

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

EL PAPEL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO Y
DE LA INSULINA EN EL MECANISMO DE REGU-
LACION DE LA BIOSINTESIS DE PROTEINAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO

P R E S E N T A

ROSA MARGARITA ROMERO OROZCO

MEXICO, D. F.

1973



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

PRESIDENTE: JOSE I. BOLIVAR GOYANES

VOCAL : ELVIA PILAR MARTINEZ IZAGUIRRE

SECRETARIO: JOSE DE JESUS MANRIQUE O.

1er.SUPLENTE

2do.SUPLENTE

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

BIBLIOTECAS DE: FACULTAD DE QUIMICA, UNAM;

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM Y

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DEL -

CENTRO MEDICO DEL SEGURO SOCIAL.

SUSTENTANTE: ROSA MARGARITA ROMERO OROZCO

ASESOR DEL TEMA: JOSE DE JESUS MANRIQUE O.

SUPERVISOR TECNICO: ELVIA PILAR MARTINEZ I.

A MIS PADRES
CON TODO MI CARIÑO

A MIS HERMANOS

A LA FACULTAD DE QUIMICA.

I N D I C E

INTRODUCCION

CAPITULO I. BIOSINTESIS DE PROTEINAS

- 1.1 TRANSCRIPCION
- 1.2 TRADUCCION
- 1.20 ACTIVACION DE AMINOACIDOS
- 1.21 INICIACION
- 1.22 ALARGAMIENTO
- 1.23 TERMINACION
- 1.3 REQUERIMIENTOS ENERGETICOS.

CAPITULO II. REGULACION BIOQUIMICA DE LA SINTESIS DE PROTEINAS .

- 2.1 DIFERENTES SISTEMAS DE REGULACION
- 2.2 REGULACION HORMONAL

CAPITULO III. HORMONAS

- 3.1 PRINCIPALES HORMONAS, SU NATURALEZA QUIMICA Y SUS FUNCIONES.
- 3.2 INSULINA
- 3.3 EL PAPEL DE LA INSULINA EN LA SINTESIS DE PROTEINAS
- 3.4 HORMONA DE CRECIMIENTO
- 3.5 EL PAPEL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN LA SINTESIS DE PROTEINAS.

CAPITULO IV. REGULACION HORMONAL INDIRECTA
EFECTOS RELACIONADOS CON LA SINTESIS DE
PROTEINAS.

- 4.1 ACUMULACION DE AMINOACIDOS
- 4.2 TRANSPORTE DE AMINOACIDOS
- 4.3 INCORPORACION DE AMINOACIDOS EN LA
PROTEINA

CAPITULO V. EL PAPEL DE LAS HORMONAS EN LA BIOSINTESIS
DE PROTEINAS

- 5.1 EFECTO SOBRE EL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
- 5.2 EFECTO SOBRE LA SINTESIS DEL ACIDO RIBONUCLEICO
- 5.3 EFECTO SOBRE LOS RIBOSOMAS
- 5.4 EFECTO SOBRE EL MECANISMO INTERNO DE SINTESIS

CAPITULO VI. MECANISMOS DE ACCION HORMONAL

CONCLUSIONES.

BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION.

La Bioquímica es una ciencia relativamente nueva que nos lleva a un campo extenso de gran interés y que se ha venido desarrollando rápidamente en las últimas décadas. Estudia a nivel molecular los procesos y funciones vitales de los organismos y trata de explicar que es la vida y como se manifiesta.

Es de especial interés el observar la existencia de mecanismos de gran complejidad que permiten regular las funciones del organismo y que en último término de ellos dependen de nuestra existencia. La síntesis de proteínas es uno de esos mecanismos complejos que comprende una serie de factores y funciones específicas de gran trascendencia para los procesos vitales del organismo, como son, la respiración, la nutrición, el crecimiento, la reproducción, la sensibilidad, irritabilidad, movimiento, etc. y el conjunto armónico de ellos nos proporciona la vida.

Otro factor de gran interés es el de señalar la importancia de las proteínas que de acuerdo con su función biológica se clasifica en dos grandes grupos: las enzimas, que son los catalizadores de las reacciones bioquímicas y que reducen la energía de activación de la reacción química del sistema, las cuales pueden tener una función regulatoria y se denominan

enzimas regulatorias y en algunos casos alostéricas. El segundo tipo de proteínas lo constituyen aquellas que tienen función estructural. Estas son las dos grandes clasificaciones y dentro de ellas se encuentran: Enzimas, proteínas de almacenamiento, de transporte, contractiles, protectoras, toxinas, hormonas y proteínas estructurales.

Al considerar la gran variedad de funciones que realizan las proteínas se hace evidente la importancia que presentan éstas en el organismo, así como la trascendencia de una alteración en su secuencia o en la regulación de ellas, que podría repercutir en el equilibrio metabólico del organismo.

Con tal motivo se presenta la siguiente tesis con el fin de analizar un tema específico relacionado con las proteínas, y que consiste en determinar el papel de la insulina y de la hormona de crecimiento en el mecanismo de regulación de la síntesis de proteínas en hígado y músculo de mamíferos, así como revisar algunas de las principales teorías que existen sobre el o los mecanismos de regulación hormonal, presentándose para esto una revisión bibliográfica sobre las principales investigaciones publicadas en los últimos años (1967-1972).

Para facilitar el estudio de estos sistemas biológicos .

se tomaron en consideración dos aspectos de regulación hormonal de síntesis de proteínas: I.- Una regulación directa sobre la síntesis que constituye una regulación genética, es decir, las hormonas pueden influir en la transcripción y/o la traducción de la información genética estimulando: a) La síntesis de RNA mensajero. b) La activación del RNA de transferencia, c) La formación de complejos ribosomales en iniciación y alargamiento de cadena, d) La liberación de la misma, así como también, e) Una estimulación de actividades enzimáticas involucradas en este mecanismo de biosíntesis. II.- Una regulación indirecta, incluyéndose en ésta todos aquellos efectos que en forma secundaria están relacionados con la síntesis de proteínas, pero que en realidad son efectos independientes entre sí. Estos se manifiestan como: a) Una acumulación de aminoácidos en el plasma, b) El transporte de los mismos al interior de las células, y c) Su incorporación en las protefinas.

Se considera además esta revisión de especial importancia por la utilidad que reporta en el campo de la Nutrición, de la Biomedicina y de la Biología, principalmente porque analiza a nivel molecular y con bases bioquímicas el posible mecanismo de regulación hormonal y en particular trata de explicar el origen de enfermedades o defectos físicos ocasionados por la hipersecreción, hiposecreción o la ausencia de una o ambas hormonas (Insulina y Hormona de Crecimiento); así como

el papel que desempeñan las mismas en el crecimiento normal del organismo.

Por lo tanto mediante una presentación de los conocimientos actuales sobre un aspecto particular de la biosíntesis de proteínas se proporciona una fuente de información dentro del campo de la Bioquímica que contribuye indirectamente, junto con otras especializaciones y otras ciencias al desarrollo de la misma.

C A P I T U L O I.-

CONCEPTOS GENERALES.

1. MECANISMO DE BIOSINTESIS DE PROTEINAS.

La síntesis de proteínas es uno de los procesos biológicos más importantes de un ser vivo y como todo proceso de un organismo viviente es muy complejo y altamente organizado. Un factor de importancia es la síntesis de proteínas es que el mecanismo de la expresión genética es por especificación el responsable de la caracterización de todas las proteínas celulares, y a pesar de que existen diferentes proteínas que tienen diversas funciones biológicas es evidente que todas son sintetizadas por el mismo mecanismo, no obstante que existan algunas diferencias en detalle.

Para sintetizarse una proteína se requiere de una información genética que nos exprese la secuencia de aminoácidos que la va a constituir y todo un proceso de gran precisión que conduzca esta información que procede de los genes, hasta el sitio en donde se sintetizan las proteínas que son los ribosomas. Para poder entender mejor este mecanismo de síntesis es indispensable primero especificar en que consiste esta información y el papel que les corresponde a los genes en este mecanismo.

Se sabe que el dogma central de la Biología Molecular establece que la información genética procede del ácido desoxirribonucleico (DNA) y que es transmitido en el mensaje

para continuar su traducción en la proteína, por lo tanto el flujo que sigue la información es el siguiente: DNA → mRNA → proteína.

Por lo tanto la secuencia de aminoácidos para una proteína particular es específica para la secuencia de nucleótidos en un segmento particular del ácido desoxirribonucleico ó DNA. Los DNA son los moldes indirectos para la síntesis de proteínas, son transportadores genéticos del sistema del código, es decir, la información que poseen la transfieren a las moléculas del ácido ribonucleico, RNA, que en particular en este caso se conoce como mensajero ó mRNA. En este proceso primero se sintetiza una molécula de mRNA en el núcleo por un mecanismo que se denomina transcripción, copiándose la secuencia de bases del DNA y una vez que esta integrada viaja hacia el citoplasma transportando el mensaje hasta el sitio en donde se efectúa la traducción, en los ribosomas y es precisamente el mRNA quien actúa como molde directo o templado y quien va a determinar mediante su secuencia de bases (púricas y pirimídicas) la secuencia de aminoácidos en la proteína; habiendo un mRNA específico para cada proteína. El mRNA permanece unido a partículas citoplásmicas de ribonucleoproteína (ribosomas) y es ahí en donde se determina el orden de unión de los aminoácidos en una proteína específica (traducción).

Este proceso de síntesis de proteínas comprende dos grandes eventos: la TRANSCRIPCIÓN Y la TRADUCCIÓN.

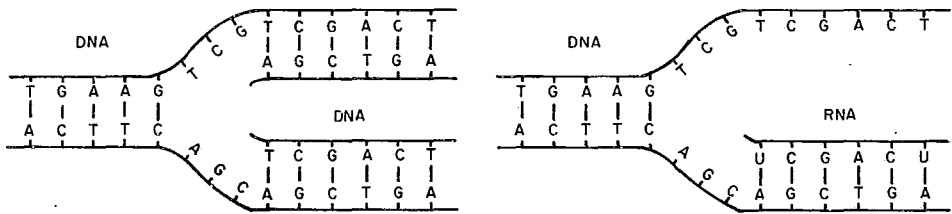


FIG. I TRANSCRIPCIÓN

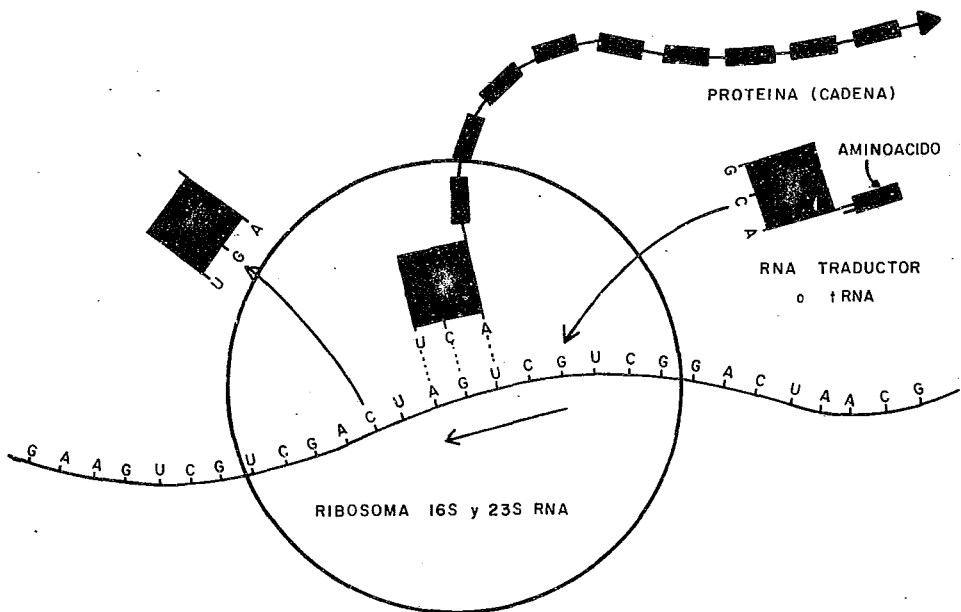
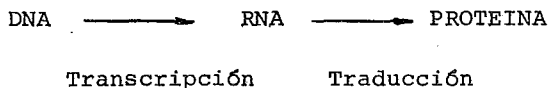


FIG. II TRADUCCIÓN



El mRNA se traduce en dirección 5' \rightarrow 3': La síntesis de una proteína se inicia en el grupo amino terminal del aminoácido y prosigue hacia el carboxilo terminal del aminoácido. Durante la traducción un grupo de tres nucleótidos adyacentes en el mRNA (codon) especifica cual aminoácido tiene que unirse a la cadena peptídica en crecimiento. Se ha establecido cuales codones especifican para cada uno de los veinte aminoácidos (esto es el código genético). Parece ser que la secuencia de aminoácidos y por lo tanto la cadena polipeptídica contiene toda la información requerida para generar la estructura tridimensional de la molécula de la proteína nativa.

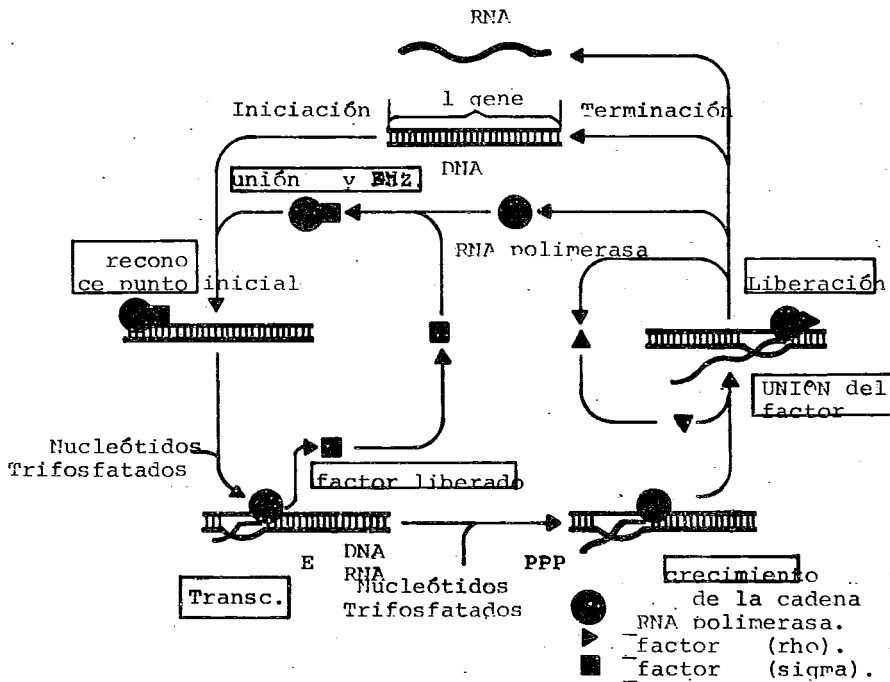


FIG. III TRANSCRIPCIÓN .-

SINTESIS DE PNA MENSAJERO

1.2 TRADUCCION DEL MENSAJE GENETICO.

La síntesis de proteínas en su proceso de traducción comprende cuatro grandes etapas:

1a. ETAPA. Comprende la activación de los aminoácidos, y requiere los siguientes componentes: los aminoácidos, los RNA solubles o de transferencia (tRNA), la enzima aminoacil-tRNA sintetasa, ATP y Mg^{2+} .

2a. ETAPA. Iniciación de la cadena polipeptídica, requiere el aminoacil-tRNA iniciador, mRNA, GTP, Mg^{2+} , los factores de iniciación M_1 , M_2 y M_3 , y las subunidades ribosomales 40s y 60s.

3a. ETAPA. Alargamiento de la cadena, requiere los aminoacil-tRNAs seleccionados por los codones, Mg^{2+} , los factores T_1 y T_2 y energía como GTP.

4a. ETAPA. Terminación de la cadena, comprende: el codon terminal del mRNA y el factor de liberación del polipéptido denominado factor R.

1.20 ACTIVACION DE LOS AMINOACIDOS.

En la traducción además de los dos tipos de RNA mencionados (mRNA y rRNA) participa otro tipo diferente de RNA, el soluble o de transferencia (tRNA). Para esto es indispensable primero establecer que los aminoácidos no se unen directamente a los ribosomas por las bases del mRNA sino que es necesario que antes se combinen con moléculas de adaptadores específicos

y formen complejos adaptador-aminoácido, ya que en esta forma son capaces de unirse para sintetizar una proteína debido a que se encuentran activados.

El adaptador tiene una fuerte afinidad química por los nucleótidos del mRNA. Todos los adaptadores son moléculas de tRNA que constan de una estructura especial formada por tres grupos integrados por pares de bases complementarias, unidos por puentes de hidrógeno y en los sitios en donde da vuelta la cadena tiene varias bases no apareadas, como se puede observar en la figura No. IV. El tRNA consta de cuatro asas (en donde da vuelta su estructura), un tallo principal que debe tener tres nucleótidos específicos para que se pueda realizar la activación (CCA); posee varios sitios específicos, uno de ellos es el que reconoce al ribosoma y otro es indispensable para el crecimiento de la cadena peptídica como sitio de unión de dos tRNAs en la translocación del péptido. Otro sitio específico importante que se encuentra en el asa II es el anticodon que está formado por tres bases, y son las que formarán pares de bases complementarias con las tres bases del codon del mensajero. Es el tRNA ya cargado quien posee especificidad y no el aminoácido activado y es quien va a trasladar su aminoácido específico del citoplasma al sitio de síntesis de la cadena polipeptídica (Fig. No. IV).

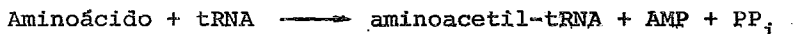
Los aminoácidos se unen con su grupo carboxilo terminal al grupo adenosin del tRNA por uniones covalentes de alto contenido energético y de esta forma los aminoácidos adapta

dos permanecen activados. Para este paso de activación es necesaria la presencia de la enzima aminoacil sintetasa que es específica para cada aminoácido. Un factor de importancia es el señalar que algunos investigadores reconocen que es la enzima y no el tRNA quien reconoce al aminoácido (Fig. No. V).

Para este proceso de activación se requiere una molécula de ATP (adenositrifosfato) para suministrar energía al sistema. La reacción se lleva a cabo de la forma siguiente:



por lo tanto se tiene:



Mg^{2+} y

aminoacil sintetasa $\Delta G^\circ = -7.0 \text{ Kcal.}$

Este dato del ΔG° , o cambio de energía libre nos indica que la reacción es exotérmica y que el compuesto formado contiene una energía de unión muy grande. Después de la activación que se lleva a cabo en el citoplasma las moléculas de estos aminoacil-tRNA se difunden hacia los ribosomas.

En estudios para determinar cual es el aminoácido inicial se ha logrado demostrar que todas las proteínas comienzan con el mismo aminoácido y que por lo tanto existe un codon necesario para iniciar la cadena peptídica. Tanto en procariontes como en eucariotes se sabe que este aminoácido es me-

tionina y que la única diferencia entre ellos es que en pro
cariotes la metionina esta formilada, es decir, tiene blo-
queado su grupo amino para asegurar el crecimiento de la ca
dena en un sólo sentido. Sin embargo se sabe que en eucario
tes esto no es necesario y que incluso en la mayoría de los
casos la metionina es liberada de la cadena polipeptídica por
medio de una enzima por un mecanismo específico que en ocasio
nes es activo y en otras inactivo, ya que se han encontrado
péptidos de 15 aminoácidos que ya perdieron su metionina ter-
minal como otros de mayor peso molecular que la conservan.

El único codon identificado para la metionina es AUG,
se sabe que este trinucleótido (adenina, uracilo, guanina) se
identifica tanto para metionina como para formil-metionina en
los ribosomas. Por lo tanto a este codon se le considera como
el codon inicial de la cadena.

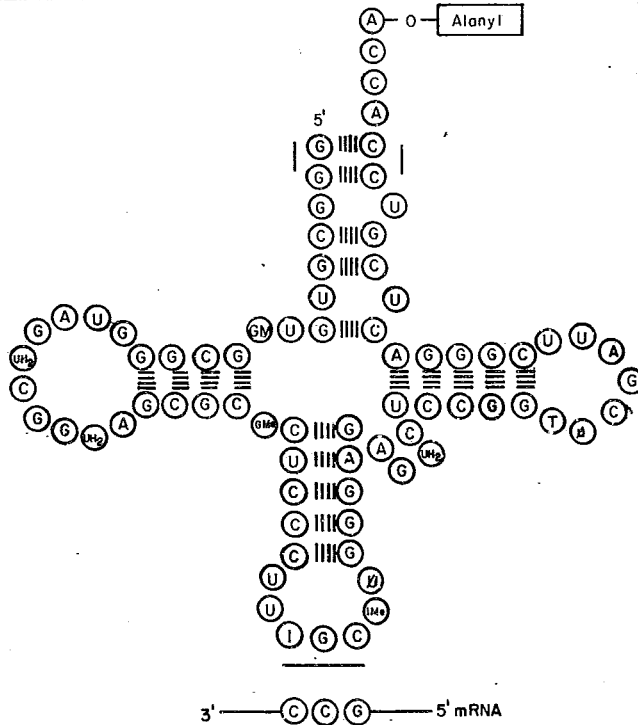


FIG IV. RNA DE TPANSFERENCIA.

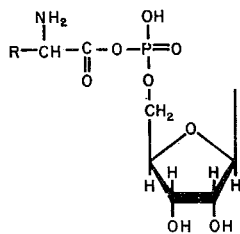


FIG V. - ADENILATO

1.21 INICIACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN EUCARIOTES.

En eucariotes es evidente la existencia de pozas de subunidades ribosomales, ribosomas y polisomas; y todos ellos juegan un papel muy importante en la síntesis de proteínas.

Se sabe que los ribosomas están formados por subunidades que pueden disociarse y reasociarse, pero que permanecen unidos durante la síntesis, al final del proceso se disocian y permanecen en una poza para después volverse a reasociar para nuevas síntesis, sin ser específico que la unión sea de las mismas subunidades. En eucariotes el ribosoma 80s se disocia en las subunidades 40s y 60s (coeficiente de sedimentación). La diferencia principal entre la iniciación de síntesis de proteínas en eucariotes (células nucleadas) y procariotes (bacterias) es que en los primeros los ribosomas simples sedimentan alrededor de 75-80s mientras que en las células del segundo tipo lo hacen a 70s. Los ribosomas están formados por agrupaciones de las subunidades chicas (40s + 60s) que permanecen unidas dependiendo de las concentraciones de Mg^{2+} . Y al conjunto de varios ribosomas que están leyendo a un mismo tiempo la información genética de un mismo templado y que por lo tanto están sintetizando la misma proteína se les conoce como polisomas, que pueden llegar a constituir desde tres o cuatro hasta cien ribosomas individuales.

En un examen a microscopio electrónico los polisomas parecen o dan la apariencia de estar unidos entre sí por un cordón, que en realidad constituye el mRNA y las proteínas

que se están sintetizando. También a microscopio electrónico ha sido posible observar que los polisomas tienen una estructura tridimensional en el espacio y que a partir de polisomas que contienen seis o más ribosomas conservan una cierta forma regular, mostrando una estructura helicoidal en forma de espiral.

Se sabe además que los polirribosomas de células de eucariotes funcionan con un considerable orden y regularidad y que se pueden encontrar fijos o libres en el citoplasma. Los fijos se encuentran unidos a retículo endoplásmico, que forma canales para el transporte y secreción de las nuevas proteínas sintetizadas.

Un paso anterior a la iniciación de la cadena es la disociación de los ribosomas en subunidades; se sabe que participa principalmente la subunidad ribosomal pequeña 40s en la iniciación. En estudios que se han hecho con aminoácidos marcados a tiempos cortos se ha observado que la marca aparece con mayor frecuencia en las fracciones ribosomales de subunidades pequeñas que en los polisomas o monosomas. Conforme pasa el tiempo la habilidad de los ribosomas de disociarse va disminuyendo ya que tienen una vida media determinada.

Como se dijo anteriormente al hablar de la activación de los aminoácidos, en la iniciación de la síntesis de la cadena polipeptídica en procariotes se requiere que el aminoácido inicial tenga su grupo amino bloqueado para que la elongación de la proteína se realice en un solo sentido y se ha en-

contrado un aminoacil-tRNA específico para este aminoácido inicial (formil-met-tRNA_{met}). Este aminoacil-tRNA se produce por formilación del met-tRNA_{met} en presencia de una enzima específica (transformilasa). Mientras que en eucariotes no ha sido posible demostrar la actividad de esta enzima; sin embargo se sabe que existen dos tipos diferentes de Met-tRNA, uno de ellos (met-tRNA_f) se utiliza siempre como aminoácido inicial de la cadena, mientras que el otro (met-tRNA_m) proporciona metionina a posiciones intermedias. Por otra parte se sabe que existe una aminopeptidasa que quita la metionina terminal, pero no se sabe que es lo que le confiere actividad, ya que en ocasiones se han encontrado péptidos muy grandes que todavía conservan su grupo metionina; sin embargo en la mayoría de los casos la enzima es activa una vez que hay de 15 a 20 aminoácidos en la cadena peptídica, lo que hace pensar que metionina solo se encuentra en las primeras etapas del crecimiento de la proteína y es por eso que en estudios que se han hecho de secuencia de aminoácidos solo en pocos péptidos se ha encontrado metionina como aminoácido terminal. Sin embargo en estudios más específicos sobre inhibición del alargamiento de la cadena se ha observado que el péptido de iniciación es metionina o metionina-valina (hemoglobina).

FACTORES DE INICIACION.

Existe un factor de iniciación que se ha caracterizado y que es diferente de los de elongación; parece ser que

actúa en un paso posterior a la formación del aminoacil-tRNA, pero antes de la elongación del péptido. Se ha separado este factor en dos componentes: M_1 y M_2 , ambos factores regulan la óptima concentración de Mg^{2+} necesaria, pero son incapaces de estimular el mRNA natural. Existe un tercer tipo, el factor de iniciación M_3 que no regula la concentración del catión pero que es indispensable para la traducción del mRNA natural. Sin embargo, la función exacta de estos factores se desconoce. Solo se sabe que la función del M_1 y M_2 es semejante a los factores de iniciación en bacterias, estimulan la unión del met-tRNA_f a los ribosomas en la presencia del codon de iniciación (AUG), que a la vez es responsable de estabilizar el monosoma 80s. También interviene en la traducción del mRNA el factor M_3 y se piensa que su función está relacionada para seleccionar o reconocer el mRNA natural (Fig. No. VI).

Bajo diferentes tipos de experimentos se ha comprobado que el mRNA de un tejido específico no puede ser traducido por factores y ribosomas de otro y con esto se concluye que existen factores específicos celulares que reconocen al mensajero que se encuentra en el ribosoma y que tienen como función principal la iniciación de síntesis de proteínas por unión del mRNA a los ribosomas.

Por lo tanto se puede concluir que el mecanismo de iniciación de síntesis de proteínas en eucariotes es similar al de bacterias y por lo mismo la iniciación por un Met-tRNA específico podría considerarse como un fenómeno universal en la síntesis de proteínas de eucariotes y procariotes. La ú

ca diferencia es que tanto en bacterias como en mitocondrias se requiere que el iniciador tenga su grupo amino bloqueado, mientras que en citoplasma de eucariotes esto, no parece ser indispensable.

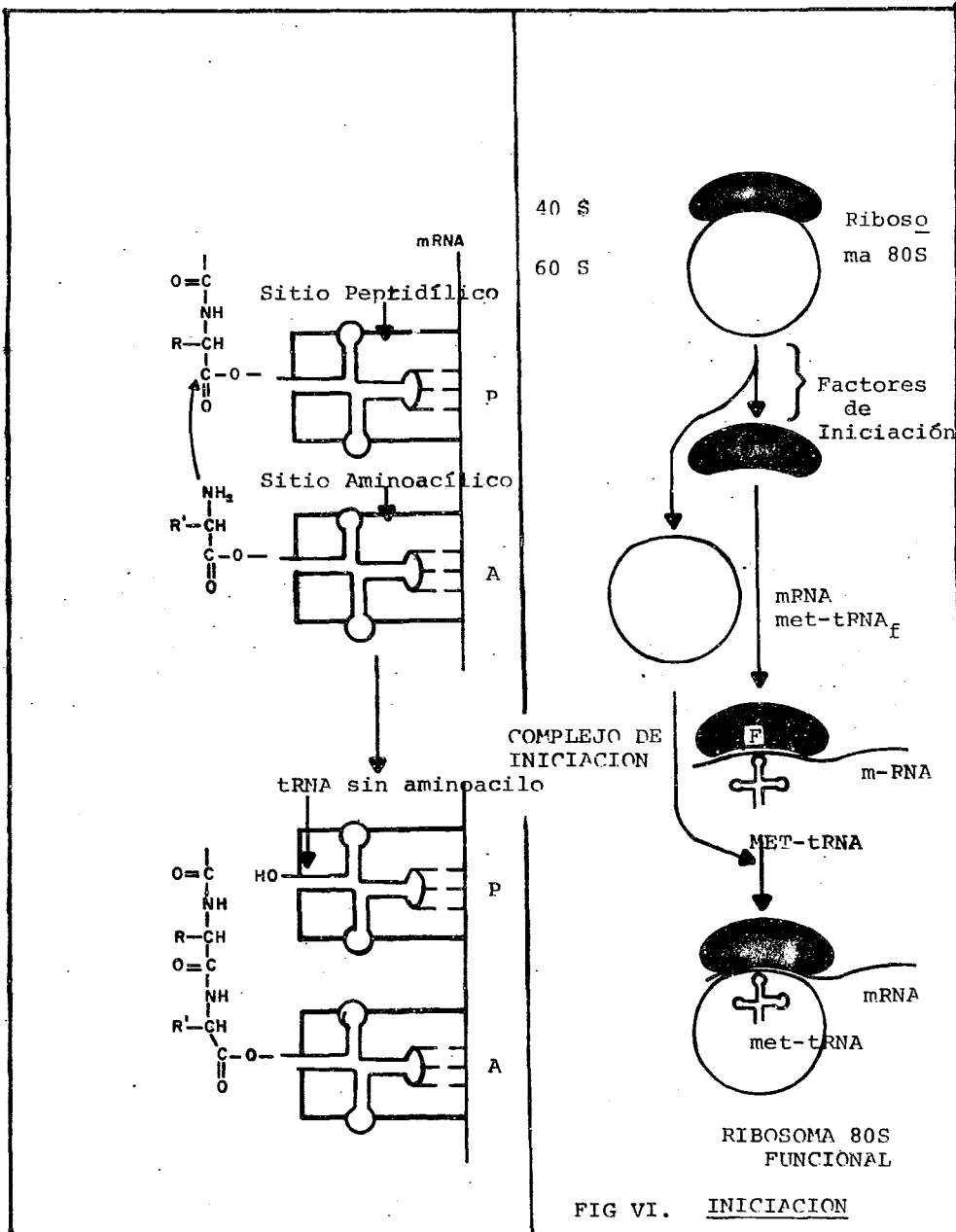


FIG. VII ELONGACION

EL PAPEL DE LA PEPTIDIL TRANSFERASA

La unión peptídica se forma por un desplazamiento nucleofílico en el cual el grupo amino del aminoácido desplaza al tRNA.

1.22 ALARGAMIENTO DE LA CADENA PEPTIDICA EN EUCARIOTES.

Se han identificado hasta la fecha dos factores: el factor T_1 ó transferasa I, que es equivalente al factor T de procariotes y el factor T_2 o transferasa II equivalente al factor G.

El T_1 se ha aislado y se sabe que es una proteína de peso molecular 18600, al hidrolizar se han encontrado subunidades aparentemente iguales, observándose que esta disociación es irreversible; por otra parte también se han encontrado agregados de esta proteína de mayor peso molecular con actividad enzimática.

Esta enzima (T_1) estabiliza y favorece la unión del aminoacil-tRNA con el ribosoma (en el sitio A); para este proceso se requiere energía que se suministra al sistema en forma de GTP, sin embargo, no se ha encontrado ninguna relación entre la unión que se efectúa en el ribosoma y la hidrólisis del compuesto de alto contenido energético, es decir, entre la cantidad de aminoacil-tRNA unido a ribosoma y la cantidad de producto de hidrólisis formado ($GDP + P_1$) a partir de GTP.

