

03068

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

4
2y.

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

TESIS:

**RELACIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS Y HORMONA DE
CRECIMIENTO EN DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES**

Que para obtener el grado de Maestría en Ciencias Fisiológicas
presenta:

HILDA MARTÍNEZ CORIA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F., 1998

257607



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz y parcialmente en los laboratorios de los doctores Carlos Valverde Rodríguez, Enrique Pedernera y Lino Díaz de León en el Centro de Neurobiología, Facultad de Medicina e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, México D.F. 1993-1997. La tesis se realizó con ayuda de una beca para estudios de maestría de CONACyT y un complemento de beca de DGAPA, UNAM.

ÍNDICE

I. RESUMEN

II. INTRODUCCIÓN

A. Hormona de crecimiento

1. Estructura

a) Variantes moleculares de la GH

2. Efectos de la GH

a) Heterogeneidad molecular y funcional de la GH

3. Mecanismo de acción de la GH

4. Regulación de la secreción de GH

B. Yodotironinas

1. Estructura

2. Función

3. Regulación de la secreción

4. Desyodación periférica

a) Desyodación en aves

C. Interrelación entre la hormona de crecimiento y yodotironinas

D. Termorregulación

1. Termorregulación en aves

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

B. Objetivo particular

V. MATERIAL Y MÉTODOS

VI. RESULTADOS

VII. DISCUSIÓN

VIII. BIBLIOGRAFÍA

IX. ANEXOS

A. Anexo A: radioinmunoensayo

B. Anexo B: inmunoensayo enzimático

C. Anexo C: actividad 5³D por radio yodo liberado

D. Anexo D: actividad 5D por cromatografía en papel

AGRADECIMIENTOS

Por su ayuda en el aprendizaje y colaboración en el trabajo del laboratorio a:

El güero (Hector)	Carlos Arámburo
Javier	Carlos Calderón
Humberto	Brenda
Mónica	Claudia
Martha	Rosa María
Tana	Bertha
Maricela	Luz
Aurea	Gonzalo
Carlos Valverde	Chepina (Josefina)
Carlos Romero	Jesús Chimal

Por su apoyo económico y amortiguar mis múltiples depresiones provocadas por esta tesis a:

La mamá (Hortensia)	Ramón
La tía (Hilda)	Mauricio
Malú	Abraham
Hilda	Javier
EL güero	Maricela
Carlos Calderón	Mónica

Por apoyarme y permitir que desarrollara esta etapa de formación en sus laboratorios a los doctores:

Carlos Arámburo
Carlos Valverde
Enrique Pedernera

RESUMEN

La hormona de crecimiento (GH) es una familia de proteínas constituida por variantes moleculares de masa y carga, descritas en todos los vertebrados. La heterogeneidad molecular de la GH puede ser una de las explicaciones a su diversidad funcional. Se han descrito efectos metabólicos directos y efectos de crecimiento esquelético que son parcialmente directos y parcialmente mediados por el factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I). Uno de los efectos descritos para esta hormona ha sido su participación en la regulación del metabolismo periférico de las hormonas tiroideas a través de la inhibición de la vía de inactivación, que involucra la participación de la enzima desyodasa Tipo III, lo que se traduce en un aumento en los niveles circulantes de la forma más activa de las hormonas tiroideas (T3). Este efecto se ha estudiado en embriones de pollo, sin embargo, en otras especies se ha observado un aumento en los niveles de T3 por efecto de la administración de GH y se sugiere su influencia en la vía de activación de las hormonas tiroideas, específicamente sobre la enzima desyodasa Tipo I. El objetivo de este trabajo fue analizar la relación entre la GH y el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas en tres condiciones experimentales. Inicialmente se estandarizaron las distintas metodologías que permitieron evaluar los cambios en los niveles hormonales (GH, T3, T4) y en la actividad enzimática de las desyodasas Tipo I y III hepáticas en pollos de distintas edades. En un primer experimento se analizaron los cambios en los niveles de T4 y T3 por efecto de la administración de GH de pollo de origen recombinante (rcGH), se observó una disminución significativa ($p < 0.001$) en los niveles de T4 plasmática y un aumento significativo ($P < 0.001$) en los niveles de T3 circulante. Por lo tanto al analizar la relación T3/T4 se encontró un aumento significativo ($P < 0.001$) en la tasa de producción de T3, lo que sugiere que por efecto de la administración de rcGH se produce un aumento en la formación de T3 a partir de T4 periférica. En el segundo experimento se analizó el efecto inhibitorio de la administración rcGH y una variante molecular de la GH de 15 kDa a hepatocitos de embrión de pollo en cultivo primario. Se observó que ambos tratamientos producen este efecto de manera similar. Finalmente embriones de 19 días, pollos de 1-3 días y 13 días posteclosión fueron sometidos a bajas temperaturas durante diferentes tiempos con el objetivo de observar aumento en los niveles de T3 circulante y cambios en los niveles de GH que pudieran ser correlacionados, sin embargo, en ningún caso se encontraron cambios significativos por efecto de la temperatura.

INTRODUCCIÓN

Los organismos pluricelulares son sistemas organizados en los que grupos celulares se han especializado en determinadas funciones. La relación que existe entre un organismo y el ambiente que lo rodea, produce cambios en el individuo que generan una respuesta de diferentes tipos celulares, que aunque realicen tareas distintas están coordinadas para cumplir con una función en particular. La comunicación celular ocurre de manera general a través de mecanismos eléctricos y químicos. En algunas situaciones fisiológicas el organismo utiliza todas las formas de comunicación celular para mantener su medio interno dentro de parámetros considerados como estables. Un buen ejemplo de esto son los procesos de control de la temperatura o el desarrollo que están regulados por la interacción concertada de los sistemas neuroendocrino y nervioso. En ambos casos, las hormonas tiroideas y la hormona de crecimiento (GH) se mantienen en constante interacción, participando en procesos metabólicos como el anabolismo proteínico y el mantenimiento de la demanda energética. La relación entre estas hormonas se ha planteado en dos sentidos. Por un lado se han reconocido los efectos de las hormonas tiroideas sobre la síntesis y secreción de la GH a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis, lo que se ve reflejado en un aumento de los niveles circulantes de la hormona. A su vez, esta última participa en la regulación del metabolismo periférico de las hormonas tiroideas, provocando un aumento de su forma más activa (T3) en la circulación general.

Estas interacciones se han estudiado evaluando la participación de la familia de hormonas de crecimiento como una sola entidad, en este trabajo se estudió la relación entre la GH y el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas utilizando tres condiciones experimentales que permitieran evaluar la participación de cada una de las variantes moleculares de la GH en este efecto.

Hormona de crecimiento

La GH es una hormona proteínica que junto con la prolactina y el lactógeno placentario constituyen una familia de hormonas homólogas relacionadas estructural y funcionalmente (7).

Estructura

La GH está formada por una cadena de cerca de 200 residuos de aminoácidos (dependiendo de la especie) que contiene un asa central grande, así como un asa pequeña cercana al extremo carboxilo terminal, formadas por puentes disulfuro. La hormona tiene un peso molecular (PM) de aproximadamente 22,000 Da y es la forma más abundante en varias especies. En las aves representa aproximadamente el 10% de la proteína hipofisiaria total (73); está constituida por una cadena de 191 residuos de aminoácidos y los puentes disulfuro están formados por cisteínas localizadas en las posiciones 53-164 y 181-189 (7).

Variantes moleculares de la hormona de crecimiento.

La GH es una familia de proteínas homólogas pero no idénticas entre sí, constituida por variantes moleculares de masa y de carga (7). Su heterogeneidad molecular ha sido descrita en mamíferos (30, 49), aves (1, 2, 10, 39), reptiles (78) y peces (42).

En las aves hay evidencias suficientes de que existen una serie de variantes de masa tanto en la adenohipófisis (3, 39) como en el plasma (52). En la glándula, el análisis mediante la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras, revela que predomina la forma monomérica de la hormona (22 kDa). Sin embargo también se identifican formas de alto PM (3, 39) que corresponden probablemente a oligómeros o "agregados" de la forma monomérica, la mayor parte de ellos unidos por puentes disulfuro intercatenarios (7).

Cuando la electroforesis se hace en condiciones reductoras desaparecen la mayor parte de las formas de alto peso molecular, la proporción del monómero incrementa y permanece una pequeña cantidad de dímero resistente a la reducción. Adicionalmente se han encontrado 2 variantes de masa que posiblemente sean producto de un proceso proteolítico; una forma con un PM de 25 kDa observada en condiciones no reductoras y un fragmento de 15 kDa observada en condiciones reductoras. Por otra parte, cuando se analiza la GH

de pollo (cGH) por electroforesis no desnaturizante se han identificado tres variantes de carga (0.23, 0.3 y 0.35) (1). Cuando se incrementa la resolución utilizando isoelectroenfoque y Western blot es posible identificar de 8 a 10 variantes de carga (3, 39), algunas de las cuales parecen estar reguladas durante el desarrollo de estos animales (39).

La presencia de variantes de masa y carga de la cGH sugiere la existencia de mecanismos de modificación estructural que pueden ser secundarias a: 1) la multiplicidad génica; 2) el procesamiento alternativo de mRNA y 3) modificaciones postraduccionales (glicosilación, fosforilación, agregación, procesamiento proteolítico, desamidación, etc.). Al analizar la heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento de pollo se han estudiado las modificaciones postraduccionales de la hormona. Así, se encontró una variante glicosilada (la glicosilación contribuye con el incremento de PM en las proteínas). En condiciones reductoras la cGH glicosilada (G-cGH) tiene un PM aparente de 29 kDa. Estudiándola con diferentes criterios electroforéticos se mostró que esta isoforma también presenta heterogeneidad molecular (5), encontrándose 6 variantes glicosiladas, 3 de las cuales eran predominantes (pI= 6.52, 6.7 y 7.17) y todas ellas con el mismo PM (29 kDa). La G-cGH se ha medido en plasma y muestra variaciones de acuerdo con fluctuaciones fisiológicas (7).

Otra modificación postraducciona que contribuye a la heterogeneidad de carga en una proteína puede ser la fosforilación, confiriéndole características más ácidas a la molécula (7). Una proporción significativa de la hormona parece estar fosforilada (1) y las células de la hipófisis del pollo en cultivo primario pueden incorporar fosfato radioactivo a la banda inmunorreactiva a cGH cuya liberación es estimulada por el factor liberador de la GH (GRF) (4). Además, en estudios *in vitro* la hormona puede ser fosforilada a través de proteínas cinasas (proteínas involucradas en mecanismos de transducción de señales hormonales).

Por otro lado, como ya se dijo, se han encontrado 2 variantes de masa que posiblemente sean producto de un proceso proteolítico; la forma con 25 kDa sugiere una forma cortada de 2 cadenas. Esta forma al analizarse en condiciones reductoras desaparece e incrementa la proporción del fragmento de 15 kDa. Se ha sugerido por estudios *in vitro*, que enzimas del tipo de la trombina y/o la colagenasa podrían estar involucradas en la generación de la cGH cortada *in vivo* (6, 7).

Efectos de la GH

La heterogeneidad molecular de la GH puede ser una de las explicaciones a la diversidad funcional de la hormona. Así, se han descrito efectos metabólicos directos que facilitan el crecimiento muscular y la conservación de la glucosa y efectos de crecimiento esquelético que son parcialmente directos y parcialmente mediados por el factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I). Entre los primeros se incluyen: la estimulación de la lipólisis, captura y transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas, la inhibición de la lipólisis estimulada por adrenalina o por glucagon, inhibición de la lipogénesis inducida por la insulina, inducción de la resistencia periférica a la insulina (efecto diabético) y participación en la regulación de la absorción tubular de algunos iones. Por otra parte, estimula el crecimiento lineal del esqueleto participando en la diferenciación de los precondrocitos, estimula la diferenciación de preadipocitos, mioblastos y posiblemente de gran variedad de tejidos incluyendo la placa cartilaginosa de la epífisis (7). En la siguiente tabla se enlistan en general algunos de los efectos que se le han atribuido a la GH.

EFFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA GH

Efectos	Referencias
Crecimiento corporal directo e indirecto	Scanes C. G., 1995c
Liberación de IGF-I	Scanes C.G., 1995c
Mitogénesis en osteoblastos	Scanes C. G., 1986
Adipogénesis (diferenciación)	Scanes C. G., 1995e
Angiogénesis	Gould, J., 1995
Diabético	Scanes C. G., 1995d
Mantenimiento de la población celular del tejido linfático	Scanes C. G., 1995h
Estimulación del transporte de glucosa	Scanes C. G., 1995d
Lipólisis	Arámburo, C., 1990a
Antilipolítico inducido por glucagon	Arámburo, C., 1990a
Antilipogénico	Scanes C. G., 1995e
Transporte de aminoácidos y síntesis de proteínas en músculo	Scanes C. G., 1995f

Efectos	Referencias
Modulación en la función reproductiva y maduración sexual	Scanes C. G., 1995g
Osmorregulación	Scanes C. G., 1995i
Estimula la liberación de insulina	Scanes C. G., 1995j
Influencia la tasa de producción de T3 circulante (inhibición de la actividad 5-D-III hepática en pollos)	Scanes C. G., 1995j Darras, V.M., 1993
Efecto neuroendocrino (autorregulación a través del hipotálamo)	Harvey, S., 1995c
Neuromodulador y proliferación de neuronas y células gliales	Harvey, S., 1995d

Heterogeneidad molecular y funcional de la GH

Se sabe poco del papel de esta familia de hormonas durante el desarrollo embrionario. En el embrión de pollo se ha podido detectar actividad somatotrópica en la adenohipófisis a partir de 15 días de incubación así como la presencia de GH circulante poco tiempo después (25, 31). La concentración de la cGH circulante se incrementa progresivamente a partir del día 17 de incubación, para el día 1 a 3 de edad post-eclosión la concentración aumenta hasta 315% (31), alcanzando su máxima concentración entre los días 5 y 8 de edad. Por otra parte, se ha reportado que el patrón de variantes de masa en la adenohipófisis es diferente en distintas etapas del desarrollo, por ejemplo la forma de 15 kDa representa el 13.7% del contenido de GH en hipófisis de embriones de 18 días, comparado con 4.8% a las 4 semanas de edad y 1.2% en adultos. Asimismo, se observó que la proporción de formas de alto peso molecular, como la de 88kDa, es mayor a medida que se avanza en la edad, y están muy poco representadas en la etapa embrionaria (5% en embriones de 18 días y 17.9% en pollos de 4 semanas de edad). Esto sugiere que las variantes están sujetas a algún tipo de regulación dependiente del estadio de desarrollo del animal, y por ello se sugiere que la GH puede estar desempeñando papeles específicos en distintas etapas del desarrollo (7).

Se ha reportado especificidad de funciones para los distintos miembros de la familia de la GH. En humanos se ha visto que la isoforma de 20 kDa presenta actividad diabética y sobre el crecimiento equivalente al de la forma de 22

kDa, sin embargo, sus efectos tipo insulina son muy reducidos en estudios *in vitro*. Además se ha identificado que algunos fragmentos de la GH humana que contienen el extremo amino terminal tienen influencia hipoglucemiante, incrementando el efecto de la insulina, a diferencia del fragmento 172-191 de GH humana que tiene efecto hiperglucemiante y antilipogénico (60). En el pollo, al menos 2 variantes de carga ($R_f = 0.23$ y 0.3) presentan diferente bioactividad en el metabolismo de lípidos, siendo la 0.23 esencialmente lipolítica mientras que la 0.3 manifiesta una actividad antilipolítica (1, 3). Sin embargo, ambas presentan una actividad somatotrópica equivalente (7).

Mecanismo de acción de la GH

El receptor de GH (GHR) pertenece a la superfamilia de receptores hematopoyetina/citocininas en la que se encuentra la PRL, GH, citocininas, interferón e interleucinas, entre otros. Se caracteriza por contener un dominio extracelular, un dominio membranal y uno intracelular (34, 15). Los GHR presentan heterogeneidad molecular que también puede contribuir con la diversidad funcional de la GH. El GHR presenta modificaciones postraduccionales tejido-específicas como la glicosilación y ubiquitinación. Además, por edición alternativa se producen transcritos y proteínas de diferente tamaño. A través de estudios con anticuerpos monoclonales se han identificado subtipos de GHR en algunos tejidos como el hígado y tejido adiposo, y comparando la unión de estos receptores en algunos órganos con las formas 22 y 20 K de GH humana, se encontraron diferencias en su capacidad de unión (34).

La GH se une secuencialmente a dos moléculas de su receptor, causando su dimerización y cambios conformacionales importantes para la función de la hormona. Estos cambios producen un aumento en la unión del GHR y una tirosina cinasa de la familia Janus (JAK2), promoviendo la fosforilación de ambos en los residuos de tirosina por la misma JAK2. Esto produce la asociación y activación de una cascada de proteínas, en la que participan las proteínas SHC, Grb2, posiblemente proteínas como Sos, Ras, Raf y posteriormente las proteínas cinasas asociadas a microtúbulos, activadoras de la mitosis o reguladas por una señal extracelular (cinasas MAP/ERK) (esquema 1) (61 y 15). La fosforilación de estas cinasas produce la activación de otras cinasas, fosfolipasa A2, proteínas del citoesqueleto y factores de transcripción como los conocidos de respuesta temprana Fos y Jun, que son factores de

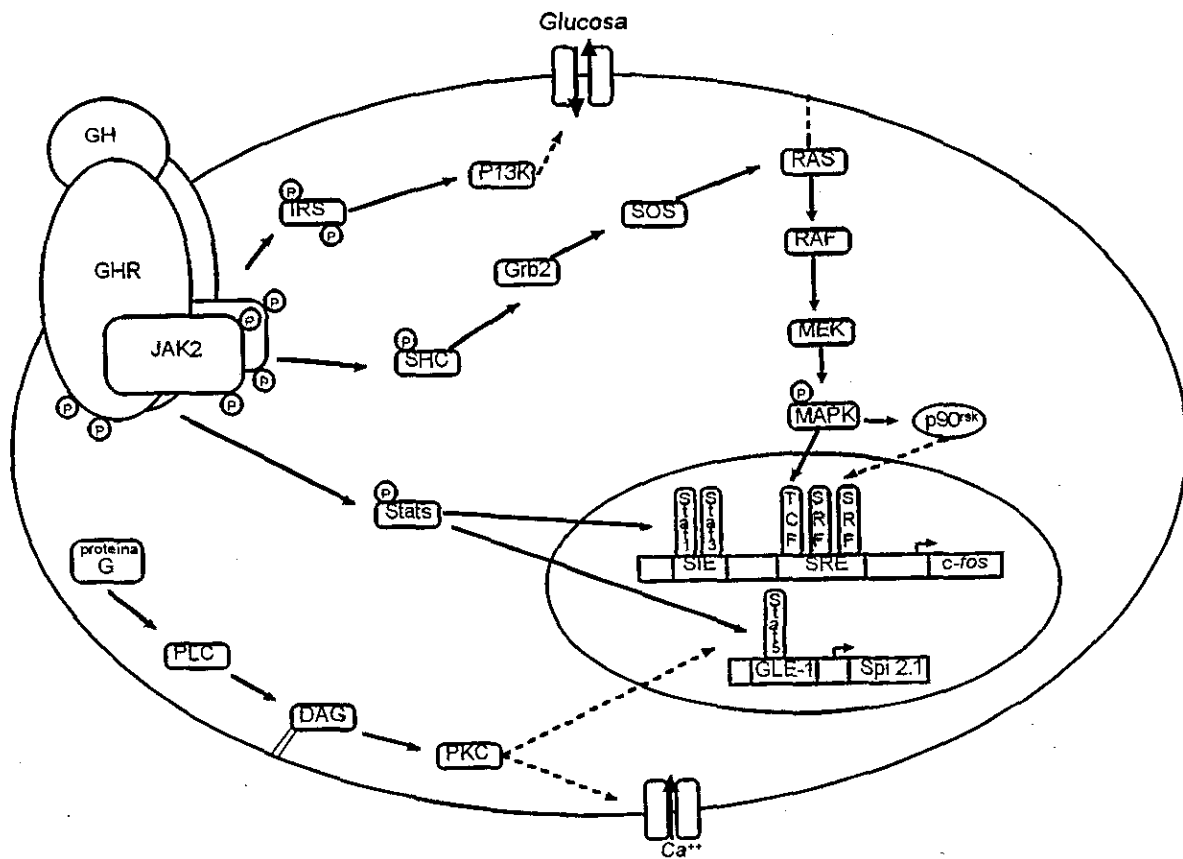
transcripción involucrados en el crecimiento, diferenciación y se relacionan con genes de respuesta tardía. Para la expresión de c-fos intervienen factores que se unen al DNA, como el factor de respuesta sérica (SRF) y el complejo de factores terceros (TCF). La GH también induce la expresión de genes como c-myc que codifica factores de transcripción involucrados en la proliferación celular. La regulación de eventos metabólicos por GH reflejan la expresión de genes específicos de cada tipo celular. En los adipocitos la GH participa en la expresión de enzimas lipogénicas y lipoproteínas a través de Fos. También participa en la expresión de los transportadores de glucosa (GLUT) y en el hígado interviene en la expresión del gen que codifica para IGF-1.

Se sugiere que a través de una vía directa y dependiente del tipo celular, en la que interviene JAK2, la GH activa proteínas de la familia Stat que son transductoras y activadoras de la transcripción, éstas se unen a otras proteínas formando homodímeros y heterodímeros que se translocan al núcleo y se unen con el DNA, activando la transcripción de genes blanco. La GH estimula la expresión del gen Spi 2.1 -que codifica en el hígado para un inhibidor de una serina proteasa-, con la intervención de un complejo proteínico que contiene una proteína Stat5 (15).

