

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**REGULACIÓN DEL EJE SOMATOTROPO A
LARGO PLAZO**

TESIS DOCTORAL

ÁNGEL PÉREZ ROMERO
Madrid, 1997

22.063



REGULACIÓN DEL EJE SOMATOTROPO A LARGO PLAZO

Tesis presentada por
 Ángel Pérez Romero
 para optar al grado de Doctor

Universidad Complutense de Madrid
 1997



ALFOMBO

VºBº Los Directores

Ángel Pérez Romero

Carmen Ariznavarreta

J.A.F. Tresguerres

*a mis padres
y mis hermanos Ana y Luismi*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a los Dres. Carmen Ariznavarreta y Jesús A. F. Tresguerres, directores de esta Tesis Doctoral, por permitirme trabajar con ellos en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y tener la paciencia necesaria para corregirme con el gusto que ambos lo han hecho. Ambos han sido para mí algo más que simples jefes y su cariño y consejos tanto laborales como personales han hecho de mí el investigador que ahora soy.

Muchas gracias a Lourdes, Fares, las "Vicentas" y al resto de becarios y profesores del Departamento, por compartir conmigo el trabajo diario y ayudarme siempre que lo necesité. Quiero dar las gracias especialmente a la Dra. Blanca Granados por tener la paciencia necesaria para enseñarme como se trabaja en un laboratorio, mostrándome su especial cariño. También a mi compañera Marian, por compartir conmigo los momentos dulces y también los amargos y sin la cuál difícilmente habría concluido esta Tesis Doctoral.

A Lucila Kraus, la técnico de laboratorio más querida de toda la Facultad de Medicina, por darme la oportunidad de conocer a una persona de tanta calidad humana y profesional. También a sus excelentes sucesores, Blanca Martínez y Antonio Carmona, con los que tantos buenos ratos he compartido comentando la jornada futbolística los lunes por la mañana.

Gracias a las Dras. Elena Vara y Cruz García del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por llevar a cabo las determinaciones de somatostatina y por dejarnos utilizar una y otra vez el sonicador, recibiéndonos siempre con una sonrisa. A Susana, Manina, la Dra. Isabel Vázquez y el resto del personal del CIT-INIA por su colaboración en los experimentos realizados con los corderos.

También gracias al Dr. A. Bartke y a toda la gente del Departamento de Fisiología de la Universidad del Sur de Illinois (EEUU), en especial a Emmanuel Dialynas por ser mi maestro en el duro campo de la Biología Molecular y también mi amigo.

A la Dra. M^a Jesús Delgado del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de CC. Biológicas, por aceptar la tutoría de esta Tesis Doctoral.

A mis amigos y toda la gente que ha estado a mi lado, en especial a Riba, Maru, Jesús, Pasca y Merchán porque han sabido escucharme y estar conmigo en todo momento, y a los que he llegado a aburrir contándoles mis experimentos con las ratas.

A mis padres, mi hermana Ana y por encima de todo mi hermano Luismi, por acompañarme una y otra vez al laboratorio y por su ayuda con el ordenador, sin la que sin duda jamás hubiera acabado este manuscrito.

Mi agradecimiento al Ministerio de Educación y Cultura, por la concesión de una Beca Predoctoral y al Fondo de Investigaciones Sanitarias, entidad financiadora del proyecto de investigación.

ABREVIATURAS

- * **ACTH** Hormona adrenocorticotropa o corticotropina
- * **ALS** Subunidad ácido lábil del complejo de 150 KDa de las IGFbPs
- * **AMPc** Adenosín-3'-5'-monofosfato cíclico
- * **AP-2** Proteína activadora-2
- * **ARNm** Acido ribonucleico mensajero
- * **BSA** Albúmina sérica bovina
- * **cADN** Acido desoxirribonucleico copia directa del ARN
- * **cpm** cuentas por minuto
- * **CRE** Elemento de respuesta a AMPc
- * **CREB** Proteína que se une al CRE
- * **CRH** Hormona liberadora de la hormona adrenocorticotropa
- * **EDTA** Acido etilendiaminotetraacético
- * **FFA** Acidos grasos libres
- * **FSH** Hormona folículoestimulante
- * **GABA** Acido gamma-aminobutírico
- * **GC** Glucocorticoides
- * **GCRE** Elemento de respuesta al receptor de GC
- * **GH** Hormona de crecimiento
- * **GHBP** Proteína ligante de GH
- * **GHR** Receptor de GH
- * **GHRH** Hormona liberadora de la GH
- * **GMS** Glutamato Monosódico
- * **h** Horas
- * **hGH** GH humana
- * **hGHRH** GHRH humana
- * **i.c.v.** Intracerebroventricular
- * **i.p.** Intraperitoneal
- * **i.v.** Intravenoso
- * **IGF-I / II** Factor de crecimiento similar a la insulina-I / II
- * **IGFBPs** Proteínas ligantes de IGFs
- * **IL-1 β / 6** Interleuquina 1 β / 6
- * **IRS-1** Sustrato del receptor de insulina-1
- * **JAK-2** Janus quinasa-2
- * **Kb** Kilobases
- * **KDa** Kilodaltons
- * **LH** Hormona luteinizante
- * **LHRH** Hormona liberadora de gonadotropinas
- * **MAP quinasa** Quinasa activada por mitógenos
- * **mGH** GH de ratón o murina
- * **NF-1** Factor nuclear-1
- * **oGH** GH ovina
- * **PACAP** Polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria
- * **pb** Pares de bases
- * **PCR** Reacción en cadena de la Polimerasa
- * **Pit-1/-2** Factor de transcripción específico de la hipófisis-1/-2
- * **RAR** Receptor del ácido retinoico
- * **rGH** GH de rata
- * **rGHRH** GHRH de rata
- * **RIA** Radioinmunoensayo
- * **rpm** revoluciones por minuto
- * **RT** Transcripción inversa
- * **s.c.** Subcutáneo
- * **SEM** Error estándar de la media
- * **SS** Somatostatina
- * **SSTR** Receptor de SS
- * **T₃** 3,5,3'-Triyodotironina

- **T₄** 3,5,3',5'-Tetrayodotironina o tiroxina
- * **TCA** Acido tricloroacético
- * **TNF- α** Factor de necrosis tumoral - α
- * **TR** Receptor de Hormonas tiroideas
- * **TRE** Elemento de respuesta a TR
- * **TRH** Hormona liberadora de TSH
- * **TSH** Hormona estimulante del tiroides u
hormona tirotrona
- * **USF** Factor estimulador upstream
- * **VDR** Receptor de la vitamina D

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.	3
1. EJE SOMATOTROPO.	3
2. GHRH.	4
2.1. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA QUÍMICA.	4
2.2. LOCALIZACIÓN.	5
2.3. ACCIONES BIOLÓGICAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.	5
2.3.1. Receptores de GHRH.	6
2.3.2. GHRH y síntesis de GH.	6
2.3.3. GHRH y liberación de GH.	7
2.3.4. GHRH y proliferación de las células somatotropas.	7
3. SOMATOSTATINA.	8
3.1. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA QUÍMICA.	8
3.2. LOCALIZACIÓN.	10
3.3. ACCIONES BIOLÓGICAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.	11
3.3.1. Receptores de SS.	11
3.3.2. SS y actividad somatotropa.	11
4. HORMONA DE CRECIMIENTO.	12
4.1. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA QUÍMICA.	12
4.2. PATRÓN DE SECRECIÓN.	13
4.3. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS.	15
4.4. RECEPTORES.	16
4.5. MECANISMOS DE ACCIÓN.	16
4.6. ACCIONES BIOLÓGICAS.	17
4.6.1. Acción anabolizante.	17
4.6.2. Acciones sobre los metabolismos glucídico y lipídico.	17
4.6.3. Acción sobre el crecimiento.	18
4.6.4. La GH y el sistema inmunitario.	21
4.7. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GH.	21
4.7.1. Pit-1.	22
4.7.2. Hormonas y otras sustancias relacionadas.	23
4.7.3. Factores ubicuos.	25
4.7.4. Modelo de control de la transcripción del gen de la GH.	25
4.8. CONTROL DE LA SECRECIÓN DE GH.	26
4.8.1. Neurotransmisores.	26
4.8.2. Neuropeptidos.	28

4.8.3. Hormonas.	30
4.8.4. Factores metabólicos.	31
4.8.5. Mecanismos de retroalimentación.	32
5. SOMATOMEDINAS.	35
5.1. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA QUÍMICA.	35
5.2. LOCALIZACIÓN.	36
5.3. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS.	36
5.4. RECEPTORES Y MECANISMOS DE ACCIÓN.	37
5.4.1. Receptor de tipo I.	38
5.4.2. Receptor de tipo II.	38
5.5. ACCIONES BIOLÓGICAS.	39
5.5.1. Efectos agudos.	39
5.5.2. Efectos crónicos.	39
5.6. CONTROL DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LAS IGFS	40
5.6.1. IGF-I.	40
5.6.2. IGF-II.	41
6. REGULACION DE LA SECRECIÓN DE GH A LARGO PLAZO.	42
II. OBJETIVOS.	45
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	49
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	49
1.1. RATAS.	49
1.2. CORDEROS.	49
1.3. RATONES.	50
2. MÉTODOS DE SEGUIMIENTO DE LOS ANIMALES.	50
2.1. PESO CORPORAL.	50
2.2. MEDIDA DE LA LONGITUD TIBIAL POR MICROKNEMOMETRÍA.	50
2.2.1. Características del Microknemómetro.	50
2.2.2. Procedimiento de medida.	52
2.3. PRUEBAS DE ESTÍMULO CON GHRH.	52
3. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS.	53
3.1. IMPLANTACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS.	53
3.2. IMPLANTACIÓN DE PELLETS.	53

4. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS.	54
4.1. TRATAMIENTO NEONATAL CON GLUTAMATO MONOSÓDICO.	54
4.2. GHRH.	54
4.3. SOMATOSTATINA.	55
5. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.	55
5.1. OBTENCIÓN DE SANGRE.	55
5.2. HIPOTÁLAMO.	56
5.3. HIPÓFISIS.	56
5.4. GLÁNDULA SUBMAXILAR.	57
6. MÉTODOS ANALÍTICOS.	57
6.1. RADIOINMUNOANÁLISIS: CARACTERÍSTICAS GENERALES.	57
6.1.1. Radioyodación de la hormona.	58
6.1.2. Evaluación del marcaje.	59
6.1.3. Realización y cinética del análisis.	59
6.1.4. Validación del RIA.	60
6.2. RIA DE GH.	61
6.2.1. Inmunorreactivos.	61
6.2.2. Soluciones tampón y suspensiones.	61
6.2.3. Radioyodación de la hormona.	62
6.2.4. Realización del análisis.	63
6.2.5. Validación del RIA.	64
6.3. RIA DE IGF-I.	66
6.3.1. Inmunorreactivos.	66
6.3.2. Soluciones tampón y suspensiones.	66
6.3.3. Radioyodación de la hormona.	67
6.3.4. Realización del análisis.	67
6.3.5. Validación del RIA.	68
6.4. RIA DE GHRH.	69
6.4.1. Inmunorreactivos.	69
6.4.2. Soluciones tampón y suspensiones.	69
6.4.3. Radioyodación de la hormona.	69
6.4.4. Realización del análisis.	70
6.4.5. Validación del RIA.	70

6.5. RIA DE SS.	71
6.5.1. Inmunorreactivos.	71
6.5.2. Soluciones tampón y suspensiones.	71
6.5.3. Radioyodación de la hormona.	71
6.5.4. Realización del análisis.	72
6.5.5. Validación del RIA.	72
6.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.	73
6.6.1. Reactivos.	73
6.6.2. Realización del análisis.	73
6.6.3. Validación del método.	73
6.7. DETECCIÓN DE ARNm DE GH.	74
6.7.1. Extracción de ARN.	74
6.7.2. Síntesis de cADN por RT.	75
6.7.3. Amplificación del cADN mediante PCR.	76
6.7.4. Análisis del producto PCR.	76
7. DISEÑOS EXPERIMENTALES.	77
7.1. EXPERIMENTO 1: ESTUDIO DEL EFECTO DE DISTINTAS PAUTAS DE ADMINISTRACIÓN DE GHRH EN LA RATA MACHO NORMAL.	77
7.2. EXPERIMENTO 2: ESTUDIO DE LA RESPUESTA A LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH EN LA RATA MACHO DEFICITARIA EN GH.	77
7.3. EXPERIMENTO 3: ESTUDIO A LARGO PLAZO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PULSÁTIL DE GHRH SÓLO O COMBINADO CON SS EN LA RATA HEMBRA NORMAL.	78
7.4. EXPERIMENTO 4: ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LA RATA HEMBRA DEFICITARIA EN GH A LA ADMINISTRACIÓN PULSÁTIL DE GHRH A LARGO PLAZO.	80
7.5. EXPERIMENTO 5: ESTUDIO DE LA RESPUESTA EN LA RATA HEMBRA NORMAL Y DEFICITARIA EN GH A LA ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA A LARGO PLAZO DE GHRH SÓLO O COMBINADO CON SS.	81

7.6. EXPERIMENTO 6: EFECTO A LARGO PLAZO DE DISTINTAS FORMAS DE ADMINISTRACIÓN DE GHRH SÓLO O COMBINADO CON SS EN CORDEROS.	82
7.7. EXPERIMENTO 7: ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA A LARGO PLAZO DE GHRH MEDIANTE BOMBAS OSMÓTICAS EN CORDEROS.	83
7.8. EXPERIMENTO 8: REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH EN TEJIDOS EXTRAHIPOFISARIOS SOMETIDOS A ALTAS DOSIS DE GHRH.	84
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.	85
IV. RESULTADOS.	89
1. EXPERIMENTO 1: EFECTO DE DIFERENTES PAUTAS DE ADMINISTRACIÓN DE GHRH EN LA RATA MACHO NORMAL.	89
1.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GHRH.	89
1.2. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.	89
1.3. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.	90
1.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.	90
1.5. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.	91
1.6. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.	91
2. EXPERIMENTO 2: EFECTO DE LA GHRH EN LA RATA MACHO DEFICITARIA EN GH.	92
2.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.	92
2.2. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.	92
2.3. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.	93
2.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.	93
2.5. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.	95
3. EXPERIMENTO 3: EFECTO DEL TRATAMIENTO A LARGO PLAZO CON INYECCIONES DE GHRH Y DE SS EN LA RATA HEMBRA NORMAL.	95
3.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.	95
3.2. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.	96
3.3. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.	97
3.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.	97

3.5. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.	98
4. EXPERIMENTO 4: ADMINISTRACIÓN PULSÁTIL DE GHRH A LARGO PLAZO EN LA RATA HEMBRA DEFICITARIA EN GH.	99
4.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.	99
4.2. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.	100
4.3. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.	101
4.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.	101
4.5. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.	102
4.6. EVOLUCIÓN DE LA LONGITUD TIBIAL.	103
5. EXPERIMENTO 5: ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA DE GHRH A LARGO PLAZO SÓLO O CON SS EN LA RATA HEMBRA NORMAL Y DEFICITARIA EN GH.	105
5.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.	105
5.2. PESO DE LAS HIPÓFISIS.	105
5.3. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.	106
5.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH TRAS LA PRUEBA DE ESTÍMULO CON GHRH.	108
5.5. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH TRAS EL SACRIFICIO.	109
5.6. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.	110
5.7. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.	110
5.8. EVOLUCIÓN DE LA LONGITUD TIBIAL.	112
6. EXPERIMENTO 6: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH Y SS A LARGO PLAZO EN CORDEROS.	113
6.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GHRH.	113
6.2. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.	113
6.3. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.	115
6.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH TRAS LA ESTIMULACIÓN AGUDA CON GHRH.	115
6.5. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.	118
6.6. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.	118
7. EXPERIMENTO 7: ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA DE GHRH A LARGO PLAZO MEDIANTE BOMBAS OSMÓTICAS EN CORDEROS.	119
7.1. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH TRAS ESTIMULACIÓN CON GHRH.	119
7.2. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.	121
7.3. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.	121

8. EXPERIMENTO 8: REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH POR GHRH EN TEJIDOS NO HIPOFISARIOS.	122
8.1. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.	122
8.2. PESO DE LAS GLÁNDULAS SUBMAXILARES.	122
8.3. CONTENIDO DE GH EN LAS GLÁNDULAS SUBMAXILARES.	122
8.4. EXPRESIÓN DEL GEN DE LA GH EN LAS GLÁNDULAS SUBMAXILARES.	124
V. DISCUSIÓN.	127
1. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH EN LA RATA MACHO.	127
1.1. ESTUDIOS EN LA RATA MACHO NORMAL.	127
1.1.1. Contenido hipotalámico de GHRH y de SS.	127
1.1.2. Contenido hipofisario y niveles circulantes de GH.	128
1.1.3. Niveles plasmáticos de IGF-I.	129
1.1.4. Peso corporal.	130
1.2. ESTUDIOS EN LA RATA MACHO DEFICITARIA EN GH.	131
1.2.1. Contenido hipotalámico de SS.	131
1.2.2. Contenido hipofisario y niveles circulantes de GH.	133
1.2.3. Niveles plasmáticos de IGF-I e incremento ponderal.	133
2. ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH Y SS EN LA RATA HEMBRA.	134
2.1. ESTUDIOS EN LA RATA HEMBRA NORMAL.	134
2.1.1. Contenido hipotalámico de SS.	134
2.1.2. Contenido hipofisario y niveles plasmáticos de GH.	135
2.1.3. Niveles plasmáticos de GH tras estímulo agudo con GHRH.	138
2.1.4. Niveles circulantes de IGF-I.	138
2.1.5. Crecimiento.	139
2.2. ESTUDIOS EN LA RATA HEMBRA DEFICITARIA EN GH.	141
2.2.1. Contenido hipotalámico de SS.	141
2.2.2. Contenido hipofisario y niveles plasmáticos de GH.	141
2.2.3. Respuesta a la estimulación aguda con GHRH.	143
2.2.4. Niveles plasmáticos de IGF-I.	144
2.2.5. Crecimiento.	144
3. ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH Y SS EN CORDEROS.	145
3.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GHRH.	145
3.2. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.	146

3.3. NIVELES PLASMÁTICOS Y CONTENIDO HIPOFISARIO DE GH.	147
3.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.	150
3.5. PESO CORPORAL.	151
4. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GH POR GHRH EN TEJIDOS EXTRAHIPOFISARIOS.	152
VI. CONCLUSIONES.	157
VII. BIBLIOGRAFÍA.	161

I. INTRODUCCIÓN

1. EJE SOMATOTROPO.

La síntesis y secreción de la hormona de crecimiento (GH) por las células somatotropas hipofisarias esta bajo el control de dos péptidos hipotalámicos: la hormona liberadora de la GH (GHRH) y la somatostatina (SS). La GH una vez secretada por las células somatotropas actua sobre los tejidos periféricos estimulando la producción de somatomedinas, también llamadas IGF-I y II (Factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II), mediadoras de muchos de los efectos de la GH. Estas hormonas actuan coordinadamente y constituyen lo que se llama el eje somatotropo (figura 1).

Este sistema está regulado por diversos neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas y señales metabólicas que actuan en la hipófisis y en el hipotálamo, y además dispone de mecanismos de retroalimentación en los que estan implicadas la GH, las IGFs, la GHRH y la SS.

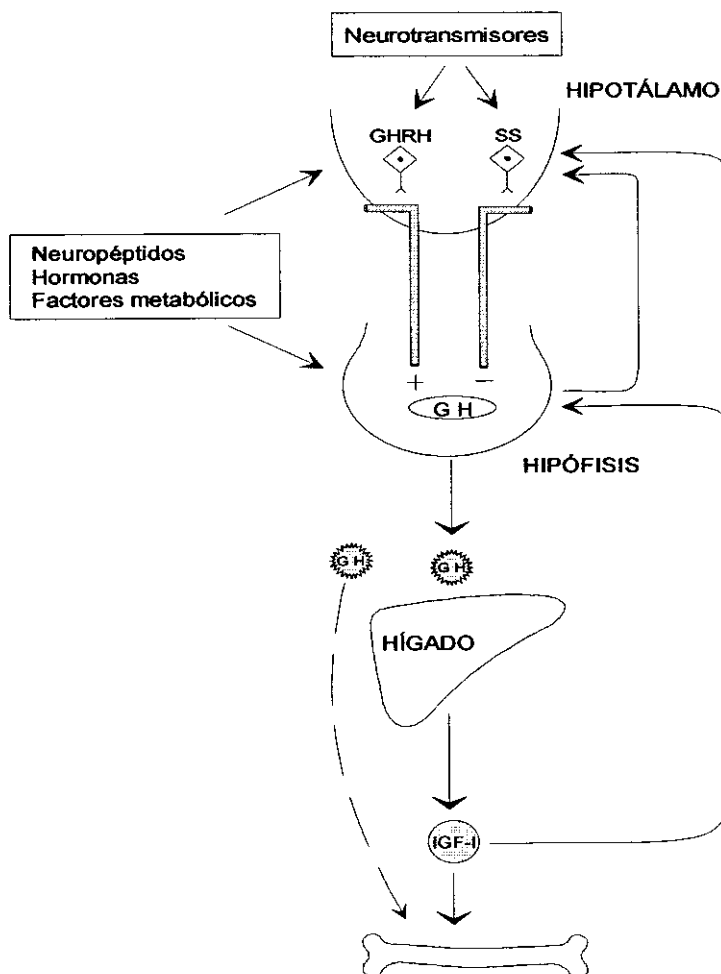


Figura 1. Componentes del eje somatotropo.

2. GHRH.

2.1. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA QUÍMICA.

La GHRH es la hormona hipotalámica que estimula la síntesis y secreción de GH. Fue aislada e identificada en 1982 por los grupos de W. Vale y R. Guillemin, a partir de tumores pancreáticos. Desde el punto de vista bioquímico se trata de un péptido perteneciente a la familia del glucagón y de la secretina.

Los genes que codifican la GHRH en la rata (rGHRH) y en el hombre (hGHRH) son similares. Constan de 5 exones, de los cuales el 2, el 3, el 4 y una parte del 5 codifican las secuencias de los respectivos precursores. El gen de la hGHRH se encuentra en el cromosoma 20.

El precursor de la rGHRH tiene 104 aminoácidos y tras su procesamiento da lugar al péptido maduro de 43 aminoácidos, mientras que del gen de la hGHRH se producen dos precursores, uno de 107 y otro de 108 aminoácidos, formados por procesamiento alternativo del ARN mensajero (ARNm) primario. Estos dos precursores de la hGHRH, tras sufrir modificaciones proteolíticas, dan lugar a las formas de 40 y 44 aminoácidos presentes en el hipotálamo humano.

La secuencia de aminoácidos de la GHRH se encuentra bastante conservada en los mamíferos, difiriendo por ejemplo la forma molecular ovina tan sólo en 6 aminoácidos respecto de la humana. La rGHRH es una excepción a esta homología, ya que sólo tiene 43 aminoácidos y de ellos 14 son diferentes a los de la hGHRH (figura 2). Sin embargo, las divergencias se encuentran sobre todo en el extremo carboxilo-terminal, mientras que el extremo amino-terminal, en el que radica la actividad biológica, conserva una alta homología con la secuencia de la hGHRH (cerca del 80 %).

En cualquier caso, se ha determinado que la actividad biológica reside en los primeros 29 aminoácidos. Por esta razón, se han desarrollado péptidos sintéticos como el GHRH 1-29, que poseen la misma potencia que las formas naturales.

hombre YADAIFTNSYR **KVLGKLSARKLLQ** DIMSRQQGESNQERGARARL-NH₂
cordero YADAIFTNSYR **KILGKLSARKLLQ** DIMNRQQGERNQEQGAKVRL-NH₂
rata **HADAIFTSSYRRI**LGKLYARKLLH **EIMNRQQGERNQEQRSRFN**-NH₂

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la GHRH del hombre, del cordero y de la rata. En negrita se indican los aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de la GHRH humana. Nomenclatura: A-Ala D-Asp E-Glu F-Phe G-Gly H-His I-Ile K-Lys L-Leu M-Met N-Asn Q-Gln R-Arg S-Ser T-Thr V-Val Y-Tyr.

2.2. LOCALIZACIÓN.

A diferencia de otros neuropéptidos, la GHRH tiene una distribución cerebral bastante localizada. La mayor concentración de cuerpos neuronales productores de GHRH (neuronas GHRH-érgicas) se encuentra en el hipotálamo mediobasal, sobre todo en los núcleos arcuato y ventromedial (Merchenthaler y cols 1984, Bloch y cols 1984). No obstante, se han encontrado neuronas productoras de GHRH dispersas por casi todo el hipotálamo, el hipocampo y la amígdala.

De las neuronas GHRH-érgicas del núcleo arcuato, encargadas del control de la actividad somatotropa, parte una densa trama de axones hacia la eminencia media, donde descargan en el plexo vascular del sistema porta-hipotálamo-hipofisario (figura 1). Las neuronas GHRH-érgicas del núcleo ventromedial parecen proyectar a otras áreas hipotalámicas, en las que el péptido podría funcionar como neuromodulador. Además, se han localizado fibras que transportan GHRH en diversas áreas hipotalámicas (región periventricular, núcleo paraventricular, área preóptica) y extrahipotalámicas (sistema límbico) en las que el péptido parece intervenir en procesos conductuales y de ingesta de alimentos. También dentro del cerebro se ha detectado GHRH en concentraciones apreciables en el líquido cefalorraquídeo.

Fuera del cerebro se ha aislado y caracterizado la GHRH en la placenta, el estómago, el duodeno, el páncreas, la hipófisis, el ovario, el testículo y los linfocitos (Cuttler 1996).

En muchos cuerpos neuronales y terminales con GHRH se ha demostrado la coexistencia de este péptido con dopamina, galanina o neurotensina. Estas moléculas podrían ser las mediadoras de la interrelación observada entre las neuronas GHRH-érgicas y las productoras de SS, interviniendo en la generación del ritmo de secreción alternante entre ambos péptidos hipotalámicos.

2.3. ACCIONES BIOLÓGICAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.

La GHRH estimula la síntesis y secreción de GH, e induce la proliferación de las células somatotropas (Barinaga y cols 1985, Billestrup y cols 1986). Como sucede con otras muchas hormonas peptídicas, la GHRH realiza sus acciones biológicas tras unirse a receptores de membrana.

2.3.1. Receptores de GHRH.

El receptor de la GHRH en el hombre y la rata es una proteína de 423 aminoácidos, con 7 dominios α -hélice transmembranares típicos de los receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores se han localizado principalmente en las células somatotropas, aunque también se ha encontrado ARNm del receptor de GHRH en el hipotálamo y el tracto gastrointestinal (Matsubara y cols 1995). En estos órganos, en los que también se sintetiza GHRH, el receptor mediaría las acciones auto/paracrinas de éste péptido.

La unión de la GHRH con su receptor estimula la adenilato ciclasa a través de una proteína G activadora, resultando en la producción de AMP cíclico (AMPc). Este segundo mensajero parece ser el mediador de los efectos de la GHRH sobre los procesos de síntesis y secreción de GH, y proliferación de las células somatotropas.

2.3.2. GHRH y síntesis de GH.

Tras la unión de la GHRH a su receptor se suceden toda una serie de acontecimientos que van a llevar a la activación de la síntesis hipofisaria de GH. El mecanismo por el que la GHRH regula este proceso tiene lugar a nivel de la transcripción genómica.

Hay que destacar que la GHRH estimula la transcripción del gen de la GH independientemente de su acción sobre la liberación de la hormona, a pesar de que ambos procesos están mediados por AMPc (Barinaga y cols 1985).

El aumento de los niveles de AMPc, tras la unión de la GHRH a su receptor en la célula somatotropa, conduce a la estimulación de una proteína quinasa A, que fosforila varias proteínas citoplasmáticas y nucleares, entre las que se encuentra el factor de transcripción CREB (c-AMP-Responsive Element Binding Protein), que se une en el ADN a los elementos de respuesta a AMPc denominados CRE (c-AMP-Responsive Element) y cuya secuencia es TGACGTCA.

No se han podido localizar tales CREs en el promotor del gen de la GH de la rata (rGH) pero sí en el promotor del factor de transcripción específico de la hipófisis-1 (Pit-1), por lo que se ha propuesto un posible mecanismo de activación de la expresión de GH por GHRH a través de Pit-1 (Ruvkun 1992) (figura 3). También es posible que la transcripción del gen del Pit-1 sea activada por el calcio, de tal forma que la proteína CREB sería fosforilada por una proteína quinasa dependiente del complejo calcio-calmodulina (Sheng y cols 1991).

La misma secuencia de acontecimientos propuesta para la transcripción de la rGH podría ser perfectamente válida para el promotor de la GH humana (hGH),

aunque en éste también se han detectado dos secuencias parciales de CRE (CGTCA) a las que podría unirse el factor de transcripción CREB cooperando con el Pit-1 en la regulación positiva de la transcripción del gen de la GH por GHRH en el hombre (Sheppard y cols 1994).

2.3.3. GHRH y liberación de GH.

La GHRH estimula la secreción hipofisaria de GH. La respuesta es inmediata y dependiente de la dosis dentro de un rango de concentraciones (Wehrenberg y cols 1984a). El proceso de secreción de GH esta mediado por Ca^{2+} y por un aumento en los niveles citosólicos de AMPc.

El incremento de la concentración de AMPc en el citoplasma de las células somatotropas que se observa tras la unión de GHRH a su receptor produce la activación de la proteína quinasa A que, tras actuar sobre canales de Ca^{2+} , conduce al aumento en la concentración intracelular de dicho catión. Este aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} también esta mediado por la despolarización inicial que se produce después de la unión de la GHRH con su receptor, a través de la inhibición de canales de K^+ . En última instancia, el calcio intracelular formando complejo con la calmodulina induciría la exocitosis de las vesículas secretoras portadoras de GH (figura 3). Además, estudios recientes indican la posibilidad de que el complejo calcio-calmodulina interaccione directamente con la adenilato ciclase y la proteína quinasa A aumentando su actividad (Mougin y cols 1984).

Diversos trabajos sugieren además la participación de las vías del diacilglicerol-proteína quinasa C y de segundos mensajeros relacionados con el ácido araquidónico en el proceso de liberación de GH estimulado por GHRH (Cronin y cols 1985, Canonico y cols 1986).

2.3.4. GHRH y proliferación de las células somatotropas.

Observaciones realizadas in vivo, en pacientes con tumores productores de GHRH, indican que este péptido induce proliferación de las células somatotropas. Este efecto se ha comprobado administrando GHRH a animales de experimentación, en los que tras dicho tratamiento se incrementa tanto el número total de células somatotropas como su índice mitótico.

Esta acción de la GHRH sobre la proliferación celular esta mediada por AMPc y por la proteína c-fos, cuyo contenido y el de su ARNm aumentan tras exponer cultivos hipofisarios a GHRH (Billestrup y cols 1987) (figura 3). Existen trabajos en los

que se propone también al Pit-1 como posible elemento mediador del efecto proliferativo de la GHRH (Castrillo y cols 1991) (figura 3).

3. SOMATOSTATINA.

3.1. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA QUÍMICA.

Los primeros indicios acerca de la presencia de factores inhibidores de la secreción de GH en extractos hipotalámicos aparecieron accidentalmente en el trabajo del grupo de Krulich y cols en 1968 mientras buscaban un factor liberador de GH. Varios años después, Brazeau y cols (1973) aislaron y caracterizaron este factor inhibidor de la secreción de GH, al que llamaron SRIF (Somatotropin Release-Inhibiting Factor) y al que se conoce habitualmente como somatostatina (SS).

La SS caracterizada por el grupo de Brazeau resultó ser un péptido de 14 aminoácidos (SS-14), de estructura cíclica debido a la existencia de dos puentes disulfuro intramoleculares entre dos cisteínas (figura 4a).

Aunque tanto la forma lineal como la cíclica tienen efecto *in vitro*, la reducción del puente disulfuro disminuye significativamente la actividad biológica de la molécula, por lo que dicho puente disulfuro parece ser necesario para la unión con el receptor (Rivier y cols 1975). La región amino terminal no es necesaria para la total actividad de la SS, mientras que los aminoácidos de las posiciones 7 a 10 parecen ser esenciales, por lo que se han sintetizado diferentes análogos de la SS, en los que se mantienen tanto los aminoácidos 7 a 10 como el puente disulfuro. Un ejemplo es el Octreotide, que tiene mayor actividad biológica que la SS natural y su efecto es más prolongado gracias a una elevada resistencia a la degradación (figura 4b).

Aunque inicialmente se hablaba de un único péptido con actividad inhibitoria de la secreción de GH, Pradayrol y cols (1980) describieron una nueva forma de SS con 28 aminoácidos (SS-28) que contiene la secuencia de la SS-14 y además otros 14 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal. Al principio se pensó que la SS-28 constituía un precursor de la forma de 14 aminoácidos, pero el hecho de que en las áreas hipotalámicas implicadas en el control somatotropo se produzcan los dos péptidos y que ambas se liberen a la circulación portal hace suponer que aunque la SS-28 pueda ser un precursor, también es capaz de actuar como una hormona en sentido estricto. Así, tanto la SS-14 como la SS-28 podrían intervenir en el control de la secreción de GH. No obstante, la SS-14 es la forma más abundante en el sistema nervioso central.

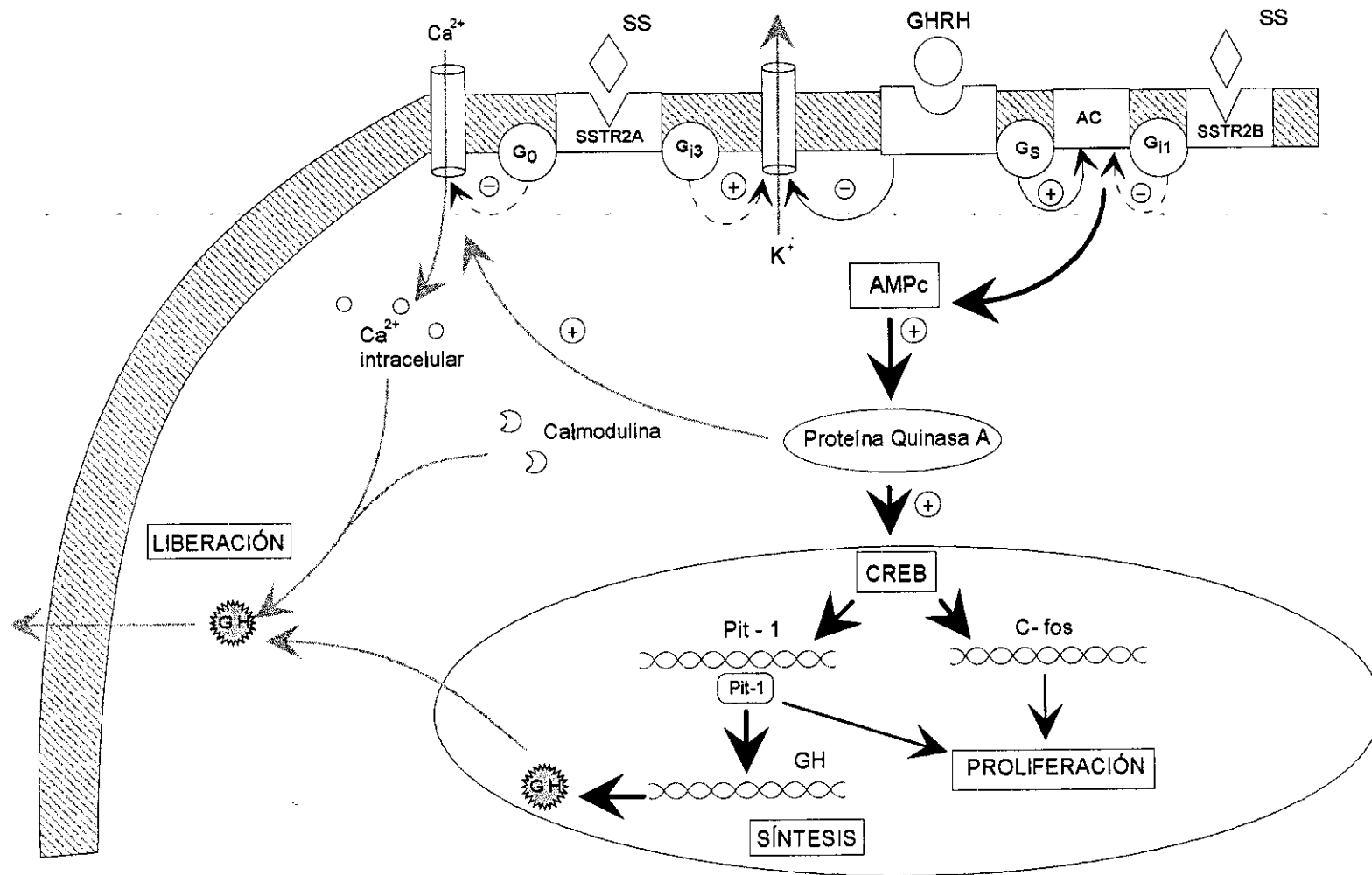


Figura 3. Mecanismos de acción de la GHRH (—→) y de la SS (- -→) sobre la síntesis (—→) y liberación de GH (- -→), y proliferación de las células somatotropas.

La SS-14 y la SS-28 proceden de un mismo precursor generado por la transcripción de un único gen. Este precursor, tras pasar por el aparato de Golgi, es empaquetado en gránulos de secreción en los que se produce el procesamiento proteolítico final para dar lugar a las formas maduras SS-14 y SS-28.

Las dos formas moleculares de la SS están presentes en los mamíferos, existiendo una gran homología entre éstas. La secuencia de aminoácidos de la SS-14 en la rata y en el hombre es exactamente la misma (Reichlin 1983).

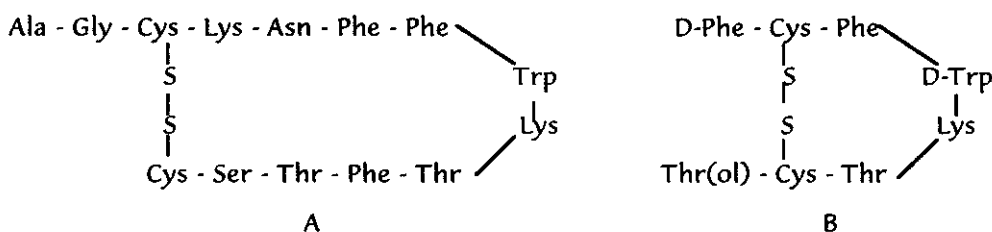


Figura 4. Secuencia de aminoácidos de la SS-14 (A) y del octreotide (B).

3.2. LOCALIZACIÓN.

La SS se encuentra ampliamente distribuida por todo el organismo pero sobre todo a nivel neural, endocrino y digestivo actuando como neurohormona, neurotransmisor y modulador paracrino.

La mayor concentración de neuronas productoras de SS (neuronas SS-érgicas) se encuentra en el núcleo periventricular hipotalámico. Los axones procedentes de este núcleo se dirigen a la eminencia media en donde contactan con el sistema porta-hipotálamo-hipofisario.

Como veíamos anteriormente, en el núcleo arcuato se localizan las neuronas GHRH-érgicas implicadas en el control somatotropo. En este mismo núcleo existen también neuronas productoras de SS y además llegan a él prolongaciones procedentes del núcleo periventricular, por lo que ambas vías podrían intervenir en el circuito de retroalimentación de asa ultracorta que opera entre la GHRH y la SS.

Numerosos trabajos han demostrado la existencia de SS en otras zonas cerebrales (núcleos supraquiasmático, ventromedial y caudado, la región preóptica), en el líquido cefalorraquídeo y en el tracto gastrointestinal (estómago, páncreas, intestino).

3.3. ACCIONES BIOLÓGICAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.

En consonancia con su amplia distribución por todo el organismo, la SS actúa en regiones tan diversas como el aparato digestivo o el cerebro, en las que sus acciones son mayoritariamente inhibitorias. No sólo es un potente inhibidor de la secreción de GH in vivo e in vitro, sino también de una serie de secreciones endo y exocrinas como insulina, glucagón, hormona estimulante del tiroides (TSH), renina, gastrina, CIH, α -amilasa etc. Lo que a nosotros nos ocupará en el presente apartado es su acción a nivel hipofisario.

3.3.1. Receptores de SS.

Al igual que sucede con la GHRH y otras hormonas proteicas, la SS ejerce sus acciones uniéndose a receptores de membrana específicos. Se han determinado 6 tipos de receptores para SS (SSTR), desde SSTR1 hasta SSTR5, con dos subtipos de SSTR2 denominados A y B (Bell y Reisine 1993).

Aunque se ha demostrado la expresión de todos los tipos de receptores en las células somatotropas (O'Carroll y Krempels 1995), los receptores SSTR2A y 2B parecen ser los mediadores de las acciones de la SS.

Los receptores de SS se encuentran asociados a diferentes proteínas G inhibitorias. El receptor SSTR2A aparece unido a la proteína G_{13} y G_0 , mientras que el SSTR2B interacciona con la proteína G_{11} (Reisine y cols 1993).

3.3.2. SS y actividad somatotropa.

La SS se opone, de forma dosis dependiente, a la práctica totalidad de las acciones estimuladoras de GHRH en las células somatotropas.

La SS inhibe tanto la secreción de GH basal como la inducida por GHRH u otros estímulos como la arginina, hipoglucemia insulínica, ejercicio o estrés (Barinaga y cols 1985). Asimismo, la SS atenúa el efecto trófico de la GHRH sobre las células somatotropas (Billestrup y cols 1986). Respecto a la biosíntesis de GH, aunque se había descrito que la SS no jugaba ningún papel en este proceso (Barinaga y cols 1985, Fukata y cols 1985), datos recientes parecen indicar que sí puede actuar también como inhibidor del incremento de transcripción genómica dependiente de GHRH (Devesa y Tresguerres 1996).

Tal y como proponen Chen y cols (1994), estos tres efectos que acabamos de describir, comienzan con la unión de la SS al receptor de membrana SSTR2B. A continuación, y a través de la proteína G_{11} , se inhibe la actividad adenilato ciclasa, produciéndose un descenso de los niveles de AMPc y de la actividad proteína

quinasa A. Como consecuencia de este último hecho, decrece la cascada de fosforilaciones iniciadas por la quinasa A conduciendo en último término al bloqueo de la síntesis y secreción de la GH y de la proliferación de las células somatotropas (figura 3).

La acción negativa de la SS sobre la secreción de GH también está mediada por el receptor SSTR2A asociado a las proteínas G inhibitorias que antes comentábamos. La vía SSTR2A-G_{i3}, actuando directamente sobre canales de K⁺, estimula la salida de este ión al exterior celular produciendo la hiperpolarización de la membrana y la disminución de la permeabilidad de ésta al Ca²⁺. Simultáneamente, el complejo SS-SSTR2A acoplado a la proteína G_o actuaría sobre canales de Ca²⁺ inhibiendo la entrada de éste a la célula. Como consecuencia de estas dos acciones sobre los canales iónicos, disminuye la concentración intracelular de Ca²⁺ con lo que también desciende la intervención de estos iones en la exocitosis de GH (figura 3).

4. HORMONA DE CRECIMIENTO.

4.1. BIOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA QUÍMICA.

La hormona de crecimiento se sintetiza en las células eosinófilas de la hipófisis anterior denominadas somatotropas, que representan el 40-50 % de las células hipofisarias. En condiciones normales, estas células contienen entre 5 y 10 mg de GH, lo que la convierte en la hormona más abundante de esta glándula.

La GH está codificada por el gen GH-N, localizado en el hombre en el brazo largo del cromosoma 17 junto a otros 4 genes (CS-L, CS-A, CS-B y GH-V) relacionados por su homología estructural y alineados a lo largo de un fragmento de 66.5 Kb formando lo que se llama el cluster de genes de la GH (Chen y cols 1989). Todos estos genes proceden de un gen ancestral común que divergió hace millones de años y del que también derivó el gen de la prolactina.

El gen GH-N consta de cinco exones y cuatro intrones, es el único que se expresa en la hipófisis y codifica para las variantes de GH de 22 y 20 KDa, aunque datos recientes sugieren que el gen GH-V u otro gen todavía sin identificar podrían también ser expresados en la hipófisis (Díaz y cols 1993). El procesamiento del ARNm primario originado a partir del gen GH-N da lugar al ARNm maduro que a nivel ribosómico se traduce en la forma de 22 KDa en el 90 % de las moléculas de transcrito primario. En el 10 % restante ocurre un procesamiento alternativo por el que se origina la forma GH de 20 KDa.

Una vez formado el producto GH de 22 KDa, puede sufrir modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, formación de dímeros mediante puentes disulfuro, acetilación y desaminación.

La GH de 22 KDa es un polipéptido de 191 aminoácidos dispuestos en una sóla cadena, en la que existen 2 puentes disulfuro: el primero entre las cisteínas 53 y 165 y el segundo entre la 182 y la 189 (figura 5).

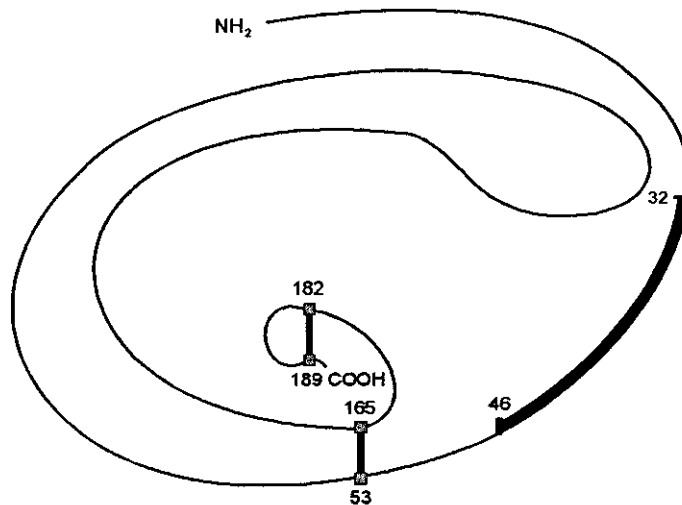


Figura 5. Estructura de la GH de 22 KDa. Con trazo más grueso aparecen el fragmento cuyo corte origina la forma de 20 KDa y los dos puentes disulfuro intracatenarios.

4.2. PATRÓN DE SECRECIÓN.

Como todas las hormonas adenohipofisarias, la GH se secreta de forma pulsátil con períodos de secreción rápida denominados picos, intercalados con etapas no secretoras o valles.

El trabajo de Wehrenberg en 1982, demostrando que el aporte de GHRH era indispensable para la secreción pulsátil de GH, y el estudio de Tannenbaum y Ling (1984), que sugería la presencia también de SS para la generación de tal pulsatilidad, probaba experimentalmente la intervención de ambos péptidos hipotalámicos en la secreción rítmica de la GH. Más tarde, Plotsky y Vale en (1985) demostraban en la rata cómo la aparición de cada pico de GH era precedido por el vertido de GHRH a la circulación portal, a la vez que disminuía la liberación de SS. Así, la secreción hipofisaria de GH depende de la actuación coordinada, a nivel hipofisario, de la GHRH y la SS que a través de la circulación portal llegan a la hipófisis, activándola en el caso de la GHRH o inhibiéndola en el de la SS.

Según todo ésto, el ritmo secretor de GH se generaría por las secreciones de GHRH y SS con un desfase de 180° (Tannenbaum y Martin 1976) (figura 6). Aunque de manera hipotética, se piensa que la GHRH sería la responsable de la amplitud de los episodios de GH, mientras que la SS, presumiblemente, determinaría la frecuencia y la duración de los pulsos (Kraicer y cols 1988).

Sin embargo, también es posible desde el punto de vista teórico, que una secreción mantenida de GHRH estimule o no la secreción de GH en función de los niveles de SS. Esta posibilidad ha sido verificada por trabajos de nuestro propio grupo (Tresguerres y cols 1991), en los que la infusión continua de GHRH es capaz de mantener un patrón de secreción episódica de GH, por lo que bastaría con que la secreción de SS fuera pulsátil para explicar los picos de GH (figura 6).

Al igual que ocurre con otras hormonas, la modulación de la frecuencia de pulsos de GH es clave para la producción de sus efectos biológicos (Gevers y cols 1996). En relación con ésto, la administración pulsátil de GH en ratas hipofisectomizadas, capaz de generar un perfil plasmático de GH similar al fisiológico con picos cada 3 h, es más eficaz en cuanto a estimular el crecimiento que la administración continua (Robinson y Clark 1987). También las acciones de la GH en el tejido adiposo y la producción hepática de somatomedinas parecen depender de la pulsatilidad. Por todo esto parece que los tejidos diana de GH son más sensibles al patrón con el que la hormona llega a ellos que a la cantidad total de GH que les alcanza. La secreción pulsátil de GH podría estar en relación con la no inducción de procesos de desensibilización de los receptores de GH en los tejidos diana.

Los niveles plasmáticos de GH varían considerablemente a lo largo del desarrollo. Son muy altos durante las etapas fetal y neonatal y descienden de forma gradual en la infancia. Desde este período hasta la pubertad en la que aumenta drásticamente la GH, los niveles circulantes de esta hormona permanecen estables.

La secreción de GH aumenta durante la pubertad como consecuencia del incremento en la tasa de producción hipofisaria de esta hormona, lo que se traduce en una mayor cantidad de GH liberada en cada pico. Luego los niveles plasmáticos de la GH disminuyen progresivamente a partir de la adolescencia, al reducirse la amplitud de los pulsos de GH.

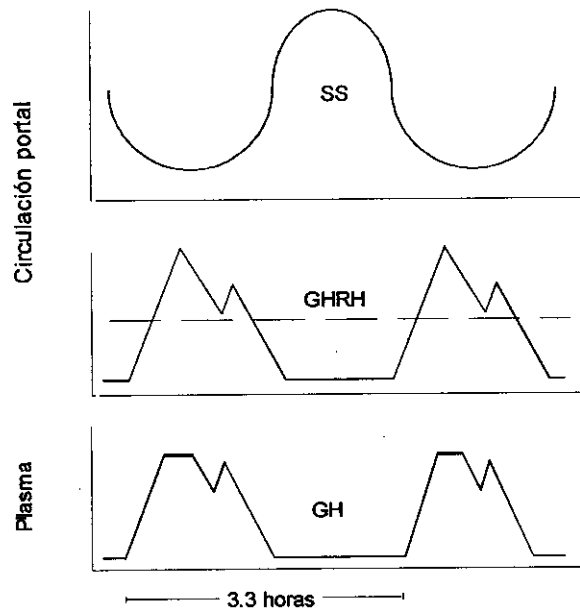


Figura 6. Ritmo secretor de los péptidos hipotalámicos GHRH y SS y de la GH. En línea discontinua aparece la teórica secreción continua de GHRH.

4.3. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS.

Hasta hace poco se pensaba que la GH circulaba en el plasma de forma libre, pero recientemente se ha determinado que el 45-50 % de la GH de 22 KDa va unida a dos tipos de proteínas ligantes de GH (GHBP): de alta y de baja afinidad (Baumann y cols 1986).

La GHBP de alta afinidad une principalmente la forma de 22 KDa. Molecularmente es idéntica al dominio extracelular del receptor de GH (GHR). En ratas y ratones esta proteína se generaría por un procesamiento alternativo del ARNm del GHR, en el que los dominios transmembrana e intracelular están sustituidos por una cola hidrofílica (Baumbach y cols 1989, Smith y cols 1989). Por el contrario, en el conejo y en el hombre parece que esta proteína transportadora de GH se produce por rotura proteolítica del receptor de GH, liberándose el dominio extracelular de éste (Sotiropoulos y cols 1993).

En lo que se refiere a la GHBP de baja afinidad, une preferentemente la GH 20 KDa y no guarda ninguna relación con el receptor de GH.

Las GHBPs, cuyo origen parece ser el hígado, constituyen un reservorio circulante de GH, impiden su degradación y aclaramiento renal y modulan la acción de la GH en los tejidos periféricos (Baumann 1991).

4.4. RECEPTORES.

El receptor de GH es un miembro de la superfamilia de los receptores hematopoyéticos, en la que también se incluyen los receptores de prolactina, interleuquinas y eritropoyetina (Dusanter-Four y cols 1994).

La proteína GHR madura tiene 620 aminoácidos, 130 KDa de peso molecular y esta organizada en 3 dominios: extracelular, donde se une la hormona, transmembrana e intracelular implicado en el mecanismo de transducción de la señal. La GH presenta 2 sitios de unión al receptor, de tal forma que cada molécula de GH se une a 2 moléculas de GHR con la consiguiente formación de dímeros entre los dominios extracelulares de las proteínas receptoras, circunstancia que es clave para que la hormona pueda desarrollar la totalidad de su función biológica (Cunningham y Well 1989, De Vos y cols 1992).

Se ha demostrado la existencia de sitios específicos de unión de la GH en multitud de órganos, sobre todo hígado, riñón, corazón, intestino y músculo (Mathews y cols 1989), localizados en su mayoría en la membrana plasmática, aunque también se han identificado en el citosol y el núcleo.

La regulación de la expresión del GHR corre a cargo de diversas hormonas, como la insulina, y factores nutricionales. La relación entre los niveles circulantes de GH y la concentración tisular de GHR no está clara ya que, en la rata, parece que la exposición prolongada a GH aumenta los niveles de estas proteínas receptoras en el hígado, mientras que en individuos acromegálicos con la GH plasmática muy elevada no se aprecian cambios similares en la concentración de GHR.

4.5. MECANISMOS DE ACCIÓN.

La unión de la GH a su receptor es el primer acontecimiento que ocurre en la acción de esta hormona sobre las células diana. Sin embargo, los procesos que siguen a la inicial activación del receptor son variados y poco conocidos.

El mecanismo principal que se propone en la transducción de la señal de GH tras unirse a su receptor es la fosforilación de varias proteínas en residuos de tirosina (Silva y cols 1993), incluido el propio GHR (Foster y cols 1988).