Durante esta etapa se forma un complejo T_1 -GTP-aatRNA, comprobándose en estudios hechos en ribosomas de hígado de rata que se encuentran todos sus constituyentes perfectamente unidos y el cual ha sido posible aislarlo en dicho estado.

Se sabe que el T_1 se une en la subunidad pequeña 40s, forma el complejo ribosomal y que en este sitio existe acti-

vidad de GTPasa. También se sabe que existe una enzima que es la que va a transferir al péptido ya formado los nuevos aminoácidos, los va pegando para formar una cadena polipeptídica más larga y su actividad como peptidil transferasa se ha localizado en la subunidad ribosomal 60s, por lo tanto se cree que forme parte de la subunidad. Estos estudios han sido hechos principalmente en levaduras, en embriones en cultivo, en sistemas de células libres de reticulocitos, en hígado de rata y en hígado del hombre.

El factor T_2 también se ha aislado, se sabe que es una proteína con un peso molecular de 60000, que es muy semejante al factor G de bacterias. La diferencia del factor G con el T_2 es que éste último es específico para ribosomas 80s, en cambio el factor G para 70s. Otra diferencia es que el factor T_2 presenta inhibición por toxina difteria y por NAD no observable en síntomas de procariotes.

Este factor T_2 es necesario para el proceso de translocación, es el que completa la reacción de polimerización de los aminoácidos, ya que translada el péptido del sitio A (del aminoácido) al sitio P (del polipéptido) y es necesario que el péptido se encuentre en el sitio P pues de otra forma no puede entrar otro aminoácido para poder alargar la cadena, es decir, no continuaría la síntesis. De ahí la trascendencia de este factor que no interviene directamente en la unión del péptido al ribosoma pero que participa transfiriendo al péptido al sitio específico para que se continúe la síntesis. Este factor también posee actividad de GTPasa, es un mecanismo

mo complementario al paso anterior de la formación del complejo y por lo tanto es necesaria la presencia de GTP para que ocurra la translocación. Se sabe que este mecanismo ocurre ayudado por un cambio en la conformación del ribosoma y que quizás es provocado por este factor proteico.

Como se sabe existe en el ribosoma un sitio para el aa-tRNA donador y otro para el aceptor (aa-tRNA) y en eucariotes se sabe que particularmente el peptidil-tRNA se encuentra en el sitio del aceptor y en presencia del factor T_2 y GTP es cambiado al sitio del donador (sitio P) y por lo tanto en células nucleadas el sitio del donador esta ocupado exclusivamente por peptidil-tRNA.

El T_2 requiere la unión de ambas subunidades para llevar a cabo la translocación y se sabe que un mismo factor va a servir para efectuar este proceso en varios ribosomas, ya que se recupera el factor T_2 y conserva su actividad de translocasa.

Se sugiere que la liberación del T_2 depende del movimiento de los ribosomas a lo largo del mRNA y quizás en la disociación de los ribosomas en el último paso de terminación de la cadena (Figs. VII y VIII).

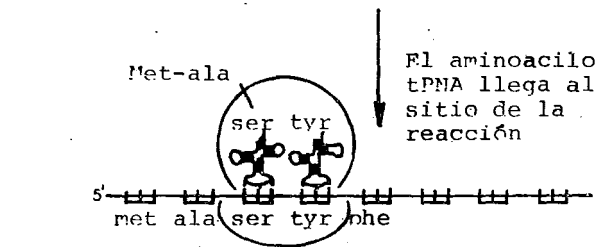
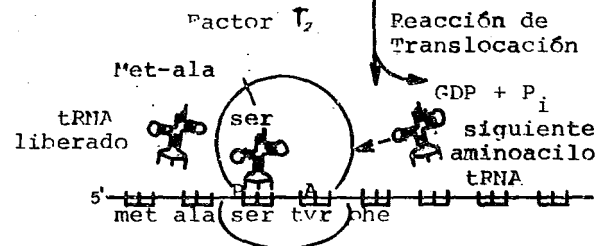
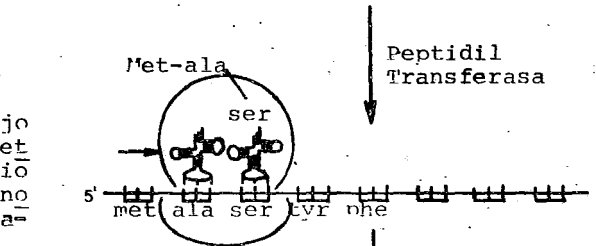
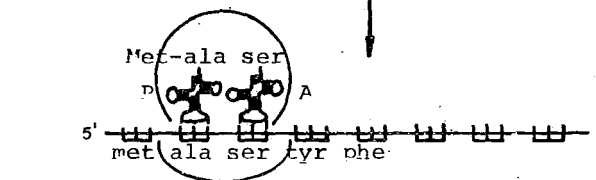
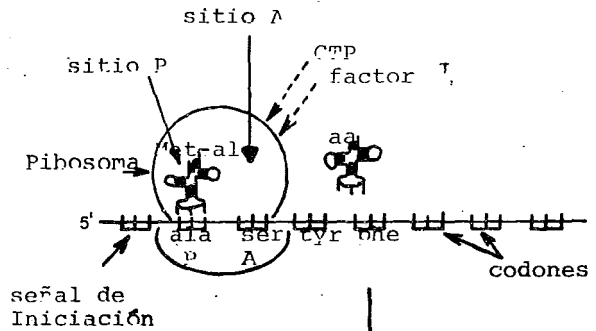


FIG. VIII

MECANISMO DE ELONGACION DE LA CADENA PEPTIDICA .-

Después de que el complejo de iniciación se forma el met tRNA se encuentra en el sitio peptídico, el siguiente amino acilo-tRNA se al sitio del aminoacilo

Peptidil Transferasa

Reacción de Translocación

El aminoacilo-tRNA llega al sitio de la reacción

1.23 TERMINACION DE LA CADENA POLIPEPTIDICA.

El proceso de terminación de la cadena peptídica es fundamentalmente parecido al de bacterias, comprende: un factor R con peso molecular de 40000 a 50000 que reconoce el codon terminal (UGA, UAA, UAG) o codones sin sentido, un factor de liberación, que origina la disociación del complejo ribosomal-mRNA-pept.-tRNA; así como también otro factor de liberación de f-Met a partir de un intermediario y por último, GTP que proporciona la energía necesaria para que la liberación se lleva a cabo.

El factor R va a determinar tanto la velocidad como la cantidad liberada de f-Met; existe también otro factor que regula la velocidad de liberación, se le conoce como factor S y no tiene actividad de liberador por sí mismo.

Del factor R se conocen dos componentes: el factor R_1 y R_2 , ambos son proteínas ácidas de pesos moleculares de 44000 y 47000 respectivamente; se sabe que la terminación es dependiente de estos factores pero no de ambos simultáneamente. Principalmente se sabe que los factores R forman un complejo con los ribosomas y trinucleótidos. El factor R_1 activa la unión de UAA ó UAG y R_2 la unión del UAA o UGA, que confirma su especificidad y sugiere la formación de un compuesto intermediario para el reconocimiento del codon terminal que posteriormente formará un complejo factor R-codon terminal-ribosoma. Se ha encontrado que estos factores R_1 y R_2 compiten por el mismo sitio en el ribosoma. Por otra parte se cree que los codones UAA, UAG y UGA (que son designados como codones sin

sentido) pueden servir como señales de terminación de la cadena.

Para el proceso de terminación se requiere la presencia de una enzima que libere el péptido formado y que libere f-Met del compuesto intermediario, esta enzima es la peptidil transferasa. Parece ser que esta enzima, los factores y las actividades de liberación van paralelos uno con respecto al otro es este paso de reconocimiento de la señal terminal y separación del polipéptido.

Por lo tanto se podría decir que la terminación comprende de dos pasos: una reacción de unión del codon terminal dependiente del factor R y una reacción hidrolítica en la cual el mismo factor R convierte la peptidil transferasa en una hidrolasa, ocasionando la transferencia de la porción peptídica del peptidil-tRNA al citoplasma.

Para tratar de explicar este proceso algunos investigadores proponen que el residuo terminal del aminoácido-COOH del último aminoacil-tRNA que ha sido agregado a la cadena polipeptídica permanece unido al último tRNA mediante una fuerte unión covalente que se encuentra en cambio unido al ribosoma por una unión mas débil. La liberación del polipeptidil-tRNA del ribosoma se efectúa, como se dijo anteriormente, por medio de un factor proteico de liberación que principalmente se une a los ribosomas y promueve la ruptura de la unión ester y por lo mismo la liberación del polipéptido. Posteriormente el ribosoma 80s desprende también al mRNA y

lo deja libre en el citoplasma, quedando el ribosoma en condiciones de disociarse hacia una poza de subunidades o en posibilidad de iniciar una nueva síntesis.

Se sabe muy poco acerca de cual es el estado en el que la nueva cadena polipeptídica deja al ribosoma, ya sea con su estructura terciaria completa o en forma de alfa hélice (estructura secundaria).

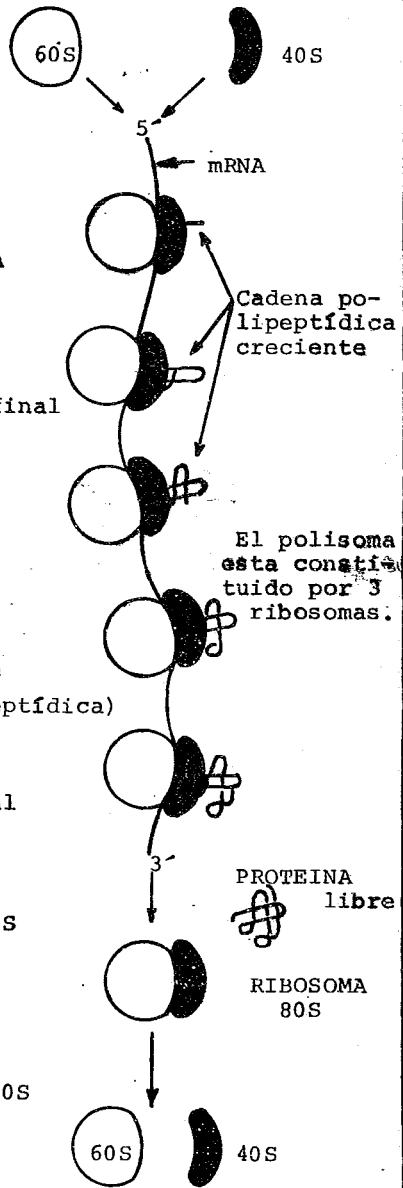
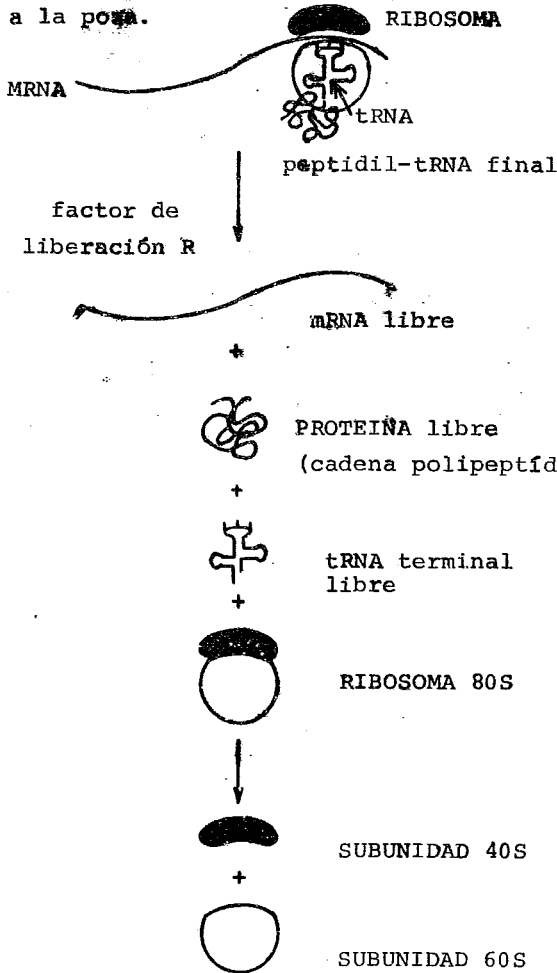
Es evidente que la terminación ocurre en los ribosomas y que el polipéptido completo es liberado en forma libre, mientras que el tRNA que acarrea este polipéptido queda en el ribosoma. Se sabe que existe un factor TR que libera el tRNA de los ribosomas cuando no hay translocación, sin embargo no hay pruebas suficientes de que este factor actúe en la terminación. El último paso que ocurre antes de la disociación de los ribosomas es la extracción del tRNA que mantiene las subunidades juntas y que después de ser liberado permite que se disocien para comenzar una nueva síntesis de proteínas y así repetirse el mecanismo.

FIG. X RESUMEN DE LAS
TRES ULTIMAS ETAPAS.

FIG. IX

TERMINACION Y LIBERACION.

Durante esta última etapa se desprende la cadena polipeptídica libre y también las subunidades ribosomales 40S y 60S, las cuales se van a la pona.



MECANISMO DE FORMACION DE UN POLISOMA.-

Los ribosomas trabajan independientemente.

1.3 REQUERIMIENTOS ENERGETICOS.

En total se requiere un mínimo de tres uniones de alta energía para cada unión peptídica de una proteína completa; una molécula de ATP se necesita para la activación del aminoácido, que constituye una unión fosfato de alto contenido energético. Durante la formación de la cadena se requieren por lo menos dos moléculas de GTP. Así un total de 21.9 Kcal. se requieren para generar una unión peptídica, cuya energía libre estandar es alrededor de -5.0 Kcal.

El cambio de energía libre neto, ΔG° , para la síntesis de una unión peptídica es -16.9 Kcal, lo que hace que la síntesis de una unión peptídica, a expensas de una energía de unión fosfato se vuelva exergónica e irreversible.

C A P I T U L O II.

2.1 MECANISMOS DE REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS.

Las células tienen mecanismos de control para asegurar se que las proteínas sean sintetizadas en las cantidades requeridas por el organismo y solo recientemente se han empezado a comprender las bases moleculares de estos mecanismos de regulación, quedando limitados la mayoría de nuestros conocimientos a procariotes, sin embargo, últimamente se ha avanzado también en el campo de organismos con células nucleadas (eucariotes). Para entender mejor este mecanismo es necesario comprender la regulación que existe a nivel genético, es decir, la regulación de la transcripción, para esto se presenta el siguiente esquema (Fig. No. XI). Existen cierto tipo de compuestos que se conocen como correpresores o inductores que controlan la velocidad de síntesis de proteínas directamente mediante una regulación de la síntesis de mRNA; éstas moléculas, tanto los correpresores como los inductores actúan uniéndose a otras moléculas específicas llamadas represores, los cuales pueden existir en forma activa cuando están combinados con un correpresor y en este caso se manifiesta una inhibición activa de la síntesis de proteínas, o también pueden estar en estado inactivo cuando se combinan con el inductor y en este caso no hay inhibición y por el contrario en algunos casos hay estimulación; ambos agentes van a actuar directamente a nivel del operador, que es una región específica del DNA, que regula varios genes estructurales (esquema).

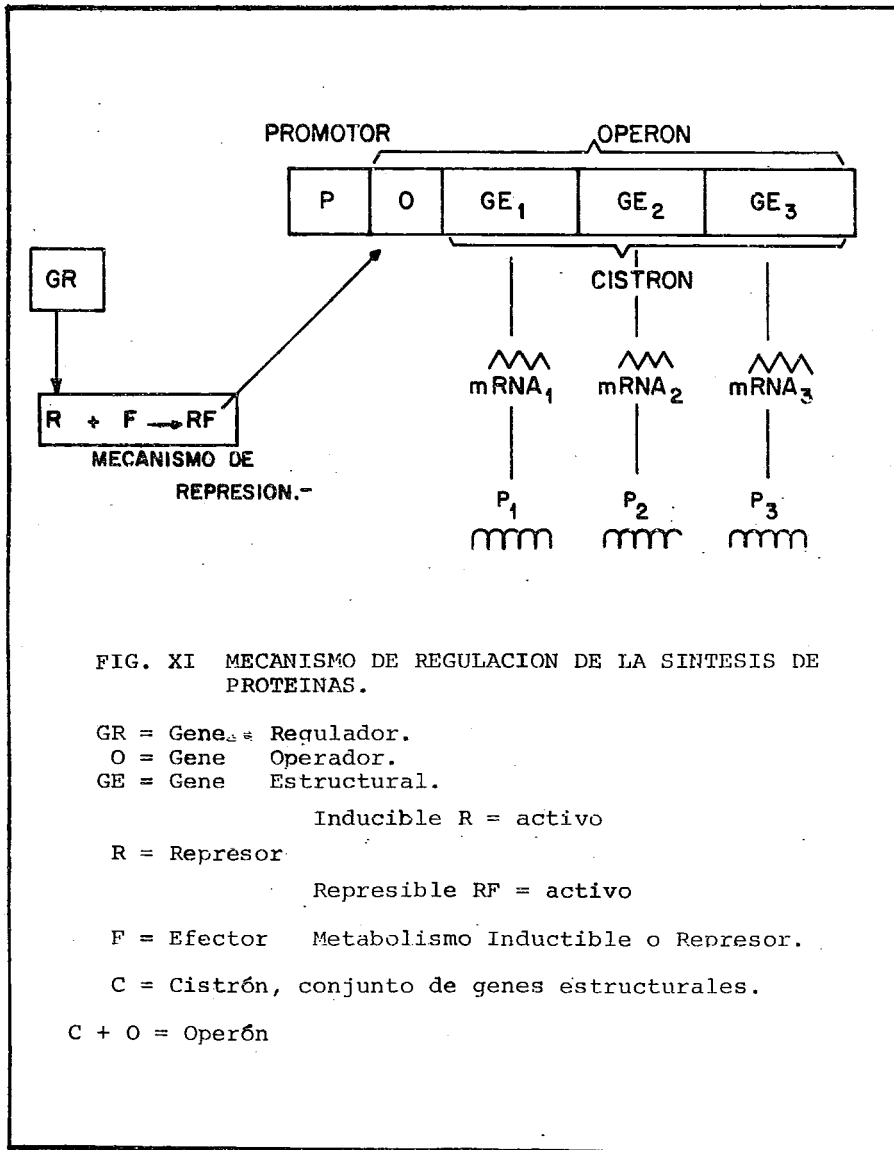


FIG. XI MECANISMO DE REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS.

GR = Gene Regulador.

O = Gene Operador.

GE = Gene Estructural.

Inducible R = activo

R = Represor

Represible RF = activo

F = Efector Metabolismo Inducible o Represor.

C = Cistrón, conjunto de genes estructurales.

C + O = Operón

Se cree que cuando el represor se une al operador previene que la RNA polimerasa se una al DNA en su sitio específico para la transcripción, que es en donde se encuentra el promotor y de esta manera se detiene específicamente la iniciación de la síntesis del RNA mensajero.

El represor controla todo un operón que esta constituido por el operador y los genes estructurales, relacionados con diversas funciones metabólicas (p. ej. la producción de enzimas sucesivas en la síntesis de un aminoácido o nucleótido). Este control del sistema operador-represor es de carácter negativo, sin embargo existe también un control positivo que esta determinado por una proteína específica que promueve la síntesis del mRNA.

Existen también otros mecanismos de regulación que no tienen carácter genético, que son de mayor rapidez y eficiencia en su funcionamiento y que van a estar en función directa de diversos factores:

I. La estabilidad de la molécula del mensajero (mRNA) del cual depende la síntesis de proteínas, ya que es un factor determinante, sin el cual no se realiza la síntesis (dependiendo del medio en el que se encuentre).

II. En otras ocasiones la velocidad de varias enzimas va a estar determinada por una síntesis constitutiva que depende a su vez de varios factores:

a) La velocidad a la que son sintetizadas las moléculas del mRNA; ya que unas serán a altas y otras a bajas.

b) La velocidad a la cual los ribosomas se unen al punto inicial de la molécula de mRNA.

c) La velocidad a la cual se lee el mensaje.

d) La vida media del mRNA.

e) Todos aquellos factores físicos y fisicoquímicos que constituyen la síntesis.

Sin embargo se sabe muy poco acerca de estos factores. Sobre el primero se sabe que el control está determinado en parte por la secuencia de nucleótidos del promotor, que en determinadas ocasiones presenta gran afinidad por la RNA polimerasa y en otras baja. La velocidad a la cual se traduce el mensaje va a depender de la secuencia de nucleótidos del templado.

El control sobre metabolismo celular está también fuertemente afectado por la inhibición de productos finales de funciones enzimáticas. Un mecanismo probable que se ha establecido es que un producto final puede combinarse con la primera enzima envuelta en un cambio biosintético específico y de esta forma actuar como propio inhibidor de la síntesis, transformando la enzima en su forma inactiva, combinándose no en el sitio activo de la enzima sino en otro sitio; parece ser que este fenómeno ocurra en el paso limitante del proceso de síntesis, que es en donde se necesita menor energía de activación para bloquear la reacción, con una menor energía se bloquea la síntesis en una forma más eficiente y no se continúa sintetizando la enzima, asegurándose la inhi

bición mediante un mecanismo rápido. Existe otro tipo de regulación enzimática en que se cambia la forma o estructura de enzimas y a estas proteínas que presentan estos efectos y que tienen la cualidad de cambiar la conformación de enzimas se les conoce como proteínas o efectores alostéricos, ya que sufren una transformación alostérica.

Una teoría de especial importancia que nos ayuda a entender este mecanismo de regulación bioquímica es la presentada por Jacob y Monod quienes proponen un modelo general de la regulación genética, sin embargo estos estudios han sido hechos en bacterias y se cree que se puedan aplicar a organismos superiores pero no deja de ser una hipótesis en que todavía existen grandes dudas y por lo tanto no se ha podido extrapolar a eucariotes.

Otro mecanismo que se propone para tratar de explicar este control externo organizado son las hormonas. Para una célula es indispensable que su sistema genético responda a condiciones externas variables y en caso de que todas las células debido a una situación especial estén alterando su metabolismo es de suponerse que exista de forma indispensable un control externo organizado. Las hormonas se proponen como posibles agentes externos que alteran la expresión genética, ya sea nivel de la traducción o de la transcripción y es el principal objetivo de esta tesis (revisión bibliográfica), el señalar el control externo que ejercen las hormonas sobre la biosíntesis de proteínas.

2.2 MECANISMO DE REGULACION HORMONAL.

El tratar de explicar el origen de la regulación hormonal ha sido objeto de múltiples investigaciones y ha requerido muchos esfuerzos. Se han sugerido diferentes mecanismos de acción entre los cuales se proponen como coenzimas, agentes activadores de enzimas importantes, agentes externos que modifican la membrana exterior de las células, que afectan la estructura de las mismas, o que poseen receptores a nivel de membrana; para cada uno de estos se tienen evidencias que los confirman.

A pesar de que no esta bien establecido el sitio de acción hormonal se han propuesto cinco sitios generales:

1. A nivel de la transcripción: Induciendo la síntesis de enzimas que actuan en el núcleo. Las hormonas estimulan la síntesis de una enzima o un grupo de enzimas que catalizan una vía metabólica particular. Una evidencia de la acción a nivel del núcleo es la demostración de un aumento en síntesis de RNA medido por la incorporación de precursores marcados con el ácido orótico o la glicina a la fracción del RNA nuclear, se observa un incremento en síntesis de RNA total, incluyendo a los RNA mensajeros, de transferencia y ribosomal, en el núcleo. Puesto que los diversos RNA mensajeros sintetizados por el núcleo se pueden identificar con las enzimas específicas cuya síntesis determinan, no ha sido posible todavía relacionar sin equivocación un cambio en el RNA total, con el aumento o disminución de la actividad de ciertas

enzimas; así una hormona que no efectúa un aumento neto en la síntesis de RNA puede actuar por este mecanismo aumentando el RNA para una enzima específica, mientras que haría disminuir la síntesis para otras. Finalmente el incremento en la actividad enzimática después de la administración de una hormona puede ser bloqueado por inhibidores de la síntesis de RNA como la actinomicina D indicando que la acción hormonal sobre la actividad enzimática esta mediada por un efecto sobre la síntesis de RNA; el mecanismo hormonal que induce un cambio en esta síntesis y en las enzimas envueltas en la misma es relativamente lento y requiere bastante tiempo para que se demuestre el efecto.

2. A nivel de la traducción: Estimulando la síntesis de enzimas a nivel de los ribosomas. La actividad se manifiesta a nivel de la traducción del RNA mensajero, en los sitios o mecanismos que intervienen en la producción de la proteína. Los ribosomas de un animal tratado con hormona de crecimiento, poseen una capacidad modificada para sintetizar proteínas en presencia de mRNA normal (Korner, 1965).

3. Activación directa a nivel de la enzima: Aunque estos efectos son difíciles de demostrar, el tratamiento de un animal entero o de un tejido aislado, con una hormona da por resultado un cambio de actividad enzimática independiente de la nueva síntesis. Estos efectos son extremadamente rápidos y por lo tanto también son difíciles de demostrar.

4. Acción hormonal a nivel de la membrana: Muchas hor-

monas parecen intervenir específicamente en el transporte de sustancias al interior de las células, incluyendo azúcares, aminoácidos, cationes y nucleótidos, posiblemente alterando la actividad de receptores en la membrana, o quizás también estimulando la síntesis de los mismos para facilitar este transporte. En general un control hormonal a nivel de membrana provoca cambios metabólicos rápidos en el tejido, pero en realidad tiene poco efecto sobre la actividad metabólica en preparaciones especiales de células.









5. Un mecanismo hormonal al que se le ha enfatizado últimamente es el que se refiere al AMP cíclico, que por sus características especiales como compuesto cíclico tiene gran importancia en el control de reacciones enzimáticas y se piensa que se encuentra presente en la mayoría de las funciones del organismo, sin embargo, lo que está mejor estudiado es su mecanismo de acción específico para epinefrina, glucagon y la hormona adenocorticotrópica (ACTH), las tres hormonas actúan por medio de AMP cíclico y sin embargo sus efectos no son aditivos sino independientes entre sí.

El mecanismo es el siguiente: La hormona posee un receptor a nivel de membrana que se piensa que cambia su conformación bajo el efecto hormonal y que tiene la característica de activar la adenil ciclasa, que es la enzima que convierte ATP en AMP cíclico y ésta a su vez va a activar la enzima proteína quinasa que es la responsable de estimular la fosforilación de los ribosomas y por lo mismo la síntesis de proteínas. Por

otra parte partiendo de ACTH el AMPcíclico también va a estimular la síntesis de corticosteroides a partir de colesterol, es decir se van a presentar efectos metabólicos aditivos independientes.

Como se podrá comprobar posteriormente con los trabajos de investigación que se presentan en esta revisión, no existe un sitio definido de acción predilecto por la hormona (insulina u hormona de crecimiento) o un mecanismo establecido en el que se demuestren cada una de las teorías anteriormente expuestas, se podrá observar que en el caso particular de estas dos hormonas anabólicas se presenta una influencia selectiva sobre DNA, síntesis de RNA y proteína, así como también una estimulación del transporte de aminoácidos, acumulación e incorporación de aminoácidos en la proteína; o una estimulación hormonal de la actividad enzimática, sin embargo el mecanismo bioquímico se desconoce.

FIG. XII. PRINCIPALES HORMONAS, SU NATURALEZA QUIMICA
Y ALGUNOS DE SUS PRINCIPALES EFECTOS BIOQUIMICOS.-

ECDISONA	 Gland. Protorácica Insectos	ESTEROIDE	I
CORTISONA	 Corteza Suprarrenal	ESTEROIDE	II
INSULINA	 Pancreas	POLIPEPTIDO	III
ESTROGENO	 Ovario	ESTEROIDE	IV
ALDOSTERONA	 Corteza Suprarrenal	ESTEROIDE	V
ACTH	 G. Pituitaria	POLIPEPTIDO	VI
GH	 G. Pituitaria	POLIPEPTIDO PROTEINA	VII
TIROXINA	 Tiroides	DERIVADO DE LA TIRONINA	VIII

C A P I T U L O III

3.1 PRINCIPALES HORMONAS, SU NATURALEZA QUIMICA Y SUS EFECTOS BIOQUIMICOS.

- I ECDISONA Origina la iniciación del desarrollo adulto del insecto, su metamorfosis al estado adulto.
- II CORTISONA
1. Biosíntesis de glucógeno en hígado.
 2. La redistribución de grasa a través del organismo.
 3. Altera el balance de nitrógeno.
 4. Es necesaria para la función muscular.
 5. Altera la excitación del sistema nervioso central.
 6. Afecta la diferenciación del tejido nervioso.
 7. Promueve la cicatrización.
 8. Induce la aparición de nuevas enzimas en el hígado.
 9. Afecta casi todos los tejidos.
- III INSULINA
1. Afecta la velocidad de incorporación de carbohidratos, aminoácidos, cationes y ácidos grasos al interior de las células.
 2. Promueve síntesis de proteínas.
 3. Afecta la actividad de síntesis de glucógeno.
 4. Estimula la síntesis de ácidos grasos.
 5. Estimula la síntesis de mucopolisacáridos ácidos.

6. Afecta casi todos los tejidos.

IV ESTROGENOS

1. Promueve la aparición de las características sexuales secundarias.
2. Aumentan la síntesis de proteínas contractiles y otras proteínas en el útero.
3. Aumentan la síntesis de proteínas en el hígado.
4. Aumentan la síntesis de polisacáridos.
5. Afectan la velocidad de la glucólisis, respiración e incorporación de sustratos al interior de las células.
6. Probablemente afectan a casi todos los tejidos.

V ALDOSTERONA

1. Controla el paso de iones Na^+ y K^+ a través de las membranas permeables y el flujo de cationes a través de muchas membranas internas.

VI HORMONA ADRE
NOCORTICOTRO

1. Estimula la síntesis de glucocorticoides por la corteza suprarrenal.

PICA

2. Estimula la síntesis de proteínas y la incorporación de glucosa intracelular.
3. Inhibe la síntesis de proteínas en tejido adiposo.
4. Estimula la degradación de la grasa.

VII HORMONA DE
CRECIMIENTO

1. Estimula todos los procesos anabólicos.
2. Afecta el balance de nitrógeno, de agua, la

velocidad del crecimiento y todos los aspectos del metabolismo proteico.

3. Estimula la incorporación de aminoácidos y la síntesis de mucopolisacáridos ácidos.
4. Afecta el metabolismo de ácidos grasos.
5. Probablemente afecta todos los tejidos.

VIII TIROXINA

1. Afecta el metabolismo, crecimiento y el flujo de agua y de iones.
2. Promueve la síntesis de proteínas, es necesaria para la función muscular normal.
3. Afecta los niveles de carbohidratos, transporte y síntesis.
4. Probablemente afecta todos los tejidos.

3.2 INSULINA

La insulina es una hormona que procede del páncreas, en donde la función endócrina se encuentra localizada en los islotes de Langerhans, células epiteliales que se encuentran dispersadas a través del órgano. Las células del tejido insular dan origen a dos hormonas: la insulina por las células beta y el glucagón por las alfa; también se ha descrito una célula delta pero su función se desconoce.

La insulina está constituida por una estructura proteica. Sanger encontró que la insulina está compuesta por dos cadenas largas polipeptídicas (A y B) con una secuencia de aminoácidos específicos y unidas entre sí por dos puentes disulfuro en las posiciones 7 y 20 de la cadena A por posiciones 7 y 19 de la cadena B. La cadena A se reconoce porque empieza con glicina, tiene 21 aminoácidos y es una cadena ácida; en cambio, la cadena B tiene 30 aminoácidos, comienza por fenilalanina y es básica. También hay un puente disulfuro entre una sola cadena que une las posiciones 6 y 11 de la cadena A; las series de seis aminoácidos que constituyen el anillo que forma el puente disulfuro en la cadena A son de especial interés y se cree que probablemente sea uno de los sitios activos de la hormona (Fig. No. XIV). Hay que estimar que esta porción de la insulina es una de sus partes más expuestas al exterior y podría ser el sitio de unión a los músculos y otros tejidos. Sin embargo ninguna parte definida de la molécula de insulina se ha designado como el centro activo de la hormona.