Una tercera vía de transducción de GH interviene en el efecto tipo insulina, es decir en el aumento del transporte de glucosa por reclutamiento de GLUT 1 y 4 en la membrana. En esta vía la GH y la insulina comparten moléculas señal como las proteínas llamadas "sustrato principal del receptor de insulina" (IRS). En respuesta a GH se fosforilan IRS-1 e IRS-2 y se piensa que se lleva a cabo a través de JAK2. En consecuencia se activa la fosfatidil inositol cinasa que se sabe que aumenta el transporte de glucosa, la síntesis de DNA y la actividad de una enzima implicada en el ciclo celular llamada p70 15 kDa. También se sabe que esta cinasa interviene en la síntesis de lípidos dependiente de GH y en la lipólisis inducida por noradrenalina (15).

Se ha reconocida una cuarta vía en la señalización de respuesta a GH es aquella en la que se activa una proteína cinasa C (PKC) que se requiere en efectos como lipogénesis, expresión de c-fos, unión de proteínas nucleares a oligonucleótidos, incremento de Ca^{2+} intracelular y activación de otras cinasas. La activación de PKC se lleva a cabo a través de la unión del GHR a una proteína G, que a su vez se une a una fosfolipasa C y en consecuencia se produce diacilglicerol (DAG) que se sabe que es un activador de PKC. El incremento de Ca^{2+} intracelular se produce por aumento en los canales tipo L

activados por voltaje y es importante en algunos efectos de la GH, como los tipo insulina. Otro efecto de GH que requiere el efecto permisivo de PKC es la expresión de enzimas como el citocromo P450, que está involucrado en el metabolismo de esteroides en ambos sexos y esta influenciado por las diferencias sexuales en la secreción de GH (15, 61).



Esquema 1. Mecanismo de acción de la GH (Carter-Su, 1996).

GH=hormona de crecimiento, GHR=receptor para la hormona de crecimiento, JAK2=tirocina cinasa de la familia Janus, SHC=proteínas de la familia Src-homologas, Sos=proteínas "son of seveless", MAPK= cinasas asociadas a microtubulos, ERK=proteínas tirocilfosforiladas dependientes de GH, MEK=ERK/MAP cinasas, TCFs=complejo de factores ternarios, SRF=factor de respuesta sérica, SRE=elemento de respuesta sérica, SIE=elemento inducible-sis, STAT= señal activadora y traductora de la transcripción, PLC=fosfolipasa C, DAG= diacilglicerol, PKC= proteína cinasa C, IRS=sustrato del receptor para insulina.

Regulación de la secreción

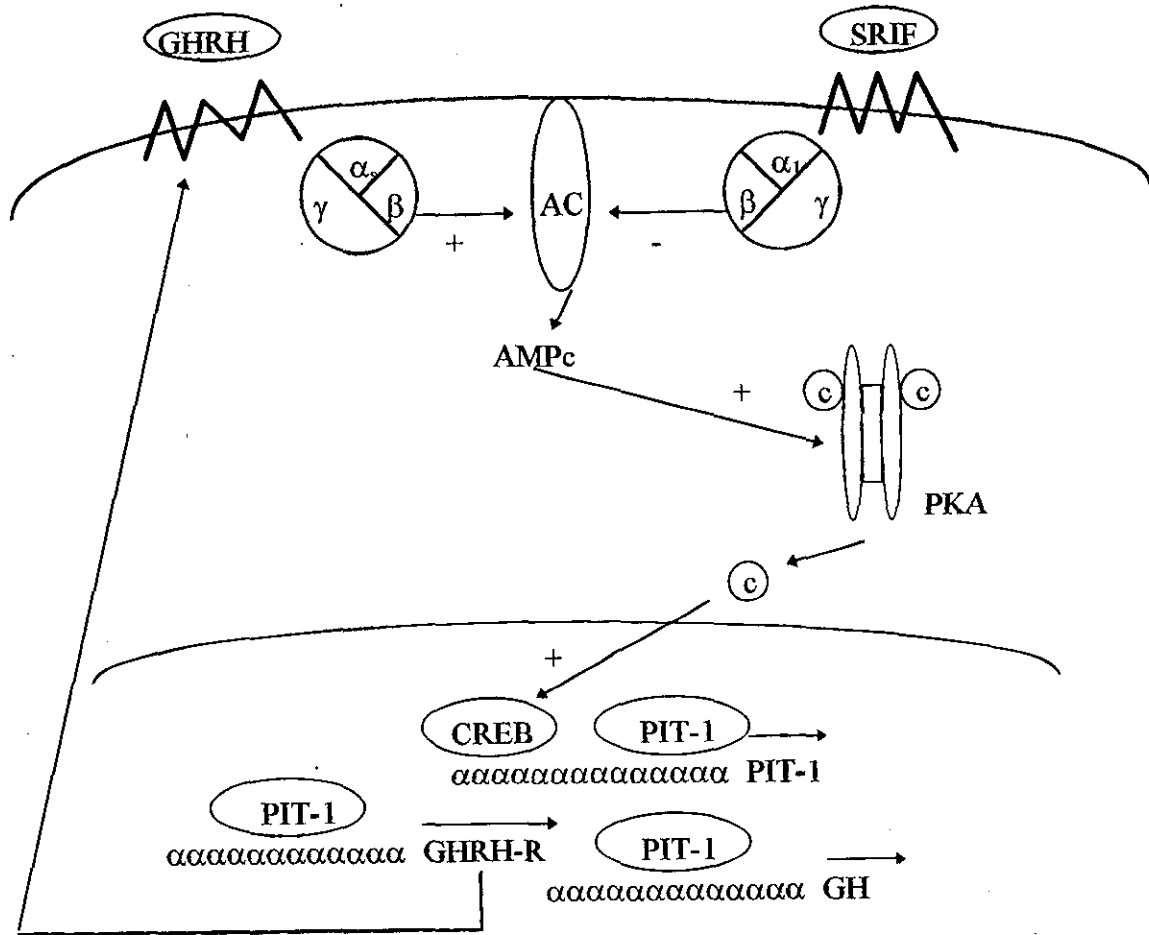
La secreción de GH se ha estudiado fundamentalmente con la GH total y se sabe poco del patrón de secreción de las variantes moleculares de esta hormona ante las diferentes señales que la regulan.

La GH se sintetiza y almacena en los somatotropos del lóbulo caudal de la adenohipófisis. Los niveles circulantes de la hormona se modifican ante situaciones como: el crecimiento y desarrollo, la privación de alimento, exposición al frío, el ejercicio y durante el sueño de ondas lentas (24).

En las aves la regulación de la secreción de GH involucra la integración de múltiples señales metabólicas y hormonales, dentro de estas últimas está involucrado el control hipotalámico en el que intervienen al menos 3 factores hipofisiotrópicos como son: la Hormona liberadora de la tirotrópina (TRH), el factor liberador de la Somatotropina (GHRH) y la Somatostatina (SRIF) (34).

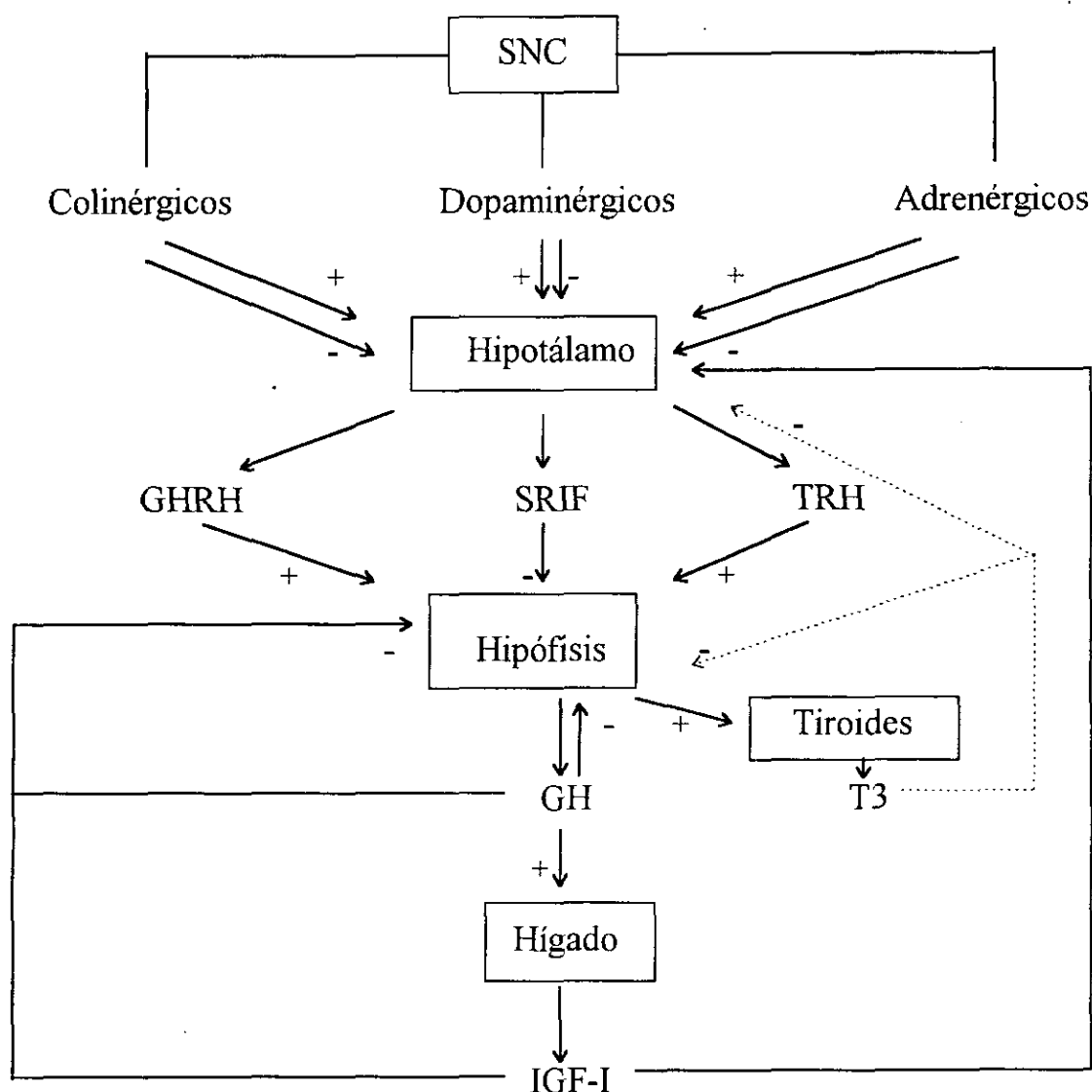
La expresión del gen de GH depende de distintos factores de transcripción activados vía AMP cíclico. La GHRH y la SRIF tienen un efecto antagónico sobre los niveles intracelulares del AMPc a través de la activación de proteínas Gs y Gi respectivamente. La activación de Gs permite la disociación de la subunidad α y en consecuencia la estimulación del adenilato ciclasa. El AMPc estimula la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc, permitiendo la disociación de la subunidad catalítica que se transloca al núcleo y fosforila el factor de transcripción CREB (elemento de respuesta de unión a proteína-AMPc) el cual activa la transcripción de los genes *c-fos* y Pit-1. Este último activa la expresión del gen de GH y del receptor de GHRH (11) (esquema 2).

La secreción de GH tiene un comportamiento pulsátil y los tejidos blanco son más sensibles a la frecuencia que a la cantidad secretada en un periodo similar. Un pulso de secreción de GH está controlado por la rítmica liberación alternada de GHRH y SRIF, este patrón intrínseco del ritmo hipotálamo-somatotropos puede ser modificado por algunos neurotransmisores, hormonas, y metabolitos intermediarios (24).



Esquema 2. Modelo teórico de transducción para la expresión del gen de GH en el somatotro.

La noradrenalina (adrenalina), acetilcolina, dopamina y algunos neuropéptidos como los péptidos opioides y la galanina participan en la liberación de GH a través de la regulación del efecto de los factores hipofisiotrópicos (24).



Esquema 3. Regulación de la secreción de GH. (..... solo en aves)

La secreción de la TRH está influenciada por los niveles circulantes de las HTs, por lo tanto, el incremento en la concentración de T3 tiene un efecto inhibitorio en la secreción de la GH inducida por TRH (32). En pollos, las HTs tienen un efecto inhibitorio sobre la síntesis y liberación de la GH inducida por TRH y GHRH, posiblemente a través de la disminución en la sensibilidad de los somatotropos a GHRH, por un lado, y por la reducción de los niveles de secretagogos de GH liberados (54).

Otra hormona que participa en el control de la transcripción del gen de GH y la liberación de ésta son los glucocorticoides, los cuales tienen un efecto estimulador. Los esteroides sexuales participan en la maduración del patrón de secreción de GH modulando GHRH y SRIF en el hipotálamo (24, 8).

Por otro lado se sugiere un mecanismo de regulación por GH llamado de asa ultracorta, en el que se supone un efecto inhibitorio sobre su secreción. También puede estar mediada por factores parácrinos extrasomatotrópicos, por ejemplo a través de las IGFs que se producen en la hipófisis en respuesta a GH, y que inhiben la liberación y transcripción del gen de GH basales e inducidas por GHRH. Además la GH sistémica disminuye su propia secreción basal o estimulada independientemente de cambios en otras hormonas o metabolitos inhibitorios como la glucosa o ácidos grasos libres. Se piensa que este efecto puede ocurrir por inhibición de los receptores a GHRH, TRH, por aumento de los receptores a SRIF, por la combinación de ambos en las membranas somatotrópicas o por daño en la señal de transducción. También la GH sistémica regula su secreción a través de su efecto sobre los niveles de otras hormonas como los IGFs hepáticos, entre otros (33).

Hormonas tiroideas

Las HTs, que se sintetizan, almacenan y secretan al torrente circulatorio por la glándula tiroides, constituyen una familia de mensajeros que por su naturaleza química también son llamadas yodotironinas.

Estructura

Hasta donde se sabe, las HTs son las únicas sustancias bioactivas de origen natural que contienen yodo en su estructura molecular. La incorporación de éste a la tiroglobulina -que es una glucoproteína dimérica sintetizada por la glándula tiroides- constituye un paso obligado para la síntesis de las tironinas. Esta molécula es la estructura básica a partir de la cual, y dependiendo del número y la posición de los átomos de yodo que contenga, se derivan las HTs (77). La tiroxina o tetrayodotironina (T4) tiene un peso molecular de 776.93 y contiene cuatro átomos de yodo en su estructura molecular, mientras que la triyodotironina (T3) contiene 3 yodos y un peso molecular de 651.01 (50).

Función

Las hormonas tiroideas tienen múltiples efectos fisiológicos que abarcan desde el nivel orgánico hasta el celular y molecular. En términos generales se han agrupado en dos categorías principales: 1) sus acciones y efectos sobre el desarrollo y 2) su participación en la regulación del metabolismo energético del organismo. El papel fisiológico de las HTs durante el desarrollo consiste básicamente en regular el crecimiento y maduración de los diferentes órganos y sistemas del individuo. Esto es particularmente claro en el caso del tejido nervioso. Actualmente se conoce que independientemente de la estrategia ontogénica de la especie, las HTs son determinantes para que en el período crítico correspondiente ocurran la neurogénesis y la maduración del sistema nervioso. Por otra parte, se sabe que las HTs controlan el consumo de oxígeno y el metabolismo energético del organismo a través de la regulación de la oxidación de carbohidratos y grasas, participando así en la síntesis de enzimas esenciales y proteínas estructurales y de exportación de prácticamente todas las células del individuo. La importancia de este papel regulador, ha llevado a sugerir que las HTs constituyen una parte fundamental de los mecanismos homeostáticos y homeorréticos o reostáticos que se instalan en el organismo durante diversos procesos fisiológicos.

Tradicionalmente, se ha señalado que por su tamaño y características fisicoquímicas las hormonas tiroideas difunden a la célula blanco por difusión pasiva y transportan directamente al núcleo celular, en donde estimulan la síntesis de proteínas. Sin embargo, en los últimos años, se han realizado estudios que muestran que las hormonas tiroideas interactúan con sitios específicos de unión o receptosomas en la membrana plasmática de las células blanco. Así ahora se reconoce que el transporte intracelular de las tironinas, es un proceso activo (dependiente de ATP), estereoespecífico y saturable, en el cual intervienen proteínas membranales con una afinidad moderada pero con una capacidad de unión relativamente alta con respecto a los receptores nucleares de T3. Además se ha señalado que estos sitios de unión en la membrana plasmática, están asociados con otros procesos de transporte como iones (Na^+ , Ca^{++}) y substratos metabólicos (glucosa). (21 y 70).

Regulación de la secreción

La síntesis y secreción de las HTs es regulada por mecanismos de naturaleza metabólica que dependen fundamentalmente del aporte dietético de yodo y por

mecanismos de naturaleza neurohumoral que mantienen los niveles de HTs circulantes. La función de la glándula tiroides está regulada por una compleja cascada de señales neuroendocrinas específicas, que desde el punto de vista funcional constituyen el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. (50) El hipotálamo estimula la síntesis y secreción de la hormona estimulante del tiroides o tirotropina (TSH), a través de la hormona liberadora de la tirotropina (TRH), e inhibe su secreción mediante la acción de la somatostatina (SRIF). A su vez la TSH, secretada por los tirotrópos de la adenohipófisis, es el factor más importante que determina el funcionamiento de la glándula tiroides, estimulando a las células foliculares o tirocitos para sintetizar y secretar HTs (77, 50). Cuando las concentraciones de estas últimas hormonas en el plasma se encuentran elevadas se inhibe la secreción de TSH (27).

Desyodación periférica

La T3 es la forma más activa de las HTs y en la mayoría de las especies, el 80% de ella se produce fuera de la tiroides por desyodación en la posición 5' de la T4 (50). Sin embargo, se ha reportado que la glándula tiroides de las aves produce sólo T4, de tal manera que en esta especie la producción de T3 es totalmente extratiroidea o periférica (48). Por otro lado, la desyodación periférica de la T4 genera prácticamente el total de la triyodotironina reversa (rT3), un isómero de la T3 al cual no se le conoce actividad biológica. Se ha mostrado que las tironinas son desyodadas de manera selectiva y diferencial en prácticamente todos los órganos del individuo, la desyodación es órgano-específica y cada uno presenta marcadas diferencias en los niveles de actividad enzimática, lo que determina a nivel local la concentración y tipo de tironina, regulando así su efecto biológico (50). Esta biotransformación implica la desyodación del anillo fenólico o externo (5'D), por medio de la cual la T4 se convierte en T3 y la rT3 en 3,3'-T2, y la desyodación del anillo tirosilo o interno (5D) que a partir de la T4 se genera en rT3, y a partir de la T3 forma 3,3'-T2. Por sus implicaciones fisiológicas la desyodación 5'D y la 5D se conocen como vías de activación y desactivación, respectivamente (77). En este proceso se ha descrito la participación de tres enzimas: la 5'D Tipo I y II y la 5D-III. La 5' desyodasa tipo I, característica del hígado, riñón y tiroides, cuyo principal sustrato es la rT3 y T4, y en menor grado la T3, desyoda en la posición 5', sin embargo también tiene actividad 5D (50). El estado de sulfatación de las tironinas parece tener influencia en la reacción catalítica de

esta enzima; las tironinas no sulfatadas (T4 y rT3) son predominantemente desyodadas en el anillo externo (5'D), mientras que las sulfatadas (T4 y T3) se desyodan en el anillo interno (5D) (72). Se ha reportado que gran parte de la T3 producida por la 5'D-I se exporta a la circulación sanguínea, por lo que se propone que el hígado y el riñón son la fuente principal de T3 circulante. La 5'desyodasa tipo II, característica del sistema nervioso central, hipófisis, grasa parda, recientemente se ha identificado en suprarrenal y pineal, su principal sustrato es la T4, por lo que se le llama "la verdadera desyodasa de la T4", sin embargo también desyoda a la rT3. La T3 producida a través de la actividad 5'D-II es utilizada por las células del mismo órgano que la produce, excepto en la grasa parda, que en determinadas situaciones fisiológicas aporta cantidades significativas de T3 a la circulación. Finalmente la 5 desyodasa tipo III, que es característica del sistema nervioso central y placenta, desyoda en la posición 5 y utiliza como sustrato a la T3 preferentemente sobre la T4, por lo que incide directamente en la desactivación de la hormona (50).

Desyodación en aves.

La biotransformación de las hormonas tiroideas se ha estudiado principalmente en mamíferos, sin embargo existen evidencias de la presencia de enzimas con actividad comparable en las aves, donde la tipo I se encuentra presente en hígado (26) y riñón (50), mientras que la actividad tipo II se ha reportado en el hígado de codorniz (18) y en el cerebro de pollo (76), y finalmente la actividad tipo III se ha encontrado en hígado y cerebro de pollo (26). Además, se ha encontrado que la conversión de T4 a T3 aumenta durante la exposición al frío, cambios nutricionales (composición de la dieta) y por diferencias entre las líneas de pollos.

Por otra parte, el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas madura durante el periodo tardío del desarrollo del sistema tiroideo. Se ha descrito que la actividad 5'D está presente en el pollo a los 5 días de la embriogénesis y que en el cerebro la 5'D-II muestra un patrón ontogénico bifásico que está relacionado con la maduración neural en las especies precociales. La actividad 5'D decrece durante la sinaptogénesis y simultáneamente aumenta la actividad 5D-III (76). Esta disminución en la actividad 5'D en los embriones inmaduros posiblemente protege el desarrollo del tejido nervioso durante esta etapa, evitando su sobreexposición a la T4 o a la T3 que se genera a partir de la primera (T3/T4) (71). Posteriormente, la actividad 5'D se vuelve a elevar

alrededor del día 18 de la embriogénesis. Un patrón similar se puede observar en el hígado durante la embriogénesis, en el que la actividad 5'D-I se incrementa en los días 11-12 y 18-20 (76). Las concentraciones plasmáticas de T3 en los días cercanos a la eclòsion aumentan principalmente debido a la actividad 5'D y a los bajos niveles en la actividad 5D del hígado, mientras que la actividad en el riñón no es importante durante esta etapa (18). Esta elevación de T3 durante la etapa perinatal está asociada con el inicio de la calorigénesis, entre otros factores (57).