El receptor de GH carece de la secuencia de aminoácidos para autofosforilarse (Leung y cols 1987) por lo que inicialmente no se sabía cómo se iniciaba la secuencia de fosforilaciones observada tras la administración de GH. En 1993, Argetsinger y cols identificaron una proteína con actividad tirosina quinasa denominada Janus quinasa-2 (JAK-2), que se encuentra asociada al dominio

citoplásmico del GHR y que, tras la unión de la GH a su receptor, se activa, fosforilándose a sí misma y al GHR.

Una vez fosforilados la JAK-2 y el GHR, se produce la fosforilación de varias proteínas citoplasmáticas, entre las que se incluyen unas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas), las proteínas STAT 1, 3 y 5 y una proteína que es sustrato del receptor de insulina (IRS-1). Las MAP quinasas y las proteínas STAT van a ser la intermediarias de los procesos de proliferación y diferenciación, en los que también intervienen las proteínas c-fos y c-jun (Moller y cols 1992, Sotiropoulos y cols 1996). La proteína IRS-1 parece mediar los efectos tipo insulina que tiene la GH sobre el transporte de glucosa y la lipogénesis. En estos dos últimos procesos también podría estar implicada una proteína quinasa dependiente de fosfatidilinositol (Ridderstrale y Tomqvist 1994, Argetsinger y cols 1995).

Aunque el mecanismo que acabamos de ver parece ser el más habitual para las acciones de la GH, en determinadas ocasiones puede realizar sus efectos a través de otras vías, como la de la fosfolipasa C-proteína quinasa C, iones Ca^{2+} , formación de nucleótidos cíclicos e incluso la internalización del complejo hormona-receptor (Arilla y cols 1988, Chou y cols 1990, Lobie y cols 1994).

4.6. ACCIONES BIOLÓGICAS.

4.6.1. Acción anabolizante .

La GH actúa de forma positiva sobre prácticamente todos los procesos implicados en la síntesis de proteínas (Devesa 1989), aumentando el transporte de aminoácidos al interior celular y activando tanto la transcripción como la traducción. Además, disminuye la degradación de las proteínas celulares. Como consecuencia de todas estas acciones se favorece el depósito de proteínas a nivel celular.

Esta acción anabolizante se da en tejidos tan variados como el hueso, el cartílago, el páncreas, el músculo y sobre todo el hígado en el que se producen las somatomedinas.

4.6.2. Acciones sobre los metabolismos glucídico y lipídico.

Los efectos de la GH sobre el metabolismo de los glúcidos y los lípidos pueden clasificarse en acciones de tipo agudo, semejantes a las de la insulina, y acciones de tipo crónico o antiinsulina.

*** Acciones semejantes a las de la insulina.**

Este tipo de efectos de la GH ocurren inmediatamente después de que el tejido este expuesto a la hormona, y consisten en un aumento en la captación y utilización de la glucosa por las células y un efecto antilipolítico.

No obstante, estas acciones tipo insulina de la GH parecen no tener un papel fisiológico importante, puesto que sólo se manifiestan de forma aguda tras el tratamiento con GH en individuos o animales carentes de ella.

*** Acciones antiinsulina.**

En un organismo normal, la GH endógena induce un estado refractario a los efectos semejantes a los de la insulina que acabamos de comentar, por lo que de las acciones de la GH resulta fundamentalmente un efecto antiinsulina. Estas acciones van unidas a la presencia de unos niveles plasmáticos de GH elevados, tanto en situaciones fisiológicas (pico nocturno de GH), como patológicos (acromegalia) o tras la administración crónica de GH, e incluyen las conocidas clásicamente como acciones diabetógena y lipolítica.

La acción diabetógena de la GH consiste en la disminución de la captación y utilización de glucosa por las células, lo que se traduce en un aumento de la glucemia. La GH también produce un aumento del depósito de glucógeno en el hígado. En lo que se refiere a su acción lipolítica, la GH produce la liberación de ácidos grasos libres (FFA) del tejido adiposo aumentando así éstos en el plasma y también favorece su posterior oxidación.

4.6.3. Acciones sobre el crecimiento.

Como acabamos de ver, la GH cumple importantes funciones en el control del metabolismo intermediario. Sin embargo, su efecto más obvio es promover el crecimiento tanto somático como visceral, mediante el aumento de tamaño de las células, y estimulando los procesos de mitosis y diferenciación específica de ciertos tipos celulares, como los condroblastos o las células musculares primarias.

La síntesis de proteínas es un fenómeno clave para el crecimiento. Además, las acciones de la GH sobre los metabolismos glucídico y lipídico van encaminadas en la obtención de la energía necesaria para el proceso de crecimiento.

*** Crecimiento somático.**

El crecimiento somático ocurre principalmente a expensas del crecimiento óseo que, tras el nacimiento, es directamente dependiente del sistema GH-somatomedinas, aunque también otros factores como las hormonas tiroideas y los esteroides sexuales intervienen modulando este proceso a nivel local.

El crecimiento del hueso puede producirse en longitud y, en espesor. El aumento del espesor ocurre por aposición perióstica, mientras que el crecimiento longitudinal depende del desarrollo del cartílago de crecimiento, también llamado de conjunción. El cartílago de crecimiento posee un único tipo celular, los condrocitos, que se encuentran en diferentes fases de maduración.

Durante el crecimiento longitudinal del hueso, estos condrocitos sufren lo que se llama osificación endocondral, que engloba las siguientes fases: proliferación celular, diferenciación celular, síntesis de la matriz extracelular, degeneración de los condrocitos y mineralización de la matriz creándose nuevo tejido óseo. En la etapa de crecimiento siempre existe una parte del cartílago que no se osifica y que permite que el hueso siga creciendo hasta alcanzar la pubertad, momento en el cual el aumento de las concentraciones plasmáticas de los esteroides sexuales osifica completamente el cartílago, bloqueando su proliferación y poniendo fin al crecimiento longitudinal del organismo.

La GH controla el crecimiento óseo en longitud actuando tanto directa como indirectamente a través de la IGF-I. Ambas hormonas actúan conjunta y coordinadamente sobre distintas poblaciones de condrocitos y sus efectos no son idénticos, sino aditivos e interdependientes (Lindahl y cols 1987, Bentham y cols 1993).

La GH interviene en el proceso de crecimiento de dos formas distintas: una mediante su efecto sobre el hígado, y otra directamente en el cartílago de crecimiento. A nivel hepático estimula la producción de IGF-I, de una proteína ligante de IGF-I, denominadas IGFBP-3, y de una subunidad ácido lábil (ALS). En el cartílago de crecimiento actúa sobre condroblastos de la zona germinal, estimulando su expansión clonal y diferenciación hacia condrocitos, entrando así éstos en la zona proliferativa del cartílago de crecimiento. Además, la GH induciría en estos condrocitos la producción de IGF-I (Russell y Spencer 1985, Schlechter y cols 1986) (figura 7).

La IGF-I procedente del hígado alcanza el cartílago por el torrente sanguíneo, en el que se encuentra junto con la IGFBP-3 y la ALS formando un complejo de 150 KDa. Una vez en el cartílago, la hormona se libera mediante un proceso en el que podrían intervenir unas proteasas que, tras actuar sobre el complejo de 150 KDa, haría que disminuyera la afinidad de IGFBP-3 por IGF-I. Tanto la IGF-I local ejerciendo su acción de forma auto y/o paracrina, como la de procedencia hepática haciéndolo de forma endocrina, actúan sobre los condrocitos ya diferenciados estimulando su proliferación clonal y maduración, con lo que aumenta el volumen del citoplasma de estas células y activando la síntesis de la matriz extracelular por los condrocitos diferenciados (figura 7).

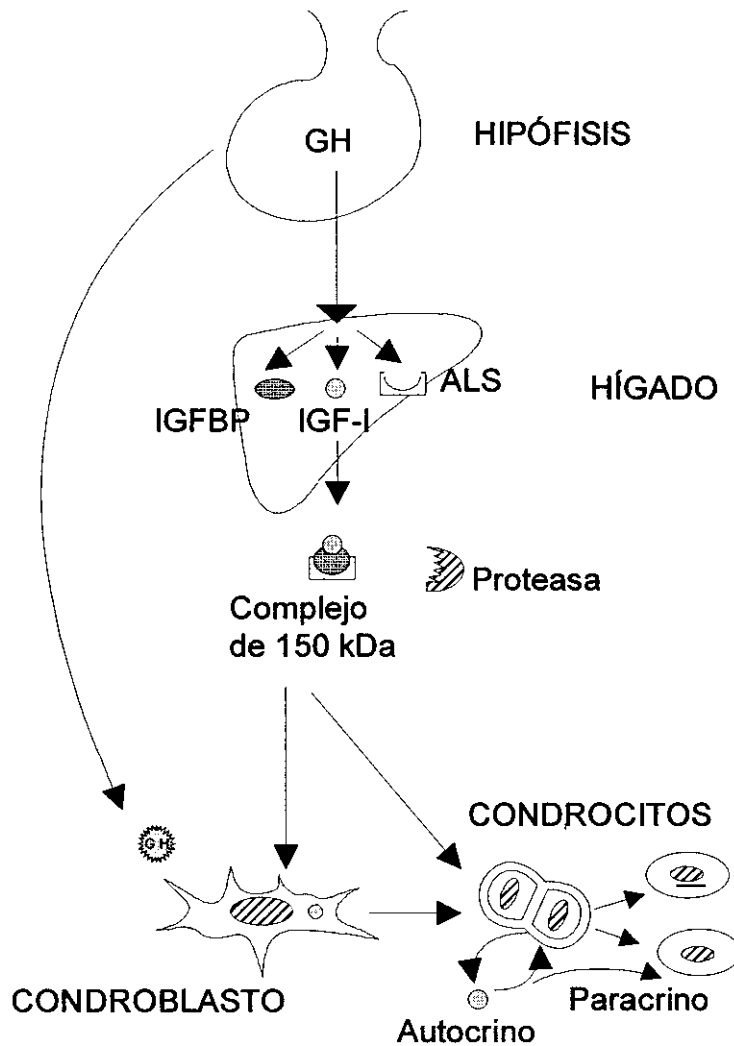


Figura 7. Control del crecimiento óseo longitudinal por la GH y la IGF-I.

* Crecimiento visceral.

La GH produce el crecimiento y desarrollo de otros tejidos además del óseo, como consecuencia de sus ya citadas acciones positivas sobre la síntesis de proteínas y la proliferación celular.

Así, en la médula ósea la GH activa la eritropoyesis y la linfopoyesis de forma dosis dependiente. También el músculo liso y las células beta del páncreas responden directamente *in vitro* a la GH, ya que a concentraciones fisiológicas aumentan la incorporación de ³H-timidina y el contenido de ADN.

4.6.4. La GH y el sistema inmunitario.

Además de las citadas acciones de la GH sobre el metabolismo intermediario, esta hormona también participa positivamente en la respuesta inmunitaria del organismo (Kelly 1990). En el timo existen receptores para la GH, y en el ratón la administración de suero anti-GH atrofia tanto el timo como los ganglios linfáticos. Además, en las células hematopoyéticas la GH es un potente mitógeno (Isaksson y cols 1985). Recientemente se ha demostrado la existencia de expresión de GH en líneas celulares de leucemia humana (Devesa y cols 1996).

4.7. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GH.

El gen de la GH tiene una extensión aproximada de 2300 pb y en él se diferencian las siguientes regiones en sentido 5'- 3':

- región 5' no codificante, que contiene el promotor del gen al que se unen los elementos reguladores y en el que se localizan las secuencias consenso CATAAA y TATAAA (Caja TATA) características de los promotores de los animales eucariotas.
- región estructural del gen, codificante del pre-ARNm de GH y organizada en intrones y exones.
- región 3' no codificante, en la que se encuentra la secuencia de poliadenilación.

En la figura 8 aparecen los factores que regulan la transcripción del gen de la rGH y de la hGH.

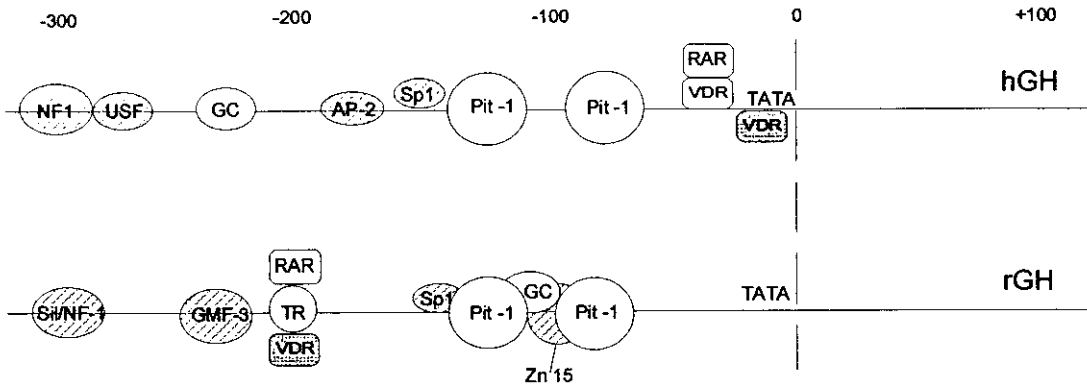


Figura 8. Factores que controlan la expresión génica de los genes de la hGH y rGH. En blanco se representan los factores que activan dicho proceso, en gris los que lo inhiben y en rayado los factores ubicuos. Los números indican la distancia al origen de la transcripción en pares de bases.

4.7.1. Pit-1.

De todos los factores de transcripción que interaccionan con el gen de la GH en la rata y en el hombre, el más importante y el que le confiere especificidad tisular es la proteína Pit-1. Esta proteína se expresa en las células somatotropas, lactotropas y tirotropas, en las que actúa como factor de transcripción estimulando la expresión de los genes de la GH, la prolactina y la subunidad β de la TSH (Sharp y Cao 1990, Karin y cols 1990).

Mediante estudios *in vitro* se ha determinado que la activación del promotor del gen de la GH por el Pit-1 requiere la unión de éste, en forma de dímeros, a dos sitios existentes en dicho promotor, uno proximal y otro distal (Bodner y Karin 1987) (figura 8). El extremo carboxilo del Pit-1 es el encargado de la unión de la proteína al ADN mientras que la región amino-terminal es la responsable de la activación de la transcripción.

Como ya se ha comentado, el Pit-1 es el mediador tanto de la estimulación de la síntesis de GH por GHRH (Ruvkun 1992) como de la proliferación de las células somatotropas inducida por dicho péptido (Castrillo y cols 1991). Asimismo, también parece que el Pit-1 desempeña una función determinante en la diferenciación celular durante el desarrollo de los tipos celulares de la hipófisis anterior (Dolle y cols 1990) y en la estimulación de la expresión del gen del receptor de GHRH (Lin y cols 1992).

Recientemente se ha descrito una variante de Pit-1, denominada Pit-2, producido por procesamiento alternativo del gen del Pit-1. Esta nueva proteína también se une al ADN en los mismos sitios que el Pit-1, aunque parece tener distinta actividad sobre la transcripción del gen de la GH (Vila y cols 1993).

4.7.2. Hormonas y otras sustancias relacionadas.

*** Hormonas tiroideas.**

Gran parte de los efectos de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4) sobre el crecimiento parecen realizarse controlando la producción de GH en la hipófisis anterior.

En la rata, la T_3 y la T_4 inducen la expresión del gen de la rGH (Yaffe y Samuels 1984) a través de la unión del receptor de las hormonas tiroideas (TR) a un elemento de respuesta a dichas hormonas (TRE) existente en el promotor (figura 8). También se ha localizado un TRE adicional en el tercer intrón del gen de la GH (Sap y cols 1990). Además, las hormonas tiroideas y el Pit-1 activan sinérgicamente el promotor del gen de la rGH (Schaufele y cols 1992).

Respecto a la intervención de la T_3 y la T_4 en la transcripción del gen de la hGH, los datos son confusos y contradictorios. Todavía no se ha localizado la secuencia de los TREs en el promotor del gen de la GH humana (Isaacs y cols 1987, Morin y cols 1990).

*** Glucocorticoides.**

Los glucocorticoides (GC) ejercen un control positivo sobre la expresión del gen de la GH tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Spindler y cols 1982). En estudios *in vitro* con células adenohipofisarias de rata y humanos se ha visto que los GC incrementan los niveles de ARNm de rGH y hGH, a través de la unión del complejo GC-receptor a los elementos de respuesta a dichos esteroides (GCREs) presentes en el promotor. En el promotor de hGH se ha demostrado la existencia de dos GCREs, uno en la zona del promotor y otro en el primer intrón, mientras que en la rGH parece existir únicamente el del promotor (Slater y cols 1985, Treacy y cols 1991) (figura 8).

*** Activina.**

La activina producida en las células gonadotropas hipofisarias controla de forma paracrina la síntesis de GH. Aunque los mecanismos de transducción de la señal de la activina no están todavía completamente definidos, parece que no actúa de forma directa uniéndose al promotor de rGH, sino que inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, provocando el descenso de la producción somatotropa de Pit-1 (Struthers y cols 1992). La activina puede actuar sinérgicamente con la SS inhibiendo la expresión de la rGH a nivel de la adenilato ciclasa (Tasaka y cols 1992).

*** IGF-I e Insulina.**

Tanto la IGF-I como la insulina disminuyen los niveles de ARNm tanto de la hGH (Yamashita y cols 1986, Prager y Melmed 1988) como de la rGH (Melmed y cols 1985, Yamashita y Melmed 1987). Aunque hay datos que sugieren un efecto directo de estas hormonas sobre la transcripción del gen, también podrían actuar indirectamente activando factores represores o disminuyendo la estabilidad del ARNm de la GH. Aún no se ha determinado la secuencia de nucleótidos implicada en la acción de la IGF-I y la insulina a nivel transcripcional.

*** Acido retinoico.**

El ácido retinoico, metabolito activo de la vitamina A, interviene en el crecimiento y desarrollo celulares. En la rata actúa tanto de forma independiente como sinérgica con la T₃ y los GC, aumentando la expresión del gen de la rGH, a través de la unión del receptor del ácido retinoico (RAR) al TRE (Umesono y cols 1988) (figura 8). Recientemente, se ha identificado un sitio específico de unión del ácido retinoico al promotor del Pit-1 en la rata (Rhodes y cols 1993).

Aunque se ha demostrado in vivo un papel facilitador del ácido retinoico sobre la secreción de GH en el hombre (Evain-Brion y cols 1994), su mecanismo todavía es poco conocido. No obstante, datos recientes parecen indicar que actúa junto con la vitamina D (Alonso-Sampedro 1997) (figura 8).

*** Vitamina D.**

Aunque la vitamina D no modifica la expresión del gen de la rGH, diferentes estudios indican que inhibe la respuesta mediada por las hormonas tiroideas y el ácido retinoico. Esta acción parece estar mediada por la unión del receptor de la vitamina D (VDR) al TRE, impidiendo la unión a éste del receptor de las hormonas tiroideas y del receptor del ácido retinoico (García-Villalba y cols 1996) (figura 8).

Existen muy pocos datos en la literatura acerca de la acción que realiza la vitamina D sobre la transcripción del gen de la hGH. No obstante, trabajos muy recientes indican la posibilidad de que el receptor de la vitamina D se una al promotor de la hGH en dos sitios: una primera zona muy cercana a la Caja TATA y en la que actuaría en solitario inhibiendo la transcripción de la hGH, y una segunda región en la que el receptor de la vitamina D intervendría junto con el receptor del ácido retinoico, cooperando con el Pit-1 en la activación de la transcripción (Alonso-Sampedro 1997) (figura 8).

4.7.3. Factores ubicuos.

Aparte de los elementos reguladores de la transcripción del gen de la GH que acabamos de ver, también se ha demostrado la intervención en este proceso de otros factores de transcripción presentes en todas las células (figura 8).

En la región promotora del gen de la hGH existen también sitios de unión para el factor de transcripción Sp1, el factor estimulador *upstream* (USF), el factor nuclear-1 (NF-1) y la proteína activadora-2 (AP-2) (Theill y Karin 1993).

En lo que respecta a la rGH, también se han localizado regiones dentro del promotor a las que se une Sp1, además del factor GHF-3 y la proteína Zn-15 (Schaufele y cols 1990, Lipkin y cols 1993). Además, en el promotor de la GH de la rata existe un elemento silenciador que suprimiría la expresión del gen en aquellos tipos celulares en los que no se produce síntesis de GH (Pan y cols 1990). Aunque el factor que se une a esta secuencia no ha sido todavía caracterizado, parece que se trata de una proteína perteneciente a la familia del NF-1.

4.7.4. Modelo de control de la transcripción del gen de la GH.

Una vez vistos los factores que intervienen en la transcripción de la GH, se ha propuesto un modelo en el que todos los elementos reguladores actuarían de forma secuencial y coordinada para dar lugar a los niveles de GH que existen normalmente en las células somatotropas (Theill y Karin 1993).

En primer lugar, tanto los factores de transcripción ubicuos NF-1, USF y Sp1 como las hormonas tiroideas, los GC y el ácido retinoico permitirían el acceso del Pit-1 al ADN actuando sobre el reordenamiento de la cromatina. Una vez unido el Pit-1, se producirían toda una serie de cambios conformacionales en el ADN, lo que haría posible la unión del complejo de transcripción de la ARN polimerasa a la caja TATA comenzando así la transcripción de la GH.

Según esto parece que el Pit-1, más que actuar como factor dominante de la transcripción de la GH, activa e interviene en la especificidad de dicho proceso, además de ser el responsable de la expresión basal de la GH. Aunque el Pit-1 es necesario para la transcripción eficaz del gen de la GH, para que se obtengan los niveles normales de expresión de esta hormona en la hipófisis también se requiere la intervención del resto de los elementos reguladores (Schaufele y cols 1992).

4.8. CONTROL DE LA SECRECIÓN DE GH.

Aunque, como veremos a continuación, hay toda una serie de factores que pueden alterar y modular en cada momento la tasa de liberación hipofisaria de GH, el control primario de esta secreción parece establecerse en estructuras extrahipotalámicas. De acuerdo con esto, existiría un marcapasos central determinante de la puesta en marcha del ritmo basal de secreción alternante de GHRH y SS, y que llevaría al patrón de secreción espontánea de la GH (Devesa y cols 1989).

La GHRH y la SS son los principales reguladores de la liberación de GH desde las células somatotropas y constituyen la vía a través de la cual actúan diversos neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas y factores metabólicos implicados en el control de la secreción de GH. No obstante, estos elementos pueden actuar directamente sobre la hipófisis.

4.8.1. Neurotransmisores.

*** Vías adrenérgicas.**

Las vías adrenérgicas tienen un doble papel sobre la secreción de GH, ya que estimulan o inhiben dicho proceso actuando a través de diferentes receptores.

La secreción de GH es estimulada por agonistas α_2 -adrenérgicos como la clonidina, mediante la activación de la secreción de GHRH (Kabayama y cols 1986), supresión de la liberación de SS (Lima y cols 1993b), y posiblemente también a través de la serotonina (Aulakh y cols 1992) (figura 9). Por otro lado, los agonistas adrenérgicos α_1 y β_2 inhiben la secreción de GH a través de su acción positiva sobre la liberación de SS (Krieg y cols 1986, Bluet-Pajot y cols 1993) (figura 9).

En cualquier caso, en condiciones fisiológicas el predominio corresponde a la vía α_2 -adrenérgica, que parece no ser solamente el mediador de estímulos liberadores de GH, sino que también está implicada en la generación de la secreción episódica de la hormona.

*** Dopamina.**

El papel de las vías dopaminérgicas en el control de la secreción de GH es muy complejo y contradictorio, ya que se han descrito acciones tanto estimuladoras como inhibitorias de la actividad somatotropa.

En primer lugar, se ha postulado que la dopamina tiene un papel positivo sobre la GH gracias a la inhibición de la liberación de SS, actuando sobre las terminaciones SS-érgicas de la eminencia media (Vance y cols 1987) o directamente en las regiones hipotalámicas productoras de este péptido (figura 9).

Por otro lado, diversos estudios indican que la dopamina activa la secreción de SS, lo que se traduciría en una disminución de la liberación de GH en la hipófisis. Aunque no puede descartarse que ésta sea una acción directa sobre las neuronas SS-érgicas (Kitajima y cols 1989), los datos de Arce y cols (1991) sugieren que la dopamina actúa de forma indirecta sobre la secreción de SS modulando negativamente la disponibilidad de noradrenalina (figura 9).

Por lo tanto, la dopamina tendría un papel principalmente modulador de la secreción de GH y dependiente del estatus funcional de las vías implicadas en el control primario de este proceso.

*** Vías colinérgicas.**

La acetilcolina, actuando sobre receptores muscarínicos, estimula la secreción de GH. Se ha propuesto que este sistema sirva como vía final común para toda una serie de estímulos que inducen secreción de GH como el sueño, el ejercicio o la arginina.

Esta acción de la acetilcolina parece realizarse modulando positivamente las vías α_2 -adrenérgicas, lo que conduciría a una disminución de la liberación de SS, (Devesa y cols 1991a). Esta acción también podría ser llevada a cabo de forma directa sobre las neuronas productoras de SS (figura 9).

*** Serotonina.**

Aunque el papel que cumple la serotonina en la regulación de la secreción de GH está muy poco claro, datos obtenidos en ratas describen un papel activador de dicho proceso a través de la estimulación de la liberación de GHRH (Murakami y cols 1986) (figura 9).

*** GABA.**

El mecanismo de acción del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el control de GH está poco claro. La administración aguda de GABA en el hombre estimula la secreción de GH a expensas del bloqueo del vertido de SS a la circulación portal. Sin embargo, el tratamiento crónico con agonistas de este neurotransmisor suprime la respuesta de GH a insulina o arginina (Llorens-Cortes y cols 1992). Como consecuencia de estas discrepancias, se ha postulado que el efecto del GABA sobre la GH no sea más que una acción indirecta dependiente del tono dopaminérgico central.

4.8.2. Neuropéptidos.

*** PACAP.**

El PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) es un polipéptido de 38 aminoácidos que se aisló inicialmente en el hipotálamo del cordero y luego se demostró su presencia también en el del hombre (Vigh y cols 1991). Se han localizado receptores específicos para este péptido en las células somatotropas, en las que produce liberación de GH por un mecanismo mediado por AMPc (Goth y cols 1992) (figura 9). A pesar de esto, todavía no se ha encontrado un papel fisiológico para este péptido en relación con la secreción de GH.

*** Péptidos opioides.**

La administración de opioides o derivados produce una brusca liberación de GH. Este proceso es inhibido, en la rata, por anticuerpos anti-GHRH, lo que indica que el mecanismo de acción puede ser a través de la liberación de dicho péptido hipotalámico (Wehrenberg y cols 1985). Por otro lado, los datos de Delitalia y cols (1989) sugieren que, en el hombre, este efecto de los péptidos opioides podría estar mediado por la inhibición de la secreción de SS (figura 9).

En cualquier caso, no parece que los opioides participen en los mecanismos básicos de control de GH, aunque si es probable que sean los responsables de la liberación de la hormona asociada al estrés o al dolor.

*** Galanina.**

La galanina es un neuropéptido que se encuentra en altas concentraciones en el hipotálamo y produce liberación de GH en el hombre y en la rata. Las vías mediadoras de esta acción podrían ser tanto la estimulación de la secreción de GHRH (Merchenthaler y cols 1993) como la inhibición de la liberación de SS (Davis y cols 1987) (figura 9).

*** Citoquinas.**

Diversas citoquinas parecen intervenir en la modulación de la secreción de GH, actuando tanto en el hipotálamo como en la hipófisis.

La interleuquina-1 β (IL-1 β) aumenta los niveles de ARNm de SS y estimula la liberación de este péptido a la circulación portal, produciendo así la atenuación de la pulsatilidad de GH (Lumpkin y Hartmann 1989). El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) también actúa a nivel hipofisario influyendo de forma negativa tanto sobre la secreción basal de GH como sobre la estimulada por GHRH (Gaillard y cols 1990). La interleuquina-6 (IL-6) estimula la secreción de GH en cultivos de células hipofisarias, por lo que podría funcionar como un factor liberador intrahipofisario de ésta hormona (Spangelo y cols 1990).

*** Otros péptidos.**

Varios péptidos presentes tanto en el aparato digestivo como en el cerebro parecen estimular la secreción de GH (Rivier y cols 1977). Entre estos se encuentra la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo, la motilina, la neurotensina y la colecistoquinina (Matsumura y cols 1984). No obstante, parece bastante improbable que estos péptidos jueguen un papel fisiológico en el control de la liberación de GH.

De la misma forma, aunque diferentes péptidos hipotalámicos liberadores de hormonas hipofisarias (TRH, CRH, LHRH) no intervienen en la secreción de GH en condiciones normales, sí parece que pueden influir sobre el eje somatotropo en situaciones patológicas como la acromegalia, la depresión o la anorexia nerviosa (Maeda y Frohman 1980, Harvey 1990).

4.8.3. Hormonas.

*** Hormonas tiroideas.**

Aparte del ya comentado efecto de las hormonas tiroideas sobre la transcripción del gen de la GH, estas hormonas intervienen en la liberación de GH actuando a nivel hipotalámico e hipofisario.

Las hormonas tiroideas parecen influir sobre la síntesis de GHRH puesto que la carencia de éstas provoca un descenso de la síntesis del citado péptido hipotalámico (Katakami y cols 1986b), lo que conduce a una disminución en la producción somatotropa de GH. Además, también facilitan la unión de la GHRH a sus receptores y modulan positivamente el número de éstos (figura 9).

*** Glucocorticoides.**

Estos esteroides aumentan la transcripción tanto del gen de la GH como la del gen del receptor de la GHRH (Seifert y cols 1985) (figura 9). Esta acción facilitadora de los GC sobre la secreción de GH ocurre tras ser administrados de forma aguda. Sin embargo, tras el tratamiento de forma crónica se observa el efecto contrario, esto es, un descenso de los niveles circulantes de GH, posiblemente como consecuencia del aumento en la liberación hipotalámica de SS a través de la estimulación de las vías β_2 -adrenérgicas (Lima y cols 1993a) (figura 9).

*** Esteroides sexuales.**

La secreción espontánea de GH presenta un claro dimorfismo sexual tanto en el hombre como en la rata, que se manifiesta a partir de la pubertad (Tannenbaum y Martin 1976, Rose y cols 1991). Así, en el varón y en la rata macho, la secreción ultradiana de GH muestra episodios de brusca liberación entre 4 y 8 veces cada 24 h, mientras que en las mujeres y en la rata hembra los picos secretores de GH aparecen a intervalos más frecuentes y presentan menor amplitud, aunque los niveles basales entre dos picos consecutivos son más altos.

Este dimorfismo sexual parece ser el resultado de la acción de los esteroides sexuales en los períodos neonatal y adulto (Chowen y cols 1993). El estradiol reduce los niveles de GHRH en el hipotálamo y tiene una acción inhibitoria sobre la SS, que puede estar mediada por las vías α_2 -adrenérgicas. Por su parte, la testosterona activa la liberación de SS e incrementa los niveles del ARNm de GHRH (Chowen y cols 1989, Devesa y cols 1991b) (figura 9). Así, en el macho, un tono somatostatinérgico elevado, unos niveles hipotalámicos de GHRH altos y la presencia de testosterona

que potencie la síntesis hipofisaria de GH se traducen en unos pulsos de GH de elevada amplitud separados por períodos en los que la GH circulante está muy baja. Mientras tanto en la hembra, en la que la concentración de GHRH en el hipotálamo es menor que en el macho y donde la SS tiene también menor efecto que en éste, los picos de GH son frecuentes pero de baja amplitud.

La existencia de este dimorfismo sexual en la secreción de GH parece tener implicaciones funcionales (Jansson y cols 1985b) que va desde el crecimiento somático hasta la inducción enzimática en el hígado o el metabolismo lipídico. En la rata macho, la aparición de picos de GH de gran amplitud separados por valles, consigue un mayor efecto sobre el crecimiento que la presencia más continuada de GH en los tejidos diana, tal y como ocurre en la rata hembra.

4.8.4. Factores metabólicos.

*** Glucosa.**

La hiperglucemia conduce a la inhibición de la secreción de GH, mientras que el descenso de la glucemia produce la rápida liberación de esta hormona. Ambos efectos parecen estar mediados por cambios en la secreción de SS de tal forma que la hiperglucemia estimula y la hipoglucemia, a través de las vías α_2 -adrenérgicas, inhibe la liberación de dicho péptido hipotalámico (Devesa y cols 1991a). No obstante también se ha postulado la intervención de la GHRH en los cambios en la secreción de GH inducidos por la glucosa (figura 9).

*** Ácidos grasos libres.**

De forma similar a lo ocurrido con la glucosa, el aumento de los niveles plasmáticos de FFA inhibe la liberación de GH y su disminución la estimula. Aunque inicialmente se aceptaba que estos efectos se realizaban únicamente a través de la SS, también se ha sugerido un efecto negativo directo de estos metabolitos a nivel de las células somatotropas, modificando las propiedades de la membrana plasmática (Casanueva y cols 1987) (figura 9).

*** Aminoácidos.**

Aunque no todos los aminoácidos intervienen en el control de GH, algunos como la arginina o la ornitina son estimuladores potentes de su secreción. El mecanismo implicado en esta acción parece ser la inhibición de la liberación hipotalámica de SS (Alba-Roth y cols 1988) (figura 9).

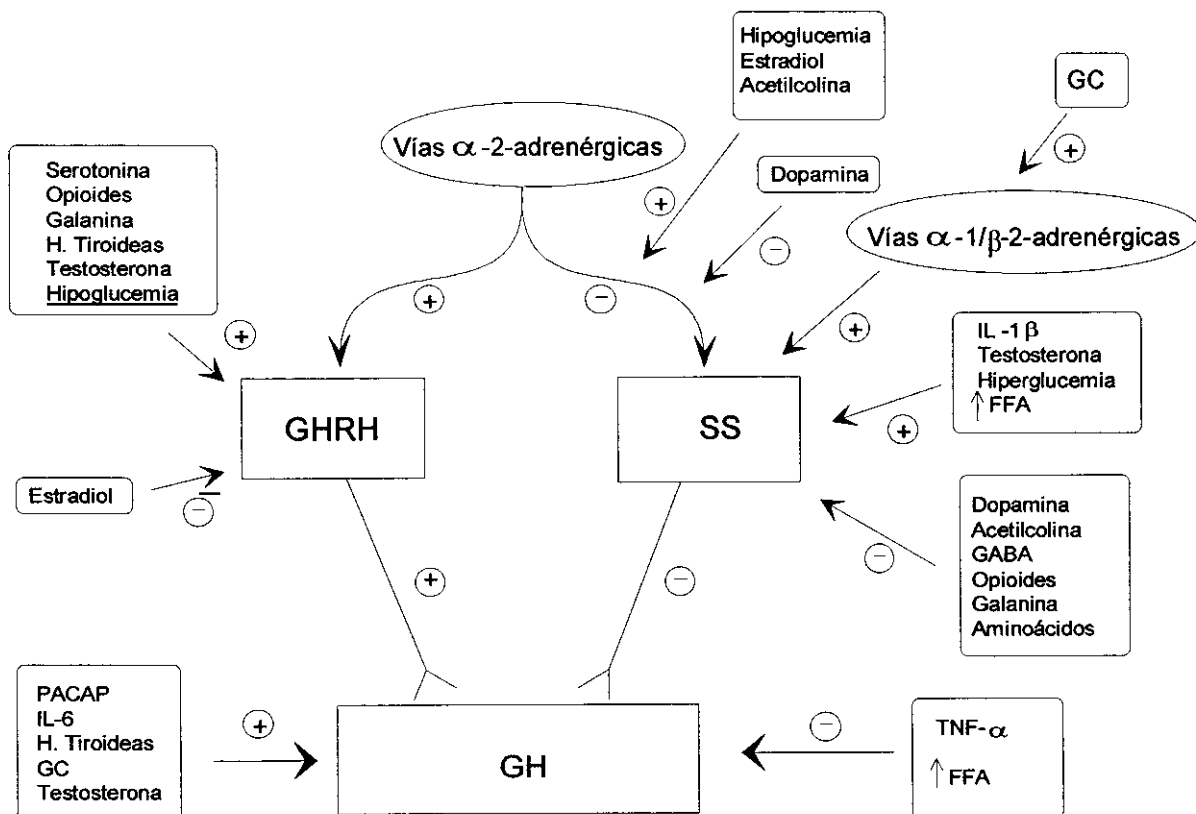


Figura 9. Control de la secreción de GH por neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas y señales metabólicas.

4.8.5. Mecanismos de retroalimentación.

Además de los efectos propios de los neurotransmisores, los neuropéptidos, las hormonas y las señales metabólicas sobre la liberación de GHRH y SS, la secreción de GH se encuentra regulada por sistemas de retroalimentación denominados de “asa larga”, “asa corta” y “asa ultracorta” (figura 10).

* Retroalimentación de asa larga.

La IGF-I circulante, actuando tanto sobre el hipotálamo como sobre la hipófisis, es capaz de inhibir la secreción de GH. En el hipotálamo, la IGF-I activa la liberación de SS (Berelowitz y cols 1981) e inhibe la de GHRH (Müller 1987). También se ha descrito una acción negativa de IGF-I sobre la síntesis de GHRH (Uchiyama y cols 1994) (figura 10). Por otro lado, en la hipófisis además de provocar la disminución de los niveles del ARNm de GH, la IGF-I disminuye la liberación de GH tanto basal como estimulada por GHRH (Ceda y cols 1987) (figura 10).

Datos recientes indican que la IGF-I regula negativamente la secreción de GH actuando principalmente en la hipófisis (Minami y cols 1997).

*** Retroalimentación de asa corta.**

La administración de GH inhibe el efecto estimulante de la GHRH sobre la liberación de GH en sujetos tanto normales como deficientes en esta hormona (Hanew y cols 1988). En la rata macho consciente se ha observado que, tras infusiones intravenosas de GH, los pulsos endógenos desaparecen durante un período aproximado de 3 h (Carlsson y Jansson 1990). Estos efectos podrían deberse a la estimulación de la liberación de SS (Chihara y cols 1981, Minami y cols 1997) e inhibición de la secreción de GHRH (Clark y cols 1988b) (figura 10). Además, la GH estimula la expresión del gen de la SS (Pellegrini y cols 1997, Rogers y cols 1988) e inhibe la del gen de la GHRH (Uchiyama y cols 1994).

No obstante, tal y como proponen diversos autores estas acciones de la GH a nivel hipotalámico podrían ser realizadas directamente por dicha hormona hipofisaria y/o también mediante la IGF-I producida localmente en el hipotálamo (Sato y Frohman 1993, Becker y cols 1995) cuya síntesis estaría regulada por la propia GH tal y como sucede en otros tejidos (Hynes y cols 1987, Wood y cols 1991).

Aunque se ha detectado ARNm para el receptor de GH en la hipófisis (Fraser y cols 1991, Hull y cols 1993), esta hormona no parece actuar directamente sobre las células somatotropas (Richman y cols 1981, Goodyer y cols 1984).

*** Retroalimentación de asa ultracorta.**

Además de su mutuo antagonismo sobre la célula somatotropa, varias evidencias morfológicas y funcionales sugieren una estrecha interacción entre GHRH y SS a nivel hipotalámico para regular la secreción episódica de GH (Liposits y cols 1988, Tannenbaum y cols 1990, Slama y cols 1993).

Mediante estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la GHRH activa la secreción de SS (Aguila y McCann 1988, Katakami y cols 1986a) (figura 10). Sin embargo, el signo del efecto de la SS sobre la secreción de GHRH no está claro. La secreción de GH inducida por la administración *i.c.v.* de SS parece estar mediada por la GHRH ya que este efecto se anula con la inmunización pasiva contra GHRH (Murakami y cols 1987), lo que apoyaría una acción positiva de la SS sobre la GHRH. Por el contrario, tanto el trabajo de Plotsky y Vale (1985) en el que se describe el aumento de los niveles de GHRH en sangre portal hipofisaria después de la inmunización pasiva anti-SS por vía *i.c.v.*, como los de otros autores (Katakami y cols 1988, Miki y cols 1988) parecen indicar que la SS inhibe la secreción de GHRH (figura 10).

Por otro lado, existen evidencias neuroanatómicas que demuestran la existencia de axones neuronales de GHRH en contacto directo con dendritas de neuronas GHRH-érgicas (Horvath y Palkovits 1988), lo que sugiere la existencia de un mecanismo de autorregulación de su propia liberación (figura 10). En relación con esto, la inyección i.c.v. de GHRH disminuye la secreción de GH a través de la inhibición de su propia liberación (Lumpkin y cols 1985). También podría existir un mecanismo de autorregulación negativa similar para la SS (Peterfreund y Vale 1984, Richardson y Twente 1986) (figura 10).

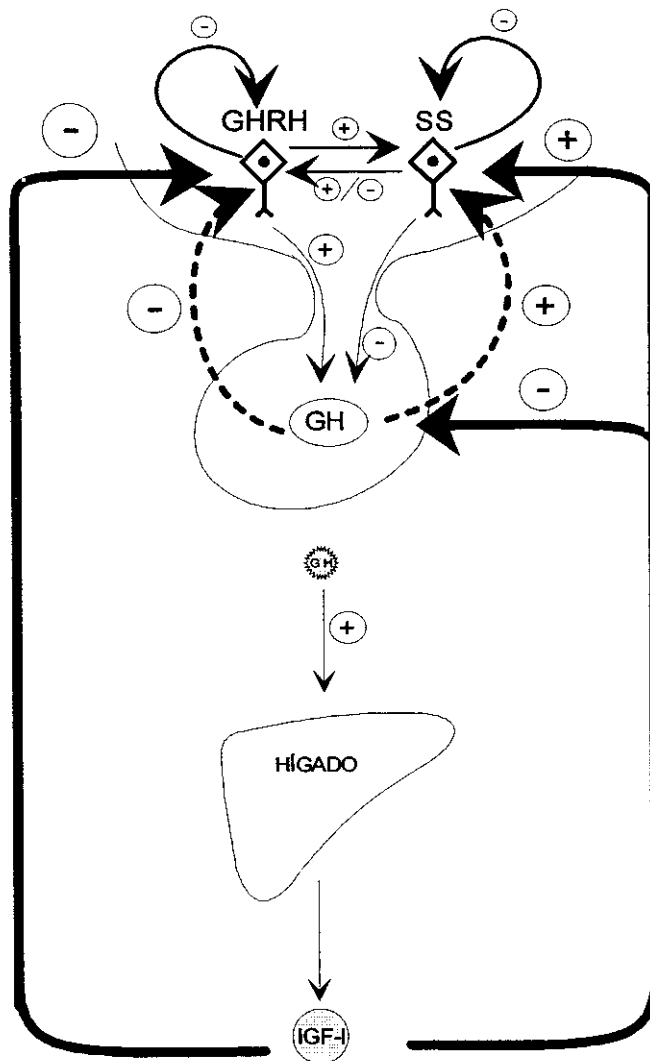


Figura 10. Mecanismos de retroalimentación de asa larga (→), asa corta (← - ▶) y asa ultracorta (↪).

5. SOMATOMEDINAS.

Los primeros datos acerca de la existencia de las somatomedinas correspondieron a los estudios de Salmon y Daughaday en 1957. Estos autores veían como el efecto positivo de la GH sobre el crecimiento del cartílago in vivo ocurría a través de un factor presente en el plasma de animales normales, que denominaron factor de sulfatación puesto que en su experimento dicha molécula estimulaba la incorporación de sulfato radiactivo a la matriz extracelular ósea. Más tarde se vió que estos factores también intervenían en diferentes actividades metabólicas, y pasaron a llamarse somatomedinas (Daughaday y cols 1972), haciendo referencia a su acción mediadora del crecimiento somático.

Actualmente, a estas somatomedinas se les conoce con el nombre de Factores de crecimiento similares a la insulina o IGFs (Rinderknecht y Humbel 1978), para resaltar sus similitudes con la insulina y su papel en el crecimiento.

5.1. BOSÍNTESIS Y ESTRUCTURA QUÍMICA.

Existen dos tipos de IGFs: la IGF-I y la IGF-II, con una secuencia de aminoácidos muy parecida a la de la proinsulina. La IGF-I humana es una cadena polipeptídica de 70 aminoácidos, de carácter básico y de 7.6 KDa (figura 11). La IGF-II tiene 67 aminoácidos, 7.4 KDa de peso molecular y es ligeramente ácida.

Ambas IGFs estan presentes en prácticamente todas las especies de mamíferos y aves, con una secuencia muy conservada. La IGF-I también esta presente en anfibios (*Xenopus*) y peces teleósteos (salmón) (Rotwein 1991).

```
Hombre  GPEELCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQT
          GIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA

Rata    GPEELCGAELVDALQFVCGPRGFYFNKPTGYGSSIRRAPQT
          GIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPTKSA
```

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la IGF-I en el hombre y en la rata. En negrita estan señalados los aminoácidos que son diferentes de la secuencia de la IGF-I humana. Nomenclatura: A-Ala C-Cys D-Asp E-Glu F-Phe G-Gly H-His I-Ile K-Lys L-Leu M-Met N-Asn P-Pro Q-Gln R-Arg S-Ser T-Thr V-Val Y-Tyr.

El gen de la IGF-I en la rata y en el hombre ocupa 90 Kb y consta de 5 exones separados por 4 intrones, de los cuales sólo codifican la proteína madura los exones 2 y 3. El gen de la IGF-I en humanos esta en el cromosoma 12, y su transcripción y posterior procesamiento origina dos tipos de ARNm como consecuencia de la

transcripción de diferentes exones (Rotwein y cols 1986). En la rata, el procesamiento del transcrito primario del gen de IGF-I es más complejo que en humanos, lo que conduce a la aparición de varias moléculas de ARNm distintas (Shimatsu y Rotwein 1987).

El gen de IGF-II en humanos ocupa 30 Kb y está situado en el cromosoma 11, junto a los genes de la insulina y de la tirosina hidroxilasa (Bell y cols 1985). Consta de 8 exones, de los que únicamente el 6, el 7 y el 8 codifican para la proteína madura; el resto forman parte del péptido señal. En la rata, el gen de IGF-II está formado por 6 exones de los que el 4, el 5 y el 6 codifican el péptido maduro.

5.2. LOCALIZACIÓN.

Las IGFs se encuentran presentes en la mayoría de los fluidos corporales, como el plasma, la linfa, la orina, la saliva y los líquidos cefalorraquídeo, ovárico y seminal. La principal fuente de estas IGFs es el hígado (Hintz 1984), aunque también se ha demostrado producción de IGFs en otros tejidos como los órganos reproductores y el cartílago y en diferentes zonas del sistema nervioso central, como los plexos coroideos. En estos tejidos, las IGFs podrían regular localmente el crecimiento, según lo cual la GH coordinaría la respuesta de crecimiento en los diferentes tejidos del organismo mediante el control de la producción local de IGFs.

Las IGFs no se almacenan en las células en forma de gránulos de secreción, sino que son sintetizadas "sobre demanda". En estudios *in vitro* se ha observado cómo estas hormonas son rápidamente sintetizadas en el hígado e inmediatamente secretadas al medio (Schwander y cols 1983).

5.3. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS.

Como decíamos anteriormente, las somatomedinas se encuentran en casi todos los fluidos biológicos y en su mayoría van unidas a unas proteínas transportadoras denominadas IGFBPs (Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins), por lo que también éstas están presentes sobre todo en plasma, aunque también se han encontrado en los líquidos cefalorraquídeo, amniótico y en la orina (Westwood y cols 1994). Su producción corre a cargo de muy diversos órganos, como el hígado, riñón, ovario, hueso, placenta y músculo (Bach y cols 1995, Oh y cols 1996). También son sintetizadas en el sistema nervioso central (Tseng y cols 1989).

Las IGFBPs constituyen una familia de 7 proteínas con la propiedad común de unir IGF-I e IGF-II. De todas ellas la más importante, tanto cuantitativa como cualitativamente, es la IGFBP-3 y además es la más directamente relacionada con el

eje somatotropo. Constituye el 75 % del total de IGFBPs presentes en plasma y transporta del 70 al 90 % de todas las IGFs circulantes. La cantidad de IGFs libres es inferior al 1 % (Gourmelen y cols 1989).

El transporte de las IGFs en plasma se hace mediante un complejo ternario de 150 KDa en el que se incluyen IGFBP-3, IGF-I o II y una proteína ácido lábil (ALS). Este complejo es estable a pH neutro, mientras que a pH ácido las IGFs se liberan del mismo. Una vez que IGFBP-3 se une a la IGF, sufre un cambio conformacional que le permite reaccionar con la ALS. Cuando las IGFs se encuentran formando este complejo, no pueden unirse a sus receptores, ya que la proteína transportadora oculta el dominio de unión de la IGF al receptor.

El proceso de liberación de las IGFs de sus proteínas transportadoras es dependiente de la acción de proteasas (Lee y Rechler 1996) sobre las proteínas transportadoras, produciéndose una disminución de la afinidad de la proteína transportadora por la IGF.

Las IGFBPs, además de transportar las IGFs en plasma, constituyen una reserva circulante de éstas, regulan su tasa de aclaramiento renal aumentando su vida media y modulan las acciones de las IGFs mediante el control de la accesibilidad de estas hormonas a sus receptores en los órganos diana. También actúan de forma directa e independiente de las IGFs sobre el proceso de proliferación celular, inhibiéndolo como en el caso de la IGFBP-3 (Kelley y cols 1996) o activándolo como IGFBP-5 (Mohan y cols 1995).

Los niveles circulantes de las IGFBPs dependen de numerosos factores como la edad, el estado nutricional y diferentes hormonas como la GH, las IGFs, la insulina, los esteroides sexuales y los GC (Powell y cols 1991, Crawford y Handelsman 1996). El principal regulador de la IGFBP-3 es la GH. Sus niveles aumentan en la acromegalia y disminuyen en los déficits de GH (Baxter y Martin 1986). Los niveles de IGFBP-3 en ratas son dependientes de IGF-I (Spagnoli y Rosenfeld 1996).

5.4. RECEPTORES Y MECANISMOS DE ACCIÓN.

Se han descrito 2 tipos de receptores para las somatomedinas que unen IGF-I, IGF-II e insulina, aunque con distinta afinidad. El receptor de tipo I tiene alta afinidad por IGF-I, algo menos por IGF-II e interacciona, aunque débilmente, con la insulina. Por el contrario el principal ligando del receptor de tipo II es la IGF-II, también se une a IGF-I pero con mucha menos afinidad y no interacciona con la insulina.

5.4.1. Receptor de tipo I.

El receptor de tipo I guarda gran homología tanto estructural como en la secuencia de aminoácidos con el receptor de la insulina. Está compuesto por cuatro subunidades, dos subunidades α y dos subunidades β , formando dos heterodímeros idénticos. Cada dímero está constituido por una subunidad α unida a una subunidad β mediante puentes disulfuro. Este mismo tipo de interacción es la que une a los dos dímeros entre sí, a través de las subunidades α .

La subunidad α es extracelular y contiene la zona de unión del ligando. La subunidad β está compuesta por un dominio extracelular, un segmento transmembrana, y una larga región intracitoplásmica en la que se encuentran el dominio con actividad tirosina quinasa y las tirosinas para fosforilación (Leroith y cols 1995).

La unión del ligando a la subunidad α produce un cambio conformacional en la subunidad β , activándose el dominio tirosina quinasa lo que conduce a la autofosforilación del receptor y de otras muchas proteínas. La autofosforilación del receptor se lleva a cabo de tal forma que las subunidades β se fosforilan recíprocamente (Frattali y Pessin 1993).

Entre las proteínas fosforiladas por el receptor de tipo I está la proteína IRS-1, también mediadora de la acción de la GH, como vimos anteriormente. La activación de la proteína IRS-1 conduce a la activación de una proteína quinasa MAP, que fosforila a determinados factores de transcripción implicados en los procesos de crecimiento y diferenciación celulares, y a la fosforilación de la fosfatidilinositol 3-quinasa que interviene en el transporte de glucosa y en procesos mitogénicos (Leroith y cols 1995).

5.4.2. Receptor de tipo II.

El receptor de tipo II es una única cadena polipeptídica. La región extracelular del receptor está compuesta por la repetición de 15 segmentos homólogos, y contiene las secuencias de unión de las IGFs y de proteínas con moléculas de manosa 6-fosfato, como varias enzimas lisosomales, la tiroglobulina y el precursor del factor de crecimiento transformante- β 1.

El segmento intracitoplásmico del receptor de tipo II contiene las secuencias que regulan el movimiento de proteínas a través de la membrana celular, la endocitosis del complejo hormona-receptor y el acoplamiento con proteínas G

inhibitorias, que parecen intervenir en la transducción de la señal de la unión de las IGFs con el receptor (Nishimoto y cols 1989).

El receptor de tipo II de las IGFs parecen ser mediador del efecto que tiene IGF-II sobre la síntesis hepática de glucógeno y la síntesis del ADN en fibroblastos de ratón (Hari y cols 1987, Kojima y cols 1988).

5.5. ACCIONES BIOLÓGICAS.

Los efectos que las IGFs tienen sobre las células diana se clasifican, según su latencia de acción, en agudos y crónicos. En cualquiera de los casos, realizan sus acciones de forma endocrina, cuando quienes actúan son las IGFs producidas en el hígado, o de forma autocrina/paracrina si las IGFs que intervienen son sintetizadas localmente. Esta última circunstancia es especialmente notable a nivel del cartílago de crecimiento.

5.5.1. Efectos agudos.

Las acciones agudas o del tipo de la insulina de las somatomedinas consisten en el estímulo de la captación y uso de glucosa por los tejidos periféricos, la activación de los procesos de síntesis de lípidos, glucógeno y proteínas, y la estimulación de la glicolisis e inhibición de la lipólisis. Estas acciones son especialmente notorias en el hueso, en el músculo esquelético y en el cardíaco y parece que podrían estar mediadas tanto por el propio receptor de IGFs como por el de insulina (Zapf y cols 1981).