Esta hormona proteica ha sido aislada y cristalizada. Su estructura con respecto a la de los animales varía muy poco y más bien este cambio se manifiesta en aumento de tamaño y diferencia entre los aminoácidos que constituyen las cadenas. No obstante la amplia variación en la estructura primaria de los aminoácidos, la actividad biológica es constante para todas las insulinas.

Se han propuesto varias estructuras secundarias para la molécula de insulina, sin embargo, en estudios recientes por medio de dispersión óptica rotatoria se ha demostrado que el 20% de la molécula es una hélice enrollada hacia la derecha, residiendo la mayor parte de la estructura helicoidal en la cadena B.

Aunque el peso molecular mínimo calculado de la insulina es de 5734, puede existir en diferentes formas poliméricas dependiendo de la temperatura, concentración y pH. La mayoría de las estimaciones que se han hecho sobre el peso de esta hormona van desde 12000 hasta 48000; el peso molecular también depende del contenido de zinc (Zn) de la molécula. En realidad el peso molecular de la insulina en condiciones fisiológicas normales es un dato incierto. No está establecido si puede existir en más de una forma polimérica ni tampoco cuales son sus sitios activos, o si es sólo uno.

MECANISMO DE ACCION DE LA INSULINA

A pesar de que se dispone de la insulina desde hace

algunos años en una forma relativamente pura, en realidad su sitio primario de acción, si es que efectivamente hay uno sólo se desconoce. La insulina puede actuar en una gran variedad de formas y por lo tanto es difícil establecer si un efecto determinado es de carácter primario o secundario.

La insulina muestra las siguientes actividades en sitios específicos: afecta el transporte a nivel de membranas; la síntesis de RNA nuclear, la síntesis de proteínas a nivel de la traducción en los ribosomas y tiene influencia sobre el nivel de AMPcíclico. La insulina es activa en los músculos cardiacos y esqueléticos, tejido adiposo e hígado y es comparativamente inactiva en tejido renal, eritrocitos y tubo digestivo.

3.3 REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS POR INSULINA.

El efecto de la insulina sobre la síntesis de proteínas se refleja en una estimulación a diferentes niveles de organización:

1. A nivel del núcleo: la transcripción.
2. A nivel de membrana: Transporte de aminoácidos al interior de las células.
3. A nivel del citoplasma:
 - a) La formación de aminoácidos.
 - b) Activación de los mismos por ATP para la formación de adenilatos.
 - c) Formación de complejos aminoacil-tRNA.

- d) Transferencia de los aminoacil-tRNA hacia los ribosomas para la formación de la unión peptídica.
- e) La liberación de la proteína completa de la partícula ribosomal hacia la porción soluble de la célula.

La insulina puede estimular tanto el transporte de aminoácidos al interior de las células como también independientemente por otro lado catalizar la incorporación de aminoácidos en la proteína. Ambas de estas acciones son independientes a su vez del efecto de la insulina sobre el transporte de glucosa, que es uno de los efectos que se consideran de mayor trascendencia para esta hormona. Sin embargo, los efectos sobre síntesis de proteínas, a pesar de no estar bien conocido su mecanismo de acción se considera también de una importancia considerable.

La fosforilación oxidativa, como una fuente de energía se sabe que es necesaria para la síntesis de proteínas. Se ha podido comprobar que en ausencia de insulina disminuye la fosforilación oxidativa y este efecto se ha podido comprobar en enfermos con diabetes.

La insulina acelera la incorporación de aminoácidos en las proteínas y por otra parte estimula la formación de mRNA y su incorporación en los ribosomas; la insulina también tiene influencia sobre la síntesis de tRNA y de rRNA y ejerce un efecto especial predominante sobre la formación de la cadena polipeptídica. Además influye en la liberación de la proteína, particularmente a partir de RNA en un proceso

que requiere ATP y probablemente un tipo especial de enzima activadora y liberadora. En base a estos datos parece que la insulina estimula la síntesis de proteínas, la biosíntesis de RNA y otros efectos metabólicos, lo que se ha comprobado por estudios recientemente realizados. Estos efectos parecen también ser independientes sobre el efecto de transporte de aminoácidos o glucosa al interior de las células.

La insulina influye sobre anabolismo proteico en tres sitios celulares principales: en mitocondria, en los ribosomas y en el núcleo; estos efectos intracelulares consisten, como se dijo anteriormente, en: estimulación de la fosforilación oxidativa, que ocurre en la mitocondria: unión peptídica, que ocurre en los ribosomas y síntesis de RNA, particularmente de mRNA, en el núcleo.

La deficiencia de insulina lleva a una disminución en la síntesis de proteínas y a un incremento en catabolismo proteico. Este defectuoso metabolismo proteico esta asociado con un crecimiento desbalanceado en animales jóvenes y con un balance negativo de nitrógeno.

Como se ha mencionado la mayoría de los estudios han sido hechos en hígado, músculo y tejido adiposo, porque además han sido identificados como los sitios activos para esta hormona. En este trabajo bibliográfico solo se harán mención los efectos observados en los dos primeros tejidos.

MUSCULO.

En este tejido se ha observado que la insulina cataliza

el transporte específico de aminoácidos independientemente de su transporte de glucosa (que es muy activo en este tejido), Manchester. Y además incrementa la síntesis de proteínas por una acción diferente de este transporte, Wool.

A pesar de que esta hormona incrementa la síntesis de RNA, esto no es necesario para la estimulación de la síntesis de proteínas, ya que la acción de la insulina sobre síntesis de proteínas se puede observar en 5 min. mientras que el recambio de mRNA es relativamente lento, y de cualquier forma la síntesis de proteínas se lleva a cabo no obstante se efectúe una inhibición casi completa de síntesis de mRNA por actinomicina (inhibe la transcripción).

Se ha observado que la insulina también tiene efecto en el templado o mRNA sobre los ribosomas; se piensa que posiblemente actúa favoreciendo la unión del mRNA al ribosoma para la formación del complejo de iniciación. Este efecto estimulativo hormonal ha sido demostrado en proporciones ribosomales de las que ha sido extraído el mRNA endógeno; observándose que los ribosomas en ausencia de mRNA son muy sensibles a estimulaciones hormonales con templados artificiales y que en estas condiciones la insulina aumenta en forma considerable la síntesis de proteínas.

Por otra parte existe bastante información que coincide en sugerir que el sitio de acción de esta hormona para estimular la síntesis de proteínas es predominantemente el ribosoma; se cree que la insulina probablemente produzca una

alteración en el ribosoma en tal forma que conduce a una modificación en la traducción del mRNA, posiblemente efectuando un cambio en la conformación del ribosoma lo que da como resultado una alteración favorable en la unión de ambos mRNA y aminoacil-tRNA (Iniciación).

También se han observado cambios en el potencial de membrana y se cree que éstos juegan un papel importante en muchas de las funciones de transporte de la membrana celular.

HIGADO.

El hígado juega un papel muy importante en la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas. La proporción en que se efectúa la síntesis de proteínas es mayor que en otros tejidos; en síntesis de glucógeno es menor que la del músculo y la síntesis de lípidos menor que en tejido adiposo. Todos estos mecanismos, así como la producción de energía en este tejido, están influenciados por la insulina en forma directa o indirecta.

Se ha observado que la insulina mientras incrementa los nuevos mRNA, simultáneamente prepara a los ribosomas para una rápida traducción de los mensajeros en unidades funcionales.

El efecto de la insulina sobre la síntesis del templado ó mRNA es bastante importante, sobretodo en la regulación de diferentes enzimas en el hígado y no se sabe hasta que punto la insulina actúa directamente sobre el hígado para efec-

tuar estos reajustes; algunos de ellos resultan de los niveles disminuidos del plasma de glucosa, aminoácidos y lípidos, efectuados por acciones periféricas o secundarias de insulina.

Por otra parte, se puede decir que la insulina directamente influye en la producción de templates para la síntesis de ciertas enzimas. Es posible además que algunas de las enzimas que son realmente afectadas modifiquen el metabolismo en el hígado de tal forma que pueden convertir otras alteraciones enzimáticas a su estado normal, a través de mecanismos de inducción, represión y alosterismo. Particularmente importantes son los marcados efectos que la insulina ejerce sobre el crecimiento de células en el hígado, así como su reorganización funcional.

En la diabetes no tratada hay una marcada disminución en la síntesis de proteínas; esto aparentemente resulta a partir de la habilidad limitada de los ribosomas de incorporar aminoácidos en la proteína.

En resumen se puede decir que la insulina puede actuar directa o indirectamente en la síntesis de proteínas por varios mecanismos y a diferentes niveles de organización.

a) A nivel de las células íntegras influye regulando cambios en la estructura, el crecimiento y la proliferación y en funciones como la generación y almacenamiento de energía, modulando su liberación y utilización.

b) A nivel de los organelos subcelulares tiene acción sobre las mitocondrias (regulando la producción de energía),

en los ribosomas (favoreciendo las uniones peptídicas) y en núcleo (posiblemente aumentando la síntesis de mRNA).

c) A nivel de las macromoléculas estimula diferentes reacciones bioquímicas entre las que encontramos: Transcripción (síntesis de mRNA); formación del enlace peptídico, fosforilación oxidativa, transporte intracelular, síntesis de glucógeno y catabolismo de glucosa.

3.4 HORMONA DE CRECIMIENTO.

La hormona de crecimiento es secretada por la adenohipófisis que constituye parte de la glándula pituitaria. La hipófisis humana es un órgano que se encuentra localizado en el cerebro, su peso promedio en el hombre es de 0.5 a 0.6 g; en la mujer es ligeramente mayor, de 0.6 a 0.7 g.

La hipofisectomía, o sea la extracción de la glándula pituitaria en animales jóvenes produce la detención del crecimiento y la falta de maduración de las glándulas sexuales; en el animal adulto, se atrofian glándulas y órganos sexuales, tiroides, paratiroides y la corteza suprarrenal; seguidos de una depresión en sus funciones. Además hay alteraciones en el metabolismo de las proteínas, de las grasas y de los carbohidratos.

Una característica importante de un animal hipofisectomizado o de los enfermos que sufren deficiencia hipofisaria es la sensibilidad anormal a la insulina y la resistencia al efecto glucogenolítico de la epinefrina. Se supone

que estas alteraciones se deben a la falta de las hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis.

El lóbulo anterior es el de mayor tamaño y la porción que se considera es la más importante de la hipófisis; en el hombre representa el 70% del peso total de la glándula.

La hormona de crecimiento, secretada por la hipófisis anterior, también se le conoce como Somatotropina (HS), fue aislada por primera vez por Li de hipófisis humanas y de monos. El peso molecular de la hormona de crecimiento humana es de 21000, conteniendo aproximadamente 188 aminoácidos y tiene una estructura simple formada por una cadena recta de aminoácidos como se puede ver en la figura No. XIII; la del mono tiene la misma estructura, mientras que la hormona de crecimiento del ganado o bovina tiene una estructura ramificada en forma de Y. La estructura completa de la hormona de crecimiento fue descrita por Li y sus cols. en 1966. Se supone que la actividad de la hormona radique en un fragmento de la molécula, es decir, en el sitio activo; el cual parece ser común para los diferentes tipos que existen de esta misma hormona, dependiendo de la especie animal de que se trate; sin embargo, tampoco se sabe hasta la fecha, cual es el fragmento activo esencial para la actividad hormonal.

3.5 ACCIONES BIOLÓGICAS

La hormona de crecimiento tiene diversos efectos sobre los diferentes tejidos del organismo, pero principalmente actúa sobre el músculo, hígado y tejido adiposo. En gene

ral se puede decir y afirmar que el efecto de esta hormona es lento y no se puede observar de inmediato sino hasta después de algunas horas y en ciertas ocasiones hasta días después de la administración parenteral y por lo tanto resulta difícil y tardado comprobar su efecto biológico. Este efecto lento, así como el efecto que también presenta esta hormona de estimulación de síntesis de RNA sostiene que una de las principales actividades importantes de esta hormona incluye la síntesis de proteínas. También se ha observado que otro mecanismo importante que presenta esta hormona es el actuar a nivel de la membrana para facilitar el transporte, particularmente de aminoácidos. Esta hormona tiene influencia sobre diferentes aspectos del metabolismo, sin embargo, solo se analizarán algunos de los efectos principales:

Se ha podido demostrar que la inyección diaria de hormona de crecimiento en animales hipofisectomizados provoca un crecimiento al cabo de pocos días y se ha demostrado que este cambio en composición corporal es principalmente debido a un incremento en proteína, acompañado por una disminución en grasa, sin embargo se ha observado que los efectos anabólicos de esta hormona son diferentes a los producidos por insulina; ya que también se ha observado que ocurre un crecimiento cuando la insulina es administrada a animales hipofisectomizados, por arriba de los límites de tolerancia. Se ha comprobado una gran diferencia de acción entre estas dos hormonas.

El papel de la hormona de crecimiento consiste en es

timular también la síntesis de proteínas y acelerar la entrada de aminoácidos a las células, lo que se ha podido comprobar mediante una disminución de los aminoácidos del plasma provocada por el efecto de transporte de los mismos. El proceso de penetración celular de aminoácidos fue detectado utilizando un aminoácido que no participa en el metabolismo, el ácido alfa isobutírico (AIB). Christiansen estableció que este aminoácido es transportado al interior de muchas células por el mismo mecanismo que utilizan otros aminoácidos y que la administración de hormona de crecimiento en animales hipofisectomizados estimula la acumulación de AIB en el músculo. En estudios hechos "in vitro" en células musculares aisladas de diafragma se ha observado una estimulación de la incorporación de AIB.

Un factor trascendental que se tiene que tomar en consideración es que el contenido intracelular de aminoácidos va a regular directamente la velocidad de síntesis de proteínas.

Korner y otros investigadores han tratado de explicar la estimulación de la síntesis de proteínas producida por la hormona de crecimiento, en términos de transporte de aminoácidos y metabolismo de ácidos nucleicos, ya que por otra parte se sabe que esta hormona cuando es administrada en animales hipofisectomizados estimula la síntesis de todos los tipos de RNA, en especial del mRNA que es el responsable de que la síntesis de proteínas se lleva a cabo, principalmente por el mensaje genético que posee para la síntesis de una proteína específica.

En busca del sitio activo se han examinado muchas etapas del metabolismo proteico después de la administración de la hormona, pero su acción primaria no se ha localizado. Mientras que estos efectos de la hormona de crecimiento sobre la maquinaria sintetizadora de proteínas se van clarificando con nuevas investigaciones; estas servirán a la vez para establecer con precisión un sitio específico de acción de esta hormona.

CAPITULO IV

REGULACION HORMONAL INDIRECTA.

4.1. ACUMULACION DE AMINOACIDOS EN EL PLASMA

Tanto la hormona de crecimiento como la insulina favorecen la acumulación de aminoácidos del plasma, para que posteriormente sean transportados y penetren al interior de las células, aumentando la cantidad intracelular de aminoácidos e interviniendo en esta forma en una estimulación indirecta de incorporación de aminoácidos en la proteína y por lo tanto en la estimulación de síntesis de proteínas, así como también se pueden utilizar para un mecanismo diferente encaminado a metabolismo de aminoácidos. Por otro lado con respecto a la estimulación de síntesis se esta favoreciendo todo el sistema y el contenido de aminoácidos esta aumentando y por lo mismo esta proporción va a regular la velocidad de síntesis, debido a que esta aumentando la poza de aminoácidos y esto favorece la rapidez con la que se sintetice la proteína.

Es por consiguiente de esperarse que primero se encuentre una elevación de aminoácidos en el plasma, favorecida por el transporte de los mismos y después se presente una disminución de aminoácidos debido a que se esta acelerando su entrada a la célula, para su posterior incorporación en la proteína.

ANTECEDENTES

Beaton en 1957 demostró que la administración de hor-

mona de crecimiento, modifica los niveles de aminoácidos plasmáticos y que esta variación depende de la duración del tratamiento.

Trabajando con animales en ayuno Li observó que un tratamiento agudo de hormona de crecimiento ocasionaba una disminución de los aminoácidos del plasma. Este estudio lo continuaron Milman y Russel, sin embargo, Russel especificó posteriormente que los animales en ayunas no están en crecimiento y por lo mismo no deben tomarse como base, no obstante se puede deducir que el requerimiento proteico era mayor y que se estimuló la síntesis de proteínas disminuyendo el nivel de aminoácidos del plasma. En otro experimento posterior Frame junto con Russel no obtuvieron ningún efecto al administrar la HC sola.

Scharff y Wool en 1964 hicieron mediciones del nitrógeno (N) amino total en diferentes tejidos bajo diferentes estímulos hormonales y encontraron que las hormonas pueden estimular la acumulación de determinados aminoácidos sin afectar la acumulación de los demás y por esto mismo el contenido total de N amino del tejido no se afectaba mucho bajo la influencia de la hormona, o por lo menos no era perceptible, ya que se compensaba la acumulación de unos con los que no se estimulaban, encontraron que el contenido de N amino en ratas era de un 20% en el músculo y un poco más en el diafragma.

Un estudio metabólico interesante fue hecho por Prader quien compara y describe los efectos que produce en enanos hipopituitarios y en niños normales la administración de pequeñas dosis de HC humana; hace un intento por correlacionar algunas de las respuestas anabólicas, sin embargo en este estudio menciona un incremento producido en nitrógeno alfa amino del suero en los niños control y un decremento en nitrógeno alfa amino libre en pacientes hipopituitarios. Snipes especifica la regulación que ejerce la HC sobre la acumulación de aminoácidos del plasma en células del músculo de humanos.

Trabajando con animales Sirek observó una aguda reducción en la concentración de aminoácidos libres en el plasma, en su experimento utilizó perros normales, hipofisectomizados, pancreatetectomizados o con doble operación, seguido de una inyección de HC, sin embargo para este experimento utilizó HC bovina, sugiere que esta reducción de concentración de aminoácidos libres del plasma puede deberse a dos motivos; uno que conduce al anabolismo proteico y otro a gluconeogénesis, ocasiona principalmente por serotonina.

Un dato curioso es que Mirsky en 1938, Frame en 1946 e Ingle en 1947 no observaron el mismo efecto de la insulina, con respecto al efecto observado de la HC sino por el contrario encontraron que decrecía la elevación de aminoácidos del plasma.

PUBLICACIONES RECIENTES.

Zachmann en 1969 hizo un estudio de aminoácidos individuales en enanos hipopituarios y observó que después del tratamiento con HC humana las concentraciones de los aminoácidos del plasma eran más altas, excepto valina, leucina, histidina y arginina. El principal incremento porcentual era para treonina, seguido por serina, glicina y tionina (mayor del 100%). Un incremento de 50-100 se observaba para taurino, ácido aspártico-glutámico/aspargina-glutamina, prolina, alanina e isoleucina. Además hizo la observación de que la concentración de aminoácidos en la orina no cambiaba consistentemente.

Felig en 1969 en comparaciones de sangre de sujetos obesos en ayuno, con respecto a no obesos, observó que se presentaban notables alteraciones en los niveles de aminoácidos del plasma, incrementos en leucina, fenilalanina, tirosina y valina y decrementos en glicina con elevación de los niveles de insulina y ácidos grasos del plasma. Felig propone una secuencia de interacciones entre insulina y aminoácidos en obesidad. Además observó que una resistencia a la insulina inducida por obesidad da como resultado una elevación de aminoácidos específicos.

También en determinaciones de aminoácidos individuales en el plasma Wool en 1968 especificó que los resultados obtenidos en plasma y en músculo del corazón de animales diabéticos eran

complicados y difíciles de interpretar: valina, taurino, alanina, cisteína, isoleucina, leucina y amoniaco (NH_3) aumentaban en suero y en músculo del corazón, mientras que treonina, serina, tirosina, triptofano, ornitina y lisina disminuían. Deduce que en presencia de insulina la velocidad de incorporación en las proteínas de muchos pero no todos los aminoácidos se incrementan suficientemente previniendo así su acumulación a una concentración mayor que la que ocurre en ausencia de insulina.

Camus sometió unas ratas a una dieta deficiente en proteínas, después ayuno por 24 horas y posteriormente por 3 días las alimentó con una dieta de caseína y D-L metionina observando que se presentaba una hipersecreción de insulina, es decir, elevaba el nivel de insulina y debido a esto especificó que se presentaba un aumento de aminoácidos esenciales en el plasma y al mismo tiempo otros decrecían. Entre los aminoácidos libres del plasma lisina, treonina y tirosina aumentaban rápidamente, mientras que serina, glicina e histidina disminuían.

En 1968 Hernández trabajó con caimanes a los que inyectó con insulina y comparó la concentración de aminoácidos libres del plasma y tejidos homogenizados con controles no inyectados; demostró que la insulina baja la concentración de aminoácidos esenciales en el músculo, hígado, corazón y cerebro; y de casi todos los aminoácidos en el plasma y en los riñones; en cambio, los aminoácidos no esenciales y glutamina, glicina y alanina no

se afectaron por la hormona o aumentaron ligeramente. Concluyó además que después de que los aminoácidos de las células y fluidos extracelulares eran convertidos en proteínas, aquéllos que quedaban en exceso eran usados en la síntesis de glutamina, glicina y alanina. Al año siguiente continuando sus estudios Hernández inyectó también caimanes con insulina y los comparó con otros a los que se les había inyectado cada uno de los 17 aminoácidos, observó que después de la administración de insulina resultaba una mayor acumulación de aminoácidos en las células de varios tejidos del cuerpo a expensas de fluidos extracelulares, es decir, primero había una acumulación de aminoácidos en el plasma y después una acumulación intracelular; principalmente los aminoácidos no esenciales eran los que mostraban un mayor incremento. Además observó que cuando los aminoácidos eran sintetizados dentro de la célula, la insulina inhibía su liberación a los fluidos extracelulares. El control del gradiente de aminoácidos entre los tejidos y fluidos extracelulares por medio de un control de permeabilidad de la membrana en ambas direcciones era el efecto más evidente de la insulina sobre el metabolismo de aminoácidos.

Manchester en 1970 presenta un estudio de los efectos generales que presenta la insulina sobre la acumulación de aminoácidos por el músculo, la naturaleza de la compartimentalización de pozas de aminoácidos, acumulación de insulina y aminoácidos, así como de la influencia de la insulina sobre la cinética de la acumulación de aminoácidos.

DISCUSION.

Del análisis de estas referencias se pueden deducir los efectos que ejercen ambas hormonas sobre la acumulación de aminoácidos en el plasma, sin embargo se observa que no todos los aminoácidos se ven afectados de igual manera sino que dependiendo de la hormona y de las condiciones empleadas en el experimento se van a incrementar determinados aminoácidos, mientras que otros decrecen, lo que también puede ser debido a las cargas propias de los aminoácidos o al tiempo en que se observa el fenómeno; ya que de hecho se sabe que se está estimulando la síntesis de proteínas y por lo tanto la utilización de aminoácidos y de esta forma disminuyen los aminoácidos del plasma. Un hecho evidente es que no todos los aminoácidos se incorporan en la proteína a la misma velocidad, lo cual podría deberse a que unos se acumulen y otros no. Otro factor que también tiene importancia es el tiempo de duración de la administración de la hormona, pues se puede observar una variación en los resultados obtenidos.

Se puede concluir que la insulina favorece la síntesis de aminoácidos y proteínas intracelularmente, al impedir que los aminoácidos salgan al espacio extracelular, por lo tanto debido a esto disminuye su concentración en el plasma, además se puede observar que esta hormona ejerce un control en el transporte o nivel de membrana modificando su personalidad. Es te hecho podría explicarse a través de un acarreador que se

modifique por la hormona, indicando así uno de los posibles sitios de acción de ésta, aunque es muy posible que existan otros sitios de acción.

Un aspecto interesante lo introdujo Manchester al hablar de compartimentalización de las pozas de aminoácidos, lo cual nos proporciona un concepto nuevo por estudiar, en el que se nos relaciona la estructura con la función y su localización.

4.2. TRANSPORTE DE AMINOACIDOS.

ACUMULACION DEL ACIDO ALFA-AMINOISOBUTIRICO (AIB).

Un proceso importante anterior a la incorporación de aminoácidos en la proteína es el movimiento de aminoácidos a través de las membranas celulares. Se ha observado que la hormona de crecimiento y la insulina incrementan este movimiento, ya sea el que está dirigido hacia su incorporación en las proteínas y en ese caso se mueven con preferencia hacia los ribosomas, o de otra forma un efecto hormonal de un movimiento neto a través de las membranas celulares y que es en realidad un transporte neto de aminoácidos, con otra finalidad diferente, ya sea para síntesis de nuevos aminoácidos, gluconeogénesis, etc.

Para estudiar el transporte de aminoácidos se utiliza el ácido alfa amino isobutírico (AIB) marcado radioactivamente con C^{14} , es un aminoácido que no es de origen natural ni es esencial para el organismo, no se metaboliza ni sufre cambios y por lo tanto puede ser estudiado sin que se transforme, es decir, sin que se convierta en otro compuesto y por lo tanto se puede seguir su trayectoria.

ANTECEDENTES.

Los antecedentes que se tienen sobre estudios hechos in vivo son los siguientes: Noall en 1957 determinó en músculo de

rata normal que la hormona de crecimiento incrementaba el radio de distribución de AIB-C¹⁴, Riggs y Walker en 1960 encontraron algo muy semejante también en músculo de rata, utilizando la misma hormona. Dawson en 1966 determinó una rápida estimulación de penetración y permeabilidad de aminoácidos en las células así como de síntesis de proteínas, provocado por la administración de hormona de crecimiento.

Christensen en 1958 trabajando con mamíferos establece el control que se ejerce sobre transferencia de aminoácidos. También trabajando específicamente con insulina, Eichnorn en 1961 observó que esta hormona incrementaba la incorporación de AIB-C¹⁴ en diafragmas de ratas adrenalectomizadas.

In vitro se tienen los siguientes antecedentes:

Kipnis presenta tres trabajos, los primeros dos en diafragmas de rata y el tercero en músculo. En 1957 hizo un estudio sobre permeabilidad del tejido y observó el efecto producido por la insulina para transferencia de aminoácidos. En 1958 junto con Noall trabajando con diafragma de rata especificó que la insulina añadida al medio estimulaba la incorporación de AIB-C¹⁴. Su tercer trabajo lo presenta en 1960 sobre el efecto de la HC en músculo de rata, demostró que un pretratamiento con esta hormona incrementa el transporte de AIB. Kostyo hizo sus primeros intentos experimentales en 1953 y 1954; pero no fue sino hasta 1959 cuando demostró que la HC

estimulaba el transporte de aminoácidos y en 1962 junto con Schmidth describe que el efecto observado in vitro de estimular el transporte de AIB en músculo de rata es específico para esta hormona (HC), comparado con los efectos de todas las demás hormonas pituitarias, ya que con las demás no se observa ningún efecto cuando son agregadas al medio de incubación. Además determinan que esta acción es rápida e irreversible.

Sobre estudios de combinación tanto in vivo como in vitro Hjalmarson en 1965 comprobó que si se tienen diafragmas de ratas maduras in vitro y se añade HC al medio de incubación se estimula la incorporación de AIB; pero si anteriormente al experimento se le inyecta al animal HC y posteriormente se prepara el medio de incubación con los diafragmas que han recibido la dosis de la hormona y están bajo sus efectos, se observa que una subsecuente adición de HC in vitro no produce ningún efecto, por lo que deduce que la primera adición hormonal in vivo bloquea por completo el efecto de la segunda adición in vitro y por lo tanto ya no se observa ninguna estimulación de incorporación de AIB para esta segunda adición. Un estudio semejante lo realizaron Snipes y Kostyo en 1962 con ratas jóvenes, obteniendo resultados un poco diferentes aunque similares en fundamento, era de esperarse cierta diversidad en los resultados por las diferencias que existen entre un organismo joven y un adulto.

PUBLICACIONES RECIENTES.

MUSCULO.

En 1967 Arvill investigando los efectos de contracciones musculares repetidas de ratas machos jóvenes, observó una estimulación de acumulación de AIB radioactivo, provocado por las contracciones y observó además que al agregar insulina, el efecto estimulante de esta hormona sobre acumulación de AIB-C¹⁴ en el músculo se reducía en presencia de las contracciones. En una investigación posterior que hizo Arvill en 1967 y continuando sus estudios anteriores presenta un trabajo en conjunto sobre el efecto de HC en músculo y en diafragmas de ratas hipofisectomizadas y normales. La HC in vitro, incrementaba el radio de distribución de C¹⁴ marcando al AIB en diafragmas que procedían de ratas hipofisectomizadas a un grado más alto que en músculos que procedían de ratas normales. En el músculo se obtuvo un efecto diferente sobre el radio de distribución de AIB. In vitro la HC no estimulaba los músculos de ratas hipofisectomizadas sino solo los de ratas normales. Además observó y comprobó un efecto que ya se había determinado de que la inyección in vivo de HC de ratas hipofisectomizadas (que no han sido estimuladas por esta hormona) hacen sensibles al diafragma a posteriores adiciones in vitro de la misma (Hjalmarson). Mas sin embargo, en músculo se presentaba un efecto adicional al ser añadida la HC in vitro.

DIAFRAGMA DE RATA.

Los principales trabajos sobre estimulación del transporte de AIB radioactivo fueron hechos por Hjalmarson, en 1968 hizo un estudio con HC bovina y señaló que su adición in vitro estimulaba la incorporación del AIB por dos o tres horas y que este efecto se prolongaba por cuatro o cinco horas mediante puromicina o actinomicina, mostrándonos aquí un nuevo aspecto sobre el efecto de los antibióticos, cuyo verdadero valor es impedir síntesis de proteínas, bloqueándola a nivel de traducción, (síntesis de mRNA), lo que provoca una acumulación de los aminoácidos que deberían ser utilizados para síntesis. Además observó que los diafragmas preexpuestos a la ^{14}C se volvían insensibles a la estimulación por subsiguientes adiciones de la misma hormona y que estos mismos antibióticos prevenían el desarrollo de la insensibilidad de la HC.

Trabajando con insulina también en 1968 Hjalmarson estudió los efectos comparados sobre la administración de esta hormona en ratas normales e hipofisectomizadas y encontró que los efectos in vitro de la insulina sobre la velocidad de acumulación intracelular de AIB- C^{14} estaban más pronunciados en ratas hipofisectomizadas que en ratas normales y que al administrar HC bovina al medio de incubación se observaba lo mismo. Con dexametasona decrecía la velocidad de acumulación de AIB, en presencia o ausencia de insulina.

En 1970 Ahren, Hjalmarson e Isaksson encontraron en diafragma de rata que la HC en concentraciones muy bajas no presenta efecto inhibitor sobre la acumulación del ácido alfa amino isobutírico sino que por el contrario presenta un efecto estimulante.

Payne en 1970 encontró que teofileno completamente suprime los efectos estimulantes in vitro que presenta la hormona de crecimiento sobre la incorporación de AIB y que en contraste ni el dibutiril-AMP cíclico (DMCAMP) ni epinefrina en las concentraciones probadas en el experimento tenían ningún efecto sobre la acción de la hormona de crecimiento sobre la acumulación de AIB.

CORAZON.

Hajlmarson en 1969 continúa sus estudios junto con sus colaboradores sobre los efectos de la HC y de la insulina sobre la incorporación de AIB posthipofisectomía, en particular para determinar un aspecto específico sobre el control hormonal en el corazón, ya que no esta bien conocido éste; pero principalmente desde el punto de vista de que el transporte transmembranal de aminoácidos es importante para sostener la síntesis de proteínas. Comparando la decrecida incorporación de AIB en corazones de ratas adultas normales con la de animales hipofisectomizados no se encontró ninguna

reducción clara en la incorporación de este compuesto. La adición de HC e insulina a los corazones de ratas hipofisectomizadas incrementaba la incorporación de AIB. Por otra parte se determinó que el efecto de la insulina se observaba también en corazones de ratas normales, mientras que eran insensibles a la hormona de crecimiento. Se hizo un estudio intensivo sobre las relaciones de tiempo y dosis para estos efectos hormonales.

