

22

2ej

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO  
DE POLLO (cGH). ANALISIS DE BIOACTIVIDAD DE LA GH  
BAJO DIFERENTES CONDICIONES FISIOLÓGICAS

T E S I S

Para obtener el título de

MAESTRIA EN CIENCIAS

BIOLOGIA

JOSE GERARDO PERERA MARIN

Mexico 1989

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

INTRODUCCION.....	5
a) Hipofisis.....	7
a.1) Neurohipofisis.....	8
a.2) Adenohipofisis.....	8
b) Crecimiento y Desarrollo.....	11
c) Hormona de Crecimiento (GH) de Mamiferos.....	11
c.1) Variantes de Hormona de Crecimiento.....	13
c.1.1) Variantes de Carga.....	13
c.1.2) Variantes de Masa.....	16
d) Hormona de Crecimiento de Aves (cGH).....	18
e) Actividad Biologica de la Hormona de Crecimiento.....	21
f) Regulacion de la Hormona de Crecimiento.....	26
BIOENSAYOS	
a) Diseno y requisitos generales.....	31
b) Bioensayos para medir la actividad de Hormona de Crecimiento.....	33
b.1) Bioensayo de la ganancia de peso corporal en ratas hipofisectomizadas y en ratas adultas normales.....	37
b.2) Bioensayo de la tibia.....	38
b.3) Bioensayo de la ornitina descarboxilasa.....	40
b.3.1) Bioensayo in vitro.....	42
b.3.2) Bioensayo lipolitico.....	43
b.3.2.1) Bioensayo antilipolitico.....	45
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	47
MATERIAL Y METODOS	
1) MATERIAL	
a) animales	
a.1) Para los bioensayos de Ornitina descarboxilasa hepatica (ODC) y del efecto del ensanchamiento del cartilago epifisial de la Tibia.....	50
a.2) Para los bioensayos lipolitico y antilipolitico.....	50

b) Muestras biológicas.....	50
c) Reactivos.....	51
2) METODOS	
a) Hipofisectomia.....	51
b) Bioensayos	
b.1) Bioensayo de la tibia.....	55
b.1.1) Tincion de la tibia.....	55
b.2) Bioensayo de la Ornitina Descarboxilasa Hepatica (ODC)	
b.2.1) Determinacion de la actividad de la ODC hepatica.....	57
b.2.2) Optimizacion y estandarizacion del metodo.....	59
1.- Tiempo de Incubacion.....	59
2.- Concentracion de sustrato.....	60
3.- Concentracion de la enzima.....	60
b.2.3) Efecto del ayuno en la actividad de la ODC.....	61
b.2.4) Efecto de la GH en la actividad de la ODC en ratas hipofisectomizadas.....	61
b.3) Bioensayo lipolitico.....	63
b.3.1) Determinacion enzimatica de glicerol.....	66
b.3.2) Curva patron.....	67
b.4) Bioensayo antilipolitico.....	64
b.4.1) Determinacion enzimatica de glicerol.....	66
b.4.2) Curva patron.....	67
c) Analisis estadistico de los bioensayos.....	68
d) Obtencion de las Variantes de Hormona de Crecimiento de Polio.....	68

#### RESULTADOS

a) Obtencion de las variantes.....	71
b) Hipofisectomia.....	74
c) Bioensayos	
c.1) Bioensayo de la tibia.....	77
b.1.2) Potencia biologica de la fraccion BDE-1.....	81

c.2) Bioensayo de Ornitina descarboxilasa hepatica	
c.2.1) Optimizacion y estandarizacion del metodo	
1.- Tiempo de incubacion.....	82
2.- Concentracion de sustrato.....	83
3.- Concentracion de enzima.....	84
c.2.2) Efecto del ayuno en la actividad de la ODC.....	88
c.2.3) Efecto de la GH sobre la actividad de ODC.....	90
c.3) Bioensayo Lipolitico	
c.3.1) Curva patron.....	92
c.3.2) Determinacion de la actividad lipolitica de la fraccion BDE-1.....	93
c.3.3) Bioensayo lipolitico a la 2a hora de incubacion.....	96
c.3.4) Actividad lipolitica de las variantes de carga de cGH.....	98
c.4) Bioensayo Antilipolitico	
c.4.1) Determinacion de la actividad antilipolitica de la fraccion BDE-1.....	99
c.4.2) Determinacion de la actividad antilipolitica de las variantes de carga de cGH.....	101
DISCUSION.....	103
CONCLUSIONES.....	115
REFERENCIAS.....	116

## INTRODUCCION

Los sistemas vivos poseen la capacidad de integración de una amplia gama de actividades y procesos, además de estar sujetos a un cambio continuo. Esta capacidad integrativa de las funciones dependen tanto del sistema nervioso como del sistema endócrino. Estos sistemas, emiten mensajes desde un centro control hacia un órgano receptor y el efecto provoca un aumento o disminución en la actividad celular de este último (1).

El sistema nervioso envía sus fibras a todas las regiones del cuerpo y la información es recogida y transmitida a través de prolongaciones nerviosas (fibras nerviosas), éste impulso es conducido de una neurona a otra por medio de la sinapsis, entendiéndose por esta un contacto entre neuronas o una neurona y célula no nerviosa donde se transmiten acciones excitatorias o inhibitorias. En algunos casos la transmisión es eléctrica, como sucede cuando hay contacto directo de las membranas y donde el impulso nervioso pasa de una neurona a otra sin retardo; no obstante existen sinapsis de transmisión química, esto es, se liberan transmisores específicos (neurotransmisores) y se desencadenan potenciales sinápticos (1,2). Es importante mencionar que la transmisión nerviosa es veloz y transitoria, de modo que la respuesta es rápida y no sostenida (2).

El segundo sistema de integración es el endócrino, que produce sustancias químicas denominadas hormonas, las cuales son moléculas que son sintetizadas y almacenadas en glándulas endócrinas, siendo una de las más importantes la hipófisis. Las hormonas ejercen su acción en órganos "blanco" localizados en otra región del organismo y para poder cumplir sus funciones, es necesario que sean vertidas al torrente sanguíneo y diseminadas hacia el órgano blanco, provocando modificaciones en el metabolismo celular (3).

Naturalmente, este método de transmisión es más lento que el que se logra con el impulso nervioso; a menudo, los efectos hormonales abarcan la mayoría de órganos y tejidos del organismo de manera global, a diferencia del "control fino" que lleva a cabo el sistema nervioso. Pero a pesar de la poca precisión aparente de la transmisión hormonal, muchas hormonas no solo son importantes, sino absolutamente indispensables (4).

Los sistemas de comunicación nervioso y hormonal, aunque distintos, no son independientes, sino que mantienen una interacción muy estrecha. Directa o indirectamente, el sistema nervioso puede ser afectado por hormonas (4,2), tal es el caso del hipotálamo, el cual puede ser regulado por las propias hormonas, para la liberación de factores tróficos (3).

## a) HIPOFISIS

En los mamíferos esta glándula endócrina forma una masa compacta, localizada en la base del encéfalo, protegida en una depresión del hueso esfenoides (silla turca) en el piso de la caja craneana. En realidad esta glándula es doble, y cada porción tiene un origen embriológico completamente distinto, y funciona de manera diferente: se habla de adenohipófisis o lóbulo anterior procedente de la bolsa hipofisaria (bolsa de Rathke), y de neurohipófisis o lóbulo posterior formada a partir de tejido cerebral (3). La figura 1 muestra la anatomía de la hipófisis de mamíferos.

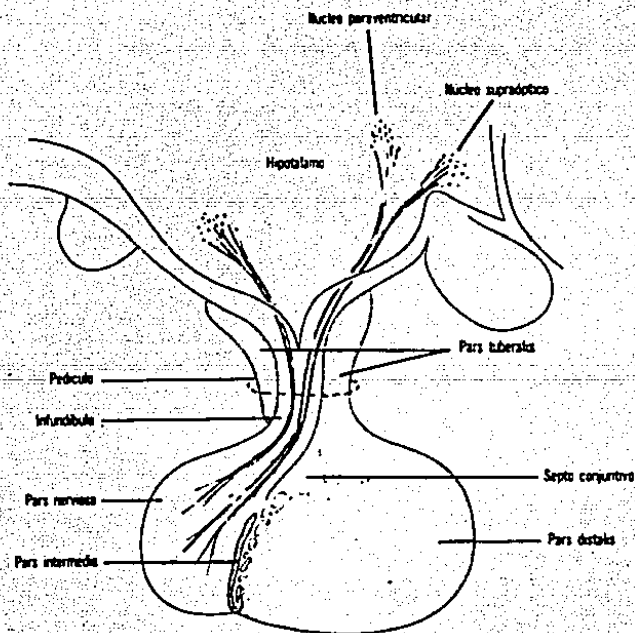


Fig.1 Anatomía de la Hipófisis de mamíferos. Pars distalis o lóbulo anterior; Pars nervosa o lóbulo posterior; Pars intermedia o lóbulo medio. [De Junqueira, L.C. 1981 (4)].



## a) HIPOFISIS

En los mamíferos esta glándula endócrina forma una masa compacta, localizada en la base del encéfalo, protegida en una depresión del hueso esfenoides (silla turca) en el piso de la caja craneana. En realidad esta glándula es doble, y cada porción tiene un origen embriológico completamente distinto y funciona de manera diferente: se habla de adenohipófisis o lóbulo anterior procedente de la bolsa hipofisaria (bolsa de Rathke), y de neurohipófisis o lóbulo posterior formada a partir de tejido cerebral (3). La figura 1 muestra la anatomía de la hipófisis de mamíferos.

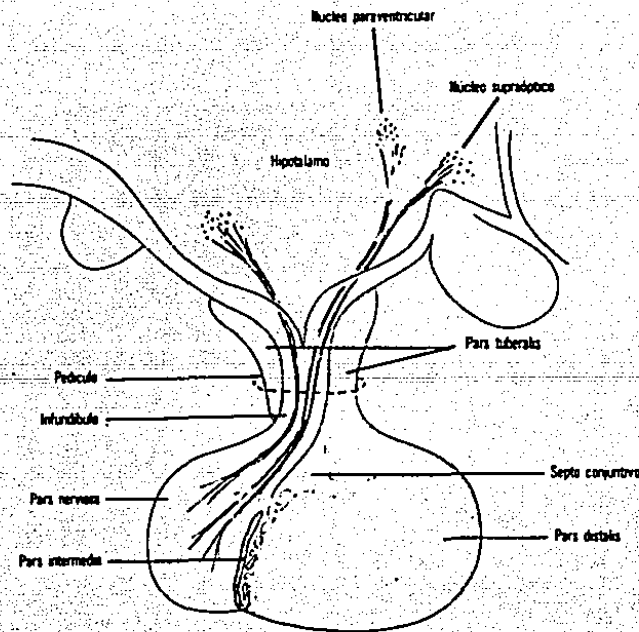


Fig. 1 Anatomía de la Hipófisis de mamíferos. Pars distalis o lóbulo anterior; Pars nervosa o lóbulo posterior; Pars intermedia o lóbulo medio. (De Junqueira, L.C. 1981 (4)).

### a.1) Neurohipófisis

La neurohipófisis en los mamíferos esta formada por la eminencia media, el tallo infundibular, y el proceso infundibular. El origen de esta parte de la hipófisis es nervioso, pues nace de un crecimiento hacia abajo de la pared del diencéfalo, que se convierte en el suelo del tercer ventrículo, por lo que las células que lo forman son pituicitos, así como numerosas fibras nerviosas. Dos hormonas neurohipofisarias son secretadas, la Vasopresina (hormona antidiurética, VP, ADH) que promueve entre otras funciones la retención del agua y la Ocitocina (OT) que actúa en el músculo liso del organismo (5).

### a.2) Adenohipófisis

La adenohipófisis en mamíferos se ha dividido en pars distalis, pars tuberalis que se encuentra alrededor del tallo del infundíbulo, y una pars intermedia o lóbulo medio que se caracteriza por ser una pequeña colección de células entre la adenohipófisis y la neurohipófisis.

La adenohipófisis contiene dos grupos principales de células de acuerdo a la fijación de colorantes básicos o ácidos, como la hematoxilina, así tenemos las  cromóforas  con citoplasma no granuloso, y las  cromófilas , con citoplasma granuloso, estas últimas células se han dividido en  acidófilas  y  basófilas .

Aproximadamente el 25 % de las células son cromóforas, mientras que las acidófilas constituyen el 50 % y las basófilas el 25 % restante. Las acidófilas y las basófilas son principalmente fuente de las hormonas adenohipofisarias (4).

Con la introducción de técnicas histocitoquímicas, inmunofluorescentes y de microscopía electrónica, se ha permitido clasificar a las células de la adenohipófisis de acuerdo al material que secretan (4,6). Así se han definido a las siguientes:

A las células que elaboran y secretan somatotropina u hormona de crecimiento (GH), se les ha denominado somatotropos; a las de la prolactina (PRL) lactotropas; a las células que secretan tirotropina u hormona estimulante del tiroides (TSH) se les ha nombrado tiotropas; las foliculotropas liberan hormona estimulante del folículo (FSH); las luteotropas secretan hormona luteinizante (LH), y las melanotropas que liberan hormona estimulante de los melanocitos (MSH).

En el caso particular de las aves, la hipófisis está formada por una pars nerviosa, que se ha demostrado que secreta arginina vasotocina (AVT) y mesotocina (MT), y no existe la pars intermedia por lo que la adenohipófisis en este grupo consta solamente de pars distalis, la cual se divide en lóbulo caudal y lóbulo cefálico. Con estudios inmunocitoquímicos, se han detectado somatotropos (GH) y gonadotropos (FSH/LH) en el lóbulo

caudal: y en el cefálico, se han detectado tirotropos (TSH), adrenocorticotropos (ACTH) y células lactotropas (PRL) (7). La figura 2 muestra un esquema de la hipófisis en aves.

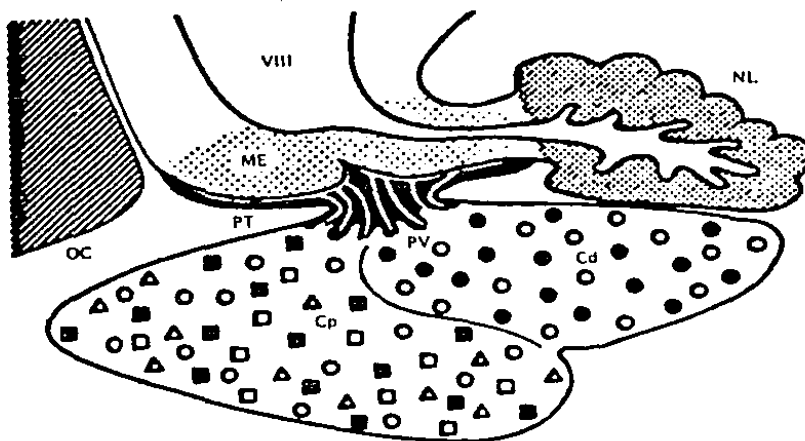


Fig.2 Corte sagital de la adenohipófisis de codorniz. Abreviaturas: Cd, Lóbulo caudal; Cp, Lóbulo cefálico; ME, Eminencia media; NL, Lóbulo neural; OC, Quiasma óptico; PT, Fars tuberalis; PV, Vasos portales; VIII, Tercer ventrículo. Símbolos ●, GH; ○, LH/FSH; ■, ACTH; ▽, PRL (De Scanes, C.G. 1968 (7))

## b) CRECIMIENTO Y DESARROLLO

El fenómeno de crecimiento y desarrollo en aves, como en los mamíferos, es un proceso complejo y multifuncional que involucra el aumento de tamaño (hipertrofia) y división celular (hiperplasia), así como la maduración de tejidos, el desarrollo de órganos, y el incremento en tamaño y maduración del organismo. Este fenómeno tan complejo, se encuentra regulado por múltiples factores tales como el aporte nutricional, la temperatura, sales, conocidos como extrínsecos. Entre los factores intrínsecos se encuentran los genéticos y un estricto control hormonal. Uno de los componentes hormonales más importantes en este fenómeno es la hormona de crecimiento (GH) (14). Además, se ha demostrado un papel importante de otras hormonas tales como hormonas tiroideas ( $T_3$ - $T_4$ ) (8), somatomedinas (9), insulina (10), glucocorticoides (11), factor de crecimiento neural (12), factor de crecimiento epidérmico (13).

## c) HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) DE MAMÍFEROS

Los primeros estudios realizados sobre esta hormona, se remontan a las investigaciones realizadas por Long y Evans en 1921 (r.c 15), quienes postularon la presencia de un factor promotor del crecimiento en extractos alcalinos de hipófisis, los cuales inyectados en ratas adultas por un período prolongado provocaron gigantismo en los animales. A partir de estos experimentos pioneros se han realizado una gran cantidad de

estudios fisiológicos y bioquímicos de la hormona de crecimiento (GH) de mamíferos (r.c.15). Sin embargo poco se conoce sobre las propiedades fisiológicas y bioquímicas de ésta hormona en otras clases de vertebrados (r.c.15).

En la actualidad se considera que la hGH es una familia de péptidos, formada por variantes de carga y de masa, cuyo componente mayoritario es una cadena de 191 a.a., con un peso molecular de 22.000 daltones (22K). Presenta dos puentes disulfuro, predomina una estructura secundaria de alfa hélice (55%), con un punto isoelectrico (pI) de 4.9. (15,16). La figura 3 muestra la estructura primaria de la hormona de crecimiento de humana (hGH) de origen hipofisario.

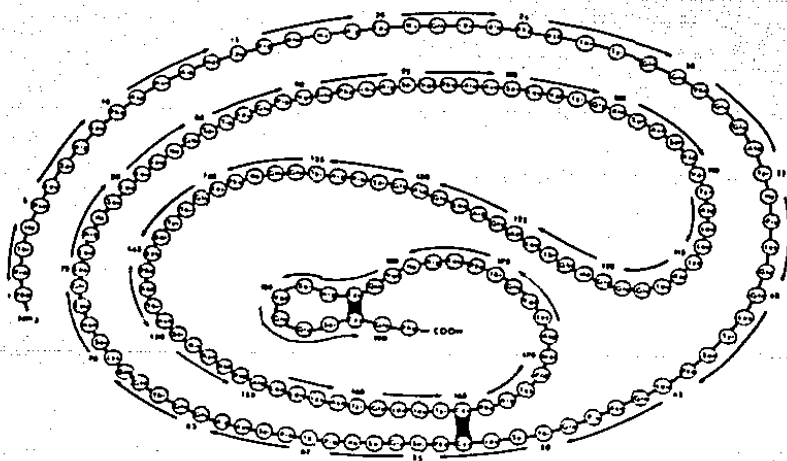


Fig.3 Estructura primaria de la hGH. Presenta 191 aminoácidos (a.a.), con 2 puentes disulfuro. (De Li C.H. 1979).

### c.1) Variantes de Hormona de Crecimiento

Con la introducción de una serie de técnicas, tales como la electroforesis en geles de almidón, la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y el isoelectroenfoco (17-20), que separan a las proteínas de acuerdo a su carga molecular, se han identificado de 4-6 componentes de la hGH (variantes de carga). En base a su peso molecular se han aislado 2-4 componentes (variantes de masa), utilizando la técnica de cromatografía de exclusión molecular (21-24).

Las variantes de carga y de masa obtenidas por estas metodologías presentan diferentes grados de inmunorreactividad y de bioactividad (16). La tabla I resumen estas características.

#### c.1.1) Variantes de Carga

Ferguson y Wallace en 1961 (17) utilizando un sistema electroforético en geles de almidón encontraron cuatro componentes mayoritarios y dos minoritarios para la hGH. Demostraron también que todos estos componentes presentaban actividad biológica en el ensayo de la tibia y en el lactogénico. Posteriormente Barret y colaboradores (25) confirmaron estas observaciones, demostrando únicamente actividad en las bandas mayoritarias.

TABLA I

PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS VARIANTES DE CARGA Y  
MASA DE LA hGH

Tomado de Chawla R.J. et al 1983 (16)

Variantes de carga	Identificación	Bioactividad				Inmunorreactividad
		E.T	E.L	E.S	G.P	
B		1	1	1	1	1
C	Electroforesis	3	3	3	3	1
D	geles de almidón	3	3	3	3	1
E		3	3	3	2	1
		1.2	5.5	-	-	1
	PAGE	1.2	5.5	-	-	1
		5.0	10.0	-	-	1
		1.1	4.5	-	-	1
Variante desamidada	PAGE	NO SE REPORTO				NO SE REPORTO
Variante N-Acetil	PAGE	1.0	1.0	-	-	1
Variantes de masa	Identificación	Bioactividad				Inmunorreactividad
		E.T	E.L	E.S	G.P	
30 K	Exclusión Molecular	100-200	-	-	-	0.01
45 K	Exclusión Molecular	-	0.5	-	0.01	0.03
24 K	SDS-PAGE	0.01	1.3	-	-	1.0
20 K	SDS-PAGE	1.0	-	1	1	0.3

E.T= Ensayo de la tibia  
E.L= Ensayo lactogénico  
E.S= Ensayo de somatomedinas  
G.P= Ensayo de la ganancia de peso corporal.  
PAGE= Electroforesis en geles de poliacrilamida  
PAGE-SDS= Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.  
a= La Bioactividad e inmunoreactividad de la 22K se tomo como 1.0



Chrumbach y colaboradores (19,26,27) utilizando un sistema de electroforesis en geles de almidón, aislaron cuatro componentes de hGH (denominados B,C,D,E), con el mismo peso molecular, el componente B fue el mayoritario, el cual al ser tratado con plasmina resultó en la conversión a las isohormonas C, D, y E. Todas presentaron el mismo comportamiento en el radioinmunoensayo (RIA) que la 22K. Las isohormonas más ácidas (D y E), presentaron 3 veces mayor bioactividad en el ensayo lactogénico y en el de la tibia que la forma mayoritaria, en el ensayo de ganancia de peso corporal únicamente la isohormona E fue 2 veces más activa que la B.

Lewis y colaboradores (28,29) aislaron y caracterizaron cuatro variantes de carga de hGH por PAGE, parecidas a las bandas o isohormonas estudiadas por Chrumbach en términos de movilidad electroforética, las denominaron  $\alpha$  1,  $\alpha$  2,  $\alpha$  3 y  $\beta$ . demostraron que la  $\alpha$  2 y  $\alpha$  3 carecían de los residuos 135-140 y 135-146 respectivamente. Estas isohormonas parecen ser formas hidrolizadas en el asa mayor de hGH, por lo tanto dan origen a una estructura de dos cadenas unidas por un puente disulfuro. Su comportamiento inmunológico fue similar a la GH intacta: con respecto a la actividad biológica, las isohormonas  $\alpha$  1,  $\alpha$  2 y  $\beta$  demostraron ser activas en el bioensayo de la tibia, en el bioensayo lactogénico presentaron una actividad de 5 a 10 veces mayor en comparación a la 22K;  $\alpha$  3 fue 5 veces más potente en el ensayo de la tibia y 10 veces en el ensayo lactogénico.

En 1980, Lewis aisló a una variante de hGH con N-acetilfenilalanina en el extremo amino terminal, ésta fue equipotente con hGH en el ensayo de la tibia, el lactogénico y en el RIA para hGH (30). En 1981 este grupo también reportó 2 formas desamidadas de hGH, demostraron que eran el resultado de la desamidación del residuo 152 (asn-->asp) y el residuo 137 (gln-->glu), pero no se informaron estudios de su bioactividad (31).

### c.1.2) Variantes de Masa

Las variantes de masa se consideran que se forman como un resultado de agregación molecular o por delección de ciertos aminoácidos en la estructura 22K.

La variante 45K obtenida a partir de extractos de hipófisis y purificada por cromatografía de exclusión molecular, resultó ser un agregado de la 22K (32,33), que presentó un 10 % de actividad en el ensayo de ganancia de peso corporal en ratas hipofisectomizadas, y un 50 % en el ensayo lactogénico con respecto a la 22K, la significancia biológica de ésta variante aún no está clara.

La existencia de otra variante de masa, es el precursor biosintético de la hormona de crecimiento ("pre-GH") en la adenohipófisis, el cual presenta un peso molecular de 24K. En ella el péptido señal corresponde a 26 a.a. (P.M. 2000) al cual

le sigue la secuencia de la 22K (34). Es importante mencionar que no se han realizado estudios de bioactividad para esta variante.

Existe otra variante 24K, idéntica a la 22K excepto que la 24K está separada entre los residuos 139 y 140, sin delección de ningún aminoácido. Esta mostró ser más potente en el ensayo lactogénico y no presentó actividad en el ensayo de la tibia (35).

