



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

19
24

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LAS ISOFORMAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO Y PROLACTINA EN PACIENTES CON ADENOMAS HIPOFISIARIOS Y MANIFESTACIONES CLINICAS DE ACROMEGALIA.

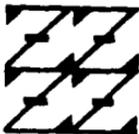
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

BLANCA ESTELA DELGADILLO TELLEZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HIZIMOS ASÍ
DE NUESTRA REFLEXIÓN

ASESORES: DRA. MA. EUGENIA FONSECA YERENA
QFB MARTHA A. SANCHEZ RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a usted como Sinodal del Examen Profesional del (la) señor (ita):

DELGADILLO TELLEZ BLANCA ESTELA

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo:

Le agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Separación cromatográfica de las Isoformas de la Hormona de Crecimiento y Prolactina en pacientes con adenomas hipofisarios y manifestaciones clínicas de Acromegalia.

y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE Q.F.B. LEONOR AGUILAR SANTELISES *Leonora Aguilar S*

VOCAL DRA. MA. EUGENIA FONSECA *Ma Eugenia Fonseca*

SECRETARIO Q.F.B. MARTHA A. SANCHEZ RODRIGUEZ *Martha A. Sanchez Rodriguez*

SUPLENTE Q.F.B. ROSALINDA ESCALANTE PLIEGO *Rosalinda Escalante*

SUPLENTE Q.F.B. PILAR CEDILLO MARTINEZ *Pilar Cedillo*

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. 28 de OCTUBRE de 1994.

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados.
c.c.p. Interesado.

Agradezco sinceramente a:

Dra Ma. Eugenia Fonseca Yerena

por su valiosa dirección y asesoría para la realización de esta tesis así como también por los consejos recibidos.

A mis sinodales por su apoyo, asesoría y estímulos recibidos.

Dr. Arturo Zarate Treviño

Jefe de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Endócrinas del Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI por permitir la realización de esta Tesis.

Mi enorme gratitud a la Bióloga Raquel Ochoa Reséndiz y a la QFB Rosa Elba Galvan D. por su valiosa colaboración y sus acertados comentarios durante mi estancia en este laboratorio.

A todo el personal del Laboratorio de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Endócrinas del CMN Siglo XXI del IMSS : Maquis, Carmelita Silvis, Aida, Elba, Miriam; Carlos, Ricardo, Dalila, July, Paty, Mary Carman, Memo, Conchita, Rosalia, Lety, Angelica, Lalo, Douglas y Andres; por el apoyo recibido para la realización del presente trabajo y por la amistad que siempre me brindaron.

Dedico este trabajo muy especialmente a:

**Mi hija Jessica que es la fuerza que me motiva
a seguir superandome diariamente.**

**Mi madre Margarita Téllez a la que debo todo lo que soy
y que a pesar de que ya no se encuentra conmigo, su
recuerdo siempre me acompaña a todas partes al igual
que sus consejos.**

**A mis hermanos: Ignacio, Rodolfo, Teresa, Ernestina
y Zita, por la comprensión y apoyo que siempre me
ofrecieron.**

A mis cuñados: Silvia, Rita, Alejandro, Sergio y Jesus

**A mi tía Mary y a toda la familia Franco Delgadillo por
sus palabras de aliento que siempre recibí.**

**A mis sobrinos : Estela, Areli, Ivan, Viviana. Omar, Lupe
y Julio por la alegría que dan a nuestras vidas.**

**A mis amigos, maestros y compañeros con los
cuales compartí momentos inolvidables y en
especial a Carlos Rivera Paredes, por su
Inapreciable comprensión y ayuda.**

CONTENIDO.

Resumen.	1
Capitulo I.-Introducción.	3
Capitulo II.-Marco Teórico.	8
Mecanismo de acción hormonal.	10
Homona de crecimiento.	12
Prolactina.	16
Clasificación de endocrinopatías.	17
Filtración en gel.	23
Radioinmunoanálisis.	27
Planteamiento del problema.	29
Objetivos.	30
Hipótesis de trabajo.	30
Capitulo III.-Diseño experimental.	31
Material .	33
Métodos.	36
Capitulo IV.-Resultados.	41
I)Estudio hormonal.	41
II)Estudio cromatográfico.	42
III)Perfil cromatográfico de GH y de PRL.	45
1.-Grupo Control	45
2.-Grupo I: Acromegalia Típica	51
3.-Grupo II: S. Acromegaloide	60
4.-Grupo III: Tumor Mixto	68
Capitulo V.- Discusión de Resultados.	88
Conclusiones	90
Bibliografía	91

RESUMEN.

La hormona de crecimiento (GH) y la prolactina (PRL) son dos hormonas de origen hipofisario química y biológicamente muy similares que constituyen junto con el lactógeno placentario la familia de las hormonas lactotrópicas somatotrópicas. Mientras que la elevación de la PRL determina alteraciones de la función gonadal y galactorrea, la de la GH causa acromegalia que se debe generalmente a la presencia de un adenoma de la adenohipófisis.

En este trabajo se estudiaron 14 pacientes con adenoma hipofisario y manifestaciones clínicas de acromegalia, de 21 a 54 años de edad que se clasificaron en tres grupos de acuerdo a su concentración de hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL).

Grupo I.- 5 pacientes con GH elevada (7.6 - 36.6 ng/ml) y una concentración normal de PRL (4.7 - 9.7 ng/ml).

Grupo II.- 4 pacientes con GH normal (0.61 - 1.75 ng/ml) y PRL elevada (69.60 - 152.0 ng/ml) con datos clínicos de acromegalia.

Grupo III.- 5 pacientes con GH elevada (21.40 - 222.0 ng/ml) y PRL también elevada (29.4 - 2020 ng/ml).

A todos los pacientes se les tomaron muestras de sangre venosa entre las 7 - 9 am, en ayunas, separando el suero en dos porciones y congelándolas a -20°C hasta realizar el estudio hormonal en una de ellas; después la otra se sometió a un estudio de filtración en Sephadex G-100, para separar las formas moleculares de las hormonas de acuerdo a su tamaño molecular: oligómeros de 100 a 60 kDa, dímeros de 52 - 40 kDa, monómeros de 26 - 22 kDa y fragmentos de 16 - 2 kDa.

La columna utilizada fue calibrada con marcadores de peso molecular conocido antes de aplicar las muestras de suero, eluyendo con amortiguador de fosfatos 0.01 M. pH 7.4 adicionado de NaCl 0.1% y albúmina bovina al 0.1%, a una velocidad de 6ml/h a 4°C . Las hormonas fueron cuantificadas en cada una de las fracciones por radioinmunoanálisis. Los perfiles cromatográficos obtenidos en los pacientes con acromegalia se compararon con los

de 5 pacientes normales, con cifras de PRL y GH también normales. El estudio cromatográfico de GH mostró en el grupo control, un predominio de las formas oligoméricas (100 - 60 kDa) mientras que en los pacientes acromegálicos de los grupos I y III predominaron los monómeros de la hormona (26 - 22 kDa). En el grupo II no pudo determinarse el perfil de la GH debido a su baja concentración, pero se encontró en este grupo que el perfil cromatográfico de la PRL también mostraba el predominio de las formas monoméricas (26 - 22 kDa), siendo muy similar al perfil de la GH en los pacientes de los grupos I y III.

Estos resultados indican que la variedad molecular predominante de la GH(%) en los pacientes acromegálicos tiene un peso molecular menor que en los sujetos normales y corresponde a la forma pequeña, la forma monomérica de 26 - 22 kDa, biológicamente la más activa. Por otra parte, en los pacientes del grupo II considerando: a) los bajos niveles de la GH, b) la elevada concentración de PRL, c) la semejanza estructural entre las dos hormonas y d) los resultados del estudio cromatográfico, con predominio de formas monoméricas de PRL, similares a las de GH, se puede concluir, que en estos pacientes, la PRL es la hormona que condiciona la acromegalia o un cuadro acromegaloide, por una posible interacción a nivel de los receptores de GH, lo que puede desencadenar el efecto biológico.

CAPITULO I

INTRODUCCION.

Las hormonas son sustancias químicas producidas por las glándulas endócrinas que regulan numerosas actividades del organismo como son: la reproducción, el crecimiento y el desarrollo; el mantenimiento del medio interno, y la producción, utilización y almacenamiento de la energía.⁽¹⁾

Según su estructura química las hormonas se clasifican en: 1) aminoras o derivados de aminoácidos, 2) hormonas proteicas o peptídicas y 3) hormonas esteroides. Entre las hormonas proteicas tenemos a la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PRL)⁽²⁾.

La GH y la PRL son sintetizadas por la adenohipófisis y forman parte de un grupo de hormonas constituidas por una sola cadena polipeptídica. Ambas están muy relacionadas estructuralmente y provienen de un gen ancestral común⁽³⁾. La molécula de la hormona de crecimiento humana (hGH) contiene 191 aminoácidos y cuenta con dos puentes disulfuro que se forman entre residuos de cisteína adyacentes. La PRL contiene 198 aminoácidos y presenta tres puentes disulfuro, existiendo elevado grado de homología entre las dos hormonas, por lo que pueden presentar similitud en su acción biológica constituyendo junto con el lactógeno placentario el grupo de las llamadas hormonas lactogénico somatotrópicas (Figura 1).

La regulación del crecimiento en el humano, está mediada de manera predominante por la GH, conocida como somatotropina u hormona del crecimiento. La actividad biológica de la GH es fundamentalmente metabólica y se ejerce, en prácticamente todos los tejidos del organismo. Su ausencia causa enanismo y su exceso en niños provoca gigantismo o bien la acromegalia en adultos, la cual se debe a una elevada concentración de GH por la presencia de un adenoma hipofisario secretor de la hormona.

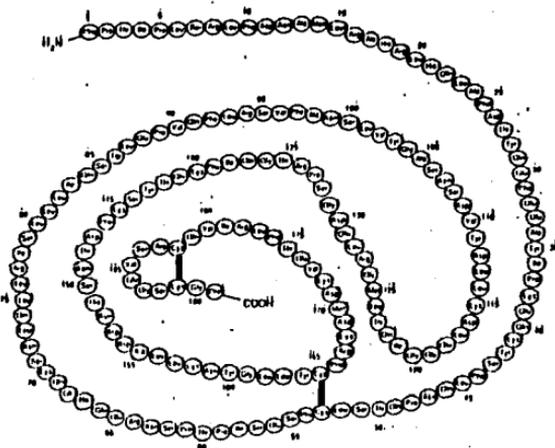
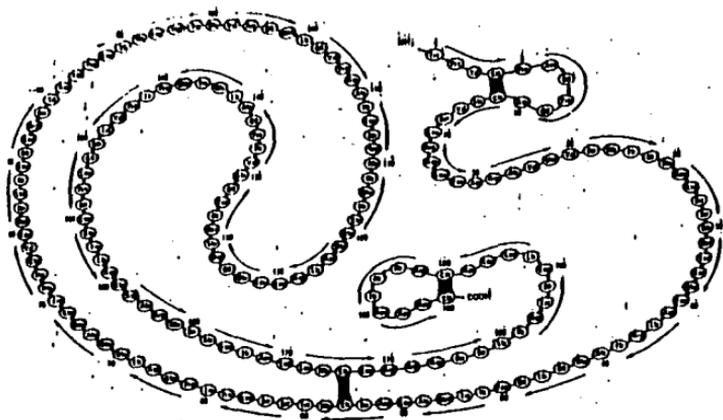


FIGURA 1.-Estructura de la Prolactina (parte superior) y de la Hormona del crecimiento humana (dibujo inferior), puede apreciarse la semejanza entre ambas hormonas.

Fuente: Manual de química fisiológica , Harper A.H. 1975.

La prolactina es una hormona con un peso molecular aproximado de 22, 000 y al igual que la GH es producida por las células acidófilas de la adenohipófisis. En el hombre, la PRL actúa como agente anabólico, simulando los efectos de la GH, aunque es menos activa. En la mujer su concentración aumenta durante el embarazo estimulando el desarrollo mamario y la actividad lactogénica en el posparto inmediato, asegurando así la producción de leche y la alimentación del recién nacido, de ahí su nombre. En condiciones patológicas la hormona es secretada a la circulación en elevadas cantidades por un adenoma hipofisiario productor de la hormona (prolactinoma).

En la actualidad se sabe por estudios cromatográficos y de electroforesis así como radioinmunoanálisis, que la mayoría de las hormonas peptídicas, sino todas, existen en el plasma y en los extractos hipofisarios en más de una forma molecular. Estas variedades moleculares pueden presentar diferente grado de actividad biológica, y representan precursores o productos resultantes de la polimerización o del metabolismo de la hormona biológicamente activa, bien conocida y caracterizada. Esto da lugar a la heterogeneidad molecular observada tanto en los extractos pituitarios como en el suero⁽⁴⁾.

De acuerdo a estudios recientemente realizados, la heterogeneidad de las hormonas puede deberse a diferentes causas: origen genético, por modificaciones postranscripcionales, postranslacionales, o eventos postsecretorios⁽⁵⁾. Así ambas hormonas existen en la circulación en varias formas moleculares, y esta heterogeneidad parece ser la responsable de las acciones complejas y algunas veces contradictorias de ambas hormonas.⁽³⁾

La importancia de la heterogenicidad molecular en la fisiología de la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina humanas (PRL) fué apreciada hasta últimas fechas.

La GH es una de las hormonas polipeptídicas más heterogéneas, entre sus formas nativas conocidas tenemos: la GH 22 kDa que es la más abundante en la hipófisis, su peso molecular es de aproximadamente 22, 000 daltons. En cuanto a su actividad biológica interviene fundamentalmente en la promoción del crecimiento.⁽⁵⁾

La GH 20 kDa es una cadena de 176 aminoácidos y es la segunda variante más abundante en hipófisis, sin embargo no existen datos concluyentes acerca de su acción promotora del

crecimiento en humanos⁽⁸⁾, por otra parte tiene disminuida su actividad parecida a la de insulina (insulin like activity) y la actividad lipolítica sobre los ácidos grasos libres en comparación a la de 22 kDa⁽⁷⁾.

En hipófisis y en suero se presentan también los dímeros de la hormona llamados " Big " GH, que pueden ser homodímeros (20 kDa/ 20 kDa ó 22 kDa / 22 kDa) o heterodímeros (20 kDa / 22 kDa). Sobre su actividad biológica hay muy poca información, solo se sabe que su actividad promotora del crecimiento es baja entre 10-20 % de la actividad que presenta la GH monomérica de 22 kDa, aunque parecen tener actividad lipolítica o lactogénica elevada, dependiendo del tipo de dímero (8,9).

También existen en hipófisis formas muy grandes de GH denominadas " Big-big "; aunque no existe suficiente información sobre su estructura, se sabe que pueden ser tri, tetra o pentámeros, de la forma monomérica o bien la forma monomérica unida a proteínas ligadoras de alta y baja afinidad⁽¹⁰⁾.

Otras formas de GH encontradas tanto en el suero como en la hipófisis, son pequeños péptidos de menos de 16 kDa que se piensa tienen actividad diabotogénica muy elevada y que no presentan actividad promotora del crecimiento, ni actividad semejante a la insulina.

En cuanto a la PRL, a la fecha son bien conocidas 3 formas moleculares de la hormona reveladas por filtración en gel. La más importante en el perfil cromatográfico es la más pequeña, que eluye en las fracciones correspondientes al estandar de PRL ¹⁻¹²⁵, es una estructura con peso molecular de 22 kDa. A esta forma molecular se le llama " little " PRL, corresponde a la forma monomérica de la hormona y parece ser la forma más activa. Las otras dos formas moleculares de mayor tamaño son " Big-big " PRL que eluye justo después del volumen de vaciado del sistema (Vo) con un peso molecular aproximado de 100 kDa, y la " big " PRL con peso molecular de 40-65 kDa, que aparece en el volumen de elución de la albúmina^(11,12,13). Ambas formas presentan menor actividad biológica que " little " PRL. Se cree que la " big" PRL puede ser el dímero y la " Big-big " PRL un polímero o el precursor de la hormona. En estudios recientes se ha reportado la presencia de una variante de PRL glicosilada (G-PRL) con un PM aproximado de 25, 000 - 28,000 daltons y ha

sido aislada de cultivos de tumores secretores de PRL⁽¹⁴⁾ y se ha identificado también en suero humano. Dicha forma parece ser menos activa que la forma monomérica no glicosilada, y es de interés por considerarse que regula la concentración de la PRL activa (22 kDa)⁽¹⁵⁾. Así, el polimorfismo de PRL es muy importante porque parece guardar relación con la actividad biológica de la hormona⁽¹²⁾ pensándose que alguna de sus formas moleculares por su semejanza estructural con la GH puede ocupar los receptores de la hormona y manifestar una acción anabólica o somatotrópica, a su vez la GH puede presentar actividad lactogénica.

Por esta razón se consideró necesario estudiar la composición cualitativa y la proporción de las diferentes formas moleculares de GH y PRL, en pacientes con acromegalia, síndrome acromegaloide y tumores mixtos.

CAPITULO II

MARCO TEORICO.

Actualmente se sabe que el cuerpo humano dispone de dos sistemas de integración: el sistema nervioso y el sistema endócrino.

El sistema endócrino es el conjunto de todas las glándulas de secreción interna, las cuales secretan una serie de sustancias complejas llamadas hormonas, que son transportadas a través de la sangre y tienen como función estimular o inhibir la actividad metabólica de glándulas u órganos "blanco", efectores que a su vez controlan el metabolismo, el crecimiento y la reproducción.⁽¹⁶⁾

Las glándulas endócrinas se dividen en dos grupos principales: 1) aquellas que forman una unidad funcional con la adenohipófisis, y son dirigidas por esta glándula central influyendo también poderosamente sobre ella para regular su secreción; tal es el caso de la tiroidea, la corteza suprarrenal y las gonadas 2) las no dependientes de la secreción adenohipofisiaria, como el páncreas y el estómago.

La hipófisis, que significa "crecimiento por debajo", se localiza debajo del cerebro, y como ya se mencionó, tiene un papel importante en la función endócrina del organismo. La glándula se divide en tres partes: el lóbulo anterior (adenohipófisis), el lóbulo posterior (neurohipófisis) y el "lóbulo intermedio" (porción intermedia)(Figura 2).

La neurohipófisis, está conectada directamente con el hipotálamo, mediante fibras nerviosas, existiendo además interacción vascular, a través del tallo hipofisiario. La neurohipófisis contiene también células de tejido conectivo no neural (células de neuroglia), conocidas como pituiticos.

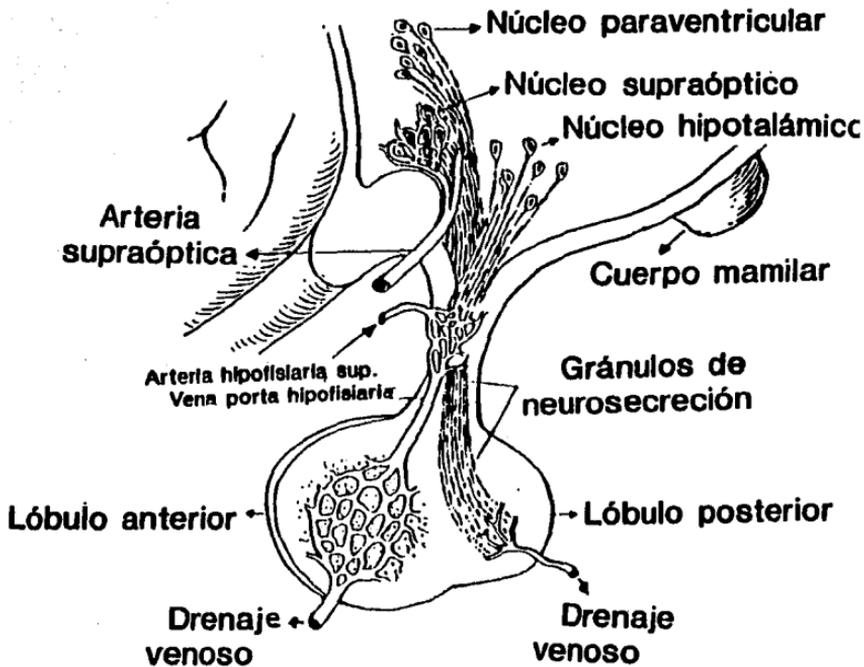


FIGURA 2.-Reconstrucción esquemáticamente simplificada del hipotálamo y de la pituitaria.

Fuente: Manual de química fisiológica . Harper A.H. 1975.

La adenohipófisis por otra parte está altamente vascularizada y sus células son reguladas en su actividad endocrina por hormonas elaboradas por el hipotálamo, que se liberan al sistema venoso porta hipotálamo-hipofisiario⁽¹⁷⁾.

