



* 5 3 0 9 8 2 2 7 8 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN LA RATA POR
MICROKNEMOMETRÍA**

TESIS DOCTORAL

MARÍA DE LOS ÁNGELES ROL DE LAMA

Madrid, 1997

21.564

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN LA RATA POR MICROKNEFOMETRÍA

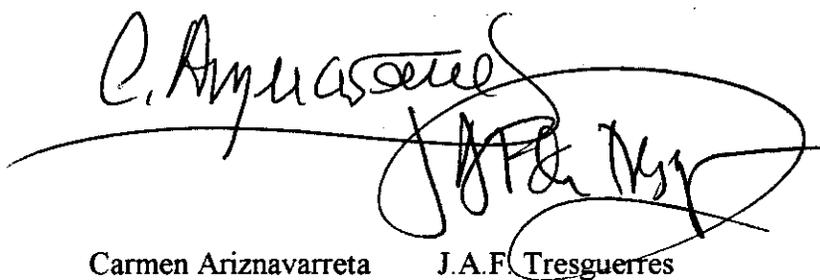
Tesis presentada por
María de los Ángeles Rol de Lama
para optar al grado de Doctor.

Universidad Complutense de Madrid.
1997

VºBº Los Directores,



Ángeles Rol de Lama



Carmen Ariznavarreta

J.A.F. Tresguerres

Agradecimientos

*A mi familia,
A Paco in memoriam*

En primer lugar quiero agradecer a los doctores Carmen Ariznavarreta y Jesús A. Fernández-Tresguerres el haber aceptado dirigir esta tesis, y haber iniciado mi formación investigadora. Ambos han demostrado que su paciencia no tiene límites, tanto al intentar que este manuscrito fuera mínimamente legible como cuando mi obstinación me impedía dar mi brazo a torcer.

Agradezco a la Dra. Paz Viveros haber aceptado la tutoría de esta tesis.

A todos los profesores de este departamento por su colaboración y su amable acogida.

A Lucila Kraus, Antonio Carmona y Blanca Martínez por su inestimable ayuda técnica, y por haber hecho el trabajo de laboratorio mucho más ameno.

A todo el personal del animalario de la Universidad Complutense que ha procurado facilitar mi tarea, pese a incordiarles de vez en cuando.

Gracias a Elena Vara y a Cruz García por las valoraciones de somatostatina y por permitirnos utilizar su sonicador, y el resto de aparatos. Al Dr. Emilio Delgado por los estudios histológicos de las tibias, y a L. Grasedick y Jens Burmeister por su trabajo en las funciones Gompertz.

A Michael Hermanussen, no sólo por haberme dado la inapreciable oportunidad de aprender una técnica nueva, sino también por brindarme una cálida acogida cada vez que he ido a visitarle, y hacer que cambiaran algunos de mis esquemas.

A Blanca, Fares y todos los demás compañeros del Departamento, por compartir conmigo el laboratorio y los ratos en el comedor; en especial, a Gelo por haber sido "mi compañero".

A todos los amigos, que simplemente han estado ahí, y me han demostrado que puedo contar con ellos. Por la especial relación que guardan con esta tesis, gracias a Paco (mi Paco), a Marta y a Vivi, por prestarse a acompañarme a pasar alguna que otra noche en la Facultad.

Gracias al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) entidad financiadora de este proyecto.

Por supuesto, a todas mis ratitas que ganaron el cielo en el empeño.

Abreviaturas

α FP	α feto proteína	IGF I	Somatomedina C o factor de crecimiento I similar a la insulina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa o corticotropina	IGF II	Factor de crecimiento II similar a la insulina
AMPc	Adenosin-3'-5'-monofosfato cíclico	IGFBP	Proteínas ligantes de IGFs
ALS	Subunidad ácido lábil	IGF-IR	Receptor de IGF I
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	IL	Interleucinas
BSA	Albúmina sérica bovina	i.m.	Intramuscular
CCK	Colecistoquinina	i.p.	Intraperitoneal
cpm	Cuentas por minuto	i.v.	Intravenoso
CRH	Hormona corticotropa	LH	Hormona luteinizante
DA	Dopamina	LHRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
DHT	Dehidrotestosterona	NA	Noradrenalina
E	Estrógenos	PEG	Polietilenglicol
EDS	Etilen dimetano sulfonato	PTH	Hormona paratiroidea
EDTA	Ácido etiléndiamino-tetra acético	Pit-1	Factor de transcripción específico de hipófisis 1.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	PKA	Proteína cinasa A
FSH	Hormona folículo estimulante	PKC	Proteína cinasa C
GABA	Ácido gamma amino butírico	PRL	Prolactina
GC	Glucocorticoides	PT	Propionato de testosterona
GH	Hormona de crecimiento	RIA	Radioinmunoanálisis
bGH	Hormona de crecimiento bovina	s.c.	Subcutáneo
rhGH	Hormona crecimiento recombinante humana	SD	Desviación estándar
GHBP	Proteína ligante de GH	SEM	Error estándar de la media
GHR	Receptor de GH	SS	Somatostatina
GHRH	Hormona liberadora de GH	T	Testosterona
GHRP	Péptido liberador de GH	TCA	Ácido tricloro-acético
GIP	Péptido inhibidor gástrico	TFA	Ácido trifluoracético
GMS	Glutamato monosódico	TGFβ	Factor β transformante de crecimiento
h	Horas	TRH	Hormona liberadora de TSH
i.c.v.	Intracerebroventricular.	TSH	Hormona estimulante del tiroides u hormona tirotrópica
		U.I.	Unidades internacionales