La variante 20K presenta una delección de los residuos 32-46 (36), solo presenta una tercera parte de la actividad inmunológica en comparación a la GH nativa. En el ensayo de ganancia de peso corporal y en el ensayo de la tibia, mostró ser equipotente a la 22K. Se sabe que esta variante es producto de un procesamiento diferente del transcrito primario de RNA mensajero que codifica para la 22K. Esta variante también se ha encontrado en plasma. Un dato importante es que la variante 20K presenta muy baja actividad de tipo insulinoide, a diferencia de la 22K (16).

En plasma se han encontrado agregados moleculares de la GH que son las variantes 45K, 70K ("big" hGH) y una mayor a 100K ("big-big" hGH) (37-39). La 45K presenta una actividad similar a la forma monomérica en el RIA, presentando una actividad de solo 26-40 % en el ensayo del radio-receptor (RRA) utilizando membranas de linfocitos humanos o de hepatocitos de conejo. Ellis y colaboradores (40,41) reportaron otra variante en plasma,

la 80K, la cual presentó una actividad de 100 o más veces en el ensayo de la tibia que la 22K. La presencia de esta variante podría ser explicada como una modificación enzimática de la forma monomérica.

Otro de los enfoques que se han abordado para observar la actividad biológica de la proteína se basa en el rompimiento de la molécula; a éste respecto, se debe mencionar que existen resultados, en donde las digestiones parciales de la bGH con quimotripsina, pepsina y tripsina han conducido al aislamiento de un pequeño fragmento que muestra algunas de las propiedades de la hormona nativa, y que demostró ser metabólicamente activa en humano (42). Estos estudios se han extendido a la fragmentación por medio de tratamientos químicos y a la síntesis de algunas secuencias seleccionadas para la hGH (43,44).

#### d) HORMONA DE CRECIMIENTO DE AVES (cGH)

Esta proteína se localiza en los somatotropos del lóbulo caudal de la hipófisis (7), y se ha extraído y purificado del tejido adenohipofisario de pollos (45-48), patos, pavos y pichones (45). Dicha proteína se asemeja a la GH de mamíferos desde el punto de vista químico (p. ej. su comportamiento en algunos sistemas cromatográficos, su peso molecular, su composición de aminoácidos y su secuencia N-terminal) así como de actividad biológica (bioensayo de la tibia en ratas hipofisectomizadas (113)).

En la tabla II se resumen algunas características fisicoquímicas de las diversas preparaciones de GH de pollo (cGH), publicadas en algunos trabajos.

TABLA II CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE cGH

CARACTERISTICAS	GH(1974) <sup>a</sup>	GH(1977-84) <sup>b</sup>	GH(1984) <sup>c</sup>	GH(1987) <sup>d</sup>
Rf	0.3	0.3	0.2	0.23, 0.3 0.35
P.M. (SDS-PAGE)	23,300	23,300	26,000	26,300
PI.	-----	7.5	7.6	7.2, 7.4 6.2, 6.7, 7.1 7.5
SECUENCIA AMINO TERMINAL.	FPAM	TFPAM	TFPAM	TFPAM
PUENTES DISULFURO	2	-----	2	-----

Nota. Signo de abreviaturas usadas para aminoácidos (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1968): T=Thr, F=Phe, P=Pro, A=Ala, M=Met. SDS-PAGE, Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio.

<sup>a</sup>Farmer y col, 1974 (45).

<sup>b</sup>Harvey y Scanes, 1977; Lai y col, 1984 (46).

<sup>c</sup>Leung y col, 1984 (47).

<sup>d</sup>Arámburo y col, 1987 (48).

Por otro lado se ha demostrado homología estructural entre la hormona de crecimiento de pollo (cGH) y la de rata (rGH) correspondiente a un 79 % a 83 % en la estructura parcialmente identificada por Leung y colaboradores (1984), cGH y hormona de crecimiento bovina (bGH) entre el 76-79 %, y cGH en comparación a hormona de crecimiento humana (hGH) del 58 % (42). También se ha demostrado homología de un 88 % entre bGH y rGH, hGH y rGH (64%); hGH y bGH del 63 % (49).

Otra de las características que se han podido demostrar para cGH es la presencia de grupos fosfatos (cGH fosforilada) (50) y reportes recientes han confirmado la presencia de azúcares en la molécula (cGH glicosilada) (51), como ya se había demostrado para hormona de crecimiento de mamíferos (52,53).

En cuanto a la presencia de variantes de carga y de masa, poco se conoce para esta proteína (54,55). En nuestro laboratorio se han aislado tres variantes de carga correspondientes a un Rf de 0.23, 0.3 y 0.35, en PAGE-TRIS (54). Por otro lado, Houston y Goddard (1988), describieron la presencia de 10 variantes de carga para esta proteína en diferentes etapas de desarrollo del pollo, es importante mencionar que no se les determinó ninguna actividad biológica (56).

## e) ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE HORMONA DE CRECIMIENTO

En el caso de GH de mamíferos, se ha podido observar que la actividad biológica de ésta hormona es muy diversa y funcionalmente compleja. Así como estimula el crecimiento de tejidos blandos también lo hace con los esqueléticos. Afecta el metabolismo de carbohidratos (57), lípidos (58) y proteínas (59). Por ejemplo: La GH influye en el incremento de la lipólisis y disminuye la lipogénesis en tejido adiposo y en hepatocitos de rata respectivamente; inhibe la lipólisis estimulada por epinefrina y glucagon (efecto antilipolítico) en explantes de tejido adiposo y en adipocitos de rata; al mismo tiempo incrementa la captación de la glucosa por el tejido adiposo; estimula el transporte de aminoácidos; e incrementa la síntesis de DNA, RNA y de proteínas en la mayoría de los tipos celulares (59). Por otro lado promueve la síntesis de poliaminas (60) e inhibe la acción de la insulina en el metabolismo de la glucosa (61). También posee un efecto "diabetógeno" o hiperglucemiante (61). Incrementa el flujo sanguíneo renal, la tasa de filtración glomerular y la reabsorción tubular de fosfatos, incrementa la tasa metabólica basal, estimula la formación ósea, la eritropoyesis (16). La tabla III resume estas funciones.

TABLA III

PRINCIPALES EFECTOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA  
(hGH)

De Chawla, R.J., et al, 1983 (16)

METABOLICOS	<ul style="list-style-type: none"><li>- Estimulación del transporte de aminoácidos.</li><li>- Estimulación de la síntesis de proteínas.</li><li>- Estimulación de la síntesis de ADN y ARN.</li><li>- Estimulación de la síntesis de poliaminas.</li><li>- Estimulación de la lipólisis.</li><li>- Estimula la antilipólisis (Inhibición de la lipólisis inducida por glucagon y epinefrina.</li><li>- Incrementa la tasa metabólica basal.</li><li>- Actividad diabética.</li></ul>
ORGANO ESPECIFICO	<ul style="list-style-type: none"><li>- Incrementa el flujo sanguíneo renal, la tasa de filtración glomerular y la absorción tubular de fosfatos.</li><li>- Estimula la eritropoyesis.</li></ul>
ANATOMICOS	<ul style="list-style-type: none"><li>- Acelera el crecimiento lineal.</li><li>- Reduce la masa de tejido graso y aumenta la masa de diferentes tejidos: músculo, hígado, riñón, corazón, páncreas, esqueleto y tejido conjuntivo.</li></ul>



En aves, se ha descrito que la concentración plasmática de GH varía durante el crecimiento y el desarrollo; se encuentra elevada en la etapa temprana posterior al nacimiento, que se caracteriza por un crecimiento rápido, y disminuye en etapas posteriores y en los adultos (62). También se han encontrado diferencias en las concentraciones plasmáticas de GH en razas "ponedoras" y de "engorda" (62,63); así como en líneas genéticamente seleccionadas y no seleccionadas. Se ha sugerido también que la GH actúa sobre el metabolismo de los lípidos, estimulando la lipólisis e inhibiendo la lipogénesis en el hígado, así como aumentando la captura de glucosa por el tejido adiposo (62,64). También se conoce que la hipofisectomía provoca disminución en la concentración circulante de hormonas pancreáticas en los patos, y que tales efectos se revierten con la administración de GH. Parecería que la GH actúa incrementando la liberación de insulina y disminuyendo la de glucagón (65,66). Asimismo, la GH aumenta la concentración de glucosa y de aminoácidos en la circulación (49).

Actualmente, no se conoce con certeza el sitio y el mecanismo celular de la acción somatotrópica de la GH. Para tal propósito se han realizado estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Los estudios al respecto han generado controversia. Por ejemplo, cuando se administra GH *in vivo* a animales deficientes en la hormona, se observa una estimulación en la condrogénesis y la mioagénesis, así como crecimiento somático acelerado (67,68). Sin

embargo, en el caso de los estudios *in vitro*, la administración de GH sobre explantes de cartílago o preparaciones de músculo, no provoca respuesta o bien ésta es pequeña e inconsistente (68).

Esta discrepancia entre los sistemas *in vivo* e *in vitro* con respecto a la actividad de la GH, además de la identificación y caracterización química de factores de crecimiento semejantes a insulina y conocidos como "somatomedinas", ha dado lugar a la hipótesis de las somatomedinas, para tratar de explicar el posible mecanismo de acción de la GH en el efecto somatotrópico.

Estos factores en un inicio se les conoció como factores de sulfatación (69,70), una sustancia inducida por GH capaz de incorporar el sulfato en el cartílago. Estas se han demostrado estar presentes en diferentes órganos y probablemente el sitio de producción y liberación sea el hígado en respuesta a la hormona (67,71-73). Las somatomedinas participan en procesos de crecimiento como son la síntesis de DNA, RNA y proteínas (74).

Esta hipótesis propone que la GH no tiene un efecto directo sobre el cartílago. En lugar de esto, se postula que la hormona estimula la condrogénesis, indirectamente a través de estimular la síntesis hepática de somatomedinas. Las somatomedinas serían las responsables de estimular diversos parámetros asociados al crecimiento en cartílago y otros tejidos.

Sin embargo existen estudios, en los que se han observado que la GH actúa directamente en condrocitos del cartílago y también

sobre preadipocitos (fibroblastos 3T3) (75,76), sugiriendo que el mecanismo indirecto mediado por somatomedinas circulantes no es el único factor que regula el crecimiento esquelético.

Los estudios recientes de Green y colaboradores (75) parecen explicar y conciliar estas discrepancias. Estos investigadores han propuesto "la teoría del efector doble de acción de la hormona de crecimiento", que consiste en: 1) La GH actúa de manera directa en la diferenciación celular en muchos tejidos incluyendo el cartílago epifisial. 2) La GH actúa de manera indirecta provocando la síntesis de factores de crecimiento (somatomedinas) que son los que provocan la expansión clonal de las células previamente diferenciadas.

En función de estos resultados, Isaksson y colaboradores (77) han propuesto que durante el proceso de diferenciación de las células de la epífisis de la tibia (precondrocitos), los genes que codifican los factores de crecimiento son simultáneamente expresados, y como consecuencia se genera la síntesis de estos factores, que provocan la expansión clonal de los condrocitos en la zona proliferativa de la placa de crecimiento (78). Este fenómeno ocurre *in vivo* durante el proceso de crecimiento normal como resultado de ésta producción local de somatomedinas. Sin embargo existen controversias para la demostración concluyente de esta hipótesis (78).

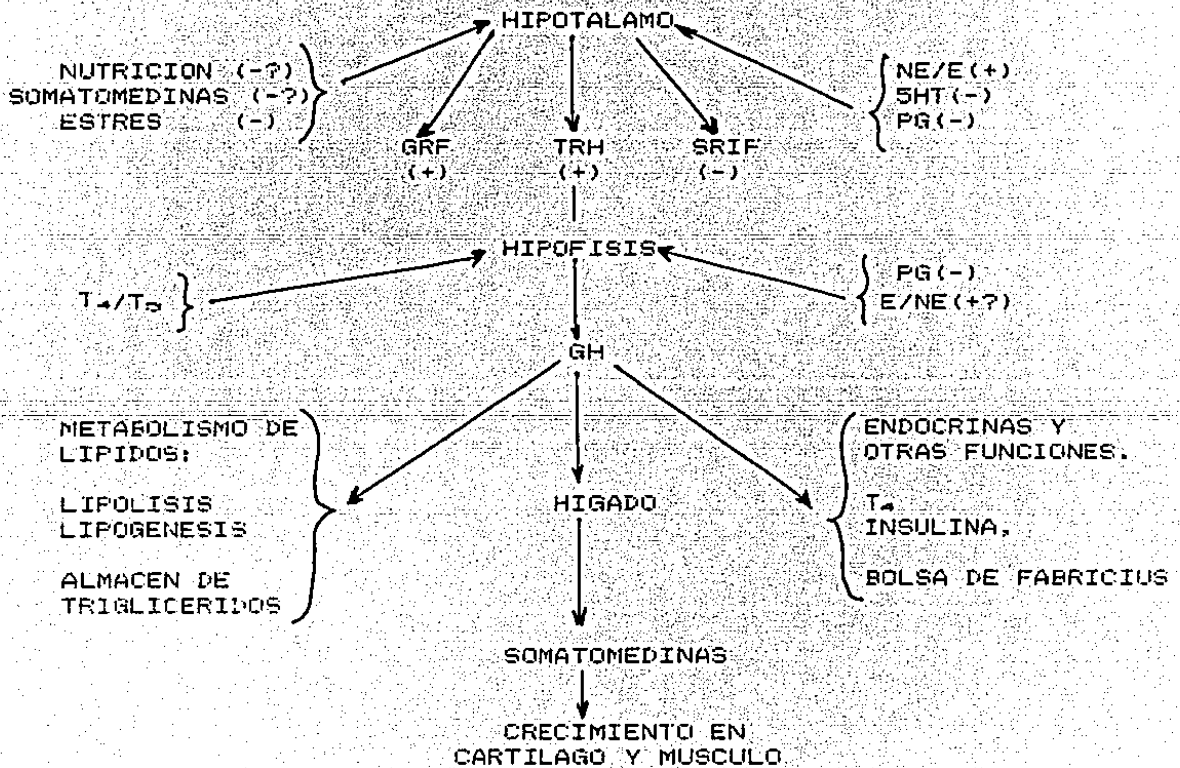
f) REGULACION DE LA SECRECION DE LA GH

La secreción de la GH presenta diferentes sitios susceptibles de regulación. La figura 4 esquematiza de manera global la regulación de la secreción de la GH.

FIGURA 4

FISIOLOGIA DE LA GH Y EL CONTROL DE SU SECRECION EN AVES

Hall, T.R., et al 1986 (80)



### f.1) Secreción basal

En el caso de la secreción basal, se ha observado que los somatotropos liberan cantidades significativas de GH en ausencia de factores externos, además se ha observado que éste fenómeno es dependiente de calcio, AMPc y prostaglandinas (79).

Ahora bien, se ha demostrado que la secreción de la GH en mamíferos presenta un patrón episódico, lo cual parece ser específico de cada especie; el hipotálamo regula la liberación pulsátil de la proteína en vertebrados (80).

### f.2) Factores hipotalámicos

Es bien conocido que el hipotálamo regula la secreción de GH por la hipófisis. Existen considerables evidencias de que el hipotálamo contiene factores peptidérgicos que promueven o inhiben la liberación de la hormona [factor liberador de la hormona de crecimiento o somatoliberina (GRF); factor liberador de la tirotrópina o tiroliberina (TRH); y el factor inhibidor de la hormona de crecimiento o somatostatina (SRIF)], los cuales a su vez parecen estar regulados por monoaminas y neurotransmisores del sistema nervioso central (49,80).

#### f.2.1) Somatoliberina

El factor liberador de la hormona de crecimiento o GRF, estimula la liberación de la GH en muchas especies de mamíferos.

Se ha pensado que los pulzos episódicos de la hormona están regulados por éste factor. No existen evidencias de la presencia de este péptido en aves, aunque se ha observado que el GRF sintético incrementa la liberación de GH en plasma de pollos adultos y jóvenes, sugiriendo la posible existencia de este factor en aves (80).

#### f.2.2) Tiroliberina

Uno de los factores que se ha sugerido que puede estimular la liberación de la GH en mamíferos es el TRH o factor liberador de la tirotropina (81,82), éste péptido sin embargo, es un potente estimulador de la liberación de GH en aves, incluyendo a patos, pavos, pollos y pichones tanto *in vitro* como *in vivo* (83,84). La estimulación de la liberación de GH por el TRH *in vitro*, es un fenómeno dependiente de calcio (85). Estudios recientes demuestran que este tripeptido estimula la liberación de la GH *in vitro* en otros vertebrados (86,87).

#### f.2.3) Somatostatina

El factor inhibidor de la hormona de crecimiento (SRIF) o Somatostatina se ha demostrado en el hipotálamo de mamíferos y otros vertebrados (83,88). Está bien establecido que el SRIF es un péptido inhibidor de la liberación de la GH en mamíferos (*in vitro* e *in vivo*), y se ha sugerido que desempeña un papel endógeno manteniendo los niveles basales de la hormona (89). Otras evidencias indican que el SRIF juega un papel fisiológico

en el patrón secretor de la GH, se ha pensado que la liberación episódica de la GH puede ser debida a la inhibición del SRIF (90,91) aunque éste punto aún se encuentra sujeto a discusión. Spada y colaboradores 1984 (92) reportaron que la somatostatina actúa en la hipófisis reduciendo la actividad de la adenilato ciclasa. En el caso particular de las aves, se ha demostrado este factor en el hipotálamo de patos (83,93). también existen evidencias de que inhibe la liberación de GH en aves domésticas (83,93). El efecto negativo en la liberación de la GH lo realiza tanto en la secreción basal, como en la liberación estimulada por el TRH y GRF en aves y mamíferos (88).

### f.3) Péptidos

Una cantidad de péptidos aislados o detectados inmunológicamente en el hipotálamo de mamíferos, han demostrado su capacidad para estimular la liberación de GH por acción directa sobre los somatotropos (94), tal es el caso del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), que estimula la secreción de GH en humanos *in vivo*, además puede potenciar la acción de GRF tanto *in vivo* como *in vitro* (95); la bombesina, que estimula la liberación de GH, también aparentemente modula la liberación del SRIF vía acción hipotalámica (96), otros péptidos son angiotensina, sustancia P, motilina, estos mismos péptidos influyen en la secreción de la GH de pollos, pero en el resto de vertebrados la información es muy escasa.

Por otro lado se ha observado que las aminas biogénicas (serotonina y norepinefrina) inhiben *in vitro* la liberación de GH en pollos y palomas (97,98), las prostaglandinas controlan la liberación de hormonas hipotalámicas y adenohipofisarias (99). La acetilcolina se ha demostrado que inhibe la liberación de la GH *in vitro* (100). Los factores externos tales como el frío, el calor, el estrés, etc afectan la liberación de la hormona (95).

#### f.4) Retroalimentación

Finalmente la regulación por retroalimentación en la secreción de la GH se ha postulado a diferentes niveles: a) Retroalimentación de asa ultracorta, en donde la GH puede suprimir su propia liberación, o también los factores hipotalámicos controlan su liberación. b) Retroalimentación de asa corta, en donde la secreción del órgano blanco, por ejemplo las somatomedinas, hormonas tiroideas actúan en la hipófisis para regular la secreción de la GH. c) Retroalimentación de asa larga, en donde la secreción del órgano blanco modifica la actividad hipotalámica (80).



## II BIOENSAYOS

### a) Diseño y requisitos generales

Cuando se extrae y purifica una hormona, el procedimiento se acompaña de técnicas de caracterización, que permiten detectar el grado de purificación que se ha alcanzado. En general, éstas técnicas sirven para definir características fisico-químicas, inmunológicas y biológicas.

La determinación biológica de las hormonas proteínicas se puede realizar por dos caminos: bioensayos *in vitro* y bioensayos *in vivo*.

Los bioensayos *in vivo* fueron los primeros sistemas que se implementaron para calificar la actividad biológica de las hormonas, y para evaluar los métodos de purificación utilizados en su obtención (101). La característica principal de los bioensayos *in vivo* radica en la utilización del animal de experimentación completo. Posteriormente se han implementado bioensayos *in vitro* que han permitido la utilización del órgano o el tejido específico de acción de la hormona, con los mismos fines (102-104).

En general la determinación de la actividad biológica de las hormonas purificadas, o de preparaciones crudas, se obtienen por medio de un bioensayo 2+2 ó 3+3 balanceado (105), entendiéndose por esto, dos dosis del estándar y dos dosis del problema para el

primer caso, y tres dosis para cada uno en el segundo caso. En cualquier diseño, existe un grupo control que solo recibe solución salina, o el solvente utilizado para disolver las hormonas y el estándar que puede ser un amortiguador.

La condición esencial del bioensayo es mantener la misma relación de cambio de dosis en el estándar y en el problema. Por otro lado, el número de animales por punto debe ser mayor a tres individuos para considerar una respuesta significativa y no dependiente del animal; lo habitual es utilizar 5 animales por punto (105)

La potencia biológica de las hormonas, con el 95 % de límites de confianza, se obtiene del análisis de varianza de los contrastes para la fuente de variación: tratamientos, preparaciones, regresión, paralelismo y error experimental en el caso del ensayo 2+2, y en el caso del 3+3 se agrega la curvatura y la curvatura opuesta (106)

El diseño experimental y el concepto de exactitud de un ensayo de naturaleza química, cambian en el bioensayo, debido a la enorme variabilidad del mismo: el concepto de que tan cercano está el valor experimental del "real", se sustituye por los criterios de validez o confiabilidad que son el valor de lambda y el índice de significancia de la pendiente ( $\rho$ ).

El valor de lambda ( $\lambda$ ) es un índice de precisión del bioensayo, que se obtiene de dividir la desviación estándar ( $s$ ) (raíz

cuadrada de la varianza) entre la pendiente combinada (b) de la "recta" de respuesta al logaritmo de las dosis.

El otro criterio de validez es la "g", que es el índice de significancia de la pendiente, el cual denota paralelismo o identidad entre el producto problema y el estándar de referencia. Si el valor de lambda es menor de 0.30 y el de la "g" menor de 1, se puede obtener la potencia del problema con sus límites de confianza del 95 %. Debe señalarse que estos parámetros solo pueden ser obtenidos en un bioensayo completo, es decir balanceado (105,107). Los esquemas 1 y 2 resumen los parámetros estadísticos, que rutinariamente se evalúan en cualquier bioensayo.

#### b) Bioensayos para medir la actividad de Hormona de Crecimiento

En el caso particular de la GH, se han montado una diversidad de bioensayos, que se basan principalmente en la determinación de alguna de las actividades reportadas para ésta hormona. Sin embargo solo algunos se han utilizado de manera rutinaria. La tabla IV resume los bioensayos mas utilizados para la determinación de la actividad biológica de la GH.

CONTROL	ESTÁNDAR		PROBLEMA	
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>
DOSIS				
TOTAL				
C	T	W	X	Y
Efectos % (n-c)/k				

**BIOENSAYO 2+2 BALANCEADO**

tipo:  fecha:  n° sec:

n° de animales/grupo n =  I = log (s<sub>2</sub>/s<sub>1</sub>) =

actividad del estándar A =   $\frac{m\mu}{\mu_0}$  B =  $\sqrt{s_1 s_2 / U_1 U_2}$  =

D = W-X-Y-Z =  G =  $(\sum T)^2 / 4nc$  =

E = W+Y-X-Z =  H =  $\sum Y^2 / n$  =

F = W+Z-X-Y =  K =  $\sum X^2$  =

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P
Tratamientos	3	N = H-G = <input type="text"/>	N/3 = <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Preparaciones	1	D <sup>2</sup> = $D^2/4nc$ = <input type="text"/>	D <sup>2</sup> = <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Regresión	1	S <sup>2</sup> = $S^2/4nc$ = <input type="text"/>	S <sup>2</sup> = <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Paralelismo	1	F <sup>2</sup> = $F^2/4nc$ = <input type="text"/>	F <sup>2</sup> = <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Error	4(n-1) = 16	R = Q-N = <input type="text"/>	S <sup>2</sup> = <input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Total	4n-1 = 19	Q = K-G = <input type="text"/>		F(3, 16) = 3.24	

$$t = t_{0.05, 4(n-1)} = \text{_____}$$

$$L = \left( \frac{1}{b(1-g)} \right) \sqrt{\frac{s^2}{n} \left[ \left( \frac{D}{E} \right)^2 + (1-g) \right]}$$

$$M = DI/E = \text{_____}$$

$$M_{12} = M - L = \text{_____}$$

$$M_{21} = M + L = \text{_____}$$

$$\text{Pendiente combinada, } (-E)/2nI = \text{_____}$$

$$\text{Varianza de la pendiente: } S^2/nI^2 = \text{_____}$$

$$\text{Criterios de validez: } \begin{cases} S/b = \text{_____} \\ \sqrt{2} v(b)/b^2 = \text{_____} \end{cases}$$

$$\text{Potencia relativa del problema: } AB \times 10^M = \text{_____}$$

$$\text{Intervalo de confianza: } \begin{cases} AB \times 10^{M_1} = \text{_____} \\ AB \times 10^{M_2} = \text{_____} \end{cases}$$

b = <input type="text"/>
v(b) <sub>2</sub> = <input type="text"/>
l = <input type="text"/>
g = <input type="text"/>
P = <input type="text"/> mU/μ <sub>0</sub>
P <sub>1</sub> = <input type="text"/> mU/μ <sub>0</sub>
P <sub>2</sub> = <input type="text"/> mU/μ <sub>0</sub>

Esquema 1. Análisis de varianza 2+2 balanceado. El análisis se realiza para las fuentes de variación por tratamientos, preparación, regresión, paralelismo y error experimental. La determinación de la potencia relativa del problema y los criterios de validez "l" y "g" se muestran en el esquema.