5.5.2. Efectos crónicos.

*** Acciones sobre el crecimiento somático.**

Entre los numerosos efectos crónicos de la IGF-I destaca su acción positiva sobre la proliferación y diferenciación de casi todos los tipos celulares entre los que destacan los condrocitos, los osteoblastos, las células del músculo liso y del esquelético, las células foliculares tiroideas y las células de la granulosa ovárica (Jones y Clemmons 1995). La consecuencia de estas acciones es la estimulación del crecimiento somático, aumentando el peso de ciertos órganos y también la longitud de los huesos.

En el cartílago de crecimiento, la IGF-I actúa sobre los condrocitos estimulando su proliferación y maduración, además de inducir la síntesis de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno de tipo I (Delany y cols 1994) y los

proteoglicanos. El resultado de estas acciones es un incremento de la velocidad de crecimiento y del espesor de la epífisis tibial.

En lo que respecta a la IGF-II, parece intervenir poco en el crecimiento somático postnatal (Glasscock y cols 1992), siendo sus acciones de muy importantes durante el desarrollo fetal (Moses y cols 1980).

*** Otras acciones.**

Otra de las características de las IGFs es su capacidad de inhibir la muerte celular, acción que además es complementaria al estímulo de la proliferación celular. Este efecto está muy bien caracterizado en las células hematopoyéticas, los fibroblastos, y los oligodendrocitos (Rodríguez-Tarduchy y cols 1992, Sell y cols 1995).

Las somatomedinas también controlan la secreción de hormonas proteicas en diferentes tejidos diana como las células de la granulosa ovárica, las células de Leydig, las células epiteliales del timo y las células foliculares tiroideas (Penhoat y cols 1989, Giudice 1992). Además, la IGF-I inhibe directamente la secreción hipofisaria de GH, como ya vimos.

Aparte de estas acciones sobre la síntesis proteica, la IGF-I también interviene en procesos de migración quimiotáctica de linfocitos T y de células endoteliales, y en el reconocimiento celular por el sistema inmunitario (Grant y cols 1987).

5.6. CONTROL DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LAS IGFs.

5.6.1. IGF-I.

*** Hormonas.**

El controlador principal de la producción de IGF-I tanto en hígado como en otros tejidos es la GH. La administración de GH en animales de experimentación tanto normales como deficientes en GH aumenta los niveles del ARNm de la IGF-I (Mathews y cols 1989). En sujetos deficientes en GH existe una disminución de los niveles de IGF-I que rápidamente revierte al administrar GH exógena, mientras que individuos acromegálicos presentan unos niveles circulantes de IGF-I sumamente aumentados.

No obstante, otras hormonas como los esteroides sexuales, la insulina y las hormonas tiroideas también están implicadas en la regulación de los niveles circulantes de IGF-I. El cambio de los niveles circulantes de los esteroides gonadales durante la pubertad puede ser la causa del incremento de los niveles circulantes de

IGF-I asociado al estirón puberal. En la diabetes los niveles circulantes de esta hormona están disminuídos (Fagin y cols 1989).

*** Estado nutricional.**

El estado nutricional del organismo también juega un papel muy importante en la fabricación de IGF-I en el hígado, de tal forma que en situaciones de desnutrición, pese a existir una secreción normal de GH, los niveles circulantes de IGF-I están disminuídos. Esta situación se debe a que es necesaria una entrada adecuada de calorías y aminoácidos esenciales de la dieta para la biosíntesis hepática de IGF-I.

*** Edad.**

La IGF-I también depende de la etapa del desarrollo en que se encuentre el individuo. Los niveles plasmáticos de esta hormona son bajos en el período fetal y van aumentando tras el nacimiento hasta alcanzar el máximo durante la pubertad, momento a partir de la cuál los niveles circulantes de IGF-I van disminuyendo de forma bastante paralela a lo que ocurre con la secreción de GH.

5.6.2. IGF-II.

La producción de IGF-II varía según la etapa del desarrollo en la que se encuentre el individuo y además es dependiente de factores específicos del tejido en el que se sintetiza. Los niveles circulantes y tisulares máximos de IGF-II se alcanzan durante la etapa fetal. Tras el nacimiento, los niveles plasmáticos de IGF-II descienden y no se producen cambios durante la etapa puberal (Widmer y cols 1983).

En cuanto a la regulación de la IGF-II por factores hormonales es muy diferente a la de IGF-I. La GH parece ser poco importante en este proceso (Hynes y cols 1987) y los datos obtenidos al respecto son contradictorios. Así, los valores de la IGF-II están disminuídos en el hipopituitarismo pero sin embargo no se aumentan en la acromegalia (Widmer y cols 1983). Otras hormonas como los GC, la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la gonadotropina coriónica también parecen intervenir en la regulación de los niveles de la IGF-II (Daughaday y Rotwein 1989).

6. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH A LARGO PLAZO.

Numerosos trabajos han mostrado la eficacia de la GHRH administrada exógenamente como estimulante de la liberación de GH, por lo que dicha forma de tratamiento se ha empleado como alternativa a la administración de GH. La mayoría de los estudios se centran en el control de la secreción de GH por GHRH en períodos inferiores a 24 h, mientras que la respuesta hipofisaria a la estimulación prolongada más allá de este tiempo con dicho péptido hipotalámico ha sido poco estudiada hasta el momento.

Existen datos que describen la atenuación de la respuesta de GH (desensibilización) tras la estimulación de la hipófisis de forma continua con GHRH durante 24 h, tanto en animales de experimentación (Wehrenberg y cols 1984a y 1986b, Bilezikjian y cols 1986) como en el hombre (Losa y cols 1984, Vance y cols 1985, Robinson y cols 1992). Esta circunstancia parece deberse al descenso en el número de receptores para GHRH en la hipófisis, alteraciones en los mecanismos de transducción de la señal al interior de la célula somatotropa o al vaciamiento hipofisario de GH (Wehrenberg y cols 1986, Bilezikjian y cols 1986, Richardson y Twente 1988, Aleppo y cols 1997).

Se ha observado que la desensibilización de las células somatotropas por acción de la GHRH puede ocurrir también tras la administración de este péptido durante largo tiempo (Hulse y cols 1986, Tresguerres y cols 1993, Devesa y Tresguerres 1996). Sin embargo, hay datos en la bibliografía que no sólo no describen dicho fenómeno (Sartorio y cols 1986, Dubreuil y cols 1994) sino que demuestran un aumento de la sensibilidad hipofisaria al tratamiento prolongado con GHRH (Jansson y cols 1985a, Dubreuil y cols 1987). Esta discrepancia de resultados depende de la forma de administración del péptido, así como de la dosis empleada (Kovacs y cols 1994).

Teniendo en cuenta que el proceso de crecimiento dura varios meses en la rata y varios años en el hombre, es precisamente la regulación a largo plazo la que tiene verdadera importancia en este fenómeno para poder buscar formas de tratamiento alternativas a la GH, en los retrasos de crecimiento (Tresguerres y cols 1993) y la posibilidad de utilizar GHRH sería muy importante si se conociera realmente su mecanismo de control a largo plazo.

II. OBJETIVOS

Es bien conocido que la GHRH estimula y la SS inhibe la secreción de GH en la hipófisis, pero esto es válido fundamentalmente a corto plazo. Siendo el crecimiento un proceso que dura meses en el animal de experimentación y años en el hombre, nos interesaba saber como es realmente la regulación del eje somatotropo, responsable del control de dicho proceso, a largo plazo.

Segun esto, los objetivos que nos fuimos marcando a lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

① Investigar el régimen de administración de GHRH en la rata macho, tanto normal como deficiente en GH, que fuera capaz de potenciar o mantener la secreción normal de GH hipofisaria sin disminuir el contenido glandular de esta hormona.

② Al comprobar que la rata macho no parecía ser el modelo experimental idóneo para nuestros estudios, nos planteamos estudiar si la rata hembra, normal o deficitaria en GH, se comportaba de distinta forma ante la administración de GHRH.

③ Una vez constatado que la rata hembra presenta una mejor respuesta a nuestros tratamientos con GHRH, y dado que en este animal la SS parece jugar un papel preponderante sobre la GHRH en la regulación de la GH, se plantea estudiar el efecto de la administración de SS en combinación con GHRH en ratas hembras normales y deficientes en GH.

④ Con objeto de optimizar el modelo animal para nuestras investigaciones, intentamos determinar la respuesta al tratamiento con GHRH y SS de un nuevo animal de experimentación: el cordero.

Por otro lado, basándonos en datos de nuestro grupo que mostraban cómo diferentes tejidos glandulares son capaces de asumir parcialmente funciones hipofisarias cuando están sometidos a la influencia de hormonas hipotalámicas, nos planteamos:

⑤ Estudiar la síntesis y secreción de GH en tejidos extrahipofisarios sometidos a altas concentraciones locales de GHRH.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

1.1. RATAS.

Las ratas que se utilizaron en los distintos experimentos que componen esta Tesis Doctoral eran de la cepa Wistar y sus progenitores procedían de Interfauna-Harlan. Se mantuvieron en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid, con licencia nº 28079-15 ABC del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, adecuado a las normativas vigentes que rigen el uso de los animales de experimentación. El régimen luminoso fue de 12 h de luz (8:00-20:00) y 12 h de oscuridad, la temperatura media de 22 ± 2 °C y la humedad de 50 ± 5 %.

En los experimentos en los que los animales fueron tratados neonatalmente, la homogeneización inicial se hizo el primer o segundo día de vida, dejando 8-10 animales por madre para que todos tuvieran similares posibilidades de crecimiento y desarrollo. Posteriormente las crías se destetaron a los 22 días de vida, homogeneizando de nuevo los animales según el peso corporal con 7-8 animales por jaula desde los 21 hasta los 30 días de vida, a partir de los cuales se dejaron 4-5 animales en cada jaula.

Las jaulas eran de policarbonato (Macrolon ®, Panlab, Barcelona); en el caso de los animales adultos las dimensiones de éstas fueron 46.5x21.5x14.5 cm, mientras que en el caso de las hembras preñadas o con crías recién nacidas fueron de 22x20x14.5 cm.

La alimentación de las ratas madres durante el período de cría y de las crías hasta los 30 días de vida consistió en pienso de cría A-03; a partir de ese momento se les suministró pienso de mantenimiento A-04 (Panlab, Barcelona). En ambos casos, tanto la dieta como el agua de bebida se administraron "ad libitum".

1.2. CORDEROS.

En los experimentos 6 y 7 se utilizaron corderos machos de raza Merina, de dos meses de edad. Estos animales fueron mantenidos en condiciones de semiestabulación en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (CIT-INIA, Madrid), bajo condiciones naturales de luz y humedad propias del mes de abril y con libre acceso a la comida (Pienso compuesto Visan, Visan Industrias Zootécnicas S.A., Madrid) y al agua de bebida.

1.3. RATONES.

Para el estudio de la regulación de la secreción de GH en tejidos extrahipofisarios (experimento 8), se utilizaron ratones hembras normales de la cepa Ames de 1.5-2 meses de vida, criados en el laboratorio del Dr. Bartke y mantenidos en el animalario de la Facultad de Medicina de la Southern Illinois University en Carbondale (Illinois).

El fotoperíodo en el que se mantuvieron dichos ratones fue de 12 h de luz y 12 de oscuridad (6:30-18:30), la temperatura de 22 ± 1 °C y la humedad del 40 %. Se colocaron 4-5 ratones por jaula. Las dimensiones de dichas jaulas eran 30×15×15 cm. Al igual que las ratas, estos animales tuvieron libre acceso al agua de bebida y la comida (Tekland, Harlan Spragle-Dawley Inc., Madison, Wisconsin).

Todos los experimentos se llevaron a cabo teniendo en cuenta las normativas existentes sobre el manejo de animales de experimentación.

2. MÉTODOS DE SEGUIMIENTO DE LOS ANIMALES.

2.1. PESO CORPORAL.

Las ratas se pesaron con una balanza Schoehnle, con un error de 1 g en pesos inferiores a 320 g y de 2 g desde 320 hasta 1000 g. En el caso de los corderos el peso se controló utilizando una balanza Tru-Test AG 500-0.1, versión 3.0.

2.2. MEDIDA DE LA LONGITUD TIBIAL POR MICROKNEMOMETRÍA.

La microknemometría es una técnica no invasiva de reciente aplicación que permite una medida muy exacta de la longitud de la tibia en ratas conscientes. El aparato con el que se desarrolló la citada técnica se denomina Microknemómetro, y ha sido diseñado por el Dr. Hermanussen y fabricado por el Dr. Fahrenholz en Kiel (Alemania). El error de la medida es de 100 μm (Hermanussen y cols 1995). En nuestros estudios se empleó dicha técnica para controlar el crecimiento diario tibial.

2.2.1. Características del Microknemómetro.

El microknemómetro es un goniómetro digital conectado a una pantalla electrónica y compuesto por dos brazos articulados, terminados en unos enganches metálicos. Estos enganches tienen forma de anillo, de manera que el superior abarca la rodilla del animal y el inferior recoge el talón, produciendo una fijación temporal de la tibia durante el tiempo que dura la medida del hueso. Entre los dos brazos del

goniómetro se encuentra un muelle que ejerce una presión constante sobre la pata de la rata de aproximadamente 2.5 Newtons (figura 12).

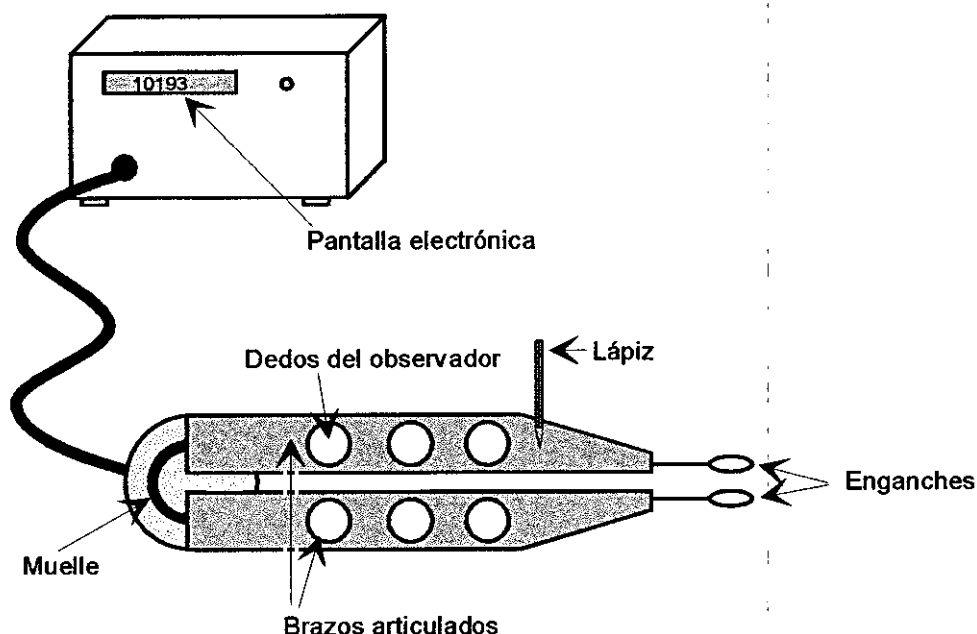


Figura 12. Esquema del microKnemómetro y la pantalla electrónica asociada a éste.

Durante la realización de la medida, en la pantalla electrónica aparecen una serie de números o unidades arbitrarias según el ángulo de apertura entre los dos brazos (α), correspondiendo una unidad arbitraria (U) a 0.0033° , lo que equivale a $12 \mu\text{m}$ aproximadamente. Esta equivalencia se estableció tras la calibración del aparato.

Cuando los brazos del microknemómetro están sin abrir la distancia entre ambos es de 2.3 cm y en la pantalla aparece un valor de 10193 U (figura 12). Así, para el cálculo real de la longitud tibial, al valor que se obtiene en cada medida se le debe restar el valor inicial, multiplicando este resultado por 12 para que aparezca en μm , y sumarle la distancia entre los enganches ($2300 \mu\text{m}$) (fórmula 1).

$$\text{Longitud tibial } (\mu\text{m}) = [(\text{Valor unidades arbitrarias} - 10193) \times 12] + 23000$$

Fórmula 1.

2.2.2. Procedimiento de medida.

La medida de la distancia tibial puede verse influenciada por la posición del animal y el ángulo que forman el tobillo, la tibia y el fémur, por lo que nuestro primer objetivo fue estandarizar las condiciones de medida. Para esto se colocó una fuente de luz que tras proyectarse sobre una estructura vertical (un lápiz) originaba una sombra en una cuadrícula milimetrada. Manteniendo constante esta sombra nos asegurábamos de que siempre medíamos el animal en las mismas condiciones.

La rata, no anestesiada y completamente relajada, se coloca frente al observador. Se sitúan los brazos del goniómetro abrazando la tibia de la pata posterior derecha, entre la rodilla y el talón, permitiendo que el muelle fije la posición. La longitud tibial se determina realizando cuatro estimaciones de esta distancia, consecutivas e independientes, y permitiendo que el animal se mueva entre cada estimación. La primera medida se descarta ya que generalmente es la más inexacta de los cuatro, y se calcula la mediana de las otras tres restantes siendo éste el valor que se toma como longitud tibial.

2.3. PRUEBAS DE ESTÍMULO CON GHRH.

En tres de los estudios (experimentos 5, 6 y 7) se sometió a los animales a una prueba de estímulo con GHRH. La droga que se administró como estímulo fue el péptido sintético GHRH 1-29 (Geref[®]) obtenido de Laboratorios Serono S.A. (Madrid). Cada una de estas pruebas de estímulo consistió en una toma basal de sangre, administración del estímulo y nuevas extracciones de sangre a diferentes tiempos post-estímulo.

En el caso de las ratas el estímulo fue de 10 µg/animal inyectado de forma i.p., y las tomas de sangre se llevaron a cabo basalmente antes de ser inyectada la GHRH y a los 5 y 15 minutos después de la administración de ésta. La sangre se extrajo de la vena yugular externa con una jeringa previamente bañada en la mezcla EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)-salino (ver punto 5.1 de Material y Métodos), según el método que se viene utilizando en el Departamento de Fisiología desde hace más de 20 años. La rata estaba levemente anestesiada con éter.

Los corderos utilizados en los diseños experimentales 6 y 7 también fueron sometidos a pruebas de estímulo, administrándoseles de forma i.v. 125 µg GHRH/cordero. Se extrajo sangre de la yugular externa antes de la administración de GHRH y a los 10, 20 y 30 minutos tras la inyección del estímulo, con una jeringa bañada en EDTA-salino y con el animal consciente.

3. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS.

3.1. IMPLANTACIÓN DE MINIBOMBAS OSMÓTICAS.

Las minibombas osmóticas utilizadas para la administración de GH en los experimentos 1 y 2, eran Alzet modelo 2001 (Alza Corporation, Palo Alto, California) de 3 cm de longitud y 0.7 cm de diámetro. Se implantaron debajo de la piel colocando la rata, anestesiada con éter, boca abajo y haciendo una leve incisión dorsal con unas tijeras en la piel, entre el omóplato y la línea media. A continuación y con ayuda de unas pinzas se abrió el hueco suficiente para introducir la minibomba en el tejido subcutáneo y finalmente se cosió la piel con seda.

En el experimento 7 realizado en corderos, se emplearon minibombas osmóticas Alzet modelo 2ML4, de 5.1 cm de longitud y 1.4 cm de diámetro. Se colocaron de forma s.c. en el lomo del cordero, para lo cual en el animal previamente anestesiado con xilocaína se realizó una incisión de unos 2 cm con unas tijeras a nivel del omóplato. Luego se abrió un pequeño hueco bajo la piel en el que se depositó la minibomba, y a continuación se cerró el tejido con grapas.

3.2. IMPLANTACIÓN DE PELLETS.

Los pellets, fabricados por Innovative Research of America (Toledo, Ohio), y del tamaño de una pastilla de 0.3 mm de diámetro, estaban compuestos de una matriz biodegradable que proporciona una liberación continua y eficaz del producto activo, GHRH en nuestro caso.

En el experimento 5, medio pellet se colocó subcutáneamente en la parte dorsal del animal, procediéndose de manera similar a la implantación de las minibombas. En la rata, previamente anestesiada con éter, se realizó un pequeño corte dorsolateral en la piel, se abrió hueco con unas pinzas, se introdujo el pellet y se cerró con seda la apertura originada.

En el caso de los corderos, utilizando un trocar se realizó un pequeño hueco detrás de la oreja derecha en el que se depositó un pellet entero con ayuda de unas pinzas, cerrándose a continuación la piel con grapas. Durante el tiempo que duró esta operación el animal permaneció despierto y consciente.

Para la implantación de un cuarto de pellet en el interior de la glándula submaxilar en el experimento 8, en los ratones anestesiados con éter se hizo un corte longitudinal en la piel y el tejido conjuntivo subyacente para dejar accesibles ambas glándulas. Sobre la glándula derecha se realizó una pequeña incisión rompiendo interiormente el tejido glandular, y se depositó el trozo de pellet en el hueco

producido, cerrándose a continuación con catgut de tal forma que el pellet quedaba embebido en la glándula. Finalmente se colocaron los tejidos en su posición original y se cosió la piel con seda.

En los tres casos, a los animales control se les implantó un pellet de placebo, procediendo de la misma forma que con el pellet de GHRH.

4. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS.

4.1. TRATAMIENTO NEONATAL CON GLUTAMATO MONOSÓDICO.

El tratamiento neonatal con Glutamato Monosódico (GMS) (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri) se realizó en días alternos, durante los 10 primeros días de vida de la rata. La dosis diaria que se administró fue de 4 mg/g peso corporal, en una sola inyección s.c. Se preparó una solución stock con una concentración de 0.5 mg/ μ l, diluyendo 5 g de GMS en 10 ml de solución salina e inyectándose el volumen necesario hasta conseguir la dosis apropiada.

4.2. GHRH.

La GHRH utilizada en todos los experimentos fue la misma que en las pruebas de estímulo, esto es, el péptido sintético GHRH 1-29. La dosis, la pauta y la frecuencia de administración de dicho fármaco varió según el diseño experimental.

Tanto para las inyecciones como para las minibombas osmóticas, la GHRH se disolvió en solución salina, hasta alcanzar la dosis necesaria.

En el caso de los experimentos 1 y 2, 5 mg de GHRH se disolvieron en 300 μ l de suero salino que se introdujeron dentro de cada una de las minibombas con ayuda de una jeringa a través de un pequeño orificio existente en uno de los extremos, de tal forma que con un flujo de liberación de 1 μ l/h, la minibomba proporcionaba 400 μ g de GHRH al día. Para los corderos del diseño experimental 7, en cada minibomba se introdujeron 30 mg de GHRH disueltos en 2 ml de solución salina. El flujo de liberación de estas bombas era de 2.3 μ l/h, por lo que cada cordero recibía 900 μ g/día.

Los pellets que se colocaron en las ratas y los corderos contenían 25 mg de GHRH liofilizado, dentro de una matriz biodegradable, cantidad a liberar en un total de 21 días. En el caso de los ratones los pellet eran de 5 mg para un total de dos meses.

4.3. SOMATOSTATINA.

La SS que se utilizó en los distintos estudios realizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral fue de 2 tipos: de corta y de larga duración.

La SS de larga duración fue Sandostatín® (Octreotide, DCI), de Laboratorios Sandoz (Barcelona). En el caso de las ratas, cada animal recibió una dosis diaria de 2 µg, mientras que en los corderos la dosis administrada fue 10 veces superior, esto es, 20 µg/animal/día. El producto activo venía ya en forma líquida, por lo que se inyectó directamente desde el envase.

Se utilizó Somiatón®, de Laboratorios Serono, como SS de corta duración. Este fármaco es un decapeptido de síntesis, idéntico a la hormona natural, que viene presentado en viales de 250 µg en forma de liofilizado. Para su utilización en las ratas, se reconstituyó en 500 µl de suero salino y la dosis administrada fue de 100 µg/inyección, mientras que en el caso de los corderos, se empleó 1 ml para disolver cada vial, y la dosis fue de 250 µg/inyección.

5. SACRIFICIO DE LOS ANÍMALES. RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Al final de cada uno de los estudios, las ratas se sacrificaron por decapitación con una guillotina, sin anestesia previa, e inmediatamente después se recogieron el hipotálamo, la hipófisis y la sangre troncular.

Los ratones fueron primero anestesiados con éter para tomárseles sangre directamente del corazón por punción cardíaca. A continuación se procedió a la disección de las glándulas submaxilares, y finalmente fueron decapitados.

Tras finalizar los estudios con los corderos, éstos fueron sacrificados en el Matadero de GYPISA (Pozuelo de Alarcón, Madrid). Inmediatamente tras la decapitación se tomaron el hipotálamo y la hipófisis.

5.1. OBTENCIÓN DE SANGRE.

La sangre troncular recogida tras la decapitación de las ratas, la sangre de los ratones obtenida por punción cardíaca, y la sangre obtenida tras las pruebas de estímulo con GHRH en las ratas y los corderos se depositó en tubos de propileno con EDTA-salino (2% de EDTA (Sigma) en suero salino 0.15 M), enfriados en hielo. A continuación esta sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una

centrífuga Beckman, Modelo TJ-6. El sobrenadante se decantó y se mantuvo congelado a -20°C hasta su análisis.

5.2. HIPOTÁLAMO.

Para la extracción del hipotálamo medio basal tanto en la rata como en el cordero, primeramente se abrió el cráneo dejando expuesto el cerebro. Este se levantó con unas pinzas, y tras reconocer el hipotálamo, se tomó cortándolo rostralmente al quiasma óptico, caudalmente por detrás de los cuerpos mamilares y lateralmente al surco hipotalámico, hasta el nivel de la comisura anterior. Esta disección incluyó la eminencia media y el núcleo arcuato. Una vez extraído el hipotálamo, se congeló inmediatamente en nieve carbónica, para ser conservado a -80°C hasta el momento de su estudio.

El hipotálamo se procesó homogeneizando el tejido por ultrasonidos (Branson Sonifier 450) en 1 ml de una solución de ácido acético 2 M en el caso de las ratas o en 20 ml del mismo compuesto en el caso de los corderos. Seguidamente se hirvió el homogeneizado durante 5 minutos, y se centrifugó 30 minutos a 17000 rpm a 4°C , en una centrífuga Beckman Modelo J2-MC. Tras esto se obtuvo un sobrenadante del que se hicieron diferentes alícuotas que fueron liofilizadas (Liofilizador Benchtop 3 L. Virtis. The Virtis Company Inc. Gardiner. Nueva York) y congeladas hasta el momento de su utilización.

5.3. HIPÓFISIS.

Tras la disección del hipotálamo, se pudo observar la hipófisis cubierta por la duramadre. Se retiró ésta y se extrajo la glándula hipofisaria.

Las hipófisis de las ratas se depositaron en un tubo con 1 ml de solución salina, en el que se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su procesamiento. El tejido se homogeneizó con ultrasonidos, y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C . El sobrenadante permaneció a -20°C hasta el momento de los análisis hormonales y de proteínas.

En el caso de los corderos se procedió de la misma forma, pero homogeneizando la hipófisis en un volumen total de 10 ml de suero salino.

5.4. GLÁNDULA SUBMAXILAR.

Tras tomar la muestra de sangre del corazón, el animal levemente anestesiado se colocó boca arriba para abrir la piel y el tejido conjuntivo en la zona en la que había sido implantado el pellet. Ambas glándulas submaxilares se extrajeron con ayuda de unas pinzas y unas tijeras.

El lóbulo de la glándula que contenía el pellet se dividió longitudinalmente en dos partes con un bisturí estéril. Uno de los trozos se introdujo en un eppendorf esterilizado y se congeló inmediatamente con N₂ líquido para los estudios de expresión génica. La otra parte se congeló a -20°C hasta su posterior análisis hormonal, para lo cual antes hubo de ser procesada como sigue. Primero la glándula se troceó con unas tijeras y se homogeneizó manualmente en 1.2 ml de tampón fosfato 0.01 M, pH=7.5; luego se sonicó y se centrifugó a 3000 rpm 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C.

También se extrajo el lóbulo contralateral que no contenía el pellet, y se procesó según lo visto anteriormente utilizando 2.4 ml de tampón fosfato. Todo el tejido se utilizó para estudios hormonales.

6. MÉTODOS ANALÍTICOS.

6.1. RADIOINMUNOANÁLISIS: CARACTERÍSTICAS GENERALES.

Para determinar los niveles y contenidos hormonales en la sangre, la hipófisis, el hipotálamo y la glándula submaxilar se utilizó la técnica del Radioinmunoanálisis (RIA).

El RIA consiste en una reacción competitiva entre la hormona que tenemos en la muestra (hormona fría u hormona sin marcar) y una cantidad constante de esa misma hormona marcada con ¹²⁵I (hormona radiactiva), para combinarse con un anticuerpo específico para ella. Como la afinidad que tienen ambas hormonas por el anticuerpo es la misma, al ser añadido éste en una cantidad constante a todos los tubos, la proporción de hormona radiactiva que puede unirse al anticuerpo vendrá dada por la cantidad de hormona presente en la muestra. Esto es, cuanto mayor sea la concentración de hormona en la muestra, menos posibilidades tendrá la hormona radiactiva de unirse con el anticuerpo.

Para calcular las concentraciones de la hormona en las muestras problema se utilizó una curva patrón preparada realizando diluciones sucesivas a partir de una solución stock de concentración conocida. La unión correspondiente tanto a los

puntos de la curva patrón como a las muestras problema se calculó mediante la fórmula 2.

$$\frac{(B - N) \times 100}{B_0 - N}$$

Fórmula 2.

B son las cpm correspondientes al complejo hormona radiactiva-anticuerpo cuando también hay muestra problema. B₀ representa la hormona radiactiva ligada al anticuerpo en ausencia de hormona fría y N representa la unión inespecífica del anticuerpo. Además de la curva patrón y de los puntos B₀ y N, también se utilizó un control de la radiactividad total añadida (A_T).

La curva patrón se representó en papel semilogarítmico. En el eje de ordenadas representamos el porcentaje de unión y en el de abscisas cantidades conocidas de hormona fría correspondientes a la curva patrón. Al unir todos los puntos obtuvimos una curva de forma sinusoidal, e interpolando el % de unión obtenido por las muestras mediante la aplicación de la fórmula 2, se calculó la cantidad de hormona presente en cada una de ellas.

6.1.1. Radioyodación de la hormona.

El marcaje o radioyodación de las hormonas consiste en la introducción del isótopo ¹²⁵I en la estructura de las mismas, por medio de una reacción enzimática. Los marcadores más corrientes utilizados en un RIA son el ¹³¹I, ¹²⁵I y el ³H. Nosotros utilizamos el ¹²⁵I porque su vida media es más larga que la del ¹³¹I, y además tiene la ventaja de proporcionar una mayor actividad específica que el ³H y un conteo de emisión más sencillo que el de un emisor β que requiere líquido de centelleo.

La mezcla de todos los reactivos utilizados para el marcaje debe ser purificada con el fin de separar la hormona marcada del yodo libre. Esta purificación se hizo mediante cromatografía en gel Sephadex G-50 Fine (Pharmacia, Uppsala, Suecia) en una columna de vidrio.

Inmediatamente después de finalizar la reacción de marcaje de la hormona, la mezcla resultante se colocó en la parte superior de la columna y se eluyó en el medio correspondiente, recogiendo una serie de fracciones que tras ser contadas en un contador de radiactividad se representaron gráficamente. Se obtuvo un perfil con dos

picos, el primero correspondiente a la hormona marcada y el segundo al ^{125}I libre. Esta situación apareció en el caso de la GH y la SS, pero tras el marcaje de otras hormonas como la GHRH o la IGF-I apareció además otro pico adicional anterior al de la hormona marcada, que correspondió a moléculas marcadas inespecíficamente.

En cualquiera de los casos las fracciones que contenían el pico de la hormona marcada se mezclaron y se distribuyeron en alícuotas que fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su utilización.

6.1.2. Evaluación del marcaje.

Una vez finalizado el marcaje se procedió al cálculo del rendimiento de la radioyodación, o porcentaje de ^{125}I incorporado a la hormona, y de la actividad específica de la hormona marcada, utilizando para ello el método inespecífico de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA). Se diluyó una pequeña parte del producto de marcaje y se tomaron seis alícuotas de $50\ \mu\text{l}$, midiéndose en tres de ellas inmediatamente su radiactividad (radiactividad total). Al resto se les añadieron $500\ \mu\text{l}$ de tampón BSA (ver apartado 6.2.2) y $2\ \text{ml}$ de TCA al 10% y se les agitó vigorosamente. Se incubaron 15 minutos a 4°C , posteriormente se centrifugaron otros 15 minutos a $3000\ \text{rpm}$ y a 4°C , se aspiró el sobrenadante y se contó el precipitado en un contador de radiactividad.

El rendimiento del marcaje se calculó dividiendo la radiactividad del precipitado entre la radiactividad total. La actividad específica se obtuvo multiplicando el rendimiento por la cantidad de yodo utilizado (en μCi) y dividiendo el resultado por la cantidad de hormona (en μg) empleada en la radioyodación.

6.1.3. Realización y cinética del análisis.

En todos los casos las muestras problema se pipetearon por duplicado y se completaron con tampón hasta un volumen de reacción determinado. Asimismo, y por triplicado también se pipetearon cada uno de los puntos de la curva patrón, y los tubos A_T , N y B_0 . Los tubos A_T sólo contenían hormona marcada, los N hormona marcada y la suspensión utilizada en el proceso de separación, y los B_0 lo mismo que los N pero además el anticuerpo específico.

Una vez pipeteadas las muestras y la curva patrón, se añadió el anticuerpo a todos los tubos, salvo a los N y A_T . Esta mezcla se preincubó durante un período de tiempo variable según el RIA en cuestión (etapa de preincubación).

Transcurrida esta fase, se añadió a todos los tubos del ensayo la misma cantidad de hormona marcada, disuelta en el tampón correspondiente. En algunos casos, la hormona marcada hubo de ser purificada antes de su uso, para separarla de la hormona degradada y del yodo libre. Esta segunda purificación, llevada a cabo inmediatamente antes de ser utilizada la hormona, se realizó por cromatografía en Sephadex G-100 en una columna de vidrio de 25×2 cm, procediéndose de la misma forma que en la purificación tras el marcaje. En este caso se obtuvieron tres picos: un primer pico u hormona deteriorada, un segundo pico u hormona marcada inmunorreactiva que se utilizó para el ensayo y un tercer pico correspondiente al yodo libre. Una vez añadida la hormona marcada se mantuvieron todos los tubos en incubación.

A continuación se procedió a la separación del complejo hormona-anticuerpo de la hormona libre, para lo cual se utilizaron diferentes tipos de suspensiones según el tipo de RIA. Esta suspensión se añadió a todos los tubos, excepto a los tubos A_T. Se incubó la nueva mezcla a 4°C y se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm. En cualquiera de los casos, y tras aspirar el sobrenadante, se obtuvo un precipitado que se valoró en un contador de radiactividad dándonos las cpm correspondientes al complejo hormona-anticuerpo, excepto en el RIA de SS que procedían de la hormona libre. Con estas cpm aplicadas en la fórmula 2 se consiguió un valor de % de unión que al interpolarse en la curva patrón nos daba la cantidad de hormona fría presente en la muestra.

6.1.4. Validación del RIA.

Todos los RIAs realizados se validaron determinándose la variación intra e interensayo, así como la menor cantidad de hormona fría detectable en el análisis (sensibilidad del ensayo) y el grado de interferencia de sustancias distintas a la hormona que se va a medir, pero que tienen un comportamiento inmunológico parecido en el RIA. Para el cálculo de las variaciones intra e interensayo se compararon los valores hormonales obtenidos al medir una misma mezcla de plasmas en los distintos RIAs realizados.

El Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina tiene gran experiencia en la realización de este tipo de RIAs, puestos a punto y validados hace muchos años. En esta Facultad existe una Instalación Radiactiva Central que posee laboratorios especialmente diseñados para el uso de isótopos radiactivos y además

tiene contadores de radiación γ (Contador Cobra Auto-Gamma. Packard. A Camberra Company) para la lectura de las muestras.

Aunque el esquema básico seguido en los diferentes RIAs específicos fue el que acabamos de detallar, cada uno de éstos tuvo sus particularidades y cambios que vinieron dados principalmente por el tipo de hormona en estudio.

6.2. RIA DE GH.

6.2.1. Inmunorreactivos.

Los reactivos empleados para los RIAs de la GH de rata (rGH), de ratón (mGH) y de cordero (oGH) fueron suministrados por el "National Hormone and Pituitary Program" (NHPP) del "National Institute for Diabetes and Digestive and Kidney Diseases" (NIDDK) (Baltimore, Maryland). Cada uno de ellos fue reconstituido y conservado según las instrucciones que lo acompañaban. El nombre de estos reactivos se recoge en la tabla 1.

	rGH	mGH	oGH
hormona patrón	rGH-RP-2	mGH-AFP 10783 B	oGH-I-4
hormona para yodar	rGH-I-6	mGH-AFP 10783 B	oGH-I-4
anticuerpo	anti-rGH-S-5	anti-rGH-S-5	anti-oGH-2

Tabla 1.

6.2.2. Soluciones tampón y suspensiones.

* Tampón fosfato 0.5 M, pH= 7.6. Se obtiene mezclando $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ y $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 0.5 M. Se utiliza para el marcaje y para preparar el resto de los tampones.

* Tampón fosfato 0.01 M, pH= 7.6. Preparado diluyendo 50 veces el tampón anterior y añadiendo NaCl 0.15 M. Se utiliza para preparar la suspensión de segundo anticuerpo, como eluyente en la columna de cromatografía y como base de los siguientes tampones.

* Tampón BSA, pH=7.6. Se prepara añadiendo un 1% de albúmina sérica bovina fracción V (BSA, Sigma) sobre el tampón fosfato 0.01 M. Se emplea para realizar las diluciones de la curva estándar, completar las muestras y diluir la hormona marcada.

* Tampón EDTA, pH= 7.6. Se obtiene utilizando como base el tampón fosfato 0.01 M, al que se le añade EDTA 0.025 M, NaCl 0.15 M y Tritriplex 0.025 M. Se usa para diluir el primer anticuerpo.

* **Suspensión de Staphilococo aureus.** La mezcla de Staphilococo aureus preparada por el Dr. Pérez Silva (CSIC) se centrifuga 15 minutos a 3000 rpm y a 4°C, y el sobrenadante obtenido se reemplaza por el mismo volumen de tampón EDTA con tritón al 0.5%. De esta nueva suspensión, se pipeten 50 µl a los tubos. Esta suspensión se utilizó para separar la hormona ligada al anticuerpo de la hormona libre, en los RIAs de rGH y mGH.

* **Suspensión de segundo anticuerpo.** Se prepara a partir de tampón fosfato 0.01 M, añadiéndole 10% de polietilenglicol y 10 µl de antigammaglobulina de conejo, obtenida en ovejas en nuestro propio laboratorio por los Dres. Ariznavarreta y Tresguerres, gracias a la colaboración del CIT-INIA. La antigammaglobulina de conejo se obtuvo previa inmunización de ovejas con una mezcla constituida por gamma globulina de conejo (Sigma), Coadyuvante de Freund (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan) y agua destilada. Esta suspensión fue utilizada para separar la hormona ligada en el RIA de oGH, pipeteando 500 µl a cada tubo.

6.2.3. Radioyodación de la hormona.

Para el marcaje de rGH y mGH se siguió el método de la lactoperoxidasa y para la radioyodación de oGH empleamos el de la cloramina T.

El marcaje de hormonas con lactoperoxidasa, técnica descrita por Thorell y Johansson (1971), se basa en una reacción enzimática (oxidación por H₂ O₂) que consigue que el yoduro radiactivo pase a yodo atómico y este último sustituya a los átomos de hidrógeno presentes en la estructura molecular de las proteínas, principalmente en el anillo fenólico de la tirosina.

Se añadieron sucesivamente los siguientes reactivos sobre una alícuota de la hormona a marcar (2.5 µg en 25 µl de tampón fosfato 0.01 M): 10 µl de tampón fosfato 0.5 M, 5 µl (0.5 mCi) de ¹²⁵I (Nuclear Ibérica), 10 µl de una dilución de lactoperoxidasa (25 µl de lactoperoxidasa (Sigma) en 500 µl de agua destilada) y 1 µl de una dilución 1:10000 de H₂ O₂. Se mantuvo la reacción durante 4 minutos a temperatura ambiente, y se detuvo por adición de 100 µl de tampón BSA.

La cloramina T (Merck, Darmstadt, Alemania) también se utilizó como agente oxidante en la radioyodación (Hunter y Greenwood, 1962). Su acción es más general, y no esta dirigida exclusivamente al aminoácido tirosina. Sobre la alícuota de hormona destinada a marcaje (4 µg / 40 µl) se fueron añadiendo de forma sucesiva 25 µl de tampón fosfato 0.5 M, 5 µl (0.5 mCi) de ¹²⁵I (Nuclear Ibérica) y 1.5 µl de una dilución de cloramina T (20 mg de cloramina T (Merck) en 2 ml de tampón fosfato

0.05 M). La reacción duró 30 segundos y a continuación se paró con 1 ml de tampón fosfato 0.01 M.

Una vez realizado el marcaje, en ambos casos se purificó la mezcla de radiyodación en una columna de vidrio de 16×0.5 cm utilizando como eluyente tampón fosfato 0.01 M. Finalmente, se determinó para cada una de las hormonas la actividad específica y el rendimiento de la reacción (tabla 2).

	rGH	mGH	oGH
Actividad específica	61.4 $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$	119 $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$	57.3 $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$
Rendimiento	30.7 %	59 %	46 %

Tabla 2.

6.2.4. Realización del análisis.

Los plasma se pipetearon directamente del tubo que contenía toda la muestra, mientras que las hipófisis de rata fueron diluídas previamente 1:100000 con tampón BSA, las de cordero 1:5000 y la glándula submaxilar de los ratones 1:10. El anticuerpo se añadió en tampón EDTA a la dilución final correspondiente.

Esta mezcla se preincubó a 4°C durante 24 h. Después se pipeteó la hormona marcada en tampón BSA, previamente purificada. Tras 72 h de incubación, se separó la fracción de hormona libre de la ligada al anticuerpo, con la suspensión indicada en cada caso. Después de ser centrifugados y de aspirar el sobrenadante se midió la radiactividad del precipitado. El rango de la curva patrón, la dilución del anticuerpo específico y el nº de cpm de hormona radiactiva que se pusieron a cada tubo aparecen en la tabla 3.

	rGH	mGH	oGH
Rango de la curva patrón	5 - 2500 pg/tubo	2.5-5000 pg/tubo	2-200 ng/tubo
Dilución del anticuerpo	1:75000	1:75000	1:60000
número de cpm	20000	20000	15000

Tabla 3.

6.2.5. Validación del RIA.

La sensibilidad de cada uno de los RIAs, así como los valores de variación intra e interensayo que se obtuvieron quedan recogidos en la tabla 4. En la figura 13 aparecen las curvas de rGH (a), mGH (b) y oGH (c) respectivamente, como media \pm error estándar de la media (SEM).

	rGH	mGH	oGH
Sensibilidad del RIA	5 pg / tubo	5 pg / tubo	5 pg / tubo
Variación intraensayo	8.4 %	4.97 %	12.7 %
Variación interensayo	7.5 %		8.5 %

Tabla 4.

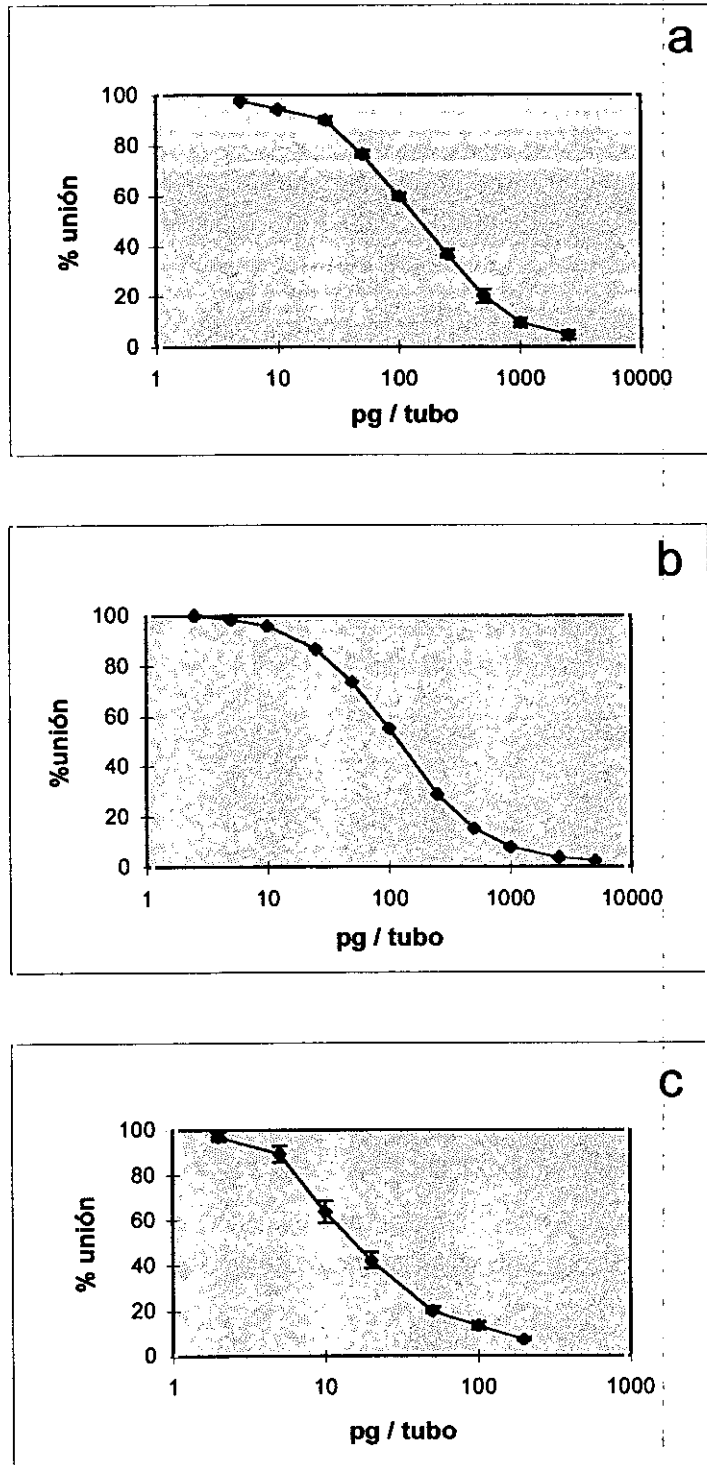


Figura 13. Curvas de rGH (a), mGH (b) y oGH (c) (media \pm SEM).

6.3. RIA DE IGF-I.

Este RIA fue puesto a punto por nuestro grupo basándonos en el método que describe el grupo de Daughaday (Daughaday y cols 1980, Daughaday y cols 1982) y en nuestra propia experiencia en la realización de otros RIAs.

6.3.1. Inmunorreactivos.

La hormona utilizada como patrón y para marcaje fue la A52-EPD-186, cedida por Eli Lilly and Company (Indianápolis, Indiana). Como anticuerpo se utilizó uno policlonal por lo que pudo seguirse el mismo tipo de ensayo para determinar los valores de IGF-I tanto en rata como en cordero, al ser capaz el anticuerpo de reconocer ambos tipos de moléculas. Este anticuerpo fue inicialmente el UB3-T89 y posteriormente se usó el UB2-495, ambos suministrados por el NHPP del NIDDK y reconstituídos según los consejos de dicha entidad.

6.3.2. Soluciones tampón y suspensiones.

Además de los tampones fosfato 0.5 M, fosfato 0.01 M, BSA y la suspensión de segundo anticuerpo, preparados tal y como vimos en el RIA de GH, en este ensayo se utilizaron los siguientes:

- * Tampón IGF-I, pH=7.5. Constituido por tampón fosfato 0.04 M, azida sódica 0.02%, Tween 20 0.05%, EDTA 0.01 M y protamina sulfato 20 % (Protamina Rovi ®). Se añadió protamina sulfato a este tampón siguiendo las recomendaciones de varios autores que indicaban que el uso de ésta disminuía la unión inespecífica y la variabilidad interensayo (Copeland y cols 1980, Chatelain y cols 1983). Este tampón se utilizó para preparar la curva patrón, completar las muestras y diluir el anticuerpo y la hormona radiactiva.
- * Tampón Trizma Base 1 M. Preparado con Tris hidroximetil amino metano en agua destilada. Se utilizó como base para tampones posteriores.
- * Tampón Trizma Base 0.855 M. Se obtuvo mediante dilución 1:1.17 del anterior y se utilizó en el proceso de extracción de las proteínas ligantes de IGF-I.
- * Tampón Tris HCl, pH=7.4. Se preparó inicialmente Tampón Trizma Base 0.025 M, ajustándose el pH hasta 7.4 con HCl y se le añadió 0.25% de BSA. Se utilizó como eluyente en el proceso de purificación de la mezcla de marcaje.
- * Mezcla de etanol ácido, con 87.5% de etanol y 12.5% de HCl 2N. Se empleó durante la extracción de las proteínas ligantes de IGF-I.
- * Suspensión de segundo anticuerpo, preparado según aparece en el RIA de GH.

6.3.3. Radioyodación de la hormona.

Se hizo siguiendo el método de la cloramina T, de forma similar a como se realizó en el marcaje de oGH. Este procedimiento también ha sido empleado por Daughaday y cols (1980) y Chatelain y cols (1983) para marcar la IGF-I.

Partiendo de 1 μg de IGF-I disuelta en 100 μl de tampón IGF-I se fueron añadiendo de forma sucesiva 25 μl de tampón fosfato 0.5 M, 0.5 mCi de ^{125}I , y 2.5 μg de cloramina T (2 mg de cloramina T en 2 ml de tampón fosfato 0.05 M). Esta mezcla de marcaje se mantuvo 30 segundos y se paró con 1 ml de tampón Tris HCl.

La purificación de la mezcla de marcaje se hizo por cromatografía en Sephadex G-50 Fine, en una columna de vidrio de 56 \times 1 cm. La actividad específica media fue de 208.8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ y el rendimiento del 66.5 %.

6.3.4. Realización del análisis.

Tantos los plasmas de las ratas como los de los corderos hubieron de sufrir un proceso de extracción de las proteínas ligantes y posterior dilución 1:100 antes de ser pipeteados al RIA. El rango de la curva patrón era desde 2 hasta 800 pg/tubo.

El método utilizado para separar la IGF-I de sus proteínas ligantes existentes en el plasma fue la extracción con etanol ácido (Daughaday y cols 1980). Esta consistió inicialmente en la incubación de 50 μl de muestra con 450 μl de la mezcla de etanol ácido durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, decantándose únicamente 250 μl del sobrenadante que fueron neutralizados con 100 μl de tampón Trizma base 0.855 M.

Mediante tratamiento de la mezcla de plasma ya extraída con carbón dextrano (3% carbón y 0.25% de dextrano) se comprobó que la IGF-I quedaba libre de las proteínas ligantes en un 98%, principalmente de la IGFBP-3. De todas las proteínas ligantes, es ésta la que parece mostrar una afinidad parecida a la del anticuerpo por la IGF-I. Así, la realización de una separación efectiva de esta proteína permite al anticuerpo ser el lugar preferente de unión para la IGF-I (Crawford y cols 1992). El porcentaje de IGF-I libre en plasma no extraído fue del 43%.

Tras completar los volúmenes de muestra, se añadió el anticuerpo a una dilución final 1:20000. Se preincubaron los tubos 24 h a 4°C, para luego pippear 15000 cpm de hormona marcada sin purificar. Una vez completada esta etapa, y después de 24 h de incubación separamos la fracción de IGF-I unida al anticuerpo

utilizando la suspensión de segundo anticuerpo, procediéndose de la misma forma que en el RIA de oGH.

6.3.5. Validación del RIA.

La sensibilidad del RIA fue de 2 pg/tubo y los coeficientes de variación interanálisis e intraanálisis del 12.9% y 7.8% respectivamente.

En esta ocasión, además de validar el método de radioinmunoanálisis, también se valoró el proceso de extracción siguiendo las recomendaciones aparecidas en el Tercer Simposium Internacional sobre IGFs (1995). Así se comprobó que las diluciones del plasma extraído eran paralelas a la curva patrón (figura 14), lo que indicaba que la IGF-I libre tenía un comportamiento inmunológico igual al de la IGF-I nativa. Además, cuando a una muestra de plasma se le añadió tanto hormona marcada como hormona fría, tras ser extraída la mezcla, la recuperación fue del 83.2% y 102% respectivamente. Según indican Daughaday y cols (1980), una recuperación superior al 100% se debe al propio error intrínseco del ensayo.

La curva media del RIA de IGF-I se muestra en la figura 14.

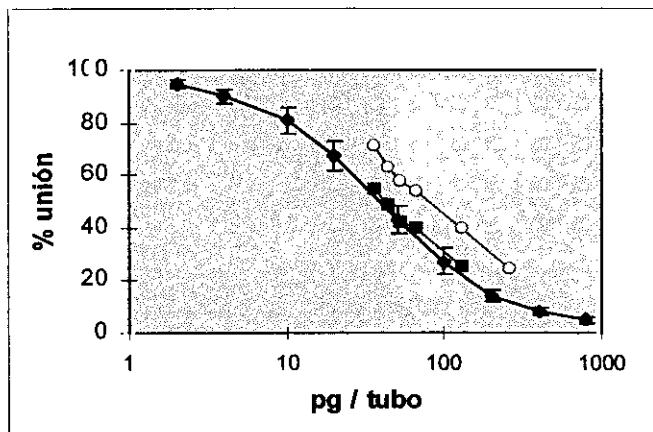


Figura 14. Curva de IGF-I (media \pm SEM). \blacklozenge IGF-I, \circ plasma 1, \blacksquare plasma 2.