Interrelación de la hormona de crecimiento y las yodotironinas.

La GH y las HTs son hormonas que participan en procesos metabólicos del organismo, su interrelación esta dirigida a la regulación del metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Se sabe que las HTs tienen efecto sobre la producción de GH, a través de la regulación del gen que codifica para la síntesis de esta última. Específicamente, la T3 forma con sus receptores nucleares un complejo hormona-receptor, que se une a los llamados "elementos para la respuesta tiroidea (TREs)" del DNA y estimula la transcripción del GH-RNA, la T3 regula de manera primaria la síntesis de la hormona. Se sugiere que diferentes clases de receptores (α y β) para HTs juegan diferentes papeles durante el desarrollo, en estudios realizados con receptores β se observó que los niveles de éste, están regulados durante el desarrollo embrionario de la rata y el pollo (50). Sin embargo, en el pollo se ha visto que un aumento en las HTs produce una disminución en la síntesis y secreción de cGH (54).

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que la GH tiene un efecto estimulador sobre los niveles circulantes y la producción hepática *in vitro* de T3 en embrión de pollo (46) y los cambios que ocurren al respecto después de la eclòsion (17). El incremento de los niveles basales de la T3 es debido al efecto combinado de la actividad 5'D y 5D en el que predomina la actividad 5'D. Darras y colaboradores (1992b) reportaron que la GH actúa disminuyendo la actividad enzimática de la 5D-III, permitiendo así que las concentraciones de T3 se incrementen durante este periodo. En los trabajos realizados en pollos de diferentes edades se observó que la administración de GH tiene efecto en el metabolismo de las hormonas tiroideas en embriones de pollo y animales

adultos. Sin embargo, la administración de suero anti-cGH en pollos en crecimiento (20) produce disminución de los niveles circulantes de T3. Se piensa que durante el crecimiento rápido no se puede evaluar el efecto de la GH administrada porque los receptores para esta hormona se encuentran disminuidos por los altos niveles de GH endógena. En la siguiente tabla se enlistan algunos trabajos sobre el efecto de la GH sobre el metabolismo periférico de las HTs en diferentes especies.

Influencia de la GH sobre el metabolismo periférico de las HTs.

Especie	Estudio	Resultado	Referencia
Niños deficientes en hGH	administración de hGH	aumento de T3 y disminución de T4	Sato, 1977
Humanos adultos normales	administración de rhGH	aumento de T3 y disminución de T4	Moller, 1992
Ratas tiroidectomizadas	administración de hGH	aumento en la tasa de depuración de T3 aumento de T3 hepática, renal e hipofisiaria	Gelhoed, 1992
Cerdos jóvenes	administración de pGH	aumento de T3 y disminución de T4	Kirwood, 1989
Bovinos hembras adultas, lactantes, en crecimiento y borregos en crecimiento	administración crónica de bGH	no hay modificaciones de T3 y T4 circulantes	Capucco, 1989, Peel, 1983
Bovinos hembras lactantes	administración crónica de bGH	aumento de la desyodación 5' en glándula mamaria	Capuco, 1989
Bovino	administración crónica de bGH	aumento ligero de T3	Byatt, 1992
Borrego recién nacido	administración de oGH	aumento de T3	Kühn, 1986

Especie	Estudio	Resultado	Referencia
Embriones de pollo	administración de TRH y GRF	aumento de GH aumento de T3 y actividad 5'D hepática	Kühn, 1988
Pollos adultos	administración de oGH	aumento de T3 y de la actividad 5'D	Kühn, 1987
Pollos de 1 día	administración de cGH	No se observan cambios	Darras, 1990
Embriones de pollo	administración de cGH	disminución de la desyodación 5-III y sin efecto sobre la 5'-I	Darras, 1992b
Pollos de 4 semanas	administración de anti-cGH	disminución de T3 y aumento de T4 plasmáticas	Darras, 1993
Peces	administración de GH	aumento en la conversión de T4 a T3	deLuze, 1984
Trucha (<i>in vitro</i>)	administración de GH	No afecta la desyodación 5' hepática	Sweeting, 1992

hGH=GH humana; rhGH= GH humana de origen recombinante; pGH=GH porcina; bGH=GH bovina; oGH= GH ovina; cGH= GH de pollo

Termorregulación

Las aves y los mamíferos mantienen su temperatura dentro de niveles casi constantes (homeotermia), a pesar de las variaciones del medio. Esto es resultado de la interacción de mecanismos aislantes, endotérmicos y termolíticos. Los mecanismos termorregulatorios en homeotermos son de naturaleza nerviosa y neuroendocrina, se activan cuando la temperatura del medio es superior o inferior a un valor relativamente estable conocido como zona termoneutral, que es cuando en el individuo no se altera la tasa metabólica apreciablemente.

La relación térmica del organismo con su entorno está mediada por los termorreceptores cutáneos (sensibles a frío y sensibles a calor), estructuras nerviosas especializadas en registrar las fluctuaciones de temperatura y enviarlas como impulsos aferentes hasta los centros integradores (15). De manera general el hipotálamo posterior y la médula espinal controlan los

mecanismos de conservación del calor que se activan cuando los homeotermos son expuestos a bajas temperaturas (12).

En respuesta al frío interviene el sistema simpatoadrenal y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por lo cual hay vasoconstricción cutánea, piloerección, aumento en los niveles de catecolaminas y glucocorticoides circulantes. En consecuencia se da un incremento en la gluconeogénesis y el catabolismo proteínico (55). Simultáneamente se activan mecanismos termogénicos como el tiriteo que es un aumento en el tono de la musculatura esquelética (44).

Posteriormente se instala un proceso conocido como termogénesis sin tiriteo en la que interviene el tejido graso pardo, cuyas mitocondrias contienen una proteína llamada termogenina o proteína desacopladora (UCP). Esta proteína aumenta el gradiente eléctrico intramitocondrial provocando un pobre acoplamiento en la cascada de la fosforilación oxidativa y por ende en la síntesis de ATP. Esta respuesta termogénica depende de la inervación simpática que estimula la síntesis de la UCP, la movilización de lípidos e induce la hipertrofia del tejido. También las hormonas tiroideas (HTs) participan promoviendo el aumento del número de receptores β -adrenérgicos en el tejido graso pardo y la T3 es un factor limitante en la síntesis de UCP. Los glucocorticoides por otro lado, favorecen la termogénesis sin tiriteo debido a sus efectos lipolíticos (37). También la hormona de crecimiento (GH) participa durante el proceso de adaptación al frío por sus efectos en el metabolismo de lípidos (38).

Termorregulación en aves

En la aves existen algunas diferencias en los mecanismos de conservación y producción de calor. En general, podemos decir que su plumaje es altamente impermeable y aislante, la tasa metabólica es mucho más elevada con respecto a los mamíferos y carecen de tejido graso pardo (38).

Las aves en general son poco tolerantes a las altas temperaturas, sin embargo, la disminución de la temperatura parece ser menos seria, la tasa metabólica y la actividad cardíaca se mantiene esencialmente constante en intervalos de temperatura muy grandes, además se ha reportado que los embriones de pollo doméstico sobreviven a 0°C durante 1hr en cualquier periodo del desarrollo, aunque con la exposición crónica a bajas temperaturas se observa retraso en el crecimiento (9). Tazawa, H. y col. (75) sostienen que los embriones de pollo hasta los 17 días no presentan respuestas compensatorias al enfriamiento del

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la GH participa en el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas a través de la regulación de la actividad desyodativa. Asimismo, se ha observado en algunas especies, en diferentes estados fisiológicos que la administración de GH induce un aumento en los niveles circulante de T3. En el caso de las aves se ha atribuido principalmente a la inhibición de la desyodasa Tipo III. Por otra parte, con respecto a las variantes moleculares de la GH se conoce que existe especificidad de función, por lo que se puede pensar que sólo algunas de estas están participando en la regulación de la desyodación periférica de las hormonas tiroideas.

Además, en el proceso de termorregulación se da un aumento de la T3 circulante, lo que permite plantear que la GH puede estar relacionada con este cambio.

HIPÓTESIS

La hormona de crecimiento y algunas de sus variantes tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la Desyodasa Tipo III hepática en pollos, con el consecuente incremento en la producción extratiroidea de T3.

Durante el proceso de termogenesis en pollos expuestos al frío la hormona de crecimiento participa en el aumento de los niveles de T3.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la GH participa en el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas a través de la regulación de la actividad desyodativa. Asimismo, se ha observado en algunas especies, en diferentes estados fisiológicos que la administración de GH induce un aumento en los niveles circulante de T3. En el caso de las aves se ha atribuido principalmente a la inhibición de la desyodasa Tipo III. Por otra parte, con respecto a las variantes moleculares de la GH se conoce que existe especificidad de función, por lo que se puede pensar que sólo algunas de estas están participando en la regulación de la desyodación periférica de las hormonas tiroideas.

Además, en el proceso de termorregulación se da un aumento de la T3 circulante, lo que permite plantear que la GH puede estar relacionada con este cambio.

HIPÓTESIS

La hormona de crecimiento y algunas de sus variantes tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la Desyodasa Tipo III hepática en pollos, con el consecuente incremento en la producción extratiroidea de T3.

Durante el proceso de termogenesis en pollos expuestos al frío la hormona de crecimiento participa en el aumento de los niveles de T3.

huevo, no obstante, a partir del día 18 de incubación se observa un incremento en la respuesta metabólica. Estos autores consideran que los pollos de esta edad son organismos homeotermos endotermicos, pero no tienen la posibilidad de responder eficientemente debido a la baja difusión de oxígeno a través del cascarón, lo cual limita la capacidad de producción de calor.

Por otra parte, algunos autores piensan que la termogénensis sin tiriteo en las aves se origina en el hígado y en los músculos principalmente e interviene la oxidación de lípidos como principal proceso de producción de calor. La participación de las HTs es muy claro, existe un aumento en los niveles plasmáticos de T3 en respuesta al frío (38). Existe una correlación directa entre el consumo de oxígeno y los niveles plasmáticos de T3 en pollos durante diferentes etapas del crecimiento. Durante la adaptación al frío en el invierno se han observado altos niveles de ácidos grasos libres que coincide con altos niveles de GH plasmática y se piensa que su efecto lipolítico controla el metabolismo de lípidos durante este proceso (38).

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la relación que existe entre la GH y el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas.

Objetivos particulares

1. Estandarización de métodos analíticos.
 - a) Obtención de una curva patrón para determinar cGH por Inmunoensayo enzimático (ELISA).
 - b) Obtención de una curva patrón para determinar la concentración de T4 de pollo por Radioinmunoensayo (RIA).
 - c) Obtención de una curva patrón para determinar la concentración de T3 de pollo por Radioinmunoensayo (RIA).
 - d) Determinación de la concentración de proteína apropiada para determinar la actividad 5'D hepática en pollos por el método de Radioyodo liberado.
 - e) Determinación de la concentración de proteína apropiada para determinar la actividad 5D hepática en pollos por cromatografía en papel.
2. Analizar en un modelo *in vivo* el efecto fisiológico de la GH exógena sobre la secreción y metabolismo de las hormonas tiroideas.
 - a) Determinación de las concentraciones periféricas de las hormonas: T3, T4 y la relación T3/T4, en pollos tratados con rcGH.
3. En un modelo *in vitro* analizar la participación de la GH en la regulación de la vía de desactivación hepática de las hormonas tiroideas.

- a) Determinación de la actividad 5D-III en cultivo primario de hepatocitos de embrión de pollo de 18 días tratados con 1, 5, 10, 50, 100 y 500 ng totales de rcGH y rcGH de 15 kDa.
4. Analizar la participación de la GH en la respuesta tiroidea, secundaria a la termorregulación en diferentes estadios fisiológicos.
 - a) Análisis de los niveles de rcGH en embriones de 20-21 días sometidos a 25-28 y 38 °C durante 2, 4, 8, 19 y 24 horas.
 - b) Análisis de los niveles de rcGH, T4, T3 y la actividad 5'D hepática de pollos de 1-2 días sometidos a 26-28 y 36-38 °C durante 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas.
 - c) Análisis de los niveles de rcGH, T4, T3 y la actividad 5'D hepática de pollos de 13-15 días sometidos a 15 y 32 °C durante 0.5, 12, 24, 37, 48 y 63 horas.

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico

Animales

Para llevar a cabo los diferentes experimentos propuestos (véase más adelante) se utilizaron embriones de pollo de 19, 20-21 días, pollos de 1-3 y 13-15 días posteclosión.

Procedimientos Analíticos

La determinación de las concentraciones circulantes de T4, T3, cGH total, la actividad desyodativa 5'D total y la actividad 5D-III de los embriones y pollos, se llevó a cabo siguiendo los procedimientos estandarizados en los laboratorios del Dr. C. Valverde y el Dr. C. Arámburo;

1. Yodotironinas y actividad desyodativa:

a) Radioinmunoensayo para T3:

Las condiciones para el RIA de T3 fueron: el anticuerpo a una dilución 1:10000, antígeno radioactivo 10 pg/100 µl, antígeno "frío" de 15.6 a 500 pg/100 µl para la curva estándar, 50 µl de suero hipotiroideo homólogo o 50 µl de suero problema, ANS en una proporción de 1 mg/ml de la solución de antígeno radioactivo y cbp de Tris-HCl (Tris 0.05 M, pH 8.6) para obtener un volumen final de 500 µl. La separación de las fracciones unida y libre se llevó a cabo con carbón activado (carbón 0.5%, dextrans 0.5%).

Radioinmunoensayo para T4:

Para el RIA de T4 el anticuerpo se utilizó 1:2000, antígeno radioactivo 10 pg/100 µl, antígeno "frío" de 12.5 a 800 pg/100 µl para la curva estándar, 10 µl de suero hipotiroideo homólogo o 10 µl de suero problema, ANS en una proporción 0.5 mg/ml de la solución de antígeno radioactivo y cbp de Tris-HCl para obtener un volumen final de 500 µl. La separación de las

fracciones unida y libre se llevó a cabo con 25 μ l de segundo anticuerpo, 10 μ l de suero normal de conejo y 1 ml de PEG al 20% (ver anexo A).

b) Actividad desyodativa 5'D-I (Valverde, 1993)

Los tejidos se homogeneizaron en amortiguador (HEPES 10 mM, sucrosa 0.32 M, EDTA 1.0 mM, pH 7.0), en una proporción 1:10 (100 mg de tejido/1 ml de amortiguador).

Las condiciones del ensayo estándar para el hígado fueron las siguientes: 200 fmol de rT3 [I^{125}], 0.5 μ M de rT3 fría, 1-7 μ g de proteína y 10 mM DTT. El volumen final fue de 150 μ l. Para detener la reacción se adicionaron 50 μ l de suero bovino 50%, 10 mM PTU, y 350 μ l de ácido tricloroacético al 10%. El radioyodo liberado fue medido después del aislamiento de las hormonas por cromatografía sobre columnas de Dowex 50 W-X2 eluidas con 2 ml de ácido acético al 10% (ver anexo C).

c) Actividad desyodativa 5D-III

Los tejidos se homogeneizaron en amortiguador (HEPES 10 mM, sucrosa 0.32 M, EDTA 1.0 mM, pH 7.0), en una proporción 1:10 (100 mg de tejido/1 ml de amortiguador).

Las condiciones del ensayo estándar para el hígado y hepatocitos fueron las siguientes: PTU 1 mM, DTT 100 mM, T3* 200 fmol, rT3 1 μ M, T3 0.1 μ M, 3 h a 39°C y 0.2 mg de proteína/ml. El volumen final fue de 300 μ l. Para detener la reacción se adicionaron 200 μ l de etanol. La cantidad de hormona desyodada fue determinada por cromatografía en papel (ver anexo D).

2. Hormona de crecimiento.

a) Inmunoensayo enzimático (ELISA) para cGH circulante.

Para el método de ELISA se incluyeron los siguientes pasos: 1) Se recubrieron los pozos de las microplacas con la solución de antígeno (6 ng de cGH/100 μ l de amortiguador de carbonato, 0.1 M pH 10.3) durante toda la noche, 2) simultáneamente se incubaron las muestras y las diluciones para la curva estándar, con el primer anticuerpo, 3) las placas se lavaron y bloquearon con BSA, 4) se lavaron nuevamente las placas y se les adicionó la mezcla de muestra (o el estándar) y anticuerpo a los pozos, 5) después de otro lavado se les agregó el segundo anticuerpo unido a HRP, 6) se volvieron a lavar las placas y se les adicionó el sustrato HRP, 6) la reacción enzimática se termina con la adición de ácido sulfúrico 1 mM y 8) se mide la absorbencia a una λ de 490 nm (ver anexo B).

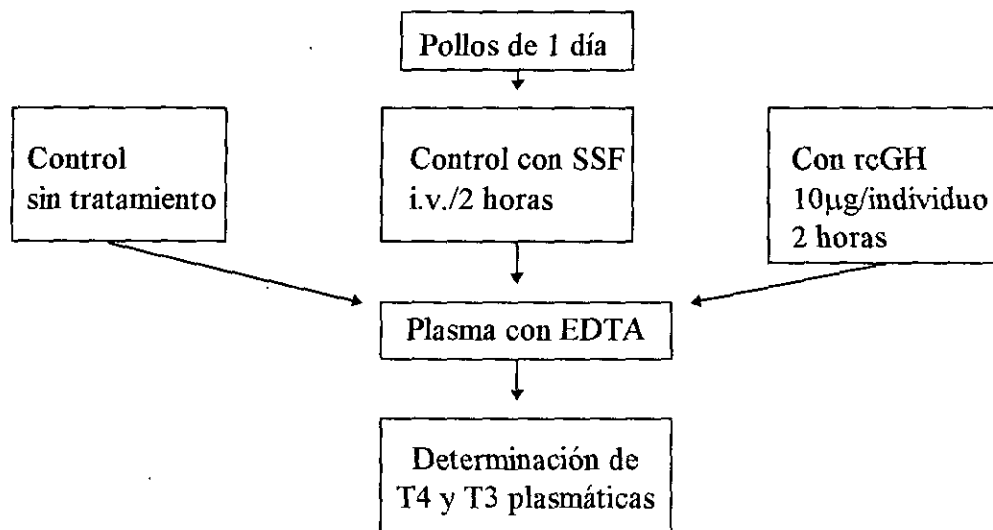
3. Cultivo primario de hepatocitos de embrión de pollo

Se removieron los hígados de embriones de pollo de 19 días de incubación en una campana de flujo laminar. Se dispersaron con 0.2% de colagenasa y se sembraron en cajas de 35mm con una densidad de 1×10^5 /cm² en medio MEM con 10% de suero hipotiroideo y penicilina 200 U/ml, en un ambiente con 95% de aire y 5% de CO₂, hasta semiconfluencia.

Posteriormente se agregaron los siguientes tratamientos: 5, 10, 50, 100, 500 ng totales de rcGH y 1, 5, 10, 50, 100 ng totales de rcGH 15kDa, durante 24 horas. Al otro día se lavaron con amortiguador de HEPES, se recolectaron las células en ese amortiguador y se congelaron a -70°C. Para la determinación de la actividad 5D-III se sonicaron y centrifugaron 5 minutos a 10,000 rpm en la microfuga.