BIOCENSA Y O 3+3							BALANCEADO		
CONTROL	ESTÁNDAR			PROBLEMA			tipo: _____	fecha: _____	n° sec: _____
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	U <sub>3</sub>	n° de dosis/grupo = _____	I = log(I <sub>1</sub> /I <sub>2</sub> ) = _____	
							D = r <sub>xy</sub> = r <sub>xy</sub> = _____	A = actividad del estándar = _____	
							E = r <sub>wx</sub> = r <sub>wx</sub> = _____	B = (r <sub>xy</sub> <sup>2</sup> / r <sub>wx</sub> <sup>2</sup> ) = _____	
							F = r <sub>wx</sub> - r <sub>xy</sub> = _____	G = (E <sup>2</sup> ) / n = _____	
							C = r <sub>zw</sub> = r <sub>zw</sub> = _____	H = E <sup>2</sup> / n = _____	
							CN = r <sub>zw</sub> - r <sub>xy</sub> = _____	K = E <sup>2</sup> / n = _____	

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P
Tratamientos	5	N = K - G = _____	N/5 = _____		
Preparaciones	1	D <sup>2</sup> = D <sup>2</sup> / 6n = _____	D <sup>2</sup> = _____		
Regresión	1	E <sup>2</sup> = E <sup>2</sup> / 4n = _____	E <sup>2</sup> = _____		
Paralelismo	1	F <sup>2</sup> = F <sup>2</sup> / 4n = _____	F <sup>2</sup> = _____		
Curvatura	1	C <sup>2</sup> = C <sup>2</sup> / 2n = _____	C <sup>2</sup> = _____		
Curvatura opuesta	1	CN <sup>2</sup> = CN <sup>2</sup> / 2n = _____	CN <sup>2</sup> = _____		
Error	6(n-1) = 24	R = Q - N = _____	S <sup>2</sup> = _____		
Total	6n-1 = 29	O = K - G = _____		F(5, 24) = 262	

$$L = \left( \frac{1}{b(l-g)} \right) \left[ \frac{2S^2}{3n} [2(\frac{D}{2})^2 + (l-g)] \right]$$

$$M = 4.01 / 3E = _____$$

$$M_1 = M - L = _____$$

$$M_2 = M + L = _____$$

Pendiente combinada :  $(-E) / 4nI = b = _____$

Varianza de la pendiente :  $S^2 / 4nI^2 = v(b) = _____$

Criterios de validez :  $S/b = 1 = _____$   
 $I^2(b)/b^2 = g = _____$

Potencia relativa del problema :  $AB \pm 10^M = P = \frac{m}{1}$

Intervalo de Confianza :  $AB \pm 10^{M_1} = P_1 = \frac{m}{1}$   
 $AB \pm 10^{M_2} = P_2 = \frac{m}{1}$

Esquema 2. Análisis de varianza 3+3 balanceado. El análisis de varianza se realiza para las fuentes de variación del bioensayo que son, los tratamientos, preparación, regresión, paralelismo, curvatura, curvatura opuesta y error experimental. La determinación de la potencia relativa del problema se calcula en función de la actividad del estándar y la relación del cambio de dosis utilizadas entre el manejo de los datos. La "b" y la "g" como criterios de validez.

TABLA IV

BIOENSAYOS DE GH

ESPECIE	TIPO DE ENSAYO	CONDICION EXPERIMENTAL	ORGANO BLANCO	PROCESO ESTIMULADO
RATA	GANANCIA DE PESO	IN VIVO, HIPOX. NORMAL.	CUERPO	CRECIMIENTO CORPORAL.
RATA	TIBIA	IN VIVO, HIPOX.	CARTILAGO EPIFISIAL	CRECIMIENTO ESQUELETICO
RATON	GANANCIA DE PESO	IN VIVO ENANO	CUERPO	CRECIMIENTO CORPORAL
RATA	GANANCIA	IN VIVO HIPOX.	COLA	CRECIMIENTO CORPORAL
RATA	SINTESIS POLIAMINAS	IN VIVO HIPOX.	HIGADO	SINTESIS DE ENZIMA
RATA	CAPTURA DE TIMIDINA	IN VIVO IN VITRO HIPOX.	CARTILAGO COSTAL	SINTESIS DE DNA
RATA	INCORPORAR LEUCINA	IN VITRO HIPOX.	DIAFRAGMA	SINTESIS DE PROTEINAS
POLLO RATA	LIPOLITICO	IN VITRO	TEJIDO ADIPOSEO	LIPOLISIS
POLLO RATA	ANTILIPOLITICO	IN VITRO	TEJIDO ADIPOSEO	ANTILIPOLISIS

MODIFICADO DE GREENSPAN 1950, Y CHRAMBACH et.al. 1984.  
HIPOX= HIPOFISECTOMIA.

b.1) Bioensayo de la ganancia de peso corporal en ratas hipofisectomizadas y en ratas adultas normales

Dentro de los bioensayos que toman como referencia el efecto somatotrópico de la GH tenemos por ejemplo, el de la ganancia de peso corporal en ratas hembras adultas, que presentan un peso corporal estable (meseta) [Evans y Simpson, 1931, Marx, Simpson y Evans, 1942 (r.c.108)]. Este bioensayo consiste en determinar la diferencia de su peso corporal antes y después del tratamiento (15 a 20 días). Otro de los bioensayos utilizado es el de la ganancia de peso corporal en ratas inmaduras, hipofisectomizadas, implementado y estandarizado por Marx, Simpson y Evans en 1942 (109). El bioensayo emplea ratas prepúberes (23 días), hipofisectomizadas y utilizadas después de un período post-operatorio de 15 días; el ensayo tiene el mismo fundamento que el ensayo anterior. La principal ventaja de éste último bioensayo, es que las ratas hipofisectomizadas incrementan la sensibilidad del ensayo 30 veces, mientras que la precisión y la especificidad son muy semejantes al ensayo de la ganancia de peso corporal en ratas adultas.

Estos ensayos no son únicamente laboriosos, sino que también requieren de hormona por un período prolongado (ratas hembras adultas de 15 a 20 días, ratas hipofisectomizadas de 10-12 días).

## b.2) Bioensayo de la tibia

Un tercer bioensayo utilizado de manera rutinaria es el bioensayo de la epífisis de la tibia en ratas hipofisectomizadas. Las bases que sustentan a este bioensayo se remontan a las observaciones iniciales de Dott y Fraser (1923) (r.c.110), quienes describieron que la hipofisectomía provocaba una disminución en la deposición del cartílago epifisial en las tibias de perros y gatos. Posteriormente, Handelsman y Gordon (1930) obtuvieron evidencias de que el extracto alcalino de hipófisis anterior estimulaba el crecimiento del hueso en ratas hipofisectomizadas (r.c.108). Por otro lado Ray y colaboradores (1941), demostraron que la hipofisectomía provocaba una reducción en la anchura del cartílago de la epífisis de la tibia, reflejando una alteración en el equilibrio existente en la condrogénesis y osteogénesis, revirtiéndose éste fenómeno con la administración de la GH (111). Así, Kibrick y colaboradores (112) en ese mismo año demostraron que la respuesta del cartílago epifisial en ratas jóvenes hipofisectomizadas aumentaba con la cantidad de GH aplicada durante un período de 4 días y observaron que existía una relación logarítmica entre las dosis administradas y la respuesta obtenida.

En base a estos antecedentes, Evans, Simpson, Marx y Kibrick (1943) (r.c.113) propusieron el "bioensayo de la epífisis de la tibia" (que consiste en la administración de hormona a grupos de



animales hipofisectomizados durante cuatro días consecutivos y al quinto sacrificio para la obtención de las tibias, para la medición del ensanchamiento del cartílago epifisial), que posteriormente fue estandarizado por Greenspan en 1949 (113).

La ventaja del método antes descrito es su elevada sensibilidad que oscila alrededor de 10  $\mu\text{g}$  de hormona y que es 30 veces mayor al ensayo de la ganancia de peso corporal en ratas hipofisectomizadas, y 300 veces más al ensayo de ganancia de peso en hembras adultas. Otra de las ventajas es el corto período de experimentación (5 días), y la reproducibilidad del ensayo.

La especificidad de la respuesta en el ensayo de la tibia, se ha cuestionado (114). Así, Marx y colaboradores (1944) demostraron que 5  $\mu\text{g}$  de tiroxina administrada por un período prolongado, producía un incremento promedio en el ensanchamiento del cartílago de 31 micras, aumentando la cantidad de hormona administrada (15 y 30  $\mu\text{g}$ ) no se observó mayor aumento en el cartílago. En general se ha observado que numerosas sustancias como la TSH, hormonas lactogénicas y testosterona pueden causar un incremento en la anchura del cartílago de aproximadamente 20 a 30 micras, pero en altas concentraciones, la respuesta permanece igual (113).

### b.3) Bioensayo de la ornitina descarboxilasa hepática (ODC)

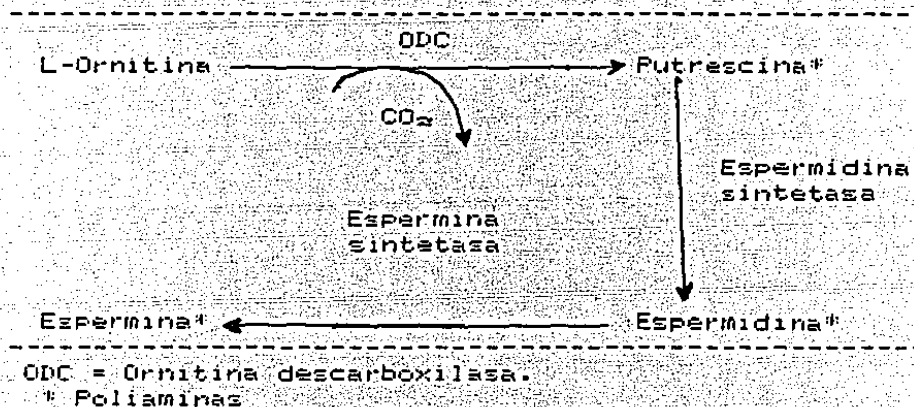
Un bioensayo que nos permite observar la estimulación de una vía metabólica a través de la GH es el bioensayo de la ODC. Este bioensayo se basa en la estimulación de la biosíntesis de las poliaminas (putrescina, espermidina, espermina), que se consideran como factores de crecimiento, que se sintetizan a partir de una descarboxilación llevada a cabo por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), utilizando como sustrato a la L-ornitina (115).

Se ha observado que las poliaminas se encuentran en altas concentraciones en tejidos donde ocurre una alta actividad metabólica (síntesis de proteínas). Por ejemplo, en estudios *in vivo*, se ha demostrado un elevada concentración de ODC en la regeneración de hígado después de una hepatectomía (116,117), hipertrofia renal y cardíaca (118), en embriones (119), en crecimiento malignos (119), con la administración de insulina (120), glucagon (120,121), prolactina (r.c.115), hormona de crecimiento (120,122-124) etc. En cultivos celulares (*in vitro*) un incremento similar ocurre en ODC, por ejemplo después de adicionar al medio, suero fresco (125), aminoácidos (126) insulina (127) hormona de crecimiento (128), agentes mitogénicos (129).

Por lo tanto el cambio en el metabolismo de las poliaminas, se ha correlacionado con una rápida elevación de la ODC, que actúa a su vez como enzima limitante para la biosíntesis de éstas. Recíprocamente en tejidos donde hay poca actividad metabólica, se ha observado una baja actividad de ODC intracelular (130). La figura 5 resume la vía metabólica.

FIGURA 5

BIOSINTESIS DE POLIAMINAS



3.1) Regulación hormonal

El control hormonal de la síntesis de poliaminas se ha demostrado que ésta regulado en gran parte por hormonas de naturaleza proteínica como son la LH, FSH, PRL y GH (131). En el caso particular de la GH se ha observado *in vivo* que la hormona

estimula la síntesis de poliaminas. A este respecto Russell y colaboradores (132) han encontrado que la alta actividad de ODC en la regeneración de hígado puede ser reducida y detenida por la hipofisectomía. Este efecto de la hipofisectomía en la respuesta de la ODC a la hepatectomía puede ser revertida con la aplicación de GH (132). Por otro lado se ha encontrado que la hipofisectomía de la rata, provoca un decremento en la concentración de espermidina hepática, y que los niveles de ésta poliamina son restaurados a sus niveles normales con tratamiento de GH en un tiempo de 2 a 4 horas, aumentando por lo tanto la actividad de la ODC (122,132). En ratas normales, la administración de la GH durante tres días también elevó la ODC hepática, Janne y Raina (122) observaron que una sola dosis de GH incrementa la actividad de ODC en el hígado de rata y que ésta actividad puede ser bloqueada por inhibidores de síntesis de proteínas y RNA.

El mecanismo de acción de la GH en el metabolismo de la espermidina, parece ser el resultado de una estimulación en la actividad de la ODC (124,133), con la acumulación de putrescina en el hígado, causando un incremento en la síntesis de espermidina.

#### **b.4 Bioensayos in vitro**

Por otra parte, en el caso de los bioensayos in vitro destaca, el que mide la incorporación de sulfato maracado dentro del

cartílago como una respuesta inducida por la GH a través de estimulación de somatomedinas (ver pág. 23); otros utilizan el transporte y uso de glucosa (134); y otros la actividad sobre el metabolismo de lípidos (104,135,136). Dentro de estos últimos, se han utilizado rutinariamente un bioensayo lipolítico (103,104,135-137) y uno antilipolítico en explantes de tejido adiposo abdominal de pollo y de rata (136-140), midiendo la liberación de glicerol en el medio después de un período de incubación con la hormona.

#### b.4.1 Bioensayo lipolítico

Las primeras sospechas de que la GH se encontraba involucrada en la lipólisis, se remonta a los experimentos de Lee y Schaffer (141), quienes administraron extractos ricos en actividad promotora del crecimiento a ratas las cuales presentaron un decremento en la cantidad almacenada de grasas, con ganancia en agua y proteínas. Esto permitió concluir que éste factor tiene un efecto específico en la obtención, síntesis y almacenamiento de las grasas. Posteriormente, Li y colaboradores (142) confirmaron que esta actividad lipolítica era atribuida a la GH.

En función de estos resultados pioneros, en los últimos años se han realizado estudios *in vitro* sobre el efecto de la GH en la lipólisis. Tal es el caso de Fain et.al. (136), y Goodman, H. (143), quienes demostraron en adipocitos aislados y en rebanadas de tejido adiposo de rata, que la GH en presencia de

glucocorticoides es capaz de incrementar la liberación de ácidos grasos y glicerol. En el caso particular de aves, existen reportes (104,135,137-140,148,149) que demuestran que la GH en ausencia de glucocorticoides en el medio es capaz de estimular la liberación del glicerol durante el proceso de incubación.

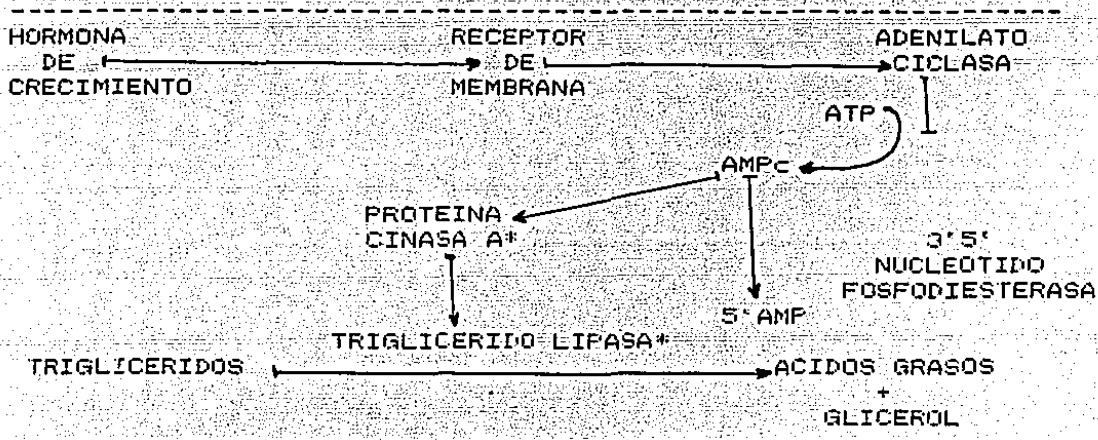
Por otro lado los trabajos de Frigieri, L. (144,145) sugieren que la lipólisis inducida en el tejido adiposo de rata, en presencia de glucocorticoides no es una propiedad de la GH, sino que ésta actividad es debida a una proteína que fue extraída durante la purificación de la GH.

En cuanto al mecanismo de acción de la GH en el metabolismo de los lípidos, es generalmente aceptado que la hormona actúa estimulando el rompimiento de triglicéridos a través de una serie de reacciones mediadas por adenosín monofosfato cíclico (AMPC), conocido como el segundo mensajero (ver figura 6). Esto es, el glicerol y los ácidos grasos libres (FFA) liberados por el tejido adiposo en presencia de GH son eventos secundarios, en donde la hormona se une a su receptor activando al adenilato ciclasa, el cual incrementa la conversión de adenosín trifosfato (ATP) a AMPC; los niveles elevados de AMPC activan a la proteína cinasa A (dependiente de AMPC) vía fosforilación que a su vez fosforila a la triglicérido lipasa inactiva y la convierte a una forma activa (146,147). Se han realizado una serie de investigaciones demostrando que éste mecanismo se encuentra regulado por la presencia de calcio extracelular (139), por inhibidores de

síntesis de proteínas y de RNA (139), así como por el 8-bromo-AMF<sub>c</sub> (139), por la somatostatina (148) y por el 8-bromo-GMF<sub>c</sub> (análogo del guanidín monofosfato cíclico) (149). Todos en explantes de tejido adiposo abdominal de pollo.

FIGURA 6

MECANISMO DE ACCION DE LA GH EN EL METABOLISMO DE LOS LIPIDOS



b.4.2 Bioensayo antilipolítico

La GH presenta efectos lipolítico y antilipolítico en tejido adiposo de rata y pollo *in vitro*. Específicamente, la GH antagoniza la lipólisis inducida por epinefrina en segmentos de tejido adiposos de rata hipofisectomizada (152,153); y la lipólisis inducida por glucagon (137-140), insulina,



somatomedinas (IGF-I, IGF-II) y somatostatina (SRIF) (148), en tejido adiposo de pollo. Sin embargo, la GH no parece afectar la lipólisis estimulada por epinefrina en tejido de rata recién destetada (154). El mecanismo por el cual la GH inhibe la lipólisis inducida por catecolaminas y glucagon *in vitro* se ha venido investigando. Esto ha sugerido que el efecto antilipolítico de la GH se inicia dentro de las primeras 12 minutos de incubación, puesto que éste efecto puede ser bloqueado con antisuero de GH antes de este tiempo, pero no después (154). En este período se cree que existe una baja actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc (153) y/o una disminución en la fosforilación de la triglicérido lipasa que puede ser involucrada en la expresión de la antilipólisis inducida por GH.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para explicar la multifuncionalidad de la GH, se han propuesto, al menos, dos hipótesis interesantes. En una de ellas propone, que al menos para la GH de mamíferos, los elementos estructurales requeridos para la actividad promotora del crecimiento o aquellos requeridos para producir una variedad de efectos metabólicos agudos, crónicos o permanentes, y aquellos que producen acciones reguladoras, se encuentran localizadas en regiones discretas de la molécula. Esta proposición sugiere que la hormona de crecimiento es una proteína con varios centros activos (155,156). Mills y colaboradores (157) interpretan la multifuncionalidad, como expresión posible de la acción de una variedad de receptores reaccionando con regiones diferentes de la estructura de la GH.

Otra posibilidad alternativa para tratar de explicar la gran diversidad funcional de la proteína, ésta relacionada con la heterogeneidad molecular de la proteína (variantes de carga y de masa) obtenida de la hipófisis. Así, La forma más abundante de la GH (22K) puede ser solo una de las especies moleculares liberadas por la hipófisis, y es posible que existan otras formas modificadas de la hormona con diferentes actividades, o bien que sean generadas en la circulación para realizar sus diferentes funciones (158).

En nuestro laboratorio existe el interés de estudiar algunos de los aspectos estructura-función de la hormona de crecimiento, y se ha tomado como modelo experimental al pollo. Para la realización de éste trabajo se requiere contar con la hormona purificada, y con la capacidad para medir las diferentes bioactividades que ésta molécula presenta. Con el propósito de evaluar la integridad biológica de la hormona de crecimiento de pollo (cGH) purificada con la técnica implementada en nuestro laboratorio, se decidió implementar y desarrollar diferentes bioensayos tanto *in vivo* como *in vitro*, heterólogos y homólogos, para medir distintas funciones en las que participa la cGH, en comparación con la GH de mamíferos.

Finalmente, un objetivo fundamental de ésta tesis, fue iniciar el análisis de bioactividad de las variantes de carga de la cGH, para estudiar si la heterogeneidad estructural puede explicar, al menos en parte, la diversidad funcional de la hormona de crecimiento.

Para conseguir dichos objetivos, se propusieron las siguientes metas específicas:

#### Bioensayos Heterólogos:

- 1.- Ensayo somatotrópico: ensanchamiento de la epífisis de la tibia en ratas hipofisectomizadas.
- 2.- Ensayo de la actividad de la ornitina descarboxilasa hepática en ratas hipofisectomizadas.

#### Bioensayos Homólogos:

- 1.- Bioensayo lipolítico en explantes de tejido adiposo de pollo.
- 2.- Bioensayo antilipolítico en explantes de tejido adiposo de pollo.
- 3.- Determinación de la bioactividad de tres variantes de carga de la cGH, en los ensayos lipolítico y antilipolíticos.

## MATERIAL Y METODOS

### 1) MATERIAL

#### A) Animales:

a.1) Para los bioensayos de la tibia y de ornitina descarboxilasa, se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, hipofisectomizados a los 28 días de edad, con un peso corporal de 55-65 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ), con un ciclo de luz-obscuridad de 10:14 h, con humedad relativa del 50-60 %, y se les proporcionó alimento (Purina-Chow) y agua "ad libitum".

a.2) Para los bioensayos lipolítico y antilipolítico, se emplearon pollos jóvenes de la raza Pilch, de aproximadamente 6 a 8 semanas, con un peso de 2.5 Kg. Los pollos utilizados, de la especie *Gallus domesticus*, fueron proporcionados por la Empresa "Procesadora de Aves de Morelos". Una vez trasladados al laboratorio, los animales se mantuvieron con alimentación normal (dieta de crecimiento) y agua "ad libitum".

#### b) Muestras biológicas:

b.1) Estándar de referencia de Hormona de Crecimiento Bovina (NIH-GH-B18) (1) cuya actividad biológica determinada por el bioensayo de la tibia fue de 1.91 UI/mg de proteína, con límites de confianza de 0.9-4.5 UI/mg de proteína y con un índice de

precisión de 0.18.

b.2) Hormona de Crecimiento Humana (hGH-IMSS) lote # 21 de uso clínico, con actividad biológica determinada por el ensayo de ganancia de peso corporal en ratas prepúberes hipofisectomizadas, mostró ser de 1 UI/mg de proteína.

b.3) Hormona de Crecimiento de pollo (cGH), fracción BDE-1, obtenida en el laboratorio a partir de hipófisis de pollo, después de caracterizarla bioquímicamente y demostrado su pureza (48).

c) Reactivos: Los reactivos fueron de grado analítico y el agua empleada fue bidestilada y desionizada en un aparato Milli-Q (Millipore).

## 2) METODOS

### a) HIPOFISECTOMIA

Preparación prequirúrgica: Se hipofisectomizaron ratas Wistar, machos, de 28 días de edad, empleando la técnica parafaríngea (159), modificada por el Dr. Ramón Álvarez Buyla (Comunicación personal) y por nuestro laboratorio. La técnica quedó estandarizada de la forma siguiente: Entre 12 a 24 horas antes de la cirugía los animales recibieron hidrocortisona a dosis de 5 mg/animal (Flebocortid 500 mg, Lab. Cilag) y antibiótico a dosis de 50,000 UI (Penprocilina de 800,000 UI, Lab. Lakeside), por vía subcutánea en un volumen de 0.5 ml.