La adenohipófisis contiene dos grupos principales de células histológicamente diferentes. Se designan como cromóforas, aquellas células pequeñas con citoplasma granular que no se tiñen bien, y cromófilas, a células grandes que tienen abundantes gránulos y que se tiñen con facilidad .

Las cromófilas se subdividen en basófilas y acidófilas, dependiendo de su afinidad tintorial con el uso de diversos colorantes. La adenohipófisis tiene cuando menos seis tipos diferentes de células, y cada una secreta una hormona específica,⁽¹⁸⁾ así por ejemplo la prolactina (PRL) se produce en los llamados lactotropos y la hormona del crecimiento (GH) en los somatotropos.

MECANISMO DE ACCION HORMONAL.

Como ya se ha mencionado las hormonas pueden dividirse desde el punto de vista estructural en tres clases: polipéptidos, derivados de aminoácidos y esteroides. Las primeras incluyen hormonas como la prolactina (PRL) y la hormona de crecimiento (GH), las aminas comprenden sustancias como la tiroxina y las catecolaminas; y las últimas incluyen las hormonas gonadales como los estrógenos y la testosterona⁽¹⁹⁾. Esto es importante porque de su estructura depende, la forma como se unen a sus receptores y su mecanismo de acción.

Algunas hormonas como los esteroides y posiblemente las hormonas tiroideas, penetran al interior de las células hasta su localización nuclear, donde van a actuar directamente sobre el genoma, otras como las de naturaleza proteica no pueden penetrar y por ello se localizan exclusivamente en la membrana celular, donde se unen a receptores específicos, requiriendo uno o varios intermediarios para desencadenar las modificaciones intracelulares características de la activación del receptor. Entre ellos destacan primordialmente los mononucleótidos cíclicos, como el AMP y el GMP, a los que se considera como segundos mensajeros de la acción hormonal.

Actualmente se admiten dos mecanismos principales de acción de las hormonas:

1.-Regulación de la síntesis proteica. A partir de 1964 se ha ido comprobando que la mayoría de hormonas esteroides conocidas regulan la síntesis de proteínas y del RNA. Posiblemente efectúan tal acción, activando a los genes y provocando la transcripción de diferentes especies de RNA mensajero, que codifican la síntesis de proteínas específicas. Tal hipótesis ha hallado amplia confirmación experimental. Por autoradiografía se ha demostrado que tales hormonas se localizan en los núcleos celulares de los tejidos efectores.

Es posible que en algunos casos la exposición prolongada a una hormona aumente el número de receptores y por lo tanto la sensibilidad celular a la misma, sin embargo en otros casos disminuye la síntesis del receptor (Down regulación).

2.-Acción a nivel de la membrana celular y formación del AMP cíclico (AMPc o segundo mensajero). Este mecanismo de acción ha sido conocido, a partir de los trabajos de Sutherland, en la década de los 50's, para la mayoría de las hormonas proteicas: ACTH, LH, TSH, MSH, glucagon, insulina, adrenalina, histamina y otras. La hormona se une al receptor específico, localizado en la membrana y estimula el sistema de la adenilciclase, enzima que favorece la formación, a partir del ATP, del adenosinmonofosfato cíclico (AMP cíclico o 3', 5'-AMP). Este producto de gran importancia biológica, traduce los efectos específicos de las hormonas mencionadas. La especificidad de la acción hormonal queda garantizada por el receptor específico para cada hormona, localizado en la membrana celular. El efecto biológico de las hormonas es así ejercido, no directamente por ellas, sino por el AMPc, el cual ha recibido por ello el nombre de segundo mensajero. El AMPc es inactivado por una fosfodiesterasa específica que lo convierte en 5-AMP. El aumento de AMPc se puede obtener por dos mecanismos: a) estimulando al sistema adenil-ciclase mediante la hormona específica (primer mensajero); b) bloqueando la degradación del AMP cíclico, lo cual se consigue al inhibir la fosfodiesterasa. Sin embargo en algunos sistemas no puede aceptarse que los nucleótidos cíclicos sean los mediadores en los efectos hormonales. Se han postulado otras alternativas, de las cuales la del flujo celular de calcio es la más interesante. Algunas hormonas como la insulina, al actuar sobre su receptor específico, modifican el transporte del calcio por las membranas plasmáticas,

estableciéndose un flujo celular por su captación por el retículo endoplásmico y las mitocondrias, lo que podría servir de mensajero⁽¹⁸⁾.

En otros casos la acción del calcio puede estar interrelacionada con el sistema de la adenilciclase, que al producir AMPc, puede estimular quinasas específicas, que ocasionan salida del calcio intracelular, principalmente de la poza mitocondrial. Esto aumenta el calcio en el citosol, el cual actúa sobre varias enzimas, algunas de las cuales son fosfoproteínas. El calcio mismo inhibe la adenilciclase para establecer una vía de retroalimentación negativa.

Otros intermediarios de la acción hormonal son las prostaglandinas involucradas en la acción de la prolactina, ya que su efecto puede ser limitado por las mismas; los inhibidores de síntesis de prostaglandinas bloquean algunos de sus efectos.

HORMONA DE CRECIMIENTO.

La hormona de crecimiento (GH) es un polipéptido constituido por una sola cadena de 191 aminoácidos con dos puentes disulfuro y con un peso molecular aproximado de 22, 000⁽³⁾, que como ya se mencionó, es sintetizada y secretada por las células somatotropas de la adenohipófisis⁽¹⁹⁾. El contenido de GH de una hipófisis normal humana es de aproximadamente 3 a 7 mg, y una vez liberada tiene una vida media corta. Proviene de un péptido precursor de mayor tamaño que es el pre-GH (peso molecular de 28, 000) que también llega a aparecer en la circulación, pero hasta la fecha parece carecer de importancia fisiológica⁽²⁰⁾.

Es probable que la hormona del crecimiento, la prolactina y el lactógeno placentario humano (hPL) que tienen gran homología provengan de un gen ancestral común⁽³⁾ y aunque presentan diferencias en su estructura e importancia funcional intrínseca, siguen compartiendo propiedades lactógenas y somatotrópicas (estimulación del crecimiento).

La función primaria de la hormona del crecimiento o somatotropina es estimular el crecimiento lineal de músculos y huesos, aunque gran parte de esta acción estimulante del crecimiento es

mediada por las somatomedinas, familia de péptidos pequeños producidos en el hígado, estructuralmente relacionados a la insulina.

La hormona de crecimiento, actuando a través de las somatomedinas aumenta la síntesis proteica, estimulando la captación de aminoácidos y acelerando la transcripción y traducción de RNAm⁽²¹⁾. Además la GH tiende a disminuir el catabolismo proteico movilizandoo las grasas que constituyen una fuente más eficaz de combustible, es decir induce lipólisis y liberación de ácidos grasos a partir de tejido adiposo, y estimula su conversión a acetil-CoA, compuesto a partir del cual se libera gran cantidad de energía.

Este efecto de ahorro proteico puede constituir el mecanismo de mayor importancia, por el cual la GH estimula el crecimiento y desarrollo de los tejidos.

Esta hormona también modifica el metabolismo de los carbohidratos disminuyendo la utilización y la captación de glucosa al interior de las células^(22,23), por lo que tiene un efecto hiperglucemiante.

En condiciones fisiológicas normales la hormona de crecimiento humana es secretada durante el sueño nocturno, en respuesta a pulsos episódicos del factor liberador de GH (GRF) de origen hipotálamico. Su secreción es disminuida por un péptido inhibidor hipotálamico llamado somatostatina (Figura 3).

La GH de los extractos hipofisarios y del plasma no es homogénea, esta formada por una mezcla de variantes moleculares que difieren en su secuencia de aminoácidos, peso molecular y carga eléctrica debido a modificaciones efectuadas durante la transloción o post-translacionalmente, así como por su unión a proteínas e hidrólisis enzimática, lo que da origen a fragmentos^(24,25). A esta variedad de formas moleculares se le conoce como heterogeneidad molecular.

El interés en la heterogeneidad de la hormona de crecimiento ha aumentado últimamente debido a que se observó que algunas de estas formas son biológicamente más activas que otras y que además ciertas actividades de la GH como la actividad promotora del crecimiento y su acción diabotogénica podían disociarse y estar confinadas en una variante determinada.

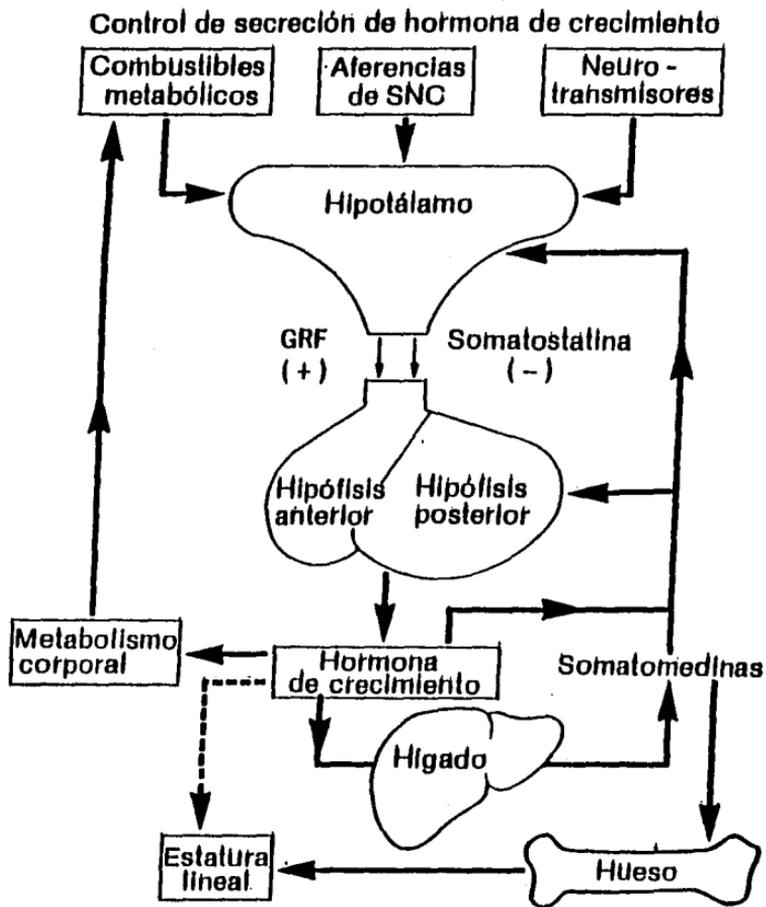


FIGURA 3.-Esquema de vías centrales y periféricas implicadas en regular la liberación de hormona del crecimiento.

Fuente: Folleto Hormona de crecimiento humana recombinante de Serono.

En la actualidad se sabe que la forma predominante de GH en hipófisis y la más activa es el monómero de 22 KDa aunque existen otras formas moleculares, que se muestran en la tabla No 1.

TABLA 1.- Formas mayores de hGH en suero.

VARIANTE	PESO MOLECULAR APROXIMADO (kDa)	GENE / CROMOSOMA	COMENTARIOS
hGH Monomérica pituitaria	22	hGH-N/17	Aproximadamente 75 % de hGH inmunorreactiva total.
hGH 20 kDa	20	hGH-N/17	Aproximadamente 16 % de hGH inmunorreactiva total.
hGH " Grande "	40-50	hGH-N/17	Dímeros.
hGH " Grande - Grande "	> 60	hGH-N/17	a) Agregados. b) hGH unida a complejos proteicos.
Fragmentos	< 20	hGH-N/17	Presente en suero en estado basal. ¿Formados en tejidos?
hGH Placentaria	22 24, 26	hGH-V/17 hGH-V/17	Secretada por placenta. Formas glicosiladas de hGH placentaria.

PROLACTINA.

La prolactina (PRL) también llamada hormona lactogénica es una hormona proteica con peso molecular aproximado de 22.000 daltons, consta de una simple cadena polipeptídica compuesta por 198 aminoácidos con tres puentes disulfuro.

Se piensa que en los animales y en la mujer, la PRL tiene un efecto sinérgico con la LH activando la formación de cuerpo lúteo y estimulando la producción de progesterona. En la especie humana además de su acción lactogénica y luteotrópica, se le atribuye un papel mamotrópico, condicionando el crecimiento de la glándula mamaria a la pubertad. De igual manera durante el embarazo la PRL incrementa notablemente su concentración y su papel principal es el desarrollo de la glándula mamaria y su preparación para la lactancia.⁽²⁸⁾

En el puerperio, la prolactina desempeña un papel clave para la secreción de leche en la glándula mamaria diferenciada, y estimula la síntesis de proteínas de la leche, tales como α -lacto albúmina y caseína⁽²⁷⁾. Además se sabe que incrementa la capacidad de la glándula mamaria para atraer y retener linfoblastos secretores de Ig A, aunque se desconoce el mecanismo por el cual esto ocurre. Después del parto los valores de PRL disminuyen, pero se mantienen elevados en relación a los del ciclo menstrual en las madres que amamantan a sus hijos. La PRL se relaciona también con la reproducción, ya que mientras se encuentra elevada, afecta negativamente el ciclo reproductivo.

Los niveles circulantes de la PRL presentan un claro ritmo circadiano, con elevaciones nocturnas asociadas a la fase de sueño más profundo. En el control y regulación de la secreción de PRL intervienen principalmente dos factores: el factor inhibidor de la prolactina (PIF) y la hormona liberadora de PRL (PRF). La estructura química de ambas se desconoce, sin embargo existen evidencias de que el PIF corresponde a la dopamina, mientras que el PRF probablemente corresponde a la hormona liberadora de tirotropina (TRH) o a un péptido químicamente relacionado ya que la administración de esta hormona hipotalámica, induce la liberación de PRL. La secreción de PRL al igual que la de GH se incrementa durante el stress, ya sea físico o psicoemocional y también con la administración de estrógenos.⁽²⁸⁾

CLASIFICACION DE LAS ENDOCRINOPATIAS.

Se tienen dos tipos principales de endocrinopatías:

1) Estados de hipofunción endocrina.

Se deben principalmente a la insuficiente producción o descarga de una determinada hormona, bien sea por alteración anatómica o funcional de la glándula que la elabora. Aunque menos importantes tenemos otros mecanismos de hipofunción como son: la conjugación, inactivación o degradación demasiado rápida o intensa y la presencia de anticuerpos antihormonales espontáneos o inducidos.

También cabe incluir aquí, las falsas hipofunciones endocrinas o pseudoendocrinopatías, así llamadas, porque sin existir defecto glandular alguno en la secreción, pueden faltar los receptores hormonales o los efectores periféricos dejan de responder, produciéndose una alteración; así por ejemplo a los indios americanos no les sale barba a pesar de no tener hipogonadismo. Otras veces ocurre lo contrario, los efectores periféricos responden excesivamente a cantidades normales de hormona causando un cuadro clínico, por ejemplo acromegalias parciales ante niveles normales de hormona de crecimiento.

2) Los estados hiperfuncionales endocrinos en general son consecutivos a la producción excesiva de la correspondiente hormona, pero otras veces dependen de la aludida mayor respuesta de los efectores, menos frecuentemente a la inactivación lenta o la excreción retardada de la hormona en cuestión. (16)

Entre este último tipo de endocrinopatías tenemos a los adenomas hipofisarios.

Adenomas hipofisarios:

Los adenomas hipofisarios son relativamente comunes, se ha calculado que representan aproximadamente el 15 % de todos los tumores intracraneales. Dentro de estos adenomas tenemos diferentes estirpes:

1) Los adenomas cromófobos, representan la neoplasia hipofisaria más común. La mayoría de dichos tumores son microscópicos y se presentan en ambos sexos, con mayor frecuencia en la sexta década de la vida.

En algunos casos de adenoma cromóforo, el tumor puede ser mixto elaborando una o más hormonas, tal como se ha demostrado en algunos casos de síndrome de Cushing, que cursa con hiperplasia adrenal virilizante y galactorrea.

Por otro lado se ha demostrado con base en estudios histológicos sistemáticos que casi todos los adenomas cromófobos clasificados anteriormente como " no funcionantes " , son realmente adenomas productores de prolactina, gonadotropinas (LH, FSH) o tirotrina (TSH).

Prolactinomas:

Los prolactinomas o tumores hipersecretores de PRL constituyen el tipo de adenoma más común; surge generalmente de las alas laterales de la zona anterior de la hipófisis, pero crece, llena la silla turca y comprime los lóbulos anterior y posterior. El tamaño del tumor varía mucho desde microadenomas (tumores menores de 1 cm de diámetro) hasta grandes masas invasoras con extensión extrasillar. Cuando se hace el diagnóstico en la mujer casi todas tienen microadenomas en cambio en el hombre es frecuente que no se diagnostique hasta que es un macroprolactinoma. Los prolactinomas a menudo muestran necrosis parcial espontánea y de este modo en 30 - 40 % de los enfermos hay una imagen de silla turca vacía.

La expresión clínica más característica de la hiperprolactinemia es la galactorrea, que puede definirse como una secreción persistente de la mama, parecido a la secreción láctea, que ocurre sin relación al parto, o bien que persiste durante varios meses post-parto en ausencia de amamantamiento^(29,30).

La galactorrea se presenta tanto en el hombre como en la mujer; en el hombre es menos frecuente, supuestamente por que la mama recibe menor estímulo estrogénico.

Por otra parte, puede presentarse también galactorrea, en mujeres que tienen niveles normales de prolactina⁽³¹⁾ lo que se ha tratado de explicar en base a varias teorías: 1) una excesiva sensibilidad

del tejido mamario a dicha hormona, debido a un aumento de los receptores de PRL, 2) cambios en los ritmos de secreción de PRL, 3) a una elevada concentración de GH. (32)

Por otro lado el 90 % de las mujeres con prolactinomas, presentan amenorrea, que es la ausencia temporal o permanente de la menstruación, en el periodo comprendido entre la pubertad y la menopausia, o bien oligomenorrea con anovulación y esterilidad.

En los varones el exceso de PRL a veces ocasiona galactorrea, pero la manifestación más común es el hipogonadismo, en el cual el síntoma inicial es la disminución de la libido. La impotencia también se observa en varones hiperprolactinémicos, así como la esterilidad, ocasionada por una disminución en la cantidad de espermatozoides.

Los prolactinomas son generalmente de crecimiento lento, si bien no se ha precisado la evolución propia de los microadenomas.

Adenomas Mixtos.

Dichos tumores, aunque predominantemente cromóforos poseen un pequeño número de células basófilas o acidófilas que justifican el término de "adenoma mixto".

Entre estos tenemos dos tipos:

- a) Adenomas acidófilos.
- b) Adenomas basófilos.

En los adenomas acidófilos, la hiperfunción de las células de la adenohipófisis produce GH y conduce a los cuadros clínicos de gigantismo y acromegalia, la cual es una enfermedad crónica que se manifiesta por un aumento gradual, pero ostensible, del tamaño de las manos, pies y cráneo, así como un trastorno generalizado con efectos nocivos en muchos órganos. Esto se atribuye a una excesiva secreción de hormona de crecimiento o somatotrópina, que causa un crecimiento longitudinal excesivo en los jóvenes, cuyas líneas epifisarias están todavía abiertas produciendo el gigantismo. En individuos de mayor edad, el cierre de las epifisis impide cualquier ulterior crecimiento en longitud, sólo es posible el crecimiento de partes blandas, lo cual conduce a la acromegalia. A veces se desarrollan gigantes hiperpituitarios, incluso en la niñez.

El tamaño del tumor varía de manera considerable; en algunos casos es pequeño y se halla embebido en el interior de un lóbulo anterior pequeño o normal. Ocasionalmente puede detectarse un pequeño adenoma acidófilo asintomático, sin llegar a observarse ninguna de las características de la acromegalia. Posiblemente, dicho tumor no produce excesivas cantidades de hormona de crecimiento.

La otra hormona producida frecuentemente por los adenomas mixtos, es la PRL por lo que los pacientes pueden presentar galactorrea.

Acromegalia.

En estos últimos años (Besser, Schally, Kastin y Hall, 1974-1990) se ha sustentado que la acromegalia podría ser una enfermedad primitiva del hipotálamo por falta de somatostatina el factor inhibidor de la GH (GH-RIH). Esta deficiencia permitiría una secreción adenohipofisaria excesiva de hGH con aparición secundaria de hiperplasia o de un adenoma. Esta enfermedad crónica afecta por igual a ambos sexos y el promedio de edad en que se hace el diagnóstico es alrededor de los 40 años, es poco frecuente, aproximadamente 1 caso por cada 10, 000-15, 000 enfermos asistidos en preclínicas.