6.4. RIA DE GHRH.

6.4.1. Inmunorreactivos.

La GHRH utilizada como patrón y para la radioyodación fue el GHRH 1-29 sintético (Geref ®), utilizado también en las pruebas de estímulo y el tratamiento farmacológico. El liofilizado fue reconstituido en ácido acético 0.1 M.

El anticuerpo utilizado se obtuvo en conejos inmunizados con Geref ® unido a hemocianina con carbodiimida por los Dres. C. Ariznavarreta y J.A.F. Tresguerres. La GHRH es un péptido muy pequeño que no tiene capacidad inmunógena por sí misma por lo que es necesario unirla a una molécula que le confiera esa cualidad, para así estimular la producción de anticuerpos. La carbodiimida facilita la unión de la GHRH a la hemocianina. Además el complejo GHRH-hemocianina-carbodiimida se inyecta junto con Adyuvante Completo o Incompleto de Freund para provocar un mejor estímulo antigénico. Este anticuerpo anti-GHRH 1-29 no mostró reactividad cruzada con glucagón, hormona paratiroidea, CRH, SS, LHRH, Colecistoquinina y gastrina y reconoció tanto a la GHRH de la rata como a la del cordero, por lo que fue posible utilizar el mismo radioinmunoanálisis para los dos tipos de muestras.

6.4.2. Soluciones tampón y suspensiones.

Aparte de los tampones fosfato 0.5 M y 0.01 M, y de la suspensión de segundo anticuerpo, preparados siguiendo el protocolo detallado para el RIA de GH, en la realización del RIA de GHRH se emplearon los siguientes reactivos:

- * Acido Acético 0.1 M, utilizado como eluyente de la mezcla de marcaje.
- * Tampón GHRH, pH=7.4. Contiene tampón fosfato 0.025 M, CIMg 0.015 M, azida sódica 0.1%, NaCl 0.1 M, Tritón X-100 0.1%, y gelatina 0.1%. Se utilizó para reconstituir los homogeneizados, preparar la curva patrón, completar las muestras, y diluir el anticuerpo y la hormona marcada.
- * Suspensión de segundo anticuerpo, preparado tal y como vimos en el RIA de GH.

6.4.3. Radioyodación de la hormona.

El marcaje de la GHRH 1-29 se hizo siguiendo el método de la lactoperoxidasa. Partiendo de 2 µg de hormona en 20 µl de ácido acético 0.1 M, fuimos añadiendo los mismo reactivos y en la misma proporción que para el marcaje de rGH y mGH, a excepción del tampón fosfato 0.5 M del que se pusieron 25 µl, en lugar de 10 µl. Tras 4 minutos de reacción, ésta se paró con 1 ml de ácido acético 0.1 M.

El producto de marcaje se sometió a purificación por cromatografía en Sephadex G-50 Fine, en una columna de vidrio de 56×1 cm y con ácido acético 0.1 M como eluyente. Los valores de actividad específica y rendimiento fueron respectivamente 121 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ y 56.3%.

6.4.4. Realización del análisis.

En el caso de las ratas, las alícuotas de homogeneizado hipotalámico liofilizado se reconstituyeron en 250 μl de tampón GHRH. Para los corderos, las alícuotas fueron reconstituídas en 2 ml del mismo tampón. La curva patrón cubría un rango de concentraciones desde 1 hasta 1000 pg/tubo .

A continuación se añadió el anticuerpo diluído 1:42000 en tampón de GHRH, con 0.25 % de suero de conejo y se dejó esta mezcla preincubando 24 h a 4 °C. Tras este período se pipeteó la hormona radiactiva (15000 cpm a cada tubo), sin purificar previamente. Transcurridas 24 h de incubación, se separó la GHRH unida al anticuerpo mediante la técnica del segundo anticuerpo.

6.4.5. Validación del RIA.

El RIA de GHRH presentó una sensibilidad de 5 pg/tubo . La variación intraensayo fue de un 14.4% y la interensayo de un 12.12%.

En la figura 15 aparece la curva media de GHRH.

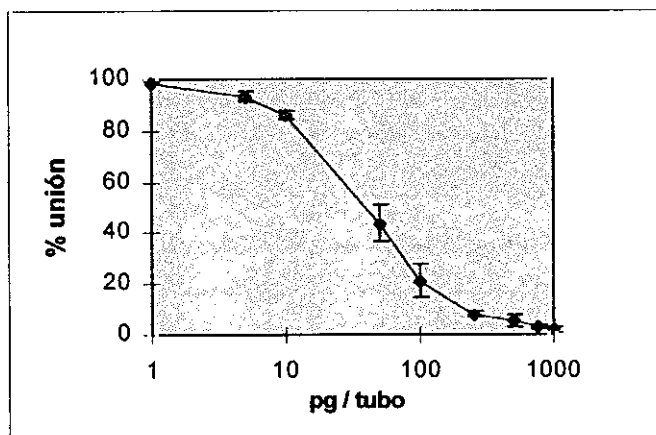


Figura 15. Curva de GHRH (media \pm SEM).

6.5. RIA DE SS.

La determinación del contenido hipotalámico de SS fue realizado por las Dras. Elena Vara y Cruz García, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (UCM), según el método puesto a puesto y validado por la Dr. Vara en su Tesis Doctoral (1982).

6.5.1. *Inmurreactivos.*

La hormona utilizada para radioyodación fue Tir-1-SS (UCB Bruselas), mientras que como hormona patrón se empleó SS cíclica (Sigma). El anticuerpo se obtuvo inmunizando conejos con el mismo tipo de SS cíclica usada para la curva patrón, unida a hemocianina con carbodiimida mediante un proceso similar al descrito anteriormente para la elaboración del anticuerpo anti-GHRH. También en este caso este anticuerpo anti-SS reconoció la SS de rata y la de cordero.

6.5.2. *Soluciones tampón y suspensiones.*

- * Tampón SS, pH=7.4. Se preparó con Na_2HPO_4 0.04 M, NaCl 0.14 M, EDTA 0.025 M y BSA 0.25%. Con este tampón se preparó la curva patrón, se reconstituyeron las alícuotas de hipotálamo, se completaron todas las muestras y se diluyeron el anticuerpo y la hormona radiactiva.
- * Acetato amónico 0.2 M, pH= 4.4. Fue utilizado para eluir la columna durante la purificación de la mezcla de marcaje.
- * Acetato amónico 0.002 M, pH= 4.4. Se obtuvo diluyendo 100 veces la solución anterior y al igual que éste también se empleó para la elución de la mezcla de marcaje.
- * Suspensión de carbón dextrano. Preparado partiendo de tampón fosfato 0.01 M, al que se añadió 0.25% de carbón y 0.025% de dextrano. Esta suspensión se usó para separar la hormona libre de los complejos hormona-anticuerpo.

6.5.3. *Radioyodación de la hormona.*

La Tir-SS se marcó con lactoperoxidasa, utilizando 5 μg de hormona y 0.5 mCi de ^{125}I . La separación de la fracción de hormona marcada y el ^{125}I libre se realizó por cromatografía en una columna de 5x0.9 cm de carboximetil celulosa CM-50 con la ayuda de una bomba peristáltica. Esta bomba se conectó a una disolución de acetato 0.002 M que a su vez también se encontraba unida a otro recipiente con

acetato 0.2 M, con lo que se establecía un gradiente de concentraciones lineal. La bomba funcionó con un flujo de 1 ml/minuto.

6.5.4. Realización del análisis.

Las alícuotas liofilizadas del homogeneizado hipotalámico de rata se reconstituyeron en 250 μ l de tampón SS, y antes de ser pipeteadas al RIA se diluyeron 1:200 con el mismo tampón. Se procedió de forma similar con las muestras de cordero, reconstituyendo las alícuotas en 2 ml de tampón SS y diluyendo éstas 100 veces antes del ensayo. El rango de la curva patrón cubrió desde 1.25 hasta 160 pg/tubo.

Después se añadieron el anticuerpo a una dilución final de 1:77000, y 5000 cpm/tubo de SS radiactiva. Toda esta mezcla se incubó 48 h a 4°C. Finalmente se pipeteó 1 ml de la suspensión de carbón dextrano para separar la fracción de hormona libre de la hormona ligada. Se incubaron 45 minutos a 4°C, y tras la centrifugación, el precipitado obtenido correspondió a la fracción de hormona libre.

6.5.5. Validación del RIA.

La sensibilidad de este radioinmunoanálisis fue de 0.032 pg/tubo. La curva media de SS es la que se representa en la figura 16.

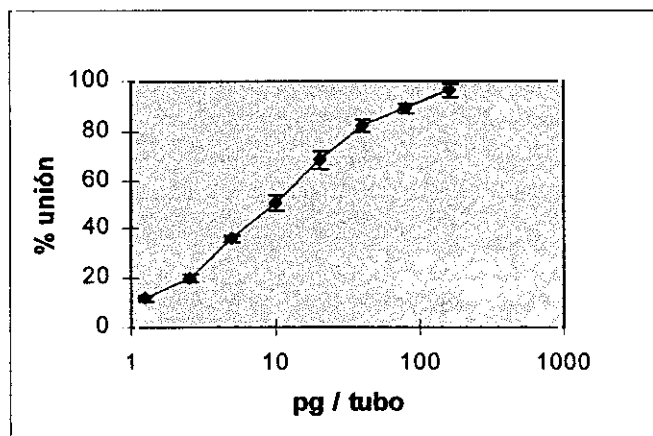


Figura 16. Curva de SS (media \pm SEM).

6.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se determinó el contenido proteico en los homogeneizados de la hipófisis, del hipotálamo y de la glándula submaxilar. El método empleado fue el descrito por Bradford (1976), que se basa en la unión del azul brillante a las proteínas, lo que produce un desplazamiento de la absorción máxima del colorante de 465 a 595 nm.

6.6.1. Reactivos.

* Azul Brillante. Se preparó con 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma), disueltos en 47.5 ml de etanol absoluto o en 50 ml de etanol al 95%. También se añadieron 100 ml de ácido fosfórico 85% y se llevó todo a 1 litro de agua bidestilada. Toda esta mezcla se filtró y se mantuvo a temperatura ambiente no más de dos semanas.

* BSA fracción V. Con ella se prepara la curva patrón disolviéndola en el mismo medio en que esten preparadas las muestras problema.

6.6.2. Realización del análisis.

Las hipófisis iban preparadas en solución salina y la glándula submaxilar en tampón fosfato 0.5 M pH=3.4. Las alícuotas de hipotálamo se reconstituyeron en HCl 0.1 N. Tanto las muestras como la curva patrón, con un rango de 2 a 50 pg/tubo, se pipetearon en cubetas esmeriladas para espectrofotómetro. Posteriormente se añadieron 2 ml del reactivo azul brillante y tras 15 minutos de incubación se leyó la Absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro U-1100 Spectrophotometer (Hitachi).

A partir de la curva patrón, dibujada en papel semilogarítmico, se obtuvo una recta colocando en el eje de ordenadas la Absorbancia y en el de abscisas las cantidades de cada uno de los punto de la curva. En esta recta se interpolaron los valores de Absorbancia de cada muestra problema y se obtuvieron las correspondientes concentraciones de proteínas.

6.6.3. Validación del método.

La sensibilidad de este ensayo fue de 10 pg/ml. El coeficiente de variación intraanálisis fue 1.84% y el de variación interanálisis de 5.05%.

La curva patrón de proteínas aparece reflejada en la figura 17.

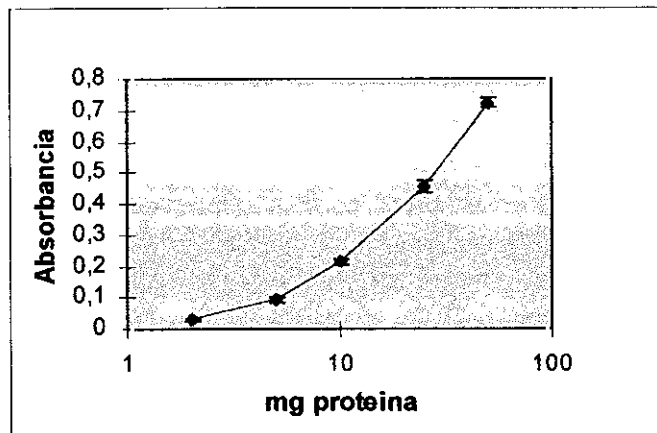


Figura 17. Curva de proteínas (media \pm SEM).

6.7. DETECCIÓN DE ARNm DE GH.

6.7.1. Extracción de ARN.

Para el aislamiento de ARN de la glándula submaxilar se siguió el método de Chomczynski y Sacchi (1987), que puede dividirse en las siguientes fases:

- Extracción del ARN del tejido mediante solución D, acetato, fenol y cloroformo.
- Precipitación del ARN ya extraído, gracias a la adición de isopropanol.
- Reprecipitación con solución D e isopropanol.
- Lavado del material precipitado con etanol.
- Solubilización del ARN en H₂O destilada estéril.

Primeramente, el tejido que había sido conservado a -80°C desde el momento de su extracción, se homogeneizó en 1.5 ml de solución D (Guanidín tiocianato 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, N-lauril sacrosina 0.5% y mercaptoetanol 0.1 M) utilizando un homogeneizador (Tissumizer, Tekmar). De cada uno de estos homogeneizados se tomaron 2 alícuotas de 500 μl sobre las que se añadieron sucesivamente 100 μl de acetato de sodio 2 M pH 4.1, 500 μl de fenol saturado con H₂O y 200 μl de una mezcla 49:1 de cloroformo-isoamiloalcohol. Toda esta mezcla se mantuvo 15 minutos en hielo y a continuación se centrifugó 20 minutos a 13000 rpm y a 4°C en una centrifuga Fisher Modelo 235 C.

Tras esta centrifugación se obtuvieron dos fases, estando el ARN en la fase superior (acuosa), mientras que el ADN y las proteínas se encontraban en la interfase y en la fase inferior (fenólica). Se tomaron 450 μl de la fase superior, con la que se

continuó trabajando, siendo descartado el resto. Sobre esta fase acuosa se añadieron 500 μl de isopropanol y la mezcla resultante se dejó incubando durante 24 h a -70°C , para que se produjera la precipitación del ARN extraído.

Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras 15 minutos en las mismas condiciones que antes. Una vez descartado el sobrenadante, el precipitado se disolvió en 150 μl de solución D, mediante pipeteo repetido. Se añadieron 400 μl de isopropanol y se dejó precipitando todo esto 24 h a -70°C (reprecipitación), al término de las cuales el precipitado obtenido después de una nueva centrifugación se lavó con 250 μl de etanol. Se descartó de nuevo el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco se reconstituyó en 40 μl de H_2O bidestilada estéril y se midió la Absorbancia a 260 y 280 nm en un espectofotómetro Shimadzu UV-1201 utilizando 5 μl de cada una de las muestras. El resto de ARN se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

El cociente A_{260}/A_{280} , denominado R, nos da el grado de pureza de nuestro ARN, esto es, si existe o no contaminación con proteínas, ADN o restos de reactivos empleados, de tal forma que valores de R entre 1.8-2 indican mínima contaminación. En nuestro estudio, sólo se utilizaron muestras de valores comprendidos en dicho rango.

La cantidad media de ARN obtenido fue de $6.29 \pm 1.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ tejido.

6.7.2. Síntesis de cADN por RT.

Una vez extraído el ARN de cada una de las muestras, se procedió a la síntesis de una cadena de ADN mediante transcripción inversa (RT) (Chelly y cols 1988), utilizando polidT como cebador y una enzima polimerasa denominada transcriptasa inversa que forma ADN a partir ARN. Este ADN obtenido se denomina cADN porque es copia directa de ARN.

Se emplearon 3 μg de ARN de cada una de las muestras a las que se añadieron 9.375 unidades de la enzima transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar, MgCl_2 5 mM, Tris-HCl 50 mM, KCl 50 mM, 0.01 unidades de RNAsin, desoxinucleósidos trifosfato 1 mM y cebador oligodT 1.25 μM .

Toda esta mezcla se incubó 25 minutos a 42°C y posteriormente 5 minutos a 99°C en un baño de agua. Finalmente las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización en la posterior etapa de amplificación.

6.7.3. Amplificación del cADN mediante PCR.

A partir del cADN formado en la etapa anterior, se obtuvieron nuevas copias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y cols 1986, Bloch 1991), utilizando la enzima polimerasa del microorganismo *Thermus aquaticus*, que es resistente a los cambios bruscos de temperatura a los que son sometidas las muestras durante este proceso (Eckert y Kunkel 1990).

Se utilizaron dos cebadores específicos para el gen de GH de ratón, cuyas secuencias, escritas en dirección 5'-3', fueron:

1819 ACTGCTTGGCAATGGCTAC 1837
2812 ATCTTCCAGCTCCTGCATC 3016.

El segundo cebador contenía nucleótidos correspondientes a dos exones distintos y consecutivos separados por un intrón.

La reacción de PCR se realizó añadiendo sobre el 7.5% de la reacción de RT los siguientes reactivos: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, desoxinucleósidos trifosfato 0.2 mM, 1 μM de cada uno de los cebadores y 3 unidades de polimerasa.

Todo esto se sometió a 30 ciclos consistentes en 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62 °C y 1 minuto a 72 °C, y además un ciclo final de 5 minutos a 72 °C. Estos ciclos se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer Modelo GenneAmp 9600.

6.7.4. Análisis del producto de la PCR.

Los productos resultantes de la reacción de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio, lo que permitió su observación a la luz ultravioleta.

Se utilizaron 12 μl de ADN de la mezcla de reacción PCR, que se dejaron correr durante 1 h en una cubeta de electroforesis GE 100 (Stratagene), a 100 V, 150 mA y 50 W. Finalmente el resultado se visualizó en un transiluminador ultravioleta Fisher Modelo FB-TIV-88.

7. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

7.1. EXPERIMENTO 1: ESTUDIO DEL EFECTO DE DISTINTAS PAUTAS DE ADMINISTRACIÓN DE GHRH EN LA RATA MACHO NORMAL.

Con el fin de investigar el efecto de la administración de GHRH en ratas machos normales, 28 ratas Wistar de 50 días de vida fueron tratadas con dicho péptido de forma continua (minibomba osmótica) o pulsátil (inyecciones). Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- * **Control (n=7):** Inyecciones i.p. diarias de salino a las 10:00 y 16:00 h.
- * **B (n=7):** Infusión continua de GHRH (400 µg/día) mediante una minibomba osmótica implantada subcutáneamente.
- * **I-D (n=7):** Inyecciones i.p. diarias de GHRH (100 µg/inyección) a las 10:00 y 16:00 h.
- * **I-A (n=7):** Inyecciones i.p. alternas de GHRH cada 48h (100 µg/inyección) a las 10:00 y 16:00 h.

El tratamiento duró 7 días, tras los cuales y a las 20 h de la última inyección de GHRH tanto en el grupo con inyecciones diarias como en días alternos, los animales fueron sacrificados.

7. 2. EXPERIMENTO 2: ESTUDIO DE LA RESPUESTA A LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH EN LA RATA MACHO DEFICITARIA EN GH.

Continuando con la línea desarrollada en el objetivo anterior, se diseñó este segundo estudio utilizando un modelo de rata deficitaria en GH, obtenida por tratamiento neonatal con GMS. Se emplearon 29 ratas machos de 34 días de vida a las que se administró GHRH tal y como sigue a continuación:

A) Ratas no tratadas neonatalmente con GMS.

- * **Control (n=7):** Inyecciones i.p. diarias de solución salina.

B) Ratas tratadas neonatalmente con GMS (ratas GMS):

- * **GMS (n=7):** Inyecciones i.p. diarias de solución salina
- * **GMS-B (n=7):** Administración continua de GHRH mediante una minibomba osmótica colocada subcutáneamente.
- * **GMS-ID (n=7):** Tratamiento diario con GHRH de forma pulsátil mediante inyecciones i.p. diarias de GHRH.
- * **GMS-IA (n=8):** Administración pulsátil de GHRH en días alternos (cada 48h) mediante inyecciones i.p.

Tanto la dosis de GHRH administrada como la forma y la duración del tratamiento en este segundo estudio fueron las mismas que en el experimento 1. En esta ocasión, los animales fueron decapitados 1 h después de la última inyección de GHRH, tanto en el grupo GMS-ID como GMS-IA.

7.3. EXPERIMENTO 3: ESTUDIO A LARGO PLAZO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PULSÁTIL DE GHRH SÓLO O COMBINADO CON SS EN LA RATA HEMBRA NORMAL.

Tras no obtener resultados concluyentes en ratas machos, se decidió continuar los estudios en ratas hembras. En este nuevo diseño se incorporó además la administración de SS. 50 ratas hembras Wistar de 40 días de vida fueron sometidas a los siguientes tratamientos:

- * **Control (n=8):** 4 inyecciones s.c. diarias de solución salina, a las 9:00, 14:00, 17:00 y 21:00 h.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 Días

- * **GHRH (n=9):** 2 inyecciones s.c. diarias de GHRH a las 9:00 y 17:00 h.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 Días

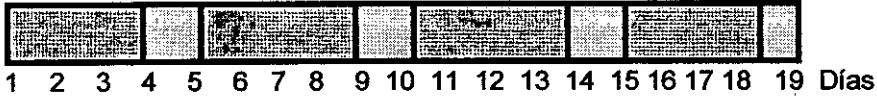
* **GHRH 3 + SS 2 (n=8):** En períodos de 5 días:



2 inyecciones s.c. de GHRH a las 9:00 y 17:00 h, durante 3 días.



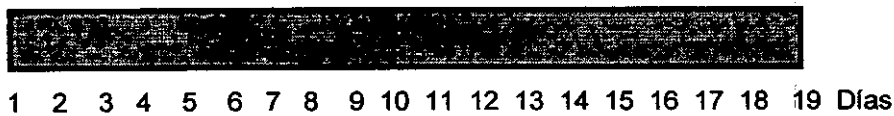
2 inyecciones s.c. de SS (Sandostatín) a las 9:00 y 17:00 h, los 2 días siguientes.



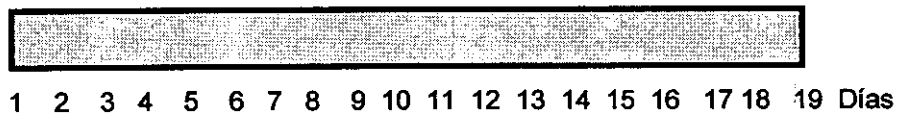
* **GHRH + SS (n=8):** Cada día 2 inyecciones s.c. de GHRH, a las 9:00 y 17:00 h, y 2 inyecciones s.c. de SS (Somiatón) a las 13:00 y 21:00 h.



* **4 GHRH (n=8):** 4 inyecciones s.c. diarias de GHRH a las 9:00, 13:00, 17:00 y 21:00 h.



* **4 SS (n=9):** 4 inyecciones s.c. diarias de SS (Somiatón) a las 9:00, 13:00, 17:00 y 21:00 h.



El tratamiento duró 19 días y las dosis empleadas fueron:

- GHRH: 300 µg/inyección.
- SS Sandostatín: 2 µg/inyección.
- SS Somiatón: 100 µg/inyección.

Las ratas se mataron 2 h después de la última inyección de GHRH, Sandostatín o Somiatón según el tratamiento correspondiente.

7.4. EXPERIMENTO 4: ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LA RATA HEMBRA DEFICITARIA EN GH A LA ADMINISTRACIÓN PULSÁTIL DE GHRH A LARGO PLAZO.

En vista de que la rata hembra parecía responder mejor que la rata macho a nuestros tratamientos, se diseñó este nuevo estudio empleando ratas deficitarias en GH tras tratamiento neonatal con GMS, con motivo de conocer el efecto de las inyecciones de GHRH. 25 ratas hembras Wistar, de 24 días de vida, se distribuyeron de la siguiente forma:

A) Animales no tratados neonatalmente con GMS:

- * **Control (n=10):** inyecciones i.p. diarias de solución salina a las 10:00 y 16:00 h.

B) Animales tratados neonatalmente con GMS (ratas GMS):

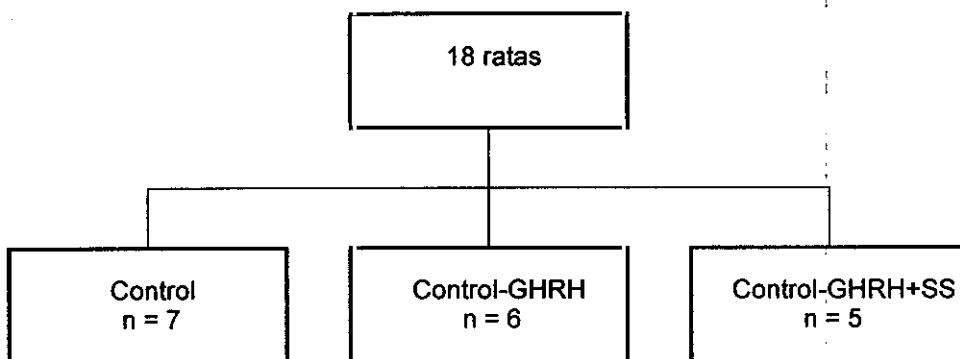
- * **GMS (n=7):** inyecciones i.p. diarias de solución salina a las 10:00 y 16:00 h.
- * **GMS-GHRH (n=8):** inyecciones i.p. diarias de GHRH (100 µg/inyección), a las 10:00 y 16:00 h.

El tratamiento con GHRH se mantuvo durante 36 días. La última inyección de GHRH fue 1 h antes de sacrificar a los animales.

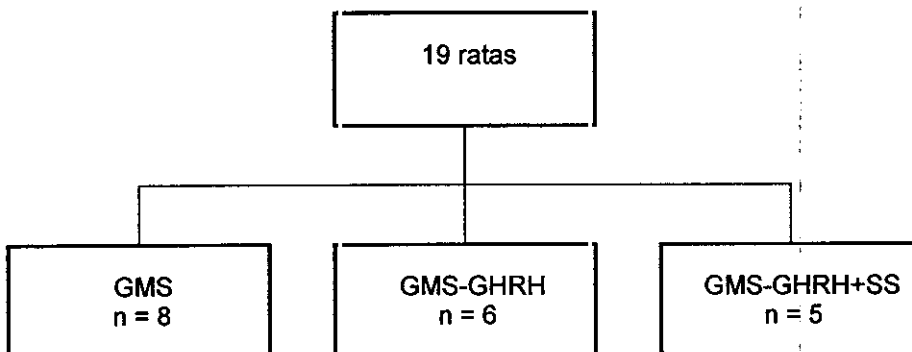
7.5. EXPERIMENTO 5: ESTUDIO DE LA RESPUESTA EN LA RATA HEMBRA NORMAL Y DEFICITARIA EN GH A LA ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA A LARGO PLAZO DE GHRH SÓLO O COMBINADO CON SS.

Una segunda fase en el estudio de la regulación de la secreción de GH en la rata hembra fue investigar el comportamiento de dichos animales ante la administración continua de GHRH. Para ello se utilizaron 37 ratas hembras Wistar, tanto normales como deficitarias en GH. Los animales se distribuyeron como sigue:

A) Ratas no tratadas con GMS (ratas control):



B) Ratas tratadas neonatalmente con GMS (ratas GMS):



El tratamiento comenzó a los 36 días de vida. La dosis y la forma de administración de cada droga, durante los 21 días que duró el experimento, fueron las siguientes:

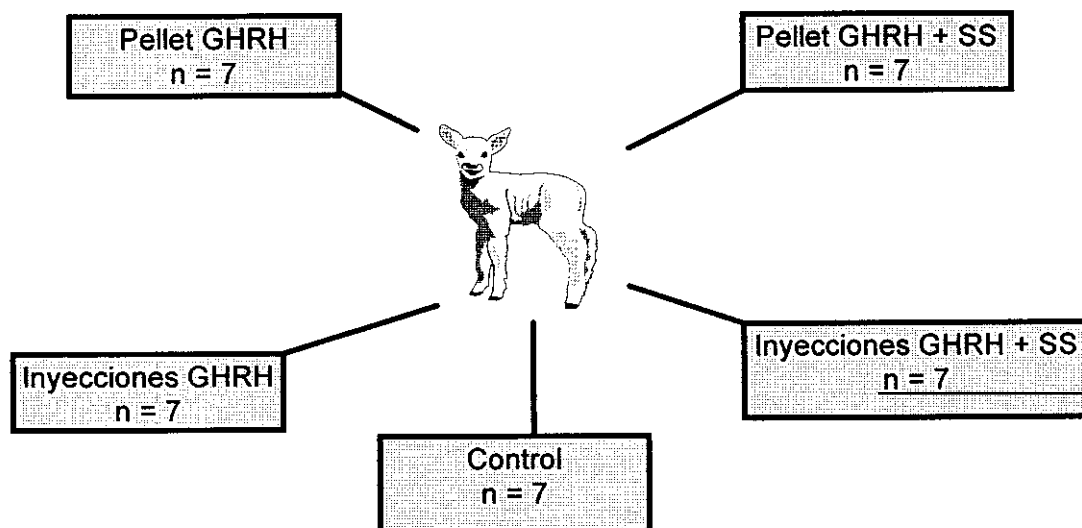
- GHRH: infusión continua, mediante un pellet s.c., que liberaba 600 μg de GHRH/día.
- SS (Sandostatín): 1 inyección diaria s.c. de 2 μg /día a las 17:00 h.

A los animales de los dos grupos control se les implantó un pellet de placebo.

El tiempo transcurrido entre la última inyección de SS y el sacrificio fue 20 h. Un día antes del sacrificio de los animales, se realizó una prueba de estímulo con GHRH, procediéndose tal y como se detalló en el punto 2.3 de Materiales y Métodos.-

7.6. EXPERIMENTO 6: EFECTO A LARGO PLAZO DE DISTINTAS FORMAS DE ADMINISTRACIÓN DE GHRH SÓLO O COMBINADO CON SS EN CORDEROS.

Para optimizar el modelo animal y su respuesta al tratamiento con GHRH y SS, se diseñó este nuevo experimento utilizando 35 corderos machos de 2 meses de vida, a los que se sometió a los tratamientos que aparecen a continuación.



Este estudio duró 21 días y las dosis y forma de administración de GHRH y SS fueron como sigue:

- Pellet GHRH: Infusión continua de 1200 µg de GHRH/día mediante un pellet de liberación lenta colocado en cada uno de los animales.

- GHRH: Inyecciones s.c. diarias de 250 µg de GHRH/inyección, tres en el caso del grupo Inyecciones GHRH (a las 9:00, 12:00 y 17:00 h) y dos en el grupo Inyecciones GHRH+SS (a las 9:00 y 15:00 h).

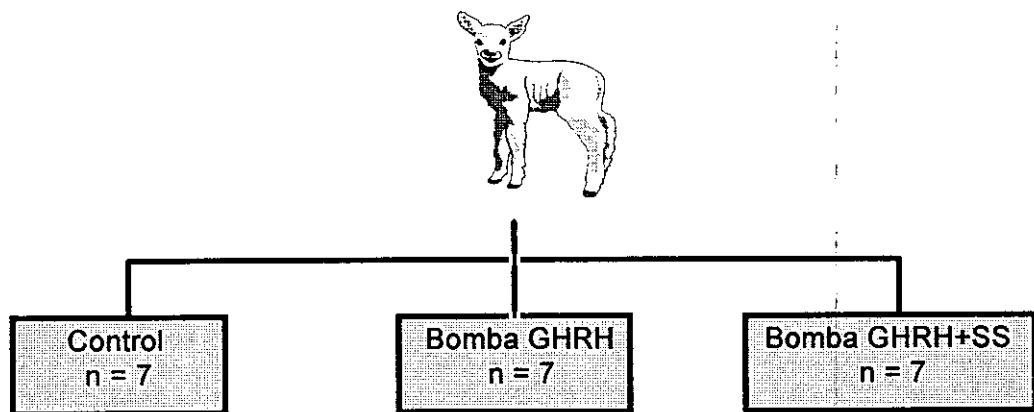
- SS: En el grupo Pellet GHRH+SS, la SS era de larga duración (Sandostatín), y el tratamiento consistió en una inyección diaria de 20 µg, a las 17:00 h. La SS administrada a los animales del grupo Inyecciones GHRH+SS era de corta duración (Somiatón), y se hizo en forma de 2 inyecciones s.c. de 250 µg/inyección, a las 12:00 y 17:00 h.

Los animales control llevaron un pellet de placebo durante todo el estudio. A todos los animales se les realizó semanalmente una prueba de estímulo con GHRH 1 h después de la inyección de GHRH de las 9:00. Tras los 21 días de tratamiento, los corderos fueron decapitados a las 20 h de la última inyección de GHRH o SS correspondiente.

7.7. EXPERIMENTO 7: ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA A LARGO PLAZO DE GHRH MEDIANTE BOMBAS OSMÓTICAS EN CORDEROS.

Con el fin de profundizar en los efectos de la infusión continua de GHRH en el cordero, se diseñó el siguiente experimento utilizando minibombas osmóticas como medio de administración continua de GHRH.

Se utilizaron 21 corderos machos de 2 meses de edad, divididos en 3 grupos experimentales:



En los grupos experimentales Bomba GHRH y Bomba GHRH+SS la dosis de GHRH liberada por la bomba osmótica fue de 900 $\mu\text{g}/\text{día}$. Además a los corderos del grupo Bomba GHRH+SS se les administró diariamente una inyección s.c. de 20 μg de SS de larga duración (Sandostatín) a las 17:00 h. El grupo control llevó una bomba osmótica, rellena con solución salina, durante todo el experimento.

También en este caso, los corderos fueron sometidos a un test de respuesta a GHRH cada semana, tomándose muestras basalmente y tras 10, 20 y 30 minutos tras la inyección de GHRH.

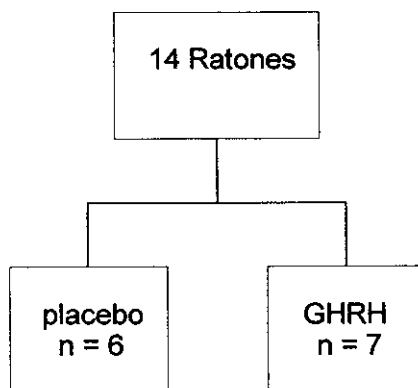
El tratamiento duró un mes, transcurrido el cual los animales fueron decapitados a las 20 h de la última inyección de Sandostatín.

En los experimento descritos anteriormente, las ratas fueron pesadas diariamente y los corderos cada 2-3 días. En los experimentos 4 y 5 también se determinó la longitud tibial por Microknemometría. Una vez finalizado el período de tratamiento, los animales se sacrificaron e inmediatamente se les recogió la sangre troncular, el hipotálamo y la hipófisis. En el experimentos 5, las hipófisis se pesaron inmediatamente después de ser extraídas.

Asimismo, se determinaron mediante RIA el contenido hipotalámico de GHRH y de SS, el contenido hipofisario de GH y los niveles plasmáticos de GH e IGF-I.

7.8. EXPERIMENTO 8: REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH EN TEJIDOS EXTRAHIPOFISARIOS SOMETIDOS A ALTAS DOSIS DE GHRH.

Con objeto de ver si la GHRH también regula la secreción de GH en otros tejidos distintos de la hipófisis, se realizó el presente experimento en ratones Ames, implantándoseles un cuarto de pellet de GHRH en la glándula submaxilar. Se utilizaron 14 ratones hembras normales de 1.5-2 meses de vida. Los grupos fueron:



Tanto el pellet de placebo como el de GHRH fue implantado tal y como se explicó en el punto 3.2.

Los cuartos de pellet de GHRH contenían 1.25 mg de GHRH, lo que les proporcionó una dosis diaria de 21 µg. El tratamiento fue de 60 días. Antes de procederse al sacrificio de los animales, se tomaron muestras de sangre directamente del corazón y se extrajeron ambas glándulas submaxilares. Luego los ratones fueron decapitados. Se determinaron mediante RIA los niveles de GH en el plasma y en la glándula submaxilar. También en dicho tejido se analizó la expresión del gen de GH mediante RT-PCR.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

En todos los casos los datos se representaron como la media \pm SEM.

Tanto para el análisis de los datos de peso corporal y de longitud tibial como para el de los niveles hormonales en los experimentos 1, 2, 3, 6 y 7 se empleó el ANOVA factorial de 1 vía seguida del test de Scheffe como test a posteriori. Además en el experimento 2 previamente al ANOVA se realizó un test t-Student entre los grupos control y GMS. En el experimento 5 se utilizó el ANOVA factorial de 2 vías, y cuando existió interacción significativa entre los dos factores principales se prosiguió el estudio con un ANOVA de 1 vía o un test t-Student.

En los experimentos 4 y 8, todo el análisis estadístico se hizo mediante un test t-Student.

En el análisis de los test de estímulo con GHRH se empleó un ANOVA de medidas repetidas de 2 vías seguido de ANOVA factorial de 1 vía y test de Scheffe o test t-Student en los experimentos 6 y 7 y un test t-Student pareado en el experimento 5.

IV. RESULTADOS

1. EXPERIMENTO 1: EFECTO DE DIFERENTES PAUTAS DE ADMINISTRACIÓN DE GHRH EN LA RATA MACHO NORMAL.

1.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GHRH.

Ninguna de las pautas de administración de GHRH produjo cambios significativos en el contenido hipotalámico de GHRH tras una semana de tratamiento (figura 18).

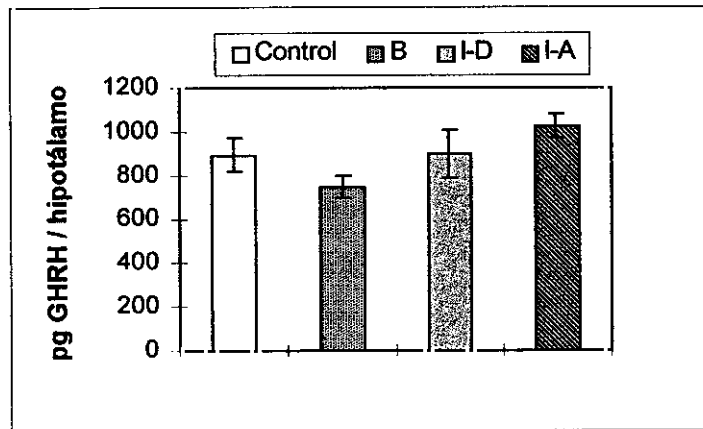


Figura 18. Contenido hipotalámico de GHRH en los distintos grupos experimentales. B=Bomba GHRH, I-D=Inyecciones diarias de GHRH, I-A=Inyecciones de GHRH en días alternos.

1.2. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.

La figura 19 muestra el contenido hipotalámico de SS. No aparecieron variaciones significativas en dicho parámetro tras los distintos tratamientos con GHRH durante los 7 días que duró el estudio.

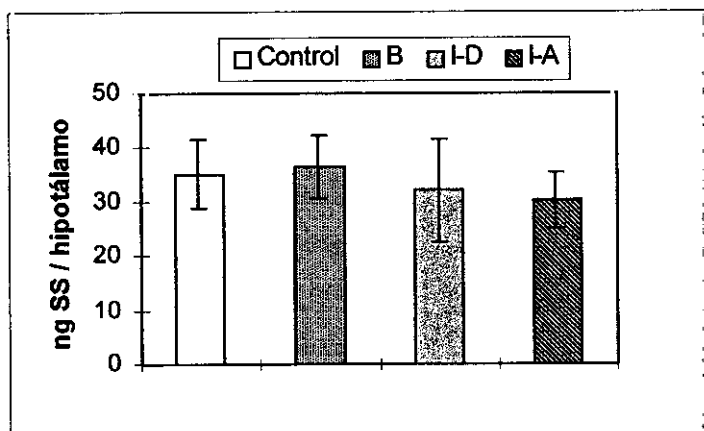


Figura 19. Contenido de SS en los hipotálamos de los diferentes animales.

1.3. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.

Los niveles hipofisarios de GH se analizaron determinándose el contenido hipofisario total de GH ($\mu\text{g GH/hipófisis}$) y la concentración hipofisaria de GH referida al contenido proteico en dicho tejido ($\mu\text{g GH/mg proteína}$). Ninguno de los tratamientos indujo cambios significativos ni en el contenido de GH ni en la concentración hipofisaria de GH referida a mg de proteínas (figura 20).

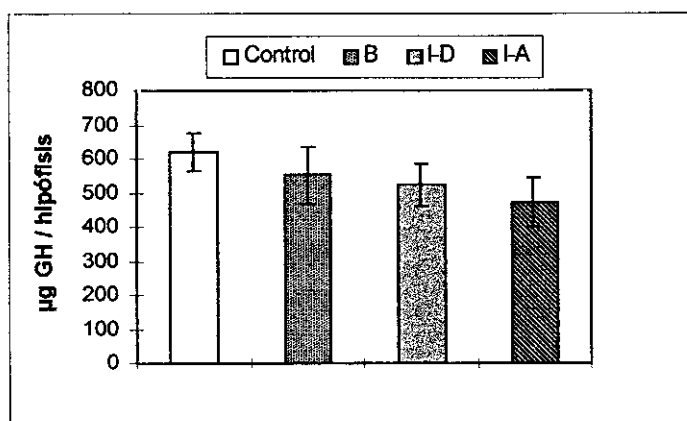


Figura 20. Contenido total de GH en las hipófisis extraídas al final del tratamiento.

1.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.

Todas las pautas de administración de GHRH utilizadas produjeron un incremento en los niveles plasmáticos de GH respecto al grupo Control, aunque sólo lo hicieron de forma significativa las ratas de los grupos B e I-D ($p < 0.05$). El aumento producido en el grupo B fue además significativamente mayor que en grupo I-A ($p < 0.05$) (figura 21).

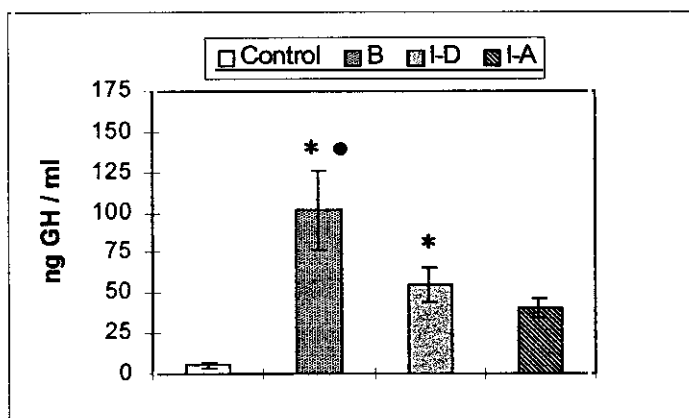


Figura 21. Niveles de GH en el plasma obtenido al final del experimento tras la decapitación.
 * $p < 0.05$ vs grupo Control, • $p < 0.05$ vs grupo I-A.

1.5. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF- I.

En la figura 22 aparecen los niveles plasmáticos de IGF-I al final del experimento. Todos los animales mostraron niveles similares de dicho parámetro.

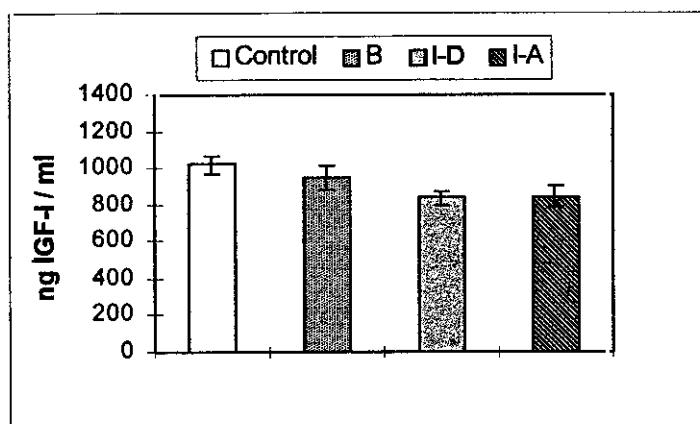


Figura 22. Niveles plasmáticos de IGF-I tras una semana de tratamiento con GHRH.

1.6. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.

Como puede verse en la tabla 5, no hubo diferencias significativas ni en el peso alcanzado al final del experimento ni en el incremento de dicho parámetro tras los distintos tratamientos.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Incremento peso (g)
Control	260.0 ± 4	304.8 ± 5.58	43.58 ± 1.9
B	259.7 ± 2.5	302.7 ± 3.61	43.02 ± 1.9
I-D	259.4 ± 4.7	305.2 ± 7.89	45.86 ± 3.8
I-A	261.0 ± 3.6	312.4 ± 7.57	51.29 ± 4.2

Tabla 5. Evolución ponderal de los diferentes grupos experimentales.

2. EXPERIMENTO 2: EFECTO DE LA GHRH EN LA RATA MACHO DEFICITARIA EN GH.

2.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.

La figura 23 muestra el contenido de SS en los hipotálamos de los ratas al final del experimento. Todos los grupos mostraron niveles similares en este parámetro.

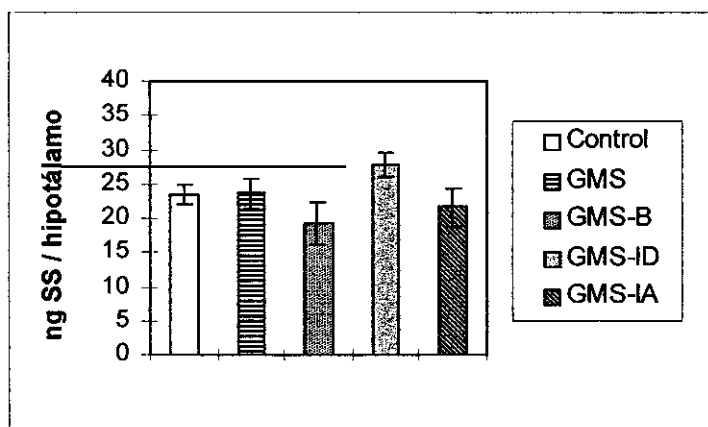


Figura 23. Niveles de SS en los hipotálamos de los diferentes grupos. B=Bomba GHRH, ID=Inyecciones diarias de GHRH, IA=Inyecciones de GHRH en días alternos.

2.2. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.

El contenido total de GH en las hipófisis de las ratas tratadas neonatalmente con GMS fue significativamente menor ($p < 0.01$) que en las del grupo Control. Ninguno de los tratamientos a los que fueron sometidos las ratas GMS modificó significativamente el contenido hipofisario de GH respecto a los animales del grupo GMS sin tratamiento. Los niveles del grupo GMS-B fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que los del grupo GMS-IA (figura 24a).

En la figura 24b se representa la concentración hipofisaria de GH/mg proteína en los distintos grupos. No se encontraron diferencias significativas ni entre el grupo Control y los animales tratados neonatalmente con GMS ni entre los distintos grupos de ratas GMS entre sí.

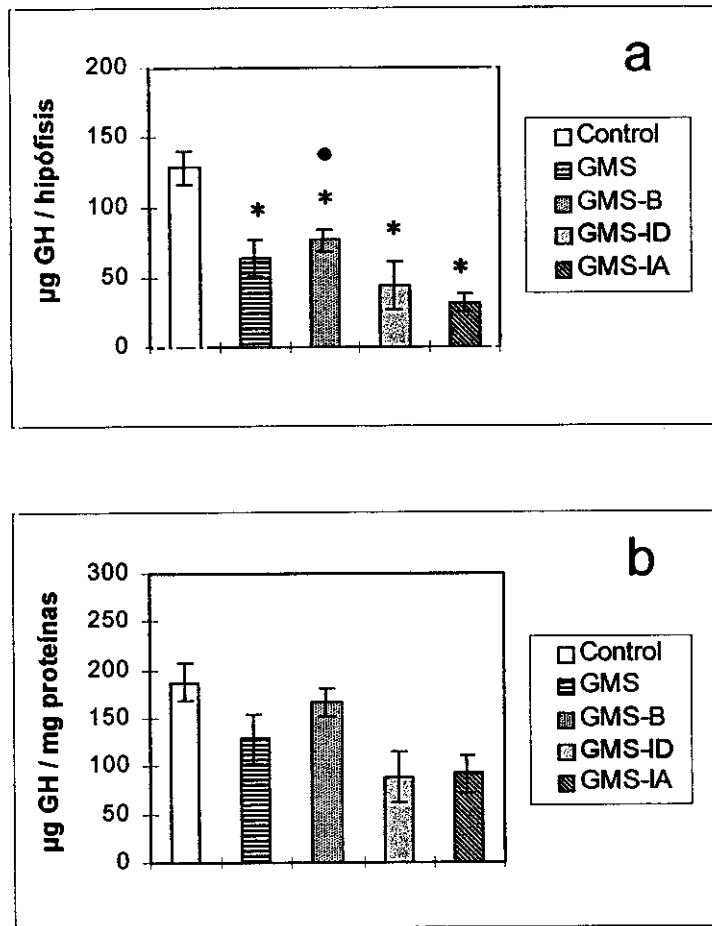


Figura 24. Contenido hipofisario de GH (a) y concentración de GH/mg proteína (b) en las hipófisis de los diferentes animales tras una semana de tratamiento. * $p < 0.01$ vs grupo Control. • $p < 0.05$ vs grupo GMS-IA.

2.3. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.

Las ratas tratadas neonatalmente con GMS presentaron niveles plasmáticos de GH significativamente menores ($p < 0.05$) que las del grupo Control. No hubo diferencias significativas entre los diversos grupos GMS, aunque todos los tratamientos llevados a cabo tendieron a aumentar los valores de GH en plasma, sobre todo las inyecciones de GHRH en días alternos (figura 25).

2.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF- I.

Las ratas GMS mostraron unos niveles plasmáticos de IGF-I significativamente menores ($p < 0.001$) que el grupo Control. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos tratados con GMS tras la semana de estudio (figura 26).

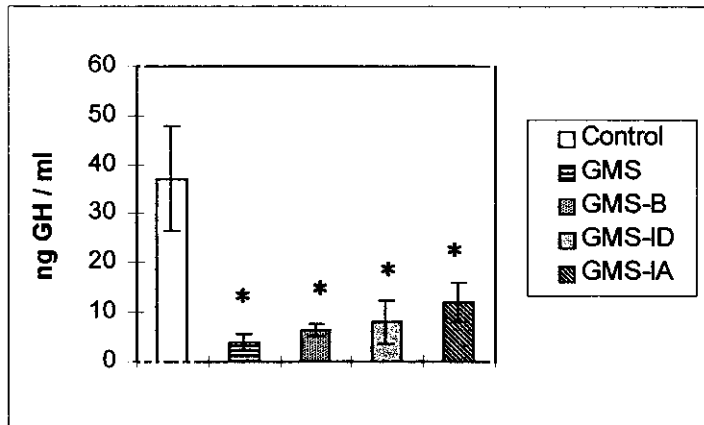


Figura 25. Niveles plasmáticos de GH al final del experimento. * $p < 0.05$ vs grupo Control.

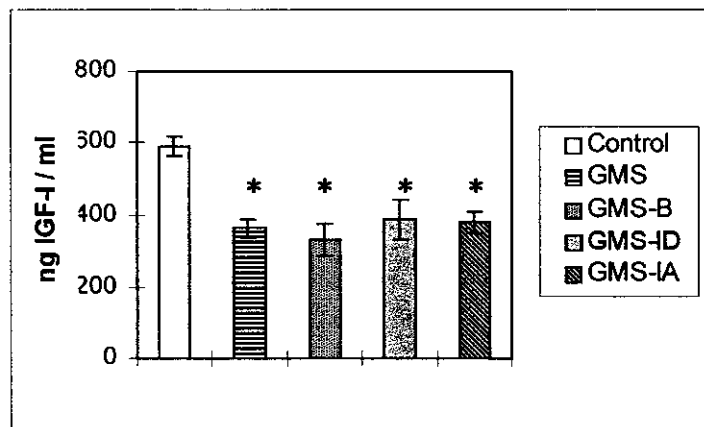


Figura 26. Niveles plasmáticos de IGF-I tras 7 días de experimentación. * $p < 0.001$ vs grupo Control.

2.5. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.

El tratamiento neonatal con GMS disminuyó significativamente el peso corporal ($p < 0.05$) respecto al grupo Control, lo que fue patente desde el inicio (34 días de vida) hasta el final del experimento, tras 7 días de tratamiento. Todos los grupos GMS, excepto el tratado con inyecciones diarias de GHRH, presentaron un incremento de peso significativamente menor que el grupo Control ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas ni en el peso corporal ni en el incremento ponderal al final del tratamiento entre los distintos grupos de ratas tratadas con GMS, siendo en ambos casos los valores del grupo GMS-ID los mayores y más próximos a los del grupo Control (tabla 6).

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Incremento peso(g)
Control	120.6 ± 1.5	163.1 ± 4.5	42.5 ± 3.3
GMS	97.7 ± 4 *	130.4 ± 5.5 *	32.7 ± 2.6 *
GMS-B	97.3 ± 4.3 *	131.7 ± 5.5 *	34.4 ± 2.3 *
GMS-ID	99.3 ± 2.8 *	139.0 ± 6 *	39.7 ± 4.7
GMS-IA	93.2 ± 2 *	128.0 ± 2.4 *	34.7 ± 2 *

Tabla 6. Evolución ponderal de los diferentes grupos experimentales. * $p < 0.05$ vs grupo Control.

3. EXPERIMENTO 3: EFECTO DEL TRATAMIENTO A LARGO PLAZO CON INYECCIONES DE GHRH Y DE SS EN LA RATA HEMBRA NORMAL.

3.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.

La figura 27 representa el contenido hipotalámico de SS tras los diferentes tratamientos realizados. En todos los grupos, excepto la combinación diaria de inyecciones de GHRH y de SS (grupos GHRH+SS y GHRH 3+SS 2), disminuyó significativamente este parámetro respecto al grupo Control. Los valores mínimos se obtuvieron tras la administración diaria de 4 inyecciones de GHRH o de SS (grupos 4 GHRH y 4 SS respectivamente), siendo el contenido de SS en el hipotálamo de estas ratas significativamente menor ($p < 0.05$) que en las ratas Control y en las del grupo GHRH+SS (figura 27).