Guidotti en 1969 en un estudio de suspensiones celulares de corazones de embriones de pollo observó la acumulación de AIB en diferentes estados de desarrollo del animal. Como era de esperarse la velocidad de acumulación de AIB por células cardiacas aisladas de corazones a diferentes estados de desarrollo embriológico decrecían con el envejecimiento, en adición a esto observó que la insulina estimulaba la acumulación intracelular de este aminoácido, obteniendo el mismo resultado que Hjalmarson. Este trabajo es útil en estudios de permeabilidad de membrana y acción de la insulina.

HIGADO.

Krawitt en 1970 demostró el transporte de AIB en células hepáticas in vitro y observó que se incrementaba por insulina, estudia su mecanismo y especifica que la insulina no aumenta el transporte en este sistema sino hasta después de que la actividad de la tirosina-aminotransferasa se ha enriquecido hasta su máximo nivel.

No obstante que los trabajos con AIB han enriquecido nuestros conocimientos acerca del transporte a través de la membrana celular es necesario indicar que este compuesto es incorporado y manipulado por las membranas celulares de una manera diferente a los aminoácidos naturales. Además hay que hacer notar que en los experimentos anteriores se refieren a una estimulación a nivel de la membrana celular, se comprende que esto no incluye incorporación de aminoácidos a proteínas, aunque ambos efectos se realicen dentro de la célula, por lo tanto se pueden diferenciar dos movimientos: uno en la membrana celular (transporte de membrana) y otro que tiene como fin la incorporación de los aminoácidos en las proteínas.

DISCUSION.

En el músculo existe una estimulación de acumulación provocada por la hormona que se bloquea por contracciones musculares, por lo tanto un estudio de este tipo se puede utilizar para la acumulación de AIB, ya que es otro método para medir un efecto determinado utilizando inhibidores del mismo.

Se incorpora más AIB por HC en diafragmas de ratas hipofisectomizadas que en músculo de ratas normales. In vitro la HC no estimula la incorporación de AIB en músculo de ratas hipofisectomizadas sino solo en normales, sin embargo esto último no es de confiarse ya que se ha observado que no ocurre de esta forma sino al contrario, para lo cual se podría pensar que no se reprodujeron las condiciones reales del problema que se investigó, aunque si podría tomarse como válido una menor incorporación de la hormona pero no una inhibición.

En músculo no se observa el mismo efecto al añadir HC in vivo y después in vitro, debido a que se presenta un efecto adicional. Lo que demuestra que en el músculo los efectos observados son diferentes y que en realidad en ellos no se puede observar bien este efecto de acumulación de AIB.

En diafragma el proceso de transporte de aminoácidos es dependiente de síntesis de proteínas y el resultado ob-

servado es una clara estimulación de la acumulación de aminoácidos.

Los resultados obtenidos en el corazón suponen que la insulina tiene efectos positivos sobre la acumulación de AIB y que la HC negativos. Sin embargo, es un sistema extremadamente especializado que no sirve como base para tratar de explicar estos fenómenos en otros tejidos.

En el hígado se observa estimulación, ya que también es un sitio en que predomina la síntesis de proteínas y el transporte de aminoácidos.

Sobre este efecto de acumulación de AIB se puede decir que los principales efectos se observaron en diafragma y en hígado.

TRANSPORTE DE AMINOACIDOS NATURALES.

El transporte de aminoácidos naturales se determina marcando con isótopos un precursor del aminoácido o bien inyectando al aminoácido ya marcado, para observar en donde se encuentra la marca y de esta forma poder determinar la trayectoria y por lo tanto el transporte del aminoácido, provocado bajo la influencia de un agente externo que en este caso son las hormonas. De preferencia se utiliza C^{14} , H^3 ó N^{15} .

ANTECEDENTES.

Manchester junto con Young en 1960, en un estudio in vitro en diafragma de rata, determinaron los efectos que producía la insulina principalmente en la acumulación de glicina- C^{14} en plasma. En cambio en 1960 Toyoda demostró que la insulina no afectaba la acumulación de valina- C^{14} y en 1961 Guroff tampoco obtuvo acumulación de tirosina- C^{14} bajo el efecto de insulina pero si observó que la hormona afectaba el transporte de este aminoácido. En estas investigaciones en que se detectaba la acumulación de compuestos radioactivos no se sabía realmente si la marca estaba dentro o fuera de la célula, pero sin embargo actualmente esto no es problema ya que se puede determinar por análisis de Microscopía Electrónica.

Es importante hacer notar un experimento realizado por Heinz en 1958 y Christensen en 1960, quienes explicaron desde otro punto de vista un efecto particular sobre la acumulación de aminoácidos marcados en células de tejidos, ya que su estudio y conclusiones consisten en proponer un intercambio de la marca de las partículas que están fuera de la célula con las de adentro, resultando así un transporte de la marca, que puede ser a través de un acarreador o una reacción química de transmutación y no un movimiento neto de aminoácidos marcados; lo que indicaría una estereoespecificidad del aminoácido del sitio en donde se encuentra la marca o el tratar de explicar la existencia de enzimas específicas envueltas en transporte que únicamente transfieren grupos que contienen la marca, de un aminoácido a otro.

En 1962 Akedo y Christensen determinaron una estimulación de la acumulación de L-prolina y L-metionina cuando la insulina se encontraba presente en el medio de incubación en células de diafragma de rata. Snipes y Kostyo también en 1962 utilizando el mismo sistema observaron que la HC estimulaba la acumulación de L-alanina y L-histidina, en este estudio se excluía la posibilidad de una difusión o intercambio de marca. Akedo en 1962 también determinó que la insulina no estimulaba la acumulación de L-histidina- C^{14} en diafragma de rata.

Snipes en 1963 y en 1967 amplió la investigación de Akedo para L-prolina- C^{14} principalmente en hipofisectomía, en 1966 Knobil demostró que la HC estimulaba la acumulación de alanina- C^{14} , histidina- C^{14} y prolina- C^{14} , no especifica bien las condiciones del experimento. Continuando los estudios acerca de la estimulación hormonal sobre acumulación de L-prolina en diafragma de ratas en 1964 y en 1966 Rieser publicó dos artículos en los que determina en adición al efecto de transporte un ataque de la insulina a uniones peptídicas.

Eichorn en 1961 hizo un estudio de transporte de L-histidina en músculo de ratas adrenalectomizadas bajo el efecto de la insulina. También en músculo de rata Adolfsen en 1967 determinó una estimulación por insulina de acumulación de L- H^3 -prolina. Y finalmente en 1966 determinó el mismo efecto, es decir, que L-prolina era estimulada por la insulina y en adición L-histidina por HC pero no viceversa, lo que demuestra una especificidad por los aminoácidos, lo que puede ser debido a su carga o a su estructura química.

Se sabe que en las membranas celulares existen diferentes sistemas de transporte que son específicos para diferentes grupos de aminoácidos. De acuerdo con esto Neame en 1966 observó que el transporte de ciertos aminoácidos específicos que pueden ser artificiales se efectúa por un camino diferente del transporte de otros aminoácidos, principalmente naturales.

PUBLICACIONES RECIENTES.

HIGADO.

En un medio de perfusión de hígado normal de rata Wolfgang en 1967 observó que la insulina y el glucagón producían cambios en la concentración intra y extracelular de aminoácidos individuales, sin embargo esto no es demostrable con las hormonas separadas, y además especificó que actuaban similarmente con determinados aminoácidos pero diferente con otros, observó que las concentraciones intra y extracelular de leucina, isoleucina y valina decrecían por insulina pero se incrementaban por glucagón, mientras que ambos disminuían la concentración de alanina e histidina. Por lo tanto se dedujo que los cambios en concentración de los aminoácidos individuales son probablemente debidos a su acción hormonal indirecta.

MUSCULO.

En estudios sobre incorporación de leucina-C¹⁴ in vitro en la proteína de músculos caudofemorales de rata, Goldstein en 1968 observó los mismos efectos de estimulación tanto in vivo como in vitro; discute el hecho de que la insulina aparentemente requiere una membrana celular íntegra para estimular la incorporación, por lo que deduce que esta estimulación está relacionada con la regulación del

transporte de aminoácidos a través de la membrana celular. Goldstein en 1970 especificó que el efecto estimulante de la insulina se pierde cuando se modifica el experimento para minimizar los efectos de transporte, cuando se hacen cambios en la radioactividad específica intracelular, cuando se incrementa la concentración de aminoácidos al doble o cuando el ion Na^+ es sacado del medio. Estos estudios demuestran que la insulina ejerce su efecto principalmente sobre transporte de aminoácidos. En otro experimento en el mismo año Goldstein especificó que la incorporación in vitro de leucina- C^{14} , en la proteína de rebanadas de hígado de rata, se incrementaba si la concentración de aminoácidos no marcados en el medio de incubación también se incrementaba. La gráfica de la incorporación se enriquecía cuando la concentración de aminoácidos era 6 veces la del plasma de la rata, y bajo la acción de hormona de crecimiento se estimulaba la incorporación del precursor en la proteína de hígado de ratas normales en un 31%. El mismo efecto se observaba en ratas hipofisectomizadas; sin embargo el tejido de ratas hipofisectomizadas previamente tratadas con hormona de crecimiento no respondía a la hormona de crecimiento in vitro. Tampoco encontró ningún efecto sobre la velocidad o extensión de incorporación de precursores radioactivos en las pozas de soluciones ácidas. Además concluyó que el mecanismo de acción de la hormona de crecimiento sobre la síntesis de proteínas in vitro es similar a sus mecanismos de acción in vivo.

Wool y Manchester en 1968 presentan cada uno por separado una revisión en la que discuten la importancia del transporte de aminoácidos observados bajo un efecto hormonal, principalmente discuten el papel de la insulina.

DIAFRAGMA DE RATA.

En 1968 Elsas sugiere que la estimulación del transporte de aminoácidos producida por insulina puede realizarse por dos caminos: o bien la insulina incrementa el transporte de aminoácidos indirectamente y lo dirige hacia metabolismo de aminoácidos o inicia la síntesis de una proteína determinada específica (enzima) que mejore o favorezca el transporte, refiriéndose en este caso a la existencia de acarreadores que se pueden sintetizar bajo la influencia de la hormona; este estudio fué hecho in vitro en músculo de diafragma de ratas normales. Hjalmarson en 1968 haciendo un trabajo in vitro sobre la adición de hormona de crecimiento bovina que provocaba una incorporación de AIB, sugiere que los procesos de transporte de aminoácidos en membrana son más dependientes sobre síntesis de proteínas que aquellos para transporte de azúcares. También Hjalmarson sugiere que a diferentes niveles de dosis aplicadas, la hormona de crecimiento puede actuar bifásicamente sobre el transporte de membrana de aminoácidos normales y sobre incorporación de aminoácidos en la proteína, haciendo la observación de que ambos efectos son independientes entre sí.

En 1968 Kostyo demostró que la adición de hormona de crecimiento bovina a diafragmas aislados de ratas hipofisectomizadas mejoraba el transporte de aminoácidos, junto con la incorporación de leucina marcada en la proteína. En cambio, fraccionando el diafragma por centrifugación no se encontraron los mismos efectos en las diferentes fracciones del diafragma, debido principalmente a las diferentes funciones que se realizan en las diferentes fracciones subcelulares. Observó que la puromicina y la cicloheximida disminuían marcadamente o abolían completamente el efecto de la hormona sobre el transporte de aminoácidos, y por lo mismo se comprueba que se tiene un efecto hormonal a nivel de traducción.

CORAZON.

Roginski en 1969 observó que el Cr III actúa como un cofactor en metabolismo de aminoácidos y tomando en consideración esto determinó una estimulación por insulina de transporte de aminoácidos (gly, met y ser) en proteínas del corazón a un mayor grado que en deficiencia del ion Cr III; parece ser que este mecanismo está asociado con fosforilación. El patrón general del transporte de aminoácidos (en la ausencia o presencia de insulina) en células cardíacas fue examinado por Guidotti, en 1969, quien subrayó que los efectos eran similares a aquellos encontrados en corazones intactos, por lo que sugirió que estas preparaciones biológicas podían ser útiles para estudios combinados de permeabilidad celular con acción de la insulina.

Hjalmarson en 1969 también enfocó sus investigaciones hacia el transporte de aminoácidos en el corazón, ya que se puede decir que es un factor importante para sostener la síntesis de proteínas; en este estudio observó el efecto que producían ambas hormonas sobre corazones de ratas normales e hipofisectomizadas y obtuvo lo siguiente: en corazones de ratas hipofisectomizadas tanto la insulina como la hormona de crecimiento estimulaban el transporte, mientras que en ratas normales solo la insulina estimulaba y eran insensibles a la hormona de crecimiento.

Hernández en 1969 determinó que el efecto más evidente de la insulina sobre el metabolismo de aminoácidos en varios tejidos es un control de gradientes de aminoácidos entre las células y líquidos extracelulares, a través de permeabilidad de la membrana en ambas direcciones.

Heindel en 1970 presenta un trabajo del efecto estimulativo de la hormona de crecimiento sobre el transporte de aminoácidos en ratas deficientes de vitamina B₆ y Wisniewski en 1971 también trata de explicar el fenómeno de transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares, pero bajo el estímulo de insulina.

DISCUSION.

Se puede observar que ambas hormonas, la hormona de crecimiento y la insulina estimulan el transporte de ciertos aminoácidos únicamente pero no de todos, lo cual puede ser debido a la carga propia del aminoácido y a problemas de afinidad, ya que incluso el transporte es específico para un determinado aminoácido para una sola hormona, pues como se pudo observar una hormona estimula el transporte y la otra no, como es en el caso de L-histidina para HC y de L-prolina para insulina.

Un estudio interesante fue el determinar si había transporte de marca o de aminoácidos, obteniéndose una comprobación casi absoluta de que era un transporte neto de aminoácidos, lo cual era más factible de entenderse y sobretodo en presencia de un acarreador específico. Mientras que lo otro sugeriría la existencia de un intercambio estereoespecífico realizado en la membrana.

Otra anotación que es importante señalar sobre la estimulación del transporte de aminoácidos, es determinar los sitios de acción sobre los cuales actúa la hormona; es decir, determinar si el efecto de la insulina es estimular el transporte de aminoácidos, en particular, estimular que éstos sean transportados; o si bien directamente la insulina esta sintetizando una enzima que es la que favorece el transporte. Y esta investigación se puede enfocar principalmente hacia estudios de permeabilidad de membrana, que puede ser un estudio

interesante que nos ayude a clarificar este problema.

Por otra parte se comprueba que el proceso de transporte de aminoácidos es más dependiente de síntesis de proteínas que de otra función y que el transporte y la incorporación de aminoácidos son actividades completamente independientes entre sí.

Una mayor estimulación de transporte de aminoácidos se observó principalmente en hígado y diafragma. En corazones de ratas normales se observó una insensibilidad a HC pero no a la insulina, sin embargo entre las funciones principales del corazón no está incluida la síntesis de proteínas y es por eso que no se obtengan resultados satisfactorios, mientras que si se encontrarán en aquellos lugares en los que predomine la síntesis de proteínas como función principal del tejido, como es en el caso del hígado o del músculo. Siendo además este el motivo principal del porqué se escogieron estos tejidos para observar en ellos la estimulación hormonal de la biosíntesis de proteínas, debido a que en ellos es en donde más se efectúa el proceso y en donde se sintetizan proteínas en mayor proporción.

4.3 INCORPORACION DE AMINOACIDOS EN LAS PROTEINAS.

La incorporación de aminoácidos es un proceso necesario para la síntesis de proteínas, sin embargo tanto el mecanismo de síntesis de proteínas como el de incorporación de aminoácidos no son absolutamente dependientes entre sí, debido a que la incorporación de aminoácidos puede tener diferentes objetivos, siendo sólo uno de ellos el sintetizar proteínas y al igual que el transporte de aminoácidos presenta la característica de ser una actividad independiente, que en algunas ocasiones pueden estar relacionadas y en otras no. Entre los diferentes caminos que pueden seguir los aminoácidos están la síntesis de hormonas, de histaminas, de péptidos pequeños, purinas y pirimidinas, metabolismo de aminoácidos, oxidación, etc.

Como se ha especificado tanto la hormona de crecimiento como la insulina son hormonas anabólicas que estimulan la síntesis de proteínas incrementando la incorporación de los aminoácidos en la proteína durante la traducción, pero de ninguna manera alteran la distribución de los aminoácidos que esté determinando el código genético, es decir, la secuencia de aminoácidos que deben seguirse para sintetizarse una proteína.

ANTECEDENTES.

Los primeros estudios que se hicieron sobre la estimu

lación de incorporación de aminoácidos fueron hechas por Friedberg y Greenberg en 1948 quienes trabajaron con hormona de crecimiento sobre proteínas de músculo de rata normal e hipofisectomizadas. Lee y Williams trabajando con el mismo tipo de experimento encontraron que añadiendo DL-cisteínas S^{35} se inhibía la incorporación de aminoácidos y que este efecto se podía corregir mediante el tratamiento con hormona de crecimiento, indicando que este efecto quizás esté relacionado con formación de puentes disulfuro, o de que sea el mismo sulfhidrilo el que ocasione la inhibición o bloqueo del efecto de estimulación. En 1959 Lee y Gaebler obtuvieron como resultado un incremento en la incorporación de glicina- N^{15} , alanina- N^{15} , ácido aspártico- N^{15} y ácido glutámico- N^{15} en las proteínas del músculo cuádriceps al estimular con HC. Acerca de la posición en que se encuentra localizada esta marca incorporada por la hormona, Florini en 1962 demostró que se encuentra en posiciones de nitrógeno amino terminal, al final de las estructuras macromoleculares que constituyen las proteínas.

Con respecto al diafragma de rata Kostyo en 1959 determinó in vitro la incorporación de leucina- C^{14} y Manchester en el mismo año de glicina- C^{14} , ambos encontraron que la hormona de crecimiento estimulaba la incorporación de los aminoácidos en la proteína del diafragma de rata. Reiss y Kipnis también encontraron lo mismo trabajando con

leucina-C¹⁴ y con valina-C¹⁴. Experimentos de incorporación de aminoácidos estimulados por la insulina fueron hechos por Sinex y Krahl en 1952, Manchester y Young en 1958 y Kostyo en 1959; posteriormente Kostyo y Manchester en 1959 ampliaron estos resultados para hormona de crecimiento bovina y de simio encontrando resultados similares, la hormona de crecimiento de simio estimulaba también la incorporación de fenilalanina-C¹⁴.

Wool y Krahl en 1959 describieron que la insulina estimulaba la incorporación de aminoácidos marcados con C¹⁴ en la proteína de disfragma de rata, siempre y cuando los aminoácidos hubieran penetrado en la célula antes de que comenzara la incubación. También Manchester en 1960 observó este efecto intracelular por la insulina. Brande y Knobil en 1960 generalizaron estos efectos de estimulación para las dos hormonas. En 1964 Wool y Krahl continuaron estos estudios sobre la insulina e hicieron algunas correcciones de los defectos anteriores; trabajaron con piruvato-C¹⁴ en un medio que contenía alanina y una menor concentración de aminoácidos no marcados.

PUBLICACIONES RECIENTES.

HIGADO.

Shigeru en 1966 observó que durante la hipofisectomía

el consumo o incorporación de leucina-C¹⁴ en la fracción proteica decrecía y que tal efecto era restaurado por la hormona de crecimiento, es decir, se normalizaba.

Trabajando con personas normales Saito observó una acelerada incorporación de leu-U-C¹⁴ en las proteínas del hígado, músculo, riñones y plasma después de la infusión de hormona de crecimiento. MacLeod en 1968 observó que ciertos tumores pituitarios ocasionaban el crecimiento de ratas y que esto se debía a que segregaban hormona de crecimiento. Además observó que la incorporación de leu-C¹⁴ en la proteína se incrementaba en presencia de estos tumores, por lo que dedujo que esta hormona tiene carácter anabólico.

Hirosaya en 1969 demostró que el decrecimiento en incorporación intracelular de leu-C¹⁴ y en síntesis de proteínas que producía la hipofisectomía podía ser compensado por la administración de hormona de crecimiento y que además iba acompañado por un incremento en el contenido de leucina. En 1970 Buck también observó esta estimulación de incorporación de leu-l-C¹⁴ en la proteína de hígado de rata producida por insulina, así como un incremento en biosíntesis de proteínas, efecto que era mínimo en dosis bajas. Pero en cambio no observó ninguna estimulación para un derivado de lisina (lis-4,4-H³-HCl). Lo que hizo fué preparar diferentes deri



QUIMICA

vados y observar la velocidad de incorporación del derivado del aminoácido, comparándolo con el resultado teórico esperado.

Buck en 1970 determinó que las inyecciones intraperitoneales de insulina en ratas parecían incrementar la velocidad de biosíntesis de proteínas nuclear en hígado de rata. Una sola inyección de insulina era suficiente para que en el lapso de una hora se incrementara o estimulara la incorporación de leu-C¹⁴ por arriba de un 50% comparado a los valores control. El máximo se observó después de 3-5 hrs y la velocidad original de biosíntesis de proteína nuclear fué obtenida después de 10 hrs. La actividad de la insulina se vió disminuída progresivamente al usar decrecidas concentraciones de insulina. Pero si la leucina era reemplazada por H³-lisina no se observaba ningún incremento de biosíntesis de proteína nuclear que pudiera ser atribuido a la insulina. En otro trabajo también en 1970 Buck determinó que la insulina bovina o el cortisol estimulan la incorporación de leucina-1-C¹⁴ en proteínas ácidas de cromatina de hígado de rata y que no tenía ningún efecto sobre la síntesis propia de histonas.

Clemens en 1970 observó en rebanadas de hígado de rata que la incorporación in vitro de leucina-C¹⁴ en la proteína se incrementaba si la concentración de aminoácidos no marca-

dos en el medio de incubación se aumentaba; la gráfica de incorporación se enriquecía cuando la concentración de aminoácidos era 6 veces la del plasma de rata. Además observó que cuando los aminoácidos estaban presentes en esta concentración en el medio, la adición de hormona de crecimiento estimulaba la incorporación del aminoácido y que esto se cumplía aún en dosis bajas de hormona de crecimiento (10 mg/ml). Concluyó que un suministro de aminoácidos abundante favorece la estimulación de la síntesis de proteínas por hormona de crecimiento en rebanadas de hígado de rata.

Liberti en 1972 por el contrario señala que el efecto estimulativo de la hormona de crecimiento no requiere la presencia de cantidades excesivas de aminoácidos no marcados. En su experimento determinó la incorporación de leucina- C^{14} en la proteína de rebanadas de hígado de ratas normales e hipofisectomizadas, que fueron incubados a diferentes tiempos en un medio de cultivo modificado. Observó que la velocidad de incorporación en rebanadas de animales hipofisectomizados fue aproximadamente 50% del de ratas normales. Y que en la presencia de $4 \mu g$ de HC/ml del medio, las rebanadas de ratas normales incorporaban 25% más de precursores marcados en la proteína que en la ausencia de la hormona. La adición in vitro de la hormona de crecimiento a rebanadas

de ratas hipofisectomizadas también incrementaban la síntesis de proteínas. La menor concentración de la hormona a la cual ya no se observaba ningún efecto era a $0.1 \mu\text{g/ml}$ medio. Estudios en los cuales las rebanadas eran separadas en fracciones subcelulares revelaban que la hormona de crecimiento incrementaba la actividad específica de la proteína citosol en un 48%. Concluyó que la adición in vitro de la hormona a rebanadas de ratas normales e hipofisectomizadas estimula la incorporación de precursores marcados en la proteína.

Schmith en 1968 en un estudio en hígado de rata sobre el efecto del ácido poliuridílico sobre la incorporación de fenilalanina en proteínas observó una estimulación de incorporación de mayor extensión en sistemas de células a partir del hígado de ratas normales que a partir de ratas hipofisectomizadas; y además que la administración de hormona de crecimiento a ratas hipofisectomizadas induce a una incrementada incorporación del aminoácido en la ausencia del ácido poliuridílico.

MUSCULO.

Goldstein en 1968 observó que en músculos caudofemorales de ratas, cortados en tiras longitudinales, presentaban una alta velocidad de incorporación in vitro de leu-C¹⁴ en la proteína del músculo bajo el efecto de insulina. En 1970 en otro estudio sobre insulina determinó una inducción

in vitro de incorporación de aminoácidos marcados en la proteína del músculo de ratas y la pérdida de este efecto mediante diversos factores. También en 1970 Goldstein en otro artículo y continuando el mismo estudio de estimulación por insulina de incorporación de aminoácidos marcados en la proteína del músculo de rata, in vitro, realiza un estudio en el cual varía las condiciones del medio de incubación. Obtuvo los siguientes resultados: el efecto estimulativo de insulina se pierde cuando Na^+ es extraído del medio, cuando la concentración de aminoácidos del medio se incrementa al doble del que se encuentra fisiológicamente, o cuando el diseño del experimento se modifica para minimizar los efectos de transporte al recambio sobre actividad específica intracelular. Concluyó que la incorporación de aminoácidos marcados en la proteína no debe compararse con la síntesis de proteínas sin la consideración de factores que afecten la radioactividad específica del precursor inmediato.

Hilder en 1971 presenta un artículo sobre el efecto de insulina sobre las pozas de aminoácidos libres y síntesis de proteínas en el músculo esquelético de ratas, en particular sobre la incorporación en la proteína de glicina y leucina y sobre pozas de tejidos en músculo. Estableció que la insulina decrecía el periodo de latencia antes del establecimiento de una linealidad en la velocidad de incorporación de gly radioactiva, y que la hormona incrementaba el tamaño de la poza de gly intracelular libre. Ninguno

de tales efectos se observó para leucina, en cambio la acumulación de glicina radioactiva en el compartimento del fluido intracelular se incrementaba, y por el contrario el contenido de leucina radioactiva en el compartimento intracelular decrecía. Además observó que la insulina decrecía la radioactividad específica de ambos gly y leu en el fluido extracelular, y que la hormona también decrecía el catabolismo proteico. El efecto sobre síntesis de proteínas no era ocasionado por un incremento en la radioactividad específica de la poza extracelular pero estaba posiblemente relacionada a una incrementada concentración de aminoácidos.

En 1967 Sanders y Riggs observaron que in vivo la incorporación de aminoácidos en la proteína del músculo de rata era estimulada directamente por la insulina, pero en el hígado estaba relacionada indirectamente con la posible respuesta de otras hormonas a la hipoglicemia. Tashima en 1968 estudió uno de los principales efectos de la insulina sobre la incorporación de glucosa y aminoácidos en glucógeno y proteína del músculo y encontró un posible mecanismo de regulación de concentración de glucosa independiente del nivel de insulina. Wool en 1968 deduce que en presencia de insulina la velocidad de incorporación de muchos aminoácidos en la proteína del músculo se incrementa suficientemente para

prevenir su acumulación a una mayor concentración que la que ocurre en la ausencia de insulina. Rieser en 1969 observó una inhibición por medio del bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobenzilo (HNB) de la incorporación de aminoácidos a proteína estimulada por insulina; además determinó que al bloquear esta incorporación se producía una acumulación de aminoácidos libres en el tejido.

Manchester en 1970 presenta un artículo de los aspectos generales de la estimulación por insulina de incorporación de aminoácidos y de la naturaleza de la compartimentalización de las pozas de aminoácidos, lo cual nos ayuda a entender las diferentes vías que pueden seguir los aminoácidos siendo una de ellas la síntesis de enzimas.

DIAFRAGMA DE RATA.

En 1967 Manchester hizo estudios sobre la incorporación de glicina-C¹⁴ en la proteína del diafragma de rata, utilizó diferentes antibióticos y observó la inhibición que presentaban, determinó que se inhibían por cicloheximida y no eran afectados por tetraciclina, eritromicina o cloramfenicol en la ausencia o presencia de insulina. Dedujo que las acciones primarias de la insulina sobre el músculo están en estricta dependencia con la proteína del diafragma y que éstas acciones tienen una rápida velocidad de recambio. En el mismo año Buse

observó que la insulina estimulaba la incorporación de glicina e histidina en proteínas del músculo o incrementaba el consumo de leucina, mientras que no promovía su oxidación a CO_2 . Utilizó también procesos de inhibición de insulina con palmitato, octanoato y β -hidroxibutirato. Arvill también en 1967 observó una incrementada velocidad de incorporación de glicina- H^3 en la proteína del músculo y en diafragma de ratas hipofisectomizadas tanto in vivo como in vitro, bajo el efecto de insulina.

En la adición de hormona de crecimiento bovina a hemidiafragmas de ratas hipofisectomizadas Hjalmarson en 1968 encontró que se incrementaba la acumulación de glicina- C^{14} en el citoplasma, mientras que se reducía leu- C^{14} y se incrementaban ambas incorporaciones en proteínas del músculo, lo que indicaba que leucina se incorpora más rápido que glicina bajo el efecto de esta hormona. Los aminoácidos se inyectaron a diferentes tiempos antes de la incubación y se observaron los resultados, tanto referentes a su incorporación como la relación de distribución de los aminoácidos intra a extracelularmente; a diferentes niveles de dosis la hormona de crecimiento puede actuar de dos formas: sobre transporte de aminoácidos y sobre incorporación de aminoácidos en la proteína, señalando que estos efectos son separados.

Schepper en 1967 trabajando sobre el efecto de estimulación

de incorporación de leucina en la proteína del diafragma de rata provocado por insulina utilizó la misma técnica que en investigaciones anteriores y también bajo el efecto de una inhibición, utilizando (para esto) sulfonilureas hipoglicemiantes (glicodiazina, carbutamida, cloropropamida, tolbutamida); observó que la inhibición no era el resultado de un transporte reducido de aminoácidos, sino que era una alteración del metabolismo de leucina, o una deteriorada respiración endógena de los tejidos, para lo cual los asocia con fosforilación oxidativa. Dedujo que la inhibición de la síntesis de proteínas está relacionada con un dañado metabolismo energético.

La adición de hormona de crecimiento bovina a diafragmas aislados de ratas hipofisectomizadas incrementó la incorporación de leucina marcada en la proteína total, Kostyo (1968) y determinó que esta inhibición podía ser bloqueada en presencia de cicloheximida o puromicina. Posteriormente sometió a centrifugación su tejido y observó que esta estimulación solo se presentaba en la fracción densa, lo que demostraba que el efecto de la hormona de crecimiento bovina era sobre síntesis de proteínas y comprendía sólo la formación de ciertas proteínas específicas. Por otra parte las proteínas marcadas estaban notablemente estimuladas en todas las fracciones del diafragma cuando se había expuesto mucho tiempo el tejido, sugiriendo que este efecto hormonal in vitro no representaba mejorías notables para la síntesis de proteínas

específicas.

Payne en 1970, junto con Kostyo hace un estudio sobre los efectos in vitro de dibutiril-AMP-cíclico, epinefrina y teofileno sobre la incorporación de aminoácidos y síntesis de proteínas por diafragma de rata; en particular estudiaron la habilidad de estas sustancias para alterar los efectos estimulativos in vitro de la hormona de crecimiento sobre la incorporación de aminoácidos a proteínas por diafragma de rata aislado. Comprueba que teofileno es el único que inhibe y discute que esta habilidad del teofileno de abolir los efectos de la hormona de crecimiento sobre la incorporación de aminoácidos está relacionada a una acción sobre una enzima.