En la acromegalia, el tumor es de ordinario lo bastante grande para erosionar y agrandar las paredes de la silla turca, de forma que en la mayoría de los casos en el examen radiológico, se observa una silla turca agrandada. Es común observar que el tumor se extienda hacia arriba en el interior de la cavidad craneal y hacia abajo en los senos esfenoidales.

Son especialmente características en la acromegalia las alteraciones de la cara y de las extremidades. La nariz, el mentón, los labios y las orejas crecen a menudo hasta lo grotesco. Hay proliferación de tejidos blandos con agrandamiento de pies y manos, y por lo regular se presenta sudoración, piel grasosa, fatiga y aumento de peso.

Suele comprobarse, además, esplenomegalia, o sea gran aumento del tamaño visceral, incluso del corazón, así como agrandamiento de los órganos genitales externos. En ocasiones la voz se vuelve ronca y grave. No rara vez aumenta la dotación pilosa, que en las mujeres ofrece una

distribución viril, cayendo en cambio, a veces, el cabello (calvicie viriloide) (16,19). El cuadro 1 nos muestra la frecuencia de los datos clínicos hallados en la mayoría de los pacientes (33).

Cuadro 1. Manifestaciones clínicas de acromegalia en 100 pacientes.

Manifestaciones del exceso de GH.	
Agrandamiento acral	100†
Hiperplasia de tejidos blandos	100
Hiperhidrosis	88
Letargia o fatiga	87
Aumento de peso	73
Parestesias	70
Artralgias	69
Fotofobia	46
Papilomas	45
Hipertricosis	33
Bocio	32
Acanosis nigricans	29
Hipertensión	24
Cardiomegalia	16
Cálculos renales	11
† Porcentaje de pacientes que mostraron los signos	
Manifestaciones locales.	
Agrandamiento de la silla turca	90†
Cefalea	65
Deficiencias visuales	20
† Porcentaje de pacientes que mostraron los signos	

Continuación del cuadro 1.

Trastornos de otras funciones endocrinas.	
Hiperinsulinemia	70†
Intolerancia a la glucosa	50
Amenorrea o irregularidades menstruales	60
Disminución de la libido o impotencia	46
Hipotiroidismo	13
Galactorrea	13
Ginecomastia	8
Hipoadrenalismo	4
† Porcentaje de pacientes que mostraron los signos señalados	

La terapia de elección que ha obtenido éxito en 70 % de los casos, es la radioterapia de la hipófisis (5000 r) y también reseca quirúrgicamente la hipófisis. Entre otros métodos terapéuticos cabe citar la crioblación hipofisaria realizada por métodos estereotácticos, la población efectuada mediante ultrasonido y la irradiación con haz protónico, que en una hora consigue destruir la glándula. Recientemente, el tratamiento médico de la acromegalia ha recibido un gran impulso gracias a la introducción en terapéutica : 1) de algunos análogos de la Somatostatina o GH-RIH, que a la dosis de 1,3 ng / min por vía endovenosa consigue disminuir la hGH circulante, aumentar la tolerancia a la glucosa y reducir el nivel de las somatomedinas (Besser, 1979), 2) la bromocriptina un alcaloide del cornezuelo del centeno que a la dosis de 5 mg cada 6 horas y administrada durante un periodo prolongado puede suprimir la hGH circulante (Besser, 1975) (34) .

Los adenomas acidófilos también pueden causar galactorrea, ya que en ocasiones dichos mores constituyen la fuente de cantidades excesivas de prolactina.

FILTRACION EN GEL.

La cromatografía es un procedimiento analítico de gran importancia cuando se tienen sustancias que analizar que deben ser separadas de otras; además es muy útil para fraccionar compuestos muy lábiles, con poco riesgo de que sean desnaturalizados durante el proceso.

En función de los distintos tipos de fuerzas que actúan entre las sustancias por separar y la fase estacionaria, los procedimientos cromatográficos, se dividen en: Cromatografía de adsorción, de intercambio iónico, de distribución, de afinidad y filtración en gel.

La filtración en gel es un procedimiento cromatográfico introducido por Porath y Flodin en 1959 ⁽³⁵⁾, en él, la separación se basa en una propiedad relativamente nueva entre los métodos de fraccionamiento, la diferencia en peso o en las dimensiones moleculares que poseen los componentes por analizar.

La herramienta para obtener una separación adecuada, es el medio cromatográfico utilizado, el cual está formado por partículas pequeñas, generalmente empacadas en un tubo o columna de vidrio (fase estacionaria). El espacio entre las partículas se ocupa por un líquido que se hace fluir a través del medio cromatográfico (fase móvil). Las sustancias que se van a separar son acarreadas por el flujo del líquido. La fase estacionaria retarda el avance de las sustancias a través del medio, de acuerdo a sus pesos moleculares y por lo tanto migran a distintas velocidades. El efecto retardatorio es producido por la partición de la sustancia entre el líquido y la fase estacionaria.

La cromatografía en gel utiliza como fase estacionaria un gel sin cargas, que típicamente está formado por polímeros de glucosa o dextranas, macromoléculas que se caracterizan por presentar enlaces entrecruzados (cross-linked) lo que da un armazón tridimensional que los hace insolubles, y en lugar de disolverse en el líquido, se hinchan, tomando gran cantidad de disolvente.

De acuerdo a Flodin el coeficiente de partición del soluto entre la fase del gel y la fase líquida esta exclusivamente regido por los efectos estéricos. El hace notar que la matriz del gel ocupa un gran espacio en las cercanías del medio de los enlaces cruzados, las moléculas grandes no pueden penetrar dentro de estas regiones, mientras que las pequeñas se pueden aproximar a las ligaduras cruzadas. Las moléculas pequeñas tienen acceso a todos los espacios entre las cadenas de la matriz

del gel y por lo tanto, estarán distribuidas igualmente entre el líquido libre y el líquido en el gel. Las moléculas grandes tienen menos espacio dentro del gel y el coeficiente de partición se desplaza a favor del líquido que se encuentra afuera de las partículas del gel. Esto induce a que las moléculas grandes salgan del medio cromatográfico antes que las moléculas pequeñas⁽³⁶⁾ (Figura 4).

Dependiendo del tipo de gel empleado, se pueden fraccionar sustancias con peso molecular por abajo de 700 daltones hasta aquellas con valores superiores a 40×10^6 daltones. Además los geles pueden ser utilizados una y otra vez, ya que generalmente son muy estables y no necesitan regeneración; un mismo gel puede ser usado varias veces sin que se alteren sus propiedades cromatográficas, siempre y cuando se evite contaminación con bacterias u hongos.

Los parámetros necesarios para caracterizar una columna cromatográfica son:

~La velocidad del flujo a través del medio cromatográfico que generalmente se mide en ml/min. o ml/horas.

~Volumen de vaciado, (V_0) del lecho cromatográfico. Este es el volumen del líquido que se encuentra en el espacio intersticial entre los granos del lecho. Se determina mediante la cromatografía de alguna sustancia que no sea retardada por el material es decir que se excluya del mismo. Un material adecuado para este fin es el azul dextrán con PM de aproximadamente 2 millones

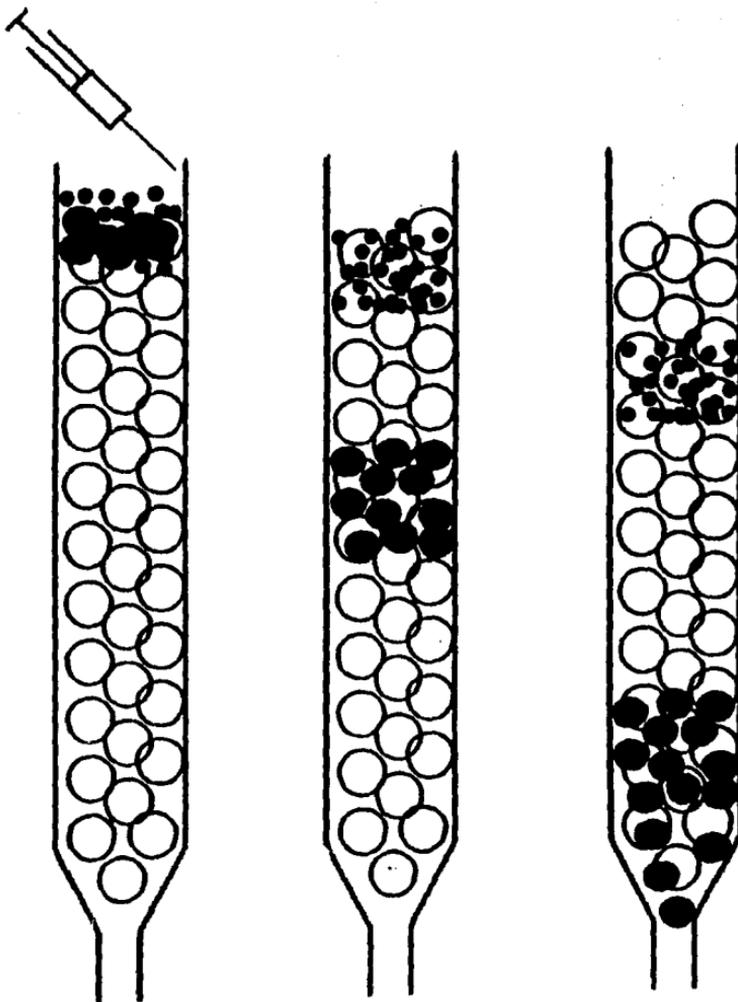
~El volumen de elución de una sustancia, (V_e) es el volumen del eluyente que se requiere para transportar determinada sustancia a través de la columna.

La filtración en gel es muy útil porque además de lograr la separación de las sustancias permite determinar el peso molecular de proteínas desconocidas lo que se hace por comparación de la relación V_e/V_0 de la proteína en cuestión con el V_e/V_0 de la proteína estándar de peso molecular conocido. Así cuando se corren varios estándares de diferente peso molecular puede prepararse una curva de calibración graficando los logaritmos de los pesos moleculares conocidos de las proteínas utilizadas como estándares contra los respectivos valores de V_e/V_0 .⁽³⁷⁾

~Otro parámetro importante es el volumen total de la columna (V_t) que es el volumen del lecho cromatográfico.

Estos parámetros antes mencionados se utilizan para obtener una constante fisicoquímica conocida como coeficiente de partición (K_{av}) que sirve para caracterizar las proteínas en la filtración en gel (en este caso las formas moleculares de GH y PRL) con base en su peso molecular. Su fórmula es:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$



○ PARTICULAS DE SEPHADEX. ● MOLECULAS GRANDES.
 ● MOLECULAS PEQUEÑAS.

FIGURA 4.-Representación gráfica del principio de la filtración en gel (Sephadex G-100)

RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA).

El advenimiento del radioinmunoanálisis (RIA) a fines de la década de los 50's y su desarrollo durante la de los 60's por Yallow y Berson, permitió contar con un método con la sensibilidad, especificidad y confiabilidad necesaria para el estudio de las hormonas haciendo posible también el estudio de su heterogeneidad.

Los ensayos de unión competitiva como el RIA son un grupo de métodos analíticos *in vitro*, basados en la unión reversible no covalente de una molécula pequeña o ligando con una proteína de unión específica.

La técnica de radioinmunoanálisis así como el análisis de radiorreceptores se basan en la evaluación del grado de unión de una sustancia radiomarcada, con un anticuerpo o proteína receptora respectivamente; donde la proteína u hormona a cuantificar compiten por unirse con la marca radiactiva (38). Todos los radioinmunoensayos son métodos de unión a proteínas específicas en los que el punto esencial, es la unión reversible de un compuesto S* a la proteína específica. Podemos decir que de acuerdo a la ley de acción de masas:



Las proteínas de unión son: proteínas séricas, receptores de hormonas o anticuerpos. Para la estimación radioinmunológica de un compuesto Sx (antígeno) son usados anticuerpos específicos contra este compuesto. La adición de cierta cantidad limitada del anticuerpo a un exceso del antígeno marcado Sx* resulta en determinado momento en un equilibrio, donde parte de las moléculas del antígeno están unidas a los anticuerpos y el resto esta libre, debido a que los sitios de unión están limitados.

Un prerequisite para la aplicación analítica de anticuerpos al RIA es que las moléculas radiactivas Sx* y las no marcadas del compuesto Sx no difieran en sus propiedades inmuoquímicas y en su capacidad de unión al anticuerpo.



Cuando un exceso de moléculas de antígeno no marcadas y radiactivas Sx^* + Sx están mezcladas, compiten por los sitios disponibles de una cantidad definida de anticuerpo. Si mayor cantidad de antígeno Sx no marcado es adicionado, una menor cantidad de moléculas radiactivas de antígeno marcado se unirán a los anticuerpos y por lo tanto más de las moléculas presentes estarán en el estado libre.

Cuando una muestra contiene una cantidad constante de anticuerpo y de antígeno radioactivo, entonces la porción unida de Sx^* es inversamente proporcional a la cantidad adicionada de antígeno no marcado. Para una cantidad dada de antígeno resulta una cierta relación "antígeno libre/ antígeno unido" la cual puede ser calculada como un % de Sx^* libre o como un % de unión (% B)

La cantidad real del compuesto Sx en la muestra por cuantificar puede ser calculada por comparación con la curva estandar elaborada con concentraciones conocidas de Sx .

La mayoría de los ensayos radioinmunológicos comprenden los siguientes pasos:

- 1.-Extracción del compuesto Sx de orina o de plasma en caso necesario, aunque en la actualidad solamente algunas hormonas requieren ser extraídas, para la mayoría de las hormonas se utiliza suero o plasma directamente sin extraer (10 - 200 μ l).
- 2.-Adición de una cantidad definida de moléculas radiactivas del compuesto Sx .
- 3.-Adición de una cantidad definida de anticuerpo específico contra el compuesto Sx .
- 4.-Incubación.
- 5.-Separación de moléculas libres y unidas al anticuerpo del compuesto Sx .
- 6.-Medición de la porción libre radiactiva o de la unida al anticuerpo y cálculo del porcentaje de unión.(16)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La heterogeneidad de las hormonas polipeptídicas y la observación de que algunas formas son biológicamente más activas que otras, sugiere que cada una de las formas o variantes tanto de GH como de PRL, son isohormonas con una función biológica específica o fisiológica determinada, de modo que esta mezcla de variantes en conjunto, pueden ser responsables de las acciones complejas y frecuentemente contradictorias que presentan las hormonas.

Otro punto importante a considerar es el hecho, de que debido a que la GH y la PRL son estructuralmente semejantes, en determinadas circunstancias o cuando se encuentran muy elevadas pueden ocupar los receptores de la otra hormona y manifestar su actividad biológica, dando origen a situaciones clínicas que no pueden ser explicadas sino a través del conocimiento de las isohormonas; de ahí la importancia de realizar un estudio para su reconocimiento y caracterización en diversas situaciones clínicas como la hiperprolactinemia tumoral y la acromegalia.

OBJETIVOS.

1.-Conocer el patrón cromatográfico de GH y PRL en sujetos normales e identificar sus diferentes formas moleculares.

2.-Comparar el patrón cromatográfico de la GH y de la PRL de sujetos normales con el de pacientes con manifestaciones clínicas de acromegalia debido a un adenoma hipersecretor de GH, a un prolactinoma (cuadro acromegaloides) o a un adenoma mixto secretor de GH y PRL para detectar si existen diferencias en su composición o proporción de las variantes moleculares.

3.-Conocer cuál es la isoforma predominante en los diferentes pacientes con acromegalia.

HIPOTESIS DE TRABAJO.

1.-La GH "pequeña" monomérica de 22 KDa es la variante de la hormona de crecimiento que parece tener la mayor actividad promotora del crecimiento, por lo tanto será la que se encuentre en mayor proporción en los pacientes acromegálicos.

2.-En pacientes con manifestaciones clínicas de acromegalia y concentraciones normales o bajas de GH y que presentan hiperprolactinemia importante, la PRL puede ser la hormona responsable de la acromegalia, sobre todo si se presenta en su forma monomérica ya que por su semejanza estructural con la GH podría ocupar los receptores de esta hormona y desencadenar la acción biológica.

CAPITULO III

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio.

Se realizó un estudio de tipo observacional, prospectivo, transversal y comparativo

Material Clínico.

5 personas normales (grupo control) y 14 pacientes con acromegalia (grupo de estudio)

Criterios de inclusión:

Grupo Control.- Personas de ambos sexos, entre 20 y 60 años con perfil hormonal normal y sin patología hipofisaria.

Grupo I.- Pacientes de ambos sexos, edad entre 20 y 60 años, con un adenoma hipofisario detectado por Tomografía Axial Computarizada (TAC) y con manifestaciones clínicas de Acromegalia, así como un valor de GH elevado (> de 7 ng/ml).

Grupo II.- Pacientes de ambos sexos, edad entre 20 y 60 años con adenoma hipofisario y con rasgos característicos de Acromegalia a pesar de tener una concentración de GH normal pero con PRL elevada (>15 ng /ml en hombres y > de 20 ng/ml en mujeres)

Grupo III.- Pacientes de ambos sexos, entre 20 y 60 años de edad, con adenoma hipofisario y manifestaciones clínicas de Acromegalia teniendo valores de GH y PRL por arriba de los valores Normales.

Criterios de exclusión.

Personas menores de 20 años y mayores de 60. Que no presenten manifestaciones clínicas de Acromegalia y que no tengan valores de GH y/o PRL por arriba de los valores normales.

Personas menores de 20 años y mayores de 60 que no tengan adenoma hipofisario, a pesar de tener concentraciones elevadas de GH o PRL.

Variables.

Variable independiente: Presencia de un Tumor hipofisario.

Variable dependiente: -Manifestaciones clínicas de Acromegalia.
-Concentraciones elevadas de GH y/o PRL.

MATERIAL Y METODO.

Material.

1) Material biológico.

Se seleccionaron 14 pacientes con diagnóstico de acromegalia y se formaron tres grupos de acuerdo a los niveles de GH y PRL que presentaron en una medición basal y las características clínicas de los pacientes.

Grupo 1.- Cuatro mujeres y un hombre con edades entre 25-52 años. Prolactina normal y GH elevada (acromegalia).

Grupo 2.- Tres mujeres y un hombre con edades entre 39-54 años. Prolactina elevada y GH normal (Síndrome acromegaloide).

Grupo 3.- Cinco mujeres con edades entre 21-50 años. Prolactina elevada y GH elevada (tumor mixto)

Además se estudió un grupo control integrado por 5 pacientes con GH normal y PRL normal.

2) Equipo y material de laboratorio.

a) Equipo.

Columna cromatográfica (60 x 1 cm).

Colector de fracciones (Microfraction Collector Gilson Mod. 203).

Bomba peristáltica (Manipuls 2 Gilson).

Centrifuga refrigerada (Sorval General-Purpose RC-3).

Contador de radiaciones gamma (Packard Cobra Auto-Gamma).

Balanza analítica (Chyo Jupiter C3-200).

Espectrofotómetro de UV y visible (Perkin-Elmer).

Potenciómetro (Beckman Φ 40 pH Meter).

Parrilla de agitación magnética (Sybron/Termolyne).

Agitador vortex (Super mixer Lab-Line Instruments Inc.).

Balanza granataria (Harvard trip balance Ohaus).

b) Material.

Tubos de poliestireno de 12 x 75 mm con tapa.

2 Microjeringas Hamilton de 500 μ l.

Pipetas volumétricas 2 y 3 ml.

Pipetas serológicas 1, 5 y 10 ml.

Vasos de precipitados 200, 500, 1000 y 2000 ml.

Matraces aforados de 250 y 1000 ml.

Tubos de ensayo de vidrio (12 x 75 mm).

Cronómetro.

Soporte universal.

Pinzas para bureta.

Gradillas metálicas y de acrílico.

Jeringas de 10 y 20 ml.

Torundas de algodón.

c) Reactivos.

Sephadex G-100. Tamaño de partículas 40- 120 μ . Volumen de lecho por gramo de gel seco: 15-20 ml (Pharmacia Fine Chemicals A B)

Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 con albúmina y azida de sodio al 0.1 % y cloruro de sodio al 0.9 %.

H₂KPO₄

HK₂PO₄

Albúmina bovina.

Azida de sodio.

Cloruro de sodio.

Estuches de radioinmunoanálisis para cuantificar GH y PRL de Diagnostic Products Co. (DPC).

Marcadores de peso molecular para cromatografica en columna (SIGMA Chemical CO.):

Citocromo C	PM 12,400
Anhidrasa carbónica	PM 29,000
Albúmina de huevo	PM 45,000
Albúmina bovina	PM 66,000
Azul dextrán	PM 2,000,000

Metodo.