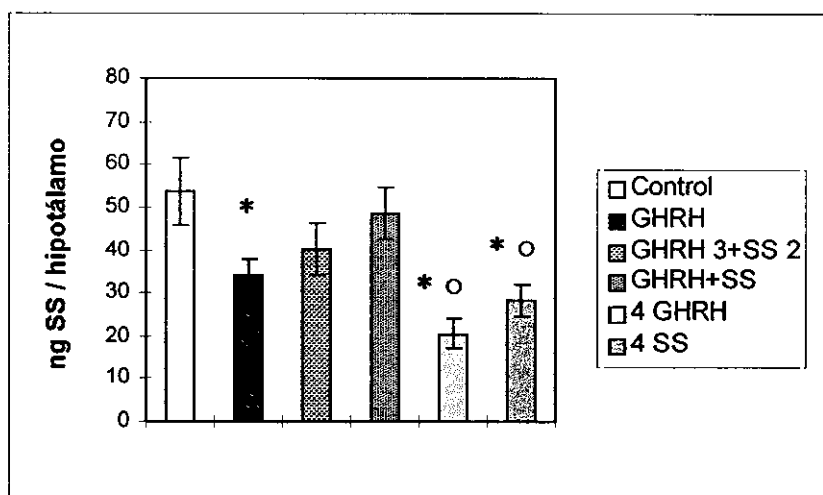


Figura 27. Niveles de SS en el hipotálamo después de 19 días de estudio. * $p < 0.05$ vs grupo Control, o $p < 0.05$ vs grupo GHRH+SS.

3.2. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.

Tras analizar los niveles de GH en las hipófisis se observó que ninguno de los tratamientos produjo cambios significativos respecto al grupo Control ni en el contenido hipofisario ni en la concentración hipofisaria de GH/mg proteína. En ambos casos los valores más altos fueron los de los grupos GHRH 3+SS 2 y 4 GHRH. En la figura 28 se presenta el contenido hipofisario total de GH.

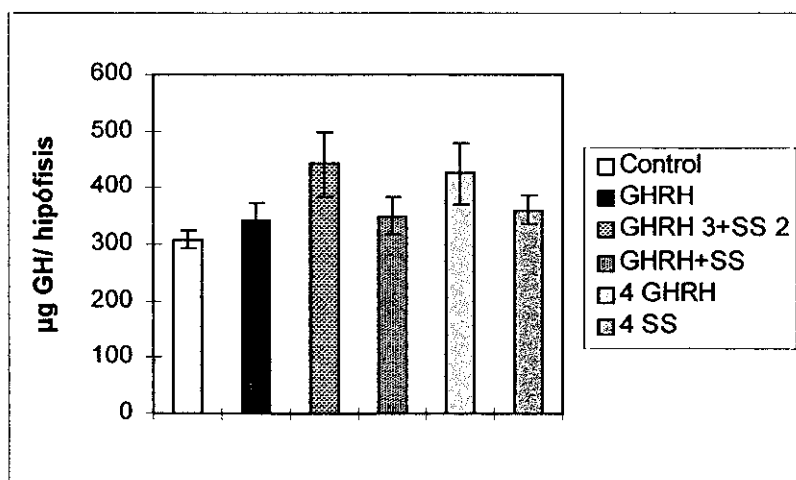


Figura 28. Contenido de GH en las hipófisis recogidas al final del experimento.

3.3. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.

Los grupos 4 GHRH y GHRH+SS mostraron unos niveles plasmáticos de GH significativamente menores ($p < 0.05$) que el grupo Control al final del estudio. El grupo GHRH+SS fue el que presentó los valores más bajos, siendo también significativamente menores que los de los ratas de los grupos GHRH y 4 SS (figura 29).

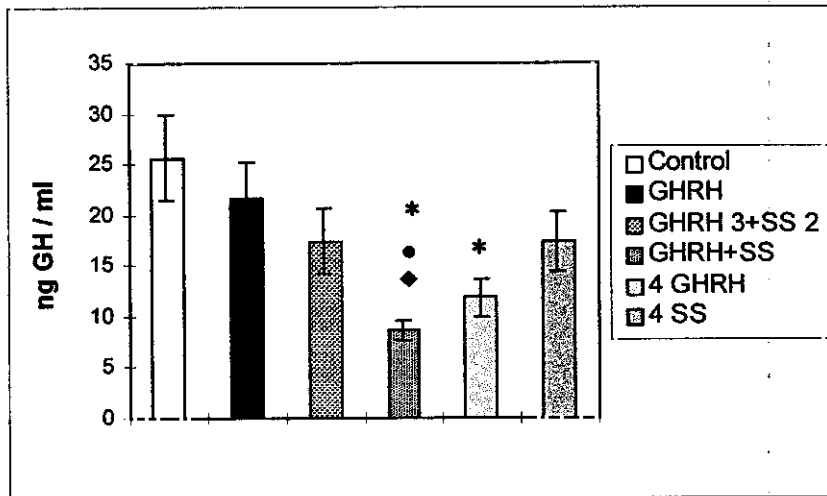


Figura 29. Niveles plasmáticos de GH. * $p < 0.05$ vs grupo Control, ♦ $p < 0.05$ vs grupo GHRH, • $p < 0.05$ vs grupo 4 SS.

3.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF- I.

En la figura 30 se muestran los niveles de IGF-I en plasma. Como puede observarse, todos los grupos mostraron valores similares de dicho parámetro.

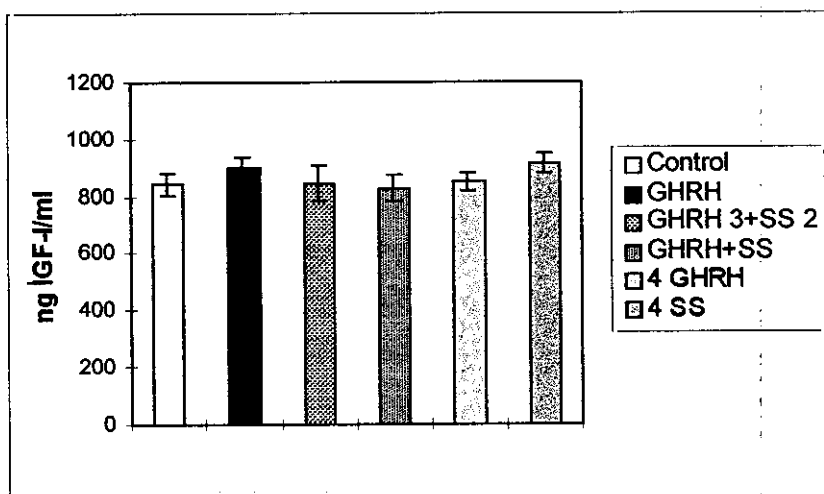


Figura 30. Niveles de IGF-I en el plasma obtenido al final del periodo de tratamiento.

3.5. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.

Prácticamente desde los primeros días de tratamiento las ratas del grupo 4 SS presentaron un peso corporal menor, aunque sólo las ratas de los grupos 4 GHRH y GHRH+SS fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que éstas, tanto en la primera semana de tratamiento (47 días de edad) como al término del estudio. Entre el resto de los grupos no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los períodos estudiados (figura 31).

Para analizar el incremento de peso corporal de este experimento, se estudiaron los valores obtenidos tras la primera semana de tratamiento y al final del mismo, después de 19 días.

En la primera semana el incremento máximo se dio en los grupos 4 GHRH y GHRH+SS, aunque en ambos casos sólo fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el hallado en el grupo 4 SS. Respecto al resto de los grupos no se encontraron diferencias significativas.

Al final del experimento, el mayor incremento de peso apareció en el grupo 4 GHRH, siendo significativa esta diferencia únicamente frente a los grupos Control, GHRH 3+SS 2 y 4 SS ($p < 0.05$). También las ratas del grupo GHRH+SS presentaron un incremento significativamente mayor ($p < 0.05$) que las del grupo 4 SS (tabla 7).

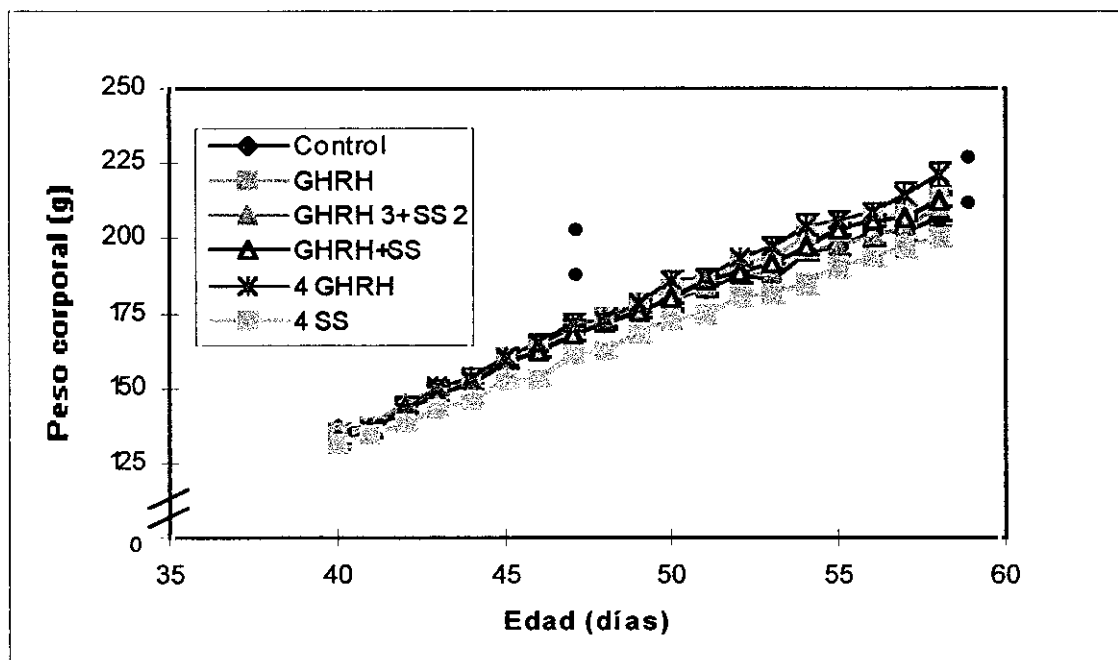


Figura 31. Evolución del peso corporal durante 19 días de tratamiento, desde los 40 hasta los 58 días de vida. • $p < 0.05$ vs grupo 4 SS.

Incremento peso (g)	7 días	19 días
Control	32.4 ± 1.6	70.6 ± 2
GHRH	31.0 ± 1.8	78.2 ± 3.2
GHRH 3 + SS 2	34.9 ± 2.3	76.2 ± 3
GHRH + SS	35.7 ± 2.1 •	80.7 ± 2 •
4 GHRH	40.3 ± 2.8 •	90.4 ± 4.2 * ▲ •
4 SS	28.8 ± 1.2	68.3 ± 3.1

Tabla 7. Incremento del peso corporal tras 7 y 19 días de tratamiento. * $p < 0.05$ vs grupo Control, ▲ $p < 0.05$ vs grupo GHRH 3+SS 2, • $p < 0.05$ vs grupo 4 SS.

4. EXPERIMENTO 4: ADMINISTRACIÓN PULSÁTIL DE GHRH A LARGO PLAZO EN LA RATA HEMBRA DEFICITARIA EN GH.

4.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.

Como puede verse en la figura 32, ninguno de los tratamientos alteró el contenido de SS en los hipotálamos extraídos al acabar las 5 semanas de tratamiento, respecto al grupo Control.

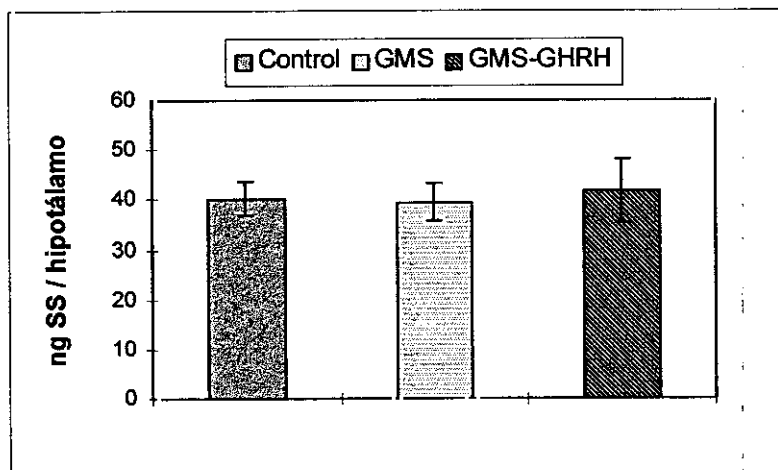


Figura 32. Contenido hipotalámico de SS de cada uno de los grupos.

4.2. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.

En la figura 33 aparecen el contenido hipofisario (a) y la concentración hipofisaria de GH/mg proteína (b) en cada uno de los grupos experimentales.

En ambos parámetros, el grupo GMS mostró niveles menores que los grupos GMS-GHRH y Control, aunque sólo fueron diferentes significativamente ($p < 0.05$ respecto a ambos grupos) los contenidos hipofisarios. El contenido hipofisario de GH del grupo GMS-GHRH fue ligeramente inferior al del grupo Control, pero esta diferencia no fue significativa.

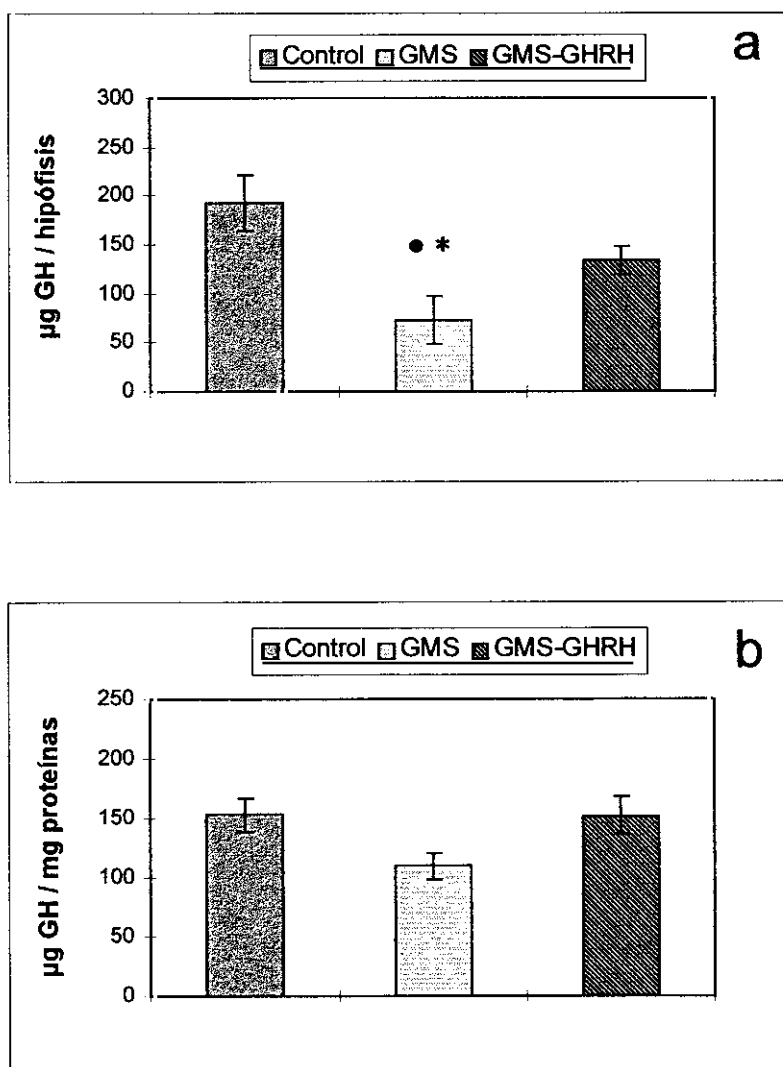


Figura 33. Contenido de GH (a) y concentración hipofisaria de GH/mg proteína (b) en las hipófisis de los diferentes animales tras 5 semanas de tratamiento. * $p < 0.05$ vs grupo Control, • $p < 0.05$ vs grupo GMS-GHRH.

4.3. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.

La figura 34 muestra los niveles plasmáticos de GH en los diferentes grupos. Los dos grupos tratados con GMS presentaron valores significativamente más bajos ($p < 0.05$) que el grupo Control. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos inyectados neonatalmente con GMS.

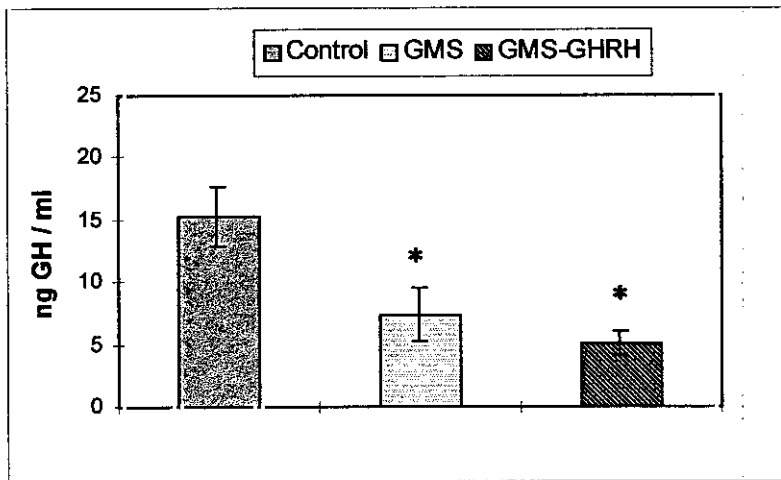


Figura 34. Niveles plasmáticos de GH al final del período estudiado. * $p < 0.05$ vs grupo Control.

4.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF- I.

El tratamiento neonatal con GMS provocó una disminución significativa ($p < 0.05$) de los niveles plasmáticos de IGF-I. No se encontraron diferencias entre los valores de los dos grupos tratados con GMS (figura 35).

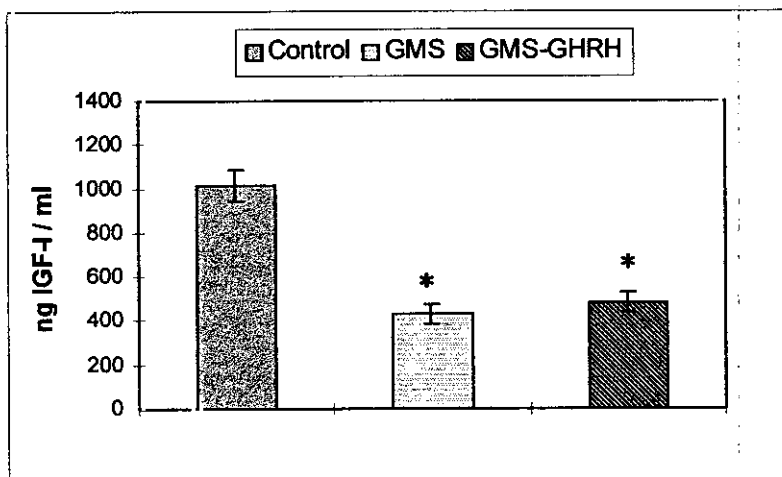


Figura 35. Niveles plasmáticos de IGF-I después de las 5 semanas de tratamiento. * $p < 0.05$ vs grupo Control.

4.5. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.

En la figura 36 aparece la evolución del peso corporal a lo largo de todo el experimento. Todas las ratas se comportaron de la misma manera durante la primera semana (32 días de vida) y no fue hasta los 46 días, esto es, transcurridas 3 semanas de tratamiento, cuando aparecieron las primeras diferencias ponderales.

El grupo GMS presentó valores significativamente menores que el grupo Control a las 3 semanas (137 ± 5 g vs 154.1 ± 4.7 g, $p < 0.05$), y que los grupos Control y GMS-GHRH al final del experimento (179.1 ± 6 g vs 197.3 ± 5 g en el grupo Control y 195.6 ± 5 g en el grupo GMS-GHRH, $p < 0.05$). A los 46 días, el grupo GMS-GHRH presentaba unos valores ligeramente inferiores a los del grupo Control (142.3 ± 3.6 g vs 154.1 ± 4.7 g), aunque no hubo diferencias significativas entre ambos grupos al final del experimento.

En este experimento, se estudió el incremento del peso corporal al final de la 1ª y 3ª semanas de tratamiento, y también después de todo el estudio. En la 1ª semana de tratamiento todos los animales aumentaron su peso en la misma proporción. Tras 3 semanas, el incremento de peso de las ratas de los dos grupos tratados neonatalmente con GMS fue igual y en ambos casos significativamente menor ($p < 0.05$) que el de las ratas del grupo Control. A las 5 semanas los grupos Control y GMS-GHRH se comportaron de forma similar, mientras que el grupo GMS incrementó su peso de forma significativamente menor que los grupos Control y GMS-GHRH ($p < 0.05$ en ambos casos). Todos estos datos aparecen reflejados en la tabla 8.

Incremento peso (g)	1 semana	3 semanas	5 semanas
Control	34.3 ± 1.3	105.5 ± 2.8	148.7 ± 3.2
GMS	32.0 ± 1.3	87.7 ± 3.8 *	129.8 ± 4.9 * •
GMS-GHRH	34.7 ± 1.3	93.7 ± 3.4 *	147.0 ± 4.4

Tabla 8. Incremento del peso corporal tras 1, 3 y 5 semanas de tratamiento. * $p < 0.05$ vs grupo Control, • $p < 0.05$ vs grupo GMS-GHRH.

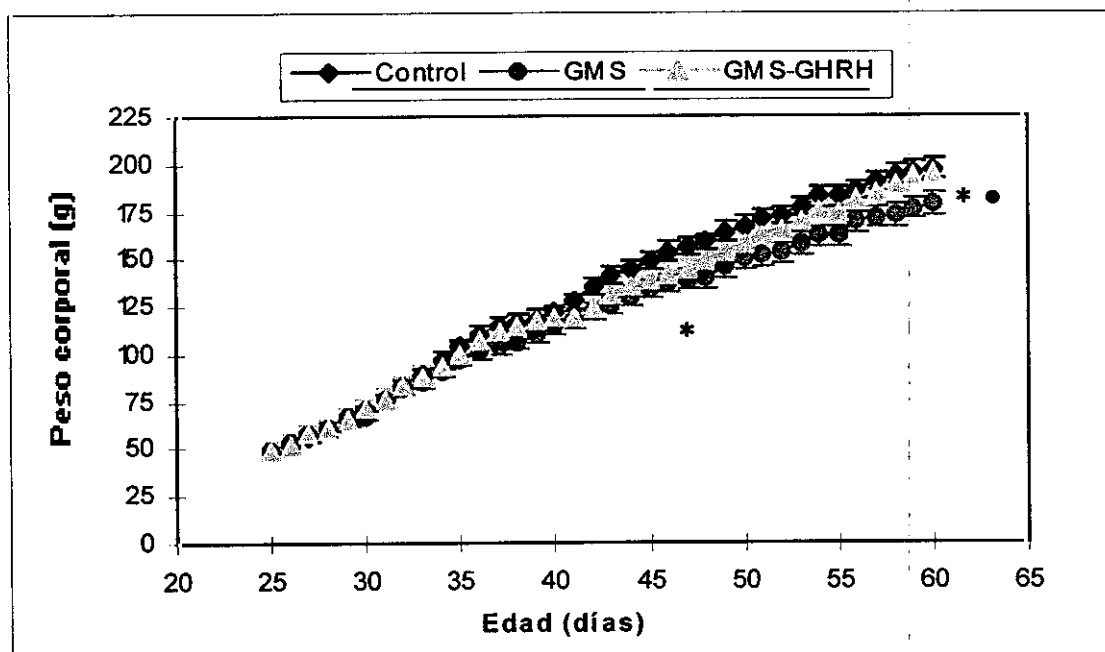


Figura 36. Evolución del peso corporal desde los 25 (comienzo del tratamiento diario con GHRH) hasta los 60 días de vida. * $p < 0.05$ vs grupo Control. • $p < 0.05$ vs grupo GMS-GHRH.

4.6. EVOLUCIÓN DE LA LONGITUD TIBIAL.

La figura 37 muestra el crecimiento tibial diario, determinado por microknemometría, en los 3 grupos estudiados.

Hasta el final del tratamiento no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos, a pesar de que ya desde las 3 semanas de iniciado el estudio (46 días de vida) la longitud tibial del grupo Control tendió a ser mayor que la del grupo GMS, aunque no de forma significativa (38 ± 0.4 mm vs 39.2 ± 0.4 mm, $p = 0.056$). Al término del estudio, todas las ratas tratadas neonatalmente con GMS presentaron una longitud tibial significativamente menor que el grupo Control (42.2 ± 0.4 mm en el grupo GMS y 42.8 ± 0.3 en el grupo GMS-GHRH vs 44 ± 0.4 en el grupo Control, $p < 0.05$). A lo largo de las 5 semanas de tratamiento los dos grupos tratados con GMS presentaron valores parecidos.

En los tres períodos estudiados, el incremento de longitud tibial en los grupos tratados neonatalmente con GMS fue significativamente menor ($p < 0.05$) que en el grupo Control. No se encontraron diferencias en el incremento de longitud de los grupos GMS y GMS-GHRH en ninguna de las etapas estudiadas (tabla 9).

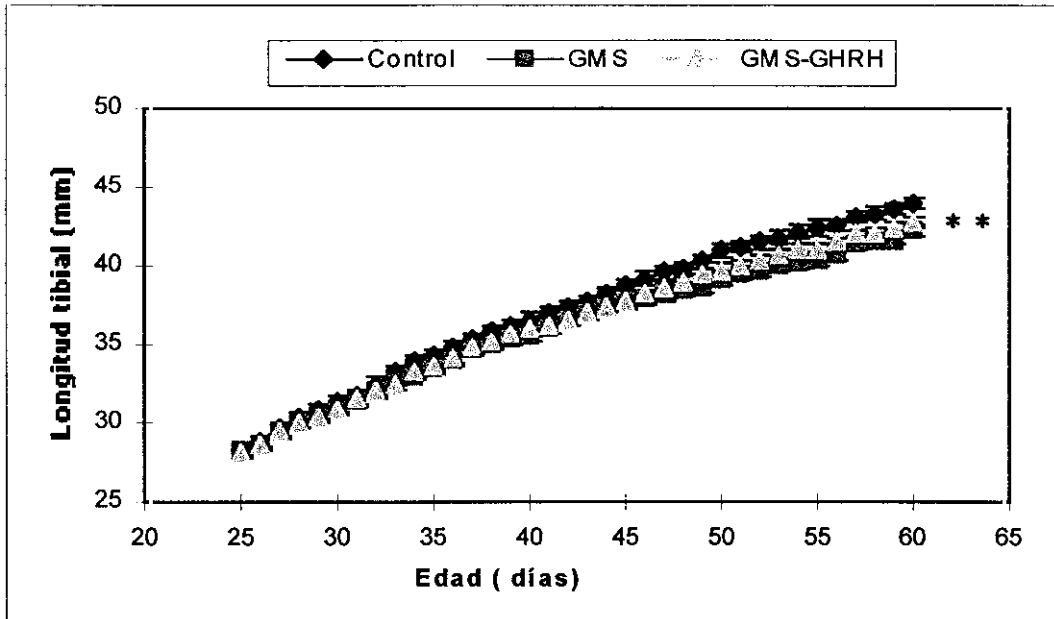


Figura 37. Longitud tibial desde los 25 hasta los 60 días de vida. La escala del eje de ordenadas comienza en 25 mm para clarificar los resultados. * $p < 0.05$ vs grupo Control.

Incremento longitud (mm)	1 semana	3 semanas	5 semanas
Control	4.35 ± 0.13	11.07 ± 0.18	15.73 ± 0.19
GMS	$3.80 \pm 0.15 *$	$9.75 \pm 0.27 *$	$14.00 \pm 0.41 *$
GMS-Inyección GHRH	$3.92 \pm 0.12 *$	$10.21 \pm 0.18 *$	$14.74 \pm 0.17 *$

Tabla 9. Incremento de la longitud tibial tras 1, 3 y 5 semanas de tratamiento. * $p < 0.05$ vs grupo Control.

5. EXPERIMENTO 5: ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA DE GHRH A LARGO PLAZO SÓLO O CON SS EN LA RATA HEMBRA NORMAL Y DEFICITARIA EN GH.

5.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.

En la figura 38 aparecen los niveles de SS en los hipotálamos de las ratas en los diferentes grupos. Aunque tras todos los tratamientos llevados a cabo desde los 36 días de vida (tratamientos postpuberales) los niveles de las ratas de los grupos *GMS* (*GMS*, *GMS-GHRH* y *GMS-GHRH+SS*) aparecen ligeramente disminuidos respecto a los grupos *control* (*Control*, *Control-GHRH* y *Control-GHRH+SS*), estas diferencias no fueron significativas.

Ninguno de los tratamientos postpuberales indujo variaciones ni en las ratas de los grupos tratados neonatalmente con *GMS* ni en las ratas de los grupos que recibieron inyecciones neonatales de salino.

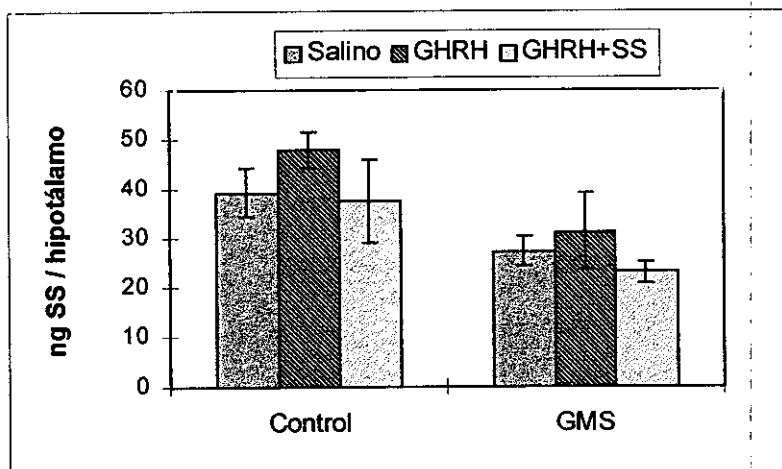


Figura 38. Contenido de SS en los hipotálamos extraídos en el momento de la decapitación, tras 3 semanas de tratamiento.

5.2. PESO DE LAS HIPÓFISIS.

Al analizar estadísticamente este parámetro (mg hipófisis/100 g peso corporal) se obtuvo interacción significativa ($p < 0.05$) entre los dos factores estudiados: tratamiento neonatal (*Salino*, *GMS*) y tipo de tratamiento postpuberal (*Salino*, *GHRH* y *GHRH+SS*).

Todas las ratas tratadas neonatalmente con *GMS* presentaron un peso de las hipófisis significativamente menor ($p < 0.001$) que sus correspondientes animales de los grupos *control*. Ninguno de los tratamientos llevados a cabo provocó

diferencias significativas ni en los animales control ni en los tratados neonatalmente con GMS. Todo esto aparece representado en la figura 39.

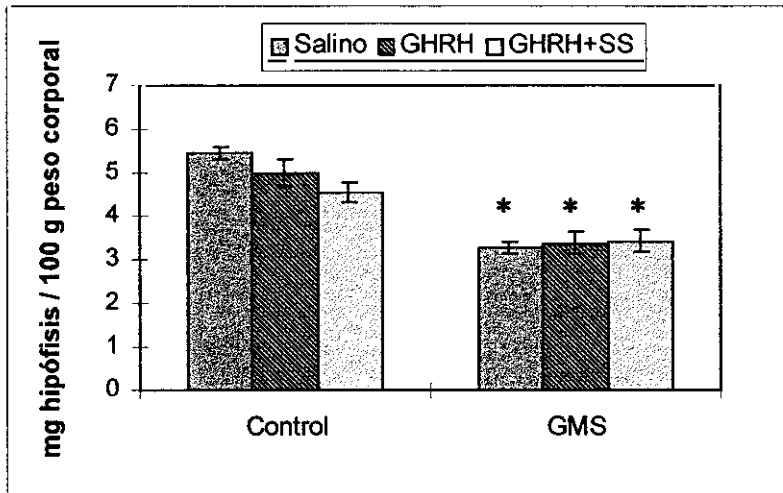


Figura 39. Peso de las hipófisis en cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.01$ vs respectivo grupo control.

5.3. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.

En la figura 40a se muestra el contenido total de GH en la hipófisis (a) y la concentración hipofisaria de GH/mg proteína (b) al final del experimento. Tras analizar ambos parámetros se obtuvo interacción significativa ($p < 0.05$) entre el tratamiento neonatal y el tratamiento postpuberal.

En lo que se refiere al contenido total de GH en las hipófisis, éste fue significativamente menor ($p < 0.05$) en todos los grupos de *ratas GMS* respecto a sus correspondientes *grupos control* (figura 40a). Por otro lado, como podemos ver en la figura 40b, únicamente el tratamiento con GHRH de forma continua produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) de la concentración hipofisaria de GH/mg proteína en las *ratas control* respecto a su correspondiente grupo de ratas tratadas con GMS.

Ninguno de los tratamientos efectuados postpuberalmente alteró este parámetro en ninguno de los grupos, aunque el tratamiento diario con GHRH tendió a aumentarlo en los animales Control-GHRH.

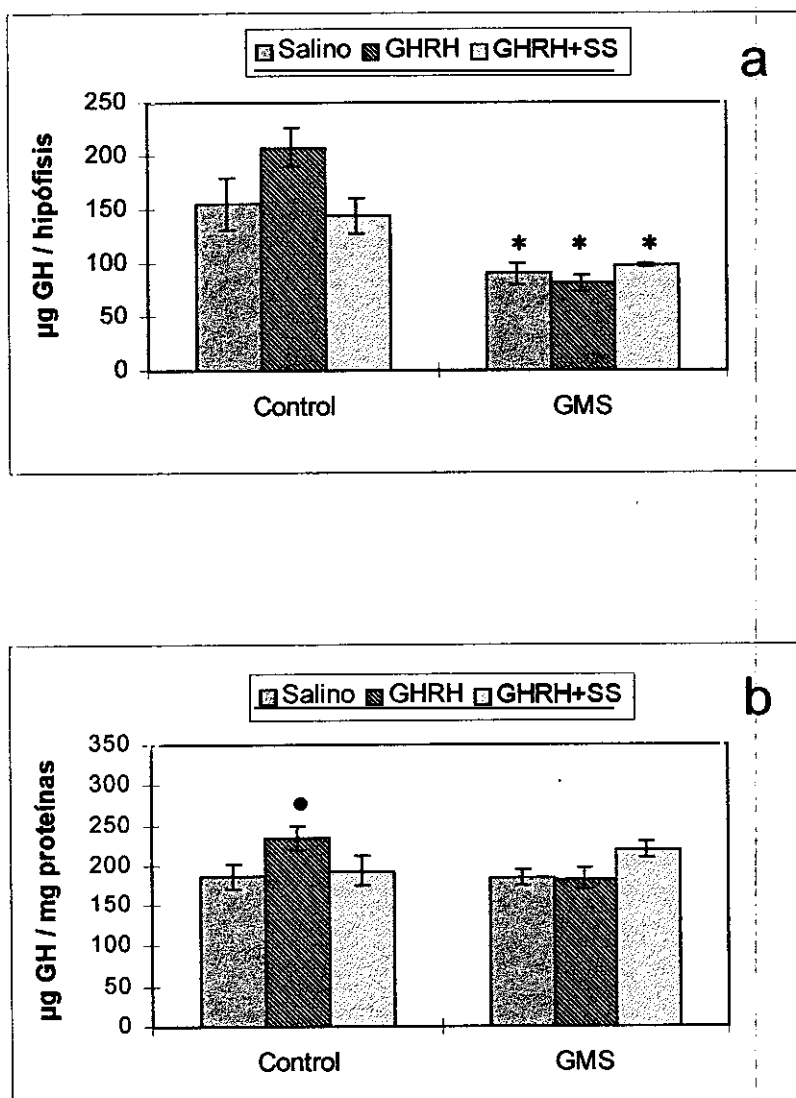


Figura 40. Contenido hipofisario total (a) y Concentración hipofisaria de GH/mg proteína (b) al final del tratamiento. * $p < 0.05$ vs respectivo grupo control, • $p < 0.05$ vs grupo GMS-GHRH.

5.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH TRAS LA PRUEBA DE ESTÍMULO CON GHRH.

En la figura 41 se representan los niveles de GH plasmática alcanzados tras la inyección de GHRH en los animales de los *grupos control* (a) y *GMS* (b).

Ninguno de los *grupos control* aumentó significativamente sus niveles a los 5 minutos de inyectado el estímulo respecto al nivel plasmático basal. Dentro de los *animales* *GMS*, únicamente el que no recibió ningún tratamiento postpuberal (grupo *GMS*) respondió significativamente al estímulo.

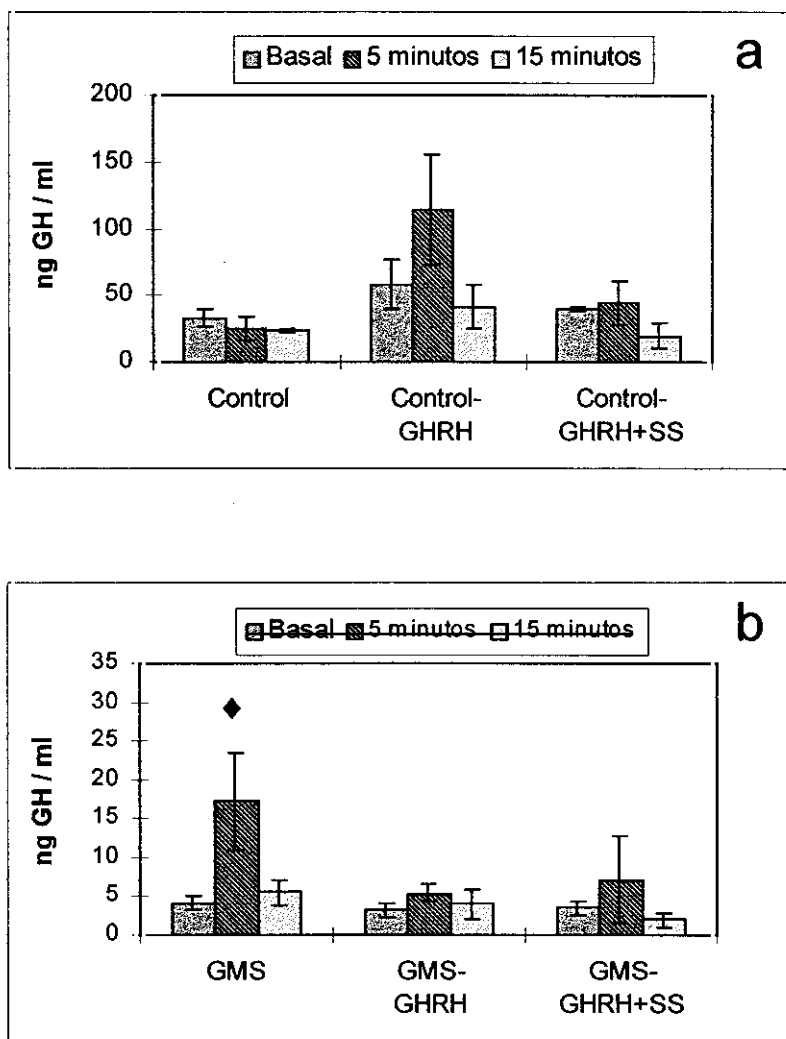


Figura 41. Niveles plasmáticos de GH basales y tras estimulación aguda con GHRH en los *grupos control* (a) y *GMS* (b). ◆ $p < 0.05$ vs respectivo basal.

5.5. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH TRAS EL SACRIFICIO.

Existió interacción significativa ($p < 0.05$) entre los factores tratamiento neonatal y el tipo de tratamiento postpuberal.

Dentro de las ratas de los *grupos control*, el tratamiento con GHRH produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) de este parámetro, respecto a los otros dos grupos. Todos los animales de los *grupos GMS* mostraron niveles similares de GH en plasma (figura 42).

Las ratas GMS tratadas con GHRH o GHRH+SS presentaron niveles plasmáticos de GH significativamente menores ($p < 0.05$) que sus respectivos animales de los *grupos control* al final del experimento. Aunque los valores del grupo GMS fueron menores que los del grupo Control, esta diferencia no fue significativa.

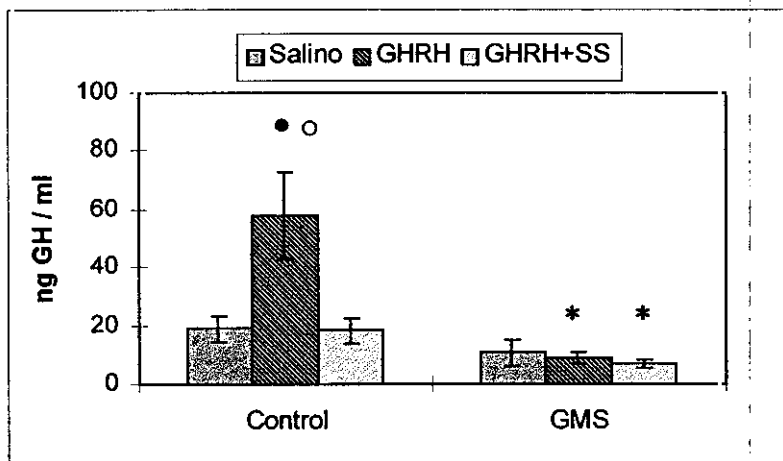


Figura 42. Niveles de GH en el plasma obtenido en el momento del sacrificio. * $p < 0.05$ vs respectivos animales de los *grupos control*. • $p < 0.05$ vs grupo Control-Salino, ○ $p < 0.05$ vs grupo Control-GHRH+SS.

5.6. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF- I.

Si bien el tratamiento neonatal con GMS provocó un descenso significativo ($p < 0.001$) en los niveles plasmáticos de IGF-I respecto a los animales de los *grupos control*, ninguno de los tratamientos postpuberales produjo diferencias significativas dentro de los *grupos control* y *GMS* (figura 43).

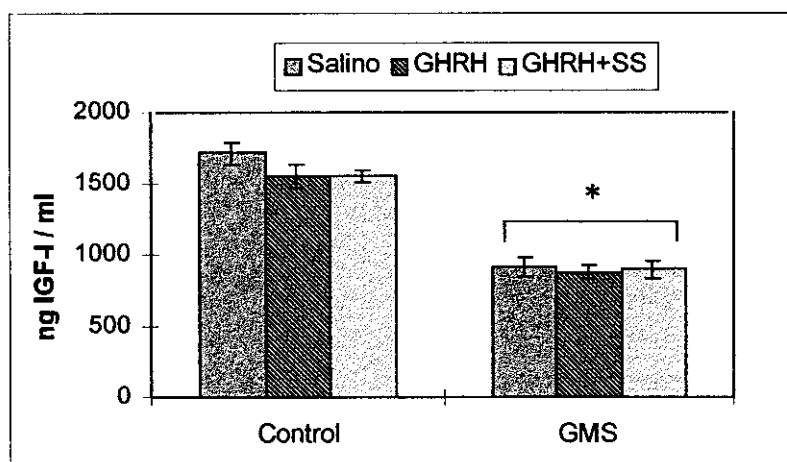


Figura 43. Niveles plasmáticos de IGF-I en los diferentes grupos al final del período de estudio. * $p < 0.001$ vs animales de los *grupos control*.

5.7. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.

Como se aprecia en la figura 44, que muestra el peso corporal diario desde los 36 días (inicio del tratamiento) hasta los 56 días de edad (final del mismo), los animales tratados neonatalmente con GMS presentaron un peso corporal significativamente menor ($p < 0.001$) que las ratas de los *grupos control*, durante todo el experimento, aunque en ninguno de los casos hubo diferencias entre los distintos tratamientos.

Para el estudio del incremento de peso corporal en este experimento, se compararon los valores de este parámetro en los diferentes grupos a la semana y al final del tratamiento después de tres semanas. En lo que se refiere a los incrementos de peso en la primera semana y tras todo el experimento, todos los animales tratados neonatalmente con GMS presentaron en ambos casos unos valores significativamente menores ($p < 0.001$) que los de las ratas de los *grupos control*. Los tres *grupos control* mostraron valores parecidos en los dos períodos estudiados. Asimismo, ninguno de los tratamientos indujo diferencias dentro de los *grupos GMS* tras una o tres semanas de tratamiento (tabla 10).

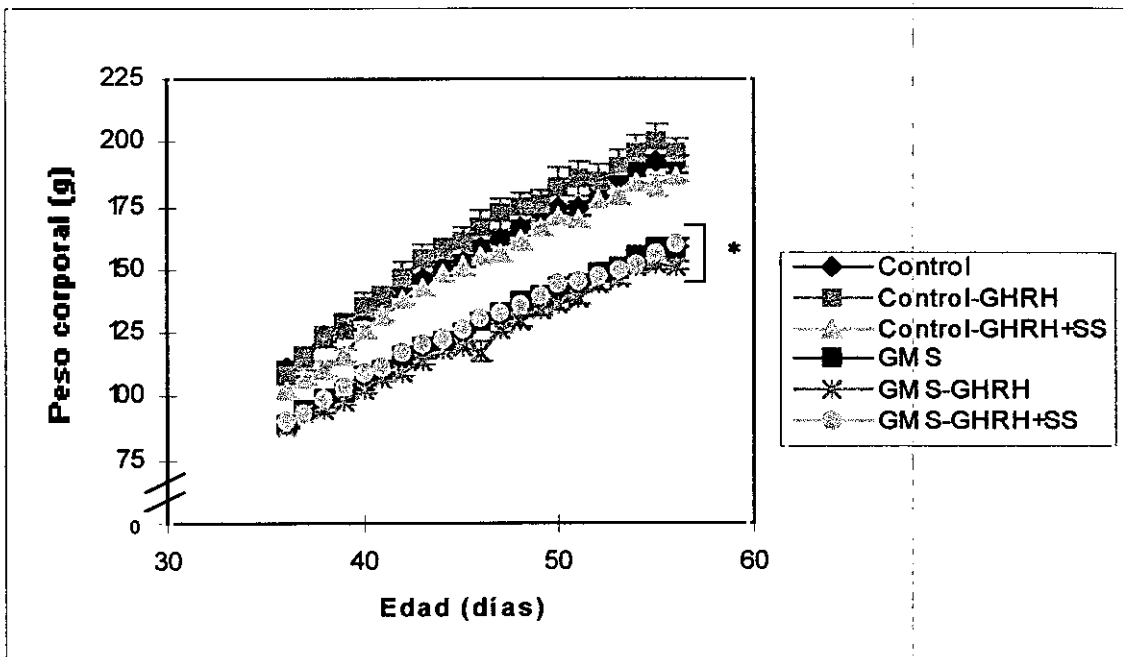


Figura 44. Evolución del peso corporal durante 3 semanas de tratamiento con diferentes pautas de GHRH solo o junto con SS. * $p < 0.001$ vs animales de los grupos control.

Incremento peso (g)	1 semana	3 semanas
Control	31.4 ± 1.3	80.0 ± 1.8
Control-GHRH	38.0 ± 3.3	87.3 ± 3.4
Control-GHRH+SS	36.6 ± 2.3	84.8 ± 3.9
GMS	25.2 ± 2	68.2 ± 3.9
GMS-GHRH	22.1 ± 1.7	63.7 ± 2.0
GMS-GHRH+SS	27.2 ± 1.8	70.0 ± 2.3

Tabla 10. Incremento del peso corporal tras 1 y 3 semanas de tratamiento. * $p < 0.001$ vs animales de los grupos control.

5.8. EVOLUCIÓN DE LA LONGITUD TIBIAL.

La figura 45 muestra la evolución diaria de la longitud tibial. Como puede verse, el tratamiento neonatal con *GMS* redujo de forma significativa ($p < 0.001$) la longitud de la tibia. Esta circunstancia se manifestó claramente desde el inicio del tratamiento y se mantuvo durante todo el período de estudio. Ninguno de los tratamientos llevados a cabo a partir de los 36 días de edad provocó diferencias ni entre los *grupos control* ni entre las ratas de los *grupos GSM*.

En la tabla 10 aparecen los incrementos de longitud a la semana y a las 3 semanas de iniciados los estudios. En ambos períodos se observó que las ratas de los *grupos GSM* presentaban un incremento de longitud significativamente menor ($p < 0.01$) que las *ratas control*. No aparecieron diferencias como consecuencia de los tratamientos postpuberales en los distintos grupos de las *ratas control*. Igualmente, todos los grupos de ratas tratadas neonatalmente con *GMS* se comportaron de la misma forma (tabla 11).

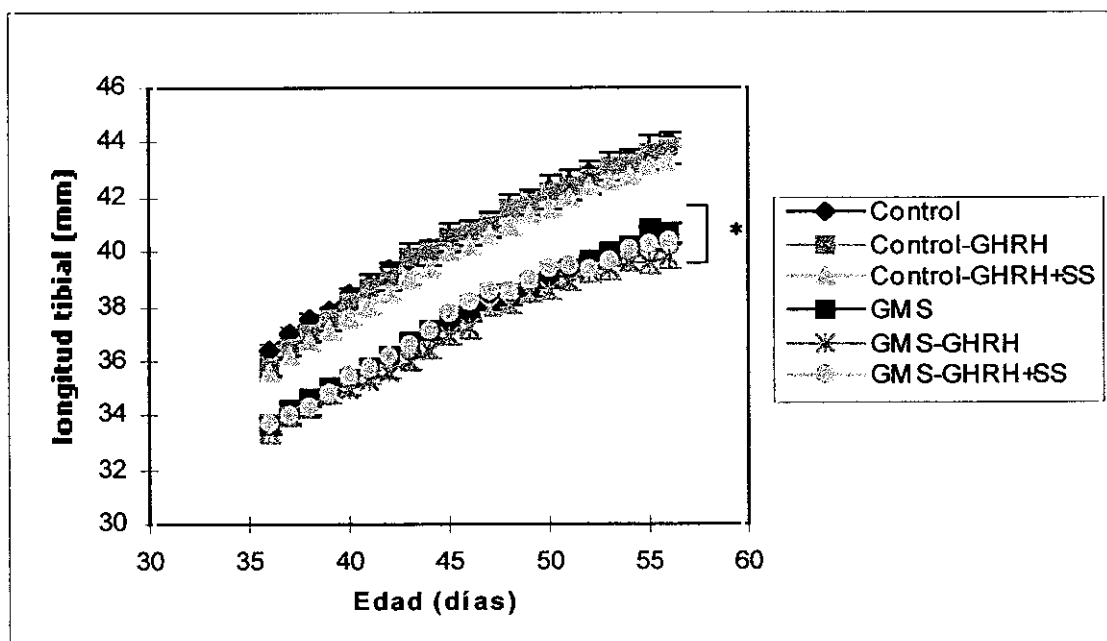


Figura 45. Evolución de la longitud tibial desde los 36 hasta los 56 días de vida. * $p < 0.001$ vs animales de los *grupos control*.

Incremento longitud (mm)	1 semana		3 semanas	
Control	3.02 ± 0.18		7.54 ± 0.13	
Control-GHRH	3.30 ± 0.32		8.02 ± 0.41	
Control-GHRH+SS	2.98 ± 0.13		7.81 ± 0.14	
GMS	2.60 ± 0.15]	7.07 ± 0.21	
GMS-GHRH	2.27 ± 0.21		*	6.41 ± 0.31
GMS-GHRH+ SS	2.52 ± 0.24			6.71 ± 0.18

Tabla 11. Incremento de longitud tibial después de 1 y 3 semanas de tratamiento. * $p < 0.01$ vs animales de los grupos control.

6. EXPERIMENTO 6: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH Y SS A LARGO PLAZO EN CORDEROS.

6.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GHRH.

Los niveles de GHRH en el hipotálamo se expresaron en forma de ng GHRH/mg proteína para minimizar el efecto de la heterogeneidad en el tamaño de las muestras.

Aunque ninguno de los tratamientos modificó significativamente sus valores respecto al grupo Control, todos los grupos tratados únicamente con GHRH presentaron una clara tendencia a aumentar el contenido hipotalámico de GHRH (figura 46).

6.2. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.

De forma similar a lo visto en los niveles de GHRH en el hipotálamo, y por la misma razón anteriormente expuesta, el contenido hipotalámico aparece expresado como ng SS / mg proteína.

Como puede apreciarse en la figura 47, el grupo Pellet GHRH presentó los niveles más altos, significativamente mayores ($p < 0.05$) que los de los grupos Control y Pellet GHRH+SS. Los animales del grupo Inyección GHRH mostraron un contenido hipotalámico de SS significativamente mayor ($p < 0.05$) que los del grupo Inyecciones GHRH+SS.

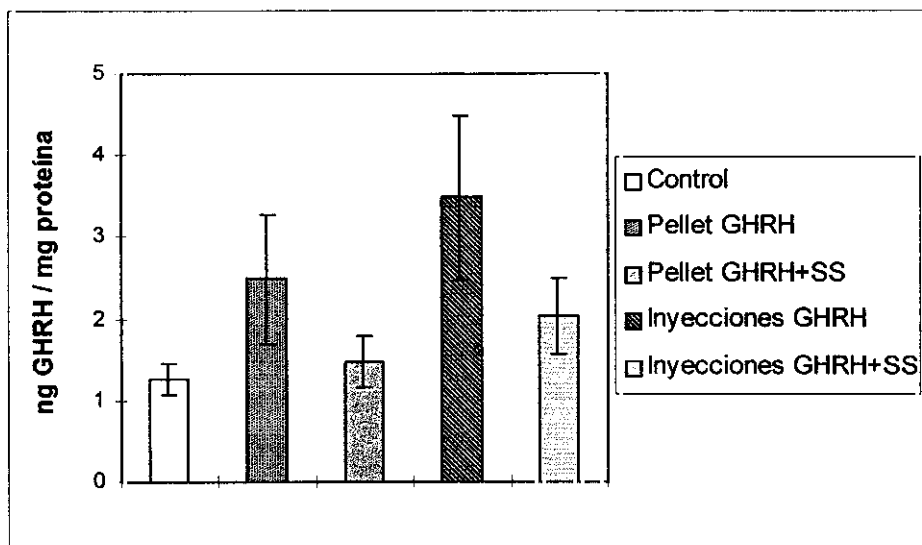


Figura 46. Contenido de GHRH en los hipotálamos extraídos al final del estudio, tras 19 días de tratamiento.