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Auxología	3
2. Factores que condicionan y regulan el crecimiento	6
3. Eje somatotropo	
3.1 Hormona de crecimiento	9
3.1.1 Regulación de la secreción de GH	12
3.1.1.1 GHRH.....	12
3.1.1.2 SS.....	13
3.1.1.3 Interacción GHRH/SS.....	14
3.1.1.4 Neurotransmisores y otros péptidos implicados	17
3.1.1.5 Factores metabólicos y regulación de GH.....	19
3.2 IGF I o somatomedina C.....	19
4. Órgano diana: estructura y función del cartílago de crecimiento	23
4.1 Osificación endocondral	25
4.2 Efecto de la GH y de la IGF I en el cartílago de crecimiento	27
4.3 Efecto de otras hormonas y sustancias en el cartílago de crecimiento.....	29
5. Modificaciones del patrón normal de crecimiento	
5.1 Dimorfismo sexual y manipulación neonatal del ambiente esteroideo	
5.1.1 Dimorfismo en el crecimiento y en la secreción de GH	31
5.1.2 Diferenciación sexual del cerebro: manipulación neonatal	34
5.1.3 Manipulación del ambiente esteroideo neonatal y secreción de GH	35
5.2 Alteraciones de la nutrición en la rata	37
5.3 Crecimiento compensatorio	38
5.4 Tratamiento neonatal con glutamato monosódico.....	40
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Animales	49
1.1 Régimen de mantenimiento	49
2. Seguimiento de los animales	
2.1 Estudio del ciclo estral y comienzo de la pubertad	49
2.2 Peso de los animales	50
2.3 Microknemometría	50
3. Sacrificio de los animales y procesamiento de las muestras	
3.1 Sacrificio y recogida de sangre.....	53
3.2 Procesamiento de las hipófisis.....	53
3.3 Procesamiento de los hipotálamos	54

4. Drogas empleadas	54
5. Estudios analíticos	
5.1 Radioinmunonálisis	55
5.1.1 RIA de GH	56
5.1.2 RIA de LH	59
5.1.3 RIA de IGF I	61
5.1.4 RIA de LHRH	64
5.1.5 RIA de SS	65
5.2 Valoración de proteínas	67
6. Diseños Experimentales	
6.1 Estudio del patrón de crecimiento por microknemometría en la rata macho normal	
6.1.1 Efecto de distintas pautas de administración de GH sobre el crecimiento. Estudio de la existencia de variaciones ultradianas en la velocidad de crecimiento	
Dosis única y diaria de GH	67
Variaciones ultradianas	68
Administración intermitente o continua de GH	68
6.1.2 Efecto de la castración química sobre el crecimiento en el macho normal	69
6.2 Estudio del crecimiento en la rata macho tratada con GMS. Efecto de la castración, y repercusión de la administración de GH, PT o ambas en animales intactos o castrados.....	70
6.3 Estudio del proceso de crecimiento en la rata hembra	
6.3.1 Estudio del papel de la GH en la rata hembra normal o deficitaria en GH.....	71
6.3.2 Estudio del papel de la GHRH en el proceso de crecimiento mediante su administración continua, de forma aislada o combinada con SS.....	73
6.4 Estudio de la repercusión sobre el crecimiento de la alteración en la diferenciación sexual del hipotálamo sobre el crecimiento	74
6.5 Estudio del proceso crecimiento compensatorio producido tras ayuno e ingesta reducida, y su posible potenciación por la administración exógena de GH	
6.5.1 Estudio en la rata macho normal.....	75
6.5.2 Estudio en la rata macho tratada con GMS.....	76
6.5.3 Estudio en la rata macho tratada con GMS prolongando el período de ayuno	77
7. Análisis Estadístico de los datos	79

RESULTADOS

1. Estudio del patrón de crecimiento en la rata normal

1.1 Crecimiento espontáneo	85
1.1.1 Variaciones infradianas	86
1.1.2 Variaciones ultradianas	87
1.2 Estudio del efecto de distintas pautas de administración de GH sobre el patrón de crecimiento en la rata macho normal.....	88