Como ya se mencionó anteriormente se seleccionaron un total de 20 pacientes para la realización del presente trabajo, 14 de estos con diagnóstico de acromegalia y los 5 restantes sanos. A todos los pacientes se tomaron muestras de sangre venosa, aproximadamente 20 ml, fueron obtenidas entre las 7:30 y 8:30 A.M. encontrándose el paciente en ayunas. Como paso siguiente se obtuvo el suero de cada muestra centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos. Una vez obtenidos los sueros, se separó una alícuota de cada uno de ellos para determinar la concentración basal de PRL y GH por el método del radioinmunoanálisis, y el resto se congeló de inmediato a -20° C, hasta realizar el análisis cromatográfico.

Cromatografía (Filtración en gel).

Para la cromatografía se utilizó una columna de vidrio de 60 x 1 cm, que se empacó con Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals) y se acopló a un colector de fracciones. Para el empacado de la columna se preparó previamente el Sephadex, pesando 4 gramos de Sephadex G-100 que se pusieron en un vaso de precipitados con 250 ml de agua destilada para hidratar el gel. Se dejó reposar durante 30 minutos y se procedió a decantar.

Esta operación de lavado y decantado se repitió unas 3 ó 4 veces hasta eliminar las partículas finas que se observan en la superficie; después se deja reposar 24 horas, y entonces se substituye el agua por amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 con azida de sodio al 0.9 %. Antes de preparar la columna se pone el vaso con el Sephadex en un baño maría a una temperatura de 40° - 45° C durante 30 minutos con el fin de eliminar el aire que pueda contener y evitar la formación de burbujas al empacar la columna. Para esto se pone primero en la columna un poco del amortiguador de fosfatos, agregando pequeñas cantidades del gel a intervalos de tiempo constantes, hasta llegar al nivel deseado se deja que se estabilice la columna durante unos 15 minutos sin flujo y después se abre la llave para permitir que fluya el amortiguador a través del lecho del gel, dejando pasar 2 a 3 veces el volumen de la columna en amortiguador. Una vez empacada, se instala la columna en el cuarto frío (temperatura aproximada de 4° C) y se deja estabilizar durante 24 - 48 horas antes de utilizarse.

Calibración de la columna.

La calibración de la columna es esencial para poder conocer los pesos moleculares de las proteínas separadas en la cromatografía. Para ello se utilizaron marcadores de peso molecular conocido los cuales se pasan a la columna uno a uno o mezclados para conocer su volumen de elución y relacionarlo después a su peso molecular y así poder construir una curva de calibración de pesos moleculares. También se determina el volumen de vaciado (V_0) y el volumen total de la columna (V_t).

Para calcular el V_0 se utilizó una solución al 0.2 % de azul dextrán en amortiguador salino de fosfatos (PBS) 0.1 M con azida y albúmina al 0.1 %. Como se refiere a continuación se toman 2 ml de la solución y se pasan por la columna cromatográfica previamente regulada a una velocidad de 6 ml/hora recolectando 70 fracciones de 1.0 ml midiendo después la absorbancia de cada una de las fracciones eluidas en un espectrofotómetro a 280 nm, para saber en que tubo se tiene el punto máximo de absorción y así conocer el V_0 del sistema; después se cromatografió en las mismas condiciones prolactina marcada con ^{125}I (PRL- ^{125}I) y hormona del crecimiento (GH- ^{125}I) y el propio ^{125}I para conocer el V_t de la columna.

Otros marcadores moleculares como: albúmina de huevo (PM 45, 000), albúmina bovina (PM 66, 000), anhidrasa carbónica (PM 29, 000) y citocromo C (PM 12, 400) se prepararon al 0.1 % en PBS 0.1 M con azida de sodio al 0.1 % cromatografiando 2 ml de cada solución, colectándose sus fracciones en tubos de poliestireno, midiendo posteriormente su absorbancia a 280 nm para saber en que tubo se encuentra la mayor concentración del marcador, y así conocer su volumen de elución (V_e).

Cromatografía de las muestras de los sueros.

Para realizar la cromatografía de los sueros de los pacientes se tomaron 2 ml de suero. En caso de utilizar un menor volumen (muestras de elevada concentración) se completo a los 2.0 ml con el amortiguador de fosfatos. La muestra se agrega a la columna lentamente, comenzando de

inmediato a coleccionar las fracciones en tubos de poliestireno, que se tapan y se guardan en el congelador, hasta determinar su concentración de GH o PRL.

Determinación de PRL y GH por radioinmunoanálisis (RIA). RIA de hormona de crecimiento.

1.-Tener a temperatura ambiente todos los reactivos del ensayo, excepto el reactivo de precipitación.

2.-Numerar los tubos como se indica a continuación:

Cuentas totales (CT) 1,2

Unión no específica (NSB) 3,4

Unión máxima (Bo) 5,6

Estandares (St) 7-18 (concentraciones de 1.5 - 30 ng / ml) cada estandar por duplicado.Sueros control alto, medio y bajo (SC) 19 - 24.

Las fracciones de la cromatografía se sometieron al RIA también por duplicado en los tubos: 25-70

Dado que los controles se tratan como si fueran muestras se procesan por igual de los tubos 19 - 70.

3.-Montar el ensayo de acuerdo al protocolo que se indica a continuación:

NUMERO DE TUBO	AMORT. FOSFATOS	ESTANDARES (1.5-30 ng/ml)	MUESTRA O SUERO CONTROL	ANTICUERPO		hGH- μ 125	
1 - 2	—	—	—	—	Mezclar	100 μ L	Mezclar
3 - 4	100 μ L	—	—	—	e	100 μ L	e
5 - 6	100 μ L	—	—	100 μ L	Incubar	100 μ L	Incubar
7 - 18	—	100 μ L	—	100 μ L	1 hora a	100 μ L	1 hora a
19 - 70	—	—	100 μ L	100 μ L	Temp. Amb.	100 μ L	Temp. Amb.

- 4.-Agregar 1.0 ml de el reactivo precipitante a todos los tubos excepto a los de cuentas totales (1 y 2). Mezclar en el vortex.
- 5.-Centrifugar durante 30 minutos a 3000 rpm en una centrifuga refrigerada.
- 6.-Decantar el sobrenadante y dejar escurrir los tubos sobre papel absorbente.
- 7.-Contar cada tubo durante 1 minuto en el contador de radiaciones gamma.

RIA de prolactina.

En la técnica del radioinmunoanálisis para PRL, los tubos se manejan igual que los de GH en cuanto a la numeración, solo varían algunos pasos y volúmenes de la técnica, como se indica en el siguiente protocolo:

NUMERO DE TUBO	AMORT. FOSFATOS	ESTANDARES (5 - 200 ng/ml)	MUESTRAS O SUEROS	PRL- ¹²⁵	ANTICUERPO	
CONTROL						
1 - 2	—	—	—	100 µL	—	MEZCLAR
3 - 4	200 µL	—	—	100 µL	—	E
5 - 6	200 µL	—	—	100 µL	100 µL	INCUBAR
7 - 18	—	200 µL	—	100 µL	100 µL	3 HORAS A
19 - 100	—	—	200 µL	100 µL	100 µL	TEMP. AMB.

Después agregar 1.0 ml de reactivo precipitante a todos los tubos excepto a 1 y 2 (cuentas totales). Se centrifuga durante 30 minutos a 3000 rpm, se decantan y secan al igual que en el RIA de GH. Por último se ponen a contar los tubos en un contador de radiaciones gamma Mca Packard modelo COBRA.

CAPITULO IV

RESULTADOS

1.-Estudio hormonal.

En la tabla 2 se presentan las concentraciones de GH y PRL de los cinco pacientes normales que formaron el grupo control, así como también los valores encontrados en el suero de los 14 pacientes con acromegalia, clasificados en los tres grupos mencionados anteriormente, de acuerdo a sus niveles hormonales. Se representa la media y la desviación estandar (DE) de cada grupo para su comparación, pudiendo observar que el grupo I sólo tenía elevada la GH, el grupo II solo la PRL y los integrantes del grupo III ambas hormonas. Entre estos últimos destaca el caso número 5 que tuvo un valor de GH muy elevado, y el paciente número 2 la prolactina.

Tabla 2.-Concentraciones hormonales de GH y PRL (ng/ml) en sujetos normales y en acromegálicos.

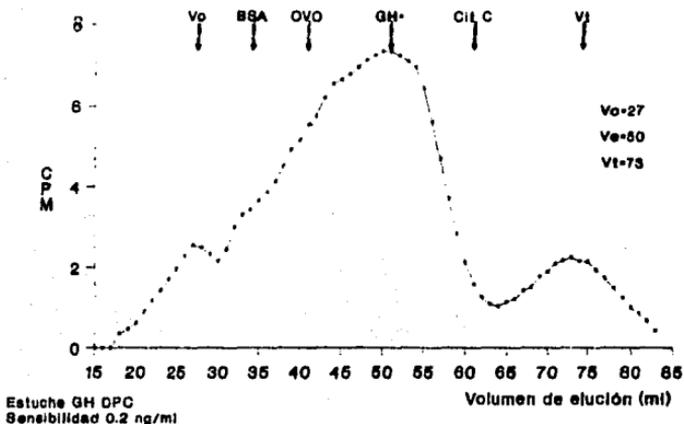
PACIENTES	NORMALES		ACROMEGALIA		S. ACROMEGALOIDE		TUMORES MIXTOS	
	GH	PRL	GH	PRL	GH	PRL	GH	PRL
1	4.8	13.38	36.6	9.0	1.20	77.4	21.4	42.40
2	1.8	10.50	39.3	4.7	1.75	152.0	25.2	2020
3	3.6	13.90	48.0	9.7	0.61	127.4	28.1	53.1
4	3.2	12.90	11.2	7.5	0.90	69.6	29.3	40.4
5	7.5	4.78	7.6	6.3	—	—	222	29.4
M ± DE	4.18 ± 2.14	11.09 ± 3.76	28.5 ± 18.02	7.45 ± 2.01	1.11 ± 0.48	106.6 ± 39.6	65.2 ± 267.7	437 ± 684.9

II.-Estudio cromatográfico.

La figura No 5 representa los perfiles cromatográficos de la $^{125}\text{-I}$ GH y la $^{125}\text{-I}$ PRL, después de que los estándares marcados fueron sometidos a la filtración en gel, para conocer su comportamiento cromatográfico, identificándose las fracciones de la cromatografía, mediante la radiactividad presente en cada una de ellas. En la parte superior de estas figuras se representa mediante flechas el volumen de elución (V_e) del azul dextrán que es el volumen de exclusión del sistema o volumen inicial de la cromatografía (V_o) mientras que el volumen final dado por el sitio de elución del $^{125}\text{-I}$ libre se marca como V_f . Se indica además el volumen de elución de otros marcadores de peso molecular conocido utilizados para la calibración de la columna.

La figura 6 corresponde a la curva de calibración de pesos moleculares obtenida a partir del V_e de los diferentes marcadores de pesos molecular (PM) utilizados, para lo cual se graficó el valor de la relación V_e/V_o en la abscisa contra el peso molecular respectivo en la ordenada; donde los puntos corresponden a albúmina bovina (BSA) de 66 kDa, ovoalbúmina (OVO) de 45 kDa, prolactina (PRL) y hormona de crecimiento (GH) de 22 kDa, y citocromo C (Cit C) de 12.4 kDa.

CROMATOGRAFIA DE GH PERFIL CROMATOGRAFICO DE GH*



CROMATOGRAFIA DE PRL PERFIL CROMATOGRAFICO DE PRL*

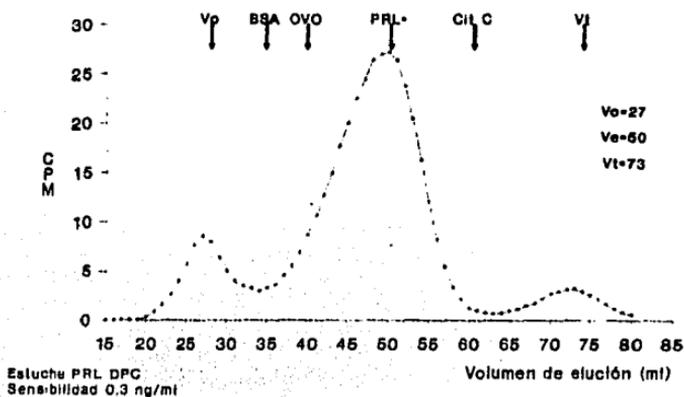


FIG # 5

CURVA DE PESO MOLECULAR MARCADORES MOLECULARES

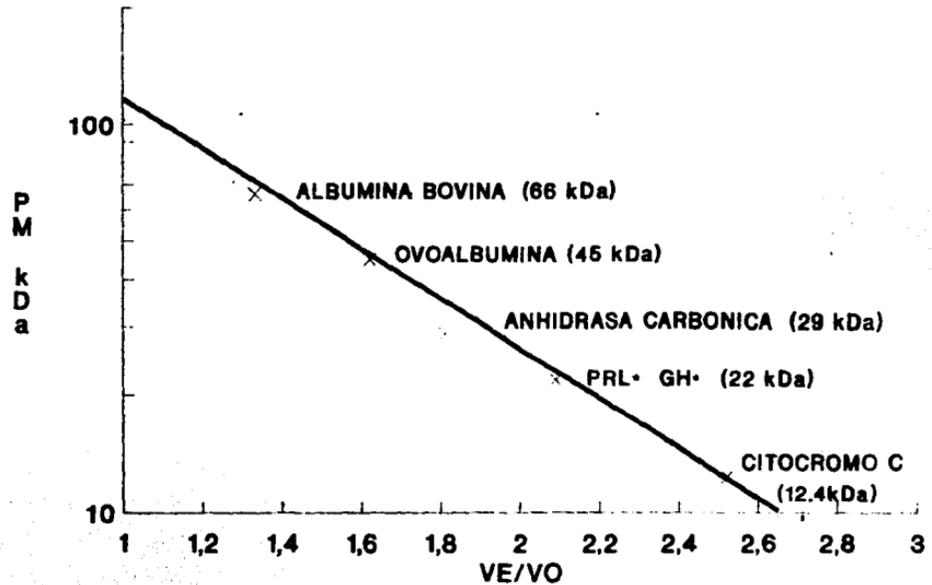


FIG # 6

III.-Perfiles cromatográficos de la GH y la PRL.

1.-Grupo Control.

La figura 7 corresponde al perfil cromatográfico de los sueros de dos adultos normales que se presentan como ejemplos representativos de los resultados obtenidos en el grupo control, ya que fueron muy similares. En la ordenada se tiene la concentración de GH (ng/ml) para cada fracción de la cromatografía y en la abscisa el respectivo volumen de elución en ml. En la parte superior del cromatograma se indica mediante flechas, los volúmenes donde eluyen los marcadores utilizados para calibrar la columna, los cuales son de gran utilidad, porque permiten localizar e identificar las diferentes formas moleculares presentes en el cromatograma, mediante su volumen de elución (V_e) o sitio donde se localizan los picos y por su peso molecular el cual se calcula sobre la curva estandar de pesos moleculares presentada anteriormente (figura 6). Como puede verse en la figura 7 la mayor inmunoreactividad (IR) de GH se localizó entre la BSA de 66 kDa y la OVO de 45 kDa, correspondiendo así a isoformas con un peso molecular comprendido entre 66 y 45 kDa. La IR de GH fué menor en el área donde eluye el estandar marcado de la hormona, la región de la $^{125}\text{-I}$ GH, que corresponde a la forma monomérica de 22 kDa.

En el caso de la prolactina (figura 8) el perfil de elución del suero de las personas normales fué un poco más heterogéneo; localizándose varios picos de IR que eluyen de izquierda a derecha: el primero coincidiendo con el V_0 del sistema, correspondiendo por lo tanto a una forma molecular pesada de más de 100 kDa, después otros a nivel de la BSA y de la OVO (de 66 y 45 kDa respectivamente), con la mayor IR de prolactina en el sitio donde eluye el estandar marcado de la hormona ($^{125}\text{-I}$ PRL) de 22 kDa, la forma monomérica y finalmente un pico de menor IR, poco antes del volumen de elución del Cit C correspondiendo a una isoforma de 16 kDa, se observan después trazas de IR en volúmenes menores, que indican la presencia de fragmentos de peso molecular menor (menor de 16 kDa).

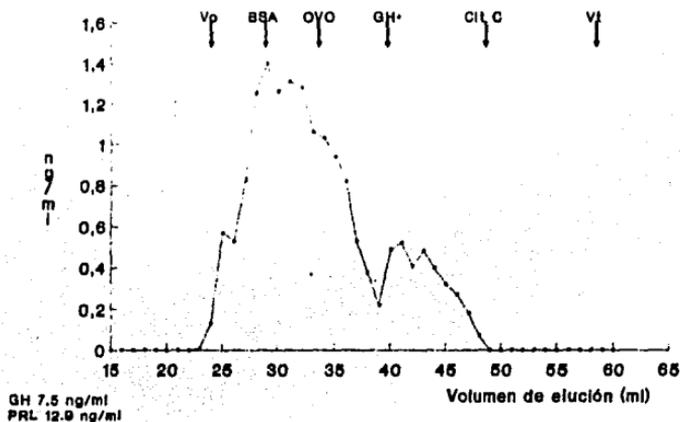
En la figura 9 se representan los perfiles cromatográficos de otras dos personas normales para su comparación, en los que también puede verse el predominio de la forma monomérica.

De acuerdo a estos resultados, las formas moleculares de GH y PRL observadas en los perfiles anteriores fueron clasificadas con base en su PM, según se indica en la tabla 3 como:

- a) Formas grandes mayores de 60 kDa, oligómeros o agregados de PM elevado (formados probablemente por la unión de varios monómeros a proteínas de unión presentes en el plasma) eluidos antes de la BSA o en el Ve de este marcador.
- b) Dímeros (45-52 kDa) formados por la unión de dos monómeros iguales (homodímeros) o diferentes (heterodímeros), los cuales eluyen entre la OVO y la BSA.
- c) Monómeros o formas monoméricas, con un PM aproximado de 20-26 kDa que eluyen en el Ve de los estándares hormonales (125-I GH y 125-I PRL).
- d) Fragmentos o moléculas pequeñas de 16 kDa y menores, derivadas probablemente de la degradación de las hormonas que son eluidas poco antes del Cit C y después de éste.

La tabla 4 nos muestra los porcentajes de la IR de las diferentes formas moleculares en los sujetos del grupo control.