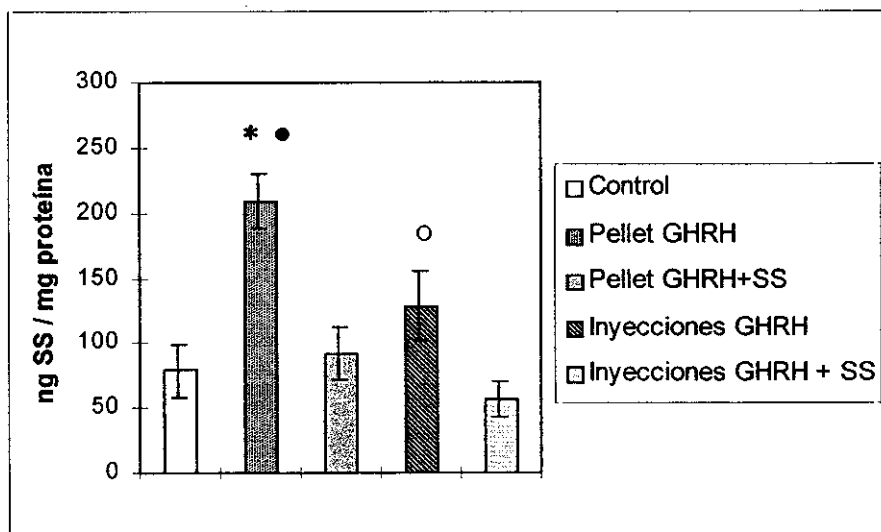


Figura 47. Niveles hipotalámicos de SS en cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.05$ vs grupo Control, • $p < 0.05$ vs grupo Pellet GHRH+SS, O $p < 0.05$ vs grupo Inyecciones GHRH+SS.

6.3. NIVELES HIPOFISARIOS DE GH.

La valoración de los niveles de GH en las hipófisis de los corderos se hizo de la misma forma que en el caso de las ratas, analizando el contenido total de GH y la concentración hipofisaria de ésta respecto al contenido de proteínas.

Ninguno de estos dos parámetros se vió alterado tras los diferentes tratamientos después de las 3 semanas de experimentación (figura 48).

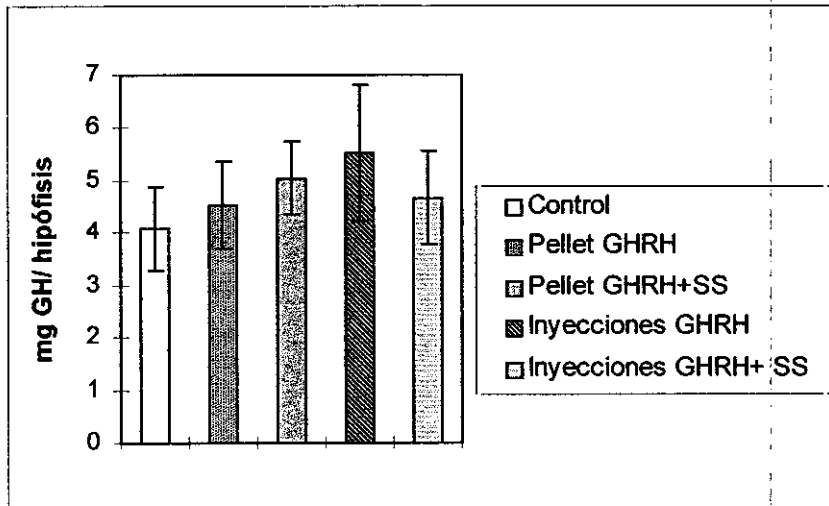


Figura 48. Contenido de GH en las hipófisis de los corderos, extraídas al final del período de tratamiento.

6.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH TRAS LA ESTIMULACIÓN AGUDA CON GHRH.

Desde la primera semana de estudio, los dos grupos de animales tratados con inyecciones de GHRH presentaron niveles más altos de GH plasmática basal. Tras una semana de tratamiento, los valores de dicho parámetro en estos dos grupos fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que en el resto de los grupos. Estos dos grupos continuaron mostrando mayores niveles de GH plasmática en el resto del estudio, aunque a las 2 semanas sólo los del grupo Inyecciones GHRH+SS fueron superiores significativamente ($p < 0.05$) que los de los demás animales y a las 3 semanas los del grupo Inyecciones GHRH (figura 49).

En la figura 50 aparecen los niveles plasmáticos de GH basales y tras estimulación con GHRH, transcurridas 1, 2 y 3 semanas de tratamiento, en cada uno de los grupos estudiados.

Como podemos ver, los grupos Control, Pellet GHRH y Pellet GHRH+SS respondieron a la inyección de GHRH en los tres períodos de estudio, aumentando significativamente ($p < 0.05$) los valores a los 10, 20 y 30 minutos post-inyección respecto al nivel basal. Los animales tratados con inyecciones de GHRH sola o en combinación con SS no respondieron ni en la primera ni en la segunda semana de tratamiento, aunque ya al final del estudio, sí mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) de los niveles plasmáticos de GH tras el estímulo. No obstante, ambos grupos ya habían mostrado tendencia a aumentar los valores post-inyección en la segunda semana.

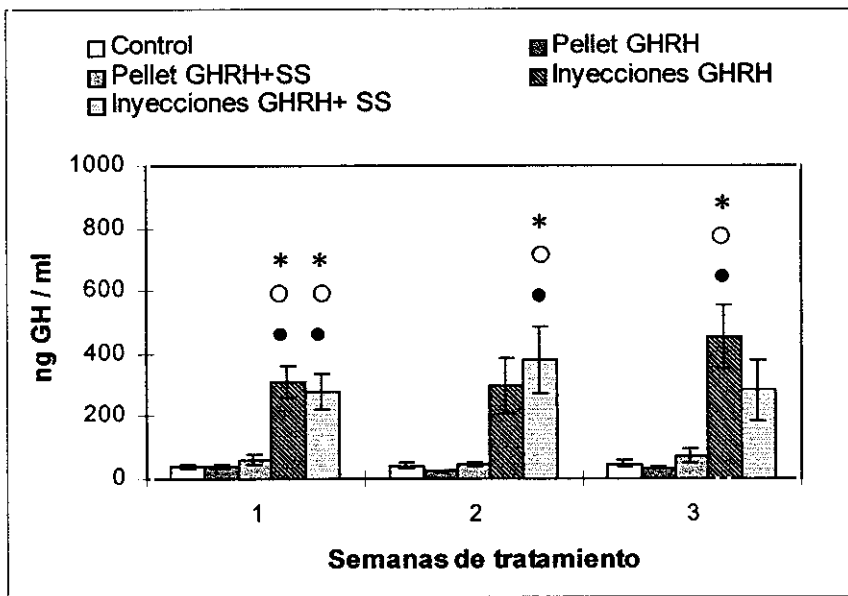


Figura 49. Niveles de GH en los plasmas extraídos basalmente, en cada uno de las pruebas de estímulo realizadas tras 1, 2 y 3 semanas de tratamiento. * $p < 0.05$ vs correspondiente grupo Control, O $p < 0.05$ vs correspondiente grupo Pellet GHRH, ● $p < 0.05$ vs correspondiente grupo Pellet GHRH+SS.

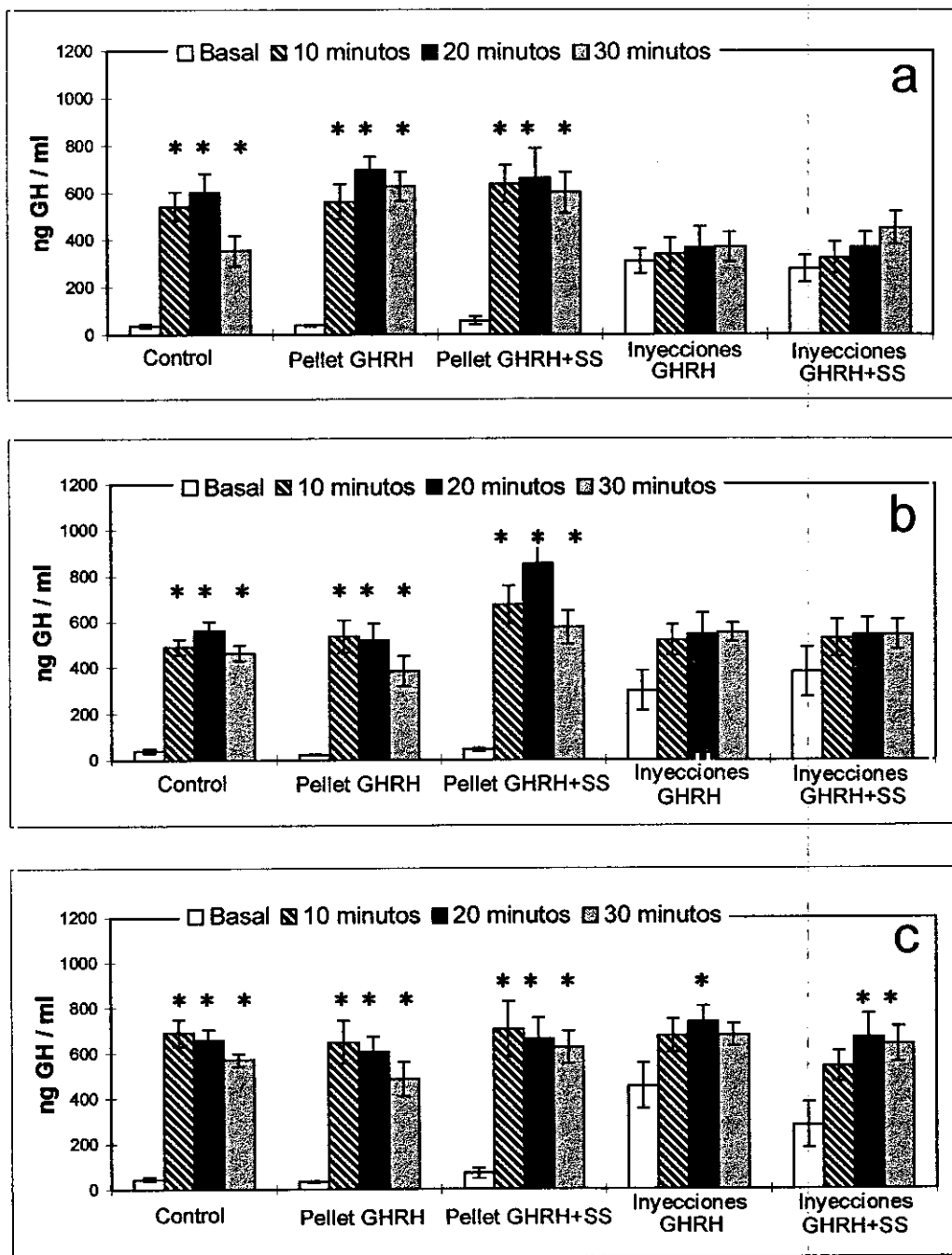


Figura 50. Niveles de GH en plasma basal y tras estimulación con GHRH, a los 10, 20 y 30 minutos de la inyección, en la primera (a), segunda (b) y tercera (c) semanas de tratamiento. * $p < 0.05$ vs correspondiente basal.

6.5. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF- I.

La figura 51 muestra los niveles de IGF-I en el plasma obtenido en la primera, segunda y tercera semanas de estudio, cuando se realizaron las extracciones basales para la posterior prueba de estímulo con GHRH.

Como podemos observar, no hubo variaciones significativas entre los distintos grupos en ninguno de los períodos estudiados.

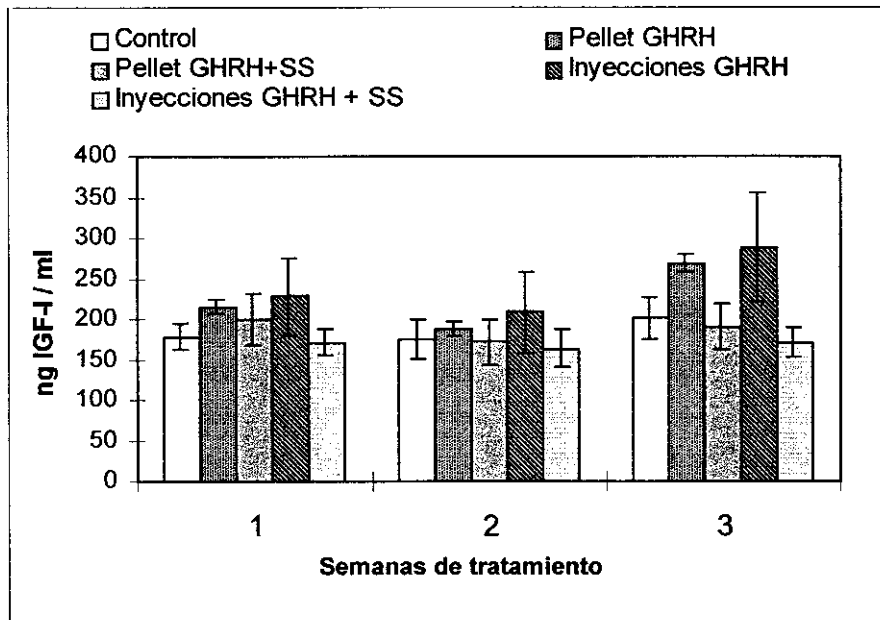


Figura 51. Niveles de IGF-I en los plasmas extraídos basalmente en cada una de las pruebas semanales de estímulo con GHRH.

6.6. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.

En la tabla 12 aparecen los valores de peso corporal inicial y final y el incremento de peso tras los 19 días de estudio, en cada uno de los grupos experimentales. Tanto el incremento de peso corporal como los valores finales alcanzados en este parámetro fueron similares en todos los animales.

	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Incremento peso (kg)
Control	15.3 ± 1.7	18.8 ± 2.1	3.50 ± 0.5
Pellet GHRH	14.7 ± 1.2	19.4 ± 1.6	4.74 ± 0.46
Pellet GHRH+SS	14.3 ± 1.1	17.3 ± 1.5	2.98 ± 0.45
Inyecciones GHRH	15.6 ± 1.9	19.2 ± 2	3.58 ± 0.31
Inyecciones GHRH+SS	15.7 ± 1.7	18.2 ± 2.5	2.46 ± 0.78

Tabla 12. Peso corporal e incremento de éste en cada uno de los grupos.

7. EXPERIMENTO 7: ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA DE GHRH A LARGO PLAZO MEDIANTE BOMBAS OSMÓTICAS EN CORDEROS.

7.1. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH TRAS ESTIMULACIÓN CON GHRH.

Como puede verse en la figura 52, ni el tratamiento con Bomba GHRH ni con Bomba GHRH+SS produjeron cambios significativos en los niveles de GH plasmática basal durante las 4 semanas de estudio, respecto al grupo Control.

Todos los grupos respondieron a la inyección de GHRH de la misma forma en las 4 pruebas realizadas, aumentando significativamente ($p < 0.05$) los niveles de GH plasmática. Asimismo, los niveles de GH alcanzados tras la inyección del estímulo en los grupos Bomba GHRH y Bomba GHRH+SS fueron siempre muy parecidos a los del grupo Control (figura 53).

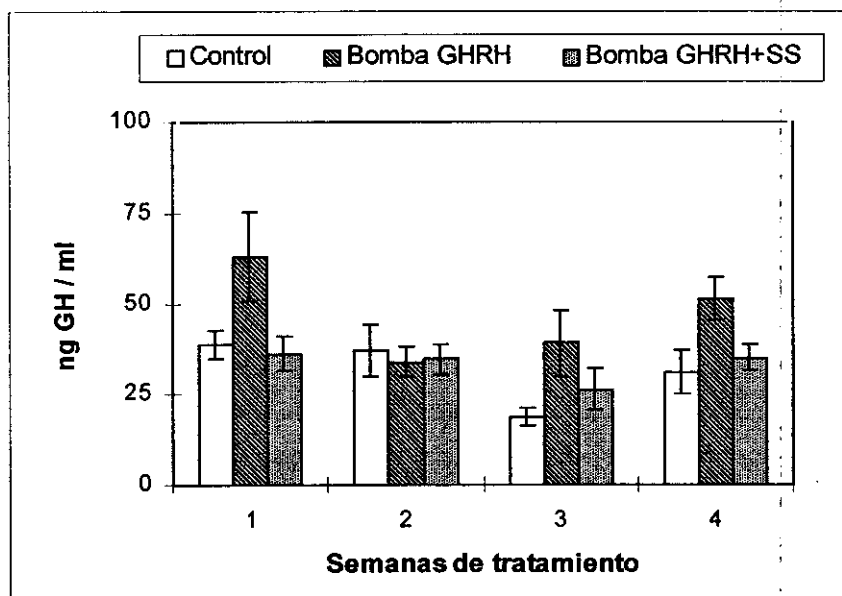
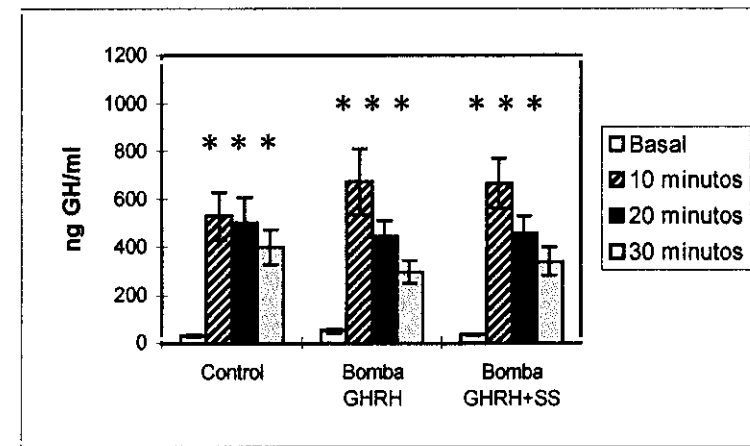
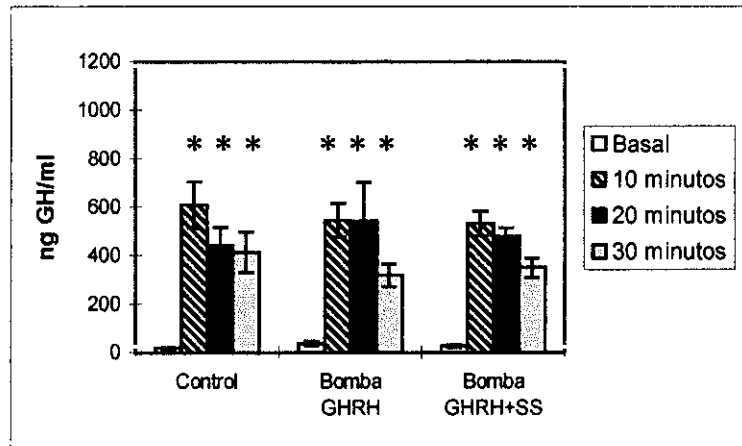
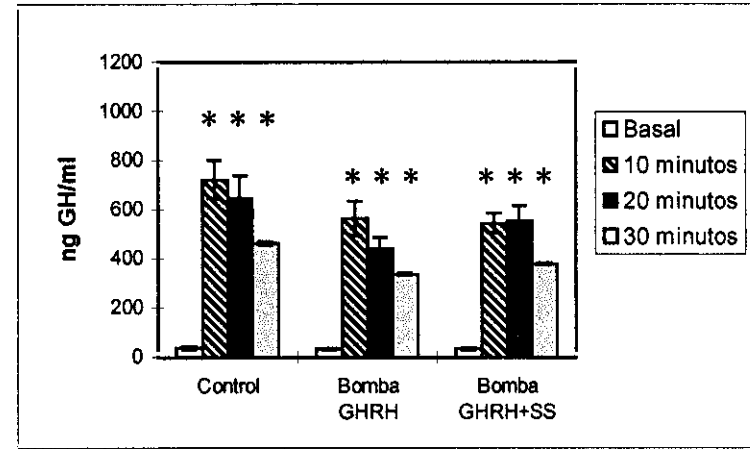
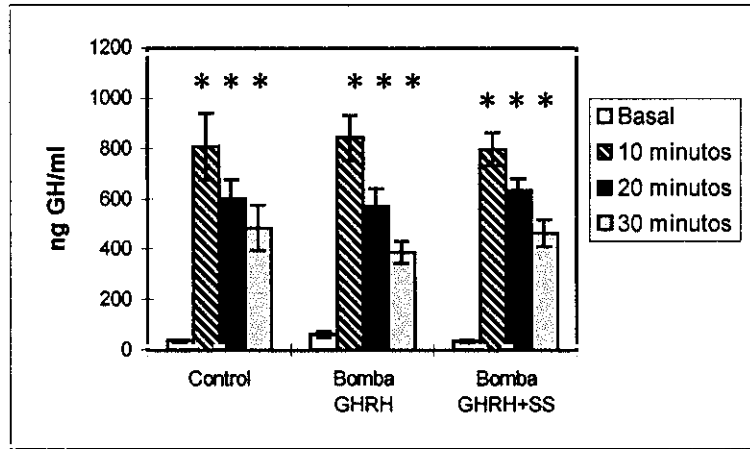


Figura 52. Niveles de GH plasmática basal en los tres grupos experimentales, en la primera, segunda, tercera y cuarta semanas de tratamiento.

Figura 53. Niveles de GH en los plasmas extraídos basalmente, y a los 10, 20 y 30 minutos tras la estimulación con GHRH en la primera (a), segunda (b), tercera (c) y cuarta (d) semanas de tratamiento. * $p < 0.05$ vs respectivo basal.



7.2. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.

En la figura 54 aparecen los niveles de IGF-I en los plasmas obtenidos basalmente en cada una de las pruebas de estímulo con GHRH.

No existieron diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de IGF-I en los grupos Bomba GHRH y Bomba GHRH+SS y los correspondientes del grupos Control en ninguna de las 4 semanas analizadas. Tanto el grupo Control como los dos grupos con bomba de GHRH mostraron valores similares durante todo el experimento.

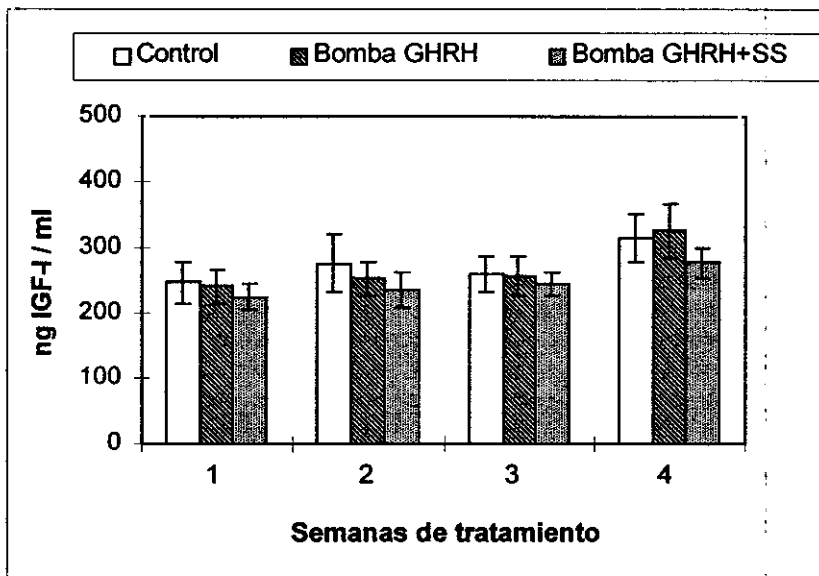


Figura 54. Niveles plasmáticos de IGF-I a lo largo del estudio.

7.3. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.

Como podemos ver en la tabla 13, tanto el peso al final del experimento como el incremento de peso corporal fue similar en los 3 grupos experimentales tras las 4 semanas de experimento.

	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	Incremento peso (kg)
Control	21.0 ± 1.02	27.8 ± 1.26	6.70 ± 0.42
Bomba GHRH	19.6 ± 1	25.2 ± 0.9	7.14 ± 0.5
Bomba GHRH+SS	22.1 ± 1.1	28.4 ± 1.4	5.65 ± 0.24

Tabla 13. Evolución del peso corporal durante las 4 semanas de tratamiento.

8. EXPERIMENTO 8: REGULACION DE LA SECRECIÓN DE GH POR GHRH EN TEJIDOS NO HIPOFISARIOS.

8.1. NIVELES PLASMÁTICOS DE GH.

No se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados con pellet de GHRH y los que llevaron pellet de placebo, después de los 2 meses de tratamiento (figura 55).

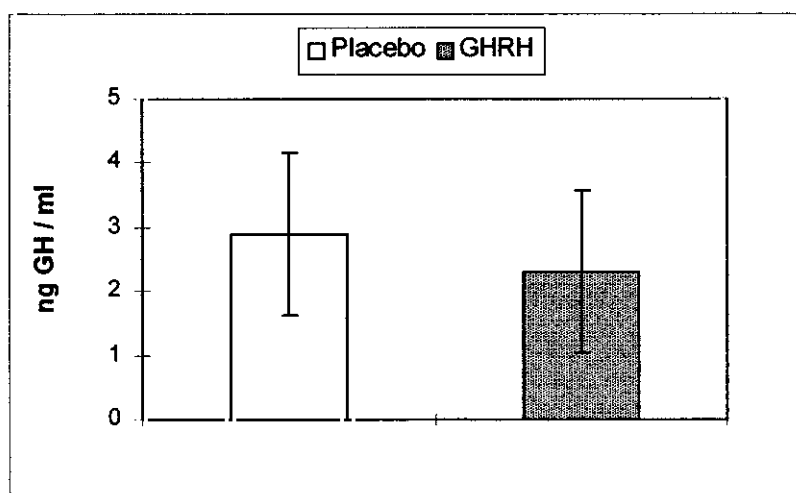


Figura 55. Niveles de GH en el plasma obtenido al final del experimento

8.2. PESO DE LAS GLÁNDULAS SUBMAXILARES.

El peso de los lóbulos de las diferentes glándulas submaxilares se expresó en mg tejido/100 g de peso corporal. El tratamiento con GHRH no provocó variaciones significativas en el peso de ninguno de los lóbulos, tanto en el que portaba el pellet (positivo) como en el contralateral (figura 56).

8.3. CONTENIDO DE GH EN LAS GLÁNDULAS SUBMAXILARES.

Los animales tratados con pellet de placebo presentaron contenidos muy bajos de GH tanto en la glándula que contenía el pellet como en la contralateral. Sin embargo, el tratamiento con el pellet de GHRH produjo un aumento en el contenido de GH en ambos lóbulos en el 60 % de los animales, aunque sólo se obtuvieron diferencias significativas en el lóbulo positivo (Figura 57).

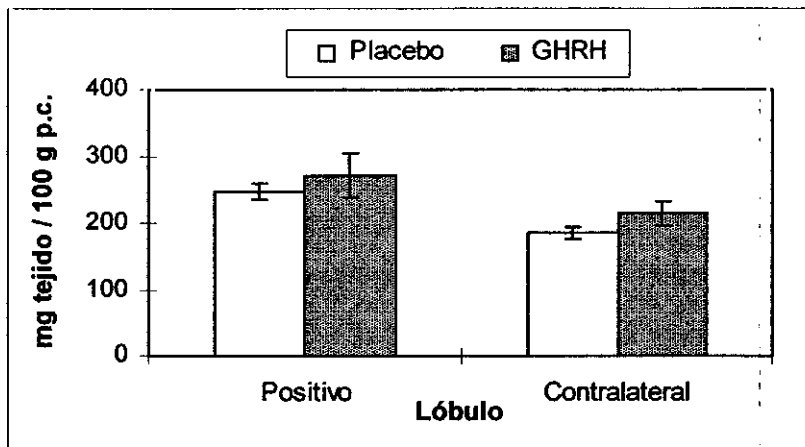


Figura 56. Peso de los lóbulos positivo y contralateral en las glándulas submaxilares tratadas con GHRH o placebo.

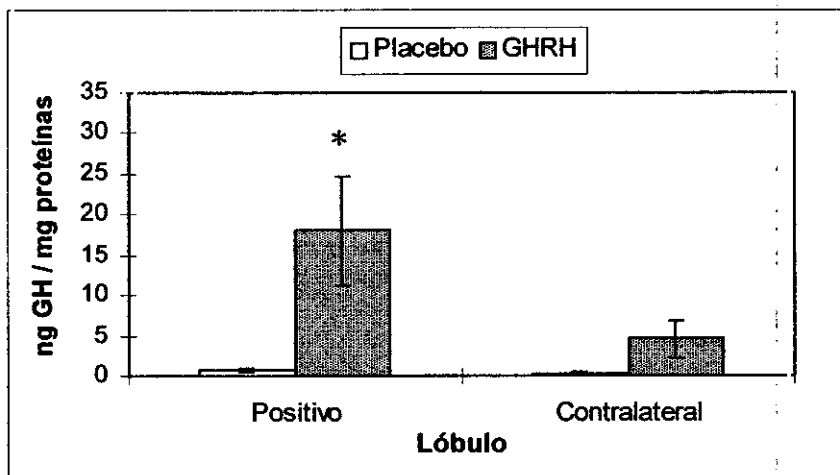


Figura 57. Concentración media de GH en ambos lóbulos de la glándula submaxilar, expresado como ng GH/mg proteína. * $p < 0.05$ vs Placebo.

8.4. EXPRESIÓN DEL GEN DE LA GH EN LAS GLÁNDULAS SUBMAXILARES.

En la figura 58 se representan los exones e intrones constituyentes del gen de la GH, y la localización en éste de los cebadores utilizados en la PCR.

Los resultados obtenidos por medidas hormonales fueron posteriormente corroborados por los estudios de Biología Molecular, ya que en los animales tratados con GHRH que presentaron altas concentraciones de GH en la glándula submaxilar se detectó la presencia de ARN de GH mediante RT-PCR (calles 3 y 4), obteniéndose una banda del mismo tamaño (473 pares de bases) que en la hipófisis (calle 2) pero de menor intensidad. Asimismo, dicha banda no se observó en los ratones con pellet de placebo (calles 5 y 6)(figura 59).

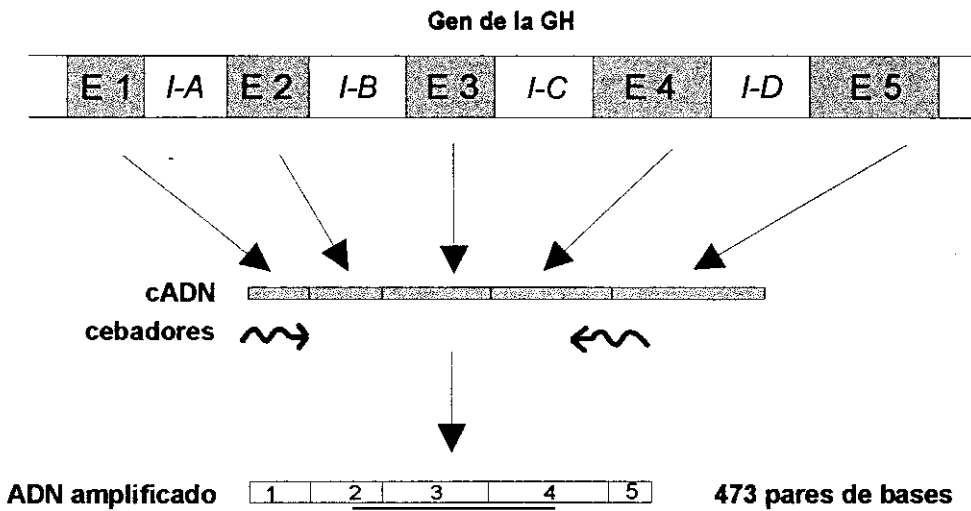


Figura 58. Representación esquemática del fragmento del genoma del ratón correspondiente al gen de la GH y localización de los cebadores empleados en la PCR. E 1, E 2, E 3, E 4 y E 5 son exones; IA, IB, IC, ID corresponden a los intrones. También aparecen el cADN formado tras la Transcripción inversa (RT) y el fragmento de ADN amplificado mediante PCR.

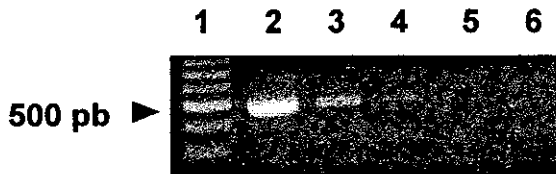


Figura 59. Electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR del gen de GH. Calle 1: Escalera de ADN, calle 2: hipófisis, calles 3 y 4: glándula submaxilar con pellet de GHRH, calles 5 y 6: glándula submaxilar con pellet de placebo. En la escalera de ADN se señala la banda correspondiente a 500 pares de bases (pb), el resto de las bandas difieren en 100 pb.

V. DISCUSIÓN

1. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH EN LA RATA MACHO.

1.1. ESTUDIOS EN LA RATA MACHO NORMAL.

1.1.1. Contenido hipotalámico de GHRH y de SS.

En el primer experimento, llevado a cabo en la rata macho normal, ninguna de las pautas de administración de GHRH alteró significativamente los contenidos hipotalámicos de GHRH o de SS.

Estudios realizados administrando GHRH de forma i.c.v. en ratas machos normales sugieren que para que este péptido produzca alteraciones en el contenido hipotalámico de GHRH o de SS mediante mecanismos de retroalimentación de asa ultracorta, debe encontrarse en dosis altas (mg) (Tannenbaum 1984) en zonas muy próximas a las neuronas productoras de GHRH y SS (Lumpkin y cols 1985). Así en nuestro estudio en la rata macho normal, la administración de GHRH "per se" no alteró la dinámica de síntesis-secreción de GHRH ni de SS, posiblemente debido a que no se consiguió una concentración adecuada de GHRH a nivel de las neuronas productoras de ambos péptidos.

Katakami y cols (1984), Lanzi y Tannenbaum (1992) y Brain y cols (1993) proponen que tras la estimulación de la liberación de GH, únicamente se producen cambios en los contenidos hipotalámicos de GHRH y de SS cuando la elevación de la GH plasmática es tal que sobrepasa los valores fisiológicos máximos. Por otro lado, Clark y cols (1988b) sugieren la necesidad de niveles elevados de GH durante largo tiempo para lograr una supresión efectiva de la liberación de GH hipofisaria mediante mecanismos de retroalimentación de asa corta. Por esto, la ausencia de modificaciones en el contenido de GHRH y SS en el hipotálamo de las ratas tratadas con GHRH en presencia de unos niveles plasmáticos aumentados de GH al final de nuestro experimento, como a continuación veremos, sugiere que este incremento no superó los niveles que alcanza la secreción espontánea de GH en la rata macho, o no se mantuvo el tiempo suficiente para provocar alteraciones en los mecanismos de retroalimentación existentes en el animal en condiciones basales.

En relación con este hecho, hay datos que muestran la existencia de una disminución del contenido hipotalámico de GHRH y aumento del de SS tan sólo en situaciones en las que la GH circulante está aumentada hasta niveles suprafisiológicos durante largos períodos de tiempo, como tras infusión de altas dosis de GH (Berelowitz y cols 1981, Leidy y cols 1990), o existencia de tumores hipersecretorios de GH (Maiter y cols 1990).

No obstante, un aumento de síntesis de GHRH y de SS compensado con un incremento en la tasa de liberación de estos péptidos también explicaría un contenido hipotalámico de GHRH y de SS similar al del animal control.

1.1.2. Contenido hipofisario y niveles circulantes de GH.

La administración de GHRH tanto de forma continua como pulsátil activó la secreción de GH, ya que en todos los casos se produjo un incremento en los niveles circulantes de GH. Este mismo efecto ha sido observado por otros autores tratando a ratas machos de la misma edad que las nuestras con inyecciones de GHRH (Dubreuil y cols 1994) o con un análogo muy potente de GHRH denominado A-515 (Kovacs y cols 1994). El tratamiento de forma continua mediante bomba osmótica parece ser el más efectivo en cuanto a estimular la liberación de GH, posiblemente debido a que de esta forma la dosis administrada diariamente fue mayor (400 μg continuo vs 200 μg pulsátil). Así, podríamos decir que el estímulo de la GHRH sobre la secreción de GH fue dosis-dependiente, de acuerdo a lo sugerido también por otros autores (Wehrenberg y cols 1984a, Arsenijevic y cols 1987 y Dubreuil y cols 1994).

La existencia de unos niveles plasmáticos aumentados de GH sin descenso marcado en el contenido hipofisario de esta hormona al cabo de 7 días de tratamiento con GHRH, sugiere también una acción positiva de la GHRH administrada sobre la síntesis hipofisaria de GH, en consonancia con lo observado por Dubreuil y cols (1994) y Hu y cols (1993).

Tal y como comentábamos en la introducción, diversos trabajos describen tanto atenuación como aumento de la respuesta de GH a la administración de GHRH a largo plazo. En nuestro estudio, los animales mantuvieron la respuesta a dicho péptido hipotalámico durante todo el período de observación como lo muestran los niveles plasmáticos elevados de GH al final del mismo, esto es, no hubo desensibilización de las células hipofisarias a la administración diaria de 200-400 μg de GHRH durante una semana. Esto podría explicarse porque tanto la administración continua de GHRH como la pulsátil actuaron positivamente sobre la síntesis y secreción de GH, como vimos anteriormente, creándose un nuevo equilibrio entre ambos procesos en la hipófisis mediante adaptación de ésta al nuevo ambiente hormonal producido por el tratamiento con GHRH. Tampoco Dubreuil y cols (1994) observaron desensibilización ante la estimulación prolongada con GHRH en ratas machos, a expensas de una acción positiva de la GHRH sobre la síntesis y secreción de GH.

En la adaptación hipofisaria a largo plazo de la que hablamos podría intervenir la SS, impidiendo el vaciamiento de la hipófisis tal y como otros autores han sugerido (Robinson y Clark 1987, Richardson y Twente 1988, Sato y cols 1988 y 1989). Tanto la presencia de un contenido hipotalámico de SS similar al de las ratas controles al final del tratamiento con GHRH como los trabajos in vitro de Soya y Suzuki (1988) y Clayton y Bailey (1987), que muestran como la SS revierte la desensibilización de las células somatotropas inducida por la GHRH, apoyan esta hipótesis.

Existen estudios como los de Robinson y Clark (1987) y Bilezikjian y cols (1986) en los que se propone que la atenuación de la respuesta a GHRH observada tras 24 h de estimulación con este péptido es un fenómeno transitorio del que el animal puede sobreponerse a largo plazo, apoyando la ausencia de desensibilización a largo plazo.

1.1.3. Niveles plasmáticos de IGF-I.

La elevación de los niveles plasmáticos de GH no se vió reflejada en una modificación en los niveles circulantes de IGF-I, tal y como podría esperarse considerando que la producción de IGF-I en los tejidos es dependiente de GH. Existen varios trabajos que también ponen de manifiesto esta discordancia entre los niveles plasmáticos de ambas hormonas. Así, Robinson y Clark (1987) y Domené y cols (1993) tratando a ratas machos con distintas pautas tanto de GH como de GHRH tampoco observaron modificaciones en los niveles plasmáticos de IGF-I cuando se habían producido cambios drásticos en los niveles circulantes de GH.

Esta circunstancia podría tener varias explicaciones. En primer lugar, la ausencia de cambios en los niveles circulantes de IGF-I no implica que los contenidos tisulares de esta hormona permanezcan también invariables (Orlowski y Chemaussek 1988). Así, un balance entre la tasa de secreción y la de aclaramiento de IGF-I reflejaría unos niveles plasmáticos de IGF-I similares a los del animal control.

Por otro lado, Kovacs y cols (1996b) indican que la secreción de IGF-I es más dependiente del patrón pulsátil de GH que de los niveles medios de GH en plasma. Así, posiblemente en nuestro estudio, aunque los niveles circulantes de GH aumentaron no se produjeron cambios en la pulsatilidad de esta hormona, con lo que no aparecieron variaciones en los niveles plasmáticos de IGF-I. Además, todos estos datos fueron obtenidos en ratas machos durante la etapa puberal, en la que tiene lugar un aumento de los niveles plasmáticos de IGF-I (pico puberal) (Handelsman y cols 1987) que posiblemente no pudo ser potenciado por la administración de GHRH según nuestras pautas.

1.1.4. Peso corporal.

No se produjeron cambios apreciables en el incremento de peso corporal tras 7 días de tratamiento con GHRH, corroborando las escasas alteraciones provocadas en todo el eje somatotropo.

Kovacs y cols (1996b) y Gevers y cols (1996) proponen que el crecimiento corporal y los niveles circulantes de IGF-I dependen más de la pulsatilidad de la GH que de los niveles plasmáticos medios de esta hormona. Según esto y considerando la relación existente entre el peso corporal y los niveles de IGF-I en plasma, podríamos decir que tras el tratamiento con GHRH probablemente no se consiguió alterar el patrón de secreción pulsátil de GH ni aumentar el peso corporal en la rata macho normal, tal y como proponíamos en el apartado anterior.

Nuestros resultados estarían de acuerdo con los trabajos de Wehrenberg (1986) y Dubreuil y cols (1994). En este último, ni aún prolongando el tratamiento con GHRH durante 2 semanas se obtuvo un incremento en el peso corporal. Por otro lado, los trabajos de Kovacs y cols administrando diferentes análogos de GHRH en ratas machos normales son contradictorios a este respecto: el tratamiento con el análogo de GHRH A-515 durante dos semanas produjo una ganancia significativa de peso (Kovacs y cols 1994), mientras que la administración de otro análogo de GHRH, el JI-38, durante el mismo tiempo no produjo tal efecto (Kovacs y cols 1996a). Una mayor afinidad por el receptor de GHRH y también mayor resistencia a la degradación en el caso del análogo A-515 comparado con el GHRH 1-29 administrado por nosotros podrían explicar estos resultados (Izdebski y cols 1995).

La ausencia de alteraciones en el eje somatotropo de la rata macho normal tras la administración de GHRH durante una semana podría justificarse tanto por la brevedad del período de tratamiento como por la utilización de una dosis de GHRH no muy alta. Sin embargo, en diversos trabajos de nuestro grupo (Tresguerres y cols 1994 y 1995, Pérez-Romero y cols 1995), y de otros (Rogers y cols 1988) administrando dosis suprafisiológicas de GH a largo plazo en ratas machos en la etapa puberal, tampoco se logró potenciación alguna del crecimiento. Todo esto parece indicar que en este período el crecimiento en la rata macho normal es máximo y el funcionamiento del eje somatotropo no puede ser aumentado de forma significativa con GH o GHRH. De acuerdo con esta teoría, Maiter y cols (1990) describen un incremento del peso corporal en ratas machos con tumores secretores de GH pero únicamente en ratas adultas (100 días de vida).

1.2. ESTUDIOS EN LA RATA MACHO DEFICITARIA EN GH.

Tras los datos poco concluyentes obtenidos en la rata macho normal tras la administración de GHRH durante una semana, para el segundo experimento se utilizaron ratas del mismo sexo deficitarias en GH por tratamiento neonatal con GMS (ratas GMS).

La administración neonatal de este fármaco provocó una disminución significativa del contenido hipofisario de GH, de los niveles plasmáticos de GH e IGF-I y del peso corporal. Estas alteraciones también han sido descritas por otros autores en este modelo animal deficitario en GH (Redding y cols 1971, Bakke y cols 1978, Millard y cols 1982, Katakami y cols 1984, Slama y cols 1993). Por otro lado, el contenido hipotalámico de SS y la concentración hipofisaria de GH por mg de proteína no fueron significativamente diferentes a los de los animales controles.

Toda esta serie de cambios en el eje somatotropo tras la administración de GMS en la etapa neonatal son consecuencia de la destrucción de las neuronas GHRH-érgicas del núcleo arcuato, lo que provoca un descenso drástico tanto del contenido hipotalámico de GHRH como de los niveles circulantes de dicha hormona en la proximidad de las células somatotropas, disminuyendo así la estimulación de la síntesis y secreción de GH en la hipófisis.

1.2.1. Contenido hipotalámico de SS.

Existen datos contradictorios en cuanto al contenido de SS en el hipotálamo de ratas tratadas con GMS. Terry y cols (1981) describen reducción de la concentración de SS en el hipotálamo mediobasal, pero no en el área preóptica. Nuestros datos, por el contrario, están más de acuerdo con los obtenidos por Nemeroff y cols (1977), Corder y cols (1990), Maiter y cols (1991) y Arce y cols (1995), que no obtuvieron diferencias en este parámetro entre los animales GMS y los normales. La ausencia de daños producidos por el GMS sobre las neuronas productoras de SS tanto en el núcleo arcuato (Bloch y cols 1984) como en el núcleo periventricular (Slama y cols 1993), en la que se encuentra la mayor concentración de neuronas somatostatinérgicas, apoyarían nuestras observaciones.

Al igual que en el caso de la rata macho normal, en los animales GMS el contenido hipotalámico de SS no se vio alterado tras la administración de GHRH, posiblemente debido a que la concentración de dicho péptido en el hipotálamo no fue la óptima para alterar la actividad normal de las neuronas productoras de SS.

1.2.2. Contenido hipofisario y niveles circulantes de GH.

Como ya hemos dicho, el tratamiento neonatal con GMS produjo un descenso significativo tanto en el contenido hipofisario como en los niveles circulantes de GH.

En lo que se refiere a la concentración hipofisaria de GH por mg de proteína, el tratamiento con GMS produjo un ligero descenso en este parámetro aunque no de forma significativa, tal y como describen otros autores (Dada y cols 1984, Maiter y cols 1991, Wakabayashi y cols 1986). Esta situación se debió a que en este tipo de animal deficitario en GH, el menor contenido de GH en la hipófisis se vió compensado con unos niveles de proteínas también disminuídos significativamente (0.78 ± 0.04 mg proteínas en los animales normales vs 0.43 ± 0.047 mg proteínas en el animal tratado neonatalmente con GMS, $p < 0.05$). No obstante, Terry y cols (1981) y Slama y cols (1993) observaron una concentración hipofisaria de GH por mg de proteína o por mg de tejido significativamente menor en los animales GMS respecto a los animales normales no deficitarios en GH, lo que podría sugerir un mayor descenso en el contenido hipofisario de GH como consecuencia de una acción más drástica del GMS en los animales utilizados por estos dos autores que en los de nuestro estudio.

Ninguna de las pautas de administración de GHRH estimuló significativamente la liberación de GH, al igual que vieron Kovacs y cols (1996a). No obstante, tras la administración pulsátil de GHRH en días alternos se consiguió un ligero aumento de los niveles circulantes de GH, pero en cualquier caso esta respuesta fue mínima. Esto indicaría que la rata macho tratada con GMS, aunque mantiene la capacidad de respuesta a la GHRH, lo hace en menor medida que la rata macho normal debido a la existencia de menos GH almacenada y susceptible de ser liberada en la hipófisis de estos animales, al igual que describen otros autores como Wakabayashi y cols (1986), Cella y cols (1990) y Maiter y cols (1991).

Ni la administración pulsátil ni la continua de GHRH afectaron a la síntesis de GH en la hipófisis de los animales deficientes en GH por tratamiento neonatal con GMS. Estos datos concuerdan con los resultados de Clark y cols (1985) y Hu y cols (1993) trabajando con ratas de la misma edad y del mismo tipo que la nuestras. Arce y cols (1995) si observaron un efecto positivo de la GHRH sobre la síntesis de GH en ratas GMS de 3 meses de vida, lo que podría indicar que la respuesta a la administración de GHRH en la rata macho GMS es dependiente de la edad del animal, al igual que vimos en la rata macho normal.

1.2.3. Niveles plasmáticos de IGF-I e incremento ponderal.

Tras una semana de tratamiento con GHRH en la rata macho GMS, no se modificaron significativamente ni los niveles circulantes de IGF-I ni el incremento ponderal, respecto a los animales tratados con GMS que no recibieron GHRH. Hu y cols (1993) tampoco encontraron aumento en los niveles de IGF-I en plasma tras administrar GHRH durante una semana a ratas deficitarias en GH del mismo tipo que las nuestras.

Las inyecciones diarias de GHRH fueron, en nuestro caso, la forma más eficaz de incrementar el peso, tal y como vieron Robinson y Clark (1987) y Clark y cols (1985) tras administrar GHRH de forma pulsátil en animales GMS. Sin embargo, en ambos trabajos, la ganancia de peso sí llegó a ser significativamente mayor que en el animal GMS sin tratar con GHRH, posiblemente debido a que la administración del péptido llevado a cabo por estos autores (cada 3 h) fue más parecido al patrón endógeno de secreción de GHRH que en nuestro caso. Además, Clark y cols realizaron el tratamiento durante 12 días, mientras que nuestro estudio duró únicamente una semana, por lo que este factor también ha de ser tenido en cuenta, ya que tal y como Kovacs y cols (1996a) sugieren, parece que la secreción de GH en un animal sometido a bajas concentraciones de GHRH durante largo tiempo, tal y como ocurre en la rata GMS, podría necesitar mucho tiempo para recuperarse. Volviendo a nuestro estudio, aunque la administración pulsátil de GHRH produjo aumento en la ganancia ponderal, no se alcanzó el peso del animal normal no deficitario en GH.

El escaso éxito obtenido tras administrar GHRH en la rata macho tratada neonatalmente con GMS, en cuanto a restaurar el normal funcionamiento del eje somatotropo y el crecimiento, parece indicar que la GHRH es necesaria durante la etapa neonatal para garantizar un perfecto funcionamiento de dicho eje posteriormente en la rata adulta. Esta teoría estaría de acuerdo con el trabajo de Cella y cols (1990) en el que tras deprivar transitoriamente de GHRH a ratas machos durante los 10 primeros días de vida mediante anticuerpos anti-GHRH observaron descenso en los niveles plasmáticos e hipofisarios de GH y retraso en el crecimiento en el animal adulto. También Hu y cols (1993) y Wakabayashi y cols (1986) proponen la existencia de alteraciones irreversibles en la célula somatotropa de la rata GMS que no pueden ser subsanadas por la administración exógena de GH o GHRH. Clark y cols (1985) sugieren la necesidad de un sistema hipotálamo-hipofisario intacto para que la GHRH haga efecto en las células somatotropas.

2. ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH Y SS EN LA RATA HEMBRA.

2.1. ESTUDIOS EN LA RATA HEMBRA NORMAL.

Como acabamos de ver, ni la rata macho normal ni la deficitaria en GH resultaron ser un modelo adecuado para el estudio del eje somatotropo. Ante la existencia de varios trabajos en los que se demostraba que la rata hembra normal respondía a la administración prolongada de GH (Tresguerres y cols 1994, Aspenberg y cols 1985), decidimos proseguir nuestras investigaciones sobre la administración de GHRH y SS utilizando este nuevo modelo animal.

2.1.1. Contenido hipotalámico de SS.

El tratamiento de forma pulsátil con GHRH durante 19 días en ratas hembras produjo un descenso en el contenido hipotalámico de SS, sugiriendo una acción estimulante de la GHRH sobre la liberación de SS. Los trabajos de Aguila y Mc Cann (1988) in vitro y los de Katakami y cols (1986a) y Mitsugi y cols (1990) in vivo también demuestran que la GHRH estimula la liberación de SS, apoyando nuestros resultados. Este efecto parece ser dependiente de la dosis de GHRH administrada, ya que la disminución en el contenido hipotalámico de SS fue mayor tras la infusión diaria de 1.2 mg (grupo 4 GHRH: 4 inyecciones diarias de 300 µg/inyección) que después de administrar 600 µg de GHRH (grupo GHRH: 2 inyecciones diarias de 300 µg/inyección).

Cuando las inyecciones de GHRH se alternaron con inyecciones de SS, ésta revertió el efecto producido por la primera, resultando un contenido hipotalámico de SS similar al del animal control. Así, la liberación de SS provocada por la GHRH se vió compensada con una inhibición del proceso llevada a cabo por la SS exógena. Richardson y Twente (1986) observaron que la adición de SS a células hipotalámicas en cultivo disminuía la liberación de dicha hormona al medio, sugiriendo una acción inhibitoria de la SS sobre su propia liberación, en consonancia con nuestros datos.

Por otro lado, la infusión continua de 600 µg de GHRH/día durante 21 días mediante un pellet de liberación lenta no alteró el contenido hipotalámico de SS, tal vez porque no se consiguió una concentración suficiente de GHRH como para modificar la tasa de secreción de las neuronas somatostatinérgicas. Esta misma situación se mantuvo tras el tratamiento combinado de GHRH con SS. Como veíamos anteriormente, la administración de la misma dosis de GHRH pero de forma pulsátil si

produjo un descenso en el contenido hipotalámico de SS, por lo que parece que la forma de administración de GHRH también intervino en el efecto de dicho péptido a nivel hipotalámico.

En cuanto a la SS, la infusión de dicho péptido en forma de 4 inyecciones diarias provocó una disminución significativa en el contenido hipotalámico de esta hormona. Esta situación podría ser consecuencia de la acción negativa de la SS sobre su propia síntesis y secreción. Así, los altos niveles de SS alcanzados en las proximidades de las células somatostatinérgicas serían capaces de inhibir la síntesis de dicha hormona, además de oponerse también a su liberación tal y como ya han descrito otros autores (Lumpkin y cols 1981, Richardson y Twente 1986).