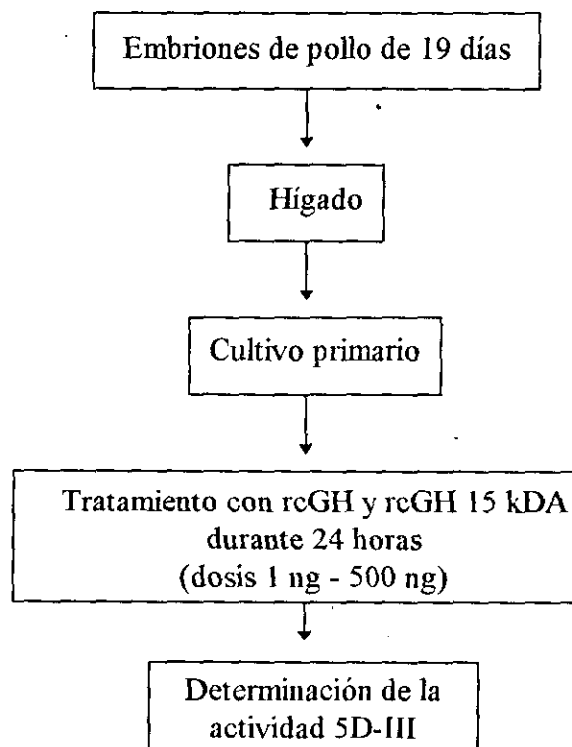
Diseño experimental

Efecto fisiológico de la GH exógena sobre la secreción y metabolismo de las hormonas tiroideas

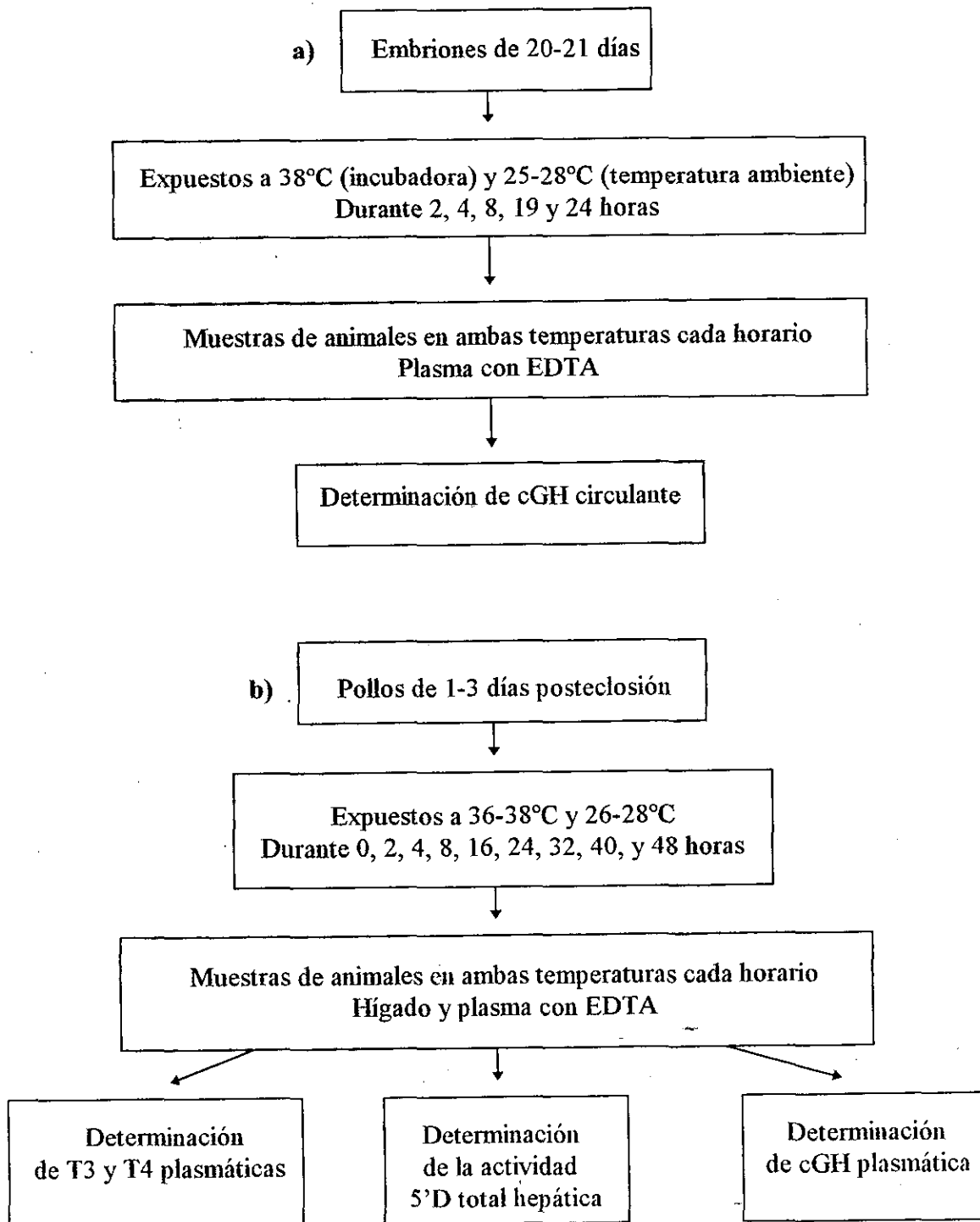


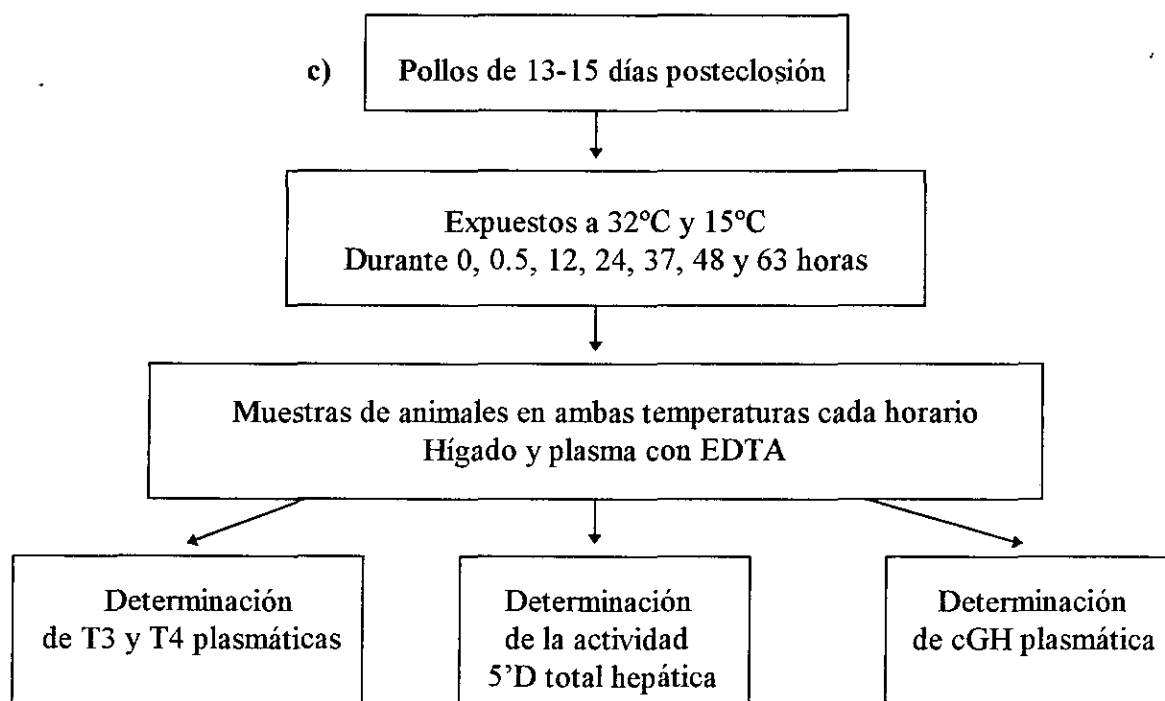
El análisis estadístico se realizó a través de una prueba de ANOVA de una vía.

Efecto de rcGH y rcGH 15kDa sobre la actividad 5D-III en cultivo primario de hepatocitos.



Participación de la GH en la respuesta tiroidea, secundaria a la termorregulación en diferentes estadios fisiológicos.





El análisis estadístico se realizó a través de pruebas de ANOVA de 2 vías y pruebas de Kruskal Wallis no paramétrica para los resultados que no tuvieron igualdad de varianzas.

RESULTADOS

1. Estandarización de los métodos analíticos

a) Obtención de la curva patrón para la determinación de cGH por Inmunoensayo enzimático.

Se realizaron 2 curvas; una utilizando hormona de crecimiento de origen recombinante (rcGH) y otra con hormona de crecimiento nativa (ncGH). Al compararlas se observó que ambas presentan un intervalo de sensibilidad equivalente, por lo que en lo sucesivo se utilizó rcGH para determinar los niveles circulantes de cGH en el plasma de pollo. En la figura 1 y cuadro 1 se muestran los parámetros de las curvas patrón.

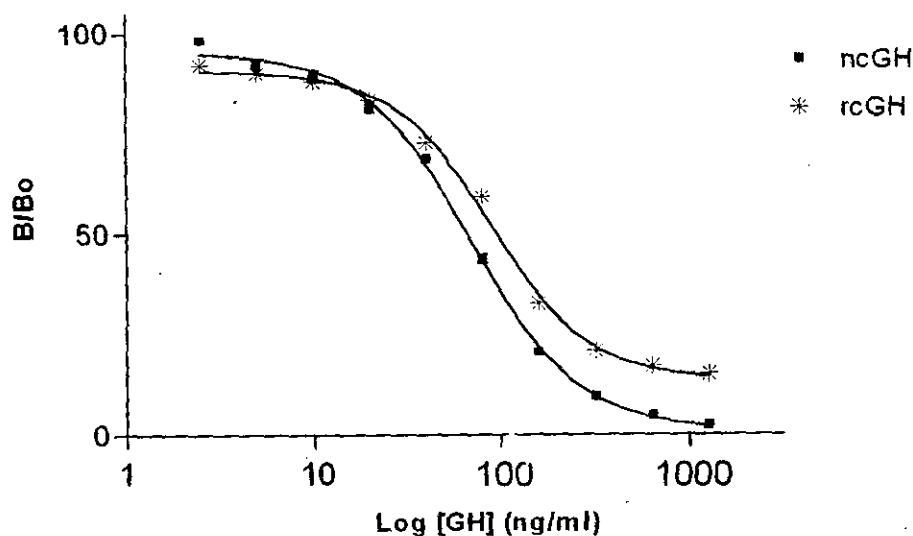


Figura 1. Se muestran las curvas estándar de los ELISAs para determinar cGH plasmática utilizando cGH nativa (■) y cGH recombinante (*).

Cuadro 1. Parámetros obtenidos de la curva patrón

ncGH	rcGH
<ul style="list-style-type: none"> • Intervalo 2.5 a 1280 ng/ml cuyo intervalo sensible es de 10 a 320 ng/ml. • Sensibilidad 10 ng/ml. • Dosis estandar al 50% de inhibición: 68 ng/ml. • Variación intra-ensayo 3.97% (ES = 0.68). • Variación inter-ensayo 4.12% (ES = 1.34). 	<ul style="list-style-type: none"> • Intervalo 2.5 a 1280 ng/ml cuyo intervalo sensible es de 10 a 320 ng/ml. • Sensibilidad 10 ng/ml. • Dosis estandar al 50% de inhibición: 88 ng/ml. • Variación intra-ensayo 4.44% (ES = 0.12). • Variación inter-ensayo 3.44% (ES = 1.36).

Con el objetivo de estudiar la especificidad del sistema, se evaluó el grado de desplazamiento obtenido al competir con otras hormonas hipofisarias (GH, PRL, FSH, TSH, LH) provenientes de otras especies.

Reactividad cruzada: en el siguiente cuadro (2) y en las figuras 2 y 3 se muestran las hormonas proteínicas utilizadas y el B/Bo al 50% de unión:

Cuadro 2. Porcentaje de reactividad cruzada

Hormona	Unión al 50%	Hormona	Unión al 50%	Hormona	Unión al 50%
bGH	1.68	pPRL	00	gFSH	00
pGH	3.10	oPRL	00	bFSH	00
oGH	15.02	rPRL	0.97	gTSH	0.52
rGH	5.60			bLH	1.26

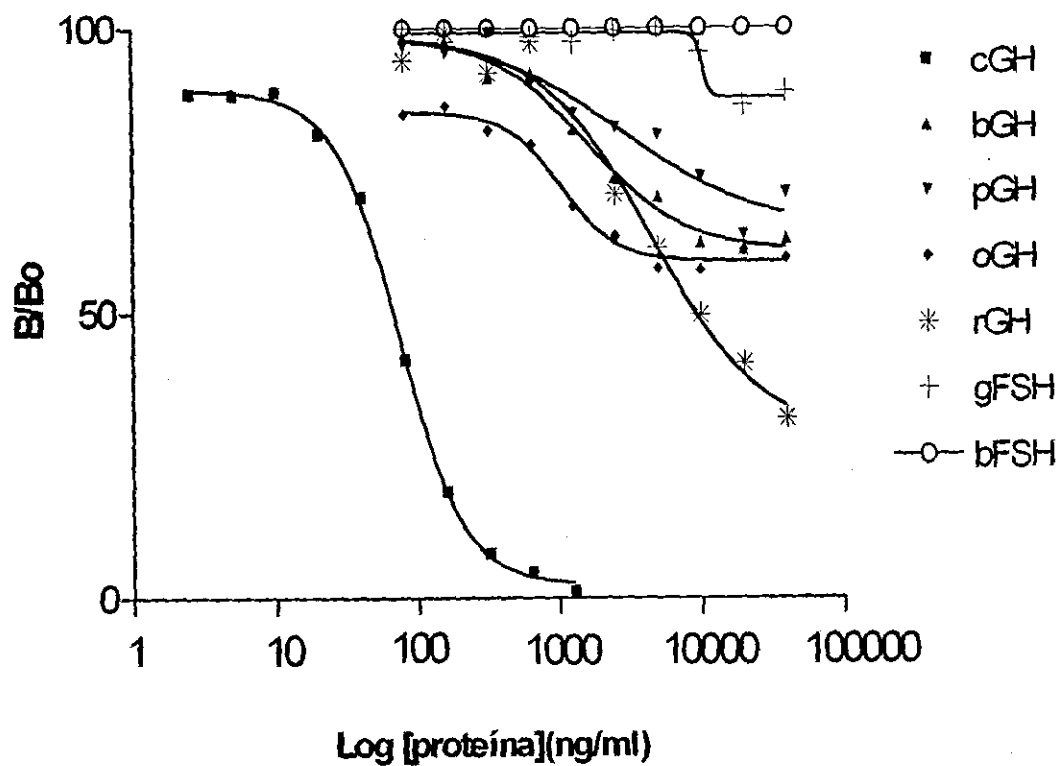


Figura 2. Se muestra la reactividad cruzada del anticuerpo policlonal utilizado en el ELISA para determinar cGH plasmática. En esta gráfica se observan las curvas obtenidas con GH de pollo (c), bovino (b), porcino (p), ovino (o), rata (r), FSH de cabra (g) y de bovino (b).

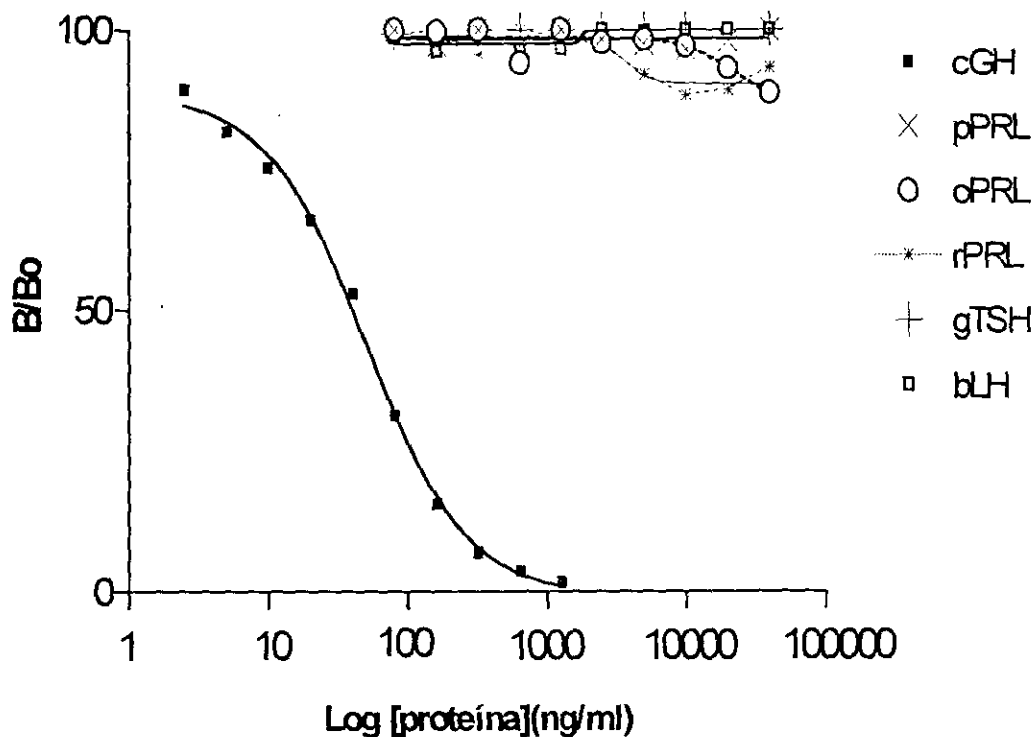


Figura 3. Se muestra la reactividad cruzada del anticuerpo policlonal utilizado en el ELISA para determinar cGH plasmática. En esta gráfica se observan las curvas obtenidas con GH de pollo (c), PRL de porcino (p), ovino (o), rata (r), TSH de cabra (g) y LH de bovino (b).

Todos estos datos indican que el ensayo para la determinación de cGH es muy específico.

b) Obtención de la curva estandar para la determinación de T4 por Radioinmunoensayo.

En la figura 4 se muestran los parámetros obtenidos de la curva patrón.

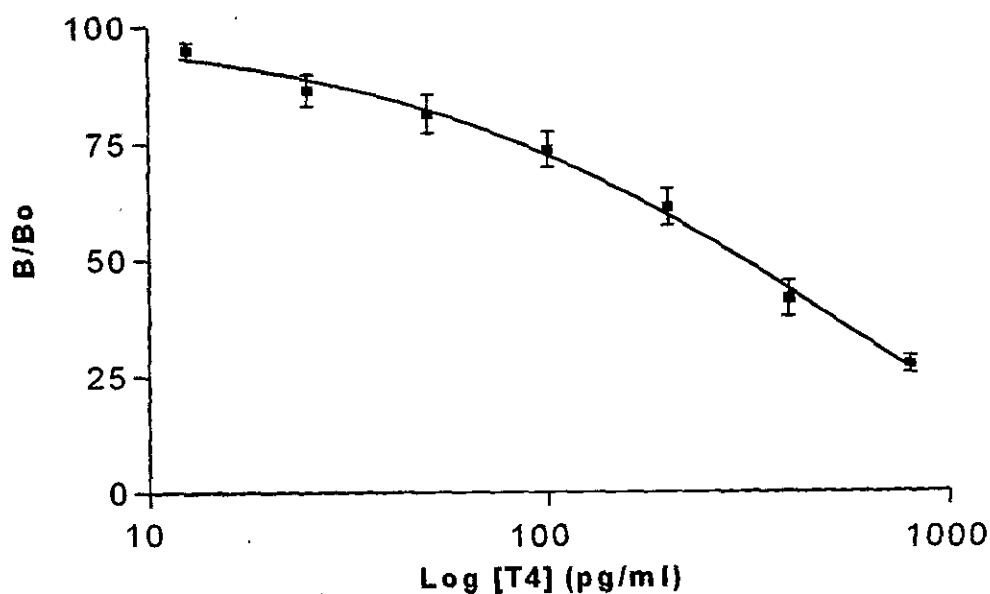


Figura 4. Se muestra la curva estandar del RIA para determinar T4 plasmática utilizando suero hipotiroideo homólogo

Parámetros obtenidos de la curva patrón de T4 de pollo:

- Intervalo 125 a 8000 pg/ml
- Sensibilidad 250 pg/ml.
- Dosis estandar al 50% de inhibición: 2950 pg/ml.
- Variación intra-ensayo 4.72% (ES = 0.80).
- Variación inter-ensayo 5.49% (ES = 3.24).

c) Obtención de la curva estándar para la determinación de T3 por Radioinmuno-ensayo.

En la figura 5 se muestran los parámetros obtenidos de la curva patrón.

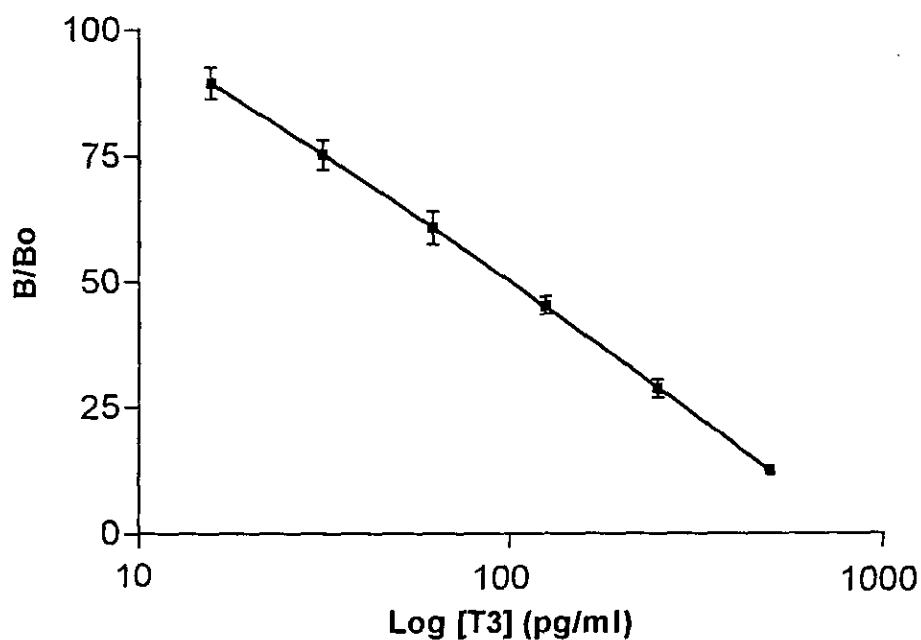


Figura 5. Se muestra la curva estándar del RIA para determinar T3 plasmática utilizando suero hipotiroideo homólogo

Parámetros obtenidos de la curva patrón de T3 de pollo:

- Intervalo 156 a 5000 pg/ml.
- Sensibilidad 156 pg/ml.
- Dosis estándar al 50% de inhibición: 960 pg/ml.
- Variación intra-ensayo 4.30% (ES = 0.75).
- Variación inter-ensayo 4.78% (ES = 2.28).

d) Optimización del método para determinar la actividad 5'D hepática en pollos

Como se muestra en la figura 6, el porcentaje de actividad 5'D total en hígado de pollo, cuantificado *in vitro* bajo las siguientes condiciones: 200 fmol de rT3 marcada, 0.5 μ M de rT3 y 10mM de DTT, fue proporcional a la concentración de proteína utilizada en un intervalo de 0.06 a 0.3 mg/ml.