1.3 Efecto de las hormonas sexuales sobre el crecimiento en la rata macho normal: Administración de un análogo de LHRH.....	90
2. Estudio del proceso de crecimiento en ratas machos tratadas neonatalmente con GMS: Repercusión de la administración de GH y efecto de los esteroides sexuales.	
2.1 Longitud tibial	91
Efecto de la castración asociada al tratamiento neonatal con GMS.....	92
Efecto del tratamiento con GH en la rata macho tratada neonatalmente con GMS.....	93
Efecto del tratamiento con testosterona en la rata macho tratada neonatalmente con GMS.....	94
2.2 Evolución ponderal	95
2.3 Eje somatotropo.....	96
2.4 Eje hipotálamo-hipofiso-gonadal.....	98
3. Estudio del patrón de crecimiento en la rata hembra.	
3.1 Efecto de la administración de GH en la rata hembra normal o tratada con GMS. Tratamiento con GHRH en inyecciones en ésta última.	
3.1.1 Longitud tibial.....	100
3.1.2 Evolución ponderal	103
3.1.3 Eje somatotropo.....	104
3.1.4 Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.....	106
3.2 Efecto de la administración continua de GHRH de forma aislada, o combinada con SS, en la hembra normal o tratada con GMS.	
3.2.1 Longitud tibial	107
3.2.2 Evolución ponderal	108
3.2.3 Eje somatotropo.....	108
3.2.4 Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal.....	109
4. Efecto de la alteración en la diferenciación sexual del hipotálamo sobre el crecimiento.	
4.1 Longitud tibial	109
4.2 Evolución ponderal	111
4.3 Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal y somatotropo.....	112
5. Estudio del proceso de crecimiento compensatorio producido tras ayuno e ingesta reducida y su posible potenciación por la administración exógena de GH.	
5.1 Estudio en la rata macho normal	
5.1.1 Longitud tibial	112
5.1.2 Evolución ponderal	113
5.2 Estudio del crecimiento compensatorio en la rata macho tratada con GMS	

5.2.1 Longitud tibial	115
5.2.2 Evolución ponderal	116
5.3 Estudio del crecimiento compensatorio en la rata macho tratada con GMS, sometida a 2 días de ayuno y 4 de ingesta reducida	
5.3.1 Longitud tibial	118
5.3.2 Evolución ponderal	120
5.3.3 Eje somatotropo	124
6. Análisis matemático del crecimiento oscilatorio (Caracterización de los miniestirones)	125
DISCUSIÓN	
1. Microknemometría	135
2. Patrón normal de crecimiento	
2.1 Dimorfismo sexual y crecimiento en la pubertad.....	139
2.2 Variaciones en la velocidad de crecimiento.....	140
Variaciones ultradianas	142
3. Estudio del crecimiento en la rata macho normal	
3.1 Efecto de la administración de GH sobre el crecimiento en la rata macho normal.....	143
3.2 Efecto de la castración química sobre el crecimiento en la rata macho normal.....	147
4. Estudio del crecimiento en la rata macho deficitaria en GH	
4.1 Efecto de la administración de GMS en la rata macho.....	148
4.2 Efecto de la castración y tratamiento con PT sobre el crecimiento, en el modelo de la rata macho tratada con GMS.....	150
4.3 Efecto de la administración de GH, aislada o en combinación con PT, sobre el crecimiento en la rata macho tratada con GMS.....	153
5. Estudio del crecimiento en la rata hembra	
5.1 Efecto de la administración de GH en la rata hembra normal.....	156
5.2 Efecto de la administración de GMS sobre el crecimiento en la rata hembra	158
5.3 Efecto de la administración de GH sobre el crecimiento en la rata hembra tratada con GMS.....	160
5.4 Efecto sobre el crecimiento de la administración continua de GHRH, de forma aislada o combinada con SS, en la rata hembra normal.....	162
5.5 Efecto sobre el crecimiento de la administración continua de GHRH, de forma aislada o combinada con SS, en la rata hembra tratada con GMS.....	164
6. Efecto de la alteración en la diferenciación sexual del hipotálamo sobre el crecimiento.	166
7. Estudio del proceso de crecimiento compensatorio producido tras	

ayuno e ingesta reducida y su posible potenciación por la administración exógena de GH en la rata macho normal o deficitaria en GH.....	169
8. Análisis matemático del crecimiento oscilatorio (caracterización de los miniestirones)	177
CONCLUSIONES	185
BIBLIOGRAFÍA	189

INTRODUCCIÓN

El crecimiento es un proceso multifactorial muy complejo que depende de la interacción de factores genéticos, nutricionales, ambientales y hormonales (Goodman 1994). No consiste únicamente en un aumento de tamaño, sino que incluye procesos de morfogénesis, diferenciación y adquisición de capacidad funcional, que hacen que el aumento de tamaño se realice de una forma armónica, de acuerdo con un plan preestablecido y que permite que a partir de una célula inicial se desarrolle un organismo completo.

1. AUXOLOGÍA

Para comprender y valorar el crecimiento, se ha desarrollado la *auxología* (*auxe*: crecimiento, *logos*: tratado), que es la ciencia del desarrollo de los organismos, y la *auxometría* (*metron*: medida), que es la ciencia de la medida del crecimiento (Moreno y cols. 1996).

En el niño existen distintos indicadores del desarrollo somático como son el peso corporal, la talla, el perímetro craneal, o medidas de los segmentos superior e inferior del cuerpo para valorar crecimientos disarmónicos.

La edad ósea del individuo es un índice muy importante. El examen radiológico de los huesos, principalmente de la muñeca y de la mano (Tanner y cols. 1988), permite asignar a cada estadio de maduración esquelética una edad ósea. Existen curvas estándar de edad ósea, que representan la edad a la cual el 50% de los niños presentan ese mismo estadio de maduración (Tanner y cols. 1988). Su importancia radica en que no sólo interesa saber lo alto que pueda llegar a ser un niño, sino lo avanzado que se encuentre en su objetivo (Tanner y cols. 1988). Por ejemplo, un adelantamiento de la pubertad compromete la talla final del niño por una actuación anticipada de los esteroides sexuales, ya que la maduración ósea es superior al incremento de talla, de tal forma que la relación normal entre edad ósea y cronológica, que normalmente es 1 se incrementa (Tresguerres 1996a); el niño crece rápidamente pero le queda menos tiempo para hacerlo.