Anestesia: Posteriormente se les inyectó pentobarbital sódico en cantidad de 2.5 mg/ 100 g de peso corporal (Anestosal 0.063 g en 1 ml, Lab. Smith Kline), por vía intraperitoneal y atropina (40 µg/100 g de peso) por vía subcutánea.

Cirugía: Una vez anestesiado el animal, se le colocó en posición de decúbito dorsal y se le sujetó por sus cuatro extremidades a una mesa diseñada para la cirugía.

La maniobra quirúrgica, que se realiza bajo el microscopio estereoscópico (Reichert, Mod stereo star ZOOM), consiste en lo siguiente: Con una torunda de algodón con benzal, se limpia la cara anterior del cuello, y se efectúa un corte en la línea media a la altura de la tráquea (2-3 cms), que va desde 1 cm por atrás del borde inferior de la mandíbula hasta un poco por delante del mango del esternón. Se incide la fascia superficial que recubre a los músculos digástricos y esternohioideos. Con pinzas de relojero se separan los músculos digástrico anterior y esternohioideo, disecándose los nódulos linfáticos y ganglios submaxilares. Así queda expuesta la tráquea, la cual se disecta del músculo tirohioideo de manera que los anillos traqueales quedan expuestos para realizar una incisión a la altura del tercer anillo traqueal (traqueotomía). Esto se realiza con el objeto de facilitar la respiración al animal durante la cirugía.

A continuación se utilizan separadores para tener una mejor visión de la zona; empleando como referencia el tendón central

del músculo digástrico anterior, con las pinzas se hace una separación de las siguientes estructuras: la vena yugular interna y la cara interna del músculo macetero, los cuales quedan hacia afuera, y el músculo digástrico y los conductos faringoesofágicos y laringotraqueales que quedan en la línea media. Con un separador de vidrio con punta roma, se separan las estructuras internas hacia la línea media, al hacerlo aparece en el fondo el piso de la nasofaringe, del que sobresale el extremo distal de la apófisis pterigoidea izquierda, la que se toma como referencia para abrir la nasofaringe. Una vez desinsertado el músculo de la nasofaringe, aparecen en el fondo los huesos del cráneo en donde se aprecia la cresta occipital y una línea transversal de color azul claro, que señala la articulación esfenooccipital. En la cara anterior del basiesfenoides en la parte media e inmediatamente por delante de la línea azul se perfora con una fresa dental de carburo del No. 8 (Motor American) hasta llegar a la dura madre. Esta se desgarrá cuidadosamente para evitar hemorragia. una vez quitada la duramadre la hipófisis queda expuesta y es fácilmente extirpada por succión mediante un sistema de vacío. A continuación se coloca un fragmento de gelfoam (esponja estéril) en el lugar de la trepanación, y por último se sutura la piel con una aguja de cirugía de 1/2 círculo e hilo (tipo Sutura Quirúrgica Trenzada calibre 3/0). Durante la recuperación, los animales se mantuvieron en un caja de policarbonato con aserrín estéril, en posición de decúbito dorsal, bajo un foco de 100 W para mantenerlos calientes.



**Manejo post-quirúrgico:** En la etapa postsquirúrgica, los animales recibieron 50,000 UI de penicilina y 5 mg de hidrocortisona por vía subcutánea durante tres días consecutivos, en un volumen de 0.5 ml, y se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , un ciclo de luz-obscuridad de 10:14 h, con humedad constante de 50-60 %, alimento (Purina-Chow) colocado dentro de la caja para facilitar la alimentación de los animales, y agua "ad libitum".

**criterios de inclusión:** Los animales hipofisectomizados se mantuvieron en condiciones controladas antes y durante los bioensayos. Durante el período de observación se seleccionaron sólo los animales que cumplieron el siguiente criterio: a) Durante doce a catorce días después de la operación, el peso corporal fue estable y no existió un aumento mayor de 3 % en los siguientes días, ratas enfermas y aquellas que sobrepasaron el peso corporal en 10 g a su peso original fueron descartadas.

Una vez sacrificados los animales utilizados en los bioensayos, se corroboró que la hipofisectomía hubiera sido completa, mediante disección y observación directa de la silla turca, además se verificó el tamaño de las glándulas suprarrenales y el hígado, finalmente se determinó la GH circulante en el suero de estos animales por medio del Radioinmunoensayo (RIA) implementado en el laboratorio (160).



## b) BIOENSAYOS

### b.1) Bioensayo de la tibia

Como se resume en la tabla V, en el ensayo se emplean ratas hipofisectomizadas, las cuales se distribuyeron en siete grupos de cuatro animales cada uno. El grupo control que solo recibió solución salina con albúmina al 0.1 %, tres grupos para la hormona de referencia (NIH-GH-B18) correspondientes a las dosis de 60, 120 y 240  $\mu$ g de hormona total; tres grupos para la cGH (fracción BDE-1) a las mismas dosis que el patrón a los que se les administró durante 4 días consecutivos GH, o solución salina (control), por vía subcutánea, en un volumen de 0.5 ml de vehículo (NaCl 0.85 %, albúmina bovina 1 %). Venticuatro horas después de la última inyección, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron ambas tibias, de las que se hicieron preparaciones histológicas teñidas con nitrato de plata al 2 % y en donde se midió la anchura de los cartílagos epifisiales, utilizando un microscopio estereoscópico, equipado con un micrómetro.

#### b.1.1) Tinción de la tibia

La tinción del cartílago de la epífisis de la tibia se realizó con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), y quedó estandarizada de la siguiente manera:

Tabla V

BIOENSAYO DE GH

(Greenspan y cols. 1949)

Aumento de la anchura del cartilago de la epífisis de la tibia en ratas hipofisectomizadas bajo la acción de la GH.

RATA: Machos de la cepa Wistar.

Edad: 26 a 28 días antes de la cirugía.

4 animales por punto.

Observaciones: 4 días de inyección, al quinto sacrificio.

µg de proteína total	
Control	Albúmina 0.1 % en solución salina.
Patrón (NIH-GH-B18)	60 µg proteína/animal. 120 µg proteína/animal. 240 µg proteína/animal.
Problema (BDE-1)	60 µg proteína/animal. 120 µg proteína/animal. 240 µg proteína/animal.
VIA DE APLICACION: SUBCUTANEA	
Horario	Lunes    Martes    Miércoles    Jueves    Viernes
11:00	0.5 ml    0.5 ml    0.5 ml    0.5 ml    Peso corporal Sacrificio. Obtención del hígado. Diseción de tibia izq. Tinción con Nitrato de plata. Medición. Cálculos.

Las tibias se limpiaron perfectamente de tejido y músculo que las rodea y se procedió como sigue:

- Se lavaron en agua durante 30 min.
- Se sumergieron en acetona durante 60 min.
- Se lavaron con agua durante 30 min.
- Se tiñeron con nitrato de plata al 2 % durante 20 min.
- Se realizaron dos lavados sucesivos con agua.
- Las tibias se colocaron en el negatoscopio durante 20 min, hasta que la parte calcificada quedo teñida de café oscuro.
- Se sumergieron posteriormente en tiosulfato de sodio al 10 % durante 10 min.
- Se colocaron en etanol al 80 % toda la noche.
- Finalmente se midió la anchura del cartílago epifisario con la ayuda del microscopio estereoscópico previamente calibrado con un micrómetro.

## b.2) BIDENSAYO DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA HEPATICA (ODC):

### b.2.1) Determinación de la actividad de ODC hepática.

Esta actividad se analizó mediante el método descrito por Slotkin y Bartolome (161). La técnica se implementó utilizando ornitina marcada ( $^{14}\text{C}$ -ornitina (NEC-469)) como sustrato específico de la ODC presente en el medio. Por lo tanto se evaluó la actividad de la enzima como la capacidad de descarboxilar al sustrato con la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  en el medio. Para tal propósito, se montó inicialmente en ratas machos no hipofisectomizados de la cepa Wistar de 30 días de edad, con un peso de 70 a 80 g.

## Técnica:

El animal en cuestión fue sacrificado por dislocación cervical para la obtención del hígado. Este se obtuvo de inmediato, se pesó y se conservó en hielo hasta su utilización (3 min). Posteriormente una fracción del hígado se homogenizó en 20 vol. de amortiguador TRIS-HCl 10 mM a pH 7.2, empleando un homogenizador tipo Potter-Elvehjem.

El homogenizado se centrifugó a  $19500 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , para lo cual se utilizó un rotor de ángulo fijo SS-34 y una centrífuga refrigerada Sorval RCS-B. Una vez obtenidos los sobrenadantes se utilizaron para la determinación de la actividad de ODC.

El ensayo consistió en lo siguiente: a  $900 \mu\text{l}$  del sobrenadante se le agregó  $50 \mu\text{l}$  de una mezcla que contiene  $45 \mu\text{l}$  de ditioneitol (protector de grupos tioles (SH)), a una concentración final de 2 mM ( $61.6 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ), y  $5 \mu\text{l}$  de  $^{14}\text{C}$ -Ornitina a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ . Finalmente se le adicionó  $50 \mu\text{l}$  de fosfato de piridoxal como cofactor a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  ( $24.7 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ). Se tapó perfectamente el frasco de reacción con un tapón de hule y se incubó la mezcla de reacción a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos, con agitación constante. Al término de éste tiempo, se detuvo la reacción en frío, mediante la adición de TCA al 10% ( $500 \mu\text{l}$ ), con el propósito de precipitar las proteínas e inmediatamente después

se agregaron 200  $\mu$ l de hidróxido de hiamina (1N) a un pozo central que cuelga del tapón de hule y que contiene un cuadro de papel filtro, para atrapar el  $^{14}\text{CO}_2$  liberado durante la reacción. Se realizó una segunda incubación a 37°C durante una hora, con el objeto de que el  $^{14}\text{CO}_2$ , se incorporara totalmente en la hiamina. Al finalizar la segunda incubación, se quitó el tapón y se colocó la hiamina y el papel filtro en un cocktail de centelleo para muestras no acuosas (PPD (4 g), POPOP (0.1 g) y Tolueno (1000 ml)), y se contó en un espectrómetro para radiaciones betas.

#### b.2.2) Optimización y Estandarización del Método

Uno de los primeros objetivos durante la implementación de esta técnica, consistió en establecer las condiciones de la cinética en la actividad de la ODC y para tal propósito se realizaron estudios tales como: 1) Tiempo de incubación de la muestra, 2) Observación de la actividad dependiendo de la concentración de sustrato no radiactivo, 3) Efecto de la concentración de proteína.

##### 1.- Tiempo de incubación de la muestra:

Las muestras fueron incubadas a diferentes tiempos partiendo del tiempo 0 hasta 360 min. Al final de cada tiempo de incubación, la reacción fue finalizada con TCA al 10 %, y se determinó la actividad enzimática de ODC, como se mencionó en la sección anterior.

## 2.- Concentración de sustrato:

Para mantener un nivel de saturación con el sustrato existente en la muestra, se realizaron experimentos, utilizando concentraciones variables ( $1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-8}$  M) de sustrato no radiactivo (L-Ornitina monohidrato-MERCK), adicionado en un volumen de 10  $\mu$ l, que compitiera con la ornitina radiactiva ( $^{14}$ C-Ornitina con una actividad específica de 49.0 mCi/mmol Nac-469, DUPONT) mantenida a una concentración constante de 5  $\mu$ M. La actividad enzimática se determinó, como se mencionó en la sección anterior.

## 3.-Concentraci3n de la Enzima:

Con el propósito de analizar la respuesta lineal a diferentes concentraciones de enzima, se realizaron experimentos utilizando diferentes diluciones del sobrenadante en cada ensayo, (proteína total) a saber 1:10 (10 mg/ml), 1:20 (5 mg/ml) y finalmente 1:40 (2.5 mg/ml). Con el propósito de observar la estabilidad de la enzima, se congelaron los mismos sobrenadantes y se determinó la actividad de ODC después de descongelados una semana después. A cada fracción se le determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry modificado por Hartree (162).

### b.2.3) Efecto del ayuno en la actividad de la ODC

Con el propósito de disminuir la variabilidad biológica en éste sistema, se decidió observar el efecto de ayuno sobre la actividad de la ODC. Como sabemos, esta condición fisiológica disminuye la síntesis de proteínas en el organismo y por lo tanto, se pretendía tener a los animales en condiciones basales semejantes, de manera que las variaciones en la actividad de la ODC hepática no dependieran de diferencias individuales en el consumo de nutrientes. Para tal propósito se determinó la actividad de la ODC en 3 animales de las mismas características (edad, peso, sexo) sometidos a ayuno durante 16 horas aproximadamente. Posterior a éste tiempo, fueron sacrificados los animales para la obtención del hígado y se determinó la actividad de la enzima.

### b.2.4) Efecto de la GH en la actividad de la ODC en ratas hipofisectomizadas

Una vez estandarizada la técnica, se procedió a estudiar el efecto de la hormona de crecimiento sobre ésta actividad enzimática. Se implementó en ratas hipofisectomizadas, estimuladas con GH por vía intraperitoneal (IP) a dosis de 1 y 5 mg/Kg de peso, en un volumen de 0.5 ml de solución salina; cuatro horas después de la inyección, se sacrificaron los animales para la determinación de la actividad de ODC utilizando el método descrito arriba. La figura 7 resume el protocolo del bioensayo.

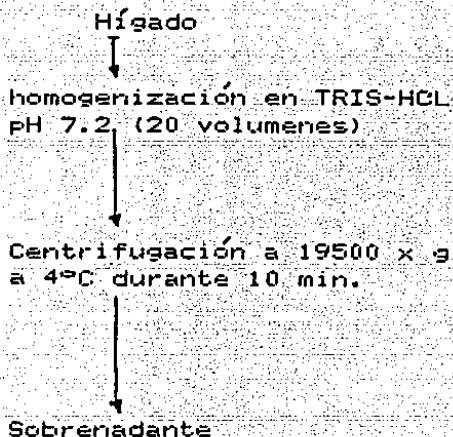
FIGURA 7

BIOENSAYO DE LA ODC HEPATICA

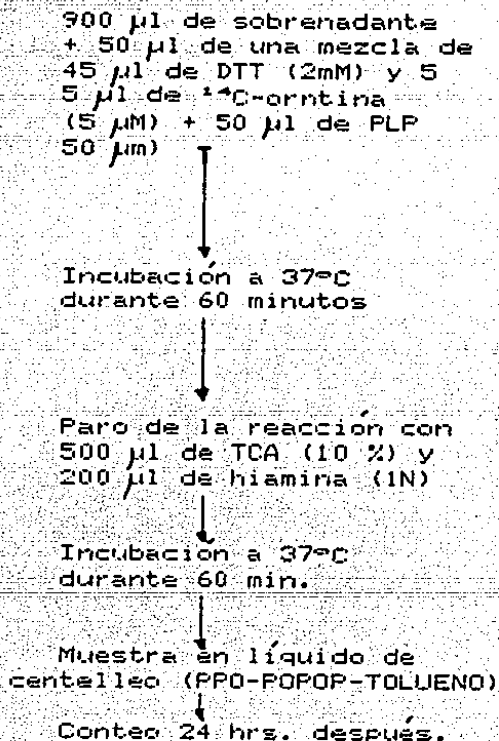
Medición de la liberación de  $^{14}\text{C}\text{O}_2$  a partir del sustrato  $^{14}\text{C}$ -ornitina después de una hora de incubación.

Animales machos de la cepa Wistar hipofisectomizados, estimulados con GH a las dosis de 1 y 5 mg/Kg de peso, cuatro horas antes del sacrificio.

OBTENCION DE LA ODC



ACTIVIDAD DE ODC



PLP: FOSFATO DE PIRIDOXAL  
DTT: DITIOTREITOL



### b.3 BIODIAGNÓSTICO LIPOLÍTICO

La actividad lipolítica de la CGH fue estimada empleando un bioensayo *in vitro* sobre explantes de tejido adiposo abdominal de pollos, siguiendo la técnica descrita por Campbell y Scanes (104). Este bioensayo se realizó en pollos machos de la raza Pilch de 8-9 a 1-9 semanas de edad.

El fundamento del bioensayo se basa en la capacidad que tienen las hormonas tiroideas (GH y Glucagon) de inducir el rompimiento de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo, produciendo ácidos grasos y glicerol, en el medio después de un período de incubación.

En cada experimento, los animales (n=3) fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente después se disectó el tejido adiposo abdominal, el cual fue colocado rápidamente en el medio de incubación (Krebs-Ringer-Hepes (18 ml de la solución patrón de Krebs, correspondiente a 5.75 % de KCl, 8.10 % de  $CaCl_2$ , 10.55 % de  $KH_2PO_4$  y 19.10 % de  $MgSO_4$ , 40 ml de NaCl al 4.5 %, 42 ml de 1 M HEPEs (0.15 M), ajustados a un volumen de 260 ml con agua que contiene 20 mM de glucosa, 1 mg/ml de albúmina bovina, ajustado a pH 7.45), gaseado previamente con 95 % de  $O_2$  y 5 %  $CO_2$  durante 30 min. a 39°C. Este tejido fue fragmentado en rebanadas de aproximadamente 1-3 mm. y mezcladas, para ser colocadas en cantidades de 7-10 rebanadas por frasco (70-100 mg aproximadamente). Las muestras se preincubaron durante una hora

bajo una atmósfera de 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub> en un baño (LAB-LINE/DUBNOFF INCUBE-SHAKER mod. 3575) con agitación constante (70 oscilaciones por minuto). Posteriormente el medio fue descartado y se reemplazó con medio fresco (950 µl) y tratamiento específico a las dosis de 10, 100 y 1000 ng/ml en un volumen de 50 µl, para la cGH y bGH respectivamente; en el caso del glucagon se utilizó una dosis única de 1 ng/ml. Durante el bioensayo, los explantes fueron incubados por dos horas sucesivas, reemplazando el medio y el tratamiento al final de cada hora, e inmediatamente después se congelaron los sobrenadantes para la determinación de glicerol en el medio (índice relativo de lipólisis) mediante una técnica enzimática (163). Al final de la última incubación se determinó el peso húmedo de los explantes. (ver figura 8).

#### b.4 BIOENSAYO ANTILIPOLITICO

Este bioensayo se implementó en base a la técnica descrita por Campbell y Scanes (138), midiendo el grado inhibición que la GH provoca sobre la lipólisis inducida por glucagon, en explantes de tejido adiposo abdominal de pollos como fue descrita anteriormente (ver figura 8). Las modificaciones a esta técnica fueron las siguientes: 1) tiempo de incubación de las muestras que correspondió únicamente a la primera hora, a la cual se le determinó glicerol en el medio. 2) Las dosis utilizadas durante el bioensayo correspondieron a 10 ng de cGH + 1 ng de glucagon/ml, 100 ng de cGH + 1 ng de glucagon/ ml y 1000 ng de

cGH + 1 ng de glucagon /ml. en el caso de glucagon solo se utilizó una dosis de 1 ng/ml. Se determinó glicerol a cada muestra como en el bioensayo lipolítico.

FIGURA 8

BIOENSAYO LIPOLITICO Y ANTILIPOLITICO DE GH

-----  
Pollo de la raza Pilch  
de 8-9 semanas

↓  
Sacrificio por dislocación  
cervical.

↓  
Obtención del tejido adiposo  
abdominal y colocado en el medio  
de incubación (Krebs-Ringer-  
Hepes pH 7.45, con 20 mM de  
glucosa, 1 mg/ml de albúmina  
bovina y 2.54 mM de cloruro de  
calcio) a 39°C

↓  
Fraccionamiento del tejido en  
explantes de 1-3 mm.

↓  
Preincubación durante 60 min

Determinación de  
glicerol a c/muestra.

↑  
Obtención del sobrenadante  
y congelado a -70°C

↑  
Adicionar medio de incubación  
con tratamiento específico.

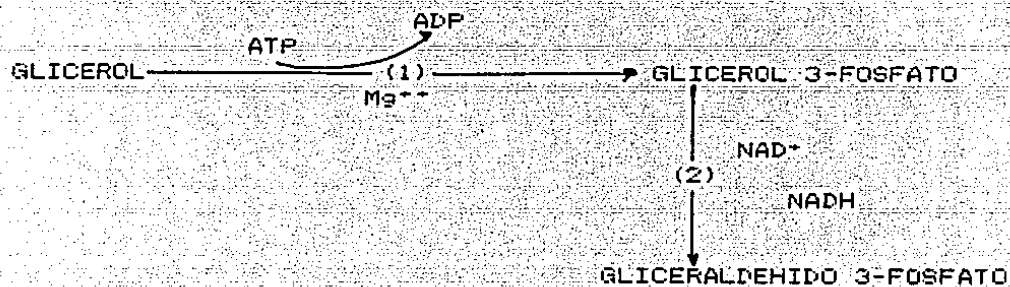
↑  
Desecho del medio de  
incubación

#### b.4.1) Determinación enzimática de glicerol

La determinación de glicerol se basa en la siguiente reacción:

FIGURA 9

#### DETERMINACION ENZIMATICA DE GLICEROL



(1) GLICEROL CINASA (GK)

(2) GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO DEHIDROGENASA (GDH)

Los sobrenadantes obtenidos en ambos bioensayos fueron desproteinizados con 1 ml de ácido perclórico (PCA) 1N, y centrifugados a 2.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante resultante se neutralizó con 0.5 ml de carbonato de potasio (0.5 N). A las muestras desproteinizadas y neutralizadas (0.5 ml), se les adicionó 1.5 ml de amortiguador de reacción (Adenosín trifosfato (2.5 mM), TRIS (0.125 M), Hidrazina (0.5 M), Cloruro de Magnesio (12.5 mM) y NAD (1.88 mM) pH 9.3)

Finalmente las muestras fueron leídas en el fluorómetro (Perkin-Elmer mod. LS-5) a una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 455 nm. Las muestras fueron releídas, 6 minutos después de la adición de 20  $\mu$ l de la mezcla de enzimas (8 UI de Glicerolcinasasa (GK) 33 UI/mg de proteína Lab. Calbiochem, No cat.3564 y 4 UI de Gliceraldehído deshidrogenasa (GDH) 50 UI/mg de proteína, Lab. Calbiochem No. Cat. 356741, con el propósito de medir cuantitativamente la conversión de NAD<sup>+</sup> a NADH por cada mol de glicerol en el medio. Los resultados fueron expresados en nmol de glicerol/g de tejido húmedo/hora.

#### Curva patrón:

Se utilizó una solución patrón de glicerol 2 mM. Se tomaron concentraciones conocidas de glicerol, a saber 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M en un volumen de 1ml. Posteriormente se procedió como sigue:

- Las muestras fueron diluidas a 1 ml con agua.
- Se adicionó 1 ml de FCA (1N).
- Se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min.
- 1.0 ml del sobrenadante resultante se neutralizó con 0.5 ml de carbonato de potasio (0.5N)
- A las muestras neutralizadas (0.5 ml), se les adicionó 1.5 ml de amortiguador de reacción.
- Se leyeron las muestras en un fluorómetro a una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 455 nm.
- Releídas 6 minutos después de la adición de las enzimas (4 UI de GDH y 8 UI de GK por muestra).

### c) ANALISIS ESTADISTICO DE LOS BIOENSAYOS

En el caso del bioensayo de la tibia, los resultados se analizaron por medio de un análisis de varianza, diseñado en la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Centro Médico Nacional del IMSS (106). Para los bioensayos de la Ornitina descarboxilasa hepática, el lipolítico y el antilipolítico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y por la diferencia mínima significativa entre los grupos estudiados (DMS) (167).

### d) OBTENCION DE LAS VARIANTES DE HORMONA DE CRECIMIENTO DE POLLO

Con el propósito de obtener las variantes de carga de la CGH, fue necesario en primer lugar la obtención de la fracción BDE-1, la cual fue extraída de hipófisis de pollo, sometidas a una extracción alcalina, seguida de una precipitación salina con sulfato de amonio y finalmente una cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa), de la cual se obtuvo la fracción antes mencionada correspondiente a la hormona de crecimiento de pollo (48).

Una vez obtenida la fracción BDE-1, se procedió a realizar una electroforesis nativa en un sistema de TRIS-PAGE, con el objeto de separar las variantes presentes en la fracción total. Esta se llevó a cabo, de manera semipreparativa según el método de Ornstein (164) consistente en un sistema electroforético

discontinuo en TRIS-poliacrilamida al 7.5 X pH 8.3 en geles nativos de 10.5 X 0.5 cm.