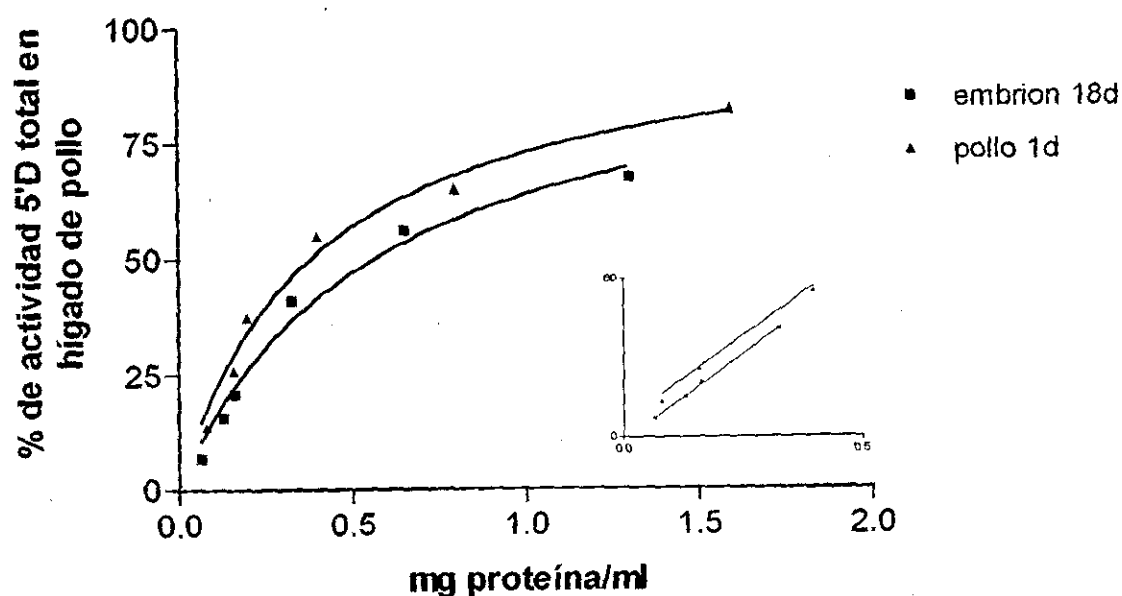


Figura 6. Se muestra el porcentaje de actividad 5'D hepática total en pollo, contra mg de proteína /ml utilizado en el ensayo, con las siguientes concentraciones: 0.06, 0.12, 0.15, 0.30, 0.60 y 1.20 mg, siendo lineal en el intervalo 0.06 a 0.30 mg/ml.

Para el análisis de muestras se decidió utilizar un intervalo de concentración de entre 0.15 a 0.2 mg/ml de proteína para poder observar cambios en esta actividad.

d) Optimización del método para determinar la actividad 5'D hepática en pollos

Como se muestra en la figura 6, el porcentaje de actividad 5'D total en hígado de pollo, cuantificado *in vitro* bajo las siguientes condiciones: 200 fmol de rT3 marcada, 0.5 μ M de rT3 y 10mM de DTT, fue proporcional a la concentración de proteína utilizada en un intervalo de 0.06 a 0.3 mg/ml.

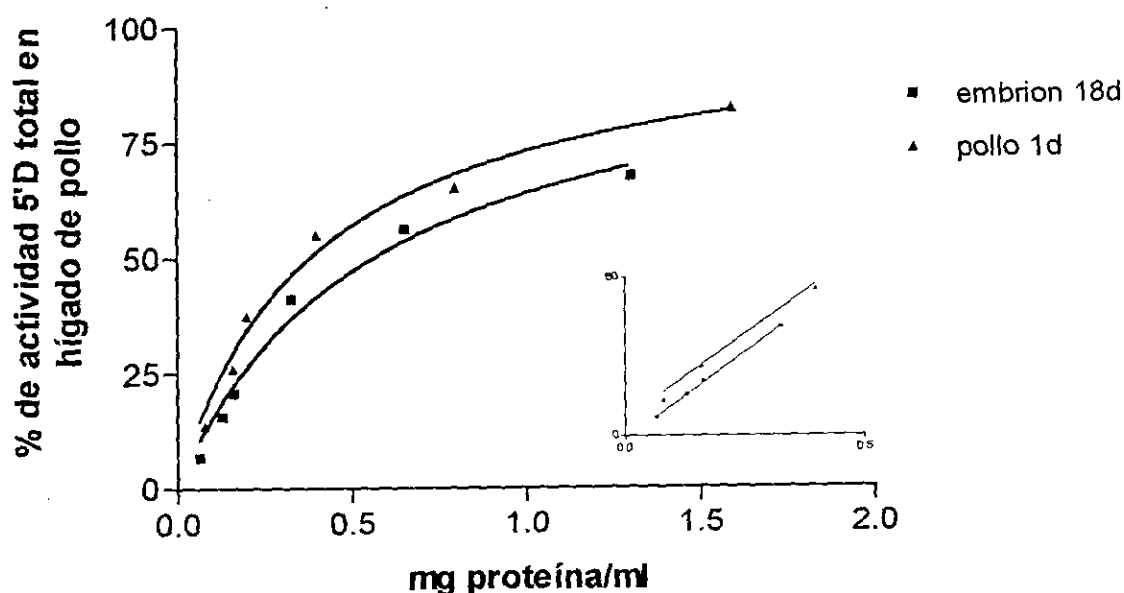


Figura 6. Se muestra el porcentaje de actividad 5'D hepática total en pollo, contra mg de proteína /ml utilizado en el ensayo, con las siguientes concentraciones: 0.06, 0.12, 0.15, 0.30, 0.60 y 1.20 mg, siendo lineal en el intervalo 0.06 a 0.30 mg/ml.

Para el análisis de muestras se decidió utilizar un intervalo de concentración de entre 0.15 a 0.2 mg/ml de proteína para poder observar cambios en esta actividad.

2. Efecto fisiológico de la GH exógena sobre la secreción y metabolismo de las hormonas tiroideas

a) Determinación de las concentraciones periféricas de las hormonas: T3 y T4, en pollos tratados con rcGH.

Pollos de 1 día de edad se trataron con 10µg de rcGH i.v. por individuo, con solución salina fisiológica (SSF) y animales sin tratamiento. Los pollos fueron sacrificados a las 2 horas de la administración de la rcGH y se tomaron muestras de plasma, a partir de la cual se cuantificaron los niveles de T3, T4. De acuerdo con los resultados que se muestran en la siguiente figura (8) en respuesta a la administración de rcGH aumentan significativamente ($P < 0.001$) los niveles de T4.

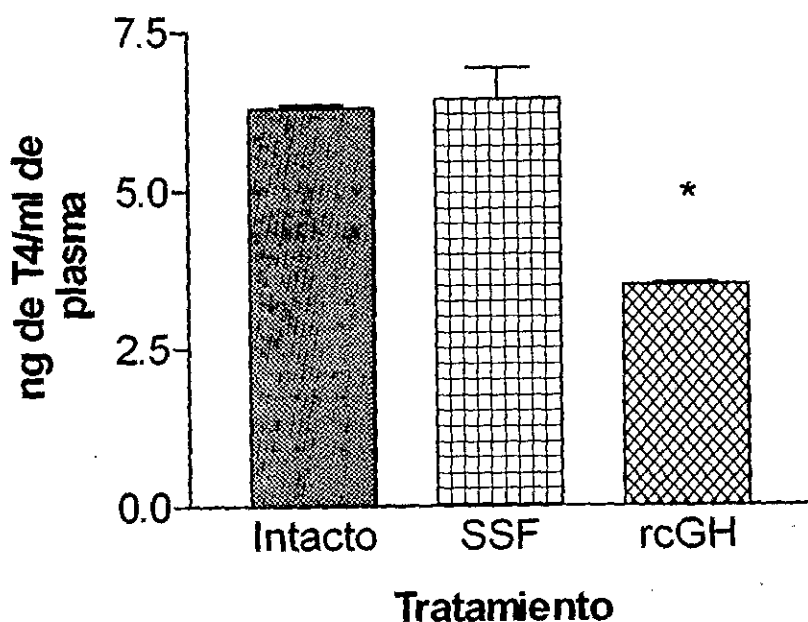


Figura 8. Se muestran la media \pm E.E. de los niveles T4 en plasma de pollos de 1 día de edad, bajo las diferentes condiciones experimentales. El asterisco muestra una diferencia significativa de $P < 0.001$ con una $n=7$.

Los animales intactos se comparan con pollos a los que se les administró SSF y los que fueron tratados con $10\mu\text{g}$ de rcGH i.v. por individuo. Las muestras fueron tomadas 2 horas después de la administración. Como se muestra en la figura 9 en respuesta a la administración de rcGH los niveles de T3 circulante aumentan significativamente ($P < 0.001$) con respecto a los animales intactos o tratados con SSF.

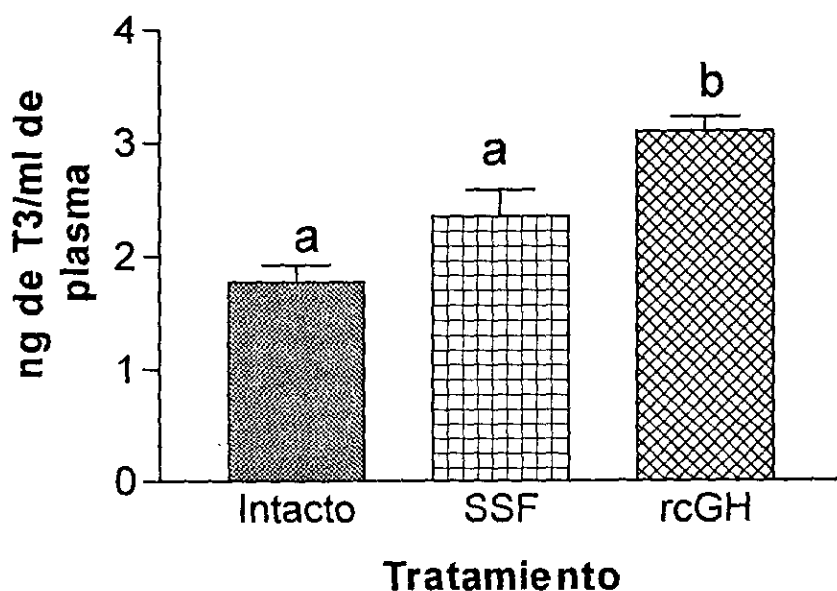


Figura 9. Se muestran la media \pm E.E. de los niveles T3 en plasma de pollos de 1 día de edad, bajo las diferentes condiciones experimentales. Las diferentes letras muestran una diferencia significativa de $P < 0.001$ con una $n=7$.

Los animales intactos se comparan con pollos a los que se les administró SSF y los que fueron tratados con 10 μ g de rcGH i.v. por individuo. Las muestras fueron tomadas 2 horas después de la administración. Al analizar la relación T3/T4 se encontró un aumento significativo ($P < 0.001$) en la tasa de producción de T3 a nivel periférico, como se puede observar en la figura 10.

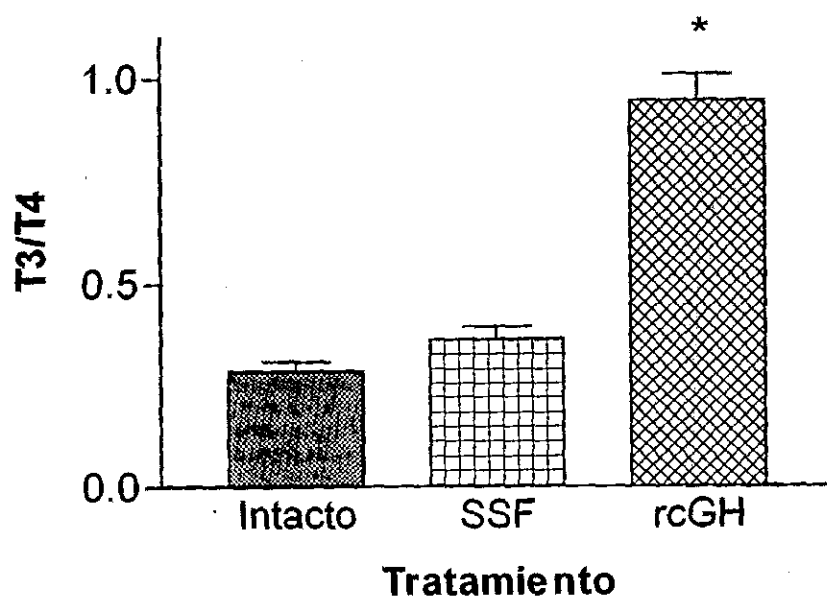


Figura 10. Se muestran la media \pm E.E. de la relación T3/T4 en plasma de pollos de 1 día de edad, bajo las diferentes condiciones experimentales. El asterisco muestra una diferencia significativa de $P < 0.001$ con una $n=7$.

3. Participación de la GH en la regulación de la vía de desactivación hepática de las hormonas tiroideas

a) Determinación de la actividad 5D-III en cultivo primario de hepatocitos de embrión de pollo tratados con rcGH y rcGH de 15kDa.

Hepatocitos de embrión de pollo de 19 días se cultivaron en medio MEM con 5% de suero hipotiroideo durante 48 horas, posteriormente se trataron con las siguientes dosis: rcGH 5 (0.68 nM), 10 (1.36 nM), 50 (6.8 nM), 100 (13.6 nM), 500 (68 nM) ng totales y rcGH 15kDa 1 (0.2 nM), 5 (1.0 nM), 10 (2.0 nM), 50 (10 nM) y 100 (20.0 nM) ng totales. Como se muestra en la siguiente figura (11) la actividad 5D-III se inhibe de forma similar con ambos tratamientos. La dosis media inhibitoria para la rcGH fue de 0.842 nM y para la forma de 15kDa fue de 0.484 nM.

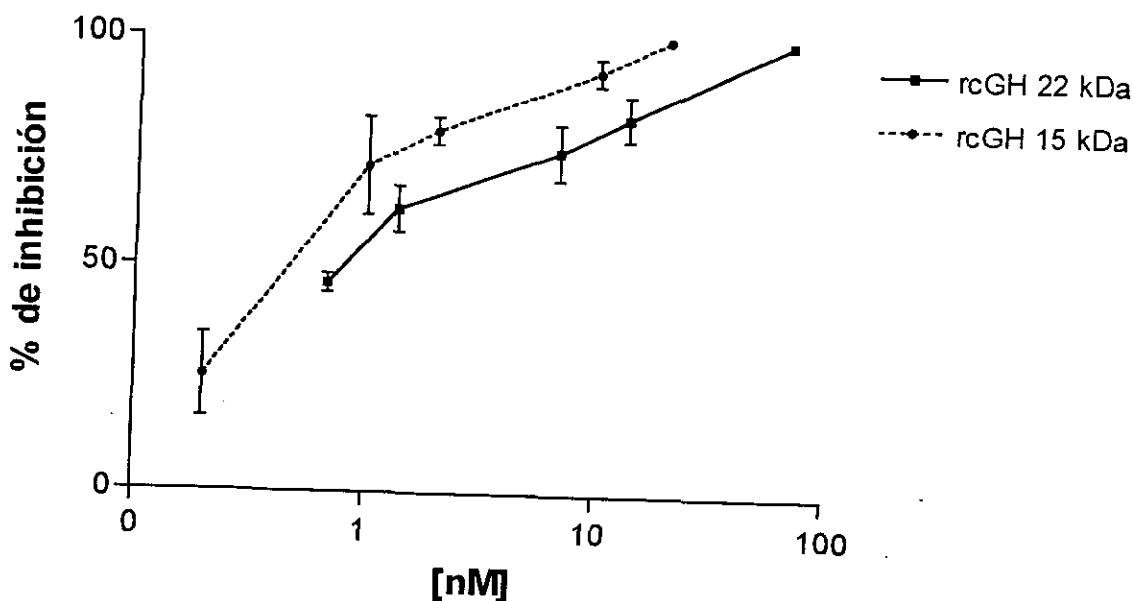


Figura 11. Se muestran el porcentaje de inhibición de la actividad 5D-III en hepatocitos de embrión de pollo de 19 días en cultivo primario, en respuesta al tratamiento con distintas dosis (0.2-68 nM) de rcGH y rcGH de 15kDa, durante 24 horas. Cada punto representa la media \pm E.E. de 4 experimentos.

4. Participación de la GH en la respuesta tiroidea, secundaria a la termorregulación en diferentes estadios fisiológicos

a) Análisis de los niveles de cGH en embriones de pollo de 20-21 días sometidos a cambios de temperatura

Los embriones se dejaron a temperatura ambiente (25-28°C) durante 2, 4, 8, 19 y 24 horas y se determinaron los niveles de cGH plasmática. Aunque hubo una gran variación entre animales fue muy grande se puede observar que a partir de las 19 horas de exposición, tiende a haber una disminución en los niveles de cGH (ver figura 12), esto concuerda con el retraso en el crecimiento que sucede a consecuencia de la disminución de la temperatura durante esta etapa del desarrollo. Los controles en este experimento fueron embriones mantenidos dentro de la incubadora con una temperatura aproximada de 38°C. El análisis estadístico se realizó con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y no se encontró diferencia significativa por efecto del tiempo y temperatura.

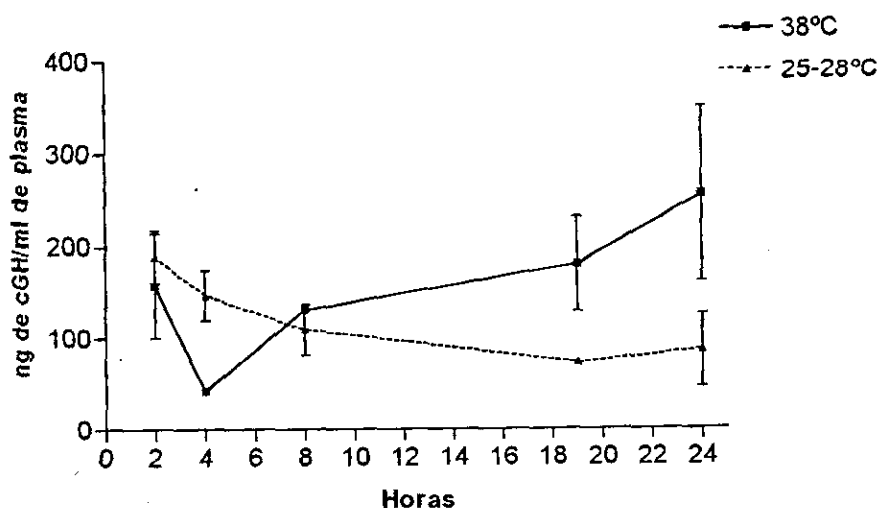


Figura 12. Se muestran los niveles de cGH plasmática en embriones de pollo de 20-21 días sometidos a diferentes temperaturas durante 2, 4, 8, 19 y 24 horas. Considerando 38°C como la temperatura control y 25-28°C como la temperatura experimental. Cada punto representa la media \pm E.E. de 10 animales.

b) Análisis de los niveles de cGH en pollos de 1-3 días posteclosión sometidos a cambios de temperatura

Se llevaron a cabo 2 experimentos equivalentes en los que los animales se mantuvieron con temperatura controlada desde la eclosión hasta el final de cada experimento, a las 20 horas de la eclosión aproximadamente se les dió agua y alimento *ad libitum* y el experimento se inició a las 36 horas de edad aproximadamente. Durante el experimento los pollos se mantuvieron en cajas con separaciones individuales pero con contacto visual entre ellos. Las muestras se tomaron simultáneamente en ambos grupos experimentales desde las 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40 hasta las 48 horas de exposición. Se determinaron los niveles plasmáticos de T3, T4, cGH y la actividad 5'D hepática total. En la siguiente figura (13) se muestran los niveles de T3 obtenidos durante el los experimentos. El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y no se encontraron diferencias significativas por efecto del tiempo y la temperatura.

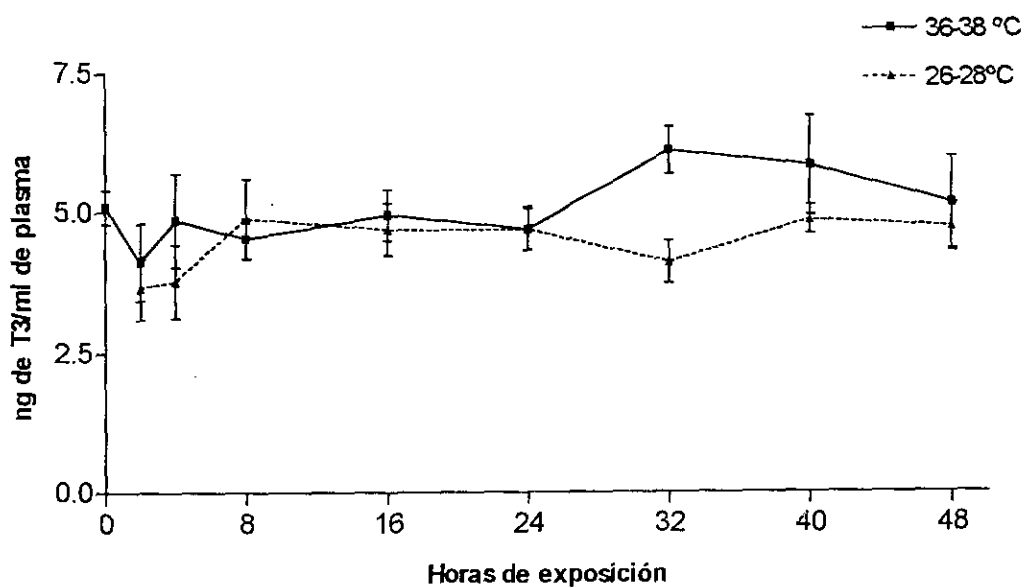


Figura 13. Se muestran los niveles de T3 plasmática en pollos de 1-3 días mantenidos a 36-38°C y 26-28°C durante 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas. Cada punto representa la media \pm E.E. de 20 animales.

En los niveles de T4 plasmáticos no se encontraron cambios significativos por efecto de la temperatura, sin embargo, si se pueden observar con respecto al tiempo. En general se ve una tendencia a la disminución de los niveles de T4 durante el segundo día del experimento, en ambos grupos experimentales. En la figura 14 se indican con letras mayúsculas los cambios encontrados en el grupo control (36-38°C) y con minúsculas el grupo experimental (26-28°C). El análisis estadístico se realizó con las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Dunn.