La estatura corporal, sin embargo, sigue siendo el parámetro principal para determinar el crecimiento, y la precisión de dicha medida es un factor limitante tanto en el control de la terapéutica como en la investigación sobre el crecimiento. Las medidas

de la estatura en intervalos inferiores a 12 meses, no se consideran habitualmente adecuadas para cuantificar tasas de crecimiento (Hermanussen y Burmeister 1993).

El intervalo de tiempo aconsejable entre las medidas de estatura depende de la precisión de la técnica (Hermanussen 1989, 1995), por lo que hasta ahora y debido a los métodos de medida estatural, los intervalos de tiempo eran muy amplios y daban lugar a la idea de que el crecimiento era un proceso lineal.

Sin embargo, se sabe que en el niño existen períodos a lo largo de su vida con distintas velocidades de crecimiento: una elevada tasa de crecimiento durante el primer año de vida, una tasa más o menos estable desde los 4 años de unos 6 cm al año, y un aumento puberal tras el que la tasa disminuye progresivamente hasta ser cero, por la osificación total de los cartílagos de conjunción (Tresguerres 1996a).

La aparición de nuevas tecnologías como la knemometría (Valk y cols. 1983a), con un error técnico muy bajo, han permitido un seguimiento del crecimiento a más corto plazo con medidas incluso diarias. Este aparato, tal y como se ilustra en la figura 1, permite una medición de la tibia desde el exterior. En la medición se incluyen la rótula, la anchura de la epífisis distal del fémur, los tejidos blandos que cubren la rodilla y el talón, así como el astrágalo y el calcáneo.

- A: Silla móvil
- B: Reposapiés
- C: Placa móvil de medida
- D: Contrapeso

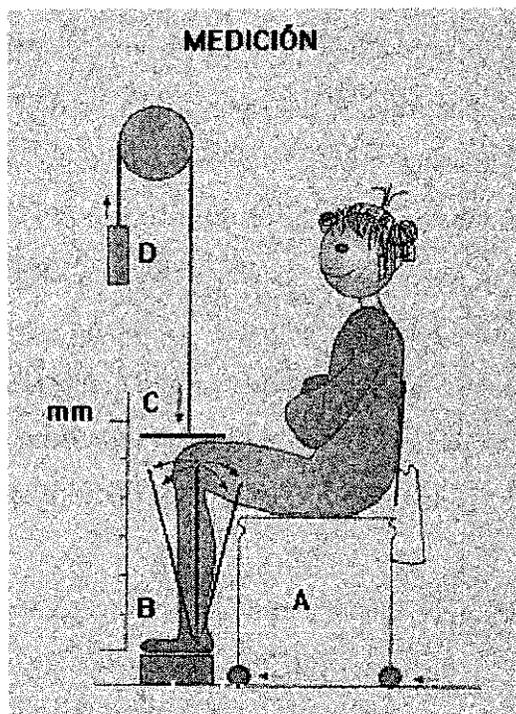


Figura 1. Esquema del Knemómetro. Modificado de Ariznavarreta (1996a).

Procedimiento de medida: El niño se sitúa en una silla móvil, buscando una posición que sea cómoda, una vez lograda se estandariza para siguientes las medidas. El pie se apoya en un reposapiés. La altura de la silla se regula de tal forma que la pierna se flexiona 90°. Un contrapeso sujeto por una polea garantiza que la presión ejercida sobre los tejidos sea siempre la misma. La pierna del niño se mueve por el observador, de tal forma que la distancia entre la base donde descansa el pie y la placa sobre la rodilla aparece continuamente en una pantalla electrónica. La longitud máxima obtenida se considera como la longitud de la pierna (Hermanussen y cols. 1985). Su error técnico es de unos 100 μm (Wolthers 1996).

Las medidas individuales obtenidas por knemometría pusieron de manifiesto la aparición de miniestirones (Hermanussen y cols. 1988a), es decir incrementos no constantes en la velocidad de crecimiento, como también vieron otros autores (Wit y cols. 1987, Hermanussen y cols. 1988a, 1988b, Hermanussen y Burmeister 1993, Gibson y cols. 1993, Michaelsen 1994, Lampl y cols. 1995, Wolthers 1996).

En contra de lo que se esperaba, se encontró que las velocidades de crecimiento obtenidas en periodos de tiempo cortos, con esta técnica, no permitían predecir la velocidad del crecimiento óseo a más largo plazo. Una explicación posible es la propia no-linearidad del crecimiento tibial (Hermanussen y cols. 1987, Wales y Milner 1987, Wit y cols. 1987, Wolthers 1996).