CROMATOGRAFIA DE GH PERFIL NORMAL



CROMATOGRAFIA DE GH PERFIL NORMAL

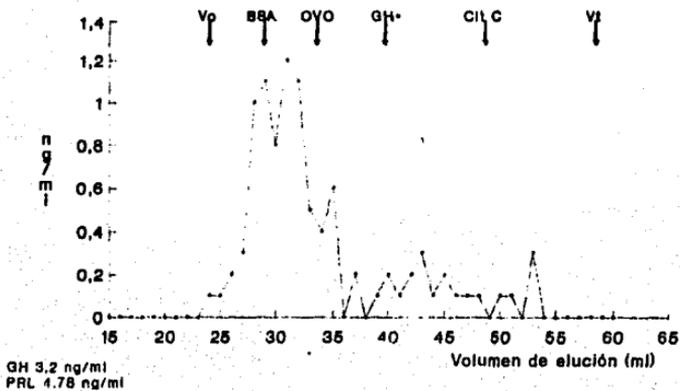
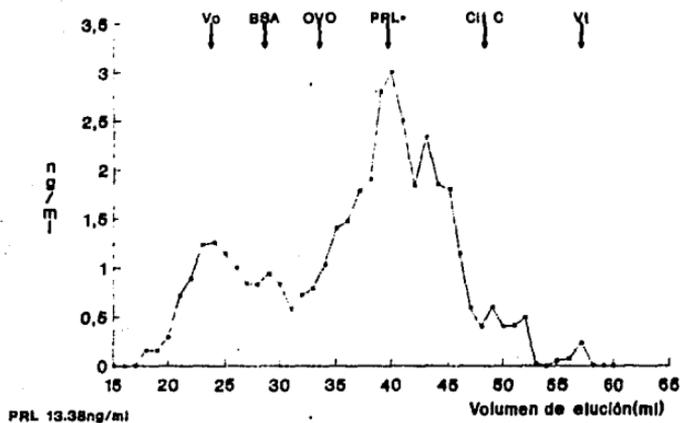


FIG # 7

CROMATOGRAFIA DE PRL PERFIL NORMAL



CROMATOGRAFIA DE PRL PERFIL NORMAL

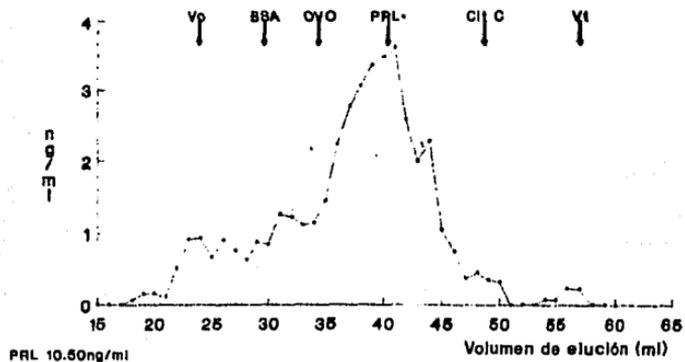
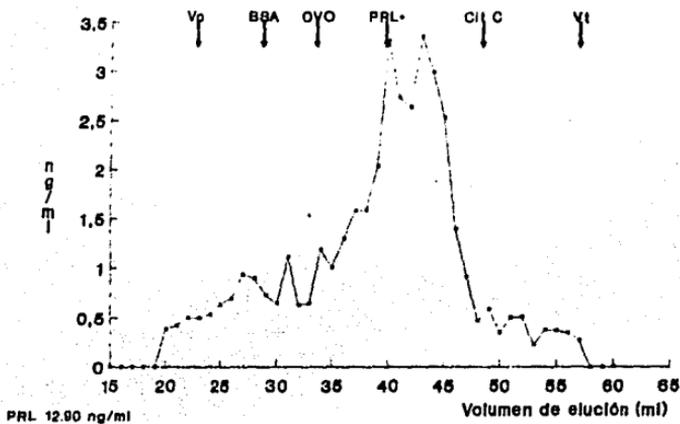


FIG # 8

CROMATOGRAFIA DE PRL PERFIL NORMAL



CROMATOGRAFIA DE PRL PERFIL NORMAL

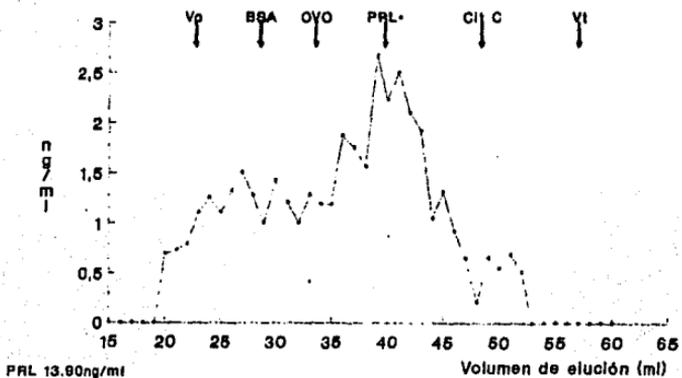


FIG # 9

Tabla 3.- Clasificación de las isoformas de GH y PRL en función de su peso molecular.

	OLIGOMEROS O FORMAS GRANDES (BIG-BIG GH)	DIMEROS (BIG GH)	MONOMEROS	FRAGMENTOS
P.M.	100-60 kDa (100,80,66 y 60)	52-40 kDa (52,45 y 40)	26-20 kDa (26,22 y 20)	16-2 kDa (16,6,4 y 2)
Kav	0.0-0.18 (0.0,0.08,0.15,0.18)	0.23-0.32 (0.23,0.28,0.32)	0.45-0.54 (0.45,0.49,0.54)	0.63-0.93 (0.63,0.80,0.89,0.93)

Tabla 4.- Inmunorreactividad de las moléculas de GH y PRL en sujetos normales (%)

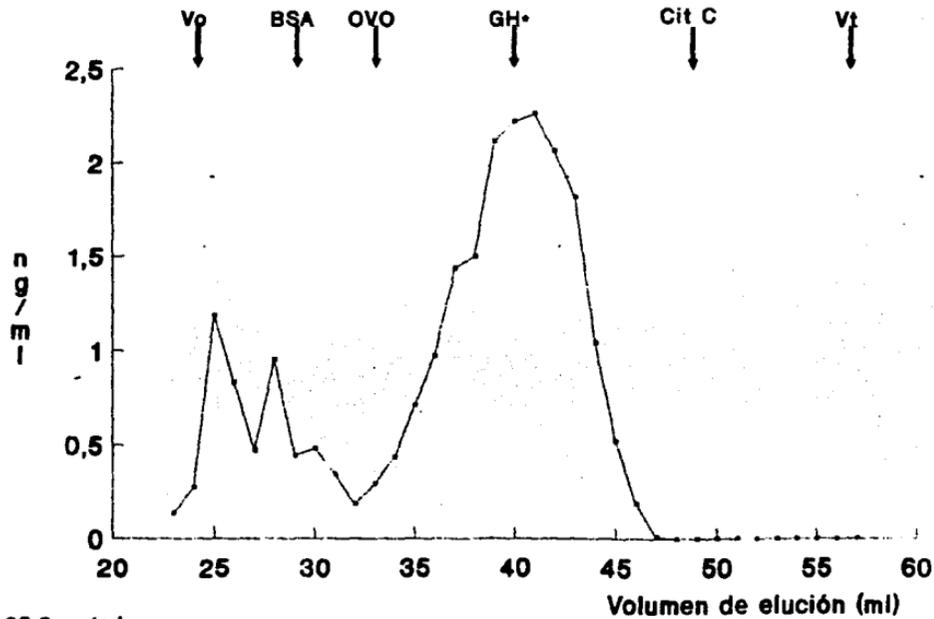
	OLIGOMEROS (100-60 kDa)	DIMEROS (52-40 kDa)	MONOMEROS (26-20 kDa)	FRAGMENTOS (16-2 kDa)
GH	64.59± 26.69	16.61± 11.99	11.55± 9.21	6.05 ± 6.91
PRL	23.67± 5.55	9.31± 1.52	53.39± 6.97	13.73± 6.14

2.- Grupo I.

Acromegalia "típica"

En los 5 pacientes con acromegalia típica que cursaron con niveles elevados de GH y valores normales de PRL, los perfiles cromatográficos aunque presentaron algunas diferencias en cuanto a la proporción de las diversas formas moleculares, tuvieron en común el predominio de las formas monoméricas de 20 a 26 kDa (figura 10 - 14) eluidas con el estándar marcado de la hormona (¹²⁵I-GH) con baja proporción de las formas moleculares grandes (> 60 kDa) y los dímeros de la hormona (40 - 52 kDa) mostrando además con excepción de los dos primeros casos, una proporción relativamente elevada de los fragmentos de bajo peso molecular. Así en las figuras 10 y 11 donde la proporción de la forma monomérica fué muy elevada, puede verse como los fragmentos prácticamente no se observan, mientras que en los tres casos restantes (figura 12, 13 y 14) la proporción de los fragmentos fué importante. El porcentaje de inmunorreactividad de las diferentes formas moleculares así como las concentraciones hormonales de cada uno de los pacientes del grupo se presentan en la tabla 5, donde puede observarse que mientras mayor fué la concentración de la GH mayor fué la proporción de la forma monomérica y menor la proporción de los fragmentos y de las formas grandes, lo cual se pone de manifiesto más claramente por los resultados de los estudios de correlación efectuados entre la proporción de las formas moleculares (porcentaje de IR) y la concentración de la GH (figura 15 y 16). En ellas puede observarse (figura 16) una correlación lineal positiva entre el nivel de la GH y la proporción de monómeros ($r = 0.647$) mientras que con los dímeros y los fragmentos la correlación fue menor y negativa, no observándose prácticamente relación alguna entre las formas grandes (Big-big GH) y la concentración de la hormona (figura 15).

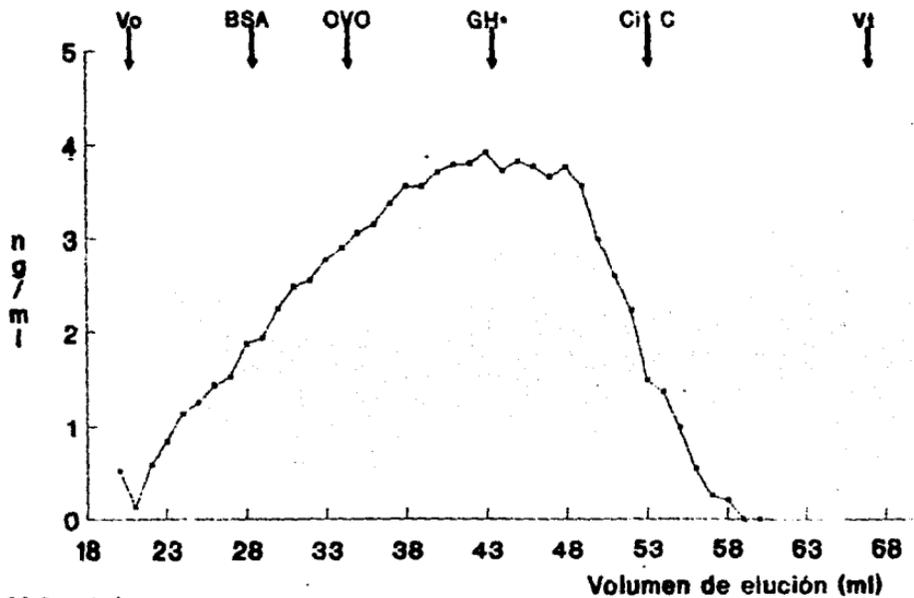
CROMATOGRAFIA DE GH ACROMEGALIA GPO. I



GH 36.6 ng/ml
PRL 9.0 ng/ml

FIG # 10

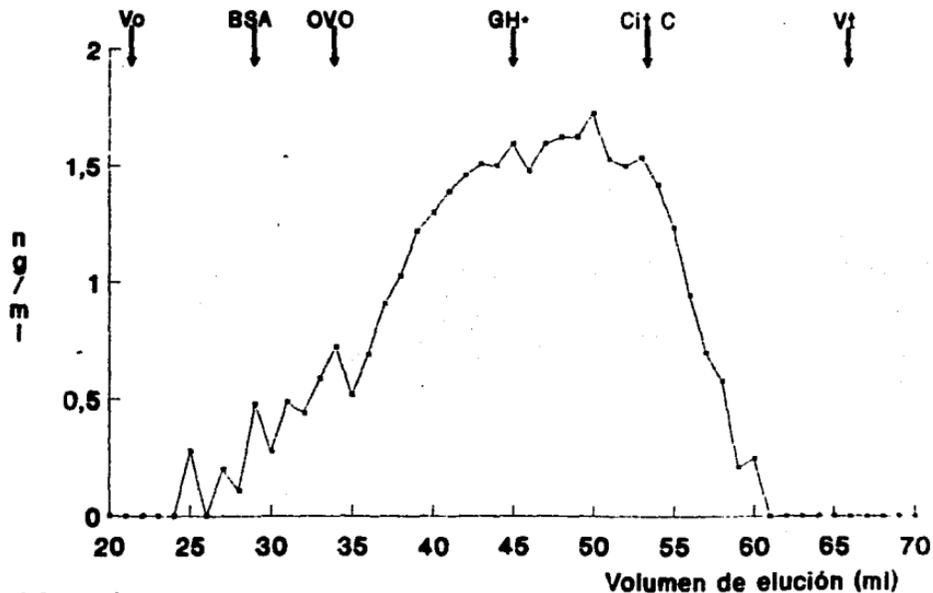
CROMATOGRAFIA DE GH ACROMEGALIA GPO. I



GH 39.3 ng/ml
PRL 4.7 ng/ml

FIG # 11

CROMATOGRAFIA DE GH ACROMEGALIA GPO. I



GH 48.0 ng/ml
PRL 9.7 ng/ml

FIG # 12

CROMATOGRAFIA DE GH ACROMEGALIA GPO. I

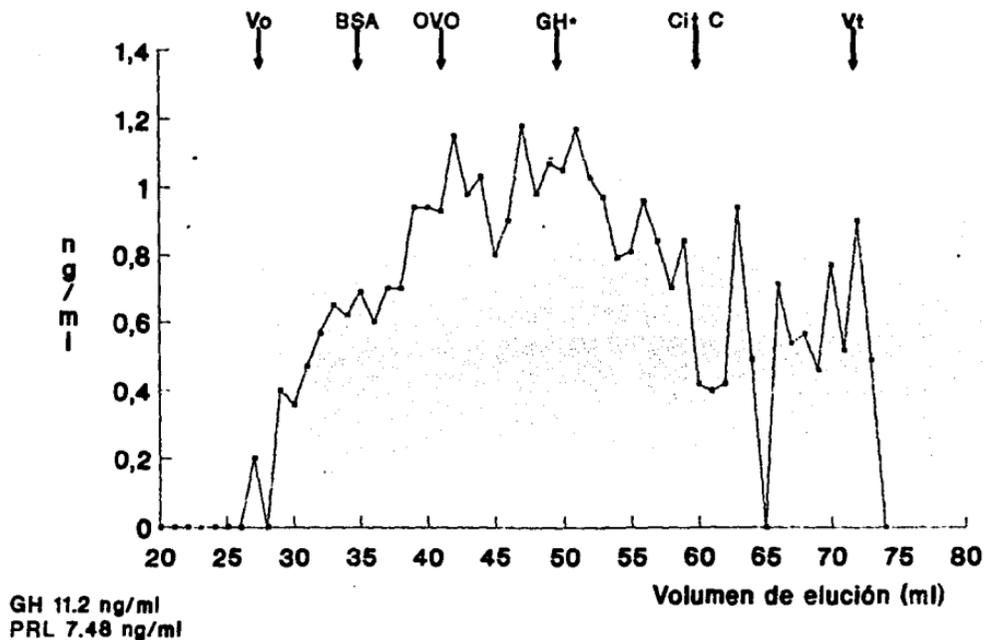
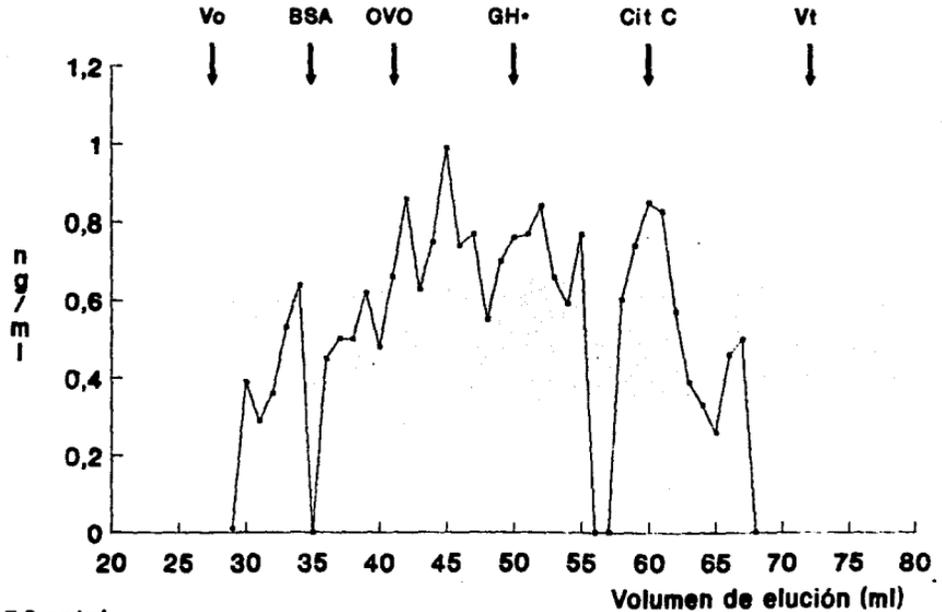


FIG # 13

CROMATOGRAFIA DE GH ACROMEGALIA GPO. I



GH 7.6 ng/ml
PRL 6.35 ng/ml

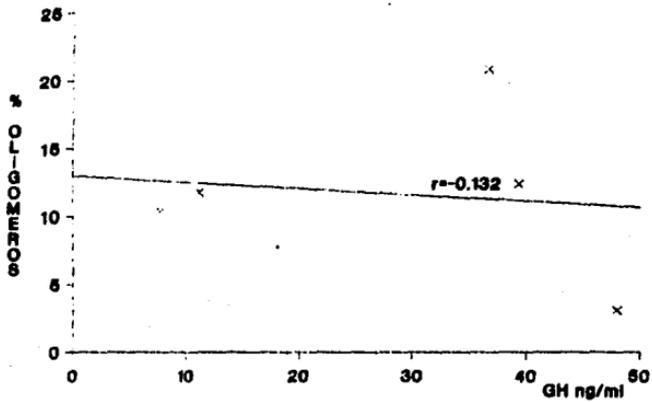
FIG # 14

TABLA 5 - ACROMEGALIA GRUPO I						
NIVELES HORMONALES			FORMAS MOLECULARES DE GH (% DE INMUNOREACTIVIDAD)			
PACIENTE	GH (ng/ml)	PRL (ng/ml)	> 60 kDa	52 - 40 kDa	22 - 20 kDa	< 16 kDa
1	36.6	9.0	20.79	5.4	70.7	3.1
2	39.3	4.7	12.34	21.0	52.7	13.9
3	48.0	9.7	3.08	10.7	52.6	33.5
4	11.2	7.48	11.74	17.7	37.9	32.6
5	7.6	6.35	10.35	19.2	44.3	26.0
M ± DE	28.5 ± 18.02	7.45 ± 2.01	11.6 ± 6.3	14.8 ± 6.5	51.6 ± 12.3	21.8 ± 13.1
NORMAL	< 5.0	< 20				

* M = Media

** DE = Desviación estandar

ACROMEGALIA
CORRELACION GH vs OLIGOMEROS



ACROMEGALIA
CORRELACION DE GH vs DIMEROS

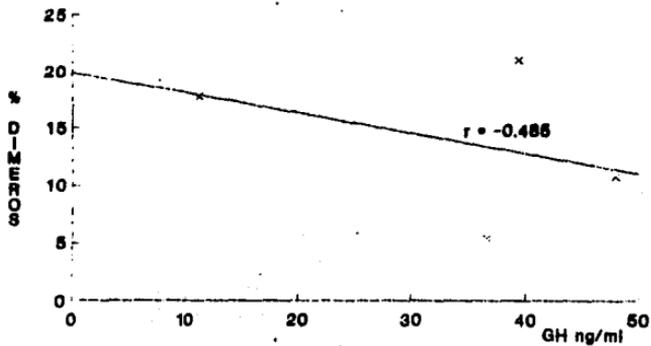
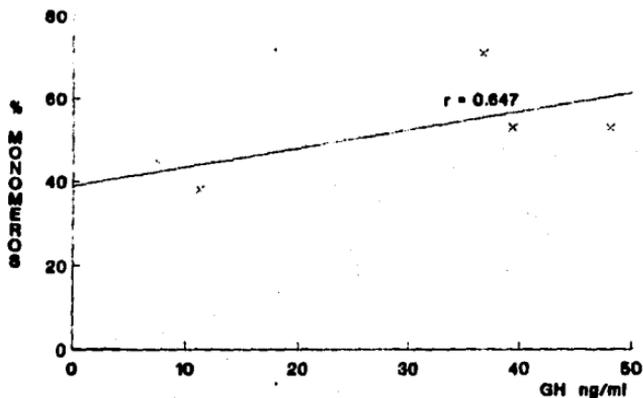


FIG # 15

ACROMEGALIA CORRELACION DE GH vs MONOMEROS



ACROMEGALIA CORRELACION GH vs FRAGMENTOS

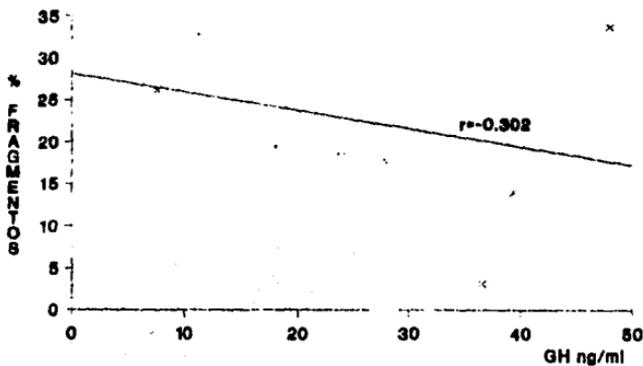


FIG # 16

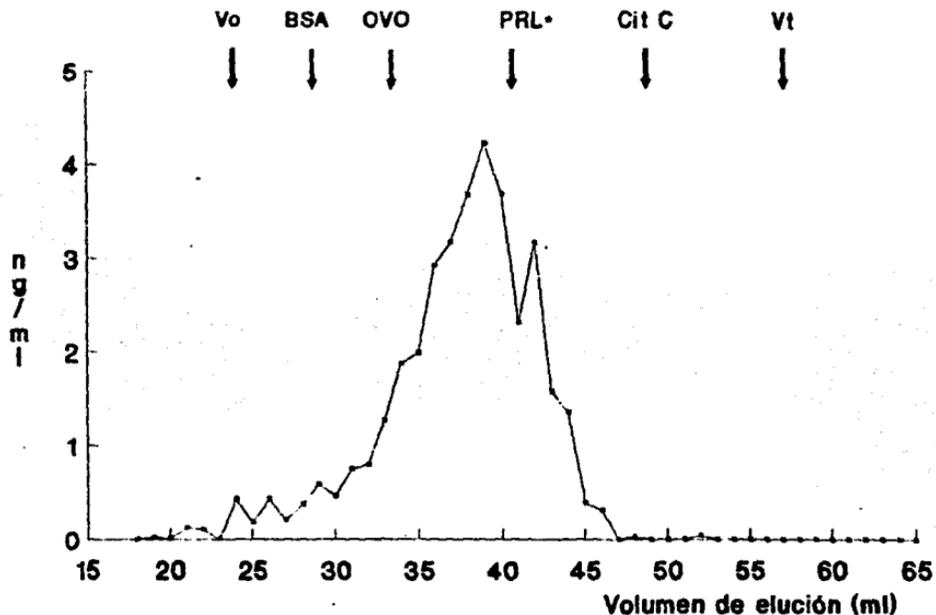
3.- Grupo II.