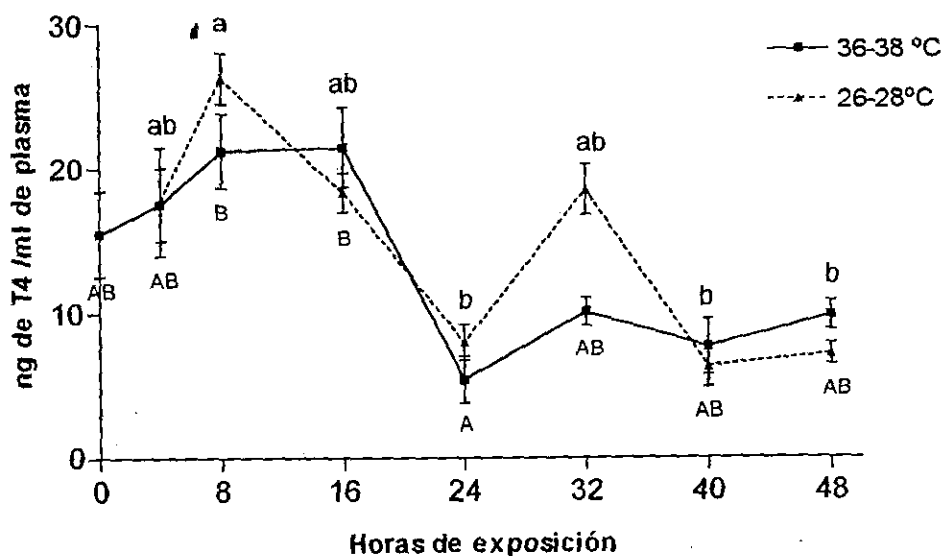


Figura 14. Se muestran los niveles de T4 plasmática en pollos de 1-3 días mantenidos a 36-38°C y 26-28°C durante 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas. Los cambios significativos ($P < 0.05$) se indican con las letras A y B mayúsculas para el grupo de 36-38°C y con minúsculas para el grupo de 26-28°C. Cada punto representa la media \pm E.E. de 20 animales.

Al analizar la relación T3/T4 encontramos que la tasa de producción de T3 tiene una ligera tendencia a aumentar en el segundo día de experimento en ambos grupos experimentales, sin embargo no se observaron cambios por efecto de la temperatura. En la figura 15 se muestra esta relación y los cambios significativos ($P < 0.05$) se indican con mayúsculas para el grupo de 36-38°C y con minúsculas para el grupo de 26-28°C. El análisis estadístico se realizó con las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Dunn.

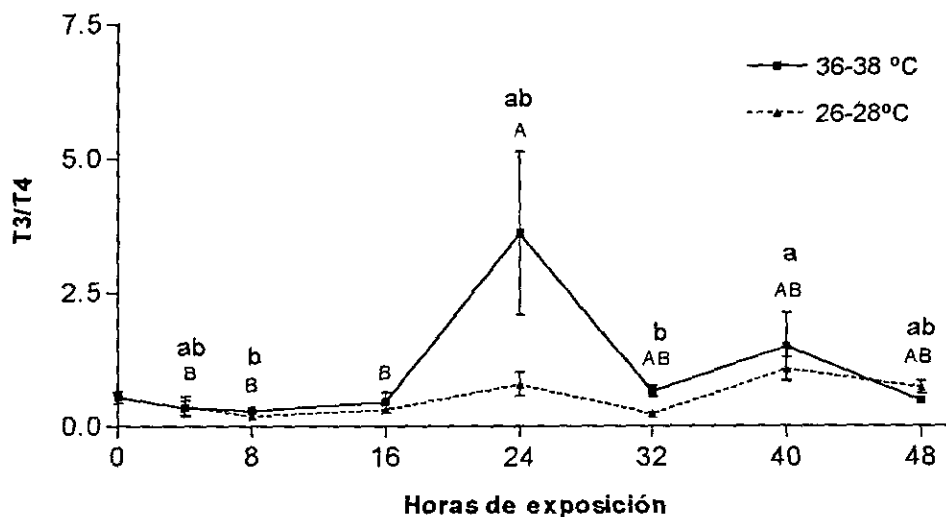


Figura 15. Se muestra la relación T3/T4 en pollos de 1-3 días mantenidos a 36-38°C y 26-28°C durante 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas. Los cambios significativos se indican con las letras A y B mayúsculas para el grupo de 36-38°C y con minúsculas para el grupo de 26-28°C ($P < 0.05$). Cada punto representa la media \pm E.E. de 20 animales.

Asimismo, en el caso de la actividad de la desyodasa 5'D no se encontraron cambios por efecto de la temperatura, sin embargo, con respecto al tiempo, en el grupo de 36-38°C se observa una disminución de la actividad a las 8 horas de exposición con respecto al grupo de 2 horas de exposición. En el grupo de 26-28°C no se aprecian cambios significativos con respecto al tiempo. El análisis estadístico se realizó con las pruebas de ANOVA de 2 vías y de Bonferroni (figura 16).

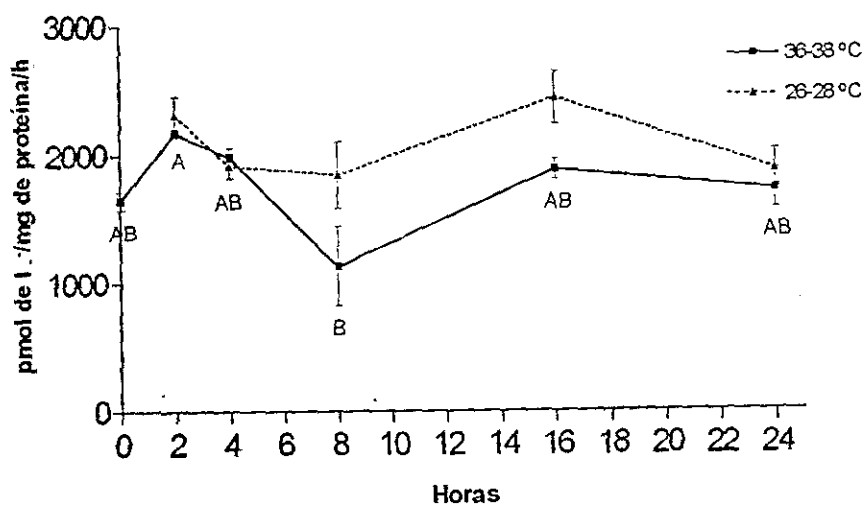


Figura 16. Se muestra la actividad 5'D hepática total en pollos de 1-3 días mantenidos a 36-38°C y 26-28°C durante 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas. Los cambios significativos en el grupo de 36-38°C se indican con las letras A y B ($P < 0.05$). Cada punto representa la media \pm E.E. de 10 animales.

Los niveles de cGH encontrados en el experimento no muestran cambios significativos por efecto de la temperatura, sin embargo, se observa la tendencia a un aumento durante el segundo día del experimento. En la figura 17 se indican los cambios significativos con las letras A y B mayúsculas para el grupo de 36-38°C y con minúsculas para el grupo de 26-28°C. El análisis estadístico se realizó con las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Dunn.

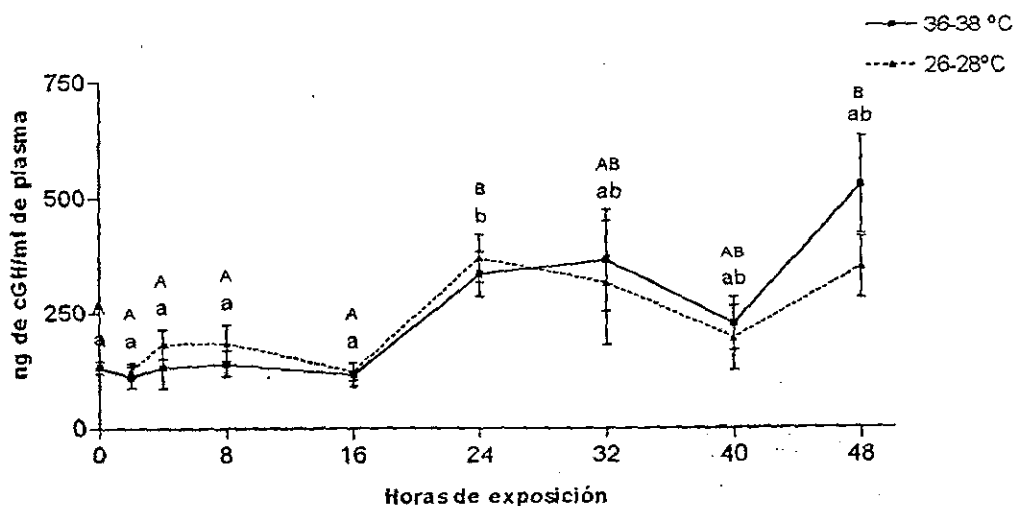


Figura 17. Se muestran los niveles de cGH plasmática en pollos de 1-3 días mantenidos a 36-38°C y 26-28°C durante 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas. Los cambios significativos se indican con las letras A y B mayúsculas para el grupo de 36-38°C y minúsculas para el grupo de 26-28°C ($p < 0.05$). Cada punto representa la media \pm E.E. de 20 animales.

c) Análisis de los niveles de T3, T4, actividad 5'D hepática y cGH en pollos de 13-15 días posteclosión sometidos a cambios en la temperatura ambiental

Los animales se mantuvieron con temperatura controlada desde la eclosión hasta el final de cada experimento, a las 20 horas de la eclosión aproximadamente se les dió agua y alimento *ad libitum* y el experimento se inició a los 13 días de edad aproximadamente. Durante el experimento los pollos se mantuvieron en cajas con separaciones individuales pero con contacto visual entre ellos. Las muestras se tomaron simultáneamente en ambos grupos experimentales a las 0, 0.5, 12, 24, 37, 48 y 63 horas de exposición. Se determinaron los niveles plasmáticos de T3, T4 cGH y la actividad 5'D hepática total. En la figura 18 se muestran los niveles de T3 obtenidos durante el experimento. No se observaron cambios por efecto de la temperatura, sin embargo, en el grupo de 15°C se encontraron cambios ($P < 0.05$) con respecto al tiempo entre las 12 y las 36 horas indicados con las letras a y b en la figura 18. El análisis estadístico se realizó con las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Dunn.

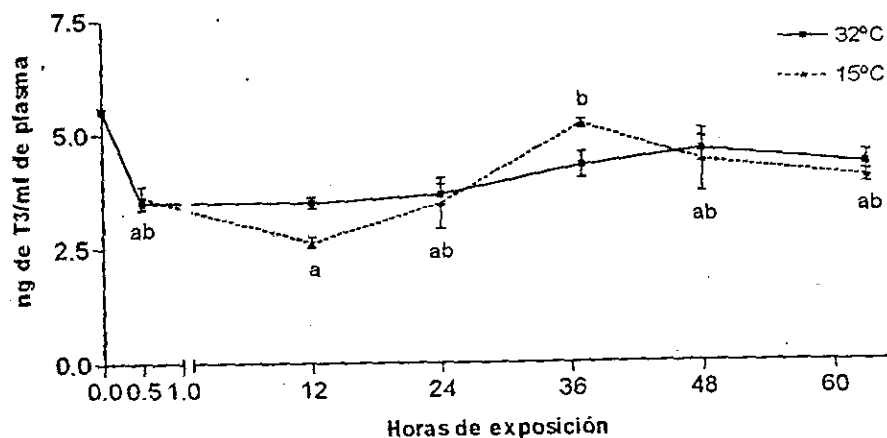


Figura 18. Se muestran los niveles de T3 plasmática en pollos de 13-15 días sometidos a diferentes temperaturas durante 0, 0.5, 12, 24, 37, 48 y 63 horas. Considerando 32°C como la temperatura control y 15°C como la temperatura experimental. Los cambios en el grupo de 15°C se indican con las letras a y b ($P < 0.05$). Cada punto representa la media \pm E.E. de 10 animales.

Los niveles de T4 no muestran cambios significativos por efecto de la temperatura o el tiempo (figura 19). El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de 2 vías.

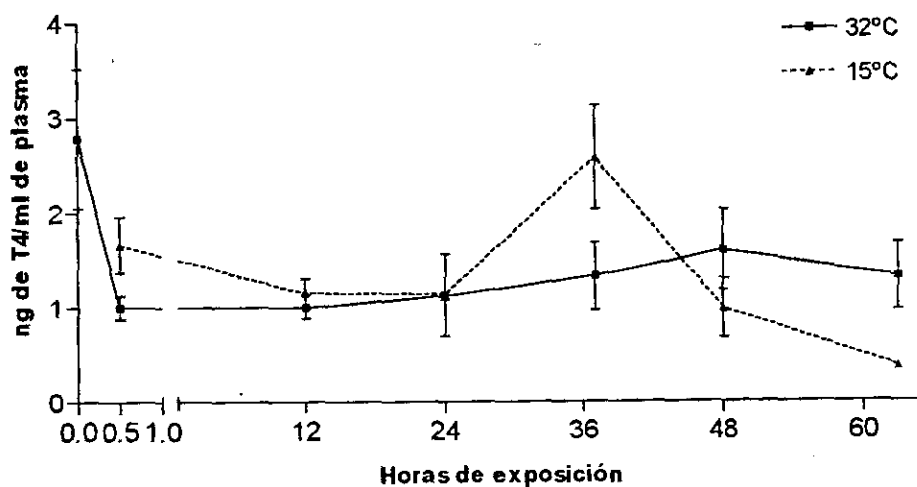


Figura 19. Se muestran los niveles de T4 plasmática en pollos de 13-15 días sometidos a diferentes temperaturas durante 0, 0.5, 12, 24, 37, 48 y 63 horas. Considerando 32°C como la temperatura control y 15°C como la temperatura experimental. Cada punto representa la media \pm E.E. de 10 animales.

Al analizar la relación T3/T4 no se observan cambios significativos por efecto de la temperatura o con respecto al tiempo (figura 20). El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

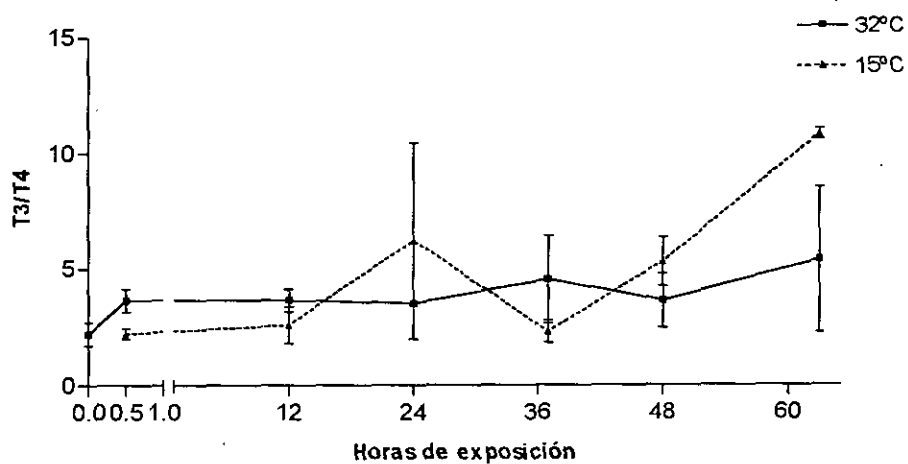


Figura 20. Se muestran la relación T3/T4 en pollos de 13-15 días sometidos a diferentes temperaturas durante 0, 0.5, 12, 24, 37, 48 y 63 horas. Considerando 32°C como la temperatura control y 15°C como la temperatura experimental. Cada punto representa la media \pm E.E. de 10 animales.

En la figura 21 se muestran la actividad de la desyodasa 5'D durante el experimento. No se observaron cambios por efecto de la temperatura o el tiempo. El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de 2 vías.

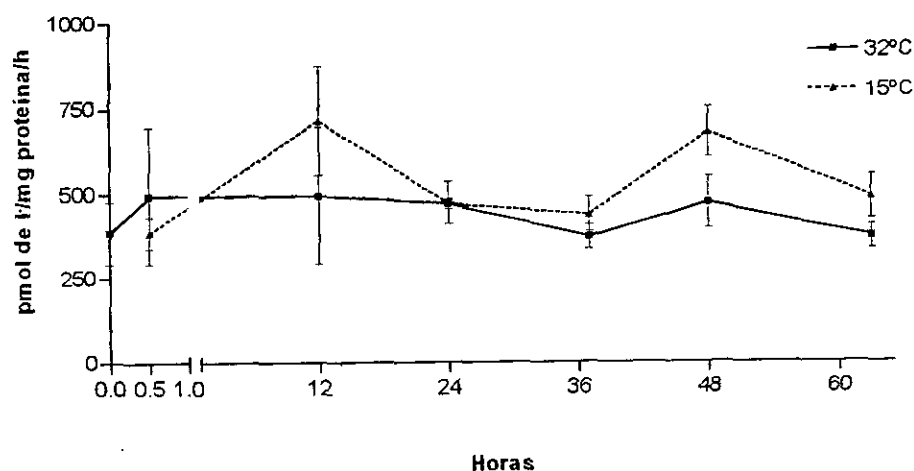


Figura 21. Se muestran la actividad 5'D hepática total en pollos de 13-15 días sometidos a diferentes temperaturas durante 0, 0.5, 12, 24, 37, 48 y 63 horas. Considerando 32°C como la temperatura control y 15°C como la temperatura experimental. Cada punto representa la media \pm E.E. de 10 animales.

En la siguiente figura (22) se observa que no se encontraron cambios significativos por efecto de la temperatura o el tiempo en los niveles de cGH durante el experimento. El análisis estadístico se realizó con la prueba de ANOVA de 2 vías.

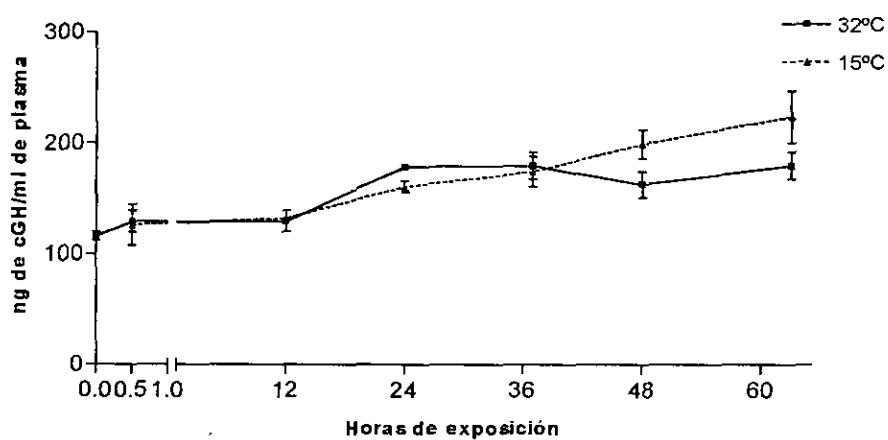


Figura 22. Se muestran los niveles de cGH plasmática en pollos de 13-15 días sometidos a diferentes temperaturas durante 0, 0.5, 12, 24, 37, 48 y 63 horas. Considerando 32°C como la temperatura control y 15°C como la temperatura experimental. Cada punto representa la media \pm E.E. de 10 animales.

DISCUSIÓN

La relación de las hormonas tiroideas y la GH se lleva a cabo en dos sentidos, por un lado las primeras están regulando la síntesis y secreción de la GH (50) y esta última regula la producción periférica de T3 (17, 18, 19 y 20). En periodos críticos del desarrollo se ha visto que ambas hormonas participan activamente en los procesos metabólicos. En los pollos durante los últimos días de la embriogénesis los niveles de GH y hormonas tiroideas aumentan de manera similar (18) y es posible que este influenciado por la interacción entre estas hormonas. Ambas participan en el catabolismo proteínico y en el mantenimiento de la elevada demanda energética que se requiere para el proceso de eclosión, el periodo de crecimiento rápido posteclosión y el control de su temperatura corporal. Además, existen algunas evidencias de que las distintas variantes moleculares de la GH se encuentran reguladas durante el desarrollo (Arámburo, datos no publicados) y que en algunos casos presentan especificidad de función (1, 3 y 60), por lo que se puede pensar que en la relación con el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas participen solo algunas de estas formas moleculares.

En este trabajo se estudió la participación de la GH y una de las variantes en el metabolismo tiroideo en tres condiciones experimentales que permitieron evaluar esta relación desde distintos puntos de vista.

Inicialmente se obtuvieron las condiciones estandar en los distintos métodos analíticos. Para evaluar la respuesta en los diferentes modelos se determinaron cambios en las concentraciones de cGH, T3 y T4 plasmáticos y en la actividad 5'D y 5D hepáticas.

Se utilizó el método del ELISA para determinar los niveles circulantes de cGH en pollo, usando hormona de pollo recombinante y nativa purificada en el laboratorio. Con ambas hormonas se obtuvieron curvas paralelas con intervalos de sensibilidad de 10 a 320 ng/ml. Este intervalo permite medir las concentraciones circulantes de cGH en pollos de cualquier edad. Las curvas patrón para el análisis de cGH fueron reproducibles: se obtuvieron variaciones

intra e interensayo menores al 5%. El anticuerpo policlonal producido en el laboratorio utilizado en las determinaciones fue probado contra otras hormonas proteínicas como GH bovina, porcina, ovina y de rata; PRL porcina, ovina y de rata; FSH caprina y bovina; TSH caprina y LH bovina. En la distintas GHs utilizadas se obtuvo una reactividad cruzada menor al 15% y en las otras hormonas menor al 1.3%. Lo anterior nos indica que el método de ELISA empleado es altamente específico y reproducible. A pesar de que las concentraciones plasmáticas de GH encontradas resultaron elevadas hasta un orden de magnitud con respecto a las reportadas por otros autores, que determinaron los niveles circulantes a través de RIAs homólogos (46, 31 y 18) y al comparar los resultados determinados por ELISA y anticuerpo monoclonal (40), la metodología utilizada en este trabajo permite observar cambios en la concentración de cGH en el plasma de pollos de 1 día a los que se les administró 10 μg de rcGH (estos datos no se muestran en la tesis) al compararlos con sus controles respectivos.

Al emplear el RIA homólogo para determinar los niveles plasmáticos de T4 y T3, se obtuvieron curvas patrón con rangos de sensibilidad de 125 a 8000 pg/ml y 156 a 5000 pg/ml con una variación intra e interensayo cercano al 5%, lo que permite decir que es un sistema reproducible. Los niveles circulantes de T4 y T3 obtenidos en los distintos experimentos se encuentran dentro del intervalo reportado por otros autores (18) que utilizaron también RIAs homólogos y anticuerpos monoclonales. En los RIAs se usaron anticuerpos comerciales específicos para T3 y T4 (Sigma), mientras el resto de las condiciones fueron comparables con las reportadas.