La presencia de unos niveles plasmáticos de GH disminuídos tras la administración pulsátil diaria y a largo plazo de 1.2 mg de GHRH o de 400 µg de SS (ver apartado siguiente) también podrían contribuir al descenso en el contenido hipotalámico de SS que se observó tras ambos tratamientos. Tal y como varios autores proponen, la concentración hipotalámica de SS es dependiente de los niveles circulantes de GH. Unos niveles bajos de GH en plasma no son capaces de mantener el circuito de retroalimentación de asa corta que la GH realiza a nivel hipotalámico, estimulando la síntesis y liberación de SS, con lo que a largo plazo se produciría una disminución en el contenido hipotalámico de dicho péptido. Patel (1979), Berelowitz y cols (1981) y Rogers y cols (1988) observan un descenso de la concentración de SS en el hipotálamo de ratas deficientes en GH, en la misma medida que en ratas hipofisectomizadas o en ratas tratadas con anticuerpos anti-GH. Además, estos autores demuestran que esta situación puede revertir tras la administración de GH.

2.1.2. Contenido hipofisario y niveles plasmáticos de GH.

La administración pulsátil de 600 µg de GHRH al día mediante 2 inyecciones s.c. no modificó significativamente ni los niveles plasmáticos ni el contenido hipofisario de GH. En el trabajo de Clark y cols (1985), la administración pulsátil de GHRH cada 3 h provocó un aumento en el contenido hipofisario de GH y Hu y cols (1993) observaron estimulación tanto de la síntesis como de la secreción de GH después de 7 días de tratamiento con inyecciones de GHRH también cada 3 h. Así, parece que en nuestro experimento el patrón de administración de GHRH no consiguió que se alcanzaran los niveles plasmáticos de este péptido necesarios para provocar cambios en la dinámica de síntesis y secreción de las células somatotropas

o en caso de producirse fueron de forma transitoria, tal y como proponen González y cols (1989) tras administración de GHRH durante 20 días.

Por otro lado, tras la administración pulsátil de GHRH en altas dosis (1.2 mg/día) se produjo un incremento significativo de peso, como más adelante veremos, pero sin embargo en el momento del sacrificio los niveles plasmáticos de GH se encontraban disminuídos. Esto podría sugerir que, aunque la GHRH podría haber estado actuando positivamente sobre la síntesis y secreción de GH a lo largo del experimento de tal forma que ésta fuera la responsable última del aumento de peso, la SS liberada desde el hipotálamo por acción de la GHRH, tal y como exponíamos en el punto anterior, también se encontraba funcionado en la hipófisis contrarrestando los efectos de la GHRH.

En el grupo en el que la administración pulsátil de GHRH se acompañó con inyecciones de SS (grupos GHRH 3+SS 2 y GHRH+SS), los niveles plasmáticos de GH aparecieron disminuídos, al igual que tras el tratamiento sólo con SS. Esta situación es indicativa de la inhibición de la secreción de GH que ejercieron tanto el Somiatón como el Sandostatín, puesto que ambos péptidos fueron administrados 2 h antes de tomarse la sangre por decapitación. Este efecto de la SS también ha sido descrito por otros autores (Lumpkin y cols 1981, Murakami y cols 1987, Turner y Tannenbaum 1995).

La administración de GHRH de forma continua durante 21 días produjo un aumento tanto de la concentración hipofisaria de GH por mg de proteína como de los niveles plasmáticos de GH, aunque el efecto sólo fue significativo en este último parámetro. Así, la GHRH infundida de forma continua en la rata hembra normal activó la síntesis y secreción de GH en las células somatotropas. Nuestros datos no concuerdan con los de Clark y cols (1985), puesto que estos autores no encontraron ningún cambio en el contenido hipofisario de GH tras infusión continua de GHRH durante 12 días en ratas hembras. Tanto la dosis de GHRH administrada por nosotros como el período de tratamiento fueron mayores en nuestro estudio, lo que podría explicar estas discrepancias.

Cuando además de la infusión continua de GHRH se inyectó SS, el contenido hipofisario y los niveles plasmáticos de GH fueron similares a los del animal control. Así, la SS se opuso a la acción estimuladora de la GHRH tanto sobre la síntesis como sobre la liberación de GH.

La acción inhibitoria de la SS sobre la secreción de GH está en consonancia con los trabajos de Tannenbaum y Ling (1984) y Clark y cols (1988a) que describen como la SS atenúa la acción estimulante de la GHRH a nivel hipofisario. En cuanto al

efecto de la SS sobre la síntesis de GH, nuestro trabajo apoya la acción negativa de este péptido hipotalámico sobre dicho proceso, tal y como proponen Devesa y Tresguerres (1996). No obstante, otros autores opinan que la SS no juega ningún papel sobre la biosíntesis de GH (Barinaga y cols 1985, Fukata y cols 1985).

Igual que ocurría en la rata macho, tras el tratamiento a largo plazo con GHRH de forma pulsátil o continua, no se produjo vaciamiento hipofisario de GH. Esta situación de nuevo confirma la capacidad de la hipófisis de la rata para adaptarse a la presencia de unos niveles circulantes elevados de GHRH, como los alcanzados tras la administración de dosis de GHRH de hasta 1.2 mg/día. Nuestra teoría también se apoya en los trabajos de Bowers y cols (1984) y González y cols (1989), en los que se describe el mantenimiento de la respuesta a GHRH sin descenso en la GH acumulada en la hipófisis después de infusión de dicho péptido a largo plazo en ratas hembras normales.

Por otro lado, Hu y cols (1993) observan un contenido hipofisario de GH inferior al de los animales controles después de 7 días de tratamiento con GHRH, debido a una estimulación desigual de los procesos de síntesis y secreción de GH, predominando este segundo sobre el primero. Esto podría indicar que tanto en nuestro estudio como en los de Bowers y cols (1984) y González y cols (1989) no se produjo tal desequilibrio en la dinámica de síntesis y secreción de la célula somatotropa tras el tratamiento crónico con GHRH.

De igual forma, tras el tratamiento con SS a largo plazo los animales mantuvieron la respuesta a dicho tratamiento durante todo el estudio, como lo demuestran unos valores plasmáticos de GH disminuídos a las 2 h de la inyección del péptido tras 19 días de tratamiento. Turner y Tannenbaum (1995) y Tzanela y cols (1996) tampoco observaron desensibilización tras administración crónica de SS. Es más, Turner y Tannenbaum describen un aumento de la respuesta a la GHRH en ratas hembras tratadas previamente con SS, y Clark y cols (1988a) exponen un aumento del contenido hipofisario de GH tras tratamiento con SS de forma pulsátil durante 10 días, lo que apoyaría nuestra hipótesis respecto al papel de la SS como hormona "sensibilizadora" o previsor de la desensibilización, y responsable de la adaptación de la hipófisis a la estimulación prolongada con GHRH. La ausencia de desensibilización debida a la administración de SS a largo plazo también aparece respaldada por la efectividad del Octreotide disminuyendo la GH plasmática en individuos acromegálicos tratados durante 3 años (Lamberts y cols 1987, Newman y cols 1995).

2.1.3. Niveles plasmáticos de GH tras estímulo agudo con GHRH.

En el experimento 5, ni el grupo Control, ni los tratados con GHRH de forma continua sólo o con inyecciones de SS, mostraron un incremento plasmático de GH en respuesta a la inyección de GHRH, posiblemente como consecuencia de la inhibición de la secreción de GH debida al estrés al que fueron sometidos los animales. Krulich y cols (1974) observaron como el manejo del animal, el cambio de ambiente desde el animalario hasta el quirófano, y sobre todo la exposición a la anestesia por éter producen una inhibición de la liberación hipofisaria de GH.

Hay trabajos en los que se sugiere que el descenso de los niveles plasmáticos de GH producido por el estrés agudo es debido a un aumento de la liberación de SS (Terry y cols 1976, Benyassi y cols 1992). Así, la ligera respuesta al estímulo agudo con GHRH en la rata hembra tratada crónicamente de forma continua con dicho péptido hipotalámico, podría indicar la existencia en estos animales de unos niveles circulantes de GHRH elevados, capaces de neutralizar y superar la acción de la SS liberada tras el estrés. Esta hipótesis se ve corroborada por la atenuación de dicha respuesta tras la administración crónica conjunta de GHRH y SS.

2.1.4. Niveles circulantes de IGF-I.

Ninguno de los tratamientos llevados a cabo con GHRH y/o SS fue capaz de modificar los niveles plasmáticos de IGF-I, pese a las alteraciones ya comentadas en los niveles circulantes de GH, lo que podría indicar que tampoco en esta ocasión se alteró el patrón pulsátil de GH en la rata hembra, tal y como ocurría con la rata macho. Tampoco Kovacs y cols (1996a) consiguieron alterar los niveles plasmáticos de IGF-I tras inyecciones del análogo de GHRH JI-38 durante 14 días.

Por otro lado, Groesbeck y cols (1987) administrando GH y Hu y cols (1993) infundiendo GHRH de forma pulsátil si observaron un aumento en los niveles plasmáticos de IGF-I. En el trabajo de Groesbeck y cols se comenta la existencia de una posible limitación en ratas puberales en comparación con ratas adultas y viejas, en cuanto a producir cambios en los niveles circulantes de IGF-I tras inyecciones de GH. Esta circunstancia apunta de nuevo la dificultad en cuanto a alterar el eje somatotropo en la etapa puberal, y más concretamente el aumento de IGF-I que tiene lugar en la rata durante este período (Handelsman y cols 1987) en el que nosotros estamos trabajando, tal y como vimos en los estudios realizados con la rata macho.

2.1.5. Crecimiento.

*** Peso.**

La administración de GHRH durante 19 días aumentó el peso corporal. Este efecto de la GHRH parece ser dependiente de la dosis, ya que 600 µg/día administrados en forma de inyecciones o mediante pellet de liberación lenta, únicamente produjeron un aumento de peso muy ligero, mientras que el incremento fue significativo cuando la dosis inyectada fue de 1.2 mg/día. En consonancia con esto, González y cols (1989) no consiguieron aumentar el peso corporal de ratas hembras tratadas durante 10 días con una dosis diez veces inferior a la nuestra.

Con la dosis de 600 µg GHRH/día se produjo el mismo incremento medio de peso independientemente de si se hizo de forma pulsátil o continua (3.75 g/día en el grupo Control, 4.11g/día tras inyecciones de GHRH y 4.15 g/día tras la administración continua de éste). En ningún caso el efecto fue significativo, y aunque la forma de administración de GHRH es un factor que parece influir en la acción de este péptido sobre el crecimiento (Robinson y Clark 1987), a la vista de nuestros resultados no podemos concluir nada este respecto. No obstante, Clark y cols (1985) empleando una misma dosis de GHRH de forma pulsátil y continua, sólo obtuvieron aumento del peso corporal tras la administración pulsátil. Esta mayor efectividad de la administración pulsátil en comparación con la continua ha sido también sugerida por otros autores inyectando GH a ratas hipofisectomizadas (Robinson y Clark 1987).

El presente experimento y el de Clark y cols (1985) indican la posibilidad de incrementar el peso corporal administrando GHRH durante largo tiempo en la rata hembra durante la etapa puberal, con lo que dicho modelo animal podría ser mejor que la rata macho para el estudio de la regulación del eje somatotropo a largo plazo.

El efecto que acabamos de comentar de la GHRH sobre el peso corporal no varió cuando se administró conjuntamente con SS. Tampoco la SS administrada de forma única produjo cambios en el peso corporal respecto a los animales controles, al igual que vieron Spencer y Hallet (1985) tratando a ratas hembras con SS de forma continua durante 2 semanas. Los altos niveles circulantes de SS presentes en ratones transgénicos para esta hormona, con un peso corporal similar al del animal normal también apoyan nuestros datos. Clark y cols (1988b) infundiendo SS de forma intermitente (períodos de administración continua del péptido alternándose con períodos de interrupción de ésta) observaron un aumento del peso corporal, lo que apoyaría aún más el papel positivo de la SS en la secreción de GH y el proceso de crecimiento.

*** Longitud tibial.**

En lo que se refiere a la longitud tibial, valorada ésta por microknemometría, la administración continua de GHRH no incrementó significativamente la longitud tibial, tal y como vieron Clark y cols (1985). Tampoco Kovacs y cols (1996a) encontraron alteraciones en la longitud tibial en ratas hembras tratadas con inyecciones del análogo de GHRH JI-38 durante dos semanas.

De igual forma, la administración conjunta de GHRH, infundido de forma continua, e inyecciones de SS, no modificó tampoco la longitud de la tibia.

En el trabajos de Robinson y Clark (1987) se propone que el incremento en la longitud tibial observado tras tratamiento prolongado de forma pulsátil con GHRH en la rata hembra, es debida a "masculinización" del patrón de secreción de GH en este animal, circunstancia que no habría ocurrido en nuestro estudio administrando GHRH de forma continua. En relación con esto, Edén (1979) y Jansson y cols (1985b) muestran como el patrón de secreción de GH en la rata macho normal parece ser el más efectivo a nivel de crecimiento.

Tanto en trabajos de nuestro grupo (Tresguerres y cols 1994, Rol de Lama y cols 1997) como en los de otros autores (Aspenberg y cols 1985), se muestra cómo en la rata hembra normal en la etapa puberal se puede aumentar la longitud tibial y el peso corporal cuando se administran inyecciones de GH durante largo tiempo. Este hecho corroboraría nuestra hipótesis de que la rata hembra parece ser un animal más apropiado para el estudio de la regulación del eje somatotropo a largo plazo. Así, el incremento en el peso corporal observado en nuestro estudio tras la infusión pulsátil de GHRH en altas dosis también pudo ir acompañado de modificaciones en el cartílago de crecimiento, y por lo tanto, en la longitud tibial.

2.2. ESTUDIOS EN LA RATA HEMBRA DEFICITARIA EN GH.

En vista de que la rata hembra parecía responder mejor que el macho a nuestros tratamientos con GHRH y SS, se procedió a estudiar el comportamiento de ratas hembras deficientes en GH por tratamiento neonatal con GMS (ratas GMS) ante la administración de ambos péptidos.

Al igual que en la rata macho, la administración de GMS durante los 10 primeros días de vida en ratas hembras produjo un descenso significativo del peso de la hipófisis, del contenido hipofisario de GH, de los niveles plasmáticos de GH e IGF-I, del peso corporal y de la longitud tibial, en consonancia con los resultados de Nemeroff y cols (1977), Dada y cols (1984), Wakabayashi y cols (1986), y Kubota y cols (1994).

2.2.1. Contenido hipotalámico de SS.

Tras la administración neonatal de GMS, el contenido hipotalámico de SS no varió significativamente respecto al del animal normal, al igual que observaron Maiter y cols (1991) en el mismo modelo animal deficitario en GH y nosotros en el experimento 2 realizado en ratas machos GMS. Esta situación está en consonancia con los trabajos de Bloch y cols (1984) y Slama y cols (1993), en los que se describe una acción específica y selectiva del GMS sobre las neuronas GHRH-érgicas del núcleo arcuato.

Cuando se infundió GHRH tanto de forma pulsátil como continua, no se modificó el contenido hipotalámico de SS, al igual que sucedió en la rata macho GMS. Esta situación indicaría, de nuevo, la ausencia de alteraciones en la dinámica de síntesis y secreción de las neuronas somatostatinérgicas tras la administración de GHRH.

Tampoco la administración continua de GHRH combinada con inyecciones de SS alteró el contenido hipotalámico de SS.

2.2.2. Contenido hipofisario y niveles plasmáticos de GH.

Aunque como comentábamos anteriormente el GMS disminuyó el contenido hipofisario de GH, la concentración de GH en la glándula por mg de proteína no varió significativamente respecto a la del animal normal, ya que el GMS también produjo un descenso significativo en el contenido total de proteínas hipofisarias (1.2 ± 0.07 mg en el animal normal y 0.66 ± 0.05 en el tratado con GMS, $p < 0.05$). Esta circunstancia se vió corroborada por un peso hipofisario también significativamente menor que el del

animal normal no deficiente en GH. Dada y cols (1984), Wakabayashi y cols (1986) y Maiter y cols (1991) también encontraron, en ratas GMS, una concentración hipofisaria de GH por mg de proteína igual a la del animal normal.

Cuando la GHRH se administró de forma pulsátil durante 36 días, se observó un aumento del contenido hipofisario de GH sin que se alterasen sus niveles plasmáticos, al igual que vieron Robinson y Clark (1987) y Kovacs y cols (1995, 1996a). Según esto, podríamos sugerir que la rata hembra deficitaria en GH por tratamiento neonatal con GMS conserva la capacidad de síntesis de GH, puesto que dicho proceso se estimuló normalmente cuando se administraron inyecciones de GHRH. El aumento significativo en el contenido de proteínas totales en las hipófisis de los animales GMS tratados con GHRH respecto al animal GMS sin este tratamiento (0.88 ± 0.06 mg en el grupo GMS-GHRH y 0.66 ± 0.05 mg en el grupo GMS, $p < 0.05$) confirman este hecho.

La infusión continua de GHRH sólo o combinado con inyecciones diarias de SS, durante 21 días, no fue capaz de modificar ni el contenido hipofisario ni los niveles circulantes de GH, al igual que habían visto Robinson y Clark (1987) y Kovacs y cols (1995).

Puesto que se activó la síntesis hipofisaria de GH cuando se infundió de forma pulsátil una dosis diaria de GHRH tres veces menor que de forma continua (200 μ g de forma pulsátil vs 600 μ g continua), parece ser que dicho proceso es más dependiente de la forma de administración del péptido que de la dosis total utilizada. Esto podría deberse a que la concentración instantánea de GHRH que se alcanzó a nivel de la hipófisis fue mayor tras las inyecciones (200 μ g/inyección) que tras la infusión continua (0.4 μ g/minuto). No obstante, el tratamiento pulsátil se realizó durante 36 días, mientras que la infusión continua duró 21 días, circunstancia que también pudo influir en la distinta respuesta de la célula somatotropa ante la administración de GHRH. En consonancia con nuestros datos, Robinson y Clark (1987) observaron un aumento del contenido hipofisario de GH después del tratamiento con GHRH de forma pulsátil, pero no tras la infusión continua de la misma dosis del péptido en ratas GMS.

2.2.3. Respuesta a la estimulación aguda con GHRH.

Los animales GMS sin tratamiento con GHRH o GHRH+SS aumentaron los niveles plasmáticos de GH en respuesta al estímulo agudo con GHRH, indicando claramente que pese a ser animales deficitarios en GH mantienen la capacidad de responder a estímulos que inciden directamente sobre la célula somatotropa, como por ejemplo la GHRH. También Millar y cols (1982), Wakabayashi y cols (1986) y Kovacs y cols (1995, 1996a) observaron respuesta a la inyección de GHRH en ratas tratadas neonatalmente con GMS.

La aparición de esta respuesta demuestra que las células somatotropas de estos animales tienen receptores para GHRH, aunque como demuestran Kovacs y cols (1996a) en menor número que las células de los animales normales no deficitarios en GH. Puesto que se ha demostrado que la GHRH regula la expresión de su propio receptor en la hipófisis (Takahashi y cols 1995, Horikawa y cols 1996), la presencia de receptores para GHRH en las células somatotropas de estos animales indicaría que en la rata GMS existen unos niveles circulantes de GHRH mínimos pero suficientes para mantener algunos de los receptores para el citado péptido hipotalámico. Merchantaler y cols (1984) indican que el GMS no llega a destruir todas las neuronas GHRH-érgicas del núcleo arcuato, y además detectan producción de GHRH en otros núcleos hipotalámicos diferentes del arcuato, apoyando aún más la existencia de GHRH en la hipófisis de los animales GMS.

Tal y como decíamos cuando analizábamos la respuesta al estímulo agudo con GHRH en la rata hembra normal, la anestesia con éter es una situación estresante para la rata, que produce inhibición de la secreción hipofisaria de GH, lo que podría explicar por qué tampoco se observó el esperado aumento en los niveles plasmáticos de GH tras la inyección de GHRH en los grupos GMS tratados con GHRH o con GHRH+SS. Si aceptamos que, en la rata, la inhibición de la liberación de GH debida al estrés agudo es dependiente de la secreción de SS (Terry y cols 1976, Benyassi y cols 1992), la respuesta a la estimulación aguda de GHRH observada en los animales GMS sin tratamiento podría indicar que la SS circulante tiene menos efecto en este modelo animal.

En relación con la teoría que acabamos de proponer, Wehrenberg y cols (1984b) y Kovacs y cols (1996a) proponen la existencia, en ratas GMS, de unos niveles circulantes disminuidos de SS respecto a los del animal normal, como resultado de un descenso en los niveles plasmáticos de GH e IGF-I. Cella y cols (1990) describen un descenso en el número de receptores para SS en la hipófisis de animales deficitarios en GH por tratamiento neonatal con anticuerpo anti-GHRH. Sin

embargo, Arce y cols (1995) indican que a la hipófisis de los animales GMS llega la misma cantidad de SS que en el animal normal tras una inyección de GHRH.

Por otro lado, también la existencia de un aumento en la sensibilidad a la GHRH en los animales GMS, al haber estado privados de dicho péptido durante largo tiempo, podría justificar la respuesta del grupo GMS. Tanto el trabajo de Spinedi y cols (1984) in vitro, en el que se describe una respuesta aumentada a LHRH y CRH en las células hipofisarias de animales GMS, como el de Kovacs y cols (1996a), donde se describe una mayor afinidad de los receptores para GHRH en la hipófisis de los animales tratados neonatalmente con GMS, están en consonancia con este hecho.

2.2.4. Niveles plasmáticos de IGF-I.

Ni el tratamiento pulsátil con GHRH ni la administración de GHRH de forma continua sólo o con SS fueron capaces de alterar los niveles plasmáticos de IGF-I de los animales GMS.

Los datos de la literatura son muy dispares respecto a los niveles circulantes de IGF-I tras tratamiento con GHRH a largo plazo en ratas GMS. Así, mientras que Hu y cols (1993) no observaron alteraciones en este parámetro tras tratamiento con GHRH, Kovacs y cols (1996a) si describen niveles plasmáticos elevados de IGF-I tras la administración de un análogo muy potente de GHRH. Los animales utilizados en nuestro estudio estaban en plena etapa puberal y aunque el GMS atenúa el aumento de IGF-I que se produce en este período (Handelsman y cols 1987), parece que dicho incremento tampoco pudo ser potenciado por los péptidos que administramos.

2.2.5. Crecimiento.

*** Peso.**

La administración de GHRH de forma pulsátil o continua, esta última ya sea sólo como con SS, no produjo ninguna ganancia de peso ni a la semana ni a los 21 días de tratamiento. Sin embargo, cuando el tratamiento de forma pulsátil se prolongó durante 5 semanas, se observó un incremento de peso significativamente mayor respecto al del animal GMS sin tratar con GHRH. Esta acción de la GHRH dependiente de la duración del tratamiento confirma el hecho que ya comentábamos en la rata macho GMS, y es que la recuperación del eje somatotropo en animales privados de GHRH durante mucho tiempo, como los animales GMS, necesitaría de la administración de GHRH por períodos de tiempo muy largos (Kovacs y cols 1996a).

***Longitud.**

El efecto de las inyecciones de GHRH aumentando el peso corporal tras el tratamiento durante 5 semanas no se manifestó de igual forma en la longitud tibial. Los trabajos de Kovacs y cols (1995, 1996a) administrando análogos muy potentes de GHRH a ratas hembras GMS de la misma edad que las nuestras muestran incremento tanto de peso corporal como de la longitud de la tibia, alcanzándose en ambos parámetros valores similares a los del animal no deficiente en GH. Esta recuperación total del crecimiento contrasta con la ausencia de la misma en nuestros estudios administrando GHRH 1-29, circunstancia que podría deberse a la mayor afinidad del análogo por el receptor de GHRH y una menor degradación de dicho fármaco en comparación con el péptido utilizado por nosotros (Izdebski y cols 1995).

Por otro lado, Robinson y Clark (1987) observaron aumento de peso y de la longitud de la tibia tras administrar GHRH en ratas hembras GMS viejas, lo que indicaría que, en la rata hembra deficitaria en GH, el tratamiento con GHRH es dependiente de la etapa durante la cual se administre el citado péptido, siendo la etapa puberal un período en el que el eje somatotropo es difícilmente modificable, como ya vimos en la rata macho.

3. ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GHRH Y SS EN CORDEROS.

Una vez realizado el estudio del eje somatotropo y del proceso de crecimiento en la rata, y tras observar que este animal presentaba una serie de limitaciones en cuanto al estudio de dicho proceso, el siguiente paso en nuestras investigaciones fue ver la respuesta a la administración de GHRH y SS en otro animal que no presentase tales características, escogiéndose el cordero, del que existían algunos estudios de crecimiento debido a su interés en el campo de la ganadería (Godfredson y cols 1990, Beermann y cols 1990).

3.1. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE GHRH.

Como consecuencia de la administración de GHRH tanto de forma pulsátil como continua, el contenido hipotalámico de GHRH aumentó respecto al del grupo control, pero en ninguno de los casos de forma significativa. Esta acumulación de GHRH en el hipotálamo reflejaría la acción negativa que produjo la GHRH

administrada sobre su propia liberación. Este mismo efecto también ha sido observado infundiendo GHRH de forma i.c.v. en ratas (Lumpkin y cols 1985).

Además, la GH plasmática se encontraba aumentada tras las inyecciones de GHRH, como veremos en el siguiente apartado, con lo que también esta hormona podría actuar a nivel de las células productoras de GHRH inhibiendo la liberación de este péptido, puesto que éste es uno de los mecanismos de control que intervienen en la regulación de la secreción de GH (retroalimentación de asa corta). De acuerdo con esta teoría figuran los trabajos de Clark y cols (1988a) y Leidy y cols (1990) en los que tras administrar GH observaron un aumento en el contenido hipotalámico de GHRH. En esta misma línea, Cella y cols (1990) describen la inhibición que sufre la liberación de GHRH desde el hipotálamo tras administrar inyecciones de GH en la rata.

Cuando la administración de GHRH se combinó con inyecciones de SS, el contenido hipotalámico de GHRH fue muy similar al del animal control, reflejando la existencia de un balance entre la acción de ambas hormonas. Según esto, la administración de SS atenuaría el efecto de la GHRH, estimulando la liberación de este péptido desde las neuronas hipotalámicas encargadas de este proceso, tal y como Murakami y cols (1987) y Tannenbaum y cols (1990) proponen.

La acción de la SS sobre la liberación hipotalámica de GHRH no está del todo clara, ya que existen trabajos que indican un efecto positivo de SS sobre la secreción de GHRH, como es el caso del nuestro y los anteriormente citados de Murakami y Tannenbaum, mientras que Katakami y cols (1988) y Miki y cols (1988) sugieren una inhibición tónica de la SS sobre la actividad GHRH-érgica en la rata. Magnan y cols (1992) administrando análogos de SS de forma i.v. en corderos obtienen un descenso de los niveles de GHRH en el sistema portahipofisario apoyando una acción inhibitoria de la SS sobre la liberación de GHRH.

3. 2. CONTENIDO HIPOTALÁMICO DE SS.

La administración de GHRH de forma continua dió lugar a la acumulación de SS en el hipotálamo, lo que sugiere una acción positiva de la GHRH sobre la actividad de las neuronas somatostatinérgicas, estimulando la síntesis de SS en mayor medida que la liberación de dicho péptido. Ambas acciones también han sido postuladas por otros autores tanto en ratas (Katakami y cols 1986a, Mitsugi y cols 1990, Gil-Ad y cols 1991) como en corderos (Spencer y cols 1992).

Sin embargo, tras las inyecciones de GHRH, el contenido hipotalámico de SS no varió significativamente respecto al de los corderos controles. Considerando que la cantidad de GHRH infundida de forma continua (1.2 mg/día) fue mayor que de forma pulsátil (750 µg/día), mientras que los niveles instantáneos de GHRH fueron mayores tras las inyecciones que tras la infusión continua (250 µg/inyección y 0.83 µg/minuto respectivamente), podríamos decir que tal vez la acción de la GHRH sobre las neuronas somatostatinérgicas sea, en el cordero, más dependiente de la forma de administración y de la dosis total utilizada que de la concentración alcanzada por la GHRH en cada momento.

En el apartado anterior veíamos como las inyecciones de GHRH y el aumento plasmático de GH producido por éstas actuaban sobre las células GHRH-érgicas. En el caso de las neuronas somatostatinérgicas, ninguno de estos dos factores parece alterar la actividad de dichas células, lo que podría sugerir la existencia de distinta sensibilidad en las células productoras de SS ante la GHRH y la GH circulantes. Maiter y cols (1990) observaron este mismo hecho, ya que tras tratar durante 10 días con inyecciones de GH a ratas machos, únicamente se alteró el contenido hipotalámico de GHRH, permaneciendo invariable el de SS respecto al de los animales control.

Puesto que tal y como proponíamos al inicio de este apartado, la infusión de GHRH actuaba sobre la síntesis y liberación de SS, para que apareciese un contenido hipotalámico de SS igual al del animal control tras la administración conjunta de GHRH y SS, sería necesaria la existencia de un equilibrio entre la acción de ambas hormonas a nivel de las neuronas somatostatinérgicas. Esto implicaría una acción negativa de la SS exógena sobre su propia síntesis. La existencia de tal autorregulación negativa de la actividad SS-érgica ha sido observada por Peterfreund y Vale (1984) y Richardson y Twente (1986).

3. 3. NIVELES PLASMÁTICOS Y CONTENIDO HIPOFISARIO DE GH.

Los corderos tratados con GHRH de forma pulsátil mostraron unos niveles plasmáticos aumentados de GH respecto a los del animal control en las muestras tomadas justo antes de realizarse las pruebas de estímulo, 1 h después de la inyección de GHRH correspondiente al tratamiento diario. Esto indicaría que la administración pulsátil diaria de GHRH estimuló la liberación de GH desde la hipófisis, tal y como vieron también Kensinger y cols (1987), Byrem y cols (1989) y Pastoureau y cols (1989) tratando a corderos con el mismo péptido. Además, también podríamos

decir que tras cada inyección de GHRH, los niveles plasmáticos de GH se mantuvieron por encima de los basales al menos durante 1 h. De acuerdo con esto, Hart y cols (1985), Barenton y cols (1987) y Kensinger y cols (1987) proponen que los niveles circulantes de GH se elevan tras la administración de GHRH y no vuelven a los niveles basales hasta 2 h después del estímulo.

El aumento de los niveles plasmáticos de GH tras el tratamiento con GHRH apareció acompañado de un contenido hipofisario de GH similar al de los corderos controles, por lo que parece que las inyecciones de GHRH también actuaron de forma positiva sobre la síntesis hipofisaria de GH. El aumento del contenido proteico hipofisario tras dicho tratamiento apoyaría esta hipótesis (26.18 ± 3.4 mg en el grupo tratado con inyecciones de GHRH vs 16.27 ± 2.6 mg en el grupo control).

En las dos primeras semanas de estudio, los corderos tratados con inyecciones de GHRH no respondieron de forma significativa al estímulo agudo con el mismo péptido administrado 1 h después de la inyección de GHRH correspondiente al tratamiento diario. No obstante, ya en la segunda semana de tratamiento, se produjo un ligero aumento en la GH plasmática post-estímulo, pero no fue hasta transcurridas 3 semanas cuando la respuesta a la estimulación aguda con GHRH fue significativa. Esto podría indicar que la respuesta hipofisaria a la administración aguda de GHRH depende del número de receptores hipofisarios para GHRH libres que existen justo antes de cada una de las pruebas. Así, posiblemente después de 3 semanas de tratamiento diario con inyecciones de GHRH, aumentó el número de receptores para este péptido, posibilitando la respuesta de la hipófisis ante un estímulo agudo.

Este incremento en el número de receptores de GHRH en la hipófisis podría deberse a un incremento en el número total de receptores en cada célula o al aumento en el número de células somatotropas como consecuencia del efecto proliferativo de la GHRH sobre estas células (Billestrup y cols 1986). Horikawa y cols (1996) demuestran como la administración de anticuerpos anti-GHRH disminuye el número de receptores hipofisarios para este péptido, indicando que la GHRH regula positivamente la expresión de su propio receptor en la hipófisis, lo que estaría en consonancia con nuestra hipótesis.

Por otro lado, parece que tras la infusión continua de GHRH mediante pellet de liberación lenta o mediante minibomba osmótica no se alcanzaron los niveles de GHRH, en el sistema porta hipotálamo-hipofisario, necesarios para alterar la actividad de las células somatotropas, a la vista de la ausencia de modificaciones en los

niveles circulantes de GH o en el contenido hipofisario de esta hormona. Corroborando esta última circunstancia, el contenido de proteínas totales en las hipófisis de los corderos sometidos a este tratamiento no fue diferente significativamente del de los animales controles (21.5 ± 2.9 mg en el grupo tratado con GHRH de forma continua y 16.27 ± 2.6 mg en el grupo control). Nuestros datos no estarían de acuerdo con los trabajos de Kensinger y cols (1987), Byrem y cols (1989) y Godfredson y cols (1990) en los que se describe un aumento en los niveles plasmáticos de GH tras la infusión continua de GHRH en corderos. La administración de una dosis de GHRH 1.6 y 2.3 veces superior a la nuestra en los trabajos de Kensinger y Byrem respectivamente, y de un análogo de GHRH más potente que el GHRH 1-29 en el de Godfredson podría justificar esos resultados.

Puesto que, como acabamos de comentar, las inyecciones de GHRH aumentaron los niveles plasmáticos de GH, parece que la administración de este péptido de forma pulsátil fue más eficaz en su acción a nivel hipofisario que la infusión continua del mismo. Kensinger y cols (1987) también observaron un mayor incremento en los niveles plasmáticos de GH inyectando GHRH que infundiendo dicho péptido de forma continua. Una posible explicación a esta circunstancia podría erradicar en las concentraciones de GHRH alcanzadas a nivel de la hipófisis en cada momento, tal y como veíamos anteriormente. Estas serían mucho mayores tras la inyección de GHRH ($250 \mu\text{g}/\text{inyección}$) que mediante la administración del péptido de forma continua ($0.83 \mu\text{g}/\text{minuto}$).

Como decíamos en la introducción, se ha descrito la existencia de fenómenos de desensibilización al tratamiento con GHRH a largo plazo en el perro o en el hombre (Hulse y cols 1986, Tresguerres y cols 1993). Sin embargo, Hart y cols (1985) y Beermann y cols (1990) describen aumento mantenido de GH administrando inyecciones de GHRH durante largo tiempo en el cordero. De forma similar, los corderos de nuestro estudio conservaron la respuesta a la administración pulsátil de GHRH durante todo el experimento, esto es, las dosis de GHRH empleadas en nuestros experimentos no condujeron a una disminución en la respuesta hipofisaria a tal estímulo a largo plazo. Al igual que postulábamos en la rata, la administración de una dosis de GHRH tal que permita un equilibrio en la célula somatotropa entre las tasas de síntesis y secreción de GH podría hacer posible la adaptación de la hipófisis a la estimulación con GHRH a largo plazo.

A la vista de los datos obtenidos en la rata y en el cordero respecto al mantenimiento de la respuesta a la administración de GHRH a largo plazo, se podría

sugerir que dicho proceso depende de la consecución de un nuevo equilibrio entre las actividades de síntesis y secreción hipofisarias tras la administración de GHRH.

La aparición de la respuesta al estímulo agudo con GHRH, junto con unos niveles plasmáticos de GH máximos en la tercera semana en los animales tratados diariamente con inyecciones de GHRH podría sugerir la posibilidad de que la hipófisis estuviera comenzando a aumentar su capacidad de respuesta a la administración pulsátil de GHRH. Esto estaría en consonancia con el presumible incremento en el número de receptores hipofisarios para GHRH comentado anteriormente. Barenton y cols (1987) y Kensinger y cols (1987) en corderos y Dubreuil y cols (1987) en cerdos también proponen la existencia de sensibilización tras tratamiento con inyecciones de GHRH a largo plazo.

En lo que se refiere a la acción de la SS, administrada con la GHRH, no varió ninguno de los efectos que ésta última ejerció sobre la célula somatotropa, lo que sugiere un papel preponderante de la GHRH sobre la SS cuando ambos péptidos se infunden conjuntamente. Law y cols (1985) y Blanchard y cols (1987) también observan este hecho en sus estudios *in vitro*.

3.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE IGF-I.

La administración de GHRH de forma pulsátil, aún produciendo un aumento los niveles plasmáticos de GH, no provocó alteraciones significativas en los niveles circulantes de IGF-I. Tampoco lo hizo la infusión continua de GHRH mediante pellet de liberación lenta o mediante bomba osmótica. En consonancia con nuestros datos, Pastoureau y cols (1989) y Godfredson y cols (1990) no vieron alteraciones en la IGF-I plasmática después de tratar a corderos con GHRH a largo plazo, en los que también se había producido una elevación de los niveles plasmáticos de GH al igual que en nuestro caso.

Los corderos utilizados en nuestro estudio y en los de Pastoureau se encontraban en la etapa de crecimiento, en la que, a la vista de nuestros resultados, los niveles plasmáticos de IGF-I parecen ser difícilmente modificables por GHRH. Pastoureau y cols (1989), tras administrar GHRH de forma pulsátil solo consiguieron elevar la IGF-I plasmática en aquellos corderos cuyo peso al nacer fue inferior al normal, y en los que tal vez el eje somatotropo no funcione tan bien como el del animal normal durante esa etapa, confirmando la ineficacia de la GHRH en cuanto a alterar la concentración plasmática de IGF-I en corderos normales durante la etapa de crecimiento.

Bass y cols (1991) y Hua y cols (1995) si aumentaron los niveles circulantes de IGF-I tras la administración pulsátil de GH en corderos de la misma edad que los anteriormente citados. Esto indicaría la posibilidad de incrementar la actividad del eje somatotropo administrando GH en el cordero, en contraposición a lo visto en la rata macho normal, en la que ni siquiera es posible modificar los niveles de IGF-I en plasma tras infusión de GH.

Las inyecciones de SS en combinación con GHRH tampoco variaron los niveles plasmáticos de IGF-I respecto a los de los corderos control.

3.5. PESO CORPORAL.

El peso corporal no se vió aumentado tras el tratamiento con GHRH de forma pulsátil durante 3 semanas. Byrem y cols (1989) y Beermann y cols (1990) administrando una dosis de GHRH similar a la nuestra en forma de inyecciones, pero durante más tiempo que nosotros (5 y 7 semanas respectivamente) si lograron un incremento significativo del peso corporal, por lo que parece que la duración de nuestro tratamiento con inyecciones de GHRH fue demasiado corto como para aumentar el peso del animal.

Los animales utilizados por Byrem y Beermann se encontraban en período de crecimiento, al igual que los nuestros, y en sus trabajos si aumentó el peso empleando GHRH, lo que sugiere que el aumento del peso corporal si es potenciable en dicha etapa del desarrollo administrando GHRH pero durante un período superior a 4 semanas.

Por otro lado, en el citado trabajo de Beermann y en los de Wolfrom y cols (1985) y Johnson y cols (1985), la administración de GH en corderos de la misma edad que los anteriormente citados, produjo una ganancia de peso significativa. Así, todo parece indicar que el cordero es un modelo animal mejor que la rata para el estudio del eje somatotropo durante el período de crecimiento.

En lo que se refiere a la administración continua de GHRH en los corderos, tampoco se produjo un incremento del peso corporal tras 3-4 semanas de tratamiento, al igual que vieron Godfredson y cols (1990) infundiendo en corderos un análogo de GHRH de forma continua durante 28 días. Tampoco Byrem y cols (1989) observaron ninguna alteración del peso corporal en corderos tratados con GHRH de forma continua durante 5 semanas, pero sí cuando la administración de GHRH se realizó mediante inyecciones. Esto podría indicar una mayor efectividad de la infusión pulsátil respecto a la administración continua de GHRH en cuanto a incremento el

peso corporal, corroborando lo anteriormente expuesto en relación con la activación de la liberación hipofisaria de GH. Esta circunstancia también ha sido descrita tras infusión de GHRH a largo plazo en ratas hembras normales y en ratas machos y hembras GMS (Clark y cols 1985, Robinson y Clark 1987, Kovacs y cols 1995).

Tampoco la SS administrada junto con la GHRH modificó el incremento de peso corporal respecto al del animal control, de forma similar a lo expuesto en cuanto a la repercusión de SS sobre los componentes del eje somatotropo.

4. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GH POR GHRH EN TEJIDOS EXTRAHIPOFISARIOS.

Trabajos previos de nuestro grupo tanto in vivo como in vitro han mostrado que la glándula parótida puede asumir funciones hipofisarias, como son la síntesis y la secreción de GH, LH, FSH y TSH, cuando es estimulada convenientemente con hormonas hipotalámicas (Alvarez-Vega y cols 1991, Granados y cols 1993).

Basándonos en esto, nuestro siguiente abordaje experimental fue conocer si la GHRH podía actuar en un tejido no hipofisario de forma similar a como lo hace sobre las células somatotropas. Se eligió la glándula submaxilar en vista del comportamiento del tejido salival ante los péptidos hipotalámicos, colocándose un pellet de liberación lenta de GHRH en el interior de uno de los lóbulos de la glándula submaxilar de ratones normales.

Las altas concentraciones locales que alcanzó la GHRH en la glándula submaxilar durante los dos meses de tratamiento indujeron la síntesis de GH en dicho tejido, como lo demuestran el aumento significativo del contenido de GH por mg de proteína y la estimulación de la expresión de GH en las glándulas tratadas con GHRH. La producción de GH en la glándula submaxilar bajo la acción de la GHRH estaría en relación con la existencia de tumores en los que se detecta GH y actividad de GHRH, y en los que posiblemente dicho péptido fuera el desencadenante de la síntesis y secreción de GH mediante una acción autocrina y/o paracrina (Frohman y cols 1980, Leveston y cols 1981).

El fragmento amplificado en la reacción de la PCR en el tejido hipofisario y en el salival, utilizando cebadores específicos para la amplificación del gen de la GH hipofisaria, fue del tamaño que se esperaba. Esto indicaría que la GH hipofisaria y la producida en la glándula submaxilar comparten gran homología en cuanto a la secuencia génica que les codifica.

En los ratones tratados con GHRH, la producción de GH fue mayor en el lóbulo portador del pellet, debido a que los niveles de GHRH alcanzados en éste fueron más altos que en el contralateral. Parece por tanto que el efecto de la GHRH sobre la síntesis extrahipofisaria de GH es dosis dependiente, de forma similar a como ocurre en la hipófisis (Wehrenberg y cols 1984a). Esta circunstancia indicaría que la GHRH alcanzó el lóbulo contralateral, mediante simple difusión o por vía sanguínea.

La pequeña cantidad de GH determinada mediante RIA en el animal tratado con placebo podría ser el resultado de reacciones inespecíficas de dicha técnica. No obstante, diferentes autores han descrito la producción de GH en tejidos diferentes de las células somatotropas, como los linfocitos (Weigent y cols 1987), la glándula mamaria (Selman y cols 1994) o el cerebro (Lobie y cols 1991).

En relación también con esta posible síntesis basal de GH observada en la glándula submaxilar está el concepto de "transcripción ilegítima", introducido por Chelly y cols (1989), según el cual un gen puede estar expresándose en niveles basales en células en las que no lo hace normalmente y que carecen de los factores de transcripción específicos de tejido de ese gen. Esta transcripción ilegítima podría ser consecuencia de la unión al promotor del gen en cuestión de factores transcripcionales ubicuos. Además, si aceptamos esto, en los animales con pellet de GHRH éste péptido podría estar aumentando la actividad basal del promotor de GH mediante la generación de factores de transcripción como el Pit-1 que se unieran al ADN, tal y como ocurre en la hipófisis (Ruvkun 1992).

La producción de GH en la glándula submaxilar no alteró los niveles circulantes de GH, lo que sugiere que dicha hormona podría estar actuando de forma autocrina o paracrina en el tejido salival.

Por otro lado, la GHRH no modificó el peso del lóbulo portador del pellet ni del contralateral, por lo que aunque ha sido descrita una acción estimulante de la GHRH sobre la actividad proliferativa de células somatotropas en cultivo (Billestrup y cols 1986), la dinámica normal de crecimiento de las células glandulares *in vivo* no se modificó tras el tratamiento con GHRH, al menos durante el tiempo estudiado.

Los presentes resultados, aparte de indicar que la GHRH puede actuar en la glándula submaxilar de forma similar a como lo hace en la hipófisis en cuanto a controlar la síntesis de GH, también demuestran la capacidad del tejido salival de diferenciarse hacia el fenotipo somatotropo cuando es sometido a un estímulo hipotalámico adecuado, corroborando los resultados *in vitro* e *in vivo* que citábamos al inicio de este apartado.

VI. CONCLUSIONES

*** EN LA RATA:**

- ① El tratamiento con GHRH durante una semana en la rata macho puberal no modifica el funcionamiento del eje somatotropo (GHRH/SS - GH - IGF-I).
- ② La administración pulsátil de GHRH durante 19 días en la rata hembra puberal es capaz de disminuir el contenido hipotalámico de SS, aunque no de modificar la tasa de síntesis y secreción de GH de las células somatotropas ni los niveles plasmáticos de IGF-I.
- ③ Asimismo, el tratamiento con GHRH de forma continua en la rata hembra puberal durante 3 semanas estimula la síntesis y secreción de GH hipofisaria, sin modificar ni la actividad de las neuronas somatostatinérgicas ni los niveles circulantes de IGF-I. En ningún caso se producen cambios en el patrón de crecimiento.
- ④ Los efectos del tratamiento con GHRH anteriormente citados a nivel hipotalámico e hipofisario en la rata hembra son revertidos por las inyecciones de SS cuando ambos péptidos se administran conjuntamente.
- ⑤ La rata GMS conserva la capacidad de respuesta hipofisaria de GH al estímulo con GHRH. No obstante, el déficit hipotalámico de GHRH no se restituye completamente mediante el tratamiento con GHRH al menos en las dosis y pautas ensayadas en este trabajo, pues ni los niveles plasmáticos de GH e IGF-I ni la longitud tibial llegan a normalizarse.

*** EN EL CORDERO:**

- ⑥ El tratamiento con GHRH de forma pulsátil durante 3 semanas es capaz de activar la síntesis y secreción de GH, efecto que no se consigue mediante la administración continua del péptido. Ambas pautas de administración aumentan ligeramente el contenido hipotalámico de GHRH de forma semejante, mientras que su acción sobre las neuronas productoras de SS es mayor cuando el tratamiento con GHRH es de forma continua. De ninguna de las maneras se consiguen modificar los niveles plasmáticos de IGF-I ni incrementar el peso corporal.

⑦ Al igual que en la rata hembra, cuando se administran conjuntamente GHRH y SS, ésta contrarresta los efectos de la GHRH a nivel hipotalámico, pero no en la hipófisis, en la que prevalece la acción estimuladora de la GHRH sobre la síntesis y secreción de GH.

*** EN AMBOS MODELOS EXPERIMENTALES:**

⑧ La administración a largo plazo de GHRH no llega a producir desensibilización de la respuesta de GH. En el cordero este tratamiento incluso aumenta la sensibilidad de las células somatotropas frente a la acción de la GHRH.

*** EN EL RATÓN:**

⑨ La GHRH administrada localmente en dosis elevadas en tejidos extrahipofisarios como la glándula submaxilar induce síntesis de GH.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- **Aguila MC, McCann SM.** Calmodulin dependence of somatostatin release stimulated by growth hormone-releasing factor. *Endocrinol* 123: 305-309, 1988.
- **Alba-Roth J, Albrecht MO, Schopohl J, Von Werder K.** Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 1186-1189, 1988.
- **Aleppo G, Moskal SF, De Grandis PA, Kineman RD, Frohman LA.** Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinol* 138: 1058-1065, 1997.
- **Alonso-Sampedro M.** Identificación de una zona de unión para el receptor de la vitamina D en el gen de la hormona de crecimiento humana. *Tesis Doctoral*. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, 1997.
- **Alvarez-Vega P, Gil-Lozaga P, Alvarez-Buylla R, Tresguerres JAF.** Partial pituitary function of parotid gland tissue autotransplanted to the sella turcica after hypophysectomy. *Program of the 73rd Annual Meeting of the Endocrine Society*, Washington DC, 416 (abs), 1991.
- **Arce V, Barros MG, Vara E, Lima L, Tresguerres JAF, Devesa J.** Clonidine potentiates the GH response to a GHRH challenge in hypothalamic GHRH deficient rats. *Neuroendocrinol* 61:552-558, 1995.
- **Arce V, Lima L, Lois N, et al.** Role of central dopaminergic pathways in the neural control of growth hormone secretion in normal men: studies with metoclopramide. *Neuroendocrinol* 53: 143-149, 1991.
- **Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C.** Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74: 237-244, 1993.
- **Argetsinger LS, Hsu GW, Myers MG Jr, Billestrup N, Norstedt G, White MF, Carter-Su C.** Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 270: 14685-14692, 1995.

- **Arilla E, Rodríguez-Sánchez MN, Fragoso J, Barrios V.** Avances en el conocimiento de la estructura molecular y mecanismo de acción de la hormona de crecimiento. En *Hormona de crecimiento*, Hernández M, ed. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, 1-37, 1988.

- **Arsenijevic Y, Rivest R W, Eshkol A, Sizonenko P C, Aubert. M L.** Plasma GH response to intravenous GHRH in adult rats: evidence for transient pituitary desensitization after GHRH stimulation. *Endocrinol* 121: 1487-1496, 1987.

- **Aspenberg P, Hansson LI, Thorngren KG.** Modification of bone formation rate by growth hormone, melanocyte-stimulating hormone, and cortisone in the normal rat. *Acta Anat* 121: 84-88, 1985

- **Aulakh CS, Hill L, Lesch KP, Murphy KL.** Functional subsensitivity of 5-hydroxytryptamine-1c or alpha-2-adrenergic heteroreceptors mediating clonidine-induced growth hormone release in the Fawn-Hooded rat strain relative to the Wistar rat strain. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 1083, 1992.

- **Bach LA, Salemi R, Leeding KS.** Roles of insulin-like growth factor (IGF) receptors and IGF-binding proteins in IGF-II induced proliferation and differentiation of L6A1 rat myoblast. *Endocrinol* 136: 5061-5069, 1995.

- **Bakke JL, Lawrence N, Bennett J, Robinson S, Bowers CY.** Late endocrine effects of administering Monosodium Glutamate to neonatal rats. *Neuroendocrinol* 26:220-228, 1978.

- **Barenton B, Duclos M, Díaz J, Deletang F, Dulong JP, Blanchard M, Charrier J.** Characteristics of growth hormone response to the administration of growth hormone - releasing hormone (GRF) in the lamb. *Reprod Nutr Dev* 27: 491-500, 1987.

- **Barinaga M, Bilezikjian LM, Vale W, Rosenfeld MG, Evans RM.** Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription. *Nature* 314: 279-281, 1985.

- **Bass JJ, Oldham JM, Hodgkinson SC, Fowke PJ, Sauerwein H, Molan P, Breier BH, Gluckman PD.** Influence of nutrition and bovine growth hormone (GH) on hepatic GH binding, insulin-like growth factor-I and growth of lambs. *J Endocrinol* 128:181-186, 1991.

- **Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, De Vries BC.** A specific growth hormone binding-protein in human plasma: initial characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 62: 134-141, 1986.
- **Baumann G.** Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocrine Reviews* 12: 424-449, 1991.
- **Baumbach WR, Horner KL, Logan JS.** The growth hormone binding-protein in rat serum is alternatively spliced form of the rat growth hormone receptor. *Genes Dev* 3: 1199-1205, 1989.
- **Baxter RC, Martin JL.** Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulin like growth factor binding protein in human plasma. *J Clin Invest* 78: 1504-1512, 1986.
- **Becker K, Stegenga S, Conway S.** Role of insulin-like growth factor I in regulating growth hormone release and feedback in the male rat. *Neuroendocrinol* 61: 573-583, 1995.
- **Beermann DH, Hogue DE, Fishell VK, Aronica S, Dickson HW, Schrickler BR.** Exogenous human growth hormone-releasing factor and ovine somatotropin improve growth performance and composition of gain in lambs. *J Anim Sci* 68: 4122-4133, 1990.
- **Bell GI, Gerhards DS, Fong NM, Sánchez-Pescador R, Rall LB.** Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6450-6454, 1985.
- **Bell GI, Reisine T.** Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends Neurosci* 16: 34-38, 1993.
- **Bentham J, Ohlsson C, Lindahl A et al.** A double-staining technique for detection of growth hormone and insulin-like growth factor-I binding to rat tibial epiphyseal chondrocytes. *J Endocrinol* 137: 361, 1993.
- **Benyassi A, Gavaldá A, Armario A, Arancibia S.** Role of somatostatin in the acute immobilization stress-induced GH decrease in rat. *Life Sci* 52: 361-370, 1992.

- **Berelowitz M, Firestone SL, Frohman LA.** Effects of GH excess and deficiency on Hypothalamic SS content and release and on tissue somatostatin distribution. *Endocrinol* 109: 714-719, 1981.

- **Bilezikjian L, Seifert H, Vale W.** Desensitization to growth Hormone-releasing factor (GRF) is associated with down-regulation of GRF-binding sites. *Endocrinol* 118:2045-2052, 1986.

- **Billestrup N, Mitchell RL, Vale W, Verma IM.** Growth hormone-releasing factor induces c-fos expression in cultured primary pituitary cells. *Mol Endocrinol* 1: 300-305, 1987.

- **Billestrup N, Swanson LW, Vale W.** Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6854-6857, 1986.

- **Blanchard MM, Goodyer CG, Charrier J, Dulor JP, Barenton B.** Effects of hypothalamic hormones (GRF, TRH, somatostatin) and insulin-like growth factor I on growth hormone secretion from prepubertal male lamb pituitary cultures. *Reprod Nutr Dev* 27: 471-480, 1987.

- **Bloch R, Ling N, Benoit R, Wehrenberg WB, Guillemin R.** Specific depletion of immunoreactive GRF by MSG in rat median eminence. *Nature* 307: 272-273, 1984.