Salmon en 1970 compara los efectos de la hormona de crecimiento, de la insulina y de una fracción de suero con actividad de factor de sulfatación, sobre la incorporación in vitro de leucina marcada con H^3 en una proteína insoluble en TCA, por músculo de diafragma y cartílago costal de ratas hipofisectomizadas. Los tejidos fueron incubados en un medio que contenía 14 aminoácidos y glucosa. El cartílago fue muy sensible a la hormona de crecimiento in vivo pero relativamente insensible a la insulina in vitro pero muy sensible al factor de la sulfatación. El músculo fue menos sensible que el cartílago a la hormona de crecimiento in vivo o que el factor

dé sulfatación in vitro. En todos los estudios de músculos combinados, el máximo efecto de la hormona de crecimiento in vivo y el máximo efecto de ambos, el factor e insulina in vitro cada uno excedía el máximo efecto de la hormona de crecimiento en alta concentración in vitro. Determinó que el factor de sulfatación del suero de ratas normales es suficiente para la estimulación de ambos músculos y cartílagos de ratas hipofisectomizadas in vitro y que estos efectos no se veían afectados por altas concentraciones de hormona de crecimiento y que solo la insulina en altas concentraciones producía un ligero efecto. Determinó además que cierto efecto de la hormona de crecimiento in vivo sobre la estimulación de la síntesis de proteínas en músculo y cartílago es mediado o regulado por este factor de sulfatación.

En otro aspecto Dawson en 1968 determinó que la incubación en tiempos cortos difiere de la efectuada en tiempos relativamente grandes, trabajó administrando hormona de crecimiento a ratas hipofisectomizadas y observó que a tiempos cortos se estimulaba la entrada de aminoácidos en la célula y su incorporación en la proteína, mientras que a tiempos largos no se observaba estimulación de entrada de aminoácidos, mientras que la síntesis de proteínas sí se estimulaba, dependiendo directamente de la síntesis de RNA, lo que demuestra que a tiempos largos ya no entran aminoácidos de proteínas.

Tata en 1968 presenta una revisión en la cual discute la incorporación de aminoácidos in vitro por ribosomas libres y unidos a membranas mediante la influencia de la hormona de crecimiento.

Riesser en 1969 observó que marcas específicas de residuos de triptofano, por medio de HNB inhibían la incorporación de aminoácidos en diafragma de ratas, previamente a una acumulación de los mismos producida por insulina y que precisamente una preincubación con insulina protegía estos efectos. Determinó que este estudio es útil pues los residuos de triptofano de un componente polipeptídico en la membrana celular pueden utilizarse en el reconocimiento de una hormona y principalmente por su interacción complementaria con la insulina lo que podría determinar los efectos de esta hormona sobre el músculo.

CORAZON.

En 1969 Roginski estudiando la hipótesis de que el Cr III actúa como cofactor para la insulina midió la interacción entre estos dos agentes sobre dos parámetros de metabolismo de aminoácidos y obtuvo el siguiente resultado: a ratas alimentadas con proteínas les dió Cr III y observó que la insulina in vivo producía una estimulación de tres aminoácidos (glicina, metionina y serina) en la proteína del corazón.

Rannels y Hjalmarson en 1970 trabajando con corazones de ratas diabéticas determinaron el efecto de estimulación de incorporación de fenilalanina mediante un tratamiento con hormona de crecimiento a diferentes períodos experimentales, indicando que la acción de esta hormona depende del período de incubación.

En una investigación sobre hormona de crecimiento Hirose en 1969 comprobó que el decremento en síntesis de proteínas e incorporación de leu-C¹⁴ que producía la hipofisectomía podía ser prevenido por administración de hormona de crecimiento y que además de prevenir se producía un incremento en el contenido de leucina, es decir, también estimulaba.

Guidotti en 1971 hizo un estudio en células del corazón de embriones de pollo y utilizó como medio de investigación el modo de acción de la insulina sobre el transporte de tres aminoácidos de ocurrencia natural: L-pro, L-ser y L-gly. Las velocidades iniciales de incorporación fueron medidas sobre un período de 5 min con un rango de 80 veces la concentración de los aminoácidos; se introdujeron correcciones para difusión de aminoácidos, incorporación en la proteína y conversión en CO₂. Los procesos de incorporación se aproximaban a la cinética de Michaelis Menten dentro de rangos definidos de concentración de aminoácidos. Se detectó un sis-

tema sencillo para transporte de prolina y un mínimo de dos sistemas de transporte de serina y glicina. Los efectos cinéticos de insulina sobre el transporte de sistemas para los aminoácidos probados estuvieron consistentes con una aceleración de la velocidad máxima de los procesos, sin cambios sustanciales en la concentración de los sustratos para una velocidad máxima media de transporte. Estos efectos hormonales no fueron alterados esencialmente por las correcciones para la incorporación de aminoácidos en la proteína y conversión en CO_2 .

Además del efecto de estimulación, la hormona de crecimiento también presenta efecto de degradación. En 1970 Wellers demostró que la velocidad del metabolismo para la incorporación de L-valina in vivo, era más lenta al administrarse hormona de crecimiento y propone que el efecto anabólico de la hormona de crecimiento aparentemente consiste en actuar directamente sobre la degradación de aminoácidos libres in situ antes de su incorporación o reincorporación en la proteína. Otro efecto catabólico fue considerado por Wellers en el mismo año, quien especificó en otro artículo diferente que la velocidad de degradación in vivo de DL-metionina exógena en ratas tratadas con somatotropina era menor que en las no tratadas y que esta acción directa de la hormona sobre el metabolismo de aminoácidos puede considerarse para el efecto anabólico de la hormona. En 1971

presenta otro artículo en el que también discute el mismo aspecto de sus investigaciones anteriores. Estudia la velocidad de degradación irreversible in vivo de treonina libre, valina y metionina que decrecieron en ratas a tiempos 2.7, 1.6 y 2.4 respectivamente, seguidos de un tratamiento con hormona del crecimiento (total 2 U.I./rata durante 17 hrs). Este decremento en catabolismo de aminoácidos se podía tomar como una explicación al efecto anabólico de la HC, debido a que la hormona probablemente actúa inhibiendo enzimas envueltas en el catabolismo de aminoácidos; pero sin embargo no significa que el decremento en catabolismo proteico necesariamente implique un aumento de anabolismo sino que es simplemente un efecto posible que puede o no estar relacionado con la síntesis.

C A P I T U L O V.

5.1 EFEECTO SOBRE EL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.

Los genes estan constituidos por el ácido desoxirribonucleico y por lo tanto un cambio mediado por un agente externo a este nivel es de gran trascendencia para la célula, ya que se pueden afectar notablemente sus funciones y modificar por lo tanto el sistema regulado por los genes.

HIGADO.

Camus en 1969 determinó la influencia de la insulina sobre la proteína total y precursores de DNA, en hígado de rata. Para este experimento utilizó ratas mal nutridas jóvenes, las cuales alimentó con caseína y DL-metionina, lo que dió por resultado que los niveles de insulina que estaban muy bajos se elevaran inmediatamente, es decir, se provocó una hipersecreción de insulina que inmediatamente provocó a su vez un incremento en incorporación de precursores en DNA y un aumento en síntesis de proteínas.

Para estudiar el efecto de varias hormonas sobre la síntesis de DNA, Esanu en 1970 realizó un estudio in vitro sobre la técnica de incorporación de timidina- H^3 en DNA de tejido humano. Estudió nueve hormonas, entre las cuales insulina, los glucocorticoides, cortisol y dexametasona ejercían los efectos estimulantes más fuertes en la síntesis de DNA, mientras que los efectos producidos por la hormona de crecimiento

triyodotrionina y glucagon eran débiles. Por último estradiol, testosterona y adrenalina inhibían la síntesis de DNA.

Moolten en 1970 estudia la respuesta acelerada de la sin tesis de DNA, en hígado de ratas hepatectomizadas parcialmente y pretratadas con hormona de crecimiento o en stress. El aumento en síntesis de DNA hepático en respuesta a la hepatectomía parcial se aceleró en ratas sometidas a otra operación 4, 8 hrs. ó 3 días antes de la hepatectomía; la hormona de crecimiento bovina también aceleró la respuesta a la hepatectomía. Un efecto importante que observó fue el que ni la cirugía ni la hormona de crecimiento estimularon la síntesis de DNA significativamente en los hígados de ratas no hepatectomizadas.

También estudiando el efecto de la hormona de crecimiento sobre la síntesis de DNA en el hígado Fast en 1970, determinó que la síntesis de DNA en hígado de ratas inmaduras se incrementaba previa administración de hormona de crecimiento, principalmente se incrementaban las actividades de las enzimas timidina quinasa y DNA polimerasa bajo este tratamiento.

Sireck en 1971, presenta un artículo en el que estudia los efectos producidos por la inanición después de una hepatectomía parcial en tejido de hígado de rata y bajo el efecto de insulina. Lo único que pudo comprobar fue que el hambre decrecía el contenido total de DNA con respecto a los controles normales y que insulina incrementaba el contenido de DNA.

Jackson en 1968 estudió el efecto directo de la hormona de crecimiento sobre el metabolismo de ácidos nucleicos y sobre el metabolismo proteico en el hígado de rata y en di-

versos tejidos. Cheek en 1969 investigó los cambios en DNA, RNA y proteína y del contenido de agua en el hígado, músculo y cerebro de ratas hipofisectomizadas, principalmente bajo los efectos de hormona de crecimiento, insulina u hormona de crecimiento con epinefrina. Después de la reducción de ácidos nucleicos y proteína ocasionados por la hipofisectomía la administración de insulina causaba la hipertrofia de células del hígado e incrementaba su contenido proteico, pero no afectaba el músculo ni el cerebro, además había un incremento definido en el contenido de RNA del músculo y del cerebro y de las relaciones RNA/DNA, y proteína/DNA del hígado. Por otra parte las inyecciones con hormona de crecimiento causaban aumento en DNA, RNA y contenido proteico del hígado, cerebro y músculo; también había una reducción en la relación núcleo/citoplasma; y por otra parte también determinó que la epinefrina inhibía los efectos de la hormona de crecimiento. Como conclusión, señaló que la insulina esta relacionada con la hormona de crecimiento en lo referente al tamaño celular, mientras que la hormona de crecimiento sola con el número celular. En el mismo año Cheek en otro trabajo de investigación observó que las inyecciones de insulina u hormona de crecimiento bovina a ratas hipofisectomizadas incrementaban el peso del hígado, en contenido proteico y de RNA, pero el DNA se incrementaba sólo por inyecciones de hormona de crecimiento. También determinó que las inyecciones de hormona de crecimiento y epinefrina inhibían el aumento de proteína y reducían los incrementos en DNA.

Rozgoni en 1970 comprueba los efectos de la hormona de crecimiento sobre la incorporación de P^{32} en ácidos nucleicos de tejidos de animales. Señaló que esta hormona inyectada intraperitonealmente en ratas a 1 mg/150g de peso, diariamente por 5 días incrementaba la incorporación de P^{32} en RNA y DNA de hígado y otros tejidos. La incorporación de P^{32} en mitocondrias de hígado y RNA nuclear de hígado, principalmente RNA, fue también mayor que en los animales no tratados con la hormona.

Oravec y Korner presentan un trabajo en 1971, en el que determinan el efecto de la hormona de crecimiento sobre la síntesis de DNA y RNA ribosomal. Usaron una columna cromatográfica de metil-albúmina para separar rápidamente RNA marcado a partir del núcleo de células del hígado de ratas a las cuales se les había dado ácido orótico- H^3 . La fracción de RNA Q era sensible a $20 \mu g$ de actinomicina D/100 g de peso y 0.5 mg de cicloheximida/100g de peso, tenían una alta composición de guanina más citosina y estaban metilados. Las fracciones de RNA Q_2 y TD (fracciones específicas del rRNA), eran de baja composición de G + C que la fracción Q; su marca no era inhibida por actinomicina o cicloheximida y eran heterodispersos y de alto peso molecular. El tratamiento con hormona de crecimiento aparentemente estimulaba la síntesis de mRNA y especialmente incrementaba al DNA para síntesis de RNA.

MUSCULO.

Dellwy en 1967 revisa los efectos de la insulina y de otras hormonas, así como también los efectos de un gran número de antibióticos en la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas; sin embargo no reporta nuevos descubrimientos.

Para determinar si la hormona de crecimiento podía alterar el contenido de DNA en el músculo de ratas jóvenes hipofisectomizadas, Beach en 1968, presentó un trabajo en el que demostró que el aumento en DNA del músculo que ocurre durante el curso normal del crecimiento depende de la hormona de crecimiento pituitaria.

D I S C U S I O N.

Tanto la hormona de crecimiento como la insulina estimulan la incorporación de precursores (bases púricas y pirimídicas) para la síntesis de DNA en hígado y músculo; incluso se presupone que la insulina sea indispensable para la síntesis de DNA (tejido adiposo) y que el aumento en DNA que se presenta durante el crecimiento normal se debe principalmente al efecto de la hormona de crecimiento (músculo).

Korner señala que un aspecto importante es que el efecto hormonal se observa primero sobre síntesis de mRNA y no sobre síntesis de DNA. Los efectos observados son sobre la transcripción y la traducción.

En otro tipo de investigaciones se determinó que la insulina junto con la hormona de crecimiento intervienen en el tamaño celular, mientras que la hormona de crecimiento sólo en el número celular. En lo referente a la proliferación celular se puede señalar que éstas células son específicamente vulnerables a agentes externos que modulan su desarrollo, como son las hormonas, y que la secreción ocurre posterior a la proliferación.

Se ha observado que los efectos estimulativos hormonales se pueden bloquear con antibióticos y que dependiendo del sitio de acción específico para cada antibiótico se puede determinar el sitio, también específico, sobre el cual actúa la hormona y de esta forma se puede determinar si actúa a nivel del gene, a nivel de transcripción o traducción en la biosíntesis de proteínas.

5.2 EFFECTO HORMONAL SOBRE LA SINTESIS DEL ACIDO RIBONUCLEICO.

Para estudiar la síntesis de DNA y RNA se utiliza como técnica marcar con radioisótopos los precursores de los ácidos nucleicos, utilizándose el mismo procedimiento para ambos casos de síntesis. La forma más evidente de comprobarlo es el conteo del ácido nucleico marcado al final del experimento y en este caso particular para determinar el efecto específico de regulación que presentan tanto la hormona de crecimiento como la insulina, es de gran utilidad.

ANTECEDENTES.

Talwar en 1962 determina una estimulación por hormona de crecimiento de la actividad del P^{32} para incorporarse en RNA de células del hígado de rata, así como también un incremento en contenido total de RNA debido a la hormona. En 1964 trabajando también en hígado de rata observó una estimulación específica de la hormona de crecimiento bovina u ovina sobre la incorporación de ácido orótico- P^{32} en RNA; primero en RNA nuclear (mRNA) y posteriormente en RNA ribosomal (rRNA). Korner en 1964 demostró que la hormona de crecimiento bovina estimula la incorporación del ácido orótico- H^3 en todos los tipos existentes de RNA de células del hígado de ratas normales e hipofisectomizadas.

Sin embargo Kostyo en 1966 no observó ningún efecto de la hormona de crecimiento agregada al medio de incubación sobre incorporación de uridina en diafragmas de ratas hipo-

fisectomizadas, por lo que la reversibilidad de la falta de síntesis de RNA en animales sin hipófisis bajo efectos de la hormona de crecimiento queda confusa.

En 1963 Wool trabajando en un experimento con diafragmas de ratas comprobó que la presencia de insulina estimulaba la incorporación de adenina u ortofosfato en todas las fracciones celulares de diferentes gradientes de densidad.

PUBLICACIONES RECIENTES.

HIGADO.

Partiendo de la velocidad de incorporación del ácido ortótico- C^{14} y P^{32} marcando fosfatos en mRNA, Tata en 1967 dedujo que la membrana asociada con mRNA metabólicamente es más estable que asociada a rRNA, observó que durante el crecimiento del hígado en regeneración o cuando se inducía por la hormona de crecimiento y la hormona tiroidea en ratas hipofisectomizadas y tiroidectomizadas, la velocidad de incorporación de la marca a una membrana asociada con mRNA se estimuló antes que aquella asociada a rRNA. El papel de la membrana asociada con mRNA en la regulación de la síntesis de proteínas es un parámetro desconocido importante y quizás determinante en el estudio de este efecto hormonal sobre la síntesis de proteínas.

Herlich en 1967 observó que la hormona de crecimiento administrada en dosis bajas estimula la actividad del mRNA nuclear del hígado de ratas normales e hipofisectomizadas; agregó que los ribosomas del hígado de ratas hipofisectomizadas eran incapaces de utilizar el mRNA o templado agregado al medio, a pesar de

que las preparaciones de mRNA tenían una muy buena actividad como molde en ribosomas de ratas normales. Observó que la hormona de crecimiento podía afectar la síntesis de mRNA así como también tenía efecto sobre los ribosomas principalmente estimulándolos para favorecer la síntesis de proteínas.

En personas normales Saito hizo una investigación en 1967 con hormona de crecimiento y determinó que producía una activación de RNA polimerasa y una estimulación de síntesis de RNA nuclear. Aparte determinó que la hormona de crecimiento incrementaba la biosíntesis de proteínas de células del hígado de ratas pretratadas con actinomicina D pero no aquellas pretratadas con puromicina; por otra parte la hormona estimulaba también la síntesis de proteínas ribosomales, por una actividad independiente de la síntesis de RNA nuclear.

Akamatsu en 1971 en un trabajo sobre el efecto de la hormona de crecimiento sobre la actividad de la RNA polimerasa determinó lo siguiente: los hígados de rata en regeneración mostraban un incremento marcado en las actividades de RNA polimerasa nuclear, nucleolar y de cromatina, después de 6 hrs. de una hepatectomía parcial. También observó que la actividad de la desoxitimidina quinasa empezaba a incrementarse de 20 a 24 hrs. después de la hepatectomía parcial. De cualquier forma después de la hipofisectomía o hepatectomía parcial estas actividades no mostraban correspondientes incrementos. El tratamiento de ratas hipofisectomizadas con hormona de crecimiento antes de la hepatectomía parcial resultaba en incrementos en la actividad de RNA polimerasa y desoxitimidina quinasa. La hormona de crecimiento parecía

estar envuelta en la regeneración de este tejido (hígado).

Para determinar los efectos de las hormonas sobre las especies de RNA sintetizadas Jackson en 1968 estableció un método de distribución de contracorriente para la separación de RNA de hígado de rata y con esto se determinaron los perfiles de distribución tanto para DNA como para RNA. Para evitar y eliminar diferencias en preparaciones de RNA debidas a procedimientos de aislamiento y fraccionamiento, los RNA de los animales tratados con hormonas y los control se marcaron con los isótopos H^3 y C^{14} y no se observó ningún cambio en las especies de RNA sintetizadas después de la administración de HC, tiroxina e hidrocortisona al ser analizadas por distribución de contracorriente.

Salganick también en 1968 presenta varios aspectos sobre inducción por insulina que provoca un incremento en mRNA, rRNA y tRNA; así como una alta densidad del nucleolo y un alto número de membranas en el retículo endoplásmico rugoso ocasionados por la hormona, proponiéndola como agente inductor externo y determinan la importancia de la inducción genética en una regulación hormonal.

Para poder evaluar la naturaleza del RNA sintetizado durante la acción hormonal uno de los métodos utilizados consiste en medir el grado de hibridización con DNA homólogo; basado en esta técnica Wyatt en 1968 trabajó con RNA nuclear de hígado de rata y observó diversidad en las especies de las moléculas marcadas de RNA; con respecto a la relación DNA/RNA dedujo una curva de hibridización. La no hibridización de RNA se creía que representaba principalmente rRNA y espe-

cies precursoras de los ribosomas. Como conclusión determinó una síntesis predilecta para RNA ribosomal en respuesta a la hormona de crecimiento.

Salganick en 1968 observó que una inyección de insulina después de un tratamiento prolongado con hidrocortisona restaura la síntesis de RNA en células del hígado de rata que habían perdido la habilidad de inducir esta síntesis por el tratamiento previo con hidrocortisona.

Como se indicó en párrafos anteriores un sistema para determinar la síntesis de RNA es por medio de precursores marcados con radioisótopos. Brossard en 1969 estudiando los efectos de la hormona de crecimiento y la hidrocortisona sobre la síntesis de RNA de hígado de rata, determinó que la hormona de crecimiento estimulaba la incorporación del ácido orótico- C^{14} en el RNA 45S prerribosomal nucleolar y que no tenía efecto sobre RNA nuclear polidisperso de origen extranucleolar. Clemens en el mismo año y también con hormona de crecimiento observó que a una máxima concentración de aminoácidos en hígado de rata, la adición de hormona de crecimiento a baja concentración estimulaba la incorporación del precursor en RNA, pero sólo a una concentración máxima de aminoácidos. Posteriormente en 1970 marcó el RNA por medio del ácido orótico- H^3 y determinó también que cuando los aminoácidos estaban ausentes del medio o presentes a concentraciones normales del plasma, no se observaba ningún efecto estimulante al añadir la hormona de crecimiento. Sin embargo cuando los aminoácidos estaban presentes en el medio 6 veces las concentraciones normales del plasma se observaba que la adición de hormona de crecimien

to estimulaba la incorporación de un precursor apropiado en un 22%, en RNA de rebanadas de hígado de ratas normales e hipofisectomizadas. Señaló que el tejido de ratas hipofisectomizadas previamente tratadas con hormona de crecimiento no respondía a la adición de hormona de crecimiento *in vitro*. No encontró ningún efecto sobre la velocidad o extensión de incorporación de precursores radioactivos en las pozas de soluciones ácidas. La cicloheximida abolía completamente el incremento inducido por la hormona de crecimiento. Como conclusión determinó que el efecto de estimulación de la incorporación de la marca en RNA observado en presencia de la hormona de crecimiento puede ser una consecuencia secundaria del efecto hormonal sobre síntesis de proteínas, y que el mecanismo de acción de la hormona de crecimiento *in vitro* es similar a su mecanismo de acción *in vivo*.

Liew en 1969 observó que la unión del aminoacil-tRNA a ribosomas de hígado de rata se incrementaban en la presencia del ácido poliuridílico y que el tratamiento de ratas hipofisectomizadas con hormona de crecimiento de buey antes de sacrificar al animal resultaba en un incremento en la unión del aminoacil-tRNA a ribosomas y que además se notaban iguales diferencias en uniones de tRNA fenilalanílicos a ribosomas. Allen en el mismo año trabajó en hígado de ratas sobre este significado de regulación del aminoacil-tRNA y encontró resultados similares.

Talwar en 1969 señala que las hormonas promotoras del crecimiento estimulan en las primeras o últimas etapas la bio síntesis de RNA y proteínas en tejidos sobre los cuales actúan,

pero su modo de acción es diferente. Determinó que la hormona de crecimiento afecta principalmente la velocidad de síntesis de RNA en hígado de ratas adultas.

Jackson en 1970 estudia los cambios en tRNA de hígado de rata seguidos a una administración de hormona de crecimiento y en regeneración del hígado. Los tRNA aislados a partir de hígados de ratas hipofisectomizadas solos y tratados con hormona de crecimiento por 5 días (1mg/día) fueron cargados con aminoácidos marcados con C^{14} o H^3 y fueron fraccionados por cromatografía en columna de fase reversa. Las aminoacil-tRNA sintetasas fueron preparadas a partir de hígado de rata normal. Leucina, valina, lisina, arginina y ácidos aspártico fueron separados en especies múltiples de isoaceptores-tRNAs sobre columnas de fase reversa; no se observaron ningunas diferencias significativas en perfiles de elusión de leucil-, valil-, lisil- y arginil-tRNAs seguidos a la administración de hormona de crecimiento. Se encontraron además dos especies adicionales de aspartil-tRNA en el hígado de animales tratados con hormona de crecimiento los cuales no estaban presentes en ratas hipofisectomizadas control; esta diferencia residía en el tRNA y no era debida a contaminaciones del aminoácido, como fue comprobado cambiando el aminoácido marcado con C^{14} y H^3 y obtuvieron resultados similares. Los cambios en aspartil-tRNAs similares a aquellos observados después de la administración de hormona de crecimiento en animales hipofisectomizados se encontraron en hígado en regeneración. Esto lo interpretó Jackson como una indicación de que los cambios en aspartil-tRNA eran debidos a iniciación de la regeneración

hepática más que a la administración de hormona de crecimiento per se.

Germanyuk en 1970 estudió la formación del aminoacil-tRNA en hígados de conejos con diabetes a los cuales se les administraba insulina y RNA de levadura (10mg/Kg diariamente por dos semanas). Los conejos con diabetes mostraron un mayor peso ganado, mayor peso del hígado y mayores niveles de aminoacil-tRNA en el hígado que los conejos con diabetes a los cuales se les había dado insulina sola. Conejos sanos inyectados con insulina (1 unidad/Kg) mostraban un incremento en aminoacil-tRNA del hígado, pero la acción de la insulina in vitro en un sistema celular libre conteniendo tRNA y aa-tRNA sintetasa no presentaba efecto sobre la síntesis de aminoacil-tRNA.

MUSCULO.

Krahl en 1966 especificó que la insulina actúa principalmente sobre músculo, tejido adiposo e hígado y que tiene ambos efectos retardado y rápido sobre la síntesis de proteínas. Los efectos rápidos pueden bloquearse por actinomicina D y por lo tanto incluyen la formación de mRNA. Los efectos retardados que constituyen principalmente transporte de aminoácidos y estimulación de transporte de glucosa no son bloqueados por puromicina y actinomicina D y por lo tanto indican que son dependientes de síntesis de proteínas o mRNA. En estos tejidos los efectos no incluyen únicamente incremento de glucosa o transporte de aminoácidos sino que afectan otros factores no involucrados, en síntesis de proteínas. Señaló que los efectos rápidos de insulina sobre síntesis de protef-

nas en el músculo no son debidos a una alterada velocidad de formación de mRNA y que podría ser que la estimulación de síntesis de proteínas se llevara a cabo aún cuando estuviera completamente bloqueada la síntesis de mRNA, este efecto lo pudo comprobar en microsomas de animales deficientes en esta hormona (insulina) y observó que no podía ser restaurada normalmente su actividad de síntesis de proteínas por adición de mRNA.

El mecanismo de síntesis de proteínas y de síntesis de RNA fue estudiado en el músculo esquelético por Florini en 1967 encontrando que era similar al de los otros tejidos, determinó además que las hormonas anabólicas testosterona y HC incrementaban la producción y actividad de los ribosomas. Florini en su experimento añadía sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, al medio para incrementar la estimulación de la actividad de RNA polimerasa especificando que la sal actúa removiendo un represor y posteriormente incrementa la actividad del DNA, que es más efectivo para sintetizar RNA, además observó que el efecto de esta sal enmascara al de la testosterona pero no al de la HC. Con esto comprobó que la HC actúa incrementando la actividad de la enzima RNA polimerasa que es específica para síntesis de RNA y posiblemente aumenta el contenido de la misma enzima. Por otra parte este autor hace la observación de que ninguna hormona muestra algún efecto in vitro y que los efectos in vivo se pueden considerar secundarios.

En estudios en músculo esquelético sobre incorporación de precursores en ácido ribonucleico Arvill en 1967 encontró que el efecto estimulante de la insulina sobre incorporación

de adenina en RNA había sido reducido por las contracciones musculares.

Roy en 1971 estudió los efectos de la insulina sobre el proceso de incorporación de la marca al RNA en cultivos de fibroblastos. El medio nutriente de una serie de cultivos inoculados simultáneamente con fibroblastos de ratón se reemplazaron por un medio conteniendo uridina-2-C¹⁴ y 5000 unidades de insulina a partir de 4 pancreas normales y dos diabéticos. Después de un período de incubación de 12 hrs. la monocapa celular fue subdividida por métodos convencionales y se estudió el gradiente específico de la fracción del ácido ribonucleico. Una diferencia consistente se observó entre la actividad específica del RNA de las monocapas celulares tratadas con insulina de pancreas de animal diabético y normal, a favor de éstas últimas. Este dato constituye un argumento más que apoya la síntesis anormal de RNA en diabetes mellitus.

DIAFRAGMA DE RATA.

En una investigación en la que estudiaba la incorporación a RNA de precursores marcados, Manchester en 1970, observó que la producción de RNA del músculo del diafragma se incrementaba en un 50% del contenido total del tejido por adición de lauril sulfato de sodio al 1% y determinó que la insulina estimulaba la incorporación del ácido orótico-C¹⁴ y uracilo en RNA pero no observaba ninguna estimulación de incorporación de adenina-C¹⁴.

Dawson en 1968 presentó un trabajo sobre la estimulación de síntesis de RNA como efecto de la HC, variando el tiem

po de incubación y obtuvo los siguientes resultados: en diafragmas de ratas hipofisectomizadas a tiempos cortos de incubación ocurrían estimulaciones hormonales que permitían la entrada de aminoácidos en la célula y su incorporación en la proteína, lo cual no se afectaba por la inhibición de síntesis de RNA provocada por la administración de actinomicina D. Mientras que a tiempos largos no se observaba estimulación de ingreso de aminoácidos, pero en cambio si se observaba una estimulación de la síntesis de proteínas dependiendo esta última de la síntesis de RNA, observando que si en este sistema se bloqueaba la síntesis de RNA se presentaba el efecto de estimulación del transporte intracelular de aminoácidos.

CORAZON.

La diabetes provoca en el músculo del corazón de rata un decremento en la cantidad y concentración de RNA (disminuye la velocidad de síntesis de RNA ribosomal), así como también una disminución en la relación RNA/DNA con respecto a los controles normales. Wool en 1968 repitió este estudio y determinó además que la inyección de insulina a las ratas una hora antes de que se hicieran las últimas determinaciones no afectaba los ácidos nucleicos de los músculos cardiacos o proteínas, es decir, se contrarrestaba el efecto de la diabetes y no se afectaban las proporciones relativas de tRNA o rRNA.

Otra manera de observar un efecto sobre la síntesis de proteínas es marcar el RNA de transferencia con un aminoácido radioactivo y observar lo que sucede al aminoacil-tRNA formado bajo el efecto que se quiere especificar. Davey en 1969 estudiando métodos para medir la actividad de los aminoácidos

marcados contenidos en aminoacil-tRNA del músculo después de la incubación de diafragmas o de la perfusión del corazón, también con aminoácidos marcados observó que la marca de leucil o tirosil-tRNAs se elevaba en la presencia de insulina, que se podría deber a un aumento en la actividad de las enzimas.

D I S C U S I O N .

Al hablar de una membrana asociada al mRNA del hígado que posee gran actividad y estabilidad, y que podría ser de retículo endoplásmico, nos hace suponer que el transporte activo tiene una importancia considerable y que es quizás por medio de esta membrana y bajo el efecto hormonal que se esten generando factores o agentes que favorezcan o estimulen la síntesis (o inhiban a represores).

En hígado se puede observar un incremento producido por la hormona de crecimiento en síntesis de RNA nuclear, proteínas ribosomales y rRNA principalmente. Así como también una estimulación de la incorporación de precursores en RNA, pero sólo a una concentración máxima de aminoácidos, indicándose que el efecto de acumulación de aminoácidos es complementario para la regulación de la biosíntesis de proteínas.

En estudios con insulina en hígado se observaba: 1.- Una estimulación de los tres tipos de RNA, 2.- Incremento del tamaño del nucleolo celular, que nos podría indicar una mayor actividad en el mismo (síntesis de RNA), es decir, un efecto de la hormona a nivel del ácido nucleico, 3.- Un incremento en número de membranas en retículo endoplásmico rugoso y en ribosomas, que nos presenta una vez más el papel complementario de las membranas en la síntesis de proteínas. Como resultado de estos efectos se propone a la hormona como un agente externo inductor.

También con ambas hormonas se observó una estimulación en incorporación del aminoacil-tRNA al ribosoma para la for-

mación del complejo ribosomal de iniciación indispensable en la síntesis, que puede sugerir un efecto sobre alguna enzima específica. Por otra parte también se confirmó que la insulina no tiene efecto sobre el proceso de activación de los aminoácidos, es decir, en la formación del aminoacil-tRNA en ningún tejido.

Tanto en hígado como en músculo se observa un efecto provocado por la hormona de crecimiento o por la insulina que se puede clasificar como efecto retardado o dilatado sobre estimulación de la actividad de la RNA polimerasa para la síntesis de mRNA específicamente; pero además se observaron otros efectos rápidos sobre transporte de aminoácidos y su incorporación en la proteína, lo cual puede afectar diversos factores, demostrándose que estos efectos son independientes de la velocidad de formación del mRNA e incluso al bloquearse la síntesis de mRNA con actinomicina D el efecto observado de insulina es una estimulación de transporte intracelular de aminoácidos.