El porcentaje de actividad 5'D total hepática en pollo aumenta con respecto a la cantidad de proteína utilizada en la técnica de radio yodo libre, hasta llegar a concentraciones de saturación. Las concentraciones de proteína utilizadas para determinar esta actividad variaron en un intervalo entre 0.06 a 0.3 mg/ml, que corresponde a la parte lineal de la curva y donde se considera que se pueden observar cambios en la actividad 5'D hepática. Las condiciones óptimas para el ensayo fueron determinadas previamente en el laboratorio del Dr. Carlos Valverde, y son las siguientes: 200 fmol de rT3 marcada, 0.5 μM de rT3 y 10mM de DTT. Comparando las concentraciones de proteína, se utilizaron 20 veces mas que otros autores, esta diferencia se debe a que se usaron homogeneizados totales y Darras y col. (18) trabajaron con fracciones microsomales. En cuanto al sustrato y cofactor se utilizaron 2 veces menos que

estos mismos autores. Sin embargo, con respecto a la actividad específica se observó que a pesar de que utilizaron una fracción enriquecida y un exceso de sustrato esta solo fue 6 veces mayor a la determinada en las condiciones de este trabajo.

En la determinación de la actividad 5D-III hepática se utilizaron las condiciones previamente establecidas para esta enzima en otras especies animales en el laboratorio del Dr. Valverde, y fueron las siguientes: PTU 1mM, DTT 100mM, T3* 200 fmol, rT3 1 μ M, T3 0.1 μ M y 3 horas a 39°C. Se determinó la cantidad de proteína optima para la cuantificación de la actividad 5D-III hepática de pollo y se observó que el porcentaje de actividad aumenta con respecto a la cantidad de proteína en el intervalo utilizado. Las concentraciones de los subsecuentes experimento en hígado de embrión de pollo variaron entre 0.20 a 0.26 mg/ml, que se la parte donde inicia la saturación de la curva de proteínas, con el objeto de poder observar el efecto de inhibición de la actividad de la GH. Estos valores fueron también utilizados para determinar la actividad en los hepatocitos de embrión de pollo de 19 días en cultivo primario. En comparación con otros autores (18), se obtuvo una actividad específica 4.16 veces mayor en los homogeneizados de hígado a diferencia de lo reportado con fracciones microsomales, esto se explica en parte porque se utilizó el doble de la concentración de proteínas, una cantidad 10 veces mayor de sustrato "frío" (T3) y de cofactor (DTT).

En el primer experimento se analizó el efecto fisiológico de la GH exógena sobre el metabolismo de las hormonas tiroideas. Se administraron 10 μ g/individuo de rcGH a pollos de 1 día de edad y se midieron los niveles de T4 y T3 circulantes. Como se muestra en los resultados, los niveles de T4 disminuyen en un 45% y los de T3 aumentan 43% con respecto a los controles, por lo tanto se puede observar que la tasa de producción de T3 aumenta en respuesta al tratamiento. Estos resultados confirman el efecto de la GH sobre el metabolismo tiroideo (17). Sin embargo, otros autores (19) no encontraron modificaciones en pollos de 1 día por efecto de la administración de GH y probablemente la diferencia se deba a las líneas de pollos utilizadas o al número de horas transcurridas desde la eclosión., porque esta respuesta esta respuesta parece estar relacionada con el desarrollo y la maduración de los sistemas neuroendocrinos. Otros experimentos en los que administraron anticuerpos contra cGH (anti-cGH) producen el efecto contrario en los niveles

de T3 y T4, por lo que la falta de respuesta a GH exógena se atribuye a los altos niveles de GH endógena y por lo tanto a la disminución de receptores disponibles para esta hormona (20). Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la administración de cGH en pollos de 1 día representan un buen modelo *in vivo* para estudiar la relación entre el metabolismo periférico de las hormonas tiroideas y las distintas variantes moleculares de la GH.

En el segundo experimento se estudió la participación de la GH en la regulación de la vía de desactivación hepática de las hormonas tiroideas en un sistema *in vitro*, utilizando cultivos primarios de hepatocitos de embrión de pollo de 19 días. La edad de los embriones fue escogida en función de los reportes previos en los que se observó un efecto inhibitorio de la GH sobre la actividad 5D-III hepática en embriones de pollo (19) en sistemas *in vivo*. Este efecto se corroboró en los resultados obtenidos con células tratadas con rcGH. Los hepatocitos también fueron tratados con una variante molecular de la GH de 15kDa producida en el laboratorio a partir de rcGH por digestión enzimática y purificada por electroelución. El efecto observado con distintas dosis de rcGH y la forma de 15kDa fueron similares. Estos resultados apoyan la hipótesis de que este fragmento es activo *in vivo*, y puede jugar un papel importante durante el desarrollo. Resultados previos (Arámburo, et.al., datos no publicados) sugieren que la síntesis o secreción de esta variante molecular de 15kDa se encuentra regulada diferencialmente durante la ontogenia y es la primera vez que se observa que es biológicamente activa. Este modelo *in vitro* representa un enfoque adicional para estudiar la actividad biológica de las distintas formas moleculares de la GH y su relación con las hormonas tiroideas, además de abrir un campo de estudio sobre el mecanismo de acción de esta forma molecular, porque a diferencia de la forma monomérica al fragmento le faltan 57 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que forma la helice 4 de la molécula que es parte del sitio 2 de unión al receptor. Por lo que resulta interesante estudiar si utiliza un receptor específico o lo activa a través de otro mecanismo que no se conoce:

En el último experimento se analizó la participación de la GH en la respuesta tiroidea, secundaria a la termorregulación en diferentes estadios fisiológicos.

La primera condición utilizada fueron embriones de pollo de 20-21 días expuestos a 25-28°C contra la temperatura de incubación (38°C) como control. Aunque, no se observaron cambios significativos por efecto de la temperatura o el tiempo, se aprecia una tendencia a la disminución en los niveles de cGH

plasmática, lo que es consistente con el retraso en la velocidad de crecimiento previamente reportado (9). Los animales controles continuaron con un crecimiento normal y eclosionaron en las fechas esperadas, mientras que los embriones mantenidos a bajas temperaturas no eclosionaron, hasta 5 días después. Algunos autores mencionan que aunque los embriones a partir de los 18 días de edad tienen la capacidad de responder a cambios en la temperatura como lo haría un homeotermo endotérmico, estos no responden adecuadamente porque las características físicas del cascaron que no permiten el flujo de grandes cantidades de oxígeno. En este mismo estudio, se observó que en embriones de 18 a 21 días sometidos a una disminución paulatina de la temperatura hasta 3 grados, responden con un ligero aumento en el consumo de oxígeno, que puede ser bloqueado con tiourea (inhibidor de la organificación de yodo). Estos resultados señalan que es posible que este cambio este regulado por las hormonas tiroideas (75). A diferencia de este trabajo, en esta tesis el cambio de la temperatura fue abrupto y de 10°C aproximadamente, por lo que de acuerdo con Tazawa, H y col. (75) el embrión es incapaz de mantener la temperatura corporal estable. Por otro lado, la aparente disminución en los niveles de GH podría ser correlacionada con un posible aumento en la actividad de la desyodasa Tipo III, sin embargo, las variaciones entre individuos encontradas en los embriones de 20 a 21 días es muy alta y no permiten comparar los resultados entre los grupos experimental y control. Para poder estudiar esta relación en estas condiciones es necesario utilizar parametros de desarrollo que permitan seleccionar grupos más homogéneos. A pesar de esto, los embriones de pollo representan un buen modelo experimental porque son relativamente fáciles de mantener en el laboratorio y manipularlos. Además, en esta etapa del desarrollo suceden cambios importantes en el organismo que involucran a todos los sistemas, lo cual permite estudiar algunas relaciones entre mensajeros químicos *in vivo*, como es el caso de los estudios relacionados con la interacción de la cGH y el metabolismo de las hormonas tiroideas en términos ontogenéticos y farmacológicos.

En la segunda condición experimental se trabajo con pollos de 1-3 días de edad. Se probaron diferentes tiempos de exposición a dos temperaturas 36-38°C vs 26-28°C. En estos animales no se observaron cambios en las hormonas tiroideas, actividad 5'D y cGH por efecto de las temperaturas a las que fueron sometidos. Es posible que el tiempo y las temperaturas ensayadas no produzcan una respuesta termorregulatoria, porque la termoneutralidad para estos

Bibliografía

1. Arámburo C., Carranza M., Sánchez R. and Perera G. (1989a). Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. Gen. Comp. Endocrinol. 76:330-339.
2. Arámburo C., Cambell R. C. and Scanes C. G. (1989b). Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants. Life. Sci. 45:2201-2207.
3. Arámburo C., Montiel J. L., Perera G., Navarrete S. and Sánchez R. (1990a). Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): Different bioactivities of cGH charge variants. Gen Comp. Endocrinol. 80:59-67.
4. Arámburo C., Donoghue D. Montiel J. L., Berghman L. R. and Scanes C. G. (1990b) Phosphorylation of growth hormone. Life Sci. 47:945-952.
5. Arámburo C., Navarrete S., Montiel J. L., Sánchez R. and Berghman L. R. (1991a). Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): Evidence of G-cGH isoforms. Gen. Comp. Endocrinol. 84:135-146.
6. Arámburo C., Scanes CG. (1991b). Endogenous cleavage of chicken growth hormone. 73rd. Annual meeting of the endocrine society, (abst.232) June 19-22, Washigton, D.C., USA.
7. Arámburo C., Montiel J.L.; Sanchez R., Pereira G., Navarrete S., Carranza M., García-Moreno J. y Fenton B. (1993). La hormona del Crecimiento de pollo: Una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional. Memorias del Congreso conmemorativo de Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, Tomo I. ed. UNAM, México.
8. Argente, J. and Chowen, J. A.(1994), Neuroendocrinology of growth hormone secretion, Growth, Genetics and hormones, Jun;10, 2:1-5.

animales es de alrededor de 34°C. Aunque se utilizaron temperaturas con 10°C de diferencia ambas temperaturas pueden ser cercanas a la termoneutralidad. Como ya se mencionó anteriormente, las aves son muy tolerantes a las bajas temperaturas. Además, hay que considerar que los animales se encontraban en condiciones ambientales en las que las corrientes de aire eran nulas y el sistema de aislamiento (plumas, piel, etc.) en estas aves pudo haber sido suficientemente efectivo. Con respecto al tiempo se observaron cambios en el caso de los niveles de T4 los que muestran una tendencia a disminuir las concentraciones durante el segundo día experimental. Esto concuerda con los cambios ontogénicos de la T4 previamente reportados (17). Similarmente los niveles de cGH aumentan en el segundo día de experimento, sin llegar a ser significativamente diferentes (día 1 vs 2).

Como los muestreos fueron continuos durante dos días se puede sugerir el análisis de un posible ritmo circadiano, sin embargo, por tratarse de animales en el periodo de crecimiento rápido, para este tipo de análisis se requiere de mayor número de animales, mayor frecuencia de muestreo y periodos de estudio más largos (1 semana aproximadamente). Además se deben controlar factores como las horas de luz-obscuridad y en este experimento se utilizó luz continua.

Posteriormente se repitió el experimento con pollos más grandes, de 13-15 días de edad, para disminuir la variabilidad entre individuos y utilizando una diferencia de temperatura de 17°C (32°C vs 15°C). A pesar de esta Δ de temperatura, los resultados no muestran cambios. En estas condiciones los animales también se encontraban sin flujo de aire, por lo que hay que considerar la posibilidad de que su sistema de aislamiento haya sido muy eficiente o bien porque en esta edad los pollos no son capaces de responder a cambios abruptos (mayores de 17°C) de temperatura. En este caso, se requieren de otros parámetros que no fueron medidos, como la disminución en la temperatura corporal, la tasa metabólica y la ganancia de peso. Finalmente es necesario mencionar que para el estudio de termorregulación en pollos se requiere de una gran infraestructura en el laboratorio para mantener a los pollos en condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad relativa, flujo de aire, etc) sin provocar estrés por manipulación de los animales.

9. Bennett, A. F. and Dawson, W. R. (1979), Physiological responses of embryonic heermann's gulls to temperature, Physiological Zoology, 52, 4:413-421.
10. Berghman L. R., Lens P., Decuyper E., Kühn E. R. and Vandersande, F. (1987). Glycosylated chicken growth hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 68:408-414.
11. Bertherat J., Bluet-Pajot M.T. and Epelbaum J. (1995). Neuroendocrine regulation of growth hormone. Eur. J. Endocrinol. 132:12-24.
12. Bruck, K. and Hinckel, P. (1990) Thermoafferent networks and their adaptive modifications; en E. Schönbaum and P. Lomax; Thermoregulation, physiology and biochemistry, Pregmon, New York.
13. Byatt, J. C., Eppard, P. J., Veenhuizen, J. J., Sorbet, R. H., Buonomo, F. C., Curran, D. F. and Collier, R. J. (1992), Serum half-life and in-vivo actions of recombinant bovine placental lactogen in the dairy cow, J Endocrinol. Feb;132, 2:185-193
14. Capucco, A. V., Keys, J. E. and Smith, J. J. (1989), Somatotrophin increases thyroxine-5'-monodeiodinase activity in lactating mammary tissue of the cow, J. Endocrinol., 121:205-211.
15. Carter Su, C., Schwartz, J. and Smit, L. S. (1996), Molecular mechanism of growth hormone action, Annu. Rev. Physiol., 58:18-207.
16. Crawshaw, L. Y., Wollmuth, L. P., O'Connor, C. S., Rausch, R. N. and Simpson, L. (1990), Body temperature regulation in vertebrates: comparative aspects and neuronal elements; en E. Schönbaum and P. Lomax; Thermoregulation, physiology and biochemistry, Pregmon, New York.
17. Darras, V. M., Huybrechts, L. M., Berghman, L., Kühn, E. R. and Decuyper, E. (1990). Ontogeny of the effect of purified chicken growth hormone on the liver 5' monodeiodination activity in the chicken: reversal of the activity after hatching. Gen. Comp. Endocrinol. 77: 212-220.
18. Darras V. M., Visser T.J., Berhman L.R. and Kühn E.R. (1992a). Ontogeny of type I and type III deiodinase activities in embrionic and posthatch chicks: relationship with changes in plasma triiodotironine and growth hormone levels. Comp. Biochem. Physiol. 103A: 131-136.

19. Darras, V. M., Berghman, L. R., Vanderprooten, A. and Kühn E. R. (1992b). Growth hormone acutely decreases type III iodothyronine deiodinase in chicken liver. FEBS Lett. sep. 21, 310 (1): 5-8.
20. Darras V. M., Rudas P., Visser T. J., Hall T. R. Huybrechts L. M., Vanderpooten A., Berghman L. R. Decupere E. and Kühn E. R. (1993). Endogenous growth hormone controls high plasma levels of 3,3',5'-triiodothyronine (T3) in growing chickens by decreasing the T3- degrading type III deiodinase activity. Dom. Anim. Endocr. 10(1):55-65.
21. Davis, P. J. Davis F. B. and Blas S.D. (1982), Studies on the mechanism of thyroid hormone stimulation in vitro of human red cell Ca²⁺ATpase activity. Life Sci. 30:675.
22. Decuypere E. and Huhn E.R. (1988), Alterations in thyroid hormone physiology induced by temperature and feeding in newly hatched chickens. Acta Physiol. Pol. Sep, 39 (5-6): 380-394.
23. deLuze, A. and Leloup, J. (1984), Fish growth hormone enhance peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine in the eel (*Anguilla anguilla* L.), Gen. Comp. Endocrinol. 562, 308-312.
24. Devesa J., Lima L., Tresguerres J.A.F. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans (1992). Trends Endocrinol. Metab. 3:175-183.
25. Enemar A. (1967) Ontogeny of the hypophysial growth-promoting activity in the chick. Lab Anim. 6:23-31.
26. Galton V. A. and Hiebert A. (1987). The ontogeny of the enzyme systems for the 5'-deiodination of thyroid hormones en chick embryo liver. Endocrinology 120:2604-2610.
27. Ganong F. W. (1993). La gándula tiroides. en: Fisiología médica. Manual Moderno, 13^a, México. cap. 18.
28. Gelhoed-Durjuvestijn, P. H., Roelfsema, F. Schroder-von der Elst, J. P., van Doorn, J. and van der Heid, D. (1992), Effect of administration of growth hormone on plasma and intracellular levels of thyroxine and tri-iodothyronine in thyroidectomized thyroxine-treated rats, J. Endocrinol. Apr., 133, 1:45-49.
29. Gould, J, Arámburo, C., Capdevielle, M and Scanes, C. G.(1995), Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the

- chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH, *Life Sci*, 56, 8:587-594.
- 30.Hart I.C., Blake L.A., Chadwick P.M.E., Payne G.A. and Simmonds A.D. (1984). The heterogeneity of bovine growth hormone. Biochem. J. 218:573-581.
- 31.Harvey S., Davison T. F. and Chadwick. (1979). ontogeny of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Gen Comp. Endocrinol. 39: 270-273.
- 32.Harvey S. , Decuypere E., Darras VM., Berghman L. (1991) Differential effects of T4 and T3 on TRH- and GRF- induced GH secretion in the domestic fowl. Reprod. Nutr. Dev. 31, 451-460.
- 33.Harvey S. (1995a), Growth hormone release: feedback regulation; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
- 34.Harvey, S. and Hull, K. L. (1995b), Growth hormone action: receptors; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
- 35.Harvey, S. (1995c), Growth hormone action: neuroendocrine function; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
- 36.Harvey, S. (1995d), Growth hormone action: neural function; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
- 37.Himms-Hagen, J.(1990), Brown adipose tissue thermogenesis: role in thermoregulation, energy regulation and obesity; en E. Schönbaum and P. Lomax; Thermoregulation, physiology and biochemistry, Pregmon, New York.
- 38.Hissa R. (1988). Controlling mechanisms in avian temperature regulation: a review. Acta physiol.scand. 132 (supl 567): 1-148.
- 39.Houston B., and Goddard C. (1988) Molecular isoforms of growth hormone in the chicken pituitary gland. J. Endocrinol. 116:35-41.

40. Houston, B., Peddie, D. and Goddard, C. (1991) Monoclonal antibody based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for chicken growth hormone. British Poultry Science, 32: 633-644.
41. Huges T. E. and Mc Nabb F.M.A. (1986) Avian hepatic T-3 production by two pathways of 5'-monodeiodination: effects of fasting and patterns during development. J. Exp. Zool. 238, 393-399.
42. Kawauchi H., Maruyama S., Yashuda A., Yamaguchi K., Shirabata K., Kubota J. and Hirano T. (1986). Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. Arch. Biochem. Biophys. 244:542-552.
43. Kirwood, R. N., Thacker, P. A. and Laarveld, B. (1989), The influence of growth hormone injections on the endocrine and metabolic status of gilts, Dom. Anim. Endocrinol. APR., 6, 2:167-176.
44. Kleinebeckel, D. and Klussman, F. W. (1990), Shivering; in E. Schönbaum and P. Lomax; Thermoregulation, physiology and biochemistry, Pergamon, New York.
45. Kühn, E. R., Van Osselaer, P., Siau, O., Decuypere, E. and Moreels, A. (1986), Thyroid function in newborn lamb: influence of prolactin and growth hormone, J. Endocrinol. 109, 215-219.
46. Kühn, E. R., Verheyen, G., Chiasson, R. B., Huts, C., Huybrechts, L., Van den Steen, P. and Decuypere, E. (1987), Growth hormone stimulates the peripheral conversion of thyroxine into triiodothyronine by increasing the liver 5'-monodeiodinase activity in the fasted and normal fed chicken, Horm. metabol. Res. 19: 304-308.
47. Kühn, E. R., Vanderpooten, A, Huybrechts, L. M., Decuypere, E., Darras, V. and Sharp, P.J. (1988), Hypothalamic hormones that release growth hormone stimulate hepatic 5'-monodeiodination activity in the chick embryo, J. Endocrinol., Aug;118, 2:233-236.
48. Lam, S.-K., Harvey, S., and Hall, T.R. (1986). In vitro release of triiodothyronine and thyroxine from thyroid glands of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Gen Comp. Endocri. 63:178-185.
49. Lewis U. J. (1984) Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. Annu. Rev. Physiol. 46:33-42

50. McNabb, F.M.A. (1992) Thyroid Hormones. Prentice Hall, Endocrinology Series, New Jersey.
51. Moller, J., Jorgensen, J. O. L., Moller, N., Christiansen, J. S. and Weeke, J. (1992), Effects of growth hormone administration on fuel oxidation and thyroid function in normal man, Metabolism, Jul; 41, 7:728-731.
52. Montiel J.L., Berghman L.R., Arámburo C. (1992). Identification of growth hormone molecular variants in chicken serum. Gen Comp. Endocrinol. 88:298-306.
53. Peel, C. J., Fronk, T. J., Bauman, D. E. and Goerewit, R. C. (1983), Effect of exogenous growth hormone in early and late lactation on lactational performance of dairy cows. Journal of Dairy Science, 66: 776-782.
54. Radecki S.V., Deaver D.R., Scanes C.G. (1994). Triiodothyronine reduce growth hormone secretion and pituitary growth hormone mRNA in the chicken, *in vivo* and *in vitro*. P.S.E.B.M. 1994, Vol. 205:340-346.
55. Rothwell, N. J., Stock, M. J. and Stribling, D. (1990), Diet-induced thermogenesis; en E. Schönbaum and P. Lomax; Thermoregulation, physiology and biochemistry, Pregmon, New York.
56. Rudas, P. and Pethes, G. (1986), Acute change of conversion of thyroxine to triiodothyronine in hypophysectomized and thyroidectomized chickens exposed to mild cold (10°), Gen. Comp. Endocrinol. 63, 408-413.
57. Salas M., Torrero C., Pulido S. y Pérez H. Acciones Neurotrópicas de las Hormonas Tiroideas durante la Ontogenia Cerebral, En: Aspectos Comparativos y Mecanismos de Regulación de la Ontogenia Neural; Coordinación de la Investigación Científica, UNAM, Soc. Mex. Cien. Fisiol., 1ª, México, 1991.
58. Sato, T., Suzuki, Y., Taketani, T., Ishiguro, K. and Masyama, T. (1977), Enhanced peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine during hGH therapy in GH deficient children, J. Clin. Endocrinol. Metab., 45, 2:324-329.
59. Scanes, C. G., Duyka, D. R., Lauterio, T. J., Bouen, S. J. Huybrechts, L. M., Bacon, W. L. and King, D. B. (1986), Effect of chicken growth hormone, triiodothyronine and hypophysectomy in growing domestic fowl. Growth, 50, 1:12-31.