La knemometría ha servido de punto de partida para el desarrollo de otras técnicas que se basan, igualmente en la medida de la longitud tibial. Así apareció el miniknemómetro (Michaelsen y cols. 1991), que permite la medida de la pierna de niños recién nacidos mientras están tumbados, o el Kyniklómetro (Hermanussen y cols. 1992), que fue concebido para su utilización en la medida de longitud tibial en el conejo. La microknemometría (Hermanussen y cols. 1995), es la técnica empleada en esta tesis y se desarrolló especialmente para la medición de la longitud tibial en la rata. De forma similar a lo descrito en la técnica empleada con humanos, en la microknemometría además de la longitud de la tibia, se incluye la medida del tejido blando que recubre el hueso (Wit y cols. 1987) y las articulaciones adyacentes, la rótula, el grosor de la epífisis distal del fémur, y parte de la pezuña, astrágalo y calcáneo, (Hermanussen y cols. 1995, 1996), tal y como puede apreciarse en la figura 2.

Debido a su precisión, la microknemometría permite un seguimiento diario del crecimiento longitudinal de la tibia de la rata, y por tanto estudiar no sólo su patrón de crecimiento a corto y largo plazo, sino también su evolución bajo distintos regímenes experimentales y sin ningún tipo de efecto nocivo sobre el animal.

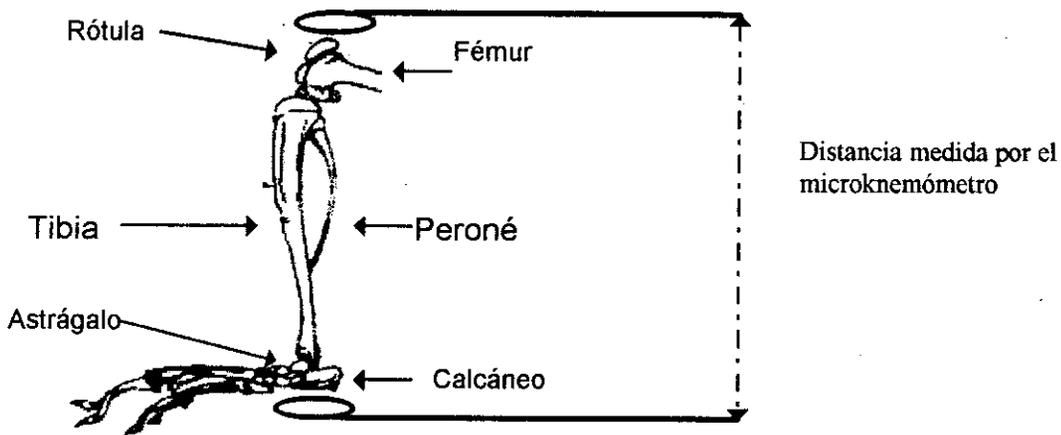


Figura 2. Esquema de la extremidad posterior de la ratona.

2. FACTORES QUE CONDICIONAN Y REGULAN EL CRECIMIENTO

Podríamos subdividir los factores que afectan al crecimiento en determinantes (genéticos), permisivos (nutricionales y ambientales), y reguladores (control neuroendocrino), también debemos considerar la respuesta de los órganos diana (Rodríguez-Hierro y Torres 1996).

❖ Factores genéticos

La talla del organismo adulto es uno de los rasgos genéticos que se heredan de forma multifactorial, estando implicados varios genes. No obstante, algunas patologías del crecimiento se corresponden con anomalías cromosómicas concretas, como por ejemplo la trisomía del cromosoma Y que lleva a una talla muy elevada, o la ausencia de brazos cortos en el cromosoma X que ocasiona una talla final baja (Orera 1996).

En humanos, el fondo genético que contribuye a la talla se conoce como “potencial genético de crecimiento” y se valora teniendo en cuenta la talla de los padres (Orera 1996). Que se logre o no ese potencial dependerá de los factores ambientales (Hernández-Rodríguez 1992), que actuarán de forma aditiva o negativa (Orera 1996). Todos estos factores son los responsables de la distinta talla existente entre las distintas poblaciones (Rodríguez-Hierro y Torres 1996, Orera 1996). Por otra parte, no sólo se hereda la talla final sino la velocidad de desarrollo y maduración (Hernández-Rodríguez 1992, Rodríguez-Hierro y Torres 1996).

❖ *Factores ambientales*

El clima, el nivel socioeconómico, o la urbanización, pueden afectar al crecimiento. Se sabe por ejemplo, que la velocidad de crecimiento se acelera en primavera y verano, y los niños de las ciudades crecen más deprisa (Hernández-Rodríguez 1992, Rodríguez-Hierro y Torres 1996). Sin embargo, resulta difícil disociar los factores enumerados de otros como los nutricionales, o las condiciones higiénico-sanitarias, que parecen ir en paralelo con la calidad de vida sobre todo en los países en vías de desarrollo, donde las diferencias sociales son más acentuadas. Por otra parte tampoco podemos separar la influencia del clima sobre una determinada población, que posee una carga genética específica.

❖ *Factores nutricionales*

La nutrición actúa sobre el crecimiento directamente al aportar los substratos que han de servir para la formación de los nuevos tejidos, e indirectamente modulando la secreción de GH e IGF I (Hernández-Rodríguez 1992).

La paralización del crecimiento por el aporte de un nivel bajo de proteínas o energía es una respuesta adaptativa a la supervivencia del individuo (Straus 1994), ya que el crecimiento se convierte en un lujo para el organismo, por lo menos a corto plazo.

Una nutrición incorrecta tiene mayores repercusiones en niños que en adultos, ya que los primeros se encuentran en pleno proceso de maduración y desarrollo, y la cantidad de nutrientes que necesitan dependen del ritmo de crecimiento que estén atravesando (Ariznavarreta 1996b).