Después, se procedió a realizar la electroelución, con el propósito de recuperar cada una de las variantes con la ayuda de fuerza eléctrica. La cual se realizó de acuerdo a la metodología implementada en el laboratorio (165), con la siguiente modificación:

Las rebanadas correspondientes a la misma banda, se cortaron a su vez en partes y se metieron en una cámara de electroelución formada por dos pozos, en el fondo de cada uno de ellos fue colocada una membrana de diálisis Spectrapor No 1. En el pozo más pequeño se depositaron las rebanadas, posteriormente se añadió 10 ml de amortiguador de electroelución TRIS-ACETATOS 0.04 M (TRIS 12.1 g, Acetato de sodio 6.8 g y EDTA 1.86 g ajustado a pH 9.1 con ácido acético glacial en un volumen de 250 ml) dentro de la cámara, posteriormente se adicionó fuera de ésta, el mismo amortiguador pero a una concentración 0.4 M. En estas condiciones, se dejó corriendo a 100 V (voltaje constante) durante 6 hrs. a 4°C y al finalizar este tiempo se invirtió la polaridad de los electrodos durante 1 min, con el propósito de desprender la proteína adherida a la membrana de diálisis.

Después se dializó el eluido de cada variante contra agua, durante 24 hrs. haciendose cambios cada 2 ó 3 hrs. y finalmente se concentró en un evaporador centrífugo al vacío SAVANT. En

estas condiciones se almacenaron las muestras en el congelador para su posterior análisis electroforético en PAGE-SDS siguiendo la técnica descrita por Laemmli (166) y su determinación biológica en los bioensayo lipolítico y antilipolítico.



## RESULTADOS

### a) Obtención de las variantes

Como se mencionó en la sección de Material y Métodos, se separaron las variantes de carga 0.23, 0.3 y 0.35 de la fracción BDE-1 obtenida de DEAE-celulosa (165), mediante una electroforesis semipreparativa en geles nativos de TRIS-poliacrilamida, 7.5 %, pH 8.3 y seguida de una electroelución (figura 10).

Posteriormente se analizó el patrón electroforético de cada uno de los componentes electroeluidos, para lo cual se realizó una electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15 %, pH 8.6, además de correr la fracción BDE-1.

El resultado de esta electroforesis se muestra en la figura 11. Se puede apreciar que los componentes se purificaron homogéneamente mediante la electroelución y que presentan el mismo peso molecular aparente que la fracción BDE-1 (26,300 d).

En este trabajo se utilizaron cada una de las variantes para su determinación biológica en los ensayos lipolítico y antilipolítico.



Fig. 10. Electroforesis discontinua en PAGE-TRIS, al 7.5 %, pH 8.3, de la fracción BDE-1 (CGH) en geles de 10.3 x 0.5 cms. Del cátodo al ánodo. Las bandas muestran los siguientes Rf: 0.26, 0.3 y 0.35.

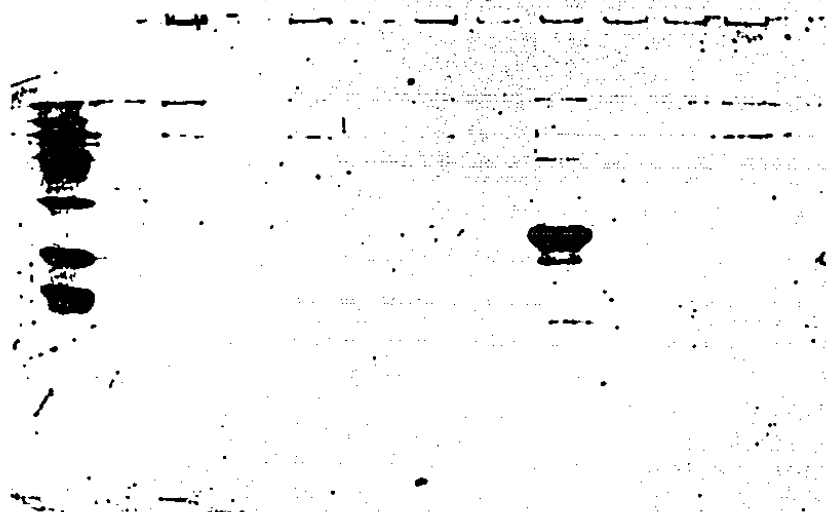


Fig. 11. Electroforesis discontinua en SDS-PAGE, al 15 %, pH 8.6, de los eluidos de cada variante de la fracción BDE-1. 1- Marcadores de peso molecular; 2) Variante 0.23; 3) Variante 0.3; 4) Variante 0.35; 5) Fracción BDE-1

## b) HIPOFISECTOMIA

Los resultados de la hipofisectomía, mostraron en un principio alta mortandad de los animales (100 %), esto puede estar explicado por la falta de experiencia en la cirugía y por la falta de un sistema de respiración artificial adecuado durante el proceso quirúrgico. Esta última condición fue sustituida por una traqueotomía durante la operación. En función de esta modificación, el porcentaje de sobrevivencia en el momento de la cirugía, aumento de un 95-100 %. Posteriormente, uno de los problemas que se resolvieron durante el período post-operatorio, fue el establecer las condiciones adecuadas del bioterio, consistente en una temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa del 50-60%, además de una limpieza exhaustiva de las cajas de policarbonato y mantenimiento de los animales en aserrín estéril. Por otro lado la administración de antibiótico e hidrocortisona durante 3 días consecutivos y suero glucosado en el agua. Con todas estas condiciones, aproximadamente el 60 % de los animales cumplió con los criterios de inclusión (pag 54) para ser utilizados en el bioensayo.

La figura 12 muestra un ejemplo de un animal hipofisectomizado con su correspondiente control (animales de la misma edad, peso y sexo).

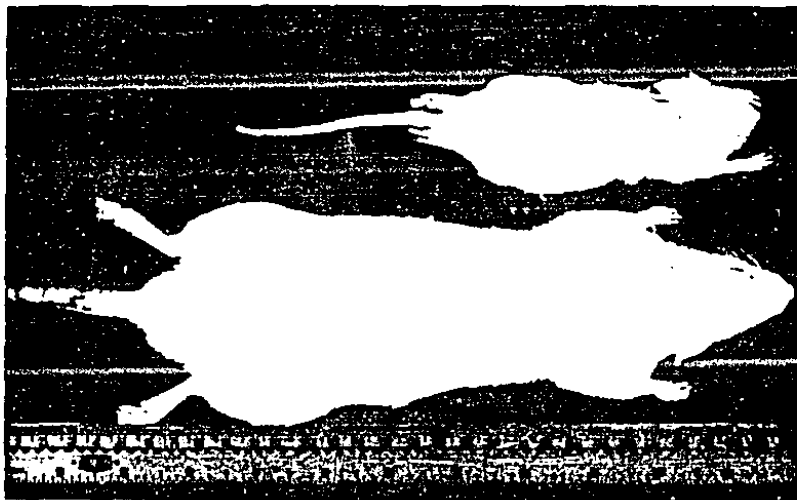


Fig. 12. Efecto de la hipofisectomía en animales de la misma edad, se c. El animal A. mostró un peso de 71 g en el momento de la cirugía y tres meses después fue de 110 g. En el caso del animal B. este mostró un peso de 50 g y tres meses después de 360 g.

Durante el período post-operatorio, se llevó a cabo un registro de peso corporal de los animales hipofisectomizados, la figura 13 ejemplifica el registro de algunos animales. Los animales A, B, y C presentan una estabilidad en cuanto su peso corporal durante 15 días de registro, permitiendo así su utilización en el bioensayo. (criterios de selección). mientras D, E y F son animales mal hipofisectomizados, ya que presentaron un aumento de 10 o más gramos, con respecto a su peso en el momento de la cirugía.

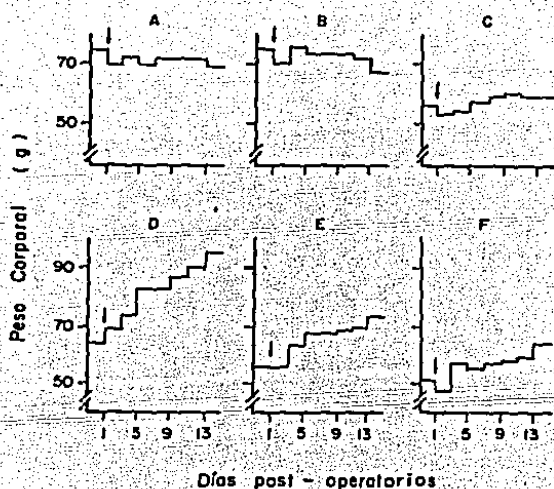


Fig. 13. Registro corporal de algunos animales después de la hipofisectomía. Se tomó el registro de peso cada tres días durante el período post-operatorio. La flecha indica el día de la hipofisectomía y el registro corporal del animal en el momento de ésta.

### c.1) Bioensayo de la tibia

Durante la implementación de este bioensayo se realizaron estudios con hormona de crecimiento bovina (NIH-GH-B18). Los resultados mostraron que la administración de la bGH a las dosis señaladas, provocó un incremento significativo en el grosor del cartílago epifisario de la tibia. Esta respuesta fue dependiente de la dosis administrada y con la dosis más alta prácticamente se duplicó el grosor obtenido en el grupo control ( $124.4 \pm 10.5$  Vs  $247.5 \pm 2.7$   $\mu\text{m}$ , respectivamente). La figura 14 muestra el efecto de la bGH en este bioensayo.

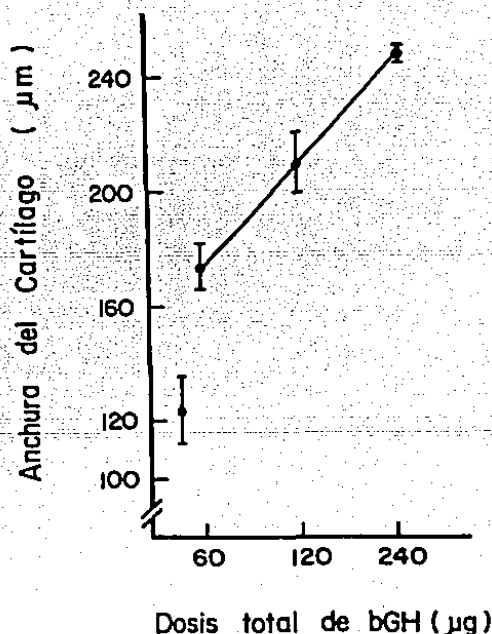


Fig.14. Relación dosis/respuesta a la administración de NIH-GH-B18 en el bioensayo de la tibia en ratas hipofisectomizadas, a dosis progresivamente crecientes. Los datos representan el  $\bar{X} \pm \text{SEM}$ , n=5 (GH). En el caso del control n=14.

Una vez montado el bioensayo con bGH se decidió comparar la respuesta del estándar bovino (NIH-GH-B18) con el producto problema, que en este caso correspondió a la cGH (fracción BDE-1) purificada en el laboratorio. La tabla V resume los resultados obtenidos durante el bioensayo completo.

TABLA V

BIOENSAYO DE LA TIBIA. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE bGH  
Y cGH (BDE-1)

TRATAMIENTO (ug proteína totales)		ANCHURA DEL CARTILAGO (um) (X ± SEM)
(4)	CONTROL	125.6 ± 3.3
(4)	bGH 60	205.0 ± 7.3 *
(4)	bGH 120	310.6 ± 31.2 **
(4)	bGH 240	298.7 ± 31.0 **
(4)	cGH 60	191.8 ± 2.8 *
(4)	cGH 120	241.3 ± 17.3 **
(4)	cGH 240	310.8 ± 5.1 ***

Los valores representan la media ± SEM. Entre parentesis el número de animales por dosis. La anchura del cartílago epifisial expresada en micras (La media de diez lecturas/tibia de animal). \* representa la diferencia significativa en p < 0.05 con respecto al control.



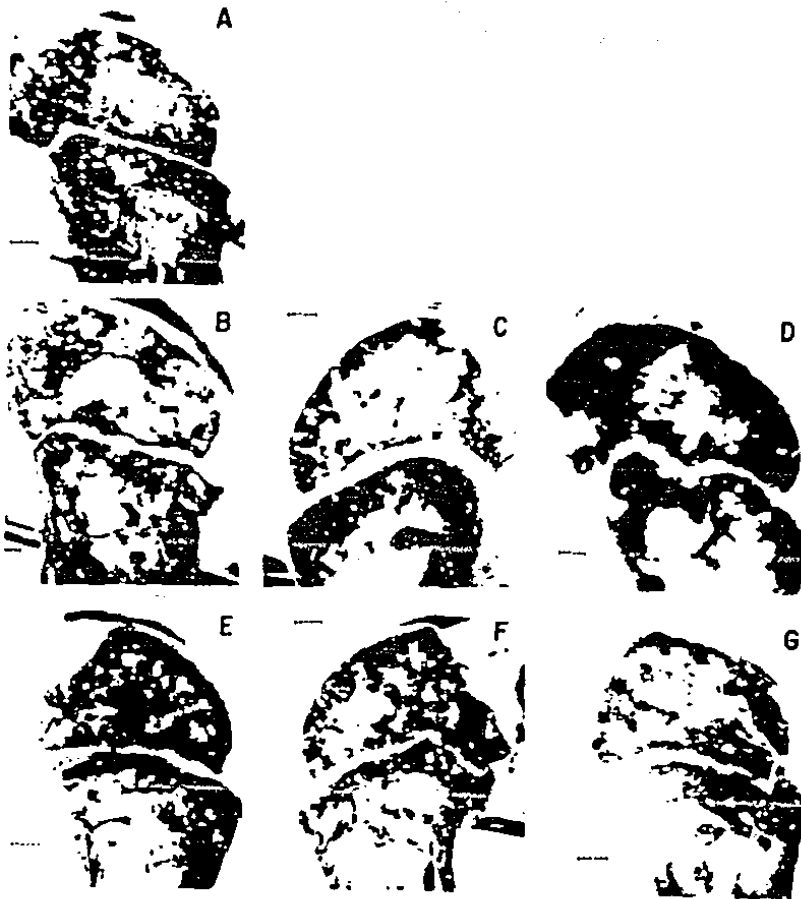


FIG. 12. Acción de la hormona de crecimiento sobre el cartílago epifisario de la tibia (Bovino de Greenspan). Se administraron las siguientes dosis (proteína total) durante el experimento: A: control; B: 50 µg BGH; C: 120 µg BGH; D: 240 µg BGH; E: 50 µg de cGH; F: 120 µg de cGH; G: 240 µg de cGH. La barra equivale a 500 µm.

La tabla anterior mostró una respuesta significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control, tanto para bGH como para cGH en las dosis estudiadas. En el caso de bGH, la dosis de 60  $\mu\text{g}$  de proteína, mostró una respuesta del 163 % que se incremento hasta un 247 % a las dosis de 120  $\mu\text{g}$  y 240  $\mu\text{g}$  de proteínas. En el caso de cGH se observó una respuesta dependiente de la dosis, 153, 192, y 247 % respectivamente. La figura 16 muestra el efecto de ambas hormonas en el bioensayo completo.

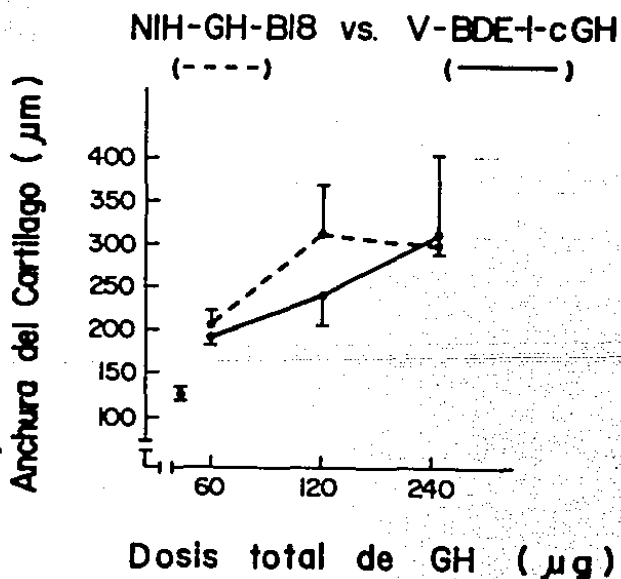


Fig. 16. Comparación de la relación dosis/respuesta del patrón de referencia NIH-GH-B18 vs cGH (BDE-1). Los valores presentan la  $\bar{x}$   $\pm$  SEM.

### C.1.2) Potencia biológica de la fracción BDE-1

La actividad biológica de la cGH (BDE-1) purificada en el laboratorio, en relación al patrón de referencia, mostró en el análisis estadístico del bioensayo en su diseño balanceado 3+3 una potencia de 1.769 UI/mg de proteína con límites de confianza (al 95 %) de 0.956 UI/mg - 3.27 UI/mg, con una lambda (índice de precisión del bioensayo) de 0.253 y una "g" (índice de significancia de la pendiente o paralelismo) de 0.188.

Cuando se analizó a dos dosis (ensayo 2+2) se obtuvo una potencia biológica de 1.321 con límites de confianza de 0.865 UI/mg - 2.01 UI/mg. Sus índices de confiabilidad fueron de 0.128 y 0.215 para la lambda y la "g" respectivamente.

## c.2) BIENSAYO DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA HEPATICA

### c.2.1) Optimización y estandarización del método

#### 1.- Tiempo de incubación:

La figura 17, muestra la cinética enzimática de la ODC con respecto al tiempo de incubación. Se observa un aumento en la liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  con respecto al tiempo, con una primera pendiente que es lineal en su respuesta hasta los 60 minutos, una segunda pendiente que parte de los 60 hasta los 180 minutos, finalmente se presenta una meseta de los 180-360 minutos. Es evidente que bajo las condiciones ensayadas el tiempo de incubación adecuado oscila alrededor de los 60 minutos, ya que se observa una respuesta proporcional con el tiempo.

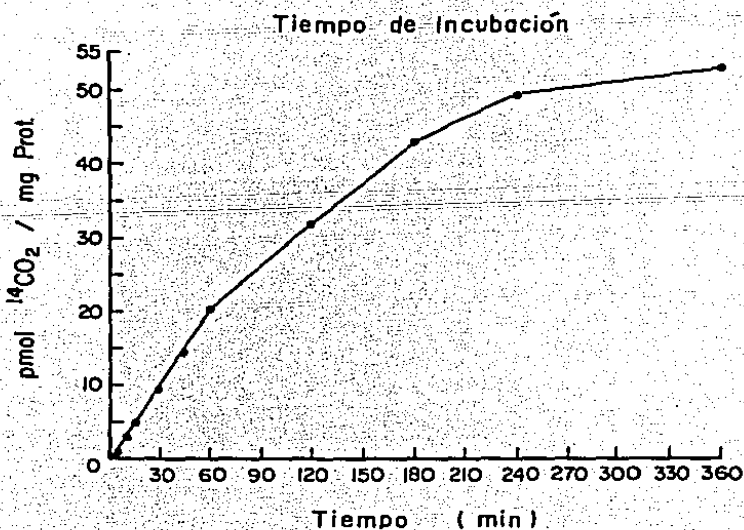


Fig.17 Cinética enzimática de la ornitina descarboxilasa hepática. EL ensayo se realizó a una dilución 1:20 en ausencia de ornitina no radiactiva en el medio.

## 2.- Concentración del sustrato:

La figura 18, presenta el efecto de la concentración de sustrato no radiactivo en el medio en la velocidad de formación de  $^{14}\text{CO}_2$  a una concentración de proteínas de 5 mg/ml.

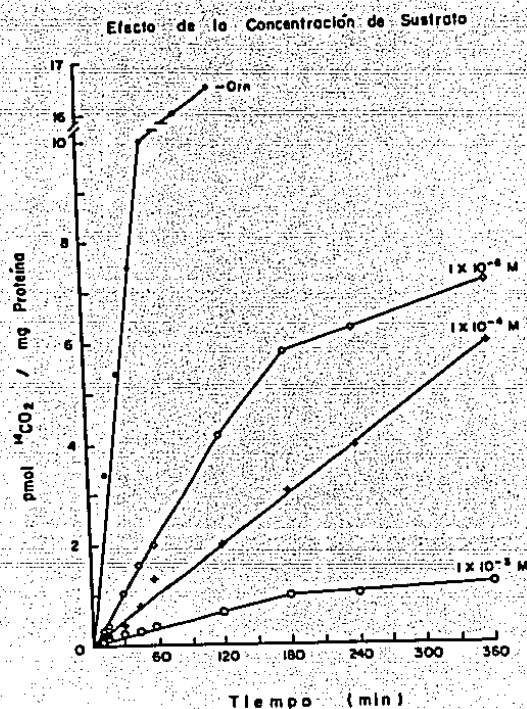


Fig.18 Efecto de la concentración de sustrato no radiactivo con respecto al tiempo de incubación, en la actividad de ODC hepática. Los ensayos se implementaron a una dilución 1:20 amortiguador TRIS-HCl pH 7.2. La actividad expresada en pmol de  $^{14}\text{CO}_2$ /mg de proteína.

La respuesta es inversamente proporcional a la concentración de sustrato en el medio. De manera general se observa, que las concentraciones de sustrato no radiactivo en el medio, muestran una respuesta proporcional a los 60 minutos, aunque en algunos casos la respuesta se prolongó hasta los 180 min ( $1 \times 10^{-3} M$  y  $1 \times 10^{-4} M$ ).

Por otro lado se observa que la concentración de  $1 \times 10^{-4} M$  incrementa la liberación de  $^{14}CO_2$  durante 6 horas de manera proporcional al tiempo; sin embargo en los ensayos sin ornitina fría en el medio, la producción de  $^{14}CO_2$  se incrementa en 10 veces aproximadamente y dependiente del tiempo hasta los 60 minutos.

### 3.- Concentración de enzima:

La figura 19, presenta los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de enzima, representadas como distintas diluciones del sobrenadante (1:10, 1:20 y 1:40) contra el tiempo de incubación.

#### Sobrenadante fresco

En la parte superior de la figura se muestra la actividad del sobrenadante fresco. Se observa una respuesta dependiente de la concentración de enzima, con un incremento aproximado de dos veces entre las diluciones, teniendo como resultados 92.0, 53.0 y 24.0 pmol de  $^{14}CO_2$  totales para las diferentes diluciones

ensavadas. Por otra parte se observa una linealidad en la actividad de la enzima hasta los 60 min. para las diluciones 1:10 y 1:20. en el caso de la dilución 1:40. la respuesta es lineal hasta los 120 min.

Con el propósito de normalizar los resultados. la actividad de la enzima fue expresada en mg de proteína (actividad específica). La parte superior derecha de la figura muestra que al tiempo de incubación de 60 minutos. la respuesta es practicamente la misma a las diluciones estudiadas.

#### Sobrenadante descongelado

Con el propósito de estudiar la estabilidad de la enzima, ante los efectos de la congelación-descongelación, se realizó el mismo diseño experimental una semana después. Los resultados se muestran en la parte inferior de la figura 19. Se presenta una dependencia en la respuesta a la concentración de enzima en el medio. teniendo como resultados 72, 37 y 16 pmol de  $^{14}\text{CO}_2$  totales para las diferentes diluciones. Por otra parte se observa un incremento de 2 veces entre las diluciones al tiempo de incubación de 60 minutos.

En función de la actividad específica. se observa que a los 60 minutos de incubación. la respuesta de las diluciones estudiadas. es semejante. De manera general se aprecia una disminución en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$ /mg de proteína de un 20-30 %, en comparación al sobrenadante fresco.

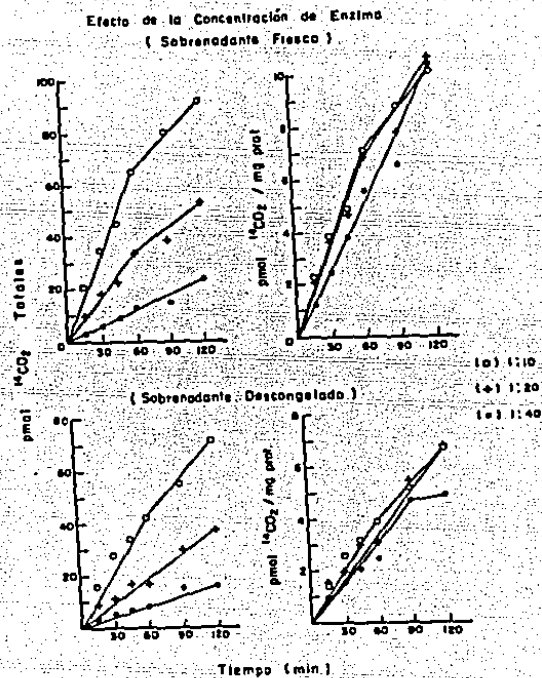


Fig. 19 Efecto de la concentración de enzimas en el sobrenadante fresco (parte superior), sobrenadante descongelado (parte inferior), expresada en pmol de <sup>14</sup>C0<sub>2</sub> totales y en mg de proteína a diferentes tiempos de incubación. 1:10 (10 mg de proteína), 1:20 (5 mg de proteína), 1:40 (2.5 mg de proteína).