Síndrome Acromegaloide.

Los pacientes que tuvieron un adenoma hipofisario y manifestaciones clínicas de acromegalia, no obstante tener una concentración normal de GH pero concentraciones muy elevadas de PRL mostraron tener en el estudio cromatográfico perfiles de elución de PRL muy similares a los encontrados para la GH en los pacientes del grupo I (figura 17 - 20). Así la figura 17 presenta un perfil hormonal caracterizado por tener una elevada proporción de la forma monomérica de la PRL (76.7 %) la que eluyó coincidiendo con el estándar de la hormona (¹²⁵I PRL) observándose baja proporción de las formas grandes, de los dímeros de 45 - 52 kDa y de los fragmentos de 16 kDa.

En la figura 18, el perfil de elución aunque diferente también muestra una proporción elevada de la forma monomérica (54.6 %) y de los dímeros de la hormona, eluidos entre la BSA y la OVO (29.5 %) con muy baja inmunoreactividad en las formas grandes > 60 kDa y en los fragmentos. En cambio en los perfiles representados en las figuras 19 y 20 aunque predominan las formas monoméricas, pueden verse los fragmentos de bajo peso molecular en una proporción elevada, tal como se observó en alguno de los perfiles de GH de los pacientes del grupo I. Los porcentajes de IR de las diferentes formas moleculares de la PRL en los pacientes de este grupo, así como sus concentraciones hormonales de GH y PRL, se muestran de manera conjunta en la tabla 6 para hacer notar que la proporción de los dímeros, parece estar en relación directa con la concentración de la PRL. Esto último se demuestra en los estudios de correlación efectuados, cuyos resultados se presentan en las figuras 21 y 22, donde se observa una relación lineal positiva entre las concentraciones de la PRL y la proporción de los dímeros y las formas grandes (figura 21), en ambos casos con coeficiente de correlación muy elevados $r = 0.976$ y 0.851 respectivamente, no así en el caso de los monómeros y los fragmentos de bajo peso molecular (figura 22).

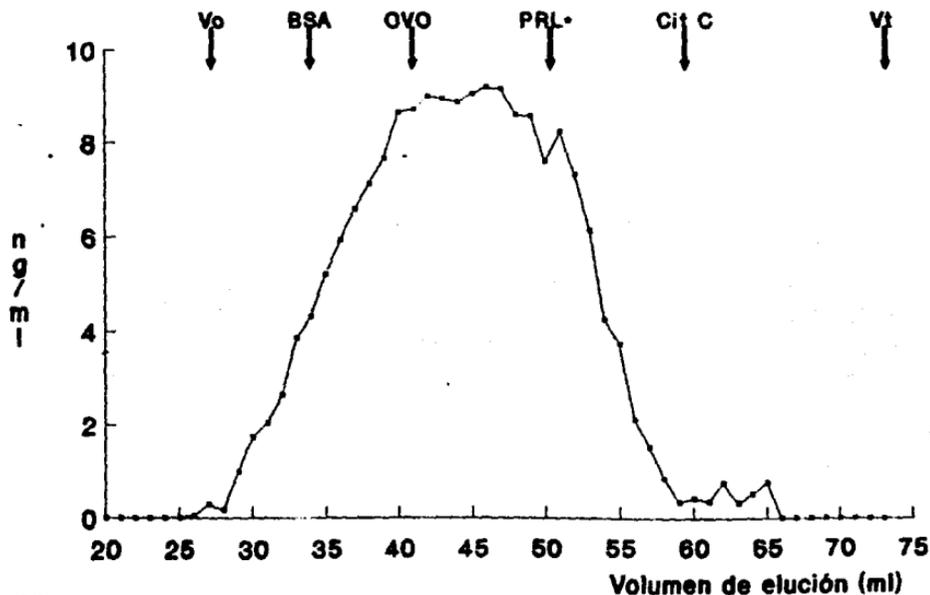
CROMATOGRAFIA DE PRL S. ACROMEGALOIDE GPO. II



GH 1.20 ng/ml
PRL 72.41 ng/ml

FIG # 17

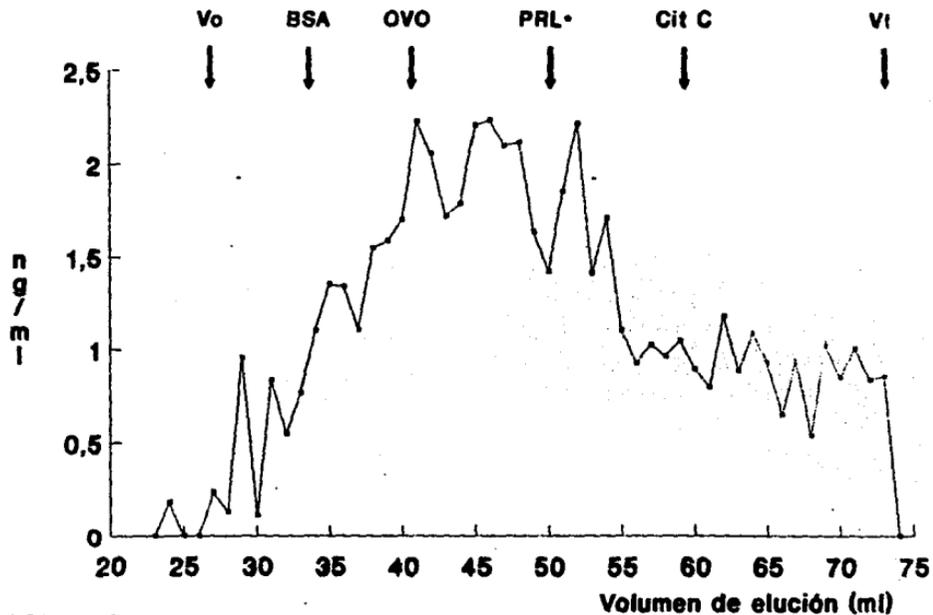
CROMATOGRAFIA DE PRL S. ACROMEGALOIDE GPO. II



GH 1.75 ng/ml
PRL 151.9 ng/ml

FIG # 18

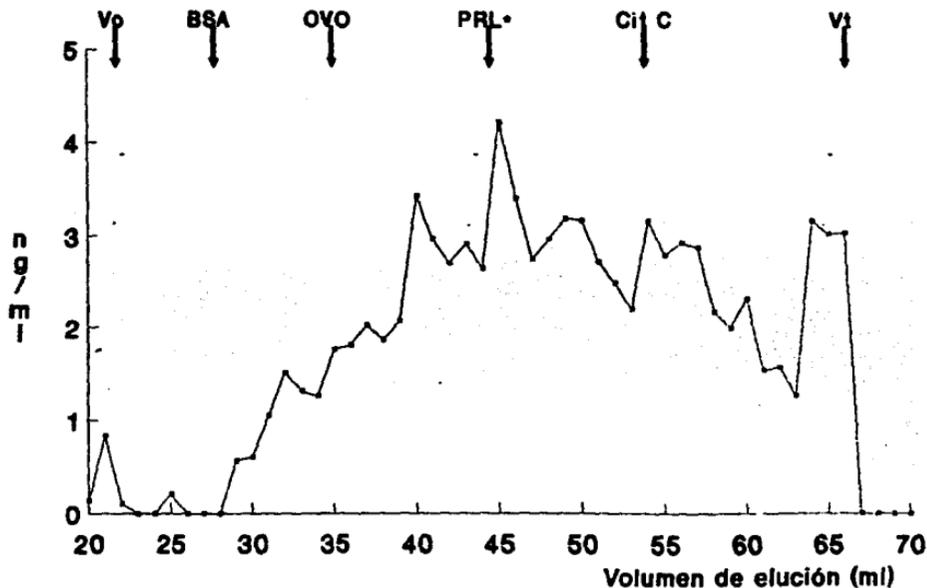
CROMATOGRAFIA DE PRL S. ACROMEGALOIDE GPO. II



GH 0.81 ng/ml
PRL 127.4 ng/ml

FIG # 19

CROMATOGRAFIA DE PRL S. ACROMEGALOIDE GPO. II



GH 0.9 ng/ml
PRL 69.6 ng/ml

FIG # 20

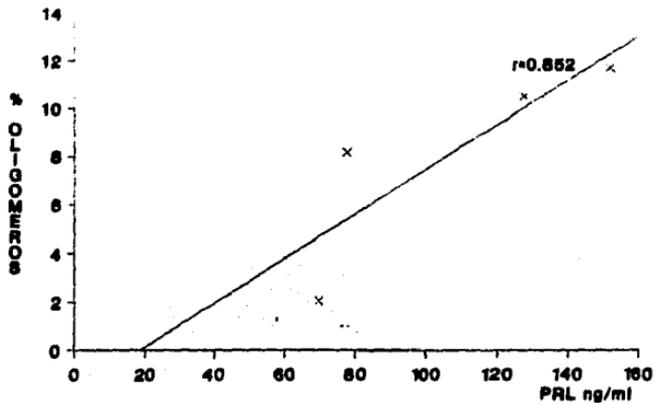
TABLA 6.- GRUPO II SINDROME ACROMEGALOIDE

NIVELES HORMONALES			FORMAS MOLECULARES DE PRL (% DE INMUNOREACTIVIDAD)			
PACIENTE	GH ng/ml	PRL ng/ml	> 60 kDa	40-52 kDa	22 - 20 kDa	< 16 kDa
1	1.20	77.41	8.13	12.93	76.79	2.15
2	1.75	152.00	11.64	29.49	54.66	4.21
3	0.61	127.40	10.43	20.05	40.82	28.70
4	0.90	69.60	2.04	10.26	40.96	46.72
M ± DE	1.11 ± 0.48	106.60 ± 39.64	8.06 ± 4.27	18.18 ± 8.59	53.30 ± 16.94	20.44 ± 21.26
NORMAL	< 5.0	< 20				

* M = Media

** DE = Desviación estandar

**SINDROME ACROMEGALOIDE
CORRELACION PRL vs OLIGOMEROS**



**SINDROME ACROMEGALOIDE
CORRELACION DE PRL vs DIMEROS**

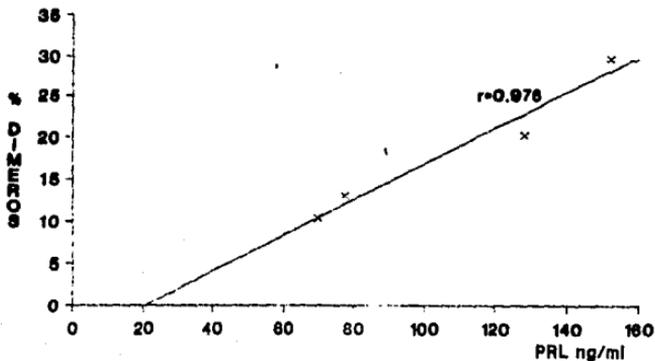
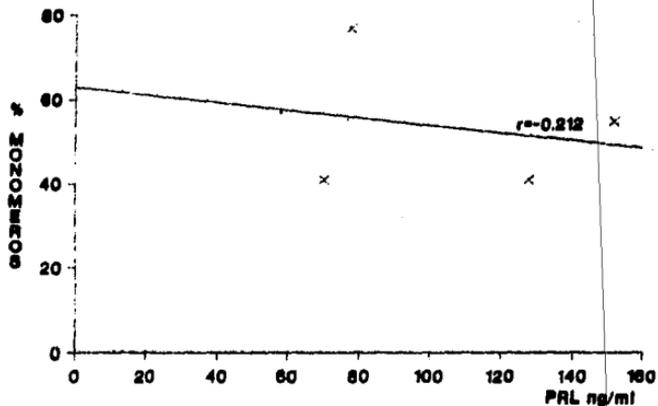


FIG # 21

SINDROME ACROMEGALOIDE CORRELACION DE PRL vs MONOMEROS



SINDROME ACROMEGALOIDE CORRELACION DE PRL vs FRAGMENTOS

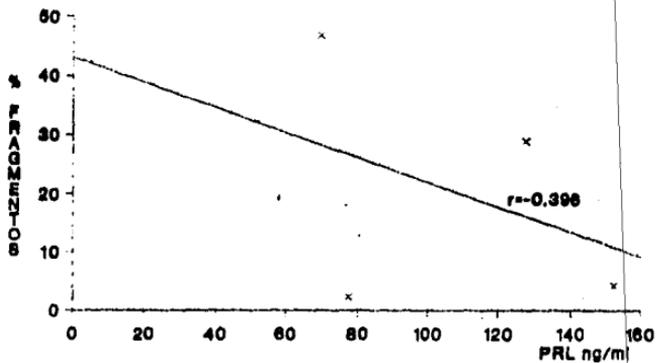


FIG # 22

4.- Grupo III.

Tumores Mixtos.

Como se recordará en este grupo se incluyeron a 5 pacientes con acromegalia que tenían concentraciones muy elevadas tanto de GH como de PRL. Los perfiles cromatográficos de ambas hormonas para cada uno de los casos estudiados se presentan en las figuras 23 - 27.

La figura 23 muestra perfiles cromatográficos muy similares para ambas hormonas, en los que destaca una elevada IR en la región de los monómeros, en la zona de elución de ambos estándares con una proporción ligeramente mayor de los dímeros de la GH. Llama la atención que estos perfiles son muy semejantes a los observados en los acromegálicos de los otros grupos, como los representados en la figura 10 para la GH (grupo I) y los de la figura 17 para la PRL (grupo II) con la diferencia de que en este paciente con adenoma mixto el tumor produjo ambas hormonas.

En los perfiles de la GH y la PRL de la figura 24 aunque predominan las formas monoméricas, la proporción de los dímeros de GH y de los fragmentos de la PRL fué mayor que en el caso anterior, semejando a su vez los perfiles cromatográficos presentados anteriormente en las figuras 11 para la GH (grupo I) y en la figura 20 para la PRL (grupo II).

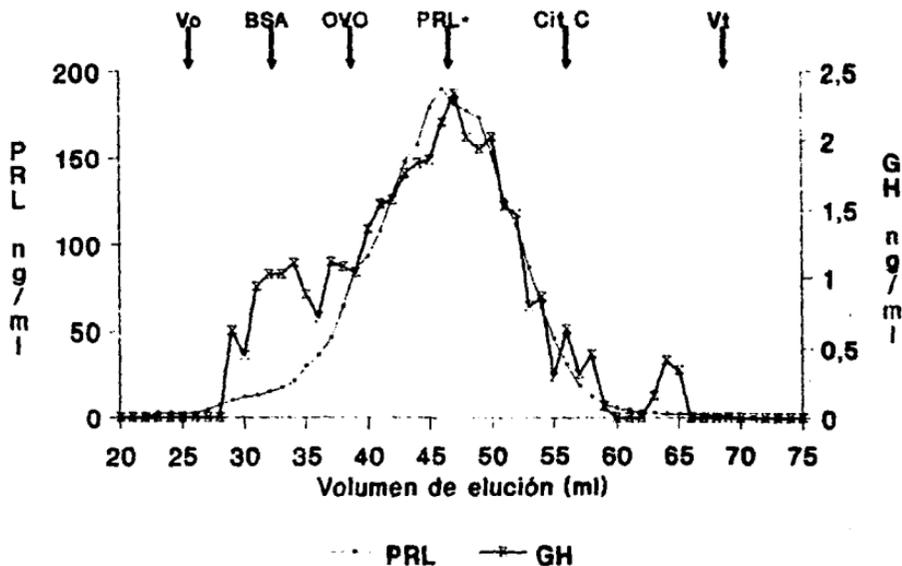
Las figuras 25 y 26 a su vez corresponden a los perfiles de elución de otros 2 pacientes con adenomas mixtos, en los que la mayor IR corresponde a la forma monomérica de ambas hormonas, pero se tiene una proporción importante de los dímeros de la GH y de los fragmentos < de 16 kDa de la PRL.

En el caso representado en la figura 27 el perfil de elución de la GH fué diferente mostrando el predominio de formas muy grandes que eluyeron antes de la BSA (86 kDa) en el Vo del sistema, correspondiendo así a formas moleculares de más de 100 kDa, con solo una tercera parte de la IR en la región de los monómeros. El perfil de la PRL en cambio es similar a algunos de los observados con anterioridad y aunque tiene una proporción, relativamente elevada del dímero de la hormona, predomina la forma monomérica. Los niveles hormonales de GH y PRL y los porcentajes de inmunoreactividad para cada caso, se indican en la tabla 7 y los estudios de correlación entre ellos en las figuras 28 - 31.

Las figuras 28 y 29 muestran que los dímeros, monómeros y fragmentos tuvieron una relación lineal positiva con la concentración de la GH, con un buen índice de correlación lineal sobre todo con los dímeros ($r=0,936$) lo cual es diferente a lo que se había observado en los acromegálicos del grupo I en los que esta correlación fué negativa (Fig 15); en el caso de la PRL el estudio de correlación mostró una relación proporcional entre los dímeros y los niveles de la hormona (Fig 30) , con los fragmentos la relación fué inversamente proporcional (Fig 31), lo cual es semejante a lo observado en los pacientes acromegálicos del grupo II (Fig 22). En el caso de los oligómeros no se observó ninguna relación con la concentración de PRL contrario a lo que sucede en el grupo II.

En la tabla 8 se puede comparar con facilidad las diferencias en cuanto a la inmunoreactividad de las diferentes isoformas de GH y PRL en los tres grupos de pacientes en relación con el grupo control. Estos valores se representan gráficamente en la Fig 32 para GH y en la Fig 34 para la PRL, mientras que la importancia cuantitativa de cada una de las formas moleculares de GH y PRL en los diferentes grupos de pacientes se visualiza en las figuras 33 y 35 respectivamente. Finalmente la tabla 9 muestra la correlación que existe entre las formas moleculares de GH y PRL con los niveles basales correspondientes a cada una de ellas.