En diafragmas de rata también se pueden observar los mismos efectos y se puede comprobar que una inhibición de la síntesis de mRNA en nada afecta los efectos rápidos provocados por estas hormonas y por el contrario lo estimulan.

Por otra parte se determinó que las contracciones musculares tienen efectos negativos sobre la actividad hormonal en este sistema, es decir, presentándose contracciones musculares no se puede realizar un estudio sobre el efecto hormonal.

5.3 EFEECTO OBSERVADO EN LOS RIBOSOMAS.

ANTECEDENTES.

Korner en 1964 y 1965 en dos trabajos que presenta y Staehelin en 1965 encontraron que la hormona de crecimiento estimulaba la habilidad de los ribosomas de incorporar aminoácidos y que en cambio no tenía efecto sobre mRNA. Por otra parte Rampersaad en 1965, y Stirewalt y Wool en 1966 coinciden en hacer un estudio de síntesis de proteínas por ribosomas del músculo del corazón bajo la influencia de la insulina. El primer trabajo fue hecho en animales diabéticos y el segundo para determinar el efecto independiente sobre estimulación de transporte de aminoácidos y estimulación de síntesis de proteínas, pero ambos autores obtuvieron el mismo resultado ya que observaron el mismo efecto estimulante de la insulina sobre la actividad de los ribosomas, es decir, se facilitaba o estimulaba la formación de complejos ribosomales para la traducción. Florini en 1966 hizo experimentos para determinar el efecto de la HC porcina sobre las actividades de los ribosomas, demostró que esta hormona incrementaba el contenido de polisomas en los músculos y que su actividad también aumentaba.

Como se puede observar por medio de los datos obtenidos de los antecedentes tanto la hormona de crecimiento como la insulina incrementan la actividad de los ribosomas.

PUBLICACIONES RECIENTES.

MUSCULO.

Midiendo el número de ribosomas activos Wool en 1967, usando puromicina peptídica observó una estricta dependencia entre el decremento ocasionado por diabetes sobre la habilidad de los ribosomas de catalizar la síntesis de proteínas y el decremento en el número de partículas activas; además observó que la insulina restauraba la síntesis de proteínas a su nivel normal y por lo mismo el número de ribosomas activos. Por otra parte partiendo del por ciento de ribosomas activos y de los moles de aminoácidos incorporados en la proteína calculó el número de uniones peptídicas formadas por ribosomas activos y sugiere la hipótesis de que la insulina estimula la síntesis de proteínas formando solo proteínas específicas (factor traducción) de tal forma que inicia la traducción del mRNA estable sobre los ribosomas. En 1967 continuando con la misma investigación presenta una hipótesis para explicar la acción de la insulina sobre la síntesis de proteínas en el músculo: la principal acción de la insulina es inducir la formación del factor de traducción, iniciando la traducción de su mRNA estable. Determinó que los factores de traducción asociados con los ribosomas alteran sus propiedades físicas, para que sean capaces de unirse a los mRNA y formar polisomas; en el proceso los ribosomas son activados y se vuelven competentes para sintetizar proteínas. En 1968 revisa los efectos metabólicos de la insulina sobre el músculo y considera la decrecida habilidad de los ribosomas de animales diabéticos

para sintetizar proteínas (ya que no poseen esta hormona).

Acerca de la distribución de los ribosomas Young en 1968 demostró la influencia que ejercían la insulina, la hidrocortisona y una dieta adecuada, sobre proteínas del músculo esquelético de ratas; este estudio fue hecho por análisis de sedimentación en gradiente lineal de sacarosa. La inyección de insulina incrementaba la producción y contenido de polirribosomas y decrecía la proporción de ribosomas agregados más ligeros; encontró que los efectos de sedimentación de ribosomas estaban en relación directa con los efectos netos de síntesis de proteínas del músculo, es decir, a mayor concentración de ribosomas se observaba mayor síntesis de proteínas.

Tata en 1968 observa que la regulación y el desarrollo de la síntesis de proteínas producidos por hormona de crecimiento se basa en los ribosomas y que la síntesis de proteínas regulada por hormonas específicas se facilita por una segregación de polirribosomas unidos a membrana citoplásmica, las cuales están en paralelo con ribosomas libres. Estos trabajos nos indican que la estimulación hormonal sobre la actividad de los ribosomas facilita la síntesis de proteínas aunque no necesariamente implica síntesis de proteínas. En otro trabajo en el mismo año y continuando su investigación Tata presenta una revisión en la cual señala la secuencia de la síntesis de RNA y proteínas, la distribución de los ribosomas, así como también la incorporación de aminoácidos en ribosomas libre y unidos a membranas.

Schwartz en 1968 demostró que la actividad in vitro de incorporación de fenilalanina- C^{14} de ribosomas aislados a par-

tir de células de fibroblastos de embriones de pollo incubados con insulina, con suero o sin suero, era mayor en cultivos celulares con suero. Este dato concuerda con el papel indirecto de la insulina en el mantenimiento de la función ribosomal.

Kostyo en 1971 determinó que el efecto estimulante in vitro de la hormona de crecimiento bovina sobre la síntesis de proteínas en diafragma de rata no era debido a un incremento en el número de ribosomas involucrados en síntesis de proteínas sino más bien, en una mínima parte, a una habilidad mejorada de los ribosomas para promover la formación de la unión peptídica. La preincubación de diafragmas aislados de ratas hipofisectomizadas con hormona de crecimiento por una hora a 37⁰ incrementaba la velocidad a la cual los péptidos nascentes eran marcados al incubar subsecuentemente con puromicina-H³. Como conclusión determinó que la hormona puede incrementar la actividad ribosomal principalmente teniendo efecto sobre la enzima que transfiere péptidos, que es la peptidil transferasa o sea el proceso de translocación.

HIGADO.

Korner en 1969 investigó la habilidad de los ribosomas de incorporar aminoácidos, péptidos y mRNA, a partir de ratas normales, hipofisectomizadas y tratadas con hormona de crecimiento, en la ausencia de la iniciación de la cadena peptídica. Utilizó sulfato de pactamicina dextrano por su habilidad de inhibir específicamente el proceso de iniciación de síntesis de proteínas en un sistema celular libre en el hígado;

se comprobó que inhibe la estimulación de incorporación por poli U por fenilalanina cuando son añadidos a los ribosomas antes que el polímero, no inhibían la incorporación en la ausencia de poli U si se añadían después de que la incubación había comenzado y por esto concluyó que específicamente inhibían la iniciación de la cadena. En este estudio Korner determinó que algunas de las incorporaciones observadas en el sistema celular del hígado resultan a partir de factores de iniciación, pero que esto ocurre solo en los primeros momentos de incubación. La hormona de crecimiento actúa para incrementar la relación entre ribosomas activos e inactivos (a favor de los primeros). En 1971 Mac Donald y Korner señalaron que la inyección de 100 μ g de hormona de crecimiento en ratas estimulaba la síntesis de proteínas *in vitro* por ribosomas unidos a la membrana hepática, pero no afectaba tal síntesis para ribosomas libres.

Schmith también en 1969 hace la aclaración de que a partir de cantidades iguales de rRNA, los ribosomas de ratas hipofisectomizadas incorporan menos fenilalanina que aquellos a partir de ratas normales y que la administración de hormona de crecimiento favorece el incremento en incorporación de fenilalanina.

Pilkis y Korner en 1971 investigaron los ribosomas de hígado de rata en un sistema celular libre. La población total de ribosomas fue inhibida en su actividad de incorporación, como resultado de la diabetes. La fracción de polisomas libres y unidos mostraban grandes diferencias de los ribosomas totales como un resultado de la diabetes mientras que se observó

una muy marcada inhibición en activación de polisomas libres, después de la diabetes. Estas diferencias estuvieron presentes a todos los niveles de Mg^{2+} provados, sin embargo, tendieron a desaparecer en altos niveles de Mg^{2+} , o también si estaban presentes altas concentraciones de cloruro de amonio, NH_4Cl , durante la preparación de los ribosomas a partir de ratas diabéticas. Estos cambios en actividad iban acompañados por alteraciones marcadas en el perfil del polisoma. La diabetes resultaba en la presencia de menos polisomas y más ribosomas diméricos. Además observó que los efectos de la diabetes y de la insulina sobre la actividad de los ribosomas persiste en la presencia de aurintricarboxilato y que los cambios ocurridos en la diabetes podrían restaurarse al cabo de 4 hrs. de tratamiento con insulina. También observó que los ribosomas de hígado de rata diabética eran más activos que los normales cuando eran tratados con poli U, especialmente a niveles de Mg^{2+} por encima de la concentración óptima para que se efectúe la reacción de poli U (10mM). Los ribosomas de ratas diabéticas son más susceptibles a disociación en subunidades por altas concentraciones de sales y temperaturas elevadas que los ribosomas normales.

D I S C U S I O N .

En hígado y músculo se observa una estimulación a nivel de la traducción sobre la actividad de los ribosomas, principalmente en iniciación; y una relación entre la concentración de ribosomas y polisomas y la estimulación de síntesis de proteínas, ya que si hay un mayor número de polisomas es de suponerse que se aumente la síntesis de proteínas, debido a que es la función primordial que se realiza en ellos y en caso de que no ocurriera la síntesis, se encontrarían subunidades ribosomales en vez de ribosomas o polisomas, es decir, estos últimos estarían disociados.

También en hígado se determinó una relación entre la estimulación hormonal y factores de iniciación de la cadena peptídica, es decir, sobre los ribosomas y por lo mismo a nivel de traducción.

Algunos autores nos hablan de una relación evidente entre las membranas nucleares y los ribosomas, que nos proporciona una mayor cercanía entre los genes, el mensaje genético, su transporte a los ribosomas pegados a la membrana, todo esto facilita el transporte del mensaje al sitio de traducción y la síntesis misma. Datos de diferentes autores nos hacen suponer que los ribosomas que se encuentran unidos a membrana nuclear y a retículo endoplásmico son los responsables de la síntesis de proteínas para otros tejidos; mientras que los polisomas libres sintetizan proteínas para la misma célula. Este aspecto dependiente de ribosomas libre o unidos a membranas esta actualmente en estudio y tiene puntos bastante inte-

resantes.

Como resultado de sus investigaciones Kostyo sugiere que el efecto de la hormona no se debe a un incremento de ribosomas sino más bien a una estimulación de la habilidad de los ribosomas para favorecer la formación de la unión peptídica, por lo tanto propone que este efecto es sobre la enzima peptidil transferasa en la translocación. Esto es más factible de creerse debido a que este proceso es más rápido que el afectar la síntesis de la enzima a un nivel genético y de esta forma los efectos hormonales observados son más rápidos, que los que serían en caso de afectar la síntesis de la misma enzima.

Actualmente se han hecho bastantes trabajos para dilucidar el sitio activo, se piensa que el efecto hormonal reside sobre una enzima envuelta en este proceso de síntesis de proteínas y en especial se cree que sea en un paso de la traducción (sobre los ribosomas). El sistema más nuevo que se ha usado es el libre de células, ya que permite separar únicamente los ribosomas de un homogenado de tejido y en este estado se utilizan inhibidores y diferentes técnicas para aclarar los efectos hormonales.

5.4 EFEECTO SOBRE EL MECANISMO INTERNO DE SINTESIS.

Los resultados de un experimento efectuado por Borth y col. en 1968, apoyan la hipótesis de que algunas adaptaciones metabólicas en hipoglicemia inducida por insulina regulan la producción misma de insulina, sugieren que este efecto de la insulina depende de la estimulación a síntesis de proteínas pero no a síntesis de RNA, que depende estrictamente de DNA. Manchester en 1968, discute y compara los efectos de varias hormonas, entre ellas la hormona de crecimiento y la insulina sobre síntesis de proteínas. En 1970 Buresova presenta una revisión de los principales factores hormonales que regulan la biosíntesis de proteínas. También Millen en 1970 discute los efectos de la hormona de crecimiento y de la insulina sobre síntesis de proteínas. En el mismo año John evealúo in vitro la influencia de la insulina, de la hormona de crecimiento, del cortisol y de una mezcla de aminoácidos nutritivos sobre la síntesis neta de proteínas del plasma de hígado de rata y observó que la máxima síntesis se presentaba al perfundir con soluciones que tienen un balance de nitrógeno positivo.

D I S C U S I O N .

Algunos autores proponen que el efecto hormonal es sobre los ácidos nucleicos, sin embargo otros determinan que este efecto se observa sobre el último paso, es decir, en la síntesis real de la proteína, en la reacción bioquímica que comprende esta síntesis, en la traducción o en particular en la translocación de péptidos o sobre la actividad de una enzima involucrada en este paso; pero de cualquier forma existen pruebas para ambos casos y por lo mismo no se puede aceptar ninguno como falso o absolutamente incompatible, ya que también se debe tomar en cuenta que están ambos procesos en estricta dependencia y que además, de acuerdo con las circunstancias externas y con el tejido de que se trate se puede afectar en ocasiones un sitio y en otras otro dependiendo de las necesidades del sistema. Por lo tanto se puede concluir que estos procesos son complementarios entre sí, pues ambos producen el mismo efecto final en la estimulación de síntesis de proteínas.

pecificó que decrecía la difusión de insulina añadida posteriormente al interior de la membrana, indicando una probable acción para transferir a nivel del receptor.

Schwartz estableció que es posible que exista una hormona receptora que sirva para discriminar y generar señales y transmitir las a sistemas múltiples de efectores en varios sitios internos de las células y por lo tanto tiene influencia sobre la membrana, los sistemas intracelulares enzimáticos, genes, ribosomas y otras áreas.

En pruebas referentes a la insulina Dormandy especificó que el sitio de interacción hormonal en la célula es la interfase extracelular entre un sistema hidrofóbico e hidrofílico, y que el principal efecto de la insulina incluye un cambio en el gradiente de potencial de membrana entre cationes o protones de dos fases. Además determinó que existen datos suficientes para formular un concepto molecular detallado de la interacción hormonal en la membrana, designado para mantener un relativo gradiente de potencial entre los dos compartimentos.

Talwar en 1969 propone como sitio de acción hormonal las estructuras membranosas, con respecto a la hormona de crecimiento. Freychet sugiere también la existencia de receptores hormonales en el hígado y señala que la insulina se pega a la membrana para realizar su efecto. Korner en 1969 presenta una revisión de los mecanismos metabólicos del control hormonal de síntesis de proteínas, basado en la hipótesis de que la insulina presenta efecto estimulativo a nivel intracelular.

Oravec y Korner en 1971 determinan un efecto de la hor-

mona de crecimiento principalmente sobre la transcripción, observaron que la hormona aparentemente estimulaba primero la síntesis de mRNA y que todos los demás efectos observados eran secundarios.

Korner en 1969 señala que se desconoce que la insulina o la hormona de crecimiento estimulen la biosíntesis de proteínas, alterando la velocidad de síntesis o de degradación de mRNA o de los ribosomas y determina que ambas hormonas mejoran la actividad de ribosomas aislados in vitro. Además observó que persiste una mínima actividad en los ribosomas aún cuando la iniciación de la síntesis de la cadena peptídica se haya inhibido. En otro artículo en 1970 propone que la sin tesis de ribosomas podría ser un sifio en donde las hormonas actuaran para mejorar la síntesis de proteínas. Además sugiere que la hormona interfiere con la acción del represor de tal forma que impide que haya una mutación en el mensaje, resultando en una mayor síntesis de la enzima y por eso se dice que la hormona conserva el mensaje.

Hilder en 1971 al hablar del efecto de estimulación de la insulina sobre incorporación de aminoácidos determina que el efecto sobre síntesis de proteínas no era ocasionado por un incremento en la radioactividad específica de la poza extracelular de aminoácidos, pero estaba posiblemente relacionada a una incrementada concentración de aminoácidos en esta poza, que podría en cambio haber afectado la agregación de ribosomas.

Kurehara en 1968 experimentando in vivo e in vitro en músculo de diafragma de ratas con diabetes determinó la incor-

C A P I T U L O VI.

MECANISMOS DE ACCION HORMONAL.

Cabe hacer la aclaración de que a las teorías que se enuncian en este capítulo corresponden también las expuestas en capítulos anteriores sobre los mecanismos de acción observados para cada uno de los procesos importantes que incluyen esta biosíntesis y para los cuales se presentó una discusión pertinente en cada caso. Al final del capítulo en las conclusiones se presenta un resumen sobre los mecanismos de acción más importantes y de mayor relevancia tanto para la hormona de crecimiento como para la insulina.

Nobuo en 1966, determinó que recientes puntos de vista sobre los mecanismos de acción de las hormonas en la síntesis de proteínas sugerían la posible existencia de estructuras o agentes receptores a nivel del gene y a nivel del citoplasma; él propone que estas estructuras sean también hormonas sin embargo en la actualidad se sabe un poco más acerca de estos agentes receptores, se sabe que son estructuras proteicas que bajo el efecto de la hormona cambian su conformación y sirven como transmisoras del mensaje hormonal.

Salganick en 1968 en un trabajo sobre inducción de la síntesis de RNA por insulina en hígado de rata propone a la hormona como un agente externo y señala la importancia de esta inducción genética. Sobre otro aspecto diferente en experimentos de preincubación con proinsulina Mascia en 1970 es-

poración de leu-C¹⁴ en las proteínas, bajo el efecto de insulina y observó un aumento en síntesis. Especificó que el efecto principal de la insulina **era acelerar** la traducción del mensaje genético, aumentando la síntesis de proteínas sarcoplásmica y ribosomal. Castles en 1970 presenta una revisión de los efectos de insulina sobre la síntesis de proteínas en el músculo normal y diabético y señala el papel de esta hormona en la regulación de la traducción del mRNA, la unión de la proteína a los ribosomas y la utilización de la enzima aminoacil transferasa.

Rannels, Wolpert y Morgan en 1970, señalaron que la insulina y el palmitato son factores externos que facilitan la iniciación de la cadena peptídica en músculo del corazón, mediante una estabilización y equilibrio de subunidades ribosomales y de polisomas de las células del músculo cardiaco. En el mismo año Maturo denota la importancia de la insulina en esta etapa de iniciación, principalmente determina el reconocimiento hormonal del sitio de iniciación de la cadena peptídica. En 1971 Morgan determinando en un experimento el efecto regulador de la insulina sobre la síntesis de proteínas en el músculo del corazón observó que cuando había estimulación de síntesis los niveles de subunidades decrecían y los niveles de polisomas aumentaban, indicando con esto que la insulina presentaba efectos rápidos involucrados en la iniciación de las cadenas peptídicas.

Kostyo en 1971 determina que la hormona de crecimiento aumenta la actividad ribosomal, afectando la reacción de la peptidil transferasa o el proceso de translocación. Este efec-

to se observó por un incremento de la velocidad a la cual los péptidos nascentes eran marcados.

Manchester en 1970 afirma que solo se tiene un conocimiento parcial de los sitios y modos de acción de las hormonas que regulan el metabolismo proteico. En otro trabajo en el mismo año además de hablarnos de la existencia de una compartimentalización de pozas de aminoácidos señala que la insulina en sistemas subcelulares presenta efectos principalmente sobre el aminoacil-tRNA y sobre el mRNA.

Wellers en 1971 en un estudio sobre degradación de aminoácidos después de la administración de hormona de crecimiento determina que la disminución en catabolismo de aminoácidos observada podría ser una razón suficiente, aunque no necesaria, para explicar el efecto anabólico de la hormona que actúa inhibiendo enzimas envueltas en el catabolismo de aminoácidos.

Rillman y Kostyo sugieren que ciertas proteínas membranales estan envueltas en la interacción primaria de la hormona de crecimiento con la célula o por lo menos en una secuencia de eventos a través de los cuales la hormona tiene sus efectos. Illin describe a la insulina como un factor alostérico capaz de cambiar la conformación de las proteínas y que por otra parte también puede modificar la actividad enzimática. Este último efecto es importante sobretodo cuando se trate de una regulación inmediata.

Algunas inhibiciones provocadas por la hormona de crecimiento son debidas a cambios en el metabolismo intracelular y Popov describe esto como un resultado de la reconstrucción

en la estructura funcional de la célula inducida. Jackson en 1970 encontró dos especies diferentes adicionales de aspartil-tRNA en hígados de animales tratados con hormona de crecimiento y los cuales no estaban presentes en ratas hipofisectomizadas control, posteriormente se encontraron cambios similares en hígados regenerados con respecto a normales. Esto se interpretó como una indicación de que los cambios en aspartil-tRNA eran debidos a iniciación del crecimiento hepático y no a otras causas.

Bessman estableció que es posible interpretar todo fenómeno asociado con la administración y deprivación de insulina, sobre las bases de un modelo en el cual la insulina proporciona una conexión mecánica entre la hexoquinasa y la mitocondria mediante un camino tal que permite una operación más eficiente del efecto aceptor. La importancia y premisa mayor de este modelo es que la insulina no es absolutamente necesaria para partes individuales de la actividad celular, sino que incrementa la eficiencia de operación de las diferentes fracciones de la célula. La generación de energía por la mitocondria puede ser considerada como un buen motivo para la acción de la insulina, en vista de su marcado papel anabólico en procesos endergónicos. Parece estar comprometida en todas las reacciones sintéticas y en mejoramiento de formación de uniones e incrementos en cadenas de proteínas, lípidos y carbohidratos, y en particular en mRNA. Además Bessman señala que hay suficientes datos que indican que la insulina puede estimular la síntesis de proteínas sin referirse a ningún efecto sobre permeabilidad de la membrana celular, es decir, que pue-

de actuar en otros sitios.

D I S C U S I O N .

Se propone la existencia de estructuras o agentes receptores a nivel del gene y del citoplasma (a nivel de membrana), que son capaces de recibir señales y transmitir las a los ácidos nucleicos o realizar un efecto sobre ellos mismos. Son capaces de producir y realizar efectos regulatorios en el citoplasma, como se puede comprobar cuando una hormona, como es en el caso de la hormona de crecimiento o de la insulina, estimula el proceso de traducción del mensaje genético para la síntesis de proteínas que se realiza en los ribosomas que se encuentran en el citoplasma. Otros suponen que estas hormonas actúan a nivel del acarreador celular de membrana durante la etapa de transporte activo, señalando que tiene estrecha relación con aspectos de translocación y activación de enzimas importantes.

Además se supone que si se habla de agentes o estructuras químicas receptoras se presupone que sirvan para generar o recibir señales y transmitir las a diferentes sistemas de efectores intracelulares y de esta forma por medio de ellos pueda presentarse un efecto sobre membranas celulares, sobre la actividad específica de enzimas intracelulares, sobre los genes, ácidos nucleicos, ribosomas, síntesis de proteínas y sobre una gran variedad de sistemas.

También se propone a la insulina como un factor alostérico que cambia la conformación de las proteínas y altera la

actividad enzimática. Un factor que podría ser alterado por este camino serían los acarreadores o receptores (proteínas), es decir, que en cierta forma la hormona alterara su conformación y por esto se favoreciera el sistema de transporte para la estimulación de la síntesis de proteínas. También se podría pensar que al estar alterando una enzima con actividad catalítica, principalmente por un cambio de conformación, quizás este nuevo cambio produzca una estimulación de su actividad y se favorezca la síntesis. Se hace incapié en varios estudios sobre una estimulación de la síntesis de proteínas por insulina a nivel intracelular.

Como se dijo anteriormente bastantes autores coinciden en afirmar que el efecto principal de la insulina es acelerar la traducción del mensaje genético, facilitando la iniciación de la cadena peptídica específicamente estabilizando las subunidades ribosomales y los complejos de iniciación.

Un aspecto que también se señala con especial importancia es el efecto que presentan las hormonas sobre las membranas celulares. Un factor importante lo constituye la existencia de receptores a nivel de membrana, que poseen características especiales y que pueden actuar como estimuladores; en otros casos hay una interacción de la hormona entre una fase acuosa y otra no acuosa, de tal forma que existe una membrana permeable. El principal efecto de la hormona consiste en alterar el gradiente de potencial existente, lo que provoca una difusión de iones a través de la membrana. Además este efecto se puede apoyar en conceptos moleculares que sostienen al gradiente electroquímico como un tipo de transporte activo.

CONCLUSIONES .

En general se puede observar que no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de estas hormonas y que hasta la fecha queda este estudio como simples teorías y suposiciones que no tienen comprobación real y que tienen puntos de vista diferentes de los distintos investigadores que trabajan por aclarar este concepto. Por lo tanto es un campo desconocido que presenta un amplio panorama por investigar.

Con respecto al mecanismo de regulación hormonal que se proponía en el capítulo II, se puede comprobar que ambas hormonas cumplen con los posibles sitios de acción hormonal que ahí se indican.

Como se puede ver a nivel de la transcripción si existe una regulación de las dos hormonas (Hormona de Crecimiento e Insulina) sin embargo la regulación que existe sobre los genes es menor y en general se puede concluir que la mayoría de los investigadores coinciden en afirmar que el principal efecto hormonal se realiza sobre la traducción; quizás una explicación de esto sería que la transcripción se realiza en el núcleo y en cambio la traducción en el citoplasma y que por lo tanto parece ser que la transmisión del efecto hormonal es más fácil observarla sobre citoplasma que sobre el núcleo, partiendo de la base de que el núcleo está protegido por una membrana y de esta forma es de esperarse que primero afecte el sitio en donde se traduce el mensaje genético para sintetizarse la proteína. Sin embargo también se

ha observado estimulación de síntesis de mRNA, pero en menor proporción. Un panorama también interesante de amplio futuro es dirigir el estudio de estos efectos hormonales hacia la iniciación, alargamiento o liberación de la cadena polipeptídica que se realiza en los ribosomas.

A nivel enzimático también se puede comprobar que existe regulación hormonal ya que para ciertas ocasiones en que se requiere una respuesta inmediata ante una situación específica para la célula, en estos casos la hormona prefiere afectar directamente una enzima, inhibiéndola o estimulándola, dependiendo de las necesidades del organismo, en vez de afectar su mecanismo de síntesis. Mediante este procedimiento la hormona altera el equilibrio de una enzima en un paso limitante de la reacción y de esta forma obtiene un efecto mucho más rápido y eficaz, que alterando el proceso de síntesis de la misma.

El estudio de membrana es un tema que está muy actualizado y en donde se espera encontrar solución a grandes incógnitas que se tienen sobre diferentes mecanismos bioquímicos de regulación. Por lo tanto no sólo los investigadores que tratan de explicar el efecto de la hormona de crecimiento y de la insulina son los únicos que trabajan en esto, sino que son bastantes los que unifican sus criterios en hipótesis quimiosmóticas y químicas que facilitan la comprensión de todos estos fenómenos regulatorios. Y quizás aquí se encuentre la respuesta a el papel que desempeñan éstas hormonas por medio del estudio de receptores químicos de carácter

proteico, que mediante un cambio de conformación reciben el mensaje hormonal y lo transmiten al interior de la célula, trabajando sobre el concepto de que en las membranas existen estructuras que son bombas bioquímicas de trabajo; y sin olvidar a la vez la importancia del potencial de membrana.

Con respecto a AMP cíclico se sabe que la insulina no tiene ninguna relación, sin embargo, éste también sería un estudio interesante por realizar más a fondo, para establecer una conexión entre insulina y AMP cíclico, ya que se sabe que éste último se encuentra en la mayoría de las reacciones regulatorias del organismo, y no sería difícil que también la insulina actuara por un mecanismo diferente a los conocidos o por uno muy semejante, con la participación de este modulador que tendría como último efecto la activación de los ribosomas y como consecuencia la estimulación de la síntesis de proteínas. No sería difícil encontrar una relación entre insulina y AMPcíclico debido a que ambos están involucrados en el metabolismo de carbohidratos.

Sobre hormona de crecimiento no se ha encontrado tampoco ninguna relación con este nucleótido cíclico de gran importancia metabólica para el organismo.

Por último es importante señalar que aunque se trate de un estudio altamente especializado, como es la regulación de la síntesis de proteínas bajo el efecto de dos hormonas, éste se encuentra en una estrecha relación con muchos otros procesos metabólicos que están ocurriendo al mismo tiempo, por ello no se debe olvidar cuando se estudia un fenómeno

aislado que este es tan sólo una pequeña parte del conjunto de reacciones bioquímicas que constituyen al ser viviente.

B I B L I O G R A F I A .-

- Adolfson, S.; Arvill, A. and Ahren, K. "Stimulation by insulin of accumulation and incorporation into protein of L-H³-proline in the intact levator ani muscle from the rat". Biochem. Biophys. Acta, 135, 176-8 (1967).
- Africa, B.B. "Effects of amino-terminal residues on the biological activity of insulin". 184pp Avail. Univer. Microfilms, Ann. Arbor, Mich., Order No. 69-14, 829. From Diss. Abstr. Int. 30 [3] 958 (1969).
- Ahren, K.; Hjalmarson, A. and Isackson, O. "Failure of growth hormone to exert an acute inhibitory effect on glucose uptake in the rat diaphragm". Acta Physiol. Scand. 78, 574-6 (1970).
- Ainson, H. "Effect of insulin on the protein level in the lymph and blood of sheep". Ecsti NSV Tead. Akad. Toim., Biol. 19 [2] 178-82 (1970).
- Akedo, H. and Christensen, H.N. "Nature of insulin action on amino acid uptake by the isolated diaphragm". J. Biol. Chem. 237, - 118-22 (1962).
- Alcindor, L.G.; Raisonnier, A.; Soler, C.; Infante, R. and Polonovski, J. "Effect of insulin on the incorporation of leucina-U-C¹⁴ into plasma lipoproteins during perfusion of isolated rat liver". C.R. Acad. Sci. Paris Ser. 268 [22] 2745-8 (1969).
- Allen, R.E. "Control of protein synthesis in mammalian liver: the regulatory significance of aminoacyl-tRNA levels". Avail. Univ. Microfilms Ann Arbor Mich. Order No. 69-13, 441. From Diss Abstr. Int. 30 [2] 816 (1969).

- Anderson, T.A.; Fausch, H.D. and Gesler, J. "The effect of restricted access to feed on growth rate and body composition of swine". *Growth* 29, 213-8 (1965).
- Arvill, A. and Hjalmarsen, A. "Effects of growth hormone on the metabolism of the isolated levator ani muscle of the rat". *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, Suppl. 56 [122] 15-25 (1967).
- Arvill, A. "Relation between the effects of contraction and insulin on the metabolism of the isolated levator ani muscle of the rat". *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, Suppl. 56 [122] 27-41 (1967).
- Aschner, B. "Demonstration von Hunden nach Extirpation der Hypophyse". *Wien-klin. Wochschr.* 22, 1730-1 (1909).
- Balazo, R. and Gaitonde, M.K. "Factors affecting protein metabolism in the brain". *Biochem. J.* 106 [2] 1P-2P (1968).
- Bardik, Y.V. "Effect of growth hormone on the duration of DNA synthesis in the mitotic cycle". *Byull. Eksp. Biol. Med.* 67 [8] (1969).
- Barej, W.; Garwachi, S. and Kulasck, G. "Effect of exogenous growth hormone on the heifers given feed supplemented with urea. II - Urea nitrogen and aminoacids in serum and blood cells". *Acta Physiol. Pol.* 21 [2] 259-68 (1970).
- Beach, P.K. and Kostyo, J.L. "Effect of growth hormone on the DNA content of muscles of young hypophysectomized rats". *Endocrinol.* 82 [4] 882-4 (1968).
- Beaton, G.H. and Curry, D.M. "A comparison of the effects of growth hormone and of insulin administration". *Endocrinology* 58, 797-801 (1956).
- Beaton, G.H.; Banský, H.Z. and Haufschild, A.H. "Interrelation of the growth and the metabolic responses to anterior pituitary -

- growth hormone administration"Can. J. Biochem. Physiol. 35, -
1113-8 (1957).
- Berson, S.A. and Rosalyn, S.Y."Insulin, growth hormone and metabolic fuels interrelations". Proc.Asia Oceania, Congr. Endocrinol. (Pt1) 15-36 (1967).
- Booth, D.A.; Love, E. and Wechsler, A."Feeding after a single insulin injection disrupted by puromycin but not actinomycin". - Physiol.Behav. 3 [3] , 455-60 (1968).
- Bornstein, J."Growth hormone and diabetes mellitus, a problem in endocrine balance".Aust.J.Sci. 32 [10] 392-4 (1970).
- Brande, P.F. and Knobil, E."The effect of simian and bovine growth hormone on the incorporation of amino acids into protein". Anat. Rec. 138, 337 (1960).
- Breuer, Ch.B."Stimulation of DNA synthesis in cartilage of hypophysectomized rats by native and modified placental lactogen - and anabolic hormones". Endocrinology 85 [6] 989-99 (1969).
- Brossard, M. and Nicole, L."Effect of growth hormone and hydrocortisone on the synthesis of rapidly labeled high molecular weight, nuclear RNA in rat liver".Can.J.Biochem.47: [2] (1969).
- Brown, Cg.B. and Civen,M."Control of rat liver aromatic amino acid transaminases by glucagon and insulin". Endocrinology 84 [2] 381-5 (1969).
- Buck, M.D.; Schauder,P. and Weser, V."Effect of insulin on nuclear protein biosynthesis in the rat liver". Z. Naturfosch. 25 - [3] 276-9 (1970).
- Buse,M.G. and Buse, J."Effect of growth hormone,free fatty acids and insulin on protein synthesis and aminoacid metabolism of isolated rat diaphragms". Diabetes 16 [11] 753-64 (1967).