La figura 20. presenta la relación existente entre la concentración de proteína en cada una de las diluciones estudiadas, con respecto a la actividad de la Ornitina descarboxilasa, expresada como la pendiente de las curvas obtenidas a cada concentración empleada, demostrando linealidad en la respuesta, que es dependiente de la concentración de enzima.

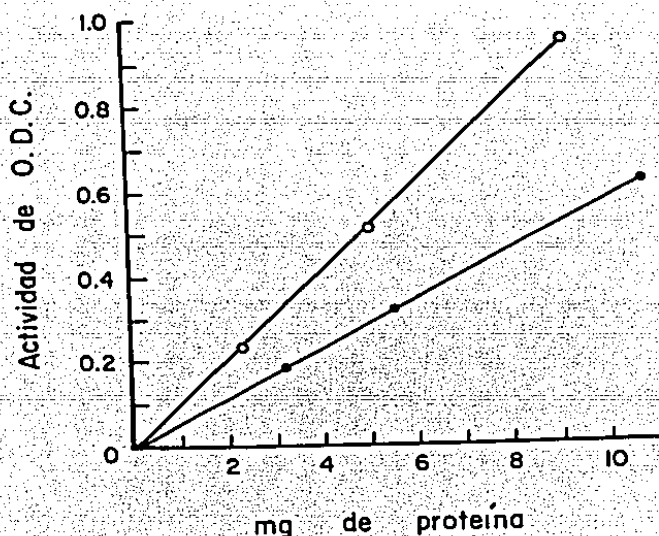


Fig. 20 Linealidad de la actividad de la enzima, expresada como actividad de O.D.C. (pendiente) con respecto a la cantidad de proteína existente en el sobrenadante de cada dilución.

- SOBRENADANTE FRESCO
- SOBRENADANTE DESCONGELADO

El análisis de la pendiente de cada ensayo, permitió determinar que la congelación-descongelación del sobrenadante no es un factor que afecte la linealidad del ensayo, aunque disminuye la actividad de la enzima en un período de conservación de una semana, cabe hacer mención que la actividad enzimática debe determinarse con diferentes períodos de congelación para conocer el efecto correspondiente. En general estos resultados experimentales demuestran que la actividad de la enzima disminuye con el período de almacenamiento, o por el efecto de la descongelación, de tal manera que es conveniente determinar su actividad en el momento del sacrificio de los animales.

#### c.2.2) Efecto del ayuno en la actividad de la ODC

La figura 21 presenta los resultados obtenidos durante el ayuno de los animales. Se observa que bajo las condiciones ensayadas, la actividad de la enzima de los sobrenadantes obtenidos de los animales, presentan una linealidad a los 60 minutos, correspondiente a 5.1, 6.5 y 6.0  $\text{pmol}^{14}\text{CO}_2$  respectivamente. Con respecto a la actividad/mg de proteína, se observa que al tiempo de incubación de 60 minutos, la actividad de la enzima correspondió a 0.9, 1.1 y 1.0  $^{14}\text{CO}_2/\text{mg}$  de proteína. En comparación a los resultados obtenidos a una dilución 1:20 en animales en condiciones normales (resultados anteriores), se observó una disminución en la actividad total y específica de la enzima de 10 veces aproximadamente. Estos resultados demuestran que la condición fisiológica de ayuno puede ser un factor que

disminuya la variabilidad biológica de este bioensayo, aunque disminuya la actividad de la enzima.

### Efecto del Ayuno

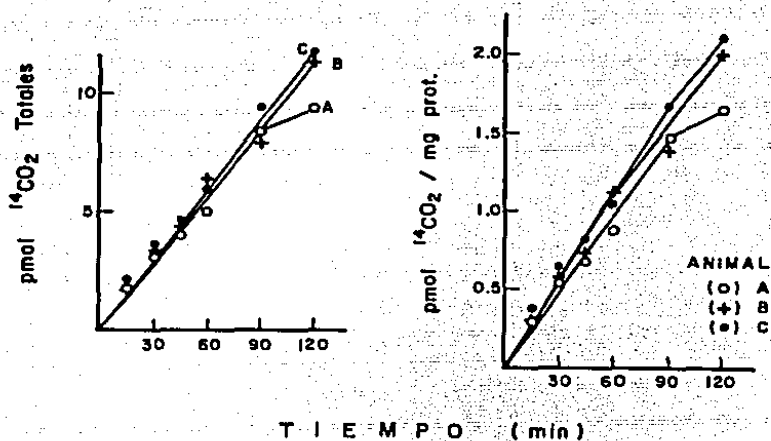


Fig. 21 Efecto del ayuno en la actividades de la ODC. La actividad total expresada en pmol de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> y la actividad específica en pmol de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/mg de proteína. Se realizó en animales de la misma edad, peso y sexo. Se estudió a una concentración de 5 mg de proteína/ml. (1:20)

### c.2.3) Efecto de la GH sobre la actividad de ODC

Estandarizada la técnica (5 mg de proteína, ausencia de ornitina fría en el medio, con un tiempo de incubación de 60 minutos pH 7.2 y a 37°C), se procedió a estudiar el efecto de la hormona de crecimiento sobre la actividad de la enzima, se implementó el bioensayo en ratas hipofisectomizadas. Los resultados se muestran en la tabla VI

TABLA VI

#### EFFECTO DE GH EN LA ACTIVIDAD DE ODC EN RATAS HIPOFISECTOMIZADAS

TRATAMIENTO	DOSIS (mg/kg)	pmol de <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> totales	pmol de <sup>14</sup> -CO <sub>2</sub> / mg prot/hora
CONTROL (n=5)	0	10.94 ± 1.90	1.73 ± 0.355 a
bGH (n=5)	1	14.97 ± 5.96	3.83 ± 0.572 b
cGH (n=3)	1	14.32 ± 0.69	1.947 ± 0.04 a
CONTROL (n=5)	0	12.57 ± 0.484	1.90 ± 0.161 a
bGH (n=5)	5	61.21 ± 3.094	10.73 ± 0.344 d
cGH (n=3)	5	58.69 ± 11.29	8.80 ± 1.957 c

Los valores representan la media ± SEM. EL análisis estadístico se realizó por ANOVA y diferencia mínima significativa (DMS). Las letras denotan la diferencia mínima significativa entre los grupos.

Los resultados mostraron una respuesta dependiente de la dosis de hormona aplicada. En el caso de bGH la dosis de 1 mg/Kg de peso presentó un aumento correspondiente al 221 % (p < 0.05), que se incrementó a un 565 % (p < 0.05) a dosis de 5 mg/Kg de peso con respecto al control. En el caso de cGH, no existió una diferencia significativa a la dosis de 1 mg/Kg, sin embargo a la dosis de 5 mg/Kg, se observó un aumento del 463 % (p < 0.05). La figura 22 muestra el efecto de la GH en éste bioensayo.

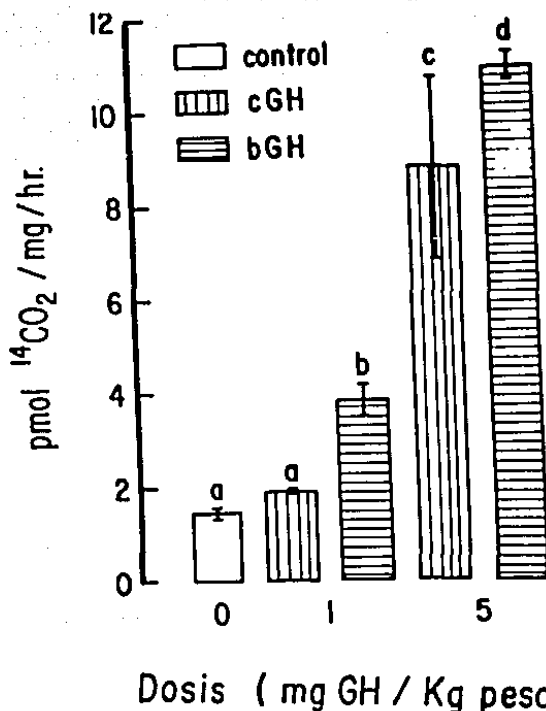


Fig. 22 Efecto de la hormona de crecimiento bovina (NIH-GH-B18) y hormona de crecimiento de pollo (cGH) en la actividad de la CDC en ratas hipofisectomizadas a dosis de 1 y 5 mg de proteína/kg de peso. La actividad expresada en pmol de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/mg de proteína. La  $\bar{X} \pm$  SEM. a-d diferencia mínima significativa entre los grupos.

### c.3) BIOENSAYO LIPOLITICO

#### c.3.1) Curva patrón

Durante la implementación del bioensayo lipolítico, fue necesario determinar la respuesta lineal de la curva patrón de glicerol. La figura 23 muestra el comportamiento de esta curva.

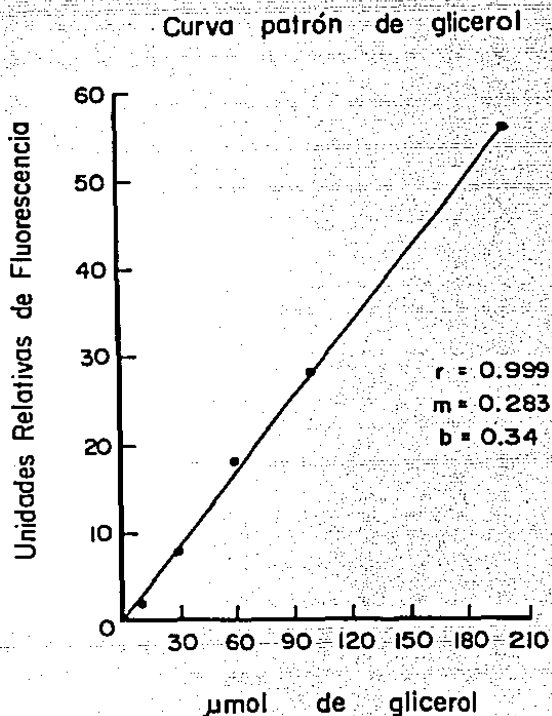


Fig. 23 Curva patrón para la determinación de glicerol. Expresada en unidades relativas de fluorescencia contra µmol de glicerol. Abreviaturas: r = Factor de correlación; m = Pendiente; b = La ordenada en el origen

c.3.2) Determinación de la actividad lipolítica de la fracción BDE-1

Una vez implementada la curva patrón, se realizó el bioensayo lipolítico, como paso inicial, fue necesario conocer el tiempo de incubación adecuado para la determinación de la actividad lipolítica para GH, por lo tanto, se procedió a realizar incubaciones durante cuatro horas sucesivas. Los resultados se muestran en la tabla VII.

TABLA VII

ACTIVIDAD LIPOLITICA DE GH EN EL TEJIDO ADIPOSEO

TRATAMIENTO (ng/ml)	LIBERACION DE GLICEROL (% CONTROL $\pm$ SEM)			
	1a	2a	3a	4a
CONTROL	100.0 $\pm$ 0.40a	100.0 $\pm$ 0.46a	100.0 $\pm$ 0.45a	100.0 $\pm$ 0.37a
bGH (10)	125.8 $\pm$ 8.92b	126.2 $\pm$ 8.24b	132.6 $\pm$ 11.8b	118.6 $\pm$ 3.89b
bGH (100)	122.4 $\pm$ 3.82b	125.6 $\pm$ 4.16b	122.7 $\pm$ 8.31b	134.6 $\pm$ 21.2b
bGH (1000)	153.2 $\pm$ 32.7b	113.5 $\pm$ 13.4a	126.6 $\pm$ 8.80b	119.2 $\pm$ 7.46b
cGH (10)	153.1 $\pm$ 25.2b	179.9 $\pm$ 30.7c	170.3 $\pm$ 22.1c	146.2 $\pm$ 23.7b
cGH (100)	132.4 $\pm$ 19.7b	125.6 $\pm$ 5.55c	200.9 $\pm$ 18.6c	165.8 $\pm$ 4.85c
cGH (1000)	130.3 $\pm$ 24.5b	184.5 $\pm$ 5.35c	175.2 $\pm$ 14.4c	160.3 $\pm$ 1.31c
Glucagon (1)	274.1 $\pm$ 15.6d	374.1 $\pm$ 4.45e	180.7 $\pm$ 4.49c	230.0 $\pm$ 9.89c

Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes para el caso de la bGH y solo dos experimentos para cGH, con tres replicados por tratamiento. El valor de glicerol liberado en el medio ( $\mu$ mol/g/h). Los valores se determinaron después de cada hora de incubación. El control presentó  $1.96 \pm 0.211$ . El análisis se realizó por ANOVA yDMS. Las letras denotan la diferencia mínima significativa entre los grupos.

Los resultados de la tabla muestran que tanto la bGH como la cGH presentan una actividad lipolítica durante el proceso de incubación, observándose una respuesta mayor para la cGH que para la bGH. Por otro lado se observa un aumento en la cantidad de glicerol en el medio durante la segunda hora de incubación, y que decrece durante los siguientes períodos. Analizando la respuesta generada por las hormonas durante las cuatro horas de incubación, la bGH muestra una respuesta dependiente de la dosis ( $p < 0.05$ ) en comparación al control, aunque no mostró una diferencia entre los grupos. En el caso de la cGH se observa una respuesta dependiente a las dosis de 10 y 100 ng/ml, existiendo una respuesta significativa ( $p < 0.01$ ) en comparación al control, tampoco existe una diferencia entre los grupos. En el caso del glucagon se observa una diferencia ( $p < 0.01$ ) con el control y entre las dosis de bGH y cGH ( $p < 0.05$ ). La figura 24 muestra la actividad de las hormonas durante el bioensayo.



## ACTIVIDAD LIPOLITICA DE GH

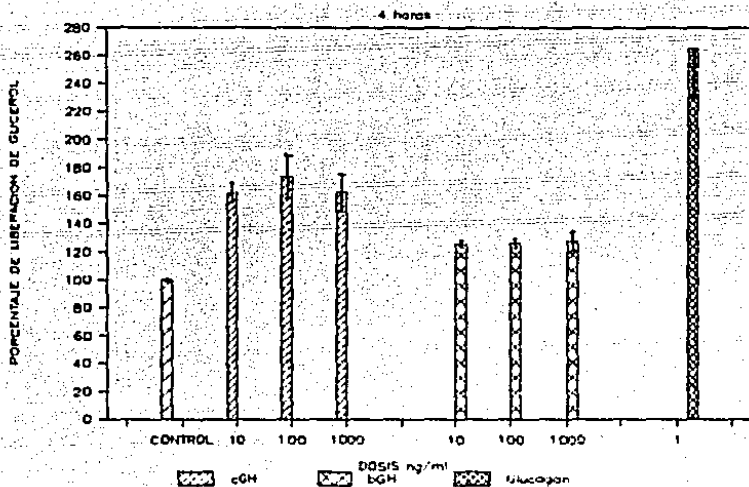


Fig. 24 Efecto lipolítico en explantes de tejido adiposo abdominal de pollo, de la bGH (NIH-GH-B19) y cGH (SCE-1) a dosis progresivamente crecientes (10, 100 y 1000 ng/ml). En el caso de glucagon solo se probó una dosis de 1 ng/ml. Los valores representan la  $\bar{x} \pm$  SEM del % de liberación de glicerol con respecto al control.

### c.3.3) Bioensayo lipolítico a la 2a hora de incubación

En función de los resultados anteriores, se decidió realizar únicamente incubaciones a la segunda hora a las dosis de 10 y 100 ng/ml tanto para bGH como cGH. Los resultados se presentan en la tabla VIII.

TABLA VIII

#### ACTIVIDAD LIPOLITICA DE GH EN EL TEJIDO ADIFOSO DE POLLO

TRATAMIENTO	LIBERACION DE GLICEROL DURANTE LA INCUBACION (% CONTROL $\pm$ SEM) 2a hora
CONTROL	100.0 $\pm$ 11.7 a
cGH (10 ng/ml)	138.4 $\pm$ 5.03 b
cGH (100 ng/ml)	215.5 $\pm$ 35.3 c
bGH (10 ng/ml)	116.8 $\pm$ 0.08 a,b
bGH (100 ng/ml)	146.4 $\pm$ 14.9 b
Glucagon ( 1ng/ml)	484.6 $\pm$ 61.3 d

Los valores representan la media + SEM de tres experimentos independientes con tres replicados por tratamiento. Los valores del glicerol liberado en el medio ( $\mu$ moles/g de tejido). El control presento  $0.786 \pm 0.11$ . El análisis estadístico se realizó por ANOVA ( $p < 0.01$ ) y la DMS. a-d la diferencia mínima significativa entre los grupos.

Los resultados mostraron una respuesta dependiente de la dosis a la segunda hora de incubación. La cGH fue significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) con respecto al control a las dosis que se probaron (10 y 100 ng/ml), mientras que la bGH fue claramente activa solamente a la dosis más alta. El glucagón por su parte, generó una respuesta a la dosis de 1 ng/ml, tal como se esperaba. La figura 25 muestra el comportamiento en el ensayo.

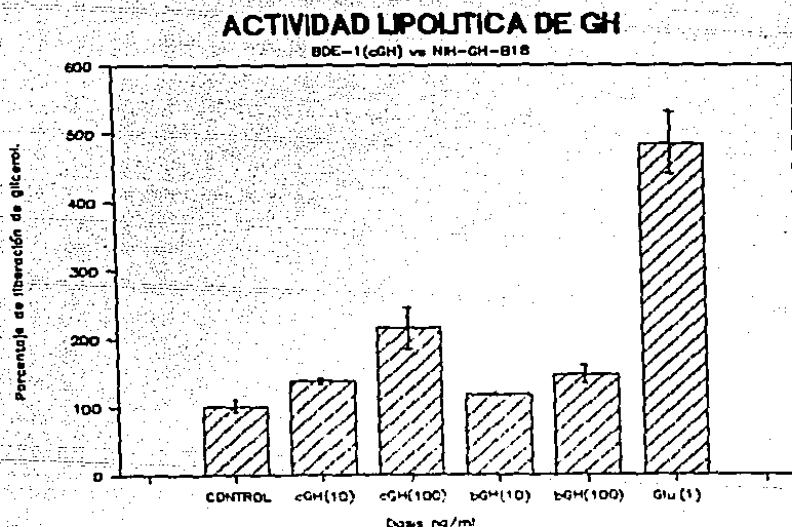


Fig. 25. Efecto lipolítico de la bGH (NIH-GH-B18) y cGH (BDE-1) a dosis de 10 y 100 ng/ml a la 2a hora de incubación, en tejido adiposo abdominal de pollo. El glucagón fue utilizado a dosis de 1 ng/ml. La actividad fue expresada en % de liberación de glicerol en comparación al control.  $\bar{X} \pm$  SEM.

### c.3.4) Actividad lipolítica de las Variantes de carga de cGH

La determinación de la actividad lipolítica para cada una de las variantes de carga obtenidas de la fracción BDE-1, se realizó a la segunda hora de incubación. Los resultados se muestran en la tabla IX.

TABLA IX

#### ACTIVIDAD DE LAS VARIANTES DE CARGA DE LA cGH EN EL BIOENSAYO LIPOLITICO

TRATAMIENTO	LIBERACION DE GLICEROL DURANTE LA 2a HORA DE INCUBACION (% CONTROL $\pm$ SEM)		
	VARIANTE 0.23	VARIANTE 0.3	VARIANTE 0.35
CONTROL	100.0 $\pm$ 3.3 a	100.0 $\pm$ 5.9 a	100.0 $\pm$ 10.9 a
cGH(10 ng)	117.6 $\pm$ 4.2 b	76.8 $\pm$ 4.9 a	131.6 $\pm$ 16.9 a
cGH(100 ng)	166.8 $\pm$ 4.0 c	76.2 $\pm$ 5.6 a	134.9 $\pm$ 12.6 a
cGH(1000 ng)	214.2 $\pm$ 7.6 d	103.5 $\pm$ 10.8 a	143.5 $\pm$ 30.2 a
cGH-BDE-1(100 ng)	156.8 $\pm$ 6.3 c	130.2 $\pm$ 4.0 b	137.5 $\pm$ 31.4 a
GLUCAGON(1 ng)	521.9 $\pm$ 24.6 e	561.2 $\pm$ 46.9 c	326.1 $\pm$ 46.5 b

Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes para las variantes 0.23 y 0.3 para 0.35 solo dos ensayos. El valor de glicerol liberado ( $\mu\text{mol/g/h}$ ). Los valores se determinaron a la 2a hora de incubación. El control fue:  $0.352 \pm 0.033$ ,  $0.308 \pm 0.059$  y  $1.715 \pm 0.109$ , para las variantes 0.23, 0.3 y 0.35 respectivamente. El análisis estadístico fue por ANOVA ( $p < 0.05$ ) y DMS. a-e diferencia mínima significativa entre los grupos.

Los resultados mostraron en el caso de la variante 0.23 una respuesta significativa ( $p < 0.05$ ) en todas las dosis estudiadas con respecto al control. por otro lado se observa una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos y dependiente de las dosis. La fracción total (BDE-1) fue lipolítica a la dosis estudiada ( $p < 0.05$ ). Como se esperaba el glucagon generó una respuesta significativa ( $p < 0.01$ ) con respecto al control. La variante 0.3, no mostró actividad lipolítica en ninguna de las dosis estudiadas, la fracción BDE-1 fue activa a 100 ng/ml ( $p < 0.05$ ) y el glucagon generó respuesta significativa ( $p < 0.01$ ) con respecto al control. Finalmente para la variante 0.35 se observa una respuesta dependiente de la dosis pero no muestra diferencia con respecto al control. La fracción BDE-1 tampoco fue significativa, sin embargo el glucagon mostró una actividad ( $p < 0.05$ ) en comparación al control.

#### **c.4) BIOENSAYO ANTILIPOLITICO**

##### **c.4.1) Determinación de la actividad antilipolítica de la fracción BDE-1**

Con el propósito de caracterizar a la CGH (BDE-1), en cuanto a su actividad antilipolítica (inhibición de la lipólisis inducida por glucagon), se implemento este bioensayo en explantes de tejido adiposo abdominal de pollo (ver Material y Metodos). Los resultados se muestran en la tabla X.

TABLA X

## BIOENSAYO ANTILIPOLITICO DE LA FRACCION BDE-1 (cGH)

TRATAMIENTO	LIBERACION DE GLICEROL DURANTE LA 1ª HORA DE INCUBACION (% CONTROL $\pm$ SEM)
CONTROL	100.0 $\pm$ 1.0 a
Glucagon (1 ng/ml)	561.7 $\pm$ 11.7 b
cGH (10 ng/ml) + Glucagon (1 ng/ml)	785.6 $\pm$ 53.0 c
cGH (100 ng/ml) + Glucagon (1 ng/ml)	535.3 $\pm$ 36.0 b
cGH (1000 ng/ml) + Glucagon (1 ng/ml)	497.3 $\pm$ 4.9 c

Los valores representan la Media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes con tres replicados por tratamiento. Los valores de glicerol en el medio ( $\mu\text{mol/g}$  de tejido/hora). El control presentó  $0.745 \pm 0.010 \mu\text{mol/g/h}$ . El análisis se realizó por ANOVA ( $p < 0.01$ ) y DMS. a-c la diferencia mínima significativa entre los grupos.

Se observa que las dosis estudiadas en este bioensayo fueron altamente significativas ( $p < 0.01$ ) con respecto al control. Tomando en comparación al glucagon (antilipólisis), se observa que 10 ng/ml de cGH en presencia de 1 ng/ml de glucagon se incrementa la respuesta a un 140 % aproximadamente ( $p < 0.05$ ), sin embargo con 100 ng/ml de la hormona y 1 ng/ml de glucagon, la respuesta es del 95 % (no significativa), que sigue disminuyendo a un 85 % a la dosis alta ( $p < 0.05$ ).

#### c.4.4.2) Determinación de la actividad antilipolítica de las variantes de carga de cGH

La actividad antilipolítica de las variantes de carga se determinó bajo el mismo diseño experimental. Los resultados se presentan en la tabla XI.

Los resultados mostraron, de manera general que la variante 0.23 no presenta una actividad antilipolítica a las dosis de 10 y 100 ng/ml en presencia de 1 ng/ml de glucagon, sin embargo a la dosis alta se observa un decremento en la respuesta del glucagon del 76.76 % y significativo ( $p < 0.05$ ), la fracción total (BDE-1) mostró actividad como se esperaba. En el caso de la variante 0.3, se observa que existe una respuesta antilipolítica a las dosis de 10, 100 y 1000 ng/ml en presencia de 1 ng/ml de glucagon, del 82, 73 y 84 % ( $p < 0.05$ ). Como se esperaba la fracción total (BDE-1) generó una respuesta del 66 %. Finalmente la variante 0.35 mostró una respuesta antilipolítica dependiente

de la dosis aunque no de manera significativa en el caso de 10 ng/ml, sin embargo las dosis de 100 y 1000 ng/ml presentaron una actividad del 81 y 75.5 % respectivamente ( $p < 0.05$ ).