❖ *Factores hormonales*

Estos factores son los que específicamente van a coordinar el proceso del crecimiento en función del potencial genético y de los factores ambientales. En la regulación del crecimiento intervienen numerosas hormonas y factores de crecimiento:

- Hormonas Tiroideas: El crecimiento se inhibe marcadamente en el hipotiroidismo (Devesa y Tresguerres 1996, Scanlon y cols. 1996) o en ratas jóvenes tiroidectomizadas (Goodman 1994). En ratas tiroidectomizadas la GH puede reiniciar el crecimiento pero no se consigue una tasa normal a menos que se administren también hormonas tiroideas (Goodman 1994). Por otra parte también intervienen en la regulación de GH, ya que la disminución de

hormonas tiroideas en la rata disminuye la transcripción de GH, el ARNm de GH, su síntesis y secreción (Scanlon y cols. 1996).

-Glucocorticoides: Se sabe que unos niveles crónicamente elevados de glucocorticoides (GC) bloquean el crecimiento somático y la liberación de GH (Argente y cols. 1996a, Scanlon y cols. 1996)

Los estudios *in vitro* han mostrado que los glucocorticoides estimulan la secreción de GH, su expresión y la del receptor para GHRH (Ohyama y cols. 1996). A nivel hipofisario la administración aguda de GC estimula la secreción de GH (Scanlon y cols. 1996, Goodman 1994), y a largo plazo aumentan la SS hipotalámica por activación de los receptores β adrenérgicos (Carrascosa y Audi 1996, Devesa y Tresguerres 1996). Otros autores (Ohyama y cols. 1996) sostienen que podrían actuar inhibiendo la expresión de GHRH. Además la dexametasona inhibe la expresión génica de IGF I (Rodríguez-Arao y Gomez-Pan 1996).

-Insulina: Es necesaria para mantener el crecimiento normal. En ratas pancreoectemizadas el tratamiento con GH estimula el crecimiento mientras se mantiene la dosis adecuada de insulina (Goodman 1994, Leung y cols. 1996). Además es un regulador positivo en la síntesis de IGF I (Straus 1994).

También es necesaria como mediadora de los efectos anabólicos de la GH, al aumentar el número de receptores para GH e IGF I (Goodman 1994, Ariznavarreta 1996a) con lo que regula la unión de GH en los tejidos periféricos (Harel y Tannenbaum 1995).

-Hormonas gonadales: En humanos, durante el desarrollo puberal y coincidiendo con un aumento en su secreción gonadal, se produce en ambos sexos una aceleración del crecimiento (estirón puberal). Tras este pico en la velocidad de crecimiento, comienza un proceso decelerativo a medida que los niveles plasmáticos de las hormonas gonadales son más elevados, y acaba con la osificación de los cartilagos de conjunción (Carrascosa y Audi 1996, Tresguerres 1996a). Los esteroides gonadales intervienen en la regulación del crecimiento tanto a nivel hipotalámico, modulando la secreción de GH, como a nivel del propio cartilago de crecimiento (Goodman 1994, Carrascosa y Audi 1996). Existe dimorfismo sexual en la secreción de GH, y el condicionamiento masculino o femenino del tipo de secreción espontánea de GH parece establecerse en el período fetal (Tresguerres 1996a).

Por otra parte la testosterona tiene una marcada acción anabolizante aumentando la síntesis de proteínas y manteniendo un balance nitrogenado positivo, fundamentalmente en el músculo (Guyton y Hall 1996), con lo que aumenta la masa muscular (Woodward 1993). Los estrógenos también producen un ligero aumento en las proteínas totales del organismo, pero menos marcado, y provocan un aumento del depósito de grasa en los tejidos subcutáneos (Guyton y Hall 1996).

Sin embargo de todas las hormonas que intervienen se considera que la GH es uno de los agentes primordiales en la regulación del crecimiento, por lo que dada su importancia desarrollamos con más detalle el eje somatotropo a continuación.

3. EJE SOMATOTROPO.

3.1 Hormona de crecimiento (GH)

Es una hormona adenohipofisaria que se produce y se almacena en las células somatotropas (Cutler 1996).

❖ *Estructura:*

El 90% de la GH secretada por las células somatotropas es un péptido de 191 aminoácidos con un peso molecular de 22 Kd. El 10% restante es un péptido de 20 Kd (Goodman 1994).

Actualmente se sabe que la GH en realidad, son un conjunto de péptidos generados por un conjunto de genes de GH, localizados en el cromosoma 17 en el caso de los humanos. De ese conjunto, el gen GH-N o GH 1 parece ser el que se expresa en la hipófisis, aunque otro gen (el GH-V) podría también expresarse (Devesa y cols. 1996). Existe un factor de transcripción Pit-1 (Pituitary-1), que se expresa de forma exclusiva en la células productoras de GH, y que es el principal factor implicado en el control transcripcional del gen GH-N (Bertherat y cols. 1995). A partir del gen GH-N se genera un pre-ARNm cuyo procesamiento alternativo genera dos ARNm que dan lugar a la síntesis de las formas de 20 y 22 Kd (Barrios y Argente 1994, Devesa y cols. 1996). Clásicamente se considera que la forma fisiológicamente activa es la de 22 Kd.