- Buxtorf, U. "Non suppressible insulin-like activity of human serum
IV. Effect of purified non suppressible insulin-like activity
and of insulin on protein synthesis of adipose tissue from -
glucose-C¹⁴, pyruvate-C¹⁴ and glycine-C¹⁴". Biochem. Biophys.
Acta 177 [3] 512-20 (1969).
- Campbell, J. and Rastogi, K.S. "Elevation in serum insulin, albu-
min and free fatty acids, with gains in liver lipids and pro-
teins, induced by glucocorticoid treatment in dogs". Can. J. -
Physiol. Pharmacol. 46 [3] 421-9 (1968).
- Camus, J.; Vandermeers-Piret, M.C. and Christophe, J. "Activity of
13 enzymes of intermediary metabolism in the liver of young -
rats recuperating from protein malnutrition". Eur. J. Biochem.
11 [2] 225-33 (1969).
- Castles, J.J. "Effect of insulin on protein synthesis in muscle.
Example of an approach to the mechanism of hormone action". Med.
Clin. N. Amer. 54 [1] 201-7 (1970).
- Cehovic, G.; Urban, J. and Vander Laen, W.P. "Effect of cyclic AMP
on growth hormone and prolactin liberation in vitro". C.R. Acad.
Sci., Sér. 270 [25] 3119-22 (1970).
- Ceriani, R.L. "Synthesis of casein-like material by rat mammary -
gland anlagen under hormonal stimulation in vitro". J. Endocri-
nol. 44 [3] 457-8 (1969).
- Clausen, T. "Role of insulin in ion transport in muscle and adipo-
se tissue". Ingoslav. Physiol. Pharmacol. Acta 5 [3] 363-8 (1969).
- Clemens, M.J. and Korner, A. "Stimulation of incorporation of pre-
cursors into protein and ribonucleic acid of rat liver slices
by bovine growth hormone in vitro". Biochem. J. 113 [2] 10P (1969).

- Collec, R.; Ducharme, J.R. and Lebocuf, G. "Growth hormone secretion". *Union Med. Can.* 98 [9] 1488-502 (1969).
- Copinshi, G.; Wegienka, L.C.; Hame, S. and Forsham, P.H. - *Metab. Clin. Exptl.* 16, 485-91 (1967).
- Chambers, W.H. and Milhorat, A.T. "Effect of insulin and of muscular exercise on protein metabolism". *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 24, 170-1 (1926).
- Cheek, D.B.; Powell, G.K. and Scott, R.E. "Growth of muscle cells and liver DNA in rats". *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 117, 306-21 (1965).
- Cheek, D.B.; Brasel, J.A.; Elliott, D. and Scott, R. "Muscle cell size and number in normal children and in dwarfs before and after treatment". *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 119, 46-62 (1966).
- Cheek, D.E. and Graystone, J.E. "Action of insulin, growth hormone and epinephrine on cell growth in liver, muscle and brain of the hypophysectomized rat". *Pediat. Res.* 3 [1] 77-88 (1969).
- Cheek, D.B.; Graystone, J.E. and Donald, B. "Changes in enzymes and metals in liver of rats during endocrine imbalance and calorie restriction". *Pediat. Res.* 3 [5] 433-40 (1969).
- Christensen, H.N.; Parker, H.M. and Riggs, T.R. "Non-exchange of carboxyl oxygen in mammalian aminoacid transport". *J. Biol. Chem.* 233, 1485-7 (1958).
- Christensen, H.N. "Reactive sites and biological transport" *Advances Pot. Chem.* 15, 239-314 (1960).
- Dakshinamurte, K.; Modi, V.V. and Misty, S.P. "Carbohydrate metabolism in biotin deficient rats". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127 [2] 396-400 (1968).
- Danner, D.J. "The effect of alloxan diabetes and insulin treatment

- in vitro on various energy requiring process in rat liver mitochondria". Avail. Univ. Microfilms Ann Arbor, Mich., Order No. 69-2810. From Diss. Abstr. B 29 [8] 2732-843 (1968).
- Daney, P.J. and Manchester, K.L."Isolation of labeled aminoacyl transfer RNA from muscle. Study of the entry of labeled aminoacids into acyl transfer RNA linkage in situ and its control by insulin". Biochem. Biophys. Acta 128 [1] 85-97 (1969).
- Darnaud, J."Insulin and its physiological effects". Rev. Med. Toulouse, Suppl. 6 [2] 117-8, 120=2, 125-6, 129 (1970).
- Darwish, I. and Rivera, E.M."Temporal effects of hormones on DNA synthesis in mouse mammary gland in vitro". J. Exp. Zool. 173 [3] 285-91 (1970).
- Davis, S.G.; Ganigus, U.S. and Hinds, F.C."Metabolic effects of growth hormone and diethylstilbestrol in lambs. II Effects of daily ovine growth hormone injections on plasma metabolites and nitrogen retention". J. Anim. Sci. 30 [2] 236-40 (1970).
- Dawson, K.G.; Patey, P.; Rubinstein, J.C. and Dand Beck, J."Growth hormone and protein synthesis". Mol. Pharmacol. 2, 269-74 (1966).
- Dawson, K.G. and Beck, J.C."Early and late effects of growth hormone on the rat diaphragm". Proc. Soc. Biol. Med. 127 [2] (1968).
- De Barnola, S.L. and Pierluissi, H.J."The effect of insulin on free plasma aminoacids of dogs treated with actinomycin D". Acta Physiol. Lat. Amer. 18 [4] 298-303 (1968).
- De Bodo, R.S. and Altzuler, N."The metabolic effect of growth hormone and their physiological significance". Vitamins and Hormones 15, 205-58 (1957).
- Dellwg, H."Antibiotics and hormones: their action on the biosyn-

- thesis of nucleic acids and proteins". *Molekularbiologie* (1967).
- Doell, R.G. "The effect of injected insulin on the amino acid incorporation system of rat liver". *Biochim. Biophys. Acta* 39, 237-41 (1960).
- ~~Dormandy, T.L. "Hormone-membrane interaction: action of insulin in red cell systems". *Form. Fate Cell Organelles*, 275-89 (1967).~~
- Drews, J. "Induction of tryptophan pyrrolase and tyrosine alpha ketoglutarate transaminase in regenerating liver of hypophysectomized rats". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126 [3] 671-4 (1967).
- Earl, D.C. and Korner, A. "Effect of rat hypophysectomy and growth hormone treatment on cardiac polysomes and ribonucleic acid". - *Arch. Biochem. Biophys.* 115, 445-9 (1966).
- Edgar, P.J.; Rabinowitz, D. and Merimee, T.J. "Effects of amino acids on insulin release from excised rabbit pancreas". *Endocrinology* 84 [4] 835-43 (1969).
- Eichhorn, J.; Seuley, E.; Halkertson, I.D.K. and Hechter, O. - "Effect of ACTH and insulin on AIB accumulation in diaphragm muscle and adrenal *in vivo*". *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 106, 153 (1961).
- Elsas, E.L.; Abreckt, I. and Rosenberg, L.E. "Insulin stimulation of amino acid uptake in rat diaphragm. Relation to protein synthesis". *J. Biol. Chem.* 243 [8] 1846-53 (1968).
- Engel, F.L. and Kostyo, J.L. "Metabolic actions of pituitary hormones". *The Hormones* 5, 69-158 (1964).
- Esanu, C.; Murekawa, S.; Bray, G.A. and Raben, M.S. "DNA synthesis in human adipose tissue *in vitro*. I Effects of serum and hormones". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29 [8] 1027-32 (1969).
- Esanu, C. "Hormonal effects on desoxyribonucleic acid synthesis in human tissues *in vitro*". *Rev. Roum. Endocrinol.* 1 [2] 151 (1970).

- Evans, H.M. and Long, J.A. "The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity and oestrous cycles of the rat". Long. Anat. Rec. 21, 62-3 (1921).
- Fabay, P.; Kleinfeld, R.; Tepperman, H.M. and Tepperman, J. "Effect of diet and insulin on the morphology and TPNH generating enzyme activities of rat adipose tissue". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133 [2] 577-81 (1970).
- Fain, J.N. "Role of RNA and protein synthesis in the lipolytic action of growth hormone in isolated fat cells" Advan. Enzyme Regul. 5, 39-51 (1967).
- Fajans, S.S.; Floyd, J.C. and Knof, R.F. "A difference in mechanism by which leucine and other amino acids induce insulin release". J. Clin. Endocrinol. Metab. 27 [11] 1600-6 (1967).
- Fajans, S.S.; Floyd, J.C.Jr.; Knof, R.F. and Conn, J.W. "Effect of amino acids and proteins on insulin secretion in man". Recent Progr. Hormone Res. 23, 617-56, 652-63 (1967).
- Felig, P.; Marliss, E. and Cahill, G.F., Jr. "Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity". N. Engl. J. Med. 281 [15] 811-6 (1969).
- Florini, J.R. "Incorporation of labeled amino acids into interior sites of protein by a cell-free system from rat skeletal muscles". Biochem. Biophys. Research Comm. 8, 125-30.
- Florini, J.R. and Breuer, C.B. "Control of RNA and protein synthesis in normal muscle". Explor. Conc. Muscular Dystrophy Relat. Disord., Proc. Int. Conf. 78-80 (1966).
- Floyd, J.C., Jr.; Fajans, S.S.; Knopf, P.F.; Rull, J. and Conn, J.W. "Stimulation of insulin secretion of amino acids". Clin. Res. -

13, 322 (1964).

Floyd, J.C.- J. Clin. Investig. 45, 1487 (1966).

Floyd, J.C.; Fajans, S.S.; Conn, J.W.; Thiffault, Ch.; Knopf, R.F. and Guhtsche, E. "Secretion of insulin induced by amino acids and glucose in diabetes mellitus". J. Endocrinol. Metab. 28 [2] (1968).

Foldes, J.; Piros, K.E. and Tamas, G. "Determination of the I¹²⁵-insulin-plasma complex by gel filtration". Acta Diabetol. Lat. 5 [3] 347-63 (1968).

Frame, E.G. and Russell, J.A. "The effects of insulin and anterior pituitary extract on the blood amino acid nitrogen in eviscerated rats". Endocrinology 39, 420-9 (1946).

Franchimont, P. and Denis, F. "Influence of growth hormone, gonadotropics, and gonadal steroids on the metabolism of costal cartilage in the rat". Rev. Fed. Etud. Clin. Biol. 14 [10] 970-6 (1969).

Friedberg, F. and Greenberg, D.M. "The effect of growth hormone on the incorporation of methionine into skeletal muscle protein of normal and hypophysectomized animals". Arch. Biochem. 17 (1948).

Gaebler, O.H.; Liu, C.H. and Zuchlewski. "Effects of small daily doses of growth hormone on nitrogen output in normal and depancreatized dogs". Am. J. Physiol. 187, 357-60 (1956).

Garren, A.P.; Richardson, A.P. and Crocco, R.M. "Studies on the role of ribosomes in the regulation of protein synthesis in hypophysectomized rats". J. Biol. Chem. 242, 650-6 (1967).

Gazariu, L. and Florescu, O. "Insulin-like cortisone relation in carbohydrate and protein metabolism". Z. Gesamte Lum. Med. Ihre Grenzgeb. 23 [22] 708-11 (1968).

Fazariu, L.; Florescu, O.; Dascalu, R.; Holan, T. and Uray, Z. -

- Geel, S.E. and Timiras, P.S. "Influence of growth hormone on cerebral cortical RNA metabolism in immature hypothyroid rats". - Brain Res. 22 [1] 63-72 (1970).
- Gelehrter, T.D. and Tompkins, G.M. "Posttranscriptional control of tyrosine aminotransferase synthesis by insulin". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 66 [2] 390-7 (1970).
- Girard, J. and Greenwood, F.C. "Radioimmunological determination of human growth hormone in urine". Rev. Med. Liege 23, 50-3 (1968).
- Gjeddle, F. "The insulin like activity of serum". Acta Endocrinol. 57 [3] 505-28 (1968).
- Gjeddle, F. "The insulin like activity of serum". Acta Endocrinol. 57 [3] 478-504 (1968).
- Gleeman, J. "Action of insulin on isolated fat cells". Dan. Med. Bull. 16, 42pp (1969).
- Goldstein, S. and Reddy, W.J. "Insulin stimulation of leucine-C¹⁴ incorporation into protein". Biochim. Biophys. Acta 150 [4] - 733-5 (1968).
- Goldstein, S. nad Reddy, W.J. "Insulin and protein synthesis in muscle". Arch. Biochem. Biophys. 140 [1] 181-9 (1970).
- Golovan, V.T. "The effect of prolactin, Thyroxine and insulin on lactation". Fziol. Zh. USSR 54 [5] 638-46 (1968).
- Granitsas, A.N. "Incorporation of alanine-C¹⁴ into protein of E. coli under the influence of insulin". Arch. Biochem. Biophys. - 134 [2] 275-8 (1969).
- Green, M.R. and Topper, Y.J. "Effects of prolactin, insulin and hydrocortisone on RNA synthesis by mouse mammary gland in vitro". Biochim. Biophys. Acta 204 [2] 441-8 (1970).

- Guidotti, G.G.; Lueningburg, B. and Borghetti, A.F. "Amino acid uptake in isolated chick embryo heart cells. Effect of insulin". *Biochem. J.* 114 [1] 97-105 (1969).
- Guroff, G. and Udenfriend, S. "the failure of insulin to affect the transport of tyrosine in the isolated rat diaphragm". *Biochim. Biophys. Acta* 46, 386-7 (1961).
- Hahn, T.J.; Downing, S.J. and Phang, J.M. "Insulin effect on amino acid transport in bone". *Biochim. Biophys. Acta* 184, 3 (1969).
- Heinz, E. and Walsh, P.M. "Exchange diffusion transport, and intracellular level of amino acids in Ehrlich carcinoma cells". *J. Biol. Chem.* 233, 1488-93 (1958).
- Hernández, T. and Coulson, R.A. "Effect of insulin on free amino acids in caiman tissue and plasma". *Comp. Physiol. Biochem.* 26 [3] 991-6 (1968).
- Hernández, T. and Coulson, R.A. "Effects of insulin on extracellular-intracellular amino acids pools in the caiman". *Amer. J. Physiol.* 217 [6] 1846-52 (1959).
- Herrlich, P. and Long, N. "Influence of growth hormone on template RNA and ribosomes from rat liver". *Hoppe-Zeyler's Z. Physiol. Chem.* 348 [11] 1377-80 (1967).
- Hirosaya, W. "Metabolism of protein in lens. Effects of hypophysectomized and growth hormone on incorporation of leucine in rat lens". *Iwate Igaku Zrshi* 21 [1] 48-58 (1969).
- Hjalmarson, A. and Ahren, K. "modification of amino acid transport in the isolated rat diaphragm of pituitary growth hormone". *Life Sciences* 4, 863-9 (1965).
- Hjalmarson, A. "Temporal relations of the growth hormone effects on amino acid transport and protein synthesis in isolated rat

- diaphragm". Acta Endocrinol. Suppl. 126, 37-44 (1968).
- Hjalmarson, A. "Influence of growth hormone on the sensitivity of -
rat diaphragm to insulin". Acta Endocrinol. Suppl. 126, 49 (1968).
- Hjalmarson, A.; Isaksson, O. and Ahren, K. "Effects of growth hor-
mone and insulin on amino acid transport in the perfused rat
heart". Amer. J. Physiol. 216 [6] 1795-802 (1969).
- Hoberman, H.D. "Endocrine regulation of amino acid and protein -
metabolism during fasting". Yale J. Biol. Med. 22, 341-67 (1950).
- Holt, P.G. and Oliver, T.T. "Multiples forms of tyrosine amino -
transferase in rat liver and their hormonal induction in the
neonate". FEBS Lett. 5 [1] 89-91 (1969).
- Il'in, V.S. "Mechanism of action of insulin". Vestn. Akad. Med. -
Nauk SSSR 24 [8] 3-15 (1969).
- Ingle, D.J.; Prestrud, M.C. and Nezamis, J.E. "The effect of insu-
lin upon the level of blood amino acids in the eviscerated rat
as related to the level of the blood glucose". Am. J. Physiol.
150, 682-5 (1947).
- Jackson, C.D. and Sells, B.H. "Countercurrent distribution patter-
ns". Biochim. Biophys. Acta 155 [2] 417-23 (1968).
- Jackson, C.D. "Effect of bovine growth hormone on protein and ri-
bonucleic acid metabolism in rat liver". Avail. Univ. Micro -
films, Ann Arbor, Mich., Order No. 68-15, 418. From Diss Abstr.
29 [5] 1586 (1968).
- John, D.W. and Miller, L.L. "Regulation of net biosynthesis of se-
rum albumin and acute phase plasma proteins". J. Biol. Chem. -
244 [22] 6134-42 (1969).
- Kaplinski, S.Y.; Myasoedova, K.N. and Protasova, T.N. "Adaptation

- of amino acid metabolism during a variation in the dietary protein level and under the influence of different hormones". - Probl. Biokhim. Adapt., 112-22 (1966).
- Kenney, F.T.; Holten, D. and Hager, CH.B. "Hormonal regulation of enzyme synthesis". Gumma Symp., Endocrinol. 5, 31-41 (1968).
- Khodzaiova, G.K. "Effect of insulin on the intensity of the conversion of glycine-2-C¹⁴ to serine, aspartate and glutamate in rat brain and liver". Vestn. Leningrad. Univ. Biol. 23 [15] (1968).
- Kipnis, D.M. and Cori, C.F. "Studies on tissue permeability. III The effect of insulin on pentose uptake by the diaphragm". J. Biol. Chem. 224, 681-93 (1957).
- Kipnis, D.M. and Noall, M.W. "Stimulation of amino acid transport by insulin in the isolated rat diaphragm". Biochim. Biophys. Acta 28, 226-7 (1958).
- Kipnis, D.M. and Reiss, E. "The effect of cell structure and growth hormone on protein synthesis in striated muscle". J. Clin. Invest. 39. 1002 (1960).
- Knobil, E. and Hotchkiss, J. "Growth hormone". Ann. Rev. Physiol. 26, 47-74 (1964).
- Knobil, E. "The pituitary growth hormone: and adventure in physiology". The Physiologist 9, 25-44.
- Knopf, R.F.; Conn, J.W.; Fajans, S.S.; Floyd, J.C.; Gantsche, E.M. and Bull, J.A. "Plasma growth hormone response to intravenous administration of amino acids". J. Clin. Endocrinol. 25, 1140-4 (1965).
- Konikova, A.S.; Morenkova, S.A.; Kritoman, M.G. and Perova, N.V. "Utilization of parenterally injected carbon-14-labeled poly -

- peptide chains of insulin bu proteins of organs and tissues".
Metab., Clin. Exp. 17 [5] 411-9 (1968).
- Konikova, A.S.; Morenkova, S.A.; Perova, N.V. and Kritsman, M.G.
"Distribution of radioactivity in various organs of rats du -
ring parenteral administration of A and B polypeptide chains -
of insulin-C¹⁴". Biokhimiya 33 [2] 263-8 (1968).
- Korner, A. "The effect of hypophysectomized rat and of treatment
with growth hormone on the incorporation of amino acids into
liver proteins in a cell-free system". Biochem. J. 73, 61-9 (1959).
- Korner, A. "Alloxan diabetes and in vitro protein biosynthesis in
rat liver microsomes and mitochondria". J. Endocrinol. 20, 265
-9 (1960).
- Korner, A. "the effect of hypophysectomy of rat and of tretament
with growth hormone on the incorporation in vivo of radioacti-
ve amino acids into the proteins of subcellular fractions of
rat liver". Biochem. J. 74, 462-71 (1960).
- Korner, A. "The effect of hypophysectomy and growth hormone treat
ment of the rat on the incorporation of amino acids into the i
solated liver ribosomes". Biochem. J. 81, 292-7 (1961).
- Korner, A. "Action of hormones at the cellular level. The effect
of growth hormone on protein synthesis". Protein Metabolism, p
8-25 (1962).
- Korner, A. "Regulation of the rate of synthesis of messenger ri-
bonucleic acid by growth hormones". Biochem. J. 92, 449-56 (1964).
- Korner, A. "Growth hormone effects on RNA and protein synthesis -
in liver". J. Cell Comp. Physiol. 66, 153-62 (1965).
- Korner, A. "Regulation of the rate of synthesis of messenger ri -

- bonucleic acid by growth hormone". Biochem. J. 92, 449-56 (1964).
- Korner, A. "Metabolic regulation by growth hormone and its relations to protein biosynthesis". Proc. Can. Cancer Res. 7, 139 (1966).
- Korner, A. "Anabolic action of growth hormone". Ann. N.Y. Acad. Sci. 148 [2] 408-18 (1968).
- Korner, A. "Hormonal control of protein synthesis". Biochem. J. 115 [5] 30P-31P (1969).
- Korner, A. "Effect of growth hormone on protein synthesis in the absence of peptide chain initiation". Biochim. Biophys. Acta 174 [1] 351-8 (1969).
- Korotgaey, A.I.; Maksimov, U.F. and Shirgaeva, I.N. "The kinetics of the fundamental biosynthetic processes and the content of ribosomes in E. coli K-125 at different stages of synchronous growth". Dokl. Akad. Nauk SSSR 178 [6] 1410-3 (1968).
- Kostyo, J.L. and Knobil, E. "The effect of growth hormone on the in vitro incorporation of leucine-2-C¹⁴ into the protein of rat diaphragm". Endocrinology 65, 395-401 (1959).
- Kostyo, J.L.; Hotchkiss, J. and Knobil, E. "Stimulation of amino acid transport by growth hormone added in vitro". Science 130, 1653-4 (1959).
- Kostyo, J.L. and Knobil, E. "The stimulation of leucine-2-C¹⁴ incorporation of isolated rat diaphragm by simian growth hormone added in vitro". Endocrinology 65, 525-8 (1959).
- Kostyo, J.L. and Schmidt, J.E. "Hormonal specificity of the in vitro action of growth hormone on amino acid transport into rat muscle". Endocrinology 70, 381-5 (1962).
- Kostyo, J.L. "Growth hormone and muscle ribonucleic acid metabolism". Biochim. Biophys. Acta 129, 294-300 (1966).

- Kostyo, J.L. "Changes in polyamine content of rat liver following hypophysectomy and treatment with growth hormone". Biochem. - Biophys. Research Comm. 23, 150-5 (1966).
- Kostyo, J.L. and Redmond, A.F. "Role of protein synthesis in the inhibitory action of adrenal steroid hormones on amino acid transport by muscle". Endocrinology 79, 531-40 (1966).
- Kostyo, J.L. "Rapid effects of growth hormone on amino acid transport and protein synthesis". Ann.N.Y.Acad.Sci. 148 [2] 389 (1968).
- Krahl, M.E. "Incorporation of C¹⁴- amino acids into peptides by normal and diabetic rat tissues". Science 116, 524 (1952).
- Krahl, M.E. "Hormones and protein synthesis". Mol. Basis Some. Aspects Ment. Activ., Proc.Nat. Advan.Study Inst. 1, 377-84 (1966).
- Krawiec, L.; Garcia, S.; Argiz, C.A.; Gómez, C.J. and Pasquini, J. M. "Hormonal regulation of brain development. Effects of triiodotreonine and growth hormone on the biochemical changes in the cerebral cortex and cerebellum of neonatally thyroidectomized rats". Brain Res. 15 [1] 209-18 (1969).
- Krawitt, E.L.; Baril, E.F.; Becker, J.E. and Potter, U.R. "Amino acid transport in hepatoma cell cultures during tyrosine amino transferase induction". Science 169 [3942] 294-6 (1970).
- Kuch, V.C. and Luck, J.M. "The effect of insulin on protein metabolism". J. Biol. Chem. 78, 257-64 (1928).
- Kurihara, K. and Wool, I.G. "Effect of insulin on the synthesis of sarcoplasmic and ribosomal proteins of muscle". Nature 219 [515] 721-4 (1968).
- Labrie, F. and Körner, A. "Effect of glucagon, insulin and tyrosine transaminase and tryptophan pyrrolase of rat liver". Arch.

- Biochem. Biophys. 129 [1] 75-8 (1969).
- Laudicina, E.; Bompiani, G.D.; Angileri, G. and Mancuso, L. "Persistence of the pancreatic insulin response to intragastric amino acid loading during continuous epinephrine infusion". Boll. - Soc. Ital. Biol. Sper. 44 [4] 288-90 (1968).
- Lee, M.O. and Ayres, G.B. "The composition of weight lost and the nitrogen partition of tissues in rats after hypophysectomy". Endocrinology 20, 489-95 (1936).
- Lee, N.D. and Williams, R.H. "The role of the pituitary-adrenal system in cystine-S³⁵ incorporation into protein". Endocrinology 51, 451-6 (1952).
- Lees, H. and Gaebler, O.H. "Utilization and transfer of nitrogen from glycine, L-alanine, L-glutamic acid and L-aspartic acid during cessation and induction of growth". Arch. Biochem. Biophys. 84, 188-95 (1959).
- Leon, H.A. and Chackerian, M.J. "Nutritional and hormonal factors concerned with the regulation of liver protein synthesis during acute centrifugation stress". Endocrinology 82 [3] 429 (1968).
- Levine, R.A. "Stimulation of plasma insulin and growth hormone in man by cyclic 3',5'-AMP". Protein Polypeptide Horm., Proc. Lat. Symp., 879-81 (1969).
- Li, C.H. and Evans, H.M. "The biochemistry of pituitary growth hormone". Recent Prog. Horm. Res. 3, 3-44 (1948).
- Li, C.H.; Geschwind, I. and Evans, H.M. "The effect of growth and adrenocorticotrophic hormones on the amino acid levels in the plasma". J. Biol. Chem. 177, 91-5 (1949).
- Liberti, J.P.; Longman, E.S. and Navon, R.S. "Effects of hydrocortisone on the amino acid levels in the plasma". J. Biol. Chem. 244, 111-5 (1969).

- tisone and growth hormone on tyrosine amino transferase and -
tryptophan oxygenase levels in hypophysectomized rats" *Endo -
crinology* 86 [6] 1448-50 (1970).
- Liew, C.C. and Korner, A. "Growth hormone and the binding of ami-
noacyl transfer-ribonucleic acid to liver ribosomes". *Biochem.J.*
114 [4] 63P-64P (1969).
- London, B.R. and Prenton, M.A. "Beta-adrenergic receptors and the
plasma amino acid response to insulin in man". *Clin. Sci.* 35
[1] 55-61 (1968).
- Lostron, A.J. "Testosterone and insulin regulation of citrate se-
cretion and protein synthesis in explanted mouse prostates". -
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 60 [4] 1312-8 (1968).
- MacLeod, R.M.; Bass, M.B.; Huang, S.C. and Smith, C.M. "Interme-
diary metabolism in the liver and adipose tissue of rats with
hormone secreting pituitary tumors". *Endocrinology* 82 [2] (1968).
- Mac Manus, J.P. and Whitfield, J.F. "Mediation of the mitogenic
action of growth hormone by adenosine 3'5'-monophosphate (cy -
clic AMP)". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132 [2] 409-12 (1969).
- Maca, R.D. and Foley, J.F. "The effect of growth hormone on mamma-
lian cells in tissue cultures". *J. Endocrinol.* 39 [3] 321-8 (1967).
- Mahler, R.J. and Szabo, O. "Acute insulin synergistic activity of
growth hormone. Reversal of chronic activity of growth hormone
effect by actinomycin D". *Horm. Metab. Res.* 1 [2] 65-71 (1969).
- Maki, S.; Nakagawa, H.; Masami, S. and Kiku, N. "Effect of bivariate
growth hormone on serine dehydratase in rat liver". *Endocrino-
logy* 83 [2] 381-3 (1968).
- Malaisse, W.J.; Malaisse-Lagae, F.; King, S. and Wrigth, P.H. "E -
ffect of growth hormone on insulin secretion". *Amer. J. Physiol.*

- 215 [2] 423-8 (1968).
- Manchester, K.L. "The effect of insulin on incorporation of amino acids into protein of normal rat diaphragm in vitro". Biochem. J. 70 353-8 (1958).
- Manchester, K.L. and Young, F.G. "The effect of insulin in vitro on the accumulation of amino acids by isolated rat diaphragm". Biochem J. 75, 487-95 (1960).
- Manchester, K.L.; Randle, P.J. and Young, F.G. "The effect of growth hormone and of cortisol on the response of isolated rat diaphragm to the stimulation effect of insulin on glucose uptake and on incorporation of amino acids into protein". J. Endocrinol. 18, 395-408 (1959).
- Manchester, K.L. "Effects of antibiotics on protein synthesis in muscle and implications with regard to the action of insulin". Nature 216 [5113] 394-5 (1967).
- Manchester, K.L. "Re-evaluation of the effect of insulin on nucleic acid synthesis in muscle". Biochem. J. 105 [1] 13-5 (1967).
- Manchester, K.L. "Hormonal control of protein biosynthesis" Biol. Basis Med. 2, 221-62 (1968).
- Marzluff, W.F., Jr.; Mac Carly, F.S. and Turkington, R.W. "Insulin dependent synthesis of histones in relation to the mammary epithelial cell cycle". Biochim. Biophys. Acta 190 [2] 517 (1969).
- Mascia, V.; Pasqualucie, S.; Cerillo, R.; Zizi, P.; Porda, G.; Desoques, A.; Pagano, G. and Pellegrini, A. "Passage of proinsulin through the isolated rat mesentery". Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 46 [4] 180-3 (1970).
- Massen, A.P. (Quoted by Manchester and Young). Ned. Akad. Wetensch. Proc. 44B, 160 (1951).

Mayne, R.; Forsyth, I.A. and Barry, J.M. "Ribonucleic acid synthesis during development of the mammary glands of pregnant mice - in organ culture". *Biochem. J.* 104 [3] 41P (1967).

Mayne, R.; Forsyth, I.A. and Barry, J.M. "Stimulation by hormones of RNA and protein formation in organ cultures of the mammary glands of pregnant mice". *J. Endocrinol.* 41 [2] 247-53 (1968).

Meller, L.V. and Beigelman, P.M. "Protein synthesis of isolated rat adipose tissue cells: effects on insulin antibody, glucose concentration, duration of incubation, rat age and puromycin". *Biochem. Med.* 1 [2] 129-40 (1967).

Merimee, T.J.; Burgess, J.A. and Rabinowitz, D. "Sex-determined - variation in serum insulin and growth hormone response to amino acid stimulation". *J. Clin. Endocrinol.* 26, 791-3 (1966).

Merimee, T.J.; Rabinowitz, D. and Nelson, J.K. - *Diabetes* 16, 530 (1967).

Milhorat, A.T. and Chambers, W.H. "Effect of insulin on protein metabolism". *J. Biol. Chem.* 77, 595-602 (1928).