- **Bloch W.** A Biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochem* 30: 2735 - 2747, 1991.

- **Bluet-Pajot MT, Bertherat J, Epelbaum J, Kordon C.** Neural and pituitary mechanism involved in growth hormone regulation. *J Pediatr Res* 6: 357-369, 1993.

- **Bodner M, Karin M.** A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell* 50: 267-275, 1987.

- **Bowers C Y, Momany FA, Reynolds GA, Hong A.** On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release GH. *Endocrinol* 114: 1537, 1984.

- **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- **Brain C, Thakrar DN, Hindmarsh PC, Brook CG.** Physiological levels of growth hormone fail to suppress growth hormone-releasing hormone (1-29) NH₂-stimulated growth hormone secretion in man. *J Endocrinol Invest* 16: 15-20, 1993.
- **Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al.** Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79, 1973.
- **Byrem TM, Dwyer DA, Aronica SM, Dickson HW, Schricker BR, Beermann DH.** Effects of continuous infusion of human growth hormone releasing factor (hGRF) on lamb growth and composition. *FASEB J* 3: A938 (abs), 1989.
- **Canonico PL, Speciale C, Sortino MA, et al.** Growth hormone releasing factor (GRF) increases free arachidonate levels in the pituitary: a role for lipoxygenase products. *Life Sci* 38: 267-272, 1986.
- **Carlsson L, Jansson JO.** Endogenous growth hormone (GH) secretion in male rats is synchronized to pulsatile GH infusions given at 3 hour intervals. *Endocrinol* 126: 6-10, 1990.
- **Casanueva FF, Villanueva L, Dieguez C, et al.** Free fatty acids (FFA) block GHRH-stimulated GH secretion in man directly at the pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 634-640, 1987.
- **Castrillo JL, Theill LE, Karin M.** Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. *Science* 253: 197-199, 1991.
- **Ceda GP, Davis RG, Rosenfeld RG, Hoffman AR.** The growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH)-GH-somatomedin axis: evidence for rapid inhibition of GHRH-elicited GH release by insulin-like growth factors I and II. *Endocrinol* 122: 855-859, 1987.
- **Cella SG, Locatelli V, Mennini T, Zannini A, Bendotti C, Forloni GL, Fumagalli G, Arce VM, de Gennaro V, Wehrenberg WB, Müller EE.** Deprivation of GHRH early in

the rat's neonatal life permanently affects somatotropic function. *Endocrinol* 127:1625-1634, 1990.

- **Clark RG, Carlsson L, Robinson ICAF.** Growth hormone (GH) secretion in the conscious rat: negative feedback of GH on its own release. *J Endocr* 119: 201-209, 1988a.

- **Clark RG, Carlsson L, Rafferty B, Robinson ICAF.** The rebound release of GH following SS infusion in rats involves hypothalamic GH-releasing factor release. *J Endocr* 119: 397-404, 1988b.

- **Clark RG, Jansson O, Isaksson O, Robinson ICAF.** Intravenous GH: growth responses to patterned infusions in hypox rats. *J Endocrinol* 104:53-61, 1985.

- **Clayton RN, Bailey LC.** Somatostatin partially reverses desensitization of somatotrophs induced by growth hormone-releasing factor. *J Endocrinol* 112: 69-76, 1987.

- **Copeland KC, Underwood LE, Van Wyk JJ.** Induction of immunoreactive somatomedin C in human serum by growth hormone: dose response relationships and effect on chromatographic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 690-697, 1980.

- **Corder R, Saudan P, Mazlan M, McLean C, Gaillard RC.** Depletion of hypothalamic Growth hormone-releasing hormone by neonatal monosodium glutamate treatment reveals an inhibitory effect of betamethasone on GH secretion in adult rats. *Neuroendocrinol* 51: 85-92, 1990.

- **Crawford BA, Handelsman DJ.** Androgen regulate circulating levels of insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-binding protein-3 during puberty in male baboons. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 65-72, 1996.

- **Crawford BA, Martin JL, Howe CJ, Handelsman DJ, Baxter RC.** Comparison of extraction methods for insulin-like growth factor-I in rat serum. *J Endocrinol* 13:169-176, 1992.

- **Cronin MJ, McLeod RM, Canonico PL.** Modification of basal and GRF-stimulated cyclic AMP levels and growth hormone release by phospholipid metabolic enzyme inhibitors. *Neuroendocrinol* 40: 332-338, 1985.

- **Cunningham BC, Well JA.** High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* 244: 1091-1085, 1989.
- **Cuttler L.** The regulation of growth hormone secretion. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 25: 541-571, 1996.
- **Chatelain PG, Van Wik JJ, Copeland KC, Blethen SL, Underwood LE.** Effect of in vitro action of serum proteases or exposure to acid on measurable immunoreactive somatomedin C in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 56: 376 - 383, 1983.
- **Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A.** Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2617-2621, 1989.
- **Chelly J, Kaplan JC, Gautron S, Kahn A.** Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 333 : 858 - 860, 1988.
- **Chen C, Vincent JD, Clarke IJ.** Ion channels and the signal transduction pathways in the regulation of growth hormone secretion. *Trends Endocrinol Metab* 5:227-233, 1994.
- **Chen WY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldaña HA, Gelinás RE, Seeburg PH.** The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics* 4: 479-497, 1989.
- **Chihara K, Minamitani N, Kaji H, Arimura A, Fujita T.** Intraventricularly injected growth hormone stimulates SS release into rat hypophysial portal blood. *Endocrinol* 109: 2279-2281, 1981.
- **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
- **Chou SY, Kostyo JL, Adamafio NA.** Growth hormone inhibits activation of phosphatidylinositol phospholipase C by insulin in ob/ob mouse adipose tissue. *Endocrinol* 126: 62-66, 1990.
- **Chowen JA, Argente J, Gonzalez-Parra S, Garcia-Segura LM.** Differential effects of the neonatal and adult sex steroid environments on the organization and activation

of hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons. *Endocrinol* 133: 2792-2802, 1993.

- **Chowen JA, Steiner RA, Clifton DK.** Sexual dimorphism and testosterone-dependent regulation of somatostatin gene expression in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Endocrinol* 125: 357-362, 1989.

- **Dada MO, Campbell GT, Blake CA.** Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on somatotrophs and GH secretion in prepubertal male and female rats. *Endocrinol* 115:996-1003, 1984.

- **Daughaday WH, Parker KA, Borowsky S, Trivedi B, Kapadia M.** Measurement of somatomedin-related peptides in fetal, neonatal and maternal rat serum by insulin-like growth factor (IGF) I radioimmunoassay, IGF-II radioreceptor assay (RRA) and multiplication-stimulating activity RRA after acid-ethanol extraction. *Endocrinol* 110: 575-581, 1982.

- **Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Van Den Brande JL, Van Wyk JJ.** Somatomedin: proposed designation for sulphatation factor. *Nature Lond* 235: 107, 1972.

- **Daughaday WH, Mariz ID, Blethen SI.** Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor assay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* 51 : 781-788, 1980.

- **Daughaday WH, Rotwein P.** Insulin-like growth factors I and II. Peptide, Messenger Ribonucleic Acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10: 68, 1989.

- **Davis TM, Burrin JM, Bloom SR.** Growth hormone (GH) release in response to GH-releasing hormone in man is 3-fold enhanced by galanin. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 1248-1252, 1987.

- **De Vos A, Ultsch M, Kossiakoff AA.** Human growth hormone DNA sequence and its extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255: 306-312, 1992.

- **Delany AM, Pash JM, Canalis E.** Cellular and clinical perspectives on skeletal insulin-like growth factor I. *J Cell Biochem* 55: 328-333, 1994.
- **Delitalia G, Tomasi PA, Palermo M, Ross RJ, Grossman A, Besser GM.** Opioids stimulate growth hormone (GH) release in man independently of GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 356-358, 1989.
- **Devesa J, Díaz MJ, Tresguerres JAF, Lima L.** Evidence that alpha2-adrenergic pathways play a major role in growth hormone (GH) neuroregulation: alpha2-adrenergic agonism counteracts the inhibitory effect of muscarinic cholinergic receptor blockade on the GH response to GH-releasing hormone, while alpha2-adrenergic blockade diminishes the potentiating effect of increased cholinergic tone on such stimulation in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 251-256, 1991a.
- **Devesa J, García Barros M, Costoya JA, Gondar M, Gavrilina R, Gavrilin M, Arce V.** Expresión de los genes de hormona de crecimiento, variantes moleculares y acciones biológicas de estas variantes. En *Retrasos del crecimiento*, 2ª edición, Moreno Esteban, Tresguerres JAF eds. Ediciones Díaz de Santos SA, Madrid, 29-44, 1996.
- **Devesa J, Lima L, Lois N, et al.** Reasons for the variability in growth hormone (GH) responses to GHRH challenge: the endogenous hypothalamic-somatotroph rhythm (HSR). *Clin Endocrinol (Oxf)* 30: 367-377, 1989.
- **Devesa J, Lois N, Arce V, Díaz MJ, Lima L, Tresguerres JAF.** The role of sexual steroids in the modulation of growth hormone (GH) secretion in humans. *J Steroid Biochem Molec Biol* 40: 165-173, 1991b.
- **Devesa J, Tresguerres JAF.** Control de la secreción de GH. En *Retrasos del crecimiento*, 2ª edición, Moreno Esteban y Tresguerres JAF eds. Ediciones Díaz de Santos SA, Madrid, 45-60, 1996.
- **Devesa J.** Hormona de crecimiento y somatomedinas: acciones biológicas y control de su secreción. En *Fisiología endocrina*, Tresguerres JAF, ed. Eudema, Madrid, 141-178, 1989.

- **Díaz MJ, Domínguez F, Haro LS, Ling N, Deveja J.** A 12 kilodalton N-glycosylated growth hormone-related peptide is present in human pituitary extract. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 134-138, 1993.

- **Dollé P, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M.** Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity. *Cell* 60: 809-820, 1990.

- **Domene H, Krishnamurthi K, Eshet R, Gilad Y, Laron Z, Koch I, Stannard B, Cassorla F, Roberts CT, LeRoith D.** GH stimulates IGF-I and IGFBP3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats. *Endocrinol* 133:675, 1993.

- **Dubreuil P, Brazeau P, Morisset J.** Effects of GHRH with or without a SS antiserum on GH, IGF-I, thyroxin, cholecystokinin, gastrin and metabolite concentrations in growing rats. *Growth Regulation* 4:56-62, 1994.

- **Dubreuil P, Couture Y, Pelletier G, Petitclerc D, Lapierre H, Gaudreau P, Morisset J, Brazeau P.** Effect of long term administration of porcine growth hormone-releasing factor and (or) thyrotropin-releasing factor on GH and thyrosine release in growing pigs. *J Anim Sci* 65: 389 (abs), 1987.

- **Dusanter-Fourt I, Muller O, Iemiecki A, Mayeux P, Drucker B, Djiane J, Wilks A, Harpur AG, Fischer S, Giselsbrecht S.** Identification of JAK protein tyrosin kinases as signaling molecules for prolactin. Functional analysis of prolactin receptor and prolactin-erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells. *The EMBO Journal* 13: 2583-2591, 1994.

- **Eckert KA, Kunkel TA.** High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl Acids Res* 18 : 3739 - 3752, 1990.

- **Eden S.** Age and sex related differences in episodic GH secretion in the rat. *Endocrinol* 105, 555-560, 1979.

- **Evain-Brion D, Porquet D, Therond P, Fjellestad-Paulsen A, Greneche M, Francois L, Czernichow P.** Vitamin A deficiency and nocturnal growth hormone secretion in short children. *Lancet* 343: 87-88, 1994.

- **Fagin JA, Roberts CT, LeRoith D, Brown AT.** Coordinate decrease of tissue insulin-like growth factor I post-transcriptional alternative mRNA transcripts in diabetes mellitus. *Diabetes* 38: 428-434, 1989.
- **Foster CM, Shafer JA, Rozsa FW, et al.** Growth hormone promoted tyrosyl phosphorylation of growth hormone receptors in murine 3T3-F422A fibroblasts and adipocytes. *Biochem* 27: 326-334, 1988.
- **Fraser RA, Siminoski K, Harvey S.** Growth hormone receptor gene: novel expression in pituitary tissue. *J Endocrinol* 128: R9-R11, 1991.
- **Frattali AL, Pessin JE.** Relationship between α subunit ligand occupancy and β subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors. *J Biol Chem* 268: 7393-7400, 1993.
- **Frohman LA, Szabo M, Berelowitz M, Stachura ME.** Partial purification and characterization with growth hormone-releasing activity from extrapituitary tumors in patients with acromegaly. *J Clin Invest* 65: 43-54, 1980.
- **Fukata J, Diamond DJ, Martin JB.** Effects of rat growth hormone (rGH)-releasing factor and somatostatin on the release and synthesis of rGH in dispersed pituitary cells. *Endocrinol* 117: 457-467, 1985.
- **Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, Muller AF.** Tumor necrosis factor inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinol* 127: 101-106, 1990.
- **García-Villalba P, Jiménez-Lara A, Aranda A.** Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. *Mol Cell Biol* 16: 318-327, 1996.
- **Gevers EF, Wit JM, Robinson ICAF.** Growth, Growth Hormone (GH)-binding protein, and GH receptors are differentially regulated by peak and trough components of the GH secretory pattern in the rat. *Endocrinol* 137: 1013-1018, 1996.
- **Gil-Ad Y, Laron Z, Koch Y.** Effect of acute and chronic administration of Clonidine on hypothalamic content of growth hormone-releasing hormone and somatostatin in the rat. *J Endocrinol* 131: 381-385, 1991.

- **Giudice LC.** Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 13: 641-669, 1992.

- **Glasscock G, Hein AN, Miller JA, Hintz RL, Rosenfeld RG.** Effects of continuous infusion of insulin-like growth factor I and II, alone and in combination with thyroxine or growth hormone, on the neonatal hypophysectomized rat. *Endocrinol* 130: 203-210, 1992.

- **Godfredson JA, Wheaton JE, Crooker BA, Wong EA, Campbell RM, Mowles TF.** Growth performance and carcass composition of lambs infused for 28 days with a Growth Hormone-releasing factor analogue. *J Anim Sci* 68: 3624-3632, 1990.

- **González D, López F, Hernández G, Sánchez-Criado J, Aguilar E.** Body growth and puberty remain unchanged in female rats after daily treatment with GRF (1-29)-NH₂. *Endocrinología* 1:13-16. 1989.

- **Goodyer CG, De Stephano L, Guyda HJ, Posner BI.** Effects of insulin-like growth factors on adult male rat pituitary function in tissue culture. *Endocrinol* 115: 1559-1576, 1984.

- **Goth CI, Lyons CE, Canny BJ, Thorner MO.** Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, growth hormone (GH)-releasing peptide and GH-releasing hormone stimulate GH release through distinct pituitary receptors. *Endocrinol* 130: 939-944, 1992.

- **Gourmelen M, Emperauger B, Binoux M.** IGF and their binding proteins in early years of life . En *Hormonal Regulation Growth*, Frisch and Thorner eds, Raven Press, New York, 113, 1989.

- **Granados B, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF.** Adrenal and parotid tissue autotransplantation to the sella turcica are able to partially recover gonadotrophic function in hypophysectomized rats. *J Endocrinol Inves* 16: 116, 1993.

- **Grant M, Jerdan J, Merimee TJ.** Insulin-like growth factor-I modulates endothelial cell chemotaxis. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 370-371, 1987.

- **Groesbeck M D, Parlow A F, Daughaday W H.** Stimulation of supranormal Growth in prepubertal, adult plateaued, and hypophysectomized female rats by large doses of

- rat GH: physiological effects and adverse consequences. *Endocrinol* 120: 1963-1975, 1987.
- Handelsman DJ, Spaliviero JA, Scott CD, Baxter RC. Hormonal regulation of the peripuberal surge of IGF-I in the rat. *Endocrinol* 120: 491-496, 1987.
- Hanew K, Goh M, Sato S, Shimizu Y, Sasaki A, Aida M, Yoshinaga K. The effects of acute and chronic growth hormone (GH) administration on GH secretion in patients with idiopathic GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 715-721, 1988.
- Hari J, Pierce SB, Morgan DO, Sara V, Smith MC, Roth RA. The receptor for insulin-like growth factor II mediates an insulin-like response. *EMBO J* 6: 3367-3371, 1987.
- Hart IC, Chadwick PME, James S, Simmonds AD. Effect of intravenous bovine growth hormone or human pancreatic growth hormone-releasing factor on milk production and plasma hormones and metabolites in sheep. *J Endocrinol* 105:189-196, 1985.
- Harvey S. Thyrotropin-releasing hormone: a growth hormone-releasing factor. *J Endocrinol* 125: 345-358, 1990.
- Hermanussen M, Rol De Lama MA, Burmeister J, Tresguerres JAF. Mikroknemometry: an accurate technique of growth measurement in rats. *Physiology and Behaviour* 58: 347 - 352, 1995.
- Hintz RL. Somatomedines. In *Advances in Pediatrics*, Barners LA ed, Year Book Medical Published, 68: 293. 1984.
- Horikawa R, Hellmann P, Cella S G, Torsello A, Day RN, Muller EE, Thorner MO. Growth Hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinol* 137:2642-2645, 1996.
- Horvath S, Palkovits M. Synaptic interconnections among growth hormone-releasing hormone (GHRH)-containing neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinol* 48: 471-476, 1988.

- **Hu Z, Friberg R, Barkan A L.** Ontogeny of GH mRNA and GH secretion in male and female rats: regulation by GHRH. *Am J Physiol* 265: E236-E242, 1993.
- **Hua KM, Hodgkinson SC, Bass JJ.** Differential regulation of plasma levels of insulin-like growth factors I and II by nutrition, age and growth hormone treatment in sheep. *J Endocrinol* 147: 507-516, 1995.
- **Hulse JA, Rosenthal SM, Cuttler L, Kaplan SL, Grumbach MM.** The effects of pulsatile administration, continuous infusion, and diurnal variation on the growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 872-878, 1986.
- **Hull KL, Fraser RA, Harvey S.** Expression and translation of the growth hormone receptor gene in chicken pituitary glands. *J Endocrinol* 135: 459-468, 1993.
- **Hunter WM, Greenwood FC.** Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature* (London) 194 : 495, 1962.
- **Hynes MA, Van Wyk JJ, Brooks PJ, D'Ercole AJ, Jansen M, Lund PK.** Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol* 1: 233-242, 1987.
- **Isaacs RE, Findell PR, Mellon P, Wilson CB, Baxter JD.** Hormonal regulation of expression of the endogenous and transfected human growth hormone gene. *Mol Endocrinol* 1: 569-576, 1987.
- **Isaksson OCP, Eden S, Jansson JO.** Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Ann Rev Physiol* 47: 483-499, 1985.
- **Izdebski J, Pinski J, Horvath JE, Halmos G, Groot K, Schally AV.** Synthesis and biological evaluation of superactive agonists of growth hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4872-4876, 1995.
- **Jansson JO, Carlsson L, Isaksson O.** Growth hormone(GH)-releasing factor (GRF) pretreatment enhances the GRF-induced GH secretion in rats with the pituitary autotransplanted to the kidney capsule. *Endocrinol* 116: 95-98, 1985a.

- **Jansson JO, Eden S, Isaksson O.** Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 6: 128, 1985b.
- **Johnsson ID, Hart IC, Butler-Hogg BW.** The effects of exogenous bovine growth hormone and bromocriptine on growth, body development, fleecweight and plasma concentrations of growth hormone insulin and prolactin in female lambs. *Anim Prod* 41:20, 1985.
- **Jones JI, Clemmons DR.** Insulin-like growth factors and their binding proteins, biological actions. *Endocr Rev*, 16: 3-34 1995.
- **Kabayama Y, Kato Y, Murakami Y, Tanaka H, Imura H.** Stimulation by alpha-adrenergic mechanism of the secretion of growth hormone-releasing factor (GRF) from perfused rat hypothalamus. *Endocrinol* 119: 432-434, 1986.
- **Karin M, Theill L, Castrillo JL, McCormick A, Brady H.** Tissue-specific expression of the growth hormone gene and its control by growth hormone factor-I. *Rec Prog Horm Res* 46: 43-47, 1990.
- **Katakami H, Arimura A, Frohman LA.** Growth hormone (GH)-releasing factor stimulates hypothalamic somatostatin release: an inhibitory feedback effect on GH secretion. *Endocrinol* 118: 1872-1877, 1986a.
- **Katakami H, Downs TR, Frohman LA.** Decreased hypothalamic growth hormone-releasing hormone content and pituitary responsiveness in hypothyroidism. *J Clin Invest* 77: 1704-1711, 1986b.
- **Katakami H, Downs TR, Frohman LA.** Inhibitory effect of hypothalamic medial preoptic area somatostatin on growth hormone-releasing factor in the rat. *Endocrinol* 123: 1103-1109, 1988.
- **Katakami H, Kato Y, Matsushita N, Imura H.** Effects of neonatal treatment with MSG on GH release induced by clonidine and PG E1 in conscious male rats. *Neuroendocrinol* 38:1-5, 1984.
- **Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto R, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG.** Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 619-637, 1996.

- **Kelly KW.** The role of growth hormone in modulation of the immune response. *Ann NY Acad Sci* 265: 19947-19954, 1990.
- **Kensinger RS, McMunn LM, Stover RK, Schricker BR, Maccicchini ML, Harpster HW, Kavanaugh JF.** Plasma somatotropin response to exogenous growth hormone releasing factor in lambs. *J Anim Sci* 64: 1002-1009, 1987.
- **Kitajima N, Chihara K, Abe H, et al.** Effects of dopamine on immunoreactive growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion from rat hypothalamic slice perfused in vitro. *Endocrinol* 124: 69-76, 1989.
- **Kojima L, Nishimoto Y, Iiri R, Ogata E, Rosenfeld R.** Evidence that type II insulin-like growth factor receptor is coupled to calcium gating system. *Biochem Biophys Res Commun* 154: 9-19, 1988.
- **Kovacs M, Fánicsik A, Hrabovsky E, Mezö Y, Teplán Y, Flerkö B.** Effects of continuous and repetitive administration of a potent analog of GHRH (1-30)-NH₂ on the GH release in rats treated with monosodium glutamate. *J Neuroendocr* 7:703-712, 1995.
- **Kovacs M, Fancsik A, Mezo Y, Teplan Y, Flerko B.** Effects of continuous and repetitive administration of a potent analog of GHRH 1-30NH₂ on the GH release in rats. *Neuroendocrinol* 59:371-379, 1994.
- **Kovacs M, Halmos G, Groot K, Izdebski J, Schally AV.** Chronic administration of a new potent agonist of GHRH induces compensatory linear growth in GHRH deficient rats: mechanism of action. *Neuroendocrinol* 64:169-176, 1996a.
- **Kovacs M, Zaranki M, Halmos G, Groot D, Schally AV.** Effects of acute and chronic administration of a new potent antagonist of GHRH in rats: Mechanism of action. *Endocrinol* 137:5364-5369, 1996b.
- **Kraicer J, Sheppard MS, Luke J, Lussier B, Moor BC, Cowan JS.** Effect of withdrawal of somatostatin and growth hormone-releasing factor on GH release in vitro. *Endocrinol* 122: 1810-1815, 1988.
- **Krieg RJ, Perkins SN, Johnson JH, Rogers JP, Arimura A, Cronin MJ.** Beta-adrenergic stimulation of growth hormone (GH) release in vivo, and subsequent

inhibition of GH-releasing factor-induced GH secretion. *Endocrinol* 119: 432-434, 1986.

- **Krulich L, Hefco, Illner P, Read CB.** The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH and GH in the normal male rat, with comments of their statistical evaluation. *Neuroendocrinol* 16:293-311, 1974.

- **Kubota A, Nakagawa Y, Igarashi Y.** Studies of gene expression in liver of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGFBP3 and GH receptor/GH binding protein in rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Horm Metab Res* 26: 497-503, 1994.

- **Lamberts SWJ, Uitterlinden P, Del Pozo E.** SMS 201-995 induces a continuous decline in circulating growth hormone and somatomedin-C levels during therapy of acromegalic patients for over two years. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 703-710, 1987.

- **Lanzi R, Tannenbaum GS.** Time course and mechanism of GH's negative feedback effect on its own spontaneous release. *Endocrinol* 130: 780-788, 1992.

- **Law GJ, Ray KP, Wallis M.** Effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin on growth hormone secretion and cellular cyclic AMP levels. Cultured ovine and rat anterior pituitary cells show markedly different responses. *FEBS Lett* 179: 12-16, 1985.

- **Lee GY, Rechler MM.** Proteolysis of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 (IGFBP-3) in 150 KDa IGFBP complexes by a cation-dependent protease activity in adult rat serum promotes the release of bound IGF-I. *Endocrinol* 137: 2051-2058, 1996.

- **Leidy JW Jr, McDermott MT, Robbins RJ.** Effect of hypophysectomy and growth hormone administration on hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin content: relationship to age-related growth rate. *Neuroendocrinol* 51: 400-405, 1990.

- **LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr.** Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143-163, 1995.

- **Leung DW, Spencer SA, Cachianes G.** Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330: 537, 1987.

- **Leveston SA, McKeel DW Jr, Buckley PJ, Deschryver D, Greider MH, Jaffe BM, Daughaday WH.** Acromegaly and Cushing's syndrome associated with a foregut carcinoid tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 682-689, 1981.

- **Lima L, Arce V, Diaz MJ, Tresguerres JAF, Devesa J.** Glucocorticoids may inhibit GH release by enhancing beta adrenergic responsiveness in hypothalamic somatostatin neurons. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 439-444, 1993a.

- **Lima L, Arce V, Tresguerres JAF, Devesa J.** Clonidine potentiates the growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in norepinephrine synthesis-inhibited rats. Evidence for an alpha-2-adrenergic control of hypothalamic release of somatostatin. *Neuroendocrinol* 57: 1155-1160, 1993b.

- **Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG.** Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone-releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360: 765-768, 1992.

- **Lindahl A, Isgaard J, Carlsson I, et al.** Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages. *Endocrinol* 121: 1061, 1987.

- **Lipkin SM, Naar AM, Kalla KA, Sack RA, Rosenfeld MG.** Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone expression. *Gene Dev* 7: 1674-1687, 1993.

- **Liposits ZS, Merchenthaler I, Paull WK, Flerko B.** Synaptic communications between somatostatinergic axons and growth hormone-releasing factor synthesizing neurons in the arcuate nucleus of the rat. *Histochemistry* 89: 247-252, 1988.

- **Lobie PE, Barnard R, Water MJ.** The nuclear growth hormone receptor binding pretein. *J Biol Chem* 266: 22645-22652, 1991.

- **Lobie PE, Mertani H, Morel G, Morales-Bustos O, Norstedt G, Waters MK.** Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone. *J Biol Chem* 269: 21330-21339, 1994.

- **Losa M, Bork L, Schopahl J, Stalla GH, Miller OA, Von Werber K.** Growth hormone-releasing factor infusion does not sustain elevated GH levels in normal subjects. *Acta Endocrinol* 107: 462-470, 1984.
- **Lumpkin MD, Hartmann DP.** Recombinant human interleukin-1 beta acts within the hypothalamic arcuate nucleus to inhibit pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinol Abs* 789, 1989.
- **Lumpkin MD, Negro-Vilar A, McCann SM.** Paradoxical elevation of GH by intraventricular somatostatin: possible ultrashort-loop feedback. *Science* 211:1072-1074. 1981.
- **Lumpkin MD, Samson WK, McCann SM.** Effects of intraventricular GRF on GH release: further evidence for ultrashort loop feedback. *Endocrinol* 116: 2070-2074, 1985.
- **Llorens-Cortes C, Bertherat J, Jomary C, Kordon C, Epelbaum J.** Regulation of somatostatin synthesis by GABA stimulation in mouse brain. *Mol Brain Res* 13: 277-281, 1992.
- **Maeda K, Frohman LA.** Release of somatostatin and thyrotropin-releasing hormone from rat hypothalamic fragments in vitro. *Endocrinol* 106, 1837-1839, 1980.
- **Magnan E, Cataldi M, Guillaume V, Conte-Devolx B, Graziani N, Figaroli JC, Thomas F, Chihara K, Oliver C.** Acute changes in growth hormone-releasing hormone secretion after injection of BIM 23014, a long acting somatostatin analog, in rams. *Life Sci* 51: 831-838, 1992.
- **Maiter D, Gabriel S, Leing J, Russell W, Martin JB.** Sexual differentiation of GH feedback effects on hypothalamic GHRH and SS. *Neuroendocrinol* 51:174-180, 1990.
- **Maiter D, Underwood LE, Martin JB, Koenig JI.** Neonatal treatment with GMS: effects of prolonged GHRH deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinol* 128:1100-1106, 1991.
- **Mathews LS, Norstedt G, Palmiter RD.** Regulation of insulin-like growth factor-I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9343-9347, 1989.

- **Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J.** Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinol* 136: 4147-4150, 1995.
- **Matsumura M, Yamanoi A, Yamamoto S, et al.** In vivo and in vitro effects of cholecystokinin octapeptide on the release of growth hormone in rats. *Horm Metab Res* 16: 626-630, 1984.
- **Melmed S, Neilson L, Slanina S.** Insulin suppresses rat growth hormone mRNA levels in rat pituitary tumor cells. *Diabetes* 34: 408-412, 1985.
- **Merchenthaler I, Lopez FJ, Negro-Vilar A.** Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol* 40: 711-769, 1993.
- **Merchenthaler I, Vigh S, Schally AV, Petrusz P.** Immunocytochemical localization of growth hormone-releasing hormone in rat hypothalamus. *Endocrinol* 114: 1082-1085, 1984.
- **Miki N, Ono M, Shizume K.** Withdrawal of endogenous SS induce secretion of growth hormone-releasing factor in rats. *J Endocrinol* 117: 245-252, 1988.
- **Millard W J, Martin J B Jr, Audet J, Sagar S M, Martin JB.** Evidence that reduced GH secretion observed in Monosodium Glutamate-treated rats is the result of a deficiency in Growth Hormone-releasing factor. *Endocrinol* 110:540-550, 1982.
- **Minami S, Suzuki N, Sugihara H, Tamura H, Emoto N, Wakabayashi I.** Microinjection of rat GH but not human IGF-I into a defined area of the hypothalamus inhibits endogenous GH secretion in rats. *J Endocrinol* 153: 283-290, 1997.
- **Mitsugi N, Arita J, Kimura F.** Effects of intracerebroventricular administration of GHRH and CRH on somatostatin secretion into rat hypophysial portal blood. *Neuroendocrinol* 51:93, 1990.
- **Mohan S, Nakao Y, Honda Y, Landale E, Leser U, Dony C, Lang K, Baulink DJ.** Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem* 270: 20424-20431, 1995.

- **Moller C, Hansson A, Enberg B, Lobie PE, Norstedt G.** Growth hormone (GH) induction of tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in cells transfected with rat GH receptor cDNA. *J Biol Chem* 267: 403-408, 1992.
- **Morin A, Louette J, Voz MLJ, Tixier-Vidal A, Belayew A, Martial JA.** Triiodothyronine inhibits transcription from the human growth hormone promoter. *Mol Cell Endocrinol* 71: 261-267, 1990.
- **Moses AC, Nissley SP, Short PA, Rechler MM, White RM, Knight AB, Higa OZ.** Increased levels of multiplication-stimulating activity, an insulin-like growth factor, in fetal rat serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 3649-3653, 1980.
- **Mougin C, Brazeau P, Ling N et al.** Roles of cyclic AMP and calcium in the mechanism of the release of growth hormone by somatocrinin. *CR Acad Sci (Paris)* 299: 83-88, 1984.
- **Muller EE.** Neural control of somatotrophic function. *Physiol Rev* 67: 962-1053, 1987.
- **Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263 - 273, 1986.
- **Murakami Y, Kato Y, Kabayama Y, Inoue T, Koshiyama H, Imura H.** Involvement of hypothalamic growth hormone-releasing factor in GH secretion induced by intracerebroventricular injection of somatostatin in rats. *Endocrinol* 120: 311-316, 1987.
- **Murakami Y, Kato Y, Kabayama Y, Tojo K, Inoue T, Imura H.** Involvement of growth hormone (GH)-releasing factor in GH secretion induced by serotonergic mechanism in conscious rats. *Endocrinol* 119: 1089-1092, 1986.
- **Nemeroff CB, Konkol RJ, Bissette G, Youngblood W, Martin JB, Brazeau P, Rone MS, Prange Jr A J, Breese GR, Kizer JS.** Analysis of the disruption in hypothalamic-pituitary regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG): evidence for the involvement of tuberoinfundibular cholinergic and dopaminergic systems in neuroendocrine regulation. *Endocrinol* 101: 613, 1977.

- **Newman CB, Melmed S, Snyder PJ et al.** Safety and efficacy of long term octreotide therapy of acromegaly: results of a multicenter trial in 103 patients. A clinical Research Center Study. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2768-2775, 1995.

- **Nishimoto L, Murayama Y, Katada T, Ui M, Ogata E.** Possible direct linkage of insulin-like growth factor-II receptor with guanine nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem* 264: 14029-14038, 1989.

- **O'Carroll AM, Krempels K.** Widespread distribution of somatostatin receptors messenger ribonucleic acids in rat pituitary. *Endocrinol* 136: 5224-5227, 1995.

- **Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kin HS, Wilson EM, Rosenfeld RG.** Synthesis and characterization of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-7. *J Biol Chem* 271: 30322-30325, 1996.

- **Orlowski CC, Chernausek SD.** Discordance of serum and tissue somatomedin levels in growth hormone-stimulated growth in the rat. *Endocrinol* 122: 44-49, 1988.

- **Pan WT, Liu QR, Bancroft C.** Identification of a growth hormone gene promoter repressor element and its cognate double and single-stranded DNA-binding proteins. *J Biol Chem* 265: 7022-7028, 1990.

- **Pastoureau P, Charrier J, Blanchard M, Boivin G, Dulor JP, Theriez M, Barenton B.** Effects of a chronic GRF treatment on lambs having low or normal birth weight. *Domest Anim Endocrinol* 6: 321-329, 1989.

- **Patel YC.** Growth hormone stimulates hypothalamic somatostatin. *Life Sciences* 24: 1589-1594, 1979.

- **Pellegrini E, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Bennett P, Kordon C, Epelbaum J.** Central administration of a growth hormone (GH) receptor mRNA antisense increases GH pulsatility and decreases hypothalamic somatostatin expression in rats. *J Neurosc* 16: 8140-8148, 1997.

- **Penhoat A, Naville D, Jaillard C, Chatelain PG, Saez JM.** Hormonal regulation of insulin-like growth factor I secretion by bovine adrenal cells. *J Biol Chem* 264: 6858-6862, 1989.

- **Pérez-Romero A, Rol de Lama MA, Tresguerres JAF, Ariznavarreta C.** Dimorfismo sexual en el patrón de crecimiento de la rata. *Endocrinología* 42: 59A (abs), 1995.
- **Peterfreund RA, Vale W.** SS analogs inhibits SS secretion from cultured hypothalamic cells. *Neuroendocrinol* 39: 397, 1984.
- **Plotsky PM, Vale W.** Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science* 230: 461, 1985.
- **Powell DR, Suwanichkul A, Cabbage ML, Depaolis LA, Snuggs MB, Lee PDK.** Insulin inhibits transcription of the human gene for insulin-like growth factor binding protein-1. *J Biol Chem* 266: 18868-18876, 1991.
- **Pradayrol L, Jörnvall H, Mutt V, Ribet A.** N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 109: 55-58, 1980.
- **Prager D, Melmed S.** Insulin regulates expression of the human growth hormone gene in transfected cells. *J Biol Chem* 263: 16580-16585, 1988.
- **Recommendations from the 3rd International Symposium on Insulin-like Growth Factors.** Valid measurements of total IGF concentrations in biological fluids. *Endocrinol* 136: 816 - 817, 1995.
- **Redding TW, Schally AV, Arimura A, Wakabayashi I.** Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinol* 8 :245-255, 1971.
- **Reichlin S.** Somatostatin. *N Engl J Med* 309: 1495-1501, 1983.
- **Reisine T, Kong H, Raynor K et al.** Molecular biology of somatostatin receptors. En *Molecular and Clinical Advances in Pituitary Disorders*, Melmed S ed. Endocrine Res Educat, Los Angeles, 293-297, 1993.
- **Rhodes SJ, Chen R, DiMattia GE, Scully KM, Kalla KA, Lin SC, Yu VC, Rosenfeld MG.** A tissue-specific enhancer confers Pit-1-dependent morphogen inducibility and autoregulation of the Pit-1 gene. *Genes Dev* 7: 913-932, 1993.
- **Richardson SB, Twente S.** Evidence that diminished pituitary responsivity to GHRF is secondary to intracellular GH pool depletion. *Am J Physiol* 254: E358- E364, 1988.

- **Richardson SB, Twente S.** Inhibition of rat hypothalamic Somatostatin release by somatostatin: evidence for SS ultrashort loop feedback. *Endocrinol* 118: 2076-2982, 1986.

- **Richman RA, Weiss JP, Horberg Z, Florini JR.** Regulation of growth hormone release: evidence against negative feedback in rat pituitary cells. *Endocrinol* 108: 2287-2292, 1981.

- **Ridderstrale M, Tornqvist H.** PI-3-Kinase inhibitor wortmannin blocks the insulin-like effects of growth hormone in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 306-310, 1994.

- **Rinderknecht E, Humbel RE.** The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776, 1978.

- **Rivier J, Brazeau P, Vale W, Guillemin R.** Somatostatin analogs: relative importance of the disulphide bridge and of the Ala-Gly side chain for biological activity. *M Med Chem* 18: 123-126, 1975.

- **Rivier J, Brown M, Vale W.** Effects of neurotensin, substance P, and morphine sulfate on secretion of prolactin and growth hormone in the rat. *Endocrinol* 100: 7551-7554, 1977.

- **Robinson BM, Friberg RD, Bowers CY, Barkan AL.** Acute growth hormone (GH) response to GH-releasing hexapeptide in humans is independent of endogenous GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1121-1124, 1992.

- **Robinson ICAF, Clark RG.** The secretory pattern of GH and its significance for growth in the rat. En *GH: Basic and Clinical Aspects*, Isaksson O et al, eds. Elsevier Science Publisher BV (Biomedical Division), Amsterdam, 109-127, 1987.

- **Rodríguez-Tarduchy G, Collins MK, García I, Loópez-Rivas A.** Insulin-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3 dependent hemopoietic cells. *J Immunol* 149: 535-540, 1992.

- **Rogers KV, Vician L, Steiner RA, Clifton DK.** The effect of hypophysectomy and GH administration on pre-prosomatostatin mRNA in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Endocrinol* 122:586-591, 1988.
- **Rol de Lama MA, Pérez-Romero A, Ariznavarreta C, Hermanussen M, Tresguerres JAF.** Periodic growth in rats. *Ann Human Biol* 1997, (en prensa).
- **Rose SR, Municchi G, Barnes KM, et al.** Spontaneous growth hormone secretion increases during puberty in normal girls and boys. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 428-435, 1991.
- **Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG.** Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. *J Biol Chem* 261: 4828-4832, 1986.
- **Rotwein P.** Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 5:3,1991.
- **Russell SM, Spencer EM.** Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrinol* 116: 2563, 1985.
- **Ruvkun G.** A molecular growth industry. *Nature* 360: 711-712, 1992.
- **Salmon WD, Daughaday WH.** A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49:825-836, 1957.
- **Sap J, Magistris L, Stunnenberg H, Vennstrom B.** A major thyroid hormone response element in the third intron of the rat growth hormone gene. *EMBO J* 9: 887-896, 1990.
- **Sartorio A, Spada A, Bochicchio A, Atterato F, Morabito F, Faglia G.** Effect of thyrotropin-releasing hormone on GH release in normal subjects pretreated with human pancreatic GHRH (1-44) pulsatile administration. *Neuroendocrinol* 44: 470-479, 1986.
- **Sato M, Chihara K, Kita R, Kashio Y, Okimura Y, Kitajima N, Fujita T.** Physiological role of SS-mediated autofeedback regulation for GH: importance of GH

in triggering SS release during a trough period of pulsatile GH release in conscious male rats. *Neuroendocrinol* 50:139-151, 1989.

- **Sato M, Frohman LA.** Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinol* 133: 793-799, 1993.

- **Sato M, Takahara J, Fijioaka Y, Niimi M, Irino S.** Physiological role of GRF and somatostatin in the dynamics of GH secretion in adult male rat. *Endocrinol* 123: 1928-1933.1988.

- **Schaufele F, West BL, Baxter JD.** Synergist activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6: 656-665, 1992.

- **Schaufele F, West BL, Reudelhuber TL.** Overlapping Pit-1 and Sp1 binding are both essential to full rat growth hormone gene promoter activity despite mutually exclusive Pit-1 and Sp1 binding. *J Biol Chem* 265: 17189-17196, 1990.

- **Schlechter NL, Russell SM, Spencer EM, et al.** Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7932, 1986.

- **Schwander J, Hauri C, Zapf J, Froesch ER.** Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver. Dependence on growth hormone status. *Endocrinol* 113: 297, 1983.

- **Seifert H, Perrin M, Rivier J, et al.** Binding sites for growth hormone releasing factor on rat pituitary cells. *Nature* 313: 487-489, 1985.

- **Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, Van Garderen E, Rijnberk A.** Progesterin induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinol* 134: 287-292, 1994.

- **Sell C, Baserga R, Rubin R.** Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 55: 303-306, 1995.

- **Sharp ZD, Cao Z.** Regulation of cell-type-specific transcription and differentiation of the pituitary. *Bioassays* 12: 80-85, 1990.
- **Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME.** CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylation by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252:1427-1430, 1991.
- **Sheppard AR, Zhang W, Eberhardt NL.** Two CGTCA motifs and a GHF1/Pit-1 binding site mediate cAMP-dependent protein kinase A regulation of human growth hormone gene expression in rat anterior pituitary GC cells. *J Biol Chem* 269: 1804-1814, 1994.
- **Shimatsu A, Rotwein P.** Sequence of two rat insulin-like growth factor I mRNAs differing within the 5' untranslated region. *Nucleic Acids Research* 15: 7196, 1987.
- **Silva CM, Day RN, Weber ML, Thorner MO.** Human growth hormone (GH) receptor is characterized as the 134-kilodalton Tyrosine-Phosphorylated protein activated by GH treatment in IM-9 cells. *Endocrinol* 133: 2307-2312, 1993.
- **Slama A, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Videau C, Kordon C, Epelbaum J.** ¹²⁵I-SS-labeled cells in the anterior arcuate nucleus mediate SS effects on GH but not PRL secretion. *Neuroendocrinol* 58: 178-184, 1993.
- **Slater EP, Rabenau O, Karin M, Baxter JD, Beato M.** Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol Cell Biol* 5: 2984-2992, 1985.
- **Smith WC, Kuniyoshi J, Talamantes F.** Mouse serum growth hormone serum (GH) binding protein has GH receptor extracellular and substitutes transmembrane domains. *Mol Endocrinol* 3: 984-990, 1989.
- **Sotiropoulos A, Goujon L, Simonin G, Kelly PA, Postel-Vinay MC, Finidori J.** Evidence for generation of the growth hormone-binding protein through proteolysis of the growth hormone membrane receptor. *Endocrinol* 132: 1863-1865, 1993.
- **Sotiropoulos A, Moutoussamy S, Renaudie F, Martine C, Kayser C, Gouilleux F, Kelley PA, Finidori J.** Differential activation of Stat 3 and Stat 5 by distinct regions of the growth hormone receptor. *Mol Endocrinol* 10: 998-1009, 1996.

- **Soya H, Suzuki M.** SS rapidly restores rat Growth Hormone (GH) release response attenuated by prior exposure to human GH-releasing factor in vitro. *Endocrinol* 122: 2492-2498. 1988.

- **Spagnoli A, Rosenfeld RG.** The mechanism by which growth hormone brings about growth. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25: 615-631, 1996.

- **Spangelo BL, MacLeod RM, Isakson PC.** Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinol* 126: 582-586, 1990.

- **Spencer GS, Aitken WM, Hodgkinson SC, Bass JJ.** Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in sheep. V. Growth hormone releasing factor and thyrotrophin releasing hormone. *Domes Anim Endocrinol* 9: 115-123, 1992.

- **Spencer GS, Hallett KG.** Somatostatin antagonist analogue stimulates growth in rats. *Life Sci* 37: 27-30, 1985.

- **Spindler SR, Mellon SH, Baxter JD.** Growth hormone gene transcription is regulated by thyroid and glucocorticoid hormones in cultured rat pituitary tumor cells. *J Biol Chem* 257: 11627-11632, 1982.

- **Spinedi E, Johnston C, Negro-Vilar A.** Increased responsiveness of the hypothalamic-pituitary axis after neurotoxin-induced denervation. *Endocrinol* 115: 267-272, 1984.

- **Struthers RS, Gaddy-Kurlen D, Vale W.** Activin inhibits binding of transcription factor Pit-1 to the growth hormone promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11451-11455, 1992.

- **Takahashi T, Okimura Y, Yoshimura K, Shigeyoshi Y, Kaji H, Abe H, Chihara K.** Regional distribution of GHRH receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinol* 136:4721-4724, 1995.

- **Tannenbaum GS, Ling N.** The interrelationship of growth hormone (GH) releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinol* 115: 1952- 1957, 1984.

- **Tannenbaum GS, Martin JB.** Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinol* 98: 562-570, 1976.
- **Tannenbaum GS, Mc Arthy GF, Zeitler P, Beaudet A.** Cysteamine-induced enhancement of GHRH immunoreactivity in the arcuate neurons: morphological evidence for putative SS/GRF interaction within the hypothalamus. *Endocrinol* 127: 2551-2560, 1990.
- **Tannenbaum GS.** Growth hormone-releasing factor: direct effects on growth hormone, glucose, and behavior via the brain. *Science* 226: 464, 1984.
- **Tasaka K, Kasahara K, Masumoto N, Mizuki J, Kurachi H, Miyake A, Tanizawa O.** Activin A increases cytosolic free calcium concentration in rat pituitary somatotropes. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 974-980, 1992.
- **Terry LC, Epelbaum J, Martin JB.** Monosodium glutamate: acute and chronic effects on rhythmic GH and PRL secretion, and somatostatin in the undisturbed male rat. *Brain Res* 217: 129-142, 1981.
- **Terry LC, Willoughby P, Brazeau P, Martin JB.** Antiserum to somatostatin prevents stress-induced inhibition of GH secretion in the rat. *Science* 192: 565, 1976.
- **Theill LE, Karin M.** Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endoc Rev* 14: 670-689, 1993.
- **Thorell SL, Johansson BG.** Enzymatic iodination of polypeptides with ¹³¹I to high specific activity. *Biochem Biophys Acta* 251 : 363 - 366, 1971.
- **Treacy MN, Ryan F, Martin F.** Functional glucocorticoid inducible enhancer activity in the 5'-flanking sequences of the rat growth hormone gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38: 1-15, 1991.
- **Tresguerres JAF, Moreno B, Lorenzo L, Garrido M, Devesa J.** GRF 1-29-NH₂ : new diagnostic and therapeutical perspectives. En *Two decades of experience in growth*. Pombo M, Rosenfeld RG eds. Serono Symposia Publications, Raven Press, 199: 239, 252, 1993.
- **Tresguerres JAF, Moreno B, Rejas J, Devesa J.** Diagnostic and therapeutical potential of GRF 1-29 NH₂ in growth disorders. En *Reproduction, growth and*

development. Negro-Vilar A, Pérez-Palacios G eds. Raven Press, Serono Symposia Series, 71: 99-109, 1991.

- **Tresguerres JAF, Pérez-Romero A, Rol de Lama MA, Granados B, Hermanussen M, Ariznavarreta RC.** Minigrowth spurts: influence of sexual hormones and GH. En *Puberty: basic and clinical aspects. Frontiers in Endocrinology*. Bergada C, Moguilevsky JA, eds. Ares-Serono Symposia Publications, 10: 225-237, 1995.

- **Tresguerres JAF, Rol de Lama MA, Pérez-Romero A, Granados B, Hermanussen M, Ariznavarreta C.** El crecimiento como fenómeno oscilatorio. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*. Tomo CXI, cuaderno cuarto, 1994.

- **Tseng LHY, Brown AL, Yang YWH et al.** The fetal rat binding protein for insulin-like growth factors is expressed in the choroid plexus and cerebrospinal fluid of adult rats. *Mol Endocrinol* 3: 1559-1568, 1989.

- **Turner JP, Tannenbaum GS.** In vivo evidence of a positive role for somatostatin to optimize pulsatile GH secretion. *Am J Physiol* 269: E683-E690, 1995.

- **Tzanela M, Guyda H, Van Vliet G, Tannenbaum GS.** Somatostatin pretreatment enhances GH responsiveness to GHRH: a potential new diagnostic approach to GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2487-2494, 1996.

- **Uchiyama T, Kaji H, Abe H, Chihara K.** Negative regulation of hypothalamic growth hormone-releasing factor messenger ribonucleic acid by Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor I. 1994.

- **Umesono K, Giguere V, Glass CK, Rosenfeld MG, Evans RM.** Retinoid acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* 336: 262-265, 1988.

- **Vance ML, Kaiser DL, Frohman LA, Rivier J, Vale W, Thorner MO.** Role of dopamine in the regulation of GH secretion: dopamine and bromocriptine augment GHRH-stimulated GH secretion in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 1136-1141. 1987.

- **Vance ML, Kaiser KL, Evans WS, Furlanetto R, Vale W, Rivier J, Thorner MO.** Pulsatile GH secretion in normal man during a continuous 24 hours infusion of human

growth hormone-releasing factor (1-40): evidence for intermittent somatostatin secretion. *J Clin Invest* 75: 1584-1590, 1985.

- **Vara E.** Estudio de la secreción hormonal y metabolismo de la glucosa en islotes de Langerhans aislados durante el ayuno prolongado. Efecto del ácido 2-bromoesteárico. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid. 1982.

- **Vigh S, Arimura A, Kovacs K, et al.** Immunohistochemical localization of the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), in human and primate hypothalamus. *Peptides* 12: 313-318, 1991.

- **Vila V, Jiménez P, Güell A, Castrillo JL.** Pit-1 and Pit-2 role in growth hormone gene regulation. *J Pediatr Endocrinol* 6: 225-228, 1993.

- **Wakabayashi Y, Hatano H, Minami S, Tonegawa Y, Akira S, Sugihara H, Ling NC.** Effects of neonatal administration of MSG on plasma GH response to GHRH in adult male and female rats. *Brain Res* 372: 361-365, 1986.

- **Wehrenberg WB, Bloch B, Chong-Li Z, Brazeau P, Ling N, Guillemin R.** Pituitary response to growth hormone-releasing factor in rats with functional or anatomical lesions of the central nervous system that inhibit endogenous growth hormone secretion. *Regul Pept* 8: 1-8, 1984b.

- **Wehrenberg WB, Bloch B, Ling N.** Pituitary secretion of growth hormone in response to opioid peptides and opiates is mediated through growth hormone-releasing factor. *Neuroendocrinol* 41: 13-16, 1985.

- **Wehrenberg WB, Brazeau P, Ling N, Textor G, Guillemin R.** Pituitary GH response in rats during a 24 hour infusion of GHRH. *Endocrinol* 114: 1613-1616, 1984a.

- **Wehrenberg WB, Brazeau P, Luben R, Böhlen P, Guillemin R.** Inhibition of the pulsatile secretion of growth hormone by monoclonal antibodies to the hypothalamic growth hormone releasing factor (GRF). *Endocrinol* 111: 2147-2148, 1982.

- **Wehrenberg WB, Seifert H, Bilezikjian LM, Bale W.** Down-regulation of GRF receptors following continuous infusion of GRF in vivo. *Neuroendocrinol*, 43: 266-268, 1986.

- **Wehrenberg WB.** Continuous infusion of GHRH: effects on pulsatile GH secretion in normal rats. *Neuroendocrinol* 43: 391-396, 1986.

- **Weigent DA, Baxer JB, Wear WE, Smith LR, Bost KL, Blalock JE.** Production of immunoreactive growth hormone by monoclonal leukocytes. *FASEB J* 2: 2812-2818, 1988.

- **Westwood M, Gibson JM, Davies AJ, Young RJ, White A.** The phosphorylation pattern of insulin-like growth factor binding protein-1 in normal plasma is different from that in amniotic fluid and changes during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1735-1741, 1994.

- **Widmer U, Zapf J, Froesch ER.** Somatomedins and hGH activity. *Pediatrics Adolescent Endocrinology* 12: 133-146, 1983.

- **Wolfrom GW, Ivy RE, Baldwin CD.** Effects of GH alone and in combination with Ralgro in lambs. *J Anim Sci* 61: 249 (abs), 1985.

- **Wood TL, Berelowitz M, Gelato MC, Roberts CT Jr, LeRoith D, Millard WJ, McKelvy JF.** Hormonal regulation of rat hypothalamic neuropeptide mRNAs: effect of hypophysectomy and hormone replacement on growth hormone-releasing factor, somatostatin and the insulin-like growth factors. *Neuroendocrinol* 53: 298-305, 1991.

- **Yaffe BM, Samuels HH.** Hormonal regulation of the growth hormone gene. Relationship of the rate of transcription to the level of nuclear thyroid hormone-receptor complexes. *J Biol Chem* 259: 6284-6290, 1984.

- **Yamashita S, Melmed S.** Insulin-like growth factor I regulates growth hormone transcription in primary rat pituitary cells. *J Clin Invest* 79: 449-452, 1987.

- **Yamashita S, Weiss M, Melmed S.** Insulin-like growth factor I regulates growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels in human pituitary tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 730-735, 1986.

- Zapf J, Schoenle E, Waldvogel M, Sand I, Froesch ER. Effect of trypsin treatment of rat adipocytes on biological effects and binding of insulin-like growth factor. Further evidence for the actions of insulin-like growth. *Eur J Biochem* 113: 605, 1981.