❖ *Proteína ligante (GHBP) y Receptor (GHR):*

Existen dos proteínas transportadoras de GH, una de alta afinidad y baja capacidad y otra de baja afinidad y alta capacidad. La primera, es una glucoproteína que se une fundamentalmente a la GH de 22 Kd y transporta el 45-50% de la hormona circulante. La proteína ligante de baja afinidad no parece estar implicada en la fisiología del crecimiento (Barrios y Argente 1994, Devesa y cols. 1996), por lo que nos referiremos a la de alta afinidad.

El receptor de GH es una única cadena de aminoácidos con un único dominio transmembrana (Nyberg y Burman 1996). En la rata la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del receptor hepático de GH, es prácticamente idéntica a la proteína ligante de alta afinidad (Maes y cols. 1991). Los datos bibliográficos describen que en ratas y ratones la GHBP y el receptor de GH parecen producirse por el procesamiento alternativo de un mismo ARNm, mientras que en humanos la GHBP se produce a partir del receptor de GH por rotura proteolítica de su dominio extracelular (Barrios y Argente 1994, Ketelslegers y cols. 1996, Clark y cols. 1996b, Oster y cols. 1996). Por tanto, en humanos, los niveles del receptor hepático se correlacionan bien con los niveles circulantes de la GHBP (Gevers y cols. 1996b, Ketelslegers y cols. 1996, Oster y cols. 1996), mientras que en roedores podrían regularse independientemente a nivel transcripcional (Clark y cols. 1996b).

Parece ser que también existen diversos tipos de receptores para GH con distintas afinidades. Cada molécula de GH se une a dos moléculas del receptor, tras la cual, los dominios extracelulares forman un dímero. Esta dimerización es necesaria para activar una proteína asociada al receptor, la Janus Cinasa 2 (JAK-2), con actividad tirosina cinasa, que se fosforila a sí misma y al receptor, desencadenándose una cascada de fosforilaciones en proteínas intracitoplasmáticas (Roupas y Herington 1994, Nyberg y Burman 1996). Parece que las acciones lipolíticas de la GH se llevarían a cabo por la vía de una proteína cinasa C, (Roupas y Herington 1994, Devesa y cols. 1996). También parece que puede existir otro mecanismo de transducción de señal a través del aumento del calcio intracelular. Por otra parte, existe una internalización del complejo hormona-receptor en un endosoma, que podría ser entonces traslocado al núcleo (Devesa y cols. 1996, García Barros 1996).

Los niveles de GHBP en plasma no se encuentran modificados en la acromegalia o en el déficit de GH en humanos (Barrios y Argente 1994), aunque datos más recientes apuntan que los niveles de GHBP se encuentran disminuidos en niños con talla baja idiopática (Clark y

cols. 1996b). En la rata no se encuentran cambios en el receptor de GH o el ARNm de la GHBP por el tratamiento intermitente con GH o con IGF I (Domené y cols. 1993). Sin embargo, tanto el receptor como los niveles de la proteína ligante aumentan con la exposición continua a GH, por lo que parece regulados, más que por los picos de secreción de GH, por sus niveles basales (Clark y Robinson 1996, Gevers y cols. 1996b). Estos mismos autores proponen que la modulación sobre la GHBP y el GHR podría incidir en la generación de distintos tipos de mecanismos de transducción de señal, y que los niveles basales de GH tendrían más relación con las acciones metabólicas de la GH, mientras que el crecimiento lo estaría con los picos.

En la rata tanto el receptor hepático como la proteína ligante disminuyen en las situaciones de ayuno, por lo que se regulan por la nutrición (Ketelslegers y cols. 1996). En humanos, también parecen regularse negativamente por la testosterona (Barrios y Argente 1994); en la rata tanto la GHBP como la cantidad del receptor de GH es más alta en la hembra que en el macho (Gevers y cols. 1996b, Ketelslegers y cols. 1996).

La GHBP puede aumentar la vida media de la GH y disminuir su degradación, siendo un reservorio de la hormona. Puede competir con el receptor por la unión con la GH (Counts y cols. 1992, Clark y cols. 1996b, Oster y cols. 1996), pero la afinidad del receptor de GH por la hormona es algo superior, así la GH puede ser cedida al receptor (Barrios y Argente 1994).

En general, el papel de la GHBP sería fundamentalmente estimulador de las acciones de la GH (Clark y cols. 1996b, Ketelslegers y cols. 1996). Podría estar modulando la concentración de GH que accede a las células diana durante los episodios secretores de GH (Barrios y Argente 1994, Gevers y cols. 1996b).

❖ *Acciones biológicas:*

La GH a nivel metabólico actúa como una hormona anabolizante, lipolítica y diabetógena (Isaksson y cols. 1987).

Activa prácticamente todos los procesos implicados en la síntesis proteica, desde la captación de aminoácidos, y la transcripción de ARNm, hasta la actividad enzimática, lo cual es clave para el crecimiento. Las acciones anabolizantes se dan en casi todos los tejidos pero es en el hígado y el músculo donde alcanza su mayor expresión (Barrios y Argente 1994, Devesa y cols. 1996). También ejerce un efecto sobre los triglicéridos de reserva,

desdoblándolos en glicerol y ácidos grasos, con posterior oxidación de éstos (Goodman y cols. 1990), consiguiendo la energía necesaria para la síntesis proteica (Devesa y cols. 1996).