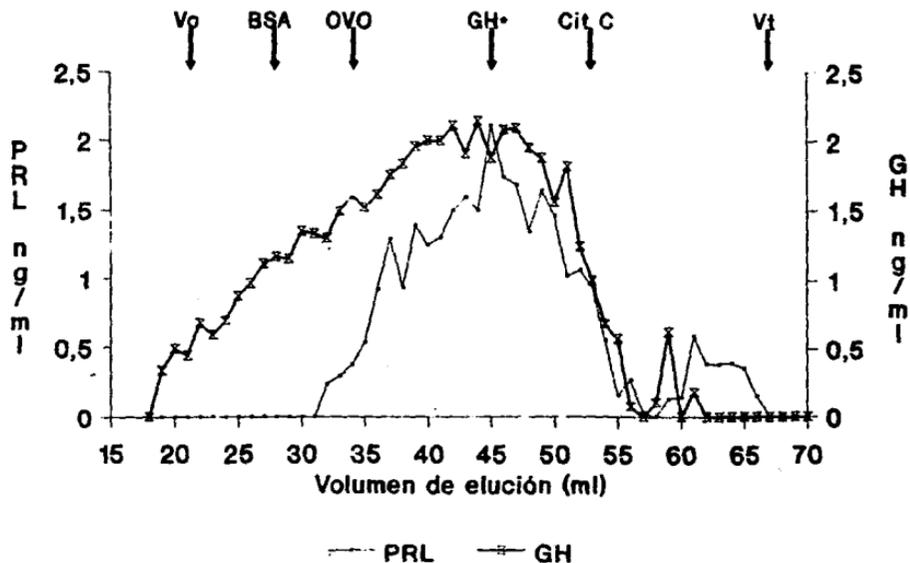
CROMATOGRAFIA DE PRL Y GH TUMOR MIXTO GRUPO III



PRL 2020 ng/ml
GH 25.2 ng/ml

FIG # 23

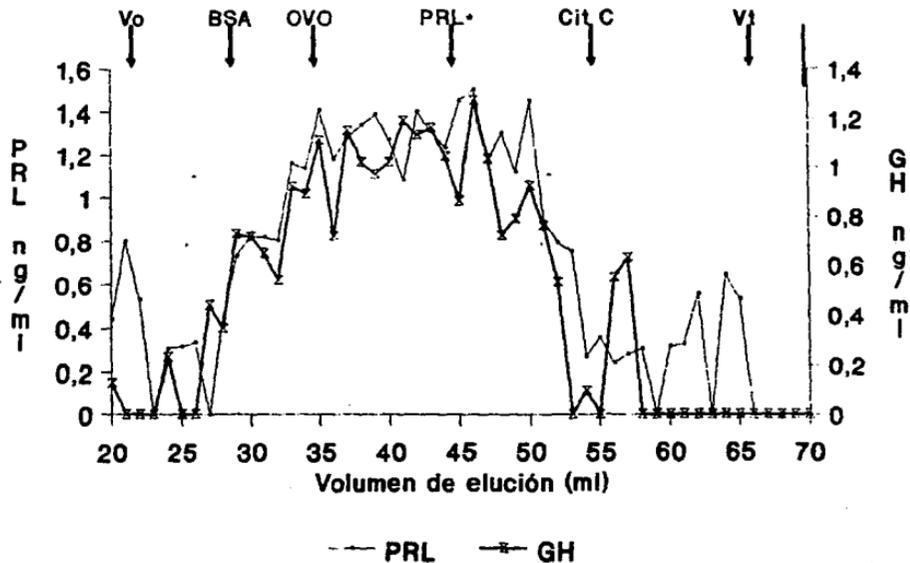
CROMATOGRAFIA DE PRL Y GH TUMOR MIXTO GRUPO III



PRL 40.41 ng/ml
GH 29.30 ng/ml

FIG # 24

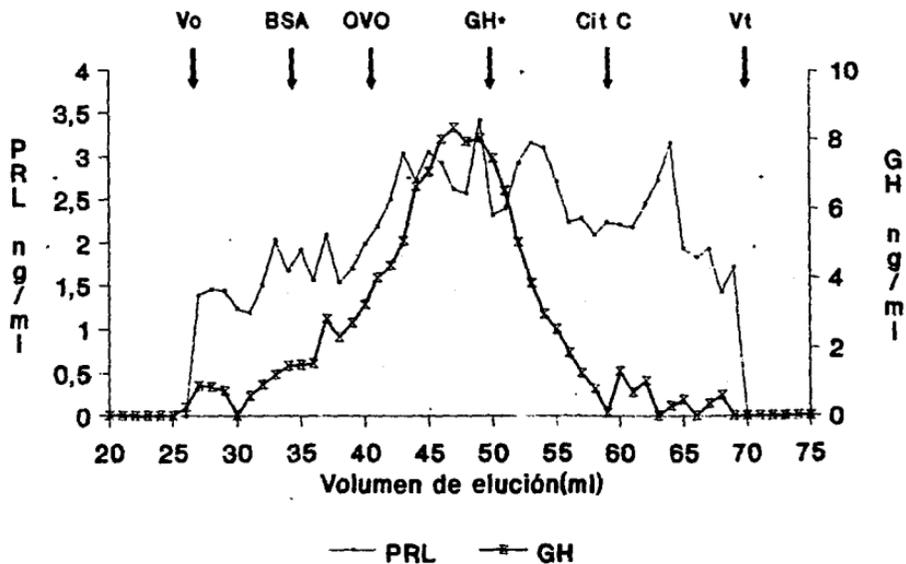
CROMATOGRAFIA DE PRL Y GH TUMOR MIXTO GRUPO III



PRL 53.10 ng/ml
GH 28.10 ng/ml

FIG # 25

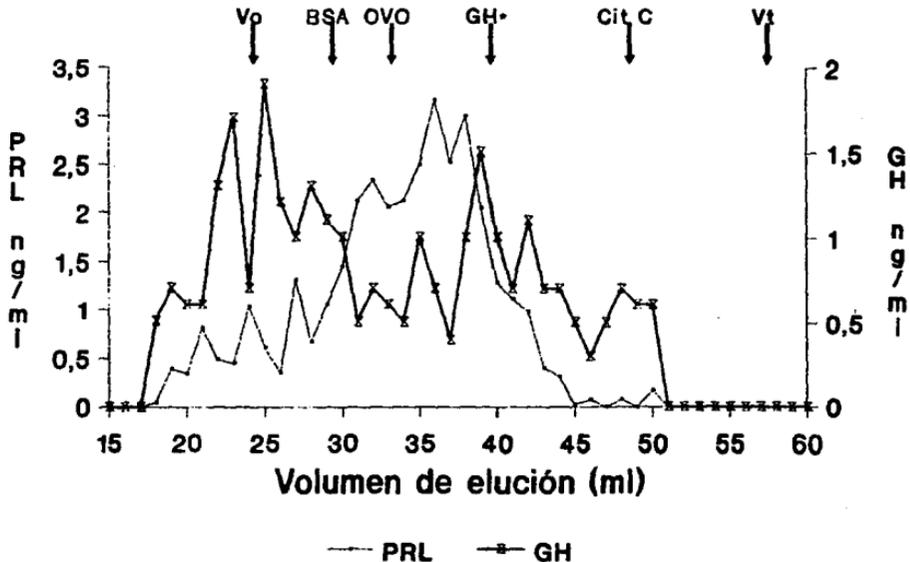
CROMATOGRAFIA DE PRL Y GH TUMOR MIXTO GRUPO III



PRL 29.4 ng/ml
GH 222.0 ng/ml

FIG # 26

CROMATOGRAFIA DE PRL Y GH TUMOR MIXTO GRUPO III



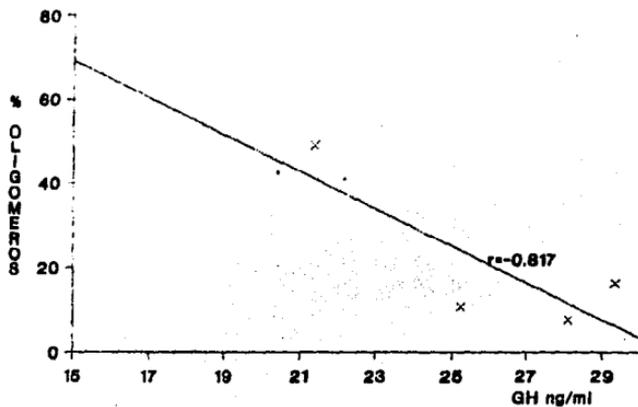
PRL 42.44 ng/ml
GH 21.40 ng/ml

FIG # 27

TABLA 7.- GRUPO III TUMORES MIXTOS

NIVELES HORMONALES			FORMAS MOLECULARES DE GH (% DE INMUNOREACTIVIDAD DE GH)				FORMAS MOLECULARES DE PRL (% DE INMUNOREACTIVIDAD)			
PACIENTE	GH ng/ml	PRL ng/ml	> 60 kDa	40 - 52 kDa	22 - 20 kDa	< 16 kDa	> 60 kDa	40 - 50 kDa	22 - 20 kDa	< 16 kDa
1	25.20	2020	10.83	15.75	58.05	15.37	3.46	10.98	70.02	15.54
2	29.30	40.41	16.29	19.58	49.05	15.08	0	8.00	64.76	27.24
3	28.10	53.1	7.75	22.88	55.03	14.34	10.86	20.52	47.14	21.48
4	222.0	29.4	7.10	14.07	69.23	9.60	14.60	11.68	38.74	34.98
5	21.40	42.44	48.75	8.24	31.54	11.47	25.47	24.45	49.06	1.02
M ± DE	65.2 ± 87.70	437.07 ± 884.92	18.14 ± 17.49	16.10 ± 5.57	52.58 ± 13.85	13.17 ± 2.52	10.87 ± 10.0	15.12 ± 6.99	53.94 ± 13.0	20.05 ± 12.83

TUMORES MIXTOS CORRELACION DE GH vs OLIGOMEROS



TUMORES MIXTOS CORRELACION DE GH vs DIMEROS

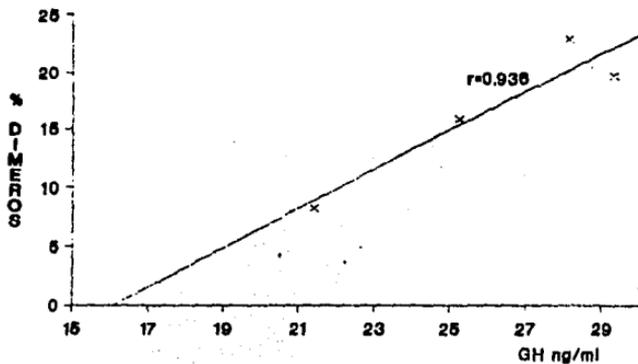
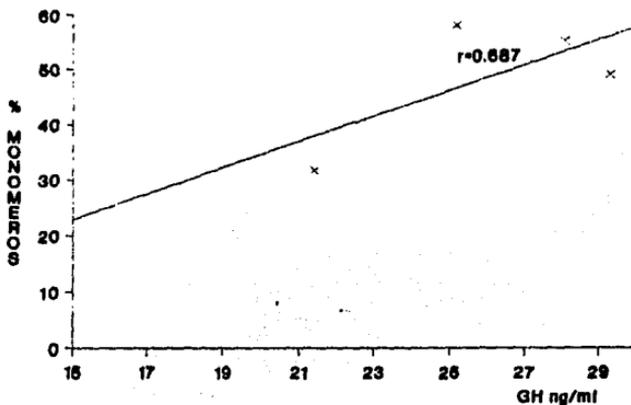


FIG # 28

TUMORES MIXTOS CORRELACION DE GH vs MONOMEROS



TUMORES MIXTOS CORRELACION DE GH vs FRAGMENTOS

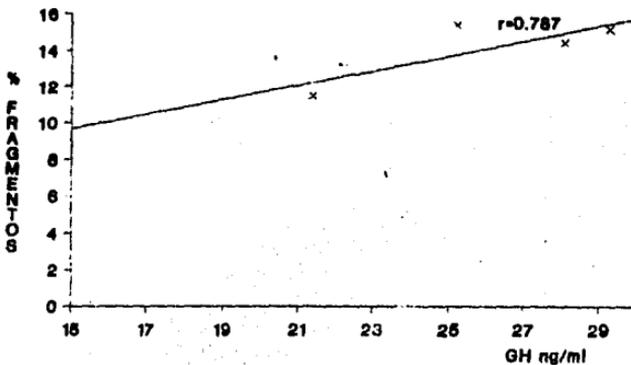
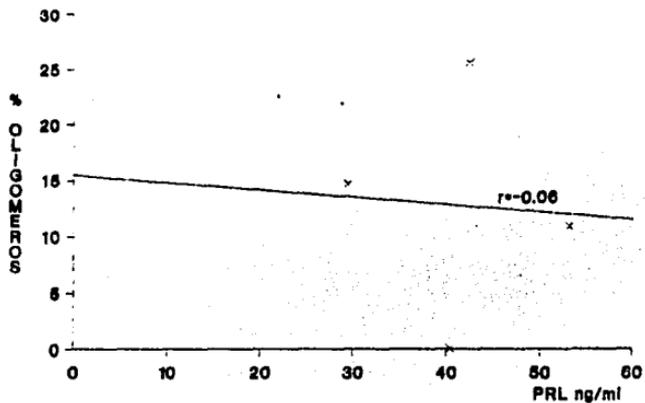


FIG. # 29

TUMORES MIXTOS CORRELACION PRL vs OLIGOMEROS



TUMORES MIXTOS CORRELACION DE PRL vs DIMEROS

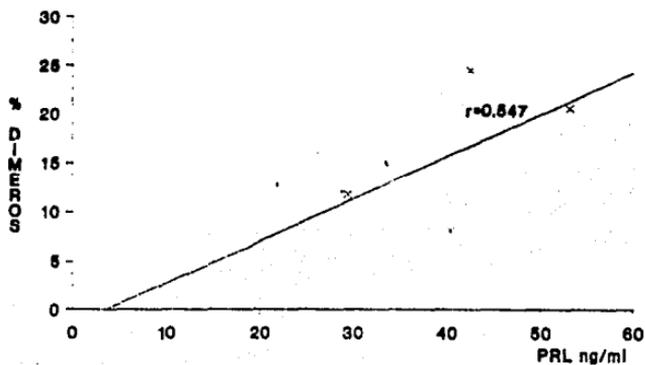
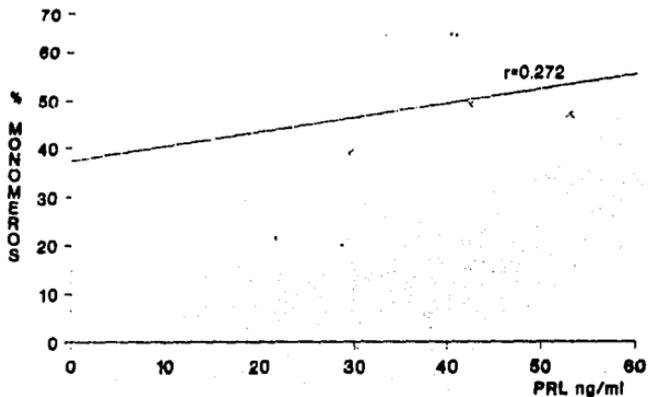


FIG # 30

TUMORES MIXTOS CORRELACION DE PRL vs MONOMEROS



TUMORES MIXTOS CORRELACION DE PRL vs FRAGMENTOS

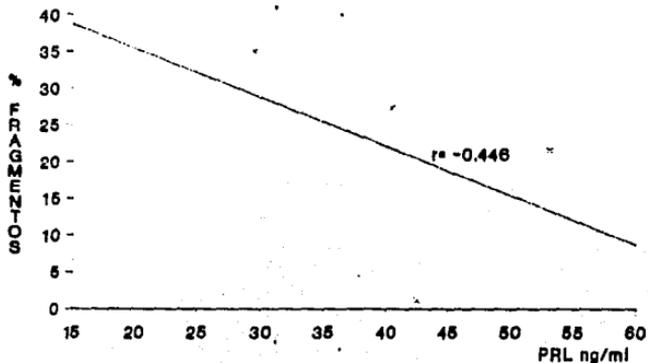


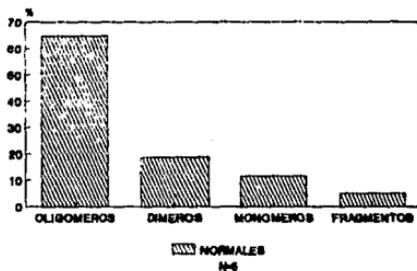
FIG # 31

Tabla 8.- Inmunorreactividad de GH y PRL en la Acromegalia

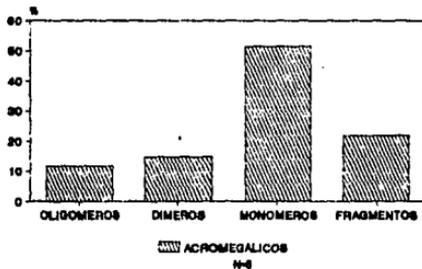
GRUPO	HORMONA	OLIGOMEROS	DIMEROS	MONOMEROS	FRAGM.
ACROMEGALIA (I)	GH	11.6±6.3	14.8±6.5	51.6±12.3	21.8±13.1
S. ACROMEGALOIDE (II)	PRL	8.06±4.26	18.18±8.6	53.3±16.9	20.4±21.2
TUMOR MIXTO (III)	GH	18.14±17.49	16.1±5.57	52.58 ±13.8	13.17±2.52
	PRL	10.87±10.0	15.12±7.0	53.94±13.0	20±12.83
NORMAL	GH	64.59±25.69	18.81±11.99	11.55±9.21	5.05±6.91
	PRL	23.57±5.55	9.31±1.52	53.39±6.97	13.73±6.14

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**FORMAS MOLECULARES DE GH
PERFIL NORMAL**



**FORMAS MOLECULARES DE GH
GRUPO I**



**FORMAS MOLECULARES DE GH
GRUPO III**

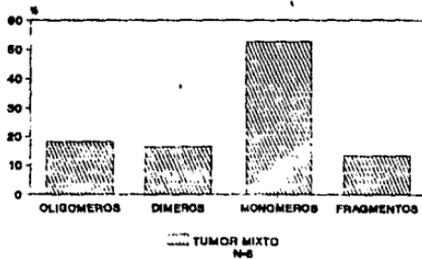


FIG # 32

FORMAS MOLECULARES DE GH

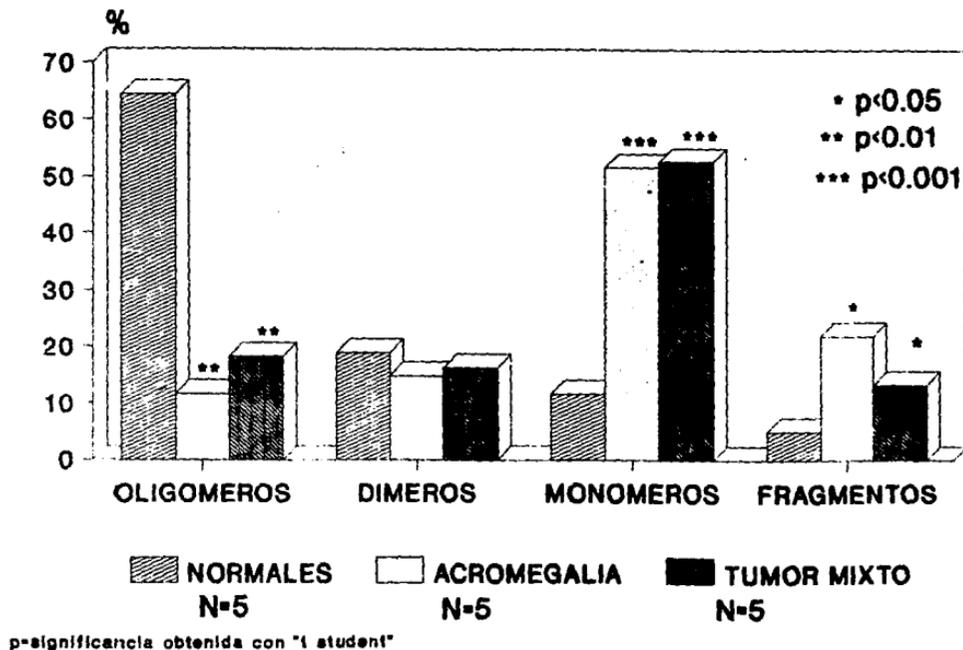
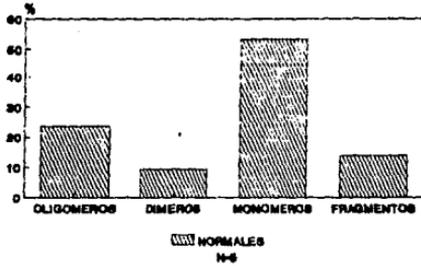
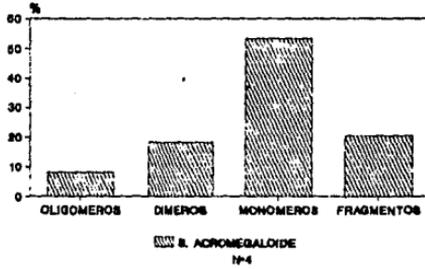


FIG # 33

**FORMAS MOLECULARES PRL
PERFIL NORMAL**



**FORMAS MOLECULARES PRL
GRUPO II**



**FORMAS MOLECULARES PRL
GRUPO III**

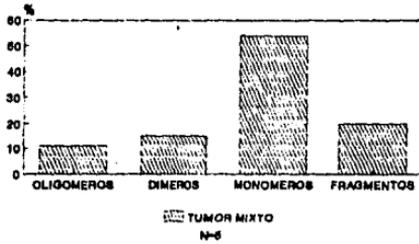
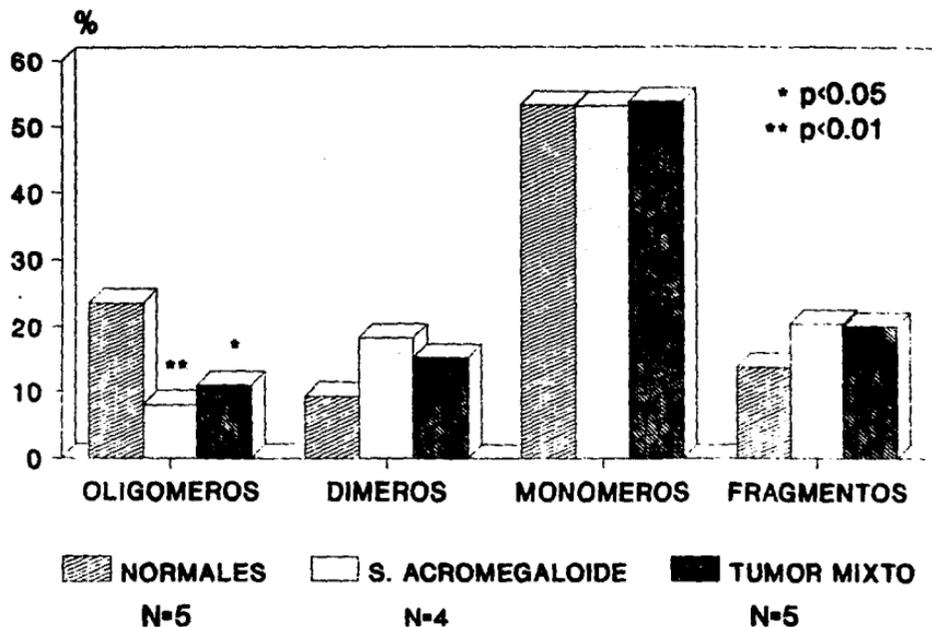


FIG # 34

FORMAS MOLECULARES PRL



p=significancia obtenida con "t student"

FIG # 35

Tabla 9.- Correlación de las formas moleculares con los niveles de GH y PRL en la acromegalia.