TABLA XI

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTILIPOLITICA DE LAS  
VARIANTES DE CARGA DE LA cGH

TRATAMIENTO (ng/ml)	LIBERACION DE GLICEROL DURANTE LA INCUBACION (% CONTROL $\pm$ SEM)		
	VARIANTE 0.23	VARIANTE 0.3	VARIANTE 0.35
CONTROL	100.0 $\pm$ 8.3 a	100.0 $\pm$ 3.4 a	100.0 $\pm$ 5.7 a
GLUCAGON (1 ng)	428.9 $\pm$ 61.7 b	418.9 $\pm$ 22.1 b	575.6 $\pm$ 20.7 b
cGH (10 ng) + GLUCAGON (1 ng)	437.3 $\pm$ 49.2 b	345.0 $\pm$ 17.7 c	471.9 $\pm$ 44.5 c
cGH (100 ng) + GLUCAGON (1 ng)	477.0 $\pm$ 22.4 b	306.0 $\pm$ 34.5 c	466.8 $\pm$ 41.5 c
cGH (1000 ng) + GLUCAGON (1 ng)	325.5 $\pm$ 18.3 c	351.6 $\pm$ 23.8 c	446.5 $\pm$ 24.1 d
cGH-BDE-1 (100) + GLUCAGON (1 ng)	373.3 $\pm$ 16.5 d	275.1 $\pm$ 9.26 d	403.2 $\pm$ 31.6 e

Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes la variante 0.23 y dos experimentos para las variantes 0.3 y 0.35, con tres replicados por tratamiento. El valor de glicerol liberado en el medio ( $\mu\text{mol/g/h}$ ). Los valores de los controles correspondieron a:  $0.769 \pm 0.083$  para la variante 0.23; para la 0.3 fue de  $0.672 \pm 0.034$ ; y para la 0.35 correspondio a  $1.4 \pm 0.057$ . El análisis estadístico se realizó por ANOVA y DMS. a-e la diferencia mínima significativa entre los grupos.



## DISCUSION

Hasta la fecha, es muy poco lo que se conoce sobre la forma y el mecanismo de acción a través del cual las hormonas proteínicas manifiestan su compleja diversidad funcional (16,57-61,65-78).

Para tratar de entender el mecanismo molecular de acción de la hormona de crecimiento, se ha intentado abordar el problema estudiando la relación estructura-función de la hormona. Para tal propósito se han realizado, entre otras, modificaciones químicas de residuos particulares de la molécula (42-44), y más recientemente se ha tratado de estudiar la actividad de los diferentes integrantes de la familia (variantes de carga y masa) (16-41).

En el caso particular de este trabajo, se ha tratado de estudiar la relación estructura-función de la GH. Los estudios biológicos, bioquímicos y fisicoquímicos de esta hormona, se han realizado mas ampliamente en mamíferos y al respecto existe una amplia literatura (r.c.15). Sin embargo, no se puede decir lo mismo de las otras clases de vertebrados, en las cuales los estudios son mínimos o no se han realizado (r.c.15).

En este trabajo se utilizó como modelo experimental a la hormona de crecimiento de pollo (cGH) (48), y sus variantes de carga con un Rf de 0.23, 0.3 y 0.35, las cuales fueron

anteriormente caracterizadas inmunológica y bioquímicamente (50).

Para la caracterización biológica de estas proteínas (objetivo de este trabajo), fue necesaria la implementación de una serie de metodologías, que posteriormente serán discutidas.

### HIPOFISECTOMIA

Los resultados mostraron que la hipofisectomía por vía parafaríngea implementada en el laboratorio, permitió la obtención de los animales en condiciones adecuadas para ser utilizados en los bioensayos de la tibia y de la ODC. Las modificaciones realizadas en el laboratorio a la técnica establecida por el Dr. Alvarez Buylia (comunicación personal), consistieron en: traqueotomía, aplicación de penprocilina 50,000 UI e hidrocortisona 5 mg/animal, antes y después de la cirugía, las cuales permitieron obtener un porcentaje de sobrevivencia de los animales en el momento de la cirugía del 95 al 100 %, permitiendo ser utilizados alrededor del 60 % de los animales que cumplieron con los criterios de inclusión para el bioensayo (ver página 54).

En cuanto a la modificación correspondiente a la aplicación de hidrocortisona y antibiótico, Wilhelm (168) reportó la utilización de 30.000 UI de penicilina después de la cirugía, no reporta porcentaje de sobrevivencia post-operatoria de los

animales.

Por otro lado Thorgren y colaboradores (101) demuestran que la aplicación de hidrocortisona a dosis de 5 mg/Kg de peso, aumenta el porcentaje de sobrevivencia del 29 % a un 37 %.

Por lo tanto, consideramos que nuestros resultados obtenidos durante la implementación y estandarización de la hipofisectomía, mostraron un porcentaje alto en comparación a lo reportado por otros autores, siendo así confiables las modificaciones a la técnica previamente establecida.

### BIOENSAYO DE LA TIBIA

Durante la implementación de este bioensayo, la bGH provocó una respuesta dependiente al logaritmo de la dosis. En el caso de los estudios realizados con hormona de crecimiento humana (hGH), se demostró una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) con respecto al control, aunque no existió una diferencia entre las dosis. La explicación a éste respecto, puede estar dada porque probablemente las dosis utilizadas no se encontraba en el rango lineal de respuesta 160, 320 y 640  $\mu\text{g}$  de proteína total (datos no mostrados). A este respecto Greenspan (113) reporta una curva dosis respuesta de 5-120  $\mu\text{g}$  de proteína total durante el bioensayo, lo que nos permite concluir que la hGH utilizada durante la implementación del bioensayo era activa biológicamente.

y que nos encontrabamos en un rango de saturación en la respuesta.

La curva dosis/respuesta (60-240  $\mu\text{g}$  de proteína) empleada para la determinación de la potencia biológica de la cGH, evocó una respuesta dependiente de la dosis en el caso de la cGH ( $p < 0.05$ ). Para bGH, se observó una dependencia de la dosis correspondiente a 60-120  $\mu\text{g}$  de proteína, sin embargo existió una caída a la dosis alta (240  $\mu\text{g}$  proteína total) que probablemente se deba a que nos encontramos en la meseta de respuesta del sistema, por lo que es necesario realizar estudios posteriores utilizando dosis más pequeñas.

La determinación de la potencia biológica de la fracción BDE-1 en el ensayo 3+3, mostró una actividad en el ensayo de la tibia de 1.769 UI/mg de proteína con límites de confianza de 0.956-3.27 UI/mg con un índice de precisión ( $\lambda$ ) de 0.253 y un índice de paralelismo ( $g$ ) de 0.180. Hasta donde sabemos es la primera ocasión en que se prueban tres dosis de cGH en este bioensayo.

En el caso del análisis estadístico 2+2, nuestra preparación mostró una actividad de 1.32 UI/mg con límites de confianza de 0.865-2.01 UI/mg con un índice de precisión de 0.128 y un paralelismo de 0.215. A este respecto Leung y colaboradores (47) han reportado el efecto obtenido con sus preparaciones, presentando una potencia de 0.71 UI/mg de proteína con límites de confianza de 0.47-1.05 UI/mg, con una  $\lambda$  de 0.18.

POTENCIA BIOLÓGICA

A

ENSAYO  
3+3 1.76 UI/mg de proteína

Límites de confianza 0.956-3.27 UI/mg de proteína

Criterios de validez  $\lambda = 0.253$   
 $g = 0.188$

A

B

ENSAYO  
2+2 1.32 UI/de prot. 0.71 UI/mg de prot.

Límites de confianza 0.865-2.019 UI/mg 0.47-1.05 UI/mg

Criterios de validez  $\lambda = 0.128$   $\lambda = 0.18$   
 $g = 0.215$   $g = \text{no reporto.}$

A = representan los resultados obtenidos durante este estudio.  
B = Resultados tomados de Leung, et al (1984). Gen. Comp. Endocrinol. 55: 389-400.

Los resultados, en general, presentaron una buena potencia para la cGH en comparación a lo reportado en la literatura, tanto en el ensayo 3+3 como en el 2+2, en donde se ve una disminución de la potencia biológica pero se incrementa el índice de precisión y el paralelismo dado que para este análisis se tomaron las dosis de 60-120  $\mu$ g de proteína (donde se presentó mayor paralelismo).

En lo que respecta al índice de precisión del bioensayo, solo existe un reporte para cGH, Leung y col. (47) quienes reportaron una  $\lambda$  de 0.18. Por lo que nos permite afirmar que el índice de precisión del ensayo es favorable con respecto a lo reportado anteriormente y mostro estar dentro de los límites del bioensayo (105).

Finalmente la "g" que significa paralelismo entre las preparaciones, y por lo tanto identidad en el bioensayo, mostro estar dentro de los límites adecuados del bioensayo (105), por lo tanto la fracción probada en este bioensayo en comparación a la muestra patrón (NIH-GH-B18) correspondió a GH desde el punto de vista biológico, apoyando los resultados inmunológicos y bioquímicos determinados para esta proteína (50). Se observó, de manera general, que la cGH es menos activa que la bGH en este modelo experimental.

## BIOENSAYO DE LA ODC HEPATICA

Durante el bioensayo de ODC hepática, fue necesario la estandarización de la técnica con el objeto de determinar la actividad de ODC. Para tal propósito se conoció el intervalo lineal de la reacción enzimática, consistente en una incubación de 60 minutos, en ausencia de sustrato no radiactivo (lo que significa que los extractos hepáticos contienen una concentración adecuada de ornitina) y utilizando una concentración de proteína de 5 mg/ml.

Por otra parte se observó una disminución en la actividad de la ODC después de realizar la congelación-descongelación de la muestra en estudio, lo que nos permitió concluir que es importante determinar la actividad de la enzima en el momento del sacrificio de los animales.

Por otro lado se observó que el ayuno de los animales en estudio, es una condición que puede ayudar a homogeneizar la respuesta y controlar así la variabilidad biológica de este bioensayo.

En función de los resultados de la estandarización de la técnica, el bioensayo de ODC hepática mostró una actividad significativa ( $p < 0.05$ ) de la muestra patrón (NIH-GH-B18) a las dosis de 1 y 5 mg/Kg de peso correspondiente a 2 y 6 veces con

respecto al control. Sin embargo para la cGH solo la dosis de 5 mg/Kg de peso mostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de 5 veces aproximadamente. Se debe mencionar que hasta donde sabemos, esta es la primera ocasión en donde se evalúa la actividad de la cGH en el ensayo heterólogo de ODC sobre ratas hipofisectomizadas.

Russell D.H. (122), demuestra la actividad de la hormona de crecimiento bovina (NIH-GH-B-13) en ratas machos de la cepa Sprague-Dawley tanto en animales adultos como en ratas prepúberes, observando una respuesta de más de 10 veces en animales jóvenes y de 4 veces para animales adultos, a la dosis de 1 mg/Kg de peso, y también observó una respuesta dependiente al incremento de la dosis de hormona. Es de importancia mencionar que dicho autor empleo animales no hipofisectomizados, y además utilizó extractos diluidos 1:5.

#### BIOENSAYO LIPOLITICO

El presente estudio demostró que la GH ~~par~~ estimula la lipólisis *in vitro*. Esta respuesta fue observada tanto para bGH como para cGH a concentraciones de 10, 100 y 1000 ng/ml durante las cuatro horas de incubación, aunque para bGH no se observó una respuesta significativa entre las dosis, posiblemente sea necesario probar dosis más pequeñas para obtener un rango lineal de respuesta.



En el caso de cGH se observó una respuesta dependiente de la dosis de 10-100 ng de proteína/ml que cae a la dosis de 1000 ng/ml. Es importante mencionar que no se realizaron experimentos con dosis menores para conocer la sensibilidad de nuestro ensayo.

La disminución en la dosis necesaria para inducir una respuesta significativa, en comparación con las utilizadas por Campbell y Scanes (104, 138-140) puede deberse a que en nuestro caso contamos con una preparación más pura, y por lo tanto su actividad específica es superior; o también a una diferencia en la sensibilidad dependiente de la raza, puesto que dichos autores emplearon animales White-leghorn mientras que nosotros utilizamos ejemplares de la raza Pilch. En otros estudios se ha reportado la actividad tanto para bGH recombinante, bGH de origen hipofisario, cGH nativa y recombinante a dosis de 1 µg/ml, observándose una respuesta significativa con respecto al control (104).

En los ensayos donde se probó solo la segunda hora de incubación se observó una dependencia de la dosis para ambas hormonas, lo que permite afirmar que la segunda hora de incubación es adecuada para la determinación de la actividad lipolítica de la GH.

## BIOENSAYO ANTILIPOLITICO

En cuanto a la capacidad de inhibición de la cGH (BDE-1) a la lipólisis inducida por glucagon (antilipólisis), se observa que a la dosis de 10 ng + 1ng de glucagon la fracción BDE-1 aumenta la respuesta lipolítica inducida por glucagon, sin embargo, las dosis de 100 y 1000 ng/ml en presencia de glucagon, muestran el efecto antilipolítico como se había reportado anteriormente (104,139).

## BIOACTIVIDAD DE LAS VARIANTES

### Actividad Lipolítica

En cuanto a la bioactividad obtenida para las variantes de carga en el bioensayo lipolítico, se muestra que la 0.23 es lipolítica y que tiene una actividad dependiente de la dosis; además la 0.3 no mostró actividad en este bioensayo y la 0.35 no fue activa a las dosis estudiadas. Es de importancia mencionar que no se han reportado ninguna actividad biológica en estas variantes.

## Actividad antilipolítica

En el caso de la variante 0.23 se observa que no presenta una respuesta significativa en el sistema a las dosis de 10 y 100 ng/ml, aunque a la dosis de 1000 ng/ml lo fue ( $p < 0.05$ ). Por otro lado la variante 0.3 es antilipolítica en las dosis utilizadas y dependiente de la dosis; sin embargo la variante 0.35 solo mostró actividad a las dosis de 100 y 1000 ng/ml ( $P < 0.05$ ).

Estos resultados nos permiten concluir que cada una de las variantes de carga de cGH purificadas en nuestro laboratorio, presentan una actividad diferente. Es importante observar que los resultados obtenidos de estas variantes apoyan la hipótesis relacionada con la heterogeneidad molecular de la proteína (16,19,24). Es importante también mencionar que este es el primer reporte de la actividad lipolítica y antilipolítica de las variantes de carga (0.23, 0.3 y 0.35) para hormona de crecimiento de pollo.

Finalmente la preparación de cGH (BDE-1) utilizada en los ensayos heterólogos mostró una buena actividad, pero inferior a la obtenida con bGH. Sin embargo, el análisis en un bioensayo homólogo la cGH mostró mayor actividad que la bGH. Esto reafirma la idea de la especificidad de especie de la GH.

Por lo tanto podemos decir que la fracción BDE-1 (cGH) obtenida en el laboratorio mediante la técnica establecida, proporciona

una hormona de crecimiento bioactiva desde diferentes puntos de vista, es decir, es somatotropica, incrementa la anchura del cartilago epifisial en ratas hipofisectomizadas, activa la vía metabolica de las poliaminas (bioensayo de la ODC hepatica), además es lipolítica y antilipolítica en los bioensayos homólogos.

Por otra parte la obtención de las variantes por la técnica de electroelución, proporcionó la cantidad suficiente de proteína para su caracterización en el bioensayo lipolítico y antilipolítico.

Se cuenta con cuatro bioensayos que miden diferentes bioactividades de la hormona de crecimiento, los cuales serán muy útiles para proseguir con los estudios de relación estructura-función de la CGH.

Como punto final es importante mencionar que es necesario realizar purificaciones exhaustivas de las variantes de carga de la CGH para caracterizarlas en los bioensayos heterólogos y demostrar que estos resultados preliminares apoyan la hipótesis de que cada variante de hormona de crecimiento presenta una actividad específica en su órgano blanco.

## CONCLUSIONES

- 1.- La técnica de la hipofisectomía, en nuestras manos permite obtener alrededor del 60 % de los animales para los bioensayos.
- 2.- Se demostró que la fracción BDE-1 (cGH) obtenida mediante la técnica establecida en el laboratorio, es activa en el ensayo de la tibia.
- 3.- La cGH mostró una actividad de 5 veces aproximadamente en el bioensayo de la ODC hepática, en comparación a la bGH esta presentó actividad de 2 y 5 veces a las dosis estudiadas. Hasta donde sabemos es el primer reporte que analiza la actividad de la cGH en este bioensayo.
- 4.- Tanto cGH como bGH exhiben actividad lipolítica dependiente de la dosis, siendo más activa la primera que el estándar de referencia.
- 5.- Solo la variante 0.23 mostró actividad lipolítica dependiente de la dosis.
- 6.- La fracción BDE-1 (cGH) fue antilipolítica a las dosis estudiadas.
- 7.- Solo la variante 0.3 fue antilipolítica a las dosis estudiadas.

En conjunto los resultados de la presente tesis muestran que se cuenta con las herramientas necesarias para proseguir con los estudios de relación estructura-función para cGH, y apoyan que la diversidad funcional de la GH probablemente es consecuencia de su heterogeneidad molecular de la hormona. Igualmente, los datos muestran la especificidad de especie característica a las hormonas proteínicas.

## REFERENCIAS

1. Goldstein, L. (1982) *Fisiología Comparada*. Ed. Interamericana México. p.p. 347-410. 1a Ed.
2. Robertis, E.D.P., De Robertis, E.M.F. (1981) *Biología celular y molecular*. Ed. Ateneo México p.p. 565, 577, 578. 2a Ed.
3. Sherwood R.A. (1973) *Anatomía Comparada (Vertebrados)*. Ed. Interamericana México. p.p. 381-393. 2a Ed.
4. Junqueira, L.C., Carneiro, J. (1981) *Histología Básica*. Salvat Editores S.A. México p.p. 394-397. 2a Ed.
5. Beck, S.W. (1983) *Fisiología Molecular, Celular y Sistemática*. Publicaciones culturales. México. Capítulo 15: 629-676. 2a Ed.
6. Vaquero C.J. (1982) *Fundamentos de Histología*. Ed. Interamericana. México p.p. 317-325. 1a Ed.
7. Scanes, C.G. (1986) Pituitary Gland. In *Avian Physiology* (Sturkie P.D. ed.) Springer-Verlag. New York. p.p. 384, 392-394
8. King, D.B., and King, C.R. (1973) Thyroidal influence on early muscle growth of chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21:517-529.
9. Haselbacher, G.K., Andres, R.Y., and Humbel, R.E. (1980) Evidence for the synthesis of a somatomedin similar for insulin-like growth factor I by chick embryo liver cells. *Eur. J. Biochem.* 111: 245-250.
10. De pablo, F., Ross, J., Hernández, E., and Pruss, R. (1982) Insuline in present in chicken eggs and early chick embryos. *Endocrinology* 111: 1909-1916.
11. Harvey, S., and Scanes, C.G. (1979) Plasma growth hormone concentrations in growth retarded, cortisone treated chicks. *Br. Poultry Sci.* 20: 331-335.
12. Ebendal, T., Hedlund, K.G., and Norrgren, G. (1982) Nerve growth factor in chick tissues. *J. Neurosci. Res.* 8: 153-164.

13. Balk, S.D., Shiu, R.P.C., La Fleur, M.M., and Young, L.L. (1982) Epidermal growth factor and insuline cause normal chicken heart mesenchymal cells to proliferate like their Rous sarcoma virus-infected counterparts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 1154-1157.
14. Scanes, C.G., and Harvey, S. (1984). Hormones and growth in poultry *Sci.* 63: 2062-2074.
15. Whilhelmi, A.E. (1974) Chemistry of growth hormone. In *Handbook of Physiology*, Ed. E. Knobil, W.H., Sawyer, 2: 59-79. Washington D.C. and *physiol. Soc.* Vol. 4.
16. Chawla, R.K., Park, J.S., and Rudman M.D. (1983) Structural variants of human growth hormone: Biochemical, genetic, and clinical aspects. *Ann. Rev. Med.* 34: 519-547.
17. Ferguson, K.A., Wallace, A.L.C. (1961) Prolactin activity of human growth hormone. *Nature* 190: 632-633.
18. Cheever, E.V., Lewis U.J. (1969) Estimation of the molecular weights of the multiple components of growth hormone and prolactin. *Endocrinology* 85: 465-473.
19. Chrambach, A., Yadley, R.A., Ben-David, M., and Rodbard, D. (1973) Isohormones of human growth hormone. *Endocrinology* 93: 848-857.
20. Hummel, B.C., Brown, G.M., Hwang P., Friesen, H.G. (1975) Human and monkey prolactin and growth hormone: Separation of polymorphic forms by isoelectric focusing. *Endocrinology* 97: 855-867.
21. Toober, J. L. Mainguy, P. (1963) Heterogeneity of human growth hormone. Its influence on a radioimmunoassay of the hormone in serum. *Lancet* 1: 1403-1405.
22. Irie, M., Barrett, R.J. (1962) Immunologic studies of human growth hormone. *Endocrinology* 71: 277-287.
23. Hunter, W.M. (1965) Homogeneity studies of human growth hormone. *Biochem. J.* 27: 199-208.
24. Lewis, U.J., Dunn, J.T., Ebnwald, L.F., Seacay, B.K. and Vanderlaan, W.F. (1978) A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 253: 2679-2687.
25. Barret, R.J., Friesen, H., Astwood, E. B. (1962) Characterization of pituitary and peptide hormone by electrophoresis in starch gel. *J. Biol. Chem.* 237: 432-439.

26. Yadley, R.A., Chrambach, A. (1973) Isohormones of human growth hormone II. Plasmin-catalyzed transformation and increase in prolactin biological activity. *Endocrinology* 93:858-865.
27. Yadley, R.A., Chrambach, A. (1973) Isohormones of human growth hormone III. Isolation by preparative polyacrylamide gel electrophoresis and characterization. *Endocrinology* 93:866-873.
28. Singh, R.N., Seavey, B.K., Rice, V.P., Lindsey, T.T., Lewis, U.J. (1974) Modified forms of human growth with increased biological activities. *Endocrinology* 94:883-891.
29. Lewis, U.J., Singh, R.N., Peterson, S.M., Vanderlaan, W.P. (1976) Human growth hormone: a family of proteins. In *growth hormone and related peptides*, ed. A. Pecile, E.E. Muller p.p. 67-74. New York.
30. Lewis, U.J., Singh, R.N., Tutwiler, G.F., Singel, M.B., Vanderlaan, E.F., Vanderlaan, W.P. (1980) Human growth hormone: A complex of proteins. *Recent Prog. Horm. Res.* 36:477-508.
31. Lewis, U.J., Singh, R.N., Bonewald, L.F., Seavey, B.K. (1981) Altered proteolytic cleavage of human growth hormone as a result of deamidation. *J. Biol. Chem.* 256:11645-11650.
32. Frohman, L.A., Buker, L., Stachura, M.E. (1972) Characterization of growth hormone different molecular weights in rat, dogs, and human pituitaries. *Endocrinology* 91:262-269.
33. Lewis, U.J., Peterson, S.M., Bonewald, L.F., Seavey, B.K., Vanderlaan, W.P. (1977) An interchain disulfide dimer of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 252:3697-3702.
34. Lingappa, V.R., Blobel, G. (1980) Early events in the biosynthesis of secretory and membrane proteins: The signal hypothesis. *Recent. Prog. Horm. Res.* 36:451-475.
35. Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide. *J. Biol. Chem.* 244:4406-4412
36. Lewis, U.J., Bonewald, L.F., Lewis, L.J. (1980) The 20,000-dalton variant of human growth hormone: Location of the amino acid deletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:511-518.



37. Goodman, A.D., Tanenbaum, R., Rabinowitz, D. (1972) Existence of two forms of immunoreactive growth hormone in human plasma. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 35:868-878.
38. Wright, D.R., Goodman, A.D., Trimble, K.D. (1974) Studies on "big" growth hormone from human plasma and pituitary. *J.Clin.Invest.* 54:1064-1073.
39. Soman, V., Goodman, A.D. (1977) Studies of the composition and radioreceptor activity of "big" and "little" human growth hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metabol.* 44:569-581.
40. Ellis, S., Vodian, M.A., Grindeland, R.D. (1978) Studies on bioassayable growth hormone-like activity of plasma. *Recent.Prog.Horm.Res.* 34:213-238.
41. Ellis, S., Grindeland, R.E., Reilly, T.J., Yang, S.H. (1976) Studies on the nature of plasma growth hormone. In *Growth Hormone and Related Peptides*, ed. A. Pecile, E.E. Muller, pp.75-83. New York: Elsevier.
42. Yamasaki, N., Nikutami, M., and Schonberg, M. (1970) Peptides of a biologically active tryptic digest of bovine growth hormone. *Biochemistry* 9:1107.
43. Paladini, A.C., Pena, C. and Retegni, L.A. (1979) The intriguing nature of multiple action of multiple action of growth hormone. *TIBS* 4:256.
44. Li, C.H. (1982) Human growth hormone 1974-1981. *Mol.Cell.Biochem.* 46:31.
45. Farmer, S.W., Fapkov, H., and Hayashida, T. (1974) Purification and properties of avian growth hormone. *Endocrinology* 95:1560-1565.
46. Harvey, S., and Scanes, C.G. (1977) Purification and radioimmunoassay of chicken growth hormone. *J.Endocrinol.* 73:321-329
47. Leung, F.C., Taylor, J.E., Steelman, S.L., Bennett, C.D., Rodkey, J.A., Long, R.A., Serio, R., Wappelman, R.M., and Olson, G. (1984). Purification and properties of chicken growth hormone and the development of homologous radioimmunoassay. *Gen.Comp.Endocrinol.* 56:369-400.