60. Scanes, C. G. and Campbell R. M. (1995a), Growth Hormone: chemistry; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
61. Scanes, C. G. (1995b), Growth hormone action: intracellular mechanisms; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
62. Scanes, C. G. and Daughaday W. H. (1995c), Growth hormone action: growth; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
63. Scanes, C. G. (1995d), Growth hormone action: carbohydrate metabolism; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
64. Scanes, C. G. (1995e), Growth hormone action: lipid metabolism; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
65. Scanes, C. G. (1995f), Growth hormone action: protein metabolism; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
66. Scanes, C. G. and Harvey S. (1995g), Growth hormone action: reproductive function; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
67. Scanes, C. G. (1995h), Growth hormone action: immune function; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
68. Scanes, C. G. (1995i), Growth hormone action: osmorregulation; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.
69. Scanes, C. G. (1995j), Growth hormone action: endocrine function; en Harvey, S., Scanes, C. G. and Daughaday, W. H.; Growth hormone; CRC Press, 1^a, Boca Raton, USA.

70. Segal, J. and Ingbar S. H. (1990), 3,5,3'-triiodothyronine enhances sugar transport in the rat thymocytes by increasing the intrinsic activity of the plasma membrane sugar transport, J. Endocrinol. 124:133.
71. Sing-yung Wu, M. D. (1994) Thyroid hormone metabolism, molecular biology and alternate pathways, CRC Press, Boca Raton USA.
72. St. Germain, D. L. (1994), Iodothyronine deiodinases, TEM, 5, 1:36-42
73. Sturkie P.D. (1986) Avian Physiology, 4^a Springer- Verlag, USA .
74. Sweeting, R. M. and Eales, J.G.(1992), Thyroxine 5'-monodeiodinase activity in microsomes from isolated hepatocytes of rainbow trout: effects of growth hormone and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine, Gen. Comp. Endocrinol., 88, 169-177.
75. Tazawa, H., Wakayama, H., Turner, J. S. and Paganelli, C. V. (1988), Metabolic compensation for gradual cooling in developing chick embryos, Comp. Biochem. Physiol. 89A, 2:125-129.
76. Valverde-R C., Aceves C. and Reyes-Z E. (1993). Ontogenesis of Iodothyronine Deiodinase Activities in Brain and Liver of the Chick Embryo. Endocrinology, 132: 867-872.
77. Valverde-R. C., Orozco R. A., Aceves C. y Romero R. C. (1988) Control y regulación de la función tiroidea. En: Texto de Fisiología. Coordinación de la investigación científica. Soc. Mex. Ciencias Fisiológicas.- ?...
78. Yashuda A. Yamaguchi K., Papkoff H., Hirata T. and Kawauchi H. (1989) The complete amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle (*Chelonia mydas*). Gen. Comp. Enocrinol. 73:242-251.

Estándares T3

Solución stock: 1µg de hormona /µl de NaOH al 0.01%

Solución B: 5µl de la sol. stock - 5µg - 10000µl TRIS

0.0005µg - 1µl

0.5 ng- 1µl

Solución C: 300µl de la sol. B - 150ng - 10000µl

0.015ng - 1µl

15pg - 1µl

Curva(pg)	6.25	12.5	25	50	100	200	500
Sol C(µl)	20	40	80	160	320	640	1600
Amort.	4780	4760	4720	4640	4480	4160	3200
VF.	4800	4800	4800	4800	4800	4800	4800

Hormona marcada

T4:

Act. específica 1250µCi - 1µg

Act total 796µCi - 0.636µg

Vol. sol. comercial 2500µl - 636800pg

Vol. sol. comercial 10µl - 2547.2pg

Se necesitan 10pg - 100µl
2547.2pg - 25462µl TRIS + 10µl T4*

T3:

Act. específica 1200µCi - 1µg

Act total 781µCi - 0.650µg

Vol. sol. comercial 2500µl - 650833pg

Vol. sol. comercial 10µl - 2603.33pg

Se necesitan 10pg - 100µl
2603.33pg - 26023.32µl TRIS + 10µl T4*

Anticuerpo

Stock 1:10

1:1000: 10µl sol 1:10 - 990µl TRIS

1:3000: 10µl sol 1:10 - 2990µl TRIS

Stock 1:100

1:1000: 100µl sol 1:100 - 900µl TRIS

1:3000: 100µl sol 1:100 - 2900µl TRIS

1:5000: 100µl sol 1:100 - 4900µl TRIS

Radioinmunoensayo de T4 plasmática

Coctel: - 6ml de la solución de hormona marcada
- 3mg de ANS

Anticuerpo: 1:1000

Tubos	Coctel	1er. Ac.	SHT	Estandares	Amort.	SP
Daño	100	-	10	-	390	-
Cero	100	100	10	-	290	-
Curva	100	100	10	100	190	-
Problema	100	100	-	-	290	10

Incubación: 24 hrs a 4°C

Método de separación: 10µl de suero normal de conejo
25µl de 2° anticuerpo (1:25) comercial durante 2hrs.
1ml de PEG al 20 % (10g/50ml)
centrifugar 30 mins. a 3000rpm y 4°C
decantar y leer 1min (unido y libre)

Radioinmunoensayo de T3 plasmática

Coctel: - 5ml de la solución de hormona marcada
- 5mg de ANS

Anticuerpo: 1:10000

Tubos	Coctel	1er. Ac.	SHT	Estandares	Amort.	SP
Daño	100	-	50	-	350	-
Cero	100	100	50	-	250	-
Curva	100	100	50	100	150	-
Problema	100	100	-	-	250	50

Incubación: 24 hrs a 4°C

Método de separación: 1ml de carbón activado al 0.5% con dextrán al 0.5% durante 15 mins.
centrifugar 30 mins. a 3000 rpm y 4°C
decantar y leer 1 min (unido y libre).

Anexo B

Determinación Inmuno enzimática de cGH plasmática

Preparación de soluciones

Amortiguador de fosfato de sodio. (PBS 0.01 M, NaCl 0.15M, pH 7.8).

- Solución A. PBS 0.5 M pH 7.8.

Fosfato de sodio monobásico (PM 138) 0.5 M-50 ml = 3.45 g en 50 ml

Fosfato de sodio dibásico (PM 142) 0.5 M-200 ml = 14.2 g en 200 ml

Se disuelve el fosfato dibásico en aprox. 100 ml con DDH₂O y se ajusta a pH 7.8 con la solución de fosfato monobásico. Al final se afora a 200 ml.

- Solución PBS 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.8.

Se toman 20 ml de la solución "A", se agregan 8.76 g de NaCl y se afora a 1000 ml con DDH₂O.

- Solución TPBS 0.01 M, NaCl 0.15 M, Tween 20, 0.05 %, pH 7.8.

A 1000 ml de PBS se añaden 500 ml de Tween-20 y se agita.

- Solución para bloquear y de incubación con anticuerpo TPBS + BSA 1 %.

Se solubiliza 1 g de BSA en 100 ml de TPBS.

Amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 10.3.

Carbonato de sodio (PM 105.99) 0.1 M-100 ml = 1.06 g en 100 ml

Bicarbonato de sodio (PM 64.01) 0.035 M-100 ml = 0.224 g en 100 ml.

El pH resulta cercano a 10.3.

Amortiguador de citratos 0.1 M, pH 5.0.

Solución "5X" de citratos (0.5 M, pH 5.0):

Citrato de sodio (PM 294.1) 0.493 M = 14.5 g en 100 ml

Ácido cítrico monohidratado (PM 192) 0.007 M = 1.35 g en 100 ml

Se solubiliza en 80 ml con DDH₂O, se ajusta a pH 5-5.2 con HCl y se afora a 100 ml con agua. Para preparar el amortiguador de cada ensayo, la solución "5X" se diluye 5 veces con DDH₂O.

Solución de ácido sulfúrico 4 N.

Ácido sulfúrico (PM 98; d= 1.85 g/ml; 96.5 % de pureza). Para 100 ml de solución se agregan 10.97 ml de ácido, con cuidado, a 60-70 ml de DDH₂O, a continuación se afora a 100 ml

Solución de peróxido de urea [0.2 mg/ml].

20 mg del polvo se disuelven en 1 ml de DDH₂O. Se conserva a 4°C en la oscuridad.

Solución de orto-fenilendiamina. [0.4 mg/ml].

6 mg del polvo para 15 ml de solución reveladora final.

Solución A. cGH [2 mg/ml].

6.25 ml sol. cGH [0.6 mg/ml] se añaden a 2.493 ml de la solución de carbonatos.

Solución B. cGH [6 ng/100 ml] (Para forrado de la placa). 300 μ l de la sol. A + 9.7 ml de la sol. de carbonatos = 10 ml (para 1 placa de 96 pozos).

Solución C. cGH [64 ng/100 ml] (1ª dilución). Para preparar una curva patrón por duplicado, se prepara 1 ml de volumen inicial en la primera dilución, es decir, 640 μ l de la sol. A y 360 μ l de PBS.

Primer anticuerpo [1:100,000]. Antisero policlonal, generado en conejo, contra la cGH. Se encuentra diluido 1:10 en PBS a -70°C . Para cada ensayo se descongela una alícuota nueva. Sol. I: 5 μ l de antisero se diluyen en 10 ml de la solución de TPBS+1 % BSA. Sol. II: 4 ml de la sol. I se diluyen 20 ml de la solución de TPBS+1 % de BSA.

Segundo anticuerpo. Anticuerpo anti-IgG de conejo, generado en cabra, y acoplado con peroxidasa de rábano (GAR-HRP, Bio Rad). Se emplea a una concentración de 1:3000 en TPBS 0.01 M + 1 % de BSA.

Procedimiento

1. Se preparan las soluciones amortiguadoras y de la hormona (B y C), éstas últimas se mantienen en hielo (4°C) todo el tiempo.

2. Se coloca una placa nueva de inmunoanálisis (DYNATECH-IMMUNLON de 96 pozos), una gradilla con tubos ependorff (1.5 ml) nuevos y marcados, se almacena 1 litro de amortiguador TPBS 0.01 M, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.8 en un recipiente limpio (a esta solución se agrega thimerosal [aprox. 0.001 %] (para evitar el crecimiento bacteriano), este se conecta con el sistema para lavar las placas (Bio-Rad).

3. Se agregan 100 ml de la solución B de cGH a cada pozo, para esto se emplea Octapette 8-channel pipetter de 100 μ l (Costar). Se tapa la placa con cinta adhesiva y se permite el pegado de la hormona a las paredes del pozo durante 16 h a 4°C .

4. Se preparan la curva patrón (sol. C) y las muestras problema:

Curva patrón: para un análisis por duplicado, se preparan 1 ml de la primera dilución [64 ng/100 ml]: 360 μ l de PBS + 640 μ l de la sol. A (cGH [2 mg/ml]). Para preparar la siguiente concentración de proteína se toman 500 μ l de la solución C (la mitad de su volumen total) y se mezclan con 500 μ l de PBS y así sucesivamente hasta llegar a 0.125 ng/100 μ l (ver siguiente cuadro).

Curva estandar y mezcla de soluciones (μ l)

[ng/pozo]	A	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	B
PBS	180	360	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0
Sol anterior	320	640	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0
1er Ac.	0	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Vol. total	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

A continuación se agrega el 1er. anticuerpo [1:100,000] en amortiguador de TPBS y 1 % de albúmina, en cada uno de los tubos de la curva patrón. Para tener un concentración final de

anticuerpo de [1:200,000] se agregan 500 ml de sol. de anticuerpo en cada tubo de ependorff. El anticuerpo se añade a todos los tubos a excepción del tubo de testigo A. Entonces se almacenan todos los tubos a 4°C durante 16h (toda la noche).

Muestras problema: en tubos ependorff se agrega la cantidad de muestra requerida para el número de repeticiones y se agrega el 1er. anticuerpo. Se agregaron 100 µl de suero y 100 µl de solución del 1er. anticuerpo ([1:100,000] en amortiguador de TPBS y 1 % de BSA) para tener una concentración final de [1:200,000] y un volumen final de 200 µl.

5. Los pozos se lavan 5 veces con amortiguador TPBS, al final de los lavados, los pozos se secan con varios golpes firmes sobre papeles absorbentes.

6. Se añaden 100 µl de TPBS + 1 % de BSA para bloquear la unión inespecífica. Esta solución se agrega a todos los pozos, se sella la placa con la cinta adhesiva y se deja incubando durante 1 h a temperatura ambiente.

7. Se lava 5 veces la placa con TPBS.

8. Se adicionan 100 µl por pozo de las diferentes concentraciones de cGH para la curva patrón y muestras problema. Así las muestras se incuban durante 2 h a temperatura ambiente.

9. Se lava la placa 5 veces con TPBS.

10. Se añaden a cada pozo 100 µl de la solución del segundo anticuerpo a una concentración [1:3000], se sella la placa con la cinta adhesiva y se deja incubando durante 2h a temperatura ambiente.

11. Se lava la placa 5 veces con TPBS.

12. Se prepara la solución de revelado: Para 15 ml de solución se mezclan 6 mg de orto-fenilendiamina, 150 ml de la sol. de peróxido de urea y 14.85 ml del amortiguador de citratos. Se prepara al momento de emplear. En un espacio oscuro, se agregan 100 µl de esta solución a cada pozo, se sella la placa con la cinta adhesiva y se deja incubar durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad.

13. Para detener la reacción de revelado, y aún en la oscuridad, se añaden 50 µl de la solución de ácidos sulfúrico 4 N. Se tapa y permanece en la oscuridad 10 min más.

14. 15 min después de detener la reacción de revelado se lee la placa de ELISA.

15. Inicialmente, de los resultados se obtiene el valor porcentual de cada valor con respecto a los valores del testigo B (sin hormona) que se considera como el 100 %. Después se obtiene la media y desviación estándar de los valores porcentuales. Estos últimos datos se graficaran contra las diferentes concentraciones de hormone por pozo.

Anexo C

Actividad 5'D total por radioyodo liberado

Preparación de soluciones

Amortiguador HEPES pH 8.6 0.05M

- 2.38 g HEPES - 1L - 10 mM
- 109.5 g Sacarosa - 1L - 320 mM
- 0.372g EDTA - 1L - 1 mM
- se diluye en 600 ml
- se ajusta el pH con HCl
- se afora a 1L.

Limpieza de la hormona

La hormona se separa del yodo (I) utilizando una columna SEP-PAK. En las fracciones de la 3 a la 9 se obtiene el I y de la 10 a la 15 la hormona marcada.

# Tubo	Cantidad	Sustancia
1	5 ml	fosfatos metanol 40:60
2	150 µl	rT3
3	500 µl	fosfatos NaH ₂ PO ₄ 0.1 M
4	500 µl	fosfatos NaH ₂ PO ₄ 0.1 M
5	500 µl	fosfatos metanol 40:60
6	500 µl	fosfatos metanol 40:60
7	500 µl	fosfatos metanol 40:60
8	500 µl	fosfatos metanol 40:60
9	500 µl	fosfatos metanol 40:60
10	200 µl	metanol amonio 99:1
11	200 µl	metanol amonio 99:1
12	200 µl	metanol amonio 99:1
13	200 µl	metanol amonio 99:1
14	200 µl	metanol amonio 99:1
15	200 µl	metanol amonio 99:1

Preparación del coctel para el experimento

- Hormona marcada (rT3): 100,000 cpm por cada 50 µl de coctel (5,000,000 cpm para 2500 µl de VF).
- Hormona fría (rT3): 0.5 µM (125 µl de una solución 10 µM para 2500 µl de VF).
- DTT: 10 mM (16 mg para 2500 µl de VF).
- Se mezcla y se afora con el amortiguador de HEPES.

Preparación del tejido

El hígado se homogeneiza en una proporción de 1:10 con amortiguador de HEPES (100mg de tejido en 1 ml de HEPES).

De acuerdo con los datos obtenidos sobre la cantidad de proteínas para el determinar cambios en la actividad 5'D hepática de pollo el intervalo de sensibilidad es de: 0.06 a 0.3 mg/ml. Para efectos del experimento se utilizó una dilución 1:150 del homogeinizado y se ajustó posteriormente la relación entre actividad y cantidad de proteína. La cuantificación de proteína se hace por el método de Bradford.

Método

	Coctel	HEPES	Tejido
CT	50 µl	-	-
Daño	50 µl	100 µl	-
Muestra	50 µl	50 µl	50 µl

- se agita,
- se incuba durante 1 hora a 37°C,
- se para la reacción con 50 µl de *stopper* (50% de suero normal de bovino + PTU 10mM) y 350 µl de ácido tricloroacético,
- se centrifuga durante 15 minutos a 3000 rpm,
- se separa el yodo liberado utilizando una columna de intercambio aniónico (Dowex 50X), eluyendo con 2 ml de ácido acético.

Formula para calcular la actividad específica

$$\text{Daño} = \text{cpm del daño} / \text{cpm de CT} \times 100 = \%$$

$$\text{Muestra} = (\text{cpm de la muestra} / \text{cpm de CT} \times 100) - \% \text{ del daño} = \%$$

$$\text{Muestra} \times 1.25 = \% \text{ de actividad (porque se recupera el 80 \% de la columna)}$$

$$\text{Actividad específica: } \frac{\% \times 2 \times \text{pmol}}{\text{h} \times [\text{mg de prot.}]} = \text{pmol de T2/mg de prot./h}$$

Anexo D

Actividad 5D por cromatografía en papel

Preparación de soluciones

Amortiguador HEPES pH 8.6 0.05M

- 2.38 g HEPES - 1L - 10 mM
- 109.5 g Sacarosa - 1L - 320 mM
- 0.372g EDTA - 1L - 1 mM
- se diluye en 600ml
- se ajusta el pH con HCl
- se afora a 1L.

Soluciones para la cromatografía en papel: teramil OH:NH₄OH 2N:hexano (5:6:1)

- 431.4 ml de agua (H₂O) + 68.6 ml de amonio (NH₃) = 500 ml de NH₄OH
- 500 ml de NH₄OH + 208.3 ml de teramil OH + 4.65 ml de hexano
- se mezclan en una probeta
- se pone la mezcla en un embudo de separación y se deja reposar
- las 2 fases resultantes se guardan por separado
- la fase superior se utiliza para correr la cromatografía y la inferior para impregnar la cámara

Limpieza de la hormona

La hormona se separa del yodo (I⁻) utilizando una columna SEP-PAK. En las fracciones de la 3 a la 9 se obtiene el I⁻ y de la 10 a la 15 la hormona marcada.

# Tubo	Cantidad	Sustancia
1	5 ml	fosfatos metanol 40:60
2	150 µl	T3
3	500 µl	fosfatos NaH ₂ PO ₄ 0.1 M
4	500 µl	fosfatos NaH ₂ PO ₄ 0.1 M
5	500 µl	fosfatos metanol 40:60
6	500 µl	fosfatos metanol 40:60
7	500 µl	fosfatos metanol 40:60
8	500 µl	fosfatos metanol 40:60
9	500 µl	fosfatos metanol 40:60
10	200 µl	metanol amonio 99:1
11	200 µl	metanol amonio 99:1
12	200 µl	metanol amonio 99:1
13	200 µl	metanol amonio 99:1
14	200 µl	metanol amonio 99:1
15	200 µl	metanol amonio 99:1

Preparación del coctei para el experimento

- Hormona marcada (T3): 100,000 cpm finales; 600,000 cpm por cada 100 µl de esta solución (12,500,000 cpm para 2500 µl).

- Hormona fría T3: 0.1 μM final; 0.6 μM en esta solución (27 μl de una solución 55.5 μM para 2500 μl) + rT3 1 μM ; 6 μM en esta solución (1500 μl de una solución 10 μM para 2500 μl).
- DTT: 100 mM; 600 mM en esta solución (231 mg para 2500 μl).
- PTU 1 mM final; 6 mM en esta solución (375 μl de una solución 20 mM para 2500 μl).
- Se mezclan la hormona fría, DTT, PTU y se afora con el amortiguador de HEPES, posteriormente se mezcla con la hormona marcada en una proporción 1:1 entre ambas soluciones.

Preparación del tejido

El hígado se homogeneiza en una proporción de 1:10 con amortiguador de HEPES (100 mg de tejido en 1 ml de HEPES).

La cantidad de proteína utilizada fue de 207 mg/1ml (20.7 μg /100 μl en el experimento). La cuantificación de proteína se hace por el método de Bradford.

Método

	Coctel	HEPES	Tejido
Daño	100 μl	200 μl	-
Muestra	100 μl	100 μl	100 μl

- se agita,
- se incuba durante 3 horas a 37°C,
- se para la reacción con 200 μl de etanol,
- se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm,
- se toman 100 μl del sobrenadante y 50 μl de un coctel de todas las HTs y yodo, se ponen en un tubo aparte,
- se ponen en tiras de papel filtro y se colocan en la cámara de cromatografía
- al otro día se revelan y se cortan de acuerdo con las marcas hechas por el coctel estandar y se cuenta cada fracción en un contador gamma.