz, D. H. J. Clin. Invest., 48: 2349, 1969.
- Taylor, A. L., Lipman, R. L. Salam, A. y Mintz, D. H. J. Clin. Endocrinol. Metab., 34: 395, 1972.
- Tell, H. M. y Cushing, H. Endocrinology, 14: 157, 1930.
- Tong, W. Endocrinology, 80: 1101, 1967.
- Trenkle, A. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 135: 77, 1970.
- Utiger, R. D., Parker, M. L. y Daughaday, W. H. J. Clin. Invest. 41: 254, 1962.
- Van den Brande, J. V. L. y DuCaju, M. V. L. In Advances in Human Growth Hormone Research, Raiti, S., Ed. DHEW publ. No. (NIH) 74-612, 98-126, 1974.
- Van den Brande, J. L., Van Buul, S., Heinrieh, V., Van Roon, F., Zurcher, T. y Van Steirtegen, A. C. Adv. Metab. Disord. 8: 171, 1975.
- Wiedmann, E. y Schwartz, E. J. Clin. Endocrinol. Metab., 34:51, 1972.

- Winick, M. y Noble, A. *Develop. Biol.*, 12: 451, 1965.
- Winick, M., Rosso, P., et al. *Exp. Neurol.*, 26: 393, 1970.
- White, P. y Hunt, H. J. *Clin. Endocr.*, 3: 500, 1943.
- Williams, R. H. y Porte, Jr. D. In text-book of Endocrinology, Williams, R. H., ed. Philadelphia, W. B. Saunders, pp. 502, 1974.
- Wright, D. R. Goodman, A. D. y Trimble, K. D. *J. Clin. Invest.* 54: 1064, 1974.
- Yalow, R. S. y Berson, S. A. *Gastroenterology*, 60: 203, 1971.
- Yalow, R. S. y Berson, S. A. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36: 415, 1973.
- Yalow, R. S. In Raitis, S. (ed.) *Advances in human growth hormone research*, DHEW Pub. No. (NIH) 74-612, Washington, D.C., 1974, p. 483.
- Yde, H. *Lancet*, 2: 624, 1964.
- Youdaev, N. A., Outecheva, Z. F., Novokova, T. E. Chvatchkin, Y. P. y Smirnove, A. P. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 210: 731, 1973.
- Young, F. G. *Biochem. J.* 39: 515, 1945.
- Young, F. G. *Recent. Progr. Hormone. Res.*, 8: 471, 1953.
- Zarrow, M. X., Jochim, J. M. y McCarthy, J. L. Academic Press, N. Y. U.S.A., 1964.
- Zunz, E. y La Berre, J. *Ann. Physiol.*, 4: 688, 1928.