48. Arámburo, C., Carranza, M., Perera, G., Fenton, B., Sánchez, R. (1987) La hormona de crecimiento de pollo (cGH). Purificación y caracterización bioquímica, biológica e inmunológica. III Congreso de la Asociación Mexicana de Especialista en Nutrición Animal. 15-17 Oct. Cocoyoc Morelos.
49. Scanes, C.G., Campbell, R., Harvey, S., King, D., Malamed, S. and Perez, F. (1986) Growth hormone in birds: A comparative perspective. *Frog. Clin.Biol.Resech.* 205:115-136.
50. Arámburo C., Carranza M., Sánchez R., Perera G., and Fenton B. (1988) Purification and partial characterization of chicken growth hormone (cGH) charge variants. Evidence that cGH is phosphorylated. 70 Ann.Meet.Endocrine Soc. Abst.241, New orleans, La. June 8-11.
51. S.Navarrate, J.L. Montiel, R.Sánchez, C. Arámburo (1988) Identificación de Hormona de Crecimiento de pollo (cGH) glucosilada. Res.J-065 XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. 6 al 11 de Nov. Oaxaca Oax.
52. Liberti, J.P., Antoni, B.A., Chlebowski, J.F. (1985) Naturally-occurring pituitary growth hormone is phosphorylated. *Biochem.Biophys Res.Commun.* 137 (2):713-720
53. Liberti, J.P., and Josht, G.S. (1986) Synthesis and secretion of phosphorylated growth hormone by rat pituitary glands. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 137(2):806-812.
54. Arámburo, C., Carranza, M., Perera, G., Sánchez, R. (1987) Purificación y caracterización parcial de variantes de carga de la hormona de crecimiento de pollo (cGH). *Soc.Mex.Nut.Endocrinol.* 25-28 de Nov., Merida Yucatan.
55. J.L.Montiel, S. Navarrate, R. Sánchez, C. Arámburo (1988) Isoformas moleculares de la Hormona de Crecimiento de pollo (cGH). Res. J-068 XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. 6 al 11 de Nov. Oaxaca, Oax.
56. Houston B. and Goddard, C. (1983) Molecular forms of growth hormone in the chicken pituitary gland. *J.Endocrinol.* 116 (1):35-41
57. Aitzuler, N. (1974) Action of growth hormone on carbohydrate metabolism. In *Handbook of Physiology*, Ed. Knobil, W.H. Sawyer 2: 233-252. Washington D.C. Am.Physiol.Soc. Vol. 4

58. Goodman, H.M. and Shwartz J. (1974) Growth hormone and lipid metabolism. In Handbook of Physiology, Ed. Knobil, W.H. Sawyer 2:211-231. Washington D.C. Am. Physiol. Soc. Vol. 4
59. Kostyo, J.L. and Nutting, D.F. (1974) Growth hormone and protein metabolism. In Handbook of Physiology, Ed. Knobil, W.H. Sawyer 2:187-210. Washington D.C. Am. Physiol. Soc. Vol. 4
60. Tabor W.C., Tabor H. (1984) Polyamines. Ann. Rev. Biochem. 53:749-790
61. Davidson, M.B. (1987) Effect of Growth Hormone on Carbohydrate and Lipid Metabolism. Endocrine Rev. 8:2 115-131.
62. Scanes, C.G., and Harvey, S. (1982) Hormones, nutrition and metabolism in birds. In: Aspects of avian endocrinology: Practical and theoretical implications (C.G. Scanes, Ottinger, M.A., Kenny, A.D., Balthazart J. Eds.) Texas Tech. Press. Luckbock pp. 173-184.
63. Burke, W.H. and Marks, H.L. (1982) Growth hormone and prolactin levels in non-selected and selected broiler lines of chickens from hatch to eight weeks of age. Growth. 46:283-295.
64. Rudas, P., and Scanes, C.G. (1983) Influence of growth hormone on glucose uptake by avian adipose tissue. Poultry Sci. 62:1838-1845.
65. Foltzer, C., Leclercq-Meyer, V., and Mialhe, P. (1975) Pituitary and adrenal control of pancreatic endocrine function in the duck I. Plasma glucose and pancreatic glucagon variation following hypophysectomy and corticosterone. Diabetes Metab. 1:39-44.
66. Foltzer, C., and Mialhe, P. (1976) Pituitary and adrenal control of pancreatic endocrine function in the duck II. Plasma free fatty acid and insulin variation following hypophysectomy and replacement therapy with growth hormone and corticosterone. Diabetes Metab. 1:101-105.
67. Daughaday, W.H. (1961) Growth hormone and the somatomedins. In Endocrine control of Growth Ed. W.H. Daughaday p.p. 1-24. New York: Elsevier
68. Kostyo, J.L., Isaksson, J. (1977) Growth hormone and regulation of somatic growth. In Int. Rev. Physiol. Reproductive physiology II. 13:255-274

69. Salmon, Jr., W.D. and Daughaday, W.H. (1957) A hormonally control-led serum factor which stimulated sulfate incorporation by cartilage *in vivo*. *J. Clin. Endocr. Metab.* 49:825-836.
70. Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S., Salmon, Jr., W.D., Van den Brande, J.L. and Van Wyck, J.J. (1972) Somatomedins a proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235:107.
71. William, J.F.G. and Hughes, S. (1974) Somatomedin activity from rats livers perfused with human growth hormone. *J. Endocrinol.* 63:585-586.
72. Daughaday, W.H., Philips, L.J. and Meullier, M.C. (1975) The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver. *Endocrinology* 98:1214-1219.
73. Herington, A.C., Cornell, H.J., and Kuffer, A.D. (1983) Recent advances in the biochemistry and physiology of the insulin-like growth factor/somatomedin family. *Int. J. Biochem.* 15:1201-10
74. Salmon, Jr., W.D. and Duvall, M.R. (1970) A serum factor with sulfatation factor activity stimulates *in vitro* incorporation of leucine and sulfate into protein polysaccharide complexes, uridine into RNA, and thymidine into DNA of costal cartilages from hypophysectomized rats *in vitro*. *Endocrinology* 86: 721-727.
75. Green, H., Morikawa, M., Nixon, T. (1985) A dual effector theory of growth hormone action. *Differentiation.* 29:195.
76. Morikawa, M., Green, H., and Lewis, U.J. (1984) Activity of human growth hormone and related polypeptides on adipose conversion of 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 4:228-231.
77. Isaksson, O.G., Eden, S., and Jansson, O. (1985) Mode action of pituitary growth hormone on target cells. *Ann. Rev. Physiol.* 47:483-499
78. Nilsson, A., Isgaard, J., Lindahl, A., Dahlstrom, A., Skottner, A., and Isaksson, O.G. (1986) Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-1 in rat growth plate. *Science* 233:571-574.
79. Stachamura, M.E. (1983) Verapamil influence upon basal and stimulated rat growth hormone and prolactin release *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 173:109-117.

80. Hall, T.R., Harvey, S., Scanes, C.G. (1986) Control of growth hormone secretion in the vertebrates: A comparative survey. *Comp. Biochem. Physiol.* 64-A, 2:231-253
81. Sonntag, W.E., Forman, L.J., Miki, N., and Meites, J. (1982) Growth hormone secretion and neuroendocrine regulation. In *Handbook of Endocrinology* (Ed. Gauss G.H. and Kaplan H.M.) pp.35-59. CRC Press, Boca Raton.
82. Caroff, S., Wlochur, A., Snyder, F.J. and Amsterdam J. (1984) Diurnal variation of growth hormone secretion following thyrotropin-releasing hormone infusion in normal men. *Psychosom. Med.* 46:59-66
83. Harvey, S. (1983) Neuroendocrine control of growth hormone secretion in birds. In *progress in Nonmammalian brain research*, vol 3 (Ed. Nitisco G. and Bolis L.) p.p. 203-237. CRC Press, Boca Raton.
84. Proudman J.A. (1984) Growth hormone and prolactin response to thyrotropin releasing hormone and growth hormone releasing factor in the immature turkey. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175:79-83.
85. Aizawa, T., and Hinkle, P.M. (1985) Thyrotropin-releasing hormone rapidly stimulates a biphasic secretion of prolactin and growth hormone in GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> rat pituitary tumor cells. *Endocrinology.* 116:73-82
86. Hall, T.R. and Chadwick A. (1983) The effect of thyrotropin releasing hormone on secretion of prolactin and growth hormone from eel pituitaries incubated in vitro. *IRCS. Med. Sci.* 11:1009-1010
87. Hall, T.R. and Chadwick A. (1984) Effects of synthetic mammalian thyrotrophin releasing hormone, somatostatin and dopamine on the secretion of prolactin and growth hormone from amphibian and reptilian pituitary glands incubated in vitro. *J. Endocrinol.* 100:175-189.
88. Sall, J.N. (1981) Hypotalamic control of the pars distalis in fishes, amphibians and reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44:135-170.
89. Fries, J.L., Murphy, W.A., Gueriae-Diaz, J. and Coy, D.H. (1982) Somatostatin antagonist analog increases GH, insulin and glucagon release in the rat. *Peptides* 3:811-814.

90. Cowan J.S., Gaul P., Moor, B.C. and Kraicer J. (1984) Secretory bursts of growth hormone secretion in the dog may be initiated by somatostatin withdrawal. *Gen.J.Physiol.Pharmac.* 62: 199-207
91. Katakami H., Kato, Y., Matsushita N., Shimatsu A., Wasada N. and Immura H. (1984) Interrelation between somatostatin output from the mediobasal hypothalamus and plasma growth hormone levels in conscious rats: effects of glucagon administration. *Endocrinology.* 115:1598-1604.
92. Spada, A. Vallar L. and Giannattasio G. (1984) Presence of adenylate cyclase dually regulated by somatostatin and human pancreatic growth hormone (GH)-releasing factor in GH-secreting cells. *Endocrinology.* 115:1203-1209.
93. Strosser, M.T., Harvey, S. Foltzer C., Mialhe P. (1984) Comparative effects of somatostatin-28 and somatostatin-14 on basal growth hormone release and pancreatic function in immature ducks (*Anas platyrhynchos*). *Gen.Comp. Endocrinol.* 56:268-270.
94. Sonntag W.E., Forman L.J., Miki N., and Meites J. (1982) Growth hormone secretion and neuroendocrine regulation. In *Handbook of Endocrinology.* (Edited by Goss G.H. and Kaplan H.M.), pp 35-59. CRC Press Boca Raton.
95. Animura A., Culler, M.D., Matsumoto, K., Kandamitch, Z., Murphy, W., Shively J.E. and Falikovits M. (1984). Growth hormone releasing factors in the brain and the gut: Chemistry, actions and localizations. *Peptides* 5, suppl. 41-44.
96. Abe H., Chigara K., Minamitani N., Iwasaki J., Chiba T., Matsukura S., and Fujita I. (1981) Stimulation by bombesin of immunoreactive somatostatin release into rat hypophysial portal blood. *Endocrinology.* 109:229-234.
97. Hall J.F. (1982) Neurotransmitter effects on release of prolactin and growth hormone *in vitro* from pituitary glands of the pigeon *Columba livia*. *J.Endocrinol.* 92:303-308.
98. Hall J.F., Harvey, S., Chadwick, A. (1984) Serotonin and acetylcholine affect the release of prolactin and growth hormone from pituitary glands of domestic fowl *in vitro* in the presence of hypothalamic tissue. *Acta Endocr.* 195:455-462

99. Capdevila J., Chacos N., Falck J.R., Negro-vilar A., and Djeda S.R. (1983) Novel hypothalamic arachidonate products stimulate somatostatin release from the median eminence. *Endocrinology*, 113:421-423.
100. Bruni J., and Meites J. (1978) Effects of cholinergic drugs on growth hormone release. *Life Sci.* 23:1351-1358.
101. Thorngren K.G., and Hansson L.I. (1974). Bioassay of Growth Hormone. I Determination of longitudinal bone with tetracycline in hypophysectomized rats. *Acta Endocrin.* 75:653-668.
102. Saxena R.K. and Talwar, G.R. (1974) A new *in vitro* method for assay of the biological activity of growth hormone. *Acta Endocrin.* 76:248-259
103. Harvey S. Scanes C.G., and Howe T. (1977) Growth hormone effects on *in vitro* metabolism of avian adipose and liver tissue. *Gen.Comp.Endocrinol.* 33:322-328.
104. Campbell R.M., Scanes G.C. (1985) Lypolytic activity of purified and bacterially derived growth hormone on chicken adipose tissue *in vitro*. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 180:513-517.
105. Loraine J.A., and Bell E.T. (1971) Hormone Assays and their clinical application. E&S. Livingston Edinburg and London. 3a edition. Chapter 1. General principles in hormone assay pp. 1-19.
106. Alatorre, F.S. (1976) Programa Manual para Bioensayos. Unidad de Investigación Biomédica, CMN-IMSS.
107. Bliss, C.I., and Cattell, McK. (1943) Biological assay. *Ann.Rev. Physiol.* 5:479-536.
108. Russell, J.A. Methods of detection and assay of growth hormone. In: The hypophyseal growth hormone, nature and action. Ed. Smith R.W., Gaebler O.H. and Long C.N.. New York: McGraw-Hill 1955, pp. 17-27
109. Marx, W.E., Simpson, M.E., and Evans, H.M. (1942) Bioassay of growth hormone of the anterior pituitary. *Endocrinology*, 30: 1-10
110. Cheek, D.B. (1974) Effect of growth hormone on cell and somatic. In *Handbook of Physiology*, Ed. Knobil, W.H. Sawyer. 2:159-186. Washington D.C. Am.Physiol.Soc. Vol.4

111. Ray, I., A.D., Evans, H.M., Beck, H. (1941) Effect of the pituitary growth hormone on the epiphyseal disk of the tibia of the rat. *Am. J. Pathol.* 17:509-528.
112. Kibrick, E. A., Beck, H., Marx, W. and Evans, H.M. (1941) The effect of different dose levels of growth hormone on the tibia of young hypophysectomized female rats. *Growth* 5:437-447.
113. Greenberger, F.S., Li, C.H., Simpson, M.E., and Evans H.M. (1949) Bioassay of hypophyseal growth hormone: The tibia test. *Endocrinology* 45:455-463.
114. Geschwind, I.I. and Li, C.H. (1955) The tibia for growth hormone. In: The hypophyseal growth hormone. Nature and Actions. Ed. S. S. Smith, R. W., Gaebler, O.H., and Long, C.N.H. New York: McGraw-Hill P.p. 28-53.
115. Tabor, C.W. and Tabor H. (1976) 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Ann. Rev. Biochem.* 45:285-306
116. Dylstra, W. G. Jr., Herbst, E. J. (1965) Spermidine in regenerating liver: relation to rapid synthesis of ribonucleic acid. *Science* 149:428-429.
117. Jenne, J. and Raina, A. (1968) Stimulation of spermidine synthesis in the regenerating rat liver: Relation to increased ornithine decarboxylase activity. *Acta Chem. Scand.* 22:1349-1351.
118. Brandt, J. T., Pierce D.A. and Fausto, N. (1972) Ornithine decarboxylase activity and polyamine synthesis during kidney hypertrophy. *Biochem. Biophys. Acta.* 273:184-193.
119. Russell, D. and Synder S.H. (1968) Amine synthesis in rapidly growing tissues: Ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo and various tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 60:1420-1472.
120. Panko, W.B. and Kenney F.T. (1971). Hormonal stimulation of hepatic ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:348-350
121. Garza, D.J., Short, J. and Lieberman, I. (1973) On the possibility that the prereplicative increases in ornithine decarboxylase activity are related to DNA synthesis in liver. *FEBS Lett* 32:251-253
122. Russell, D. H. (1970) Growth hormone induction of Ornithine decarboxylase in rat liver. *Endocrinology.* 86:1414-1419.



123. Rickman R.A., Underwood L.E., Van Wyk J.J., and Voina S.J. (1971). Synergistic effects of cortisol and growth hormone of hepatic ornithine decarboxylase. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 138:880-884.
124. Janne J., Raina A., and Siimes M. (1968) Mechanism of stimulation of polyamine synthesis by growth hormone in rat liver. *Biochem.Biophys.Acta.* 165:419-426.
125. Mc Cann, P.P. (1980) Polyamines in Biomedical Research. (Gauges J.M.) ed. Wiley, New York, p.p.109-123
126. Kay, J.E., Pegg, a.E. (1973) Effect of inhibition of spermidine formation on protein and nucleic acid synthesis during lymphocyte activation. *FEBS Lett* 29:301-304
127. Hogan, B., Shields R., and Curtis, D. (1974) Effect of cyclic nucleotides on the induction of ornithine decarboxylase in BHK cells by serum and insulin. *Cell.* 2:229-233.
128. Clark, J.L. (1980) Specific induction of ornithine decarboxylase in the 3T3 mouse fibroblast by pituitary growth factors: cell density-dependent biphasic response and alteration of half-life. *Biochemistry.* 19:4668-4674
129. Kay, J.E., Lindsay,U.J. (1973) Control of ornithine decarboxylase activity in stimulated human lymphocytes by putrescine and spermidine. *Biochem.J.* 132:791-796
130. Klingensmith,M.F., Freifeld,A.G., Pegg,A.E., and Jefferson L.S. (1980) Effects of growth hormone and glucagon on ornithine decarboxylase activity and adenosine 3'5' monophosphate levels in isolated rat hepatic. *Endocrinology* 106: 125-133
131. Raina, A. and Janne J. (1975) Physiology of the natural polyamines putrescine, spermidine and spermine. *Med.Biol.* 53:121-147
132. Russell,D.H. Snyder S.H. (1969) Amine synthesis in regeneration rat liver: Effects of hypophysectomy and growth hormone on ornithine decarboxylase. *Endocrinology* 84: 223-228.
133. Janne, J., Raina, A. (1974) On the stimulation of ornithine decarboxylase and RNA polymerase activity in rat liver after treatment with growth hormone. *Biochem.Biophys.Acta* 281: 769-772.

134. Rudas, F., and Scanes, C.G. (1980). Influences of growth hormone on glucose uptake by avian adipose tissue. Poultry Sci. 61:1838-1845.
135. Langslow D.R., and Hales C.N. (1969) Lipolysis in chicken adipose tissue *in vitro*. J.Endocrinol. 43:285-294.
136. Fain J.N., Kovacev V.F., and Scow R.O. (1965). Effects of growth hormone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. J.Biol.Chem. 240:3522-3529.
137. Perera G., Carranza S., Arámburo C. (1988). Análisis de bioactividad de la hormona de crecimiento de aves (cGH). Res C-89. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, 14-18 de agosto Querétaro, Gro.
138. Campbell R.M. and Scanes C.G. (1987) Growth hormone inhibition of glucagon and cAMP induce lipolysis by chicken adipose tissue *in vitro*. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 104:456-60.
139. Campbell R.M. and Scanes C.G. (1988). Pharmacological investigation on the lipolytic and antilipolytic effects of growth hormone (GH) in chicken adipose tissue *in vitro*. Evidence for involvement of calcium and polyamines. Proc.Soc. Exp.Biol.Med. 108:177-184.
140. Campbell R.M., and Scanes C.G. (1987) Lypolytic and antilipolytic effects of 22-human growth hormone, its 20 K variant, and human placental lactogen in chicken adipose tissue explants. Res-399. The Endocrine Society. June 10-12. Indianapolis, Indiana.
141. Lee.M.O. and Schaffer, N.K. (1934) Anterior pituitary growth hormone and the composition of growth. J.Nutr.7:337-363.
142. Li, C.H., Simpson, M.E. and Evans,H.M. (1949) Influence of growth and adrenocorticotropic hormone on body composition of hypofisectomized rats. Endocrinology 44:71-75.
143. Goodman H.M. (1968). Multiple effects of growth hormone on lipolysis. Endocrinology. 83:300-308.
144. Frigeri L.G. (1980). Absence of *in vitro* dexamethasone dependent lipolytic activity from highly purified growth hormone. Endocrinology. 107:738-743.
145. Frigieri L.G., Robel G., and Stebbins N. (1982) Bacteria, derived human growth hormone lacks lipolytic activity in rat adipose tissue. Biochim.Biophys.Res.Comm. 104: 1041-1046.

146. Vaughan, M., Berger, J. E. and Steinberg, D. (1964) Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **239**:401-409.
147. Corbin, J.D., Reimann, E.M., Walsh, D.A. and Krebs, E.G. (1970) Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate stimulated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **245**: 4849-4851.
148. Campbell, R.H. and Scanes C.G. (1988) Inhibition of growth hormone-stimulated lipolysis by somatostatin, insulin, and insulin-like growth factors (somatomedins) *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **189**:362-366.
149. Campbell, R.M., Scanes C.G. (1988) Inhibition of growth hormone-induced lipolysis by 3',5'-guanosin monophosphate in chicken adipose tissue *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **189**:367-371.
150. Fain, J.N. (1968) Effect of dibutyryl 3',5'-AMP, theophylline and norepinephrine on lipolytic action of growth hormone and glucocorticoid in white fat cells. *Endocrinology* **82**:825-830.
151. Goodman, H.M. (1981) Separation of early and late responses of adipose tissue to growth hormone. *Endocrinology* **109**: 120-129
152. Goodman H.M. (1970) Antilipolytic effect of growth hormone *Metabolism* **19**:849-855
153. Birnbaum R.S., and Goodman M. (1976) Studies on the Mechanism of the Antilipolytic Effects of Growth Hormone. *Endocrinology* **99**:1336-1345.
154. Goodman, H.M. and Coiro V. (1981) Effects of growth hormone on adipose tissue of weanling rats. *Endocrinology* **109**: 2046-2053.
155. Paladini, A.C., Pena, C. and Poskus, E. (1983) Molecular biology of growth hormone. *CRC. Crit. Rev. Biochem.* **15**:25-56
156. Nicoll, C.S., Mayer, G.L., Russell, S.M. (1986) Structural features of Prolactins and Growth hormone is that can be related to their biological properties. *Endocrin. Rev.* **7**:169-201
157. Mills, J.B., Kostyo, J.L., Reagen, C.R., Wagner, S.A., Moseley, M.H., Wilhelmi, A.E. (1980) Fragments of human growth hormone produce by digestion with thrombin: Chemistry and biological properties. *Endocrinology* **107**:391-398.

155. Lewis, U.J. (1984) Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Ann.Rev.Physiol.* 46:33-42.
159. Smith F.E. (1930) Hypophysectomy and replacement therapy in the rat. *Am.J.Anat.* 45:205-274.
160. Fenton, N.B. (1988) Desarrollo de un radioinmunoensayo homologa para la determinacion de la hormona de crecimiento de pollo (cGH). Tesis para la obtencion del titulo de Lic. en Biologia. Facultad de Ciencias UNAM.
161. Slotkin, T.A., and Bartolome, J. (1983). Ornithine Decarboxylase: master of neuroendocrine and neurotransmitter actions. In: *Methods in Enzimology*, Vol. 103, Hormone Action, part H, Neuroendocrine Peptides, Academic Press, N.Y.
162. Hartree, E.F. (1972). Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. *Ann.Biochem.* 48:422-427.
163. Garland, P.B., and Pandle, F.J. (1962). A rapid enzymatic assay for glycerol. *Nature.* 196:987-988.
164. Ornstein, L. (1964) Disc Electrophoresis-I Background and Theory. *Gel Electrophoresis* (Whipple, H.E., ed.) *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, pp.321-349.
165. Carranza S. M. (1987) Purificacion y caracterizacion bioquimica de la hormona de crecimiento (GH) hipofisaria de pollo. Tesis para la obtencion de titulo de Lic. en Biologia. Facultad de Ciencias UNAM.
166. Laemmli, L.V.K. (1970). Cleavage of Structural Protein During the Assembly of Head of Bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 224:680.
167. Hines, W.W., Montgomery C.D. (1987) Probabilidad y estadística para ingeniería y administración. Ed. Continental Mexico. 2a reimpresion p.p. 357-382.
168. Wilhelmi A.E. (1973) Bioassay. *Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology*, Vo. 2A Amsterdam-London. Ed. Solomon A. Berson-yalow. pp. 296-302