	CORRELACION CON	>60 kDa	52-40 kDa	22-20 kDa	<16 kDa
ACROMEGALIA (GRUPO I)	GH	-0.132	-0.485	0.647	-0.302
SINDROME ACROMEGALOIDE (GRUPO II)	PRL	0.851	0.976	0.212	-0.396
TUMORES MIXTOS (GRUPO III)	GH	-0.817	0.936	0.687	0.788
	PRL	-0.06	0.547	0.272	-0.446

CAPITULO V.

DISCUSION DE RESULTADOS.

En el presente estudio se demostró que los pacientes acromegálicos con una concentración elevada de GH (grupo I y III) tuvieron un perfil cromatográfico muy diferente al observado en las personas normales, caracterizado por presentar una proporción muy elevada de la forma monomérica, lo cual está de acuerdo a lo informado previamente por algunos investigadores (40,41) siendo la diferencia con el grupo control altamente significativa ($p < 0.001$).

También las formas de bajo PM (16 kDa o menos) consideradas como fragmentos resultantes de la degradación de la hormona, se encontraron elevados en relación al grupo control, no así los dímeros que no modificaron su proporción cuantitativa; las formas grandes (Big-big GH) se encontraron sensiblemente disminuidas (figuras 32 y 33).

Estos cambios en la proporción de las isohormonas y el incremento de la forma monomérica son de trascendencia, ya que explican los cambios fisiopatológicos y las manifestaciones clínicas de los pacientes con acromegalia, pues la forma monomérica de 22 kDa es la que presenta mayor acción biológica en los diferentes bioensayos y estudios de receptores que se utilizan en la actualidad para evaluar la actividad somatotrópica de la GH. El amplio espectro de su acción biológica incluye: promoción del crecimiento, estimulación de la producción de somatomedinas o factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs), retención de nitrógeno, fosfatos y sodio; así como acción anabólica en muchos tejidos principalmente músculo, hueso e hígado. La actividad de esta forma monomérica es la que se toma de referencia para evaluar la actividad somatotrópica de las otras variedades moleculares, siendo esta isoforma como se demostró, la que predomina en la acromegalia.

Por el contrario la big-GH formada por los dímeros de la hormona tiene solo un 10-20 % de la bioactividad de la GH 22 kDa (42) sabiéndose que las formas oligoméricas o formas grandes practicamente están desprovistas de acción biológica (2 - 3 %).

Respecto a esto último puede mencionarse, que también es importante la disminución de las formas grandes mayores de 60 kDa (Big-big GH). Su estructura química a sido un tema de gran controversia en los últimos años; en la década de los 70 's se les consideró como la prehormona o proteína precursora de la GH, después se pensó que correspondía a agregados moleculares formados por la unión de varios monómeros (trímeros, tetrámeros, pentámeros) presentes en la circulación (9,42) sin embargo a la fecha, evidencias experimentales más recientes han demostrado que las formas Big-big GH pueden deberse a la unión de la GH con las proteínas circulantes o proteínas que unen a la hormona (BPs) con elevada especificidad, formando un complejo GH-BPs. Esta última posibilidad está fuertemente apoyada por estudios que demuestran el aislamiento y purificación de dos proteínas de unión a partir del suero, así como sus propiedades de unión y afinidad por la GH (43,44).

Se sabe que una de ellas (BP-I) une a la GH con una constante de afinidad muy elevada y baja capacidad, siendo así fácilmente saturable. La otra proteína (BP-II) a diferencia de la anterior tiene una constante de asociación menor, pero elevada capacidad. Tienen pesos moleculares de 85 y 74 kDa respectivamente lo que unido a los 22 kDa de la GH monomérica da un peso molecular aproximado de 96 - 110 kDa que es comparable al peso atribuido a la Big-big GH. Estas proteínas de unión en condiciones normales secuestran a la GH en la circulación impidiendo su unión a los receptores celulares, y se sabe que tanto en condiciones normales como patológicas e independientemente de la edad y sexo tienen una concentración muy constante (45,46) suficiente para unir un 40 % de la GH circulante y amortiguar además los cambios de concentración de la GH, saturándose solamente cuando la hormona alcanza valores superiores a 20 ng/ml, casos en los que la proporción de la hormona unida será cada vez menor, cuanto mayor sea el incremento en la concentración de la GH, por lo que la concentración de la hormona monomérica libre puede incrementarse significativamente (47) tal como se observó en los resultados de este estudio. Así la elevada proporción de la forma monomérica de 22 kDa parece deberse a la saturación de las proteínas de unión por la excesiva concentración de la GH. Por otra parte los resultados muestran que la forma monomérica se encuentra en relación lineal a la concentración de GH con un coeficiente

de correlación relativamente elevado ($r= 0.65$) lo que está de acuerdo con la teoría anterior; por lo que podría decirse que las proteínas de unión (GH-BPs) controlan en cierta forma la actividad biológica de la hormona, al determinar la proporción de hormona monomérica libre que es la única que puede interactuar con los receptores limitando así su acción biológica (48). La Big-big formada por el complejo GH-BPs parece ser una fracción muy constante, sin embargo en este estudio se le encontró disminuida, lo cual sería otro factor que podría incrementar la proporción de la forma monomérica.

En relación a la proporción aumentada de las moléculas de muy bajo peso molecular (16 kDa o menores) en los pacientes con acromegalia, es un hallazgo que vale la pena comentar, ya que existen reportes en la literatura en los que se ha mencionado que estos fragmentos, aunque desprovistos de acción somatotrópica, tienen elevada actividad diabetogénica (49) y podrían corresponder al llamado "factor diabetogénico" un péptido de bajo peso molecular que desde hace algunos años se ha demostrado en el suero de algunos pacientes acromegálicos (50,51) de los cuales un porcentaje importante desarrollan diabetes, por lo que sería importante considerar su proporción aumentada en la acromegalia y desarrollar un protocolo de estudio al respecto.

Por otra parte los resultados del grupo II formado por pacientes con datos clínicos de acromegalia que no tenían elevada la GH, se puede decir que debido a su baja concentración hormonal (1.1 ± 0.48 ng/ml), no es posible explicar las alteraciones clínicas con base en ésta hormona. En cambio, como el estudio hormonal mostró, todos los pacientes de este grupo tuvieron concentraciones muy elevadas de PRL (106 ± 39.6) y además en el estudio cromatográfico los perfiles de elución de PRL fueron muy similares a los de la GH en los grupos I y III, con predominio de la forma monomérica y porcentajes de IR de las otras isohormonas muy similares y no diferentes estadísticamente de los obtenidos para GH, en los otros dos grupos de acromegálicos (figura 34 y 35). Por todo lo anterior se podrá inferir que es la PRL y no la GH la hormona responsable del "cuadro acromegaloide" presentado por estos pacientes.

Esto no es difícil de aceptar si se recuerda que ambas hormonas (GH y PRL) constituyen junto con el lactógeno placentario o mamosomatotropina coriónica (HPL) la familia de las llamadas

hormonas lactotrópicas-somatotrópicas, las cuales tienen una estructura química muy semejante y la capacidad de unirse en condiciones normales o patológicas a los receptores lactogénicos y somatotrópicos con diferente grado de afinidad (52,53), sobre todo cuando presentan alteraciones estructurales o mutaciones que afectan a los segmentos involucrados en la unión a los receptores como son los residuos 4 -19, 54 - 74, 167 - 182 y 183 - 191 en el caso de lo que se ha demostrado para la GH, mapeando los sitios que permiten su unión a los receptores de la PRL (54). A la vez una mutante de PRL que presenta alteraciones en la estructura primaria, a nivel de los residuos de aminoácidos que son críticos para la unión a los receptores de GH, mostró tener una capacidad de unión aumentada para dichos receptores (55). En la actualidad se conocen ya las regiones que determinan la unión de ambas hormonas (GH y PRL) a los dos tipos de receptores (somatotrópico y lactogénico) encontrándose que son muy similares aunque no idénticos(53).

A la luz de estos conocimientos es posible explicar la actividad lactogénica de la GH en mujeres normoprolactinémicas con galactorrea por niveles elevados de GH (56) así como también los resultados de este estudio, en el que pacientes con una concentración normal de GH pero con PRL muy elevada y posiblemente alterada estructuralmente, producida por un tejido tumoral como son los adenomas, pudiera ser la responsable de la acromegalia.

CONCLUSIONES.

1. En la acromegalia típica debida a concentraciones elevadas de GH el estudio cromatográfico demostró el predominio de la forma monomérica de 22 kDa, la isoforma con mayor actividad biológica y marcado efecto somatotrópico.
2. Se encontró una relación lineal entre la proporción de la forma monomérica y la concentración de GH ($r= 0.85$) lo que implica que a mayor concentración o nivel de la hormona, mayor será el incremento de la isoforma de 22 kDa.
3. El aumento significativo de los fragmentos de peso molecular bajo, puede ser importante de considerar, ya que se ha demostrado que tienen actividad diabetogénica, lo que puede explicar por que algunos pacientes acromegálicos desarrollan diabetes.
4. En los pacientes del grupo II que tuvieron concentraciones muy elevadas de PRL, esta hormona parece ser la responsable de la acromegalia, presentando perfiles cromatográficos muy similares a los de GH de los pacientes de los grupos I y III, caracterizados por exhibir también, el predominio de la forma monomérica y proporciones semejantes de las otras formas moleculares.
5. Como conclusión final puede decirse que los tres grupos de pacientes estudiados (grupo I, II y III) no obstante ser diferentes en cuanto a su producción hormonal y la estirpe del tumor (acromegalia típica, prolactinoma y tumor mixto) presentan un comportamiento cromatográfico muy similar entre ellos, pero diferente en relación al del grupo control, mostrando en todos los casos el predominio de la forma monomérica de 22 kDa, lo que explica las alteraciones clínicas características de la acromegalia.

BIBLIOGRAFIA.

1. Wilson D. J. y Foster W.D. **Endocrinología** Tomo I 7a. edición Editorial Médica Panamericana Argentina 1989 p.p.21-31, 196-209.
2. Greenspan S.F. y Forsham H.P. **Endocrinología Básica y Clínica** Ed Manual Moderno S.A. de C.V. 2a ed. México D.F. 1988
3. Smith R.C. y Norman M.R. **Prolactin and Growth hormone:molecular heterogeneity and measurement in serum.** Ann Clin Biochem 1990, 27:542-550.
4. Goodman A.D. , Tenenbaum R. y Rabinowitz D. **Existence of two forms of immunoreactive Growth Hormone in human plasma.** J.C.E. & M 1972 35 :6
5. Bauman G. **Growth hormone heterogeneity: Genes, isohormones, variants and binding proteins.**Endocr. Rev 1991; 4:424-449.
6. Lewis U.J, Sing R.N.P. , Tuwiler et al . **Human Growth Hormone: a complex of proteins.** Recent Prog Horm. Res. 1980; 36 :477-508.
7. Culler F.C. Kaufmann S. Friegeri L.G. y Jones K.L. **Comparison of acute metabolic effects of 22,000 Dalton and 20,000 Dalton Growth Hormone in human subjects.** Horm. Metab. Res. 1988;20:107-109.
8. Wright D.R. Goodman A.D. y Trimblek D. **Studies on "big" Growth Hormone from human plasma and pituitary .** J. Clin. Invest. 1974; 54: 1064-1073.
9. Stolar M.W. Amburnk K. y Baumann G. **Plasma "big" and "Big-big" growth hormone (GH) in man: an oligomeric series composed of structurally diverse GH monomers** J. Clin. Endocrinol. Metab. 59:212-218.
10. Baumann G., Shaw M.A. y Amburn K. **Circulating growth hormone binding proteins.** J. Endocrinol Invest. 1994 ;17:67-81.
11. Whitaker M.D., Kleen G.G., et al. **Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera.** J. Clin. Endocrinol Metab. 58: 826-830.

12. Gamier R. Aubert M.L. Kaplan S.I. y Grunbach. **Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: Decreased affinity of "big" prolactin in a radioreceptor assay and evidence for its secretion.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 47:1; 273-281.
13. Jordan R.M., Tresp N.M. y Kohler P.O. **Human Prolactin Heterogeneity in Pituitary effluent blood.** Horm. Metabol. Res. 1985 ; 598-601.
14. Pellegrini I., Gunz G., et al. **Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells: Immunological, receptor binding, and biological properties of the glycosylated and nonglycosylated forms.** Endocrinology 1988 ;122:2667-2674.
15. Champier J. Claustrat B., Sassolas G., Berger M. **Detection and enzymatic deglycosylation of a glycosylated variant of prolactin in human plasma.** FEBS lett, 212:220-224.
16. Farreras V. P. **Medicina Interna** Tomo II Editorial Marin S.A. 1982 Barcelona (España) p.p. 537-566.
17. Netter H.F. **Sistema Endocrino y Enfermedades Metabólicas** Colección Ciba de ilustraciones médicas . Tomo IV Editorial Salvat S.A. Barcelona 1980 p.p. 3,9,10,24
18. Bhagavan N.V. **Bioquímica** Editorial Interamericana 1978 p.p. 801-806.
19. Harper A H. **Manual de Química Fisiológica** 4a. ed. El Manual Modemo , México D.F. p.p. 474-538.
20. Martial J.A. Hallewell R.A. Baxter J.D. y Goodman H.M. **Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria.** Science 1979; 205:602-607.
21. Rudd B.T. **Growth, growth hormone and the somatomedins: a historical perspective and current concepts.** Ann. Clin. Biochem. 1991; 28:542-555.
22. Karlander S. Uranic M, y Efendić S. **Increased glucose turnover and glucose cycling in acromegalic patients with glucose tolerance.** Diabetologia 1986; 29:778-783.
23. Milton C.F. et al **Peripheral glucose metabolism in Acromegaly** J. Clin Endocrinol. Metab. 1991; 72 5: 1048-1053.

24. Makoff E., Lee D.W. et al. **Release of the 22,000 and the 20,000 daltons variants of growth hormone in vivo and in vitro by human anterior pituitary cells.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1986 62:664-669.
25. Barrett R.J. Friesen H., Astwood E.B. **Characterization of pituitary and peptide hormones by electrophoresis in starch gel.** J. Biol. Chem. 1962; 237:432-439.
26. Frantz A.G. **In: Lactogenic hormones.** Wolstenholme G.E.W. Knight J. (Ed) Churchill Livingstone. Edinburgh and London. 1972; p. 186
27. Shiw R.P.C. y Friesen H.G. **Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function.** Ann. Rev. Physiol. 1980; 42: 83-96.
28. Malacara J.M., García V.M. y Valverde R.C. **Fundamentos de Endocrinología** 3a. Edición Edit. La Prensa Médica Mexicana México D.F. 1980
29. Kleinberg D.L. Noel G.L. y Frantz A.G. **Galactorrhea : a study of 235 cases including 48 with pituitary tumors** N. Engl. J. Med. 1977 ;296:589.
30. Zarate A.T. Canales E.S. y Forbach G. **Galactorrea: un signo de patología diversa.** Folleto Sandoz de México S.A. de C.V. 1984.
31. Johnston D.G., Halgh R.W. y Watson M. **Prolactin secretion and biological activity in female with galactorrhea and normal prolactin concentrations at rest.** J. Clin. Endocrinol Metab. 1985 ; 22: 661 .
32. Ochoa R. Mason M. Fonseca ME: Moran C. y Zarate A. **Distribution of growth hormone isoforms in sera from women with normal ovarian function, galactorrhea and normoprolactinemia.** Fertility and Sterility 1993; 60: 272-275.
33. Tyrell J. B. y Wilson C.B. **Pituitary syndromes,** Surgical Endocrinology: Clinical Syndromes Lippincott, 1978.
34. Moran C., Tena G. Fonseca M.E., Ochoa R., Zarate A. **Changes in the prolactin serum isoforms secreted by a pituitary adenoma associated with therapy.** Arch Med Res. 1994 25;1:1-30
35. Porath J. y Flodin P. **Gel filtration** Nature. 1959; 183:1657

36. Fisher L. **Introducción a la cromatografía en gel.** Edit El Manual Moderno S.A. 1975
37. Sigma Chemical Company **Gel Filtration molecular weight markers** January 1986 Technical Bulletin No. GF-3
38. Charles P.W. **Immunoassays** *Methods in enzymology* 1990, 182; 53:700-718
39. De la Cruz C.D. y Mendoza M.N.V. **Manual para elaborar proyectos de investigación en ciencias de la salud.** UNAM México 1990 p.p. 7-45
40. Baumann G. Mac Cart J.C.y Amburn K. **The molecular nature of circulating growth hormone in normal and acromegalic man: evidence for a principal and minor monomeric forms.** J. Clin. Endocrinol Metab. 1983 56:946-952
41. Eastman R.C. Lesnia K. M.A. Hendricks C.M. et al **Radioreceptor assay (RRA) of endogenous and exogenous hGH components in pathologic states: evidence for increased RRA of little hGH in acromegaly.** Program of the 58th Ann. al Meeting of The Endocrine Society, San Francisco, CA, 1976, p 304
42. Li CH, **Human Growth Hormone: Perspectives on its Chemistry and Biology.** In: Raitis (ed) *Advances in Human Growth Hormone Research* pp 321-341
43. Hanson LA, Roos P y Rymon L. **Heterogenety of human growth hormone preparations by immuno-gel filtration and gel filtration electrophoresis.** *Nature* 1966, 212: 948-949
44. Moore W.V. **The Role of Aggregated hGH-deficient children** *J Clin Endocrinol Metab* 1978 46: 20-27
45. Baumann G, Show M A y Amburn K. **Regulation of plasma growth hormone-binding proteins in health and disease.** *Metabolism* 1989 38: 683-689
46. Merimee T.J, Baumann G y Daughaday W H. **Growth hormone binding protein: studies in pygmies and normal statured subjects II.** *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:1183-1188
47. Baumann G, Amburn K y Show M A. **The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man.** *Endocrinology* 1988; 122: 976-984

48. Mannor DA, Winer LM, Show MA y Baumann G. **Plasma growth hormone binding proteins: effect on growth hormone binding to receptors and on growth hormone action.** J Clin Endocrinol Metab 1991; 73: 30-34
49. Lewis U J, Singh R N P, Vander Laan W P y Tutweiler G F. **Enhancement of the hyperglycemic activity of human growth hormone by enzymic modification.** Endocrinology 1977; 101: 1587-1603
50. Loshoh A J y Krahl M E. **A hyperglycemic peptide from pituitary growth hormone: preparation with pepesin and assay in ob/ob mice.** Proc Natl Acad Sci U S A 71:1244-1246
51. Louis L H y Conn J W **Diabetogenic polypeptide from human pituitaries similar to that excreted by proteinuric diabetic patients.** Metabolism 1972; 21: 1-9
52. Cunningham B C, Bass S, Fuh G y Wells J A. **Zinc mediation of the binding of human growth hormone to the human prolactin receptor.** Science 1990; 1709-1712
53. Cunningham B C y Wells J A. **Rational design of receptor-specific variants of human growth hormone.** Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88: 3407-3411
54. Ray J, Okamura H, Kelly P A, Liebhaver S A y Cooke N E. **Alteration in the receptor binding specificity of human growth hormone by genomic exon exchange.** Mol Endocrinol 1990; 4: 101-107
55. Cunningham B C, Henner D J y Wells J A. **Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone recepto.** Science 1990; 247: 1461-1465