Milman, A.E. and Russell, J.A. "Some effects of purified pituitary growth hormone on carbohydrate metabolism in the rat". *Endocrinology* 47, 114-126 (1950).

Milman, A.E.; De Moor, P. and Luckens, F.D.W. "Relation of purified pituitary growth hormone and insulin in regulation of nitrogen balance". *Am. J. Physiol.* 166, 354-63 (1951).

Minemura, T.; Laey, W.W. and Crofford, O.B. "Regulation of the transport and metabolism of amino acids in isolated fat cells. Effect of insulin and a possible role of adenosine 3';5'-monophosphate". *J. Biol. Chem.* 245 [15] 3872-81 (1970).

- Minoree, I. "Metabolic regulation of human growth hormone secretion". *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 44 [9] 997-86 (1968).
- Mircevova, L. and Simonova, U. "Effect of adrenaline, nor adrenaline and insulin on magnesium-dependent ATPase". *Experientia* 25 [10] 1028-9 (1969).
- Mirsky, I.A. "The influence of insulin on the protein metabolism of nephrectomized dogs". *Am. J. Physiol.* 124, 569-75 (1938).
- Mueller, E.E.; Peide, A.; Naimzada, M.K. and Ferrairo, G. "Involvement of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in the growth hormone release mechanism". *Experientia* 25 [7] 750-1 (1969).
- Murakawa, S. and Raben, M.S. "Effect of growth hormone and placental lactogen of DNA synthesis in rat costal cartilage and adipose tissue". *Endocrinology* 83 [4] 645-50 (1968).
- Nataf, B. "Fetal rat thyroid gland in organ culture". *Gen. Comp. Endocrinol.* 10 [2] 159-73 (1968).
- Nathamielz, P.W. "Amino acid stimulation of insulin in the newborn calf". *J. Endocrinol.* 48 [1] 141-2 (1970).
- Neame, K.D. "Effect of neutral L and W amino acids and basic alpha amino acids on uptake of L-histidine by intestinal mucosa, testis, spleen and kidney in vitro: A comparison with effect in brain". *J. Physiol.* 185, 627-45 (1966).
- Noall, M.W.; Riggs, T.R.; Walker, L.M. and Christensen, H.N. "Endocrine control of amino acid transfer". *Science* 126 (1957).
- Nobuo, V. "Mechanism of hormone action with special emphasis on hormonal control of protein synthesis". *Seibutsu Butsuri* 6 [4] 164-73 (1966).
- Norman, N. and Turter, A.R. "radioimmunoassay studies with human

- growth hormone and a pituitary lipid-mobilizing factor". *Acta Endocrinol.* 58 [2] 318-38 (1968).
- Novelli, G.D. "Amino acid activation for protein synthesis". *Am. Rev. Biochem.* 36 [2] 449-84 (1967).
- Ottolenghi, C. and Cavagna, R. "Hormonal control of tyrosine transaminase activity in the isolated perfused rat liver". *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 43 [15] 889-92 (1967).
- Pallota, J.A. and Kennedy, P.J. "Response of plasma insulin and growth hormone to carbohydrate and protein feeding" *Metab. Clin. Exp.* 17 [10] 901-8 (1968).
- Palmiter, R.D. "Early macromolecular synthesis in cultured mammary tissue from midpregnant mice". *Endocrinology* 85 [4] 747-51 (1969).
- Pearson, O.H.- Discussion of paper Lu Wolstenholm, G.E.W. and O'Connor, C.M. (eds.). *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, Human Pituitary Hormones* 4, 129. Little, Brown and Company, Boston.
- Pimstone, B.L.; Barbezat, G.; Hausen, J.D.L. and Murray, P. "Growth hormone secretion in protein calorie mal nutrition". *Amer. J. Clin. Nutr.* 21 [5] 482-7 (1968).
- Popov, A. "Changes in the reactivity of rat diaphragmal muscle to the action of insulin". *Dokl. Bolg. Akad. Nauk.* 23 [4] 447-50 (1970).
- Potler, V.R.; Watamabe, M.; Becker, J.E. and Pitot, H.C. "Hormonal effects on enzyme activities in tissue culture and in whole animals". *Advan. Enzyme Regul.* 5, 303-16 (1967).
- Poznanski, W.J. "Hormonal influence on plasma amino acid levels in man". *Protein Polypeptide Horm., Proc. Int. Symp.*, 542-6 (1968).
- Prader, A.; Zachman, M.; Poley, J.R. and Illeg, R. "The metabolic

- effect of a small uniform dose of human growth hormone in hypopituitary dwarfs and in control children". *Acta Endocrinol.* 57 [1] 115-28 (1968).
- Priest, R.E. "Endocrine control of connective tissue metabolism". *Connective tissue*, 50-60 (1967).
- Rabinowitz, D. and Zeller, K.L. "A metabolic regulation device based on the action of human growth hormone and of insulin, singly and together, on the human forearm". *Nature* 199, 913-5 (1963).
- Rabinowitz, D.; Merimee, T.J. and Burgess, J.A. "Patterns of hormonal release after glucose, protein, and glucose plus protein". *Lancet* i, 454-6 (1966).
- Raiti, S.; Blizzard, R.M.; Johanson, A.; Davis, W.T. and Migeon, C.J. "Comparison of the effects of insulin and pyrogen as stimuli to growth hormone release in man". *Johns Hopkins, Med. J.* 122 [3] 154-9 (1968).
- Rampersad, O.R. and Wool, I.G. "Protein synthesis by ribosome - from heart muscle: effect of insulin and diabetes". *Science* 149, 1102-3 (1965).
- Rovelli, G.D. "Amino acid activation for protein synthesis". *Ann. Rev Biochem.* 36 [2] 449-84 (1967).
- Rannels, D.E.; Jefferson, L.S.; Hjalmarsen, A.C.; Wolpert, E.B. and Morgan, H.E. "Maintenance of protein synthesis in hearts of diabetic animals". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40 [5] 1110 (1970).
- Rapoport, S. and Rosenthal, S. "Molecular biological aspects of - the activity of some hormones". *Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Med.* [3] 45-57 (1965).
- Rapoport, E.A. and Morenkova, S.A. "Distribution of radioactivity between subcellular structures in rat liver during parenteral

- administration of preparations of insulin and histones labeled with C¹⁴-labeled amino acids". *Biokhimiya* 33 2 214-9 (1968).
- Reiss, M.; Schwarz, L. and Flischmann, F. "The relation between - the anterior lobe of the hypophysis and protein metabolism". - *Endokrinologie* 17, 167-70 (1936).
- Reiss, E. and Kipnis, D. "The mechanism of growth hormone and hydrocortisone in strained muscles". *J. Lab. Clin. Med.* 54, 937-8 (1959).
- Renold, A.E. "Effect of insulin on the plasma membrane". *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50 [12] 2481-7 (1968).
- Reshef, L. and Greengard, O. "Effect of amino acid mixtures, insulin, epinephrine and glucagon in vivo on the levels of rat liver tyrosine aminotransferase". *Enzymol. Biol. Clin.* 10, 113-1 (1969).
- Rieser, P. and Rieser, C.H. "Anabolic responses of diaphragm muscle to insulin and to other pancreatic proteins". *Proc. Soc. - Exper. Biol. Med.* 116, 669-71 (1964).
- Rieser, P. "The catalytic nature of insulin". *Am. J. Med.* 40, 759-64 (1966).
- Rieser, P. and Wilkens, W. "Insulin, membranes and metabolism". Baltimore Md. (1967).
- Rieser, P. and Maturo, J.M. "Insulin, substrate transport and protein synthesis in muscle". *Arch. Intern. Med.* 123 [3] 267-1 (1969).
- Riggs, T.R. and Walker, L.M. "Growth hormone stimulation of amino acid transport into rat tissues in vivo". *J. Biol. Chem.* 235, - 3603-7 (1960).
- Rivera, E.M. and Cummins, E.P. "Growth hormone activity and DNA - synthesis in mammary organ culture". *J. Endocrinol.* 46 [2] (1970).
- Roat, A. "Growth hormone". *Pediatrics* 36, 940-50 (1965).

- Roginski, E.E. and Mertz, W. "Effects of chromium(III) supplementation on glucose and amino acid metabolism in rats fed a low-protein diet". J.Nutr. 97 [4] 525-30 (1969).
- Rosenthal, I.M.; Metz, R. and Pirani, C.-Am. J. Diseases Children 107, 343-9 (1964).
- Russell, J.A. "The effect of purified growth hormone on urea formation in nephrectomized rats". Endocrinology 49, 99-104 (1951).
- Saad, S.F. "Influence of insulin on gamma aminobutyric acid level in the cerebral hemispheres of mice". Bull. Fac. Pharm., Cairo Univ. 8 [1] 1-10 (1969).
- Saito, S. "The metabolic effect of growth hormone and mode of action on protein metabolism". Nippon Naibumpi Zasshi 43 [8] 701-10 (1967).
- Salganik, R.I. "Role of genetic induction in the action of hormonal regulation". Al'dosteron Adapt. Izmen. Vod-Solevogo Rezhima, Mater Simp. 134-51 (1968).
- Salganik, R.I.; Arguteinskoya, S.V.; Mertvetsov, N.P. and Krhistolyubova, N.B. "Local disturbance of the capacity for induction due to prolonged administration of a hormonal inducer to animals". Mol. Biol. 2 [5] 721-6 (1968).
- Salter, J. and Best, C.H. "Insulin as a growth hormone". British Med. J. 2, 353-6 (1953).
- San Pietro, A. and Rittenberg, D. "A study of the rate of protein synthesis in humans". J.Biol.Chem. 201, 457-73 (1953).
- Sanders, R.B. and Riggs, T.R. "Modification by insulin of the distribution of two model amino acids in the rat". Endocrinology 80, 29-37 (1967).

- Schaffer, N.K. and Lee, M. "The effect of the anterior pituitary growth hormone on protein metabolism". J. Biol. Chem. 108, 355-71 (1935).
- Scharff, R. and Wool, I.G. "Concentration of amino acids in rat - muscle and plasma". Nature 202, 603-4 (1964).
- Scharff, R. and Wool, I.G. "Accumulation of amino acids or perfused rat heart". Biochem. J. 97, 272-6 (1965).
- Schepper, P.J. "Metabolic effects of hypoglycemic sulfonylureas. In vitro effect of sulfonilureas on leucine incorporation and metabolism and on respiration of rat tissues". Biochem. Pharmacol. 16 [12] 2337-53 (1967).
- Schmidt, G.; Beck, J.P.; Guerne, J.M.; Stutinski, F. and Ebel, J. P. "Polyuridilic acid-induced stimulation of phenylalanine incorporation in a rat liver cell-free system. Effects of hypophysectomy and treatment with growth hormone". Rev. Can. Biol. 27 [2] 171-3 (1968).
- Schwartz, A.G. and Amos, H. "Insulin dependence of cells in primary culture: influence on ribosome integrity". Nature 219 [5161] 1366-7 (1968).
- Scow, R.O. "Effect of growth hormone on growth hypophysectomized pancreatectomized rats". Endocrinology 61, 582-6 (1957).
- Scow, R.O. and Hagan, S.N. "Effect of testosterone propionate and growth hormone on growth and chemical composition muscle and other tissues in hypophysectomized male rats". Endocrinology 77, 852-8 (1965).
- Shigeru, O.; Hiroyasu, W. and Kijuro, O. "Effect of growth hormone on protein metabolism in the lens of the hypophysectomized

- rats". *Igaku to Seibutsugaku* 73 [6] 339-41 (1966).
- Shigeru, O.; Junkiti, W.; Maseo, H. and Kijuro, O. "Effects of - growth hormone on the glutathione content in the lens of hypophysectomized rat". *Igaku to Seibutsugaku* 75 [4] 134-6 (1967).
- Shigeru, O.; Maso, H. and Kijuro, O. "Protein metabolism in cornea from hypophysectomized rat". *Tohoku J. Exp. Med.* 101 [2] - 141-5 (1970).
- Short, F.A. "Protein synthesis by red and white muscle in vitro; - effect of insulin and animal age". *Amer. J. Physiol.* 217 [1] 307-9 (1969).
- Sinex, F.M.; Mc Mullen, J. and Hastings, A.B. "The effect of insulin on the incorporation of C^{14} into the protein of rat diaphragm". *J. Biol. Chem.* 198, 615-9 (1952).
- Sirakov, L. and Richlik, I. "Hormonal regulation of protein synthesis in the mammary gland". *Collect. Czech. Chem. Commun* 33 [2] 637-41 (1968).
- Sirek, O.V.; Niki, A.; Niki, M. and Sirek, A. "Serotonin and the plasma amino acid reduction caused by a single injection of - growth hormone". *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 47 [7] 611-7 (1969).
- Slavin, B.G. and Elias, J.J. "Morphologic changes in white and - beown adipose tissue by insulin, thyroxine and cortisol in organ culture". *Anat. Rec.* 167 [2] 213-23 (1970).
- Smith, P.E. "Hypophysectomy and replacement therapy in the rat". *Am. J. Anat.* 45, 205-73 (1930).
- Snipes, C.A. and Kostyo, J.L. "Effects of hypophysectomy and growth hormone on utilizable amino acid accumulation". *Am. J. Physiol.* 203, 933-8 (1962).

- Snipes, C.A. "Effects of hypophysectomy and insulin on accumulation of naturally occurring amino acids". Federation Proc. 22 [507] (1963).
- Snipes, C.A. "Hormonal effects on accumulation of naturally occurring amino acids in vivo and in vitro". Am. J. Physiol. 212, 279-83 (1967).
- Snipes, Ch. A. "Regulation by growth hormone of the accumulation of amino acids by muscle cells". Avail. Univ. Microfilms, Ann Arbor, Mich., Diss. Abstr. B 28 [9] 3861-2 (1968).
- Sprinson, D.B. and Rittenberg, D. "The rate of interaction of the amino acids of the diet with the tissue proteins". J. Biol. Chem. 180, 715-26 (1949).
- Stahelin, M. "Effect of hypophysectomy on rat liver polyribosomes". Biochem. J. 342, 49-68 (1965).
- Staib, R.; Thienkaus, R.; Ammedick, V. and Staib, W. "Direct effect of insulin and glucagon on the activity of tyrosine alpha ketoglutarate transaminase". Eur. J. Biochem. 8 [1] 23-5 (1969).
- Stirewalt, W.S. and Wool, I.G. "Protein synthesis by heart muscle ribosomes: an effect of insulin independent of substrate transport". Science 154, 284-5 (1966).
- Straub, K.; Schleyer, M. and Raptis, S. "Regulation of L-serine dehydratase by growth hormone". Endokrinologie 55 [1] 95-100 (1969)
- Sukkar, M.Y.; Hunter, W.M. and Passmore, R. "The effect of a protein meal with and without subsequent exercise on plasma insulin and growth hormone". Quart. J. Exp. Physiol. 53 [2] 206 (1968).
- Summer, K. "Characterization of a new insulin degrading enzyme from rat adipose tissue". Avail. Univ. Microfilms, Ann Arbor.

- Mich. Order No. 69-13,251. From Diss. Abstr. Int. B 30 [2] 542 (1969).
- Swislocki, N.I. "Growth hormone effects on histidine incorporation into protein by adipose tissue from hypophysectomized rats". - Biochim. Biophys. Acta 169 [2] 556-8 (1968).
- Takahashi, S.; Penn, N.W.; Lajtha, A. and Reiss, M. "Influence of growth hormone on phenylalanine incorporation into rat-brain protein". Prot. Metab. Nerv. System., 355-66 (1970).
- Talwar, G.P. and Gros, F. "Effect of growth hormone on ribonucleic acid metabolism". Biochem. J. 91, 565-6 (1964).
- Talwar, G.P.; Panda, N.C.; Sarin, G.S. and Tolani, A.J. "Effect of growth hormone on ribonucleic acid metabolism". Biochem. J. 82, 173-5 (1962).
- Tashima, L. and Cahill, G.F. "Effects of insulin in the toadfish, *Opsanus tau*". Gen. Comp. Endocrinol., 262-71 (1968).
- Tata, J.R. "Membrane-associated ribonucleic acid in the cytoplasm and its turnover". Biochem. J. 105 [3] 47P (1967).
- Tata, J.R. "Regulation of protein synthesis by growth hormone and developmental hormonal". Regul. Mech. Protein Syn. Mammalian - Cells, Kettering Symp., 299-321 (1968).
- Tata, J.R. "Hormonal regulation of growth hormone and protein synthesis". Nature 219 [5152] 331-7 (1968).
- Tchobroutsky, G. "Secretion of growth hormone and energy metabolism in humans". Am. Endocrinol. 31 [1] 111-20 (1970).
- Teel, H.M. and Cushing, H. "Studies in the physiological properties of the growth hormone, growth-promoting extracts of the anterior hypophysis". Endocrinology 14, 157-63 (1930).

- Telib, M.; Melini, F.; Ditschuneit, H.; Ammon, J. and Pleiffer, F.F. "Comparative studies of the effect of glucose, tolbutamide ACTH, STH, glucagon and secretin on insulin secretion of isolated pancreatic tissues". *Symp. Deut. Ges. Endokrinol.* 12, 92-5 (1966).
- Theolyne, M. "Purification, physicochemical properties and structure of human hypophyseal growth hormone". *Ann. Endocrinol.* 31 [1] 100-10 (1970).
- Tomoue, T. and Yamamoto, K. "Effect of the thyroidectomy and a tyrosine supplement on amino acid incorporation into proteins of rat anterior pituitary". *Endocrinology* 81 [5] 1029-32 (1967).
- Toyoda, M. and Bessman, S.P. "A non-transport effect of insulin on protein synthesis". *Federation Proc.* 19, 164 (1960).
- Troitskaya, N.A. "The effect of insulin on the restoration of plasma proteins after blood loss". *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 12 [2] 26-9 (1968).
- Truckenbrodt, H. "Regulation of DNA, RNA and protein synthesis during physiological growth and the influence of anabolic and anti-anabolic substances in mice". *Aerztl. Forsch.* 23 [4] 121-8 (1969).
- Turkington, R.W. "Hormone induced synthesis of DNA by mammary gland in vitro". *Endocrinology* 82 [3] 540-6 (1968).
- Turkington, R.W. "Hormone-dependent differentiation of mammary gland in vitro". *Curr. Top. Dvelop. Biol.* 3, 199-218 (1968).
- Turkington, R.W. and Riddle, M. "Hormone dependent differentiation and phosphorylation of nuclear proteins during mammary gland differentiation in vitro". *J. Biol. Chem.* 244 [21] 6140-6 (1969).
- Ulrich, F.; Farver, H. and Li, C.H. "Effects of growth and adrenocorticotrophic hormones on the metabolism of albumin in hypophysectomized rats". *J. Biol. Chem.* 209, 117-25 (1954).

- Vasil'eva, L.E. and Il'in, V.S. "Participation of SH-groups in the realization of the stimulating action of insulin on the uptake of C¹⁴-glycine by tissues and on its incorporation into tissue proteins". *Biokhimiya* 35 [3] 458-62 (1970).
- Verméd. E.M. and Mitzkevich, M.S. "The influence of hormones on the growth of tissue cultures". *Compt.* (1935).
- Voigt, S.; Htey, L. and Konitzer, K. "Action of insulin upon cerebral metabolism". *Acta Biol. Med. Ger.* 24, 235-41 (1970).
- Vost, A. and Hollenberg, H.A. "Effects of diabetics and insulin on DNA synthesis in rat adipose tissue". *Endocrinology* 87 [3] 606-10 (1970).
- Voytovich, A.E.; Owens, I.S. and Topper, Y.J. "Action of insulin on phosphorylation formation by mammary gland explants". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 63 [1] 213-7 (1969).
- Wagner, E.M. and Scow, R.O. "Effect of insulin on growth in foree fed hypophysectomized rats". *Endocrinology* 61, 419-25 (1957).
- Waldhacual, W. and Beringer, A. "Effect of amino acids on the secretion of growth hormonw ans indulin in helathy and diabetic individuals". *Klin. Woschensschr.* 47 [7] 359-63 (1969).
- Wellers, G.; Chevan, J. and Galent, N. "Effect of growth hormone on the rate of irreversible degradation of free valine in vivo". *C.R. Acad. Sci., Ser.* 271 [3] 335=7 (1970).
- Wellers, G.; Chevan, J. and Galent, N. "Effect of somatotropic hormone on the rate of irreversible in vivo degradation of free methionine". *C.R. Acad. Sci., Ser.* 270 [22] 2686-8 (1970).
- Weist, F.R.; Schnell, K.; Scheifforth, F. and Zicha, L. "Influence of glycodiazine and glucagon on the binding of insulin to protein". *Arzneim. Forsch.* 18 [4] 475-8 (1968).

- Widnell, C.C. and Tata, J.R. "Additive effects of thyroid hormone growth hormone and testosterone on desoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in rat liver nuclei". *Biochem. J.* 98, 621-9 (1964).
- Wittman, J.S.; Lee, K.L. and Miller, O.N. "dietary and hormonal influences on rat liver polysome profiles, fat, glucose and insulin". *Biochim. Biophys. Acta* 174 [2] 563-43 (1969).
- Wiesniewski, K. "Transport effect of insulin and protein synthesis". *Postepy Biochem.* 16 [1] 33-9 (1970).
- Wolfgang, G. and Schimassek, H. "Effect of insulin and glucagon on the amino acid metabolism of intacted, isolated perfused liver". *Verh. Dent. Ges. Inn. Med.* 73, 267-72 (1967).
- Wool, I.G. and Krahl, M.E. "An effect of insulin on peptide synthesis independent of glucose or amino acid transport". *Nature* 183, 1399-1406 (1959).
- Wool, I.G. and Monroe, A.J. "An influence of insulin on the synthesis of a rapidly labeled RNA by isolated rat diaphragm". *Endocrinology* 14, 157-63.
- Wool, I.G. and Krahl, M.E. "Effect of insulin in vitro on incorporation of C¹⁴ from pyruvate into the protein of isolated rat diaphragm". *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 606-8 (1964).
- Wool, I.G. and Kurihara, K. "Determination of the number of active muscle ribosomes: effect of diabetes and insulin". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 58 [6] 2401-7 (1967).
- Wool, I.G.; Stirewalt, W.S. and Moyer, A.N. "Effects of diabetes and insulin on nucleic acid metabolism of heart muscle". *Amer. J. Physiol.* 214 [4] 825-31 (1968).

Wool, I.G.; Stirewalt, W.S.; Kurehara, K.; Low, R.B.; Bailey, P. and Oyer, D. "Mode of action of insulin in the regulation of protein biosynthesis in muscle". *Recent Progr.Horm.Res.* 24, 139 - 213 (1968).

Wool, I.G. and Scharff, R. "Effect of insulin and diabetes on amino acid transport in muscle". *Protein Nutr. Free Amino Acids Patterns, Annu. Res. Conf. Bur.Biol.Res.* 20, 157-86 (1965).

Wyatt, G.R. and Tata, J.R. "Hybridization capacity of fibronucleic acid produced during hormone action". *Biochem.J.* 109 [2] 253-8 (1968).

Young, V.R.; Cambridge, S.C. and Mac Donald, J. "The sedimentation of rat skeletal muscle ribosomes. Effect of hydrocortisone, insulin and diet". *Biochem.J.* 106 [4] 913-9 (1968).

Yudkowsky, E.B. "Relation of insulin and hypophyseal growth hormone to nucleic acid levels in the uterus of the ovariectomized rat". Avail. Univ. Microfilms, Ann. Arbor, Mich., Order No. 69-10, 073. From *Diss. Abstr. Int.*

Zachmann, M. "Influence of human growth hormone (HGH) on plasma amino acid and urine amino acid concentration in hypopituitary dwarfs". *Acta Endocrinol.* 62 [3] 513-20 (1969).

Zeigler, B.; Lippmann, H.G.; Mehling, R. and Jutzi, E. "Protein synthesis and glucose uptake of isolated myocardial cells of chick embryo and rats in primary culture". *Experientia* 25[7] - 781-2 (1969).

- Akamatsu, N.; Tsutomu, K.; Hideyasu, R.M.; Noriko, E.; Noriko, F. and Yoshiafi, M. "Effect of growth hormone upon the RNA polymerase and deoxythymidine kinase activities of regenerating liver in hipophysectomized rats". J. Biochem. 69 [6] 1091-1095 (1971).
- Buresova, M. "Nervous and hormonal factors in regulation of protein biosynthesis". Cesk. Fysiol. 19 [1-2] 7-25 (1970).
- Buck, M.D.; Schauder, P. and Ulrich, W. "The effect of insulin on the biosynthesis of nuclear protein in rat liver". Znaturforschteilb 25 [3] 276-279 (1970).
- Buck, M.D. and Schauder, P. "In vivo stimulation of carbon-14 labelled amino acid incorporation into nonhistone proteins in rat liver chromatin induced by insulin and cortisol". Biochim. Biophys. Acta 224 [2] 644-646 (1970).
- Clemens, M.J. and Korner, A. "Amino acid requirement for the growth hormone stimulation of incorporation of precursors into protein and nucleic acids of liver slices". Biochem. J. 119 [4] 629-634 (1970).
- Castells, J.J. "Insulin and the regulation of protein biosynthesis in muscle". Proc. Meat Ind. Res. Conf. 9-15 (1970).
- Fast, D.K.; Garland, M.; Thompson, M. and Richards, J.F. "Effect of growth hormone on DNA synthesis in rat liver". Exp. Cell Res. 62 [2-3] 441-446 (1970).
- Freychet, P.; Roth, J. and Neville, D.M. Jr. "Insulin receptors in the liver. Specific binding of ^{RS}I-insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68 [8] 1833-1837 (1971).

- Germanyuk, Y.L. and Mironenko, U.I. "Formation of aminoacyl-tRNA in the liver of rabbits with experimental diabetes mellitus and given insulin injections in combination with RNA". *Endocrinol.*, 16[5] 57-61 (1970).
- Goldstein, S. and Reddy, W.J. "Insulin and protein synthesis in muscle". *Arch. Biochem. Biophys.* 140 [1] 181-189 (1970).
- Guldotti, G.G.; Borghetti, A.F.; Lunebur, B. and Gazzola, G.C. "Kinetic analysis of insulin action on aminoacid uptake by isolated chick embryo heart cells". *Biochem. J.* 122 [4] 409-414 (1971).
- Heindel, J.J. "Growth hormone stimulation of aminoacid transport in tissues of the vitamin B6 deficient rat". Avail. Univ. Microfilms, Ann Arbor, Mich., Order No. 70-14, 539. From *Diss. Abstr. Int. B* 31 [2] 560-561 (1970).
- Hilder, R.C.; Fern, E.B. and London, D.R. "The effect of insulin on free aminoacid pools and protein synthesis in rat skeletal muscle in vitro". *Biochem. J.* 125[3] 751-756 (1971).
- Jackson, C.D.; Irving, C.C. and Sells, B.H. "Changes in rat liver transfer RNA following growth hormone administration and in regenerating liver". *Biochim. Biophys. Acta* 217[1] 64-71 (1970).
- Korner, A. "Insulin and growth hormone control of protein biosynthesis". *Contr. Processes Multicellular Organisms*, Symp. 86-107 (1969).
- Korner, A. "Hormonal control of protein synthesis". *Proc. Roy. Soc., Ser. B.*, 176 [1044] 287-290 (1970).
- Kostyo, J.L. and Rillema, J.A. "In vitro effects of growth hormone on the number and activity of ribosomes engaged in protein synthesis in the isolated rat diaphragh". *Endocrinol.*, 88 [4] 1054-1062 (1971).

- Liberti, J.P.; Wood, D.M. and Duvall, C.H. "In vitro stimulation of ¹⁴C-leucine incorporation into protein by growth hormone". *Endocrinology* 90 [1] 311-314 (1972).
- Maturo, J.M. "Insulin and protein metabolism in muscle: Evidence for a primary hormonal recognition site". 1969, 121 pp. Avail. Univ. Microfilms, Ann Arbor, Mich. Order No. 70-3375. From Diss. Abstr. Int. B. 30 [10] 4767 (1970).
- Manchester, K.L. "Hormones and aminoacid transport". *Protein Polypeptide Horm., Proc. Int. Symp.*, 296-299 (1968).
- Moolten, F.L.; Oakman, N.J. and Bucher, N.L.R. "Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress". *Cancer Res.*, 30 [9] 2353-2357 (1970).
- Millen, L.L. and John, D.W. "Nutritional, hormonal and temporal factors regulating net plasma protein biosynthesis in the isolated perfused rat liver. Effects of feeding or fasting liver donors and of supplementation with aminoacids, insulin, cortisol and growth hormone". *Plasma Protein*
- Manchester, K.L. "Sites of hormonal regulation of protein metabolism". *Mammalian Protein Metab.*, 4, 229-298 (1970).
- MacDonald, R.I. and Korner, A. "Growth hormone stimulation of protein synthetic activity of membrane-bound ribosomes". *FEBS Lett.*, 13[1] 62-64 (1971).
- Manchester, K.L. "Insulin and protein synthesis". *Biochem. Actions Horm.*, 1, 267-320 (1970).
- Morgan, H.E.; Jefferson, L.S.; Wolpert, E.B. and Rannels, D.E. "Regulation of protein synthesis in heart muscle: II Effect of aminoacid levels and insulin of ribosomal aggregation". *J. Biol. Chem.* 246[7] 2163-2170 (1971).

- Oravec, M. and Korner, A. "Stimulation of synthesis of DNA-like and ribosomal RNA by growth hormone". J. Mol. Biol. 58[2] 489-498 (1971).
- Payne, S.G. and Kostyo, J.L. "Inhibition by theophylline of the stimulatory effects of growth hormone on amino acid transport and protein synthesis in muscle". Endocrinology 87[6] 1186-1189 (1970).
- Pilkis, S.J. and Korner, A. "Effect of diabetes and insulin treatment on proteins synthetic activity of rat liver ribosomes". Biochem. Biophys. Acta 247 [4] 597-608 (1971).
- Rillema, J.A. and Kostyo, J.L. "Delayed action of growth hormone on the metabolism of the rat diaphragh". Endocrinology 88[1] 240-248 (1971).
- Rozgoni, I.I. "Effect of a somatotropic hormone on the incorporation of phosphorus-32 into the nucleic acids of animal tissues". Fiziol. Biokhim. Sil'skogospod. Tuarin 12 [93-7] (1970).
- Roy, C.C.; Gotlin, R.; Shapcott, D.; Montgomery, A and O'Brien, D. "Effects of insulin from normal and diabetic human pancreas on RNA labeling in fibroblast cultures". Diabetes 20[1] 10-14 (1971).
- Salmon, W.D., Jr. and DuVall, M.R. "In vitro stimulation of leucine incorporation into muscle and cartilage protein by a serum fraction with sulfation factor activity. Differentiation of effects from those of growth hormone and insulin". Endocrinology 87 [6] 1168-1180 (1970).
- Sineck, J.; Melka, J.; Horak, J.; Husakova, A.; Deml, F. and Kanta, J. "Influence of postoperative starvation on the content and synthesis of DNA in the liver tissue of rats after partial hepatectomy". Sb. Ved. Pr., Iek. Fak. Karolovy Univ. Hradis Kralove 14[2] 281-283 (1971).

- Talwar, G.P.; Jaiikhani, B.L.; Sharma, S.K.; Sopori, M.L.;
Pandina, M.R.; Sundharadas, G. and Rao, K.N. "Mechanism
of action of growth hormone and estrogen". Contr. Processes
Multicellular organisms, Symp., 108-130 (1969).
- Wool, I.G. "Action of insulin on protein synthesis". Diabetes
Proc. Congr. Int. Diabetes Fed., 6th, 16-24 (1967).
- Wool, I.G. "Insulin and amino acid transport in muscle". Protein
Polypeptide Horm., Proc. Int. Symp., 285-295 (1968).
- Wisniewski, K. "Insulin and transport across cell membranes".
Postepy Biochem., 17[2] 347-357 (1971).
- Wellers, G. "Somatotrophic hormone and the rate of in vivo
irreversible degradation of essential amino acids in the
free state". Arch. Int. Physiol. Biochem. 79[2] 369-383
(1971).