La administración de GH a animales hipofisectomizados, induce una rápida caída de la glucemia y de los niveles de ácidos grasos libres, es decir presenta acciones similares a la insulina. Sin embargo un tratamiento prolongado se asocia con hiperglucemia y aumento del catabolismo de las grasas, acciones opuestas a las de la insulina (Isaksson y cols. 1987, Barrios y Argente 1994).

La GH parece tener acciones órgano dependientes, ya que en ratones transgénicos para GH, hay un aumento no proporcional al peso corporal del tamaño del hígado, del bazo y en menor medida del riñón (Spagnoli y Rosenfeld 1996).

Pero su acción más importante es a nivel del crecimiento, sobre todo a nivel del cartilago (Ver apartado 4.2). La GH interviene en la formación del hueso, aumentando su metabolismo directa o indirectamente, estimulando su resorción (Palmer y cols. 1994, Gevers y cols. 1996a) y estimulando la aposición perióstica (Martínez y cols. 1996).

3.1.1 Regulación de la secreción de GH

La secreción de GH es pulsátil, declina gradualmente con la edad (Edén 1979, Handelsman y cols. 1987), y depende de la acción de dos péptidos hipotalámicos, que por la circulación portal alcanzan la glándula hipofisaria estimulando (GHRH) o inhibiendo (SS) su secreción (Peñalva y cols. 1994, Argente y cols. 1996a, Chan y cols. 1996a).

3.1.1.1 GHRH

La GHRH promueve la transcripción del gen de GH (Jansson y cols. 1985b, Hu y cols. 1993, Peñalva y cols. 1994, Clark y Robinson 1996) e induce su secreción. También tiene efectos mitogénicos sobre las células somatotropas (Hu y cols. 1993, Peñalva y cols. 1994), promoviendo su diferenciación y crecimiento.

Se presenta en humanos bajo dos formas, de 40 y 44 aminoácidos, con actividad biológica similar (Devesa y Tresguerres 1996), en la rata tiene 43 aminoácidos (Peñalva y cols. 1994). Tras unirse al receptor, que está acoplado a proteínas G estimuladoras, (Gs), la GHRH desencadena un aumento en el AMPc, el cual estimula la expresión y la secreción de

GH, y la activación de la proteína cinasa A (PKA), (Bertherat y cols. 1995). También promueve la movilización de calcio causando la exocitosis de la GH (Cutler 1996).

Ya que la actividad biológica de la GHRH reside en los primeros 29 aminoácidos (Peñalva y cols. 1994), se han desarrollado péptidos sintéticos, como el que nosotros utilizamos, que poseen la misma potencia que las formas naturales (Devesa y Tresguerres 1996).

La localización más abundante de los cuerpos neuronales de la neuronas GHRHérgicas se encuentran en los núcleos arcuato y ventromedial del hipotálamo. Las neuronas del núcleo arcuato proyectan sus axones a la eminencia media donde descargan en el sistema porta-hipotálamo-hipofisario (Devesa y cols. 1992, Cutler 1996).

3.1.1.2 Somatostatina (SS)

La SS inhibe la liberación de GH (Peñalva y cols. 1994), tanto basal como tras estimulación con GHRH (Cutler 1996), y antagoniza el efecto mitogénico de la GHRH (Hu y cols. 1993, Devesa y Tresguerres 1996). Se presenta bajo dos formas de 14 ó 28 aminoácidos. Su efecto sobre la síntesis de GH no está claro: se ha descrito tanto que inhibe el aumento de transcripción genómica dependiente de GHRH (Devesa y Tresguerres 1996) como lo contrario (Clark y cols. 1988, Sugihara y cols. 1993, Clark y Robinson 1996, Cutler 1996). Tiene múltiples acciones como neurohormona, neurotransmisor y modulador paracrino.

La mayor concentración de cuerpos neuronales se encuentra en el núcleo periventricular (Devesa y cols. 1992), que proyectan sus axones a la eminencia media y hacia el núcleo arcuato. También existen neuronas somatostatinérgicas en el núcleo arcuato, donde la SS parece actuar como neurotransmisor.

Su mecanismo de acción se basa en una disminución de la entrada de calcio en la célula y en un aumento de la conductancia al potasio, el cual ocasiona una hiperpolarización de la membrana (Devesa y Tresguerres 1996). Por otro lado la unión de la SS a su receptor activa una proteína G inhibidora, (Gi), que causa una disminución en la actividad adenilato ciclasa, por lo que descienden los niveles de AMPc (Cutler 1996) e inhibe la regulación positiva de la actividad PKA ejercida por la GHRH (Bertherat y cols. 1995).

3.1.1.3 INTERACCIÓN GHRH/SS

Ambos péptidos se secretan de forma periódica desde la eminencia media a la circulación portal, con un desfase de 180 °, y en la rata macho se liberan en ciclos cada 3-4 horas (Plotsky y Vale 1985, Painsón y Tannenbaum 1991, Zeitler y cols. 1991). De su acción coordinada resulta la secreción pulsátil de GH (Plotsky y Vale 1985, Painsón y Tannenbaum 1991, Hu y cols. 1993, Turner y Tannenbaum 1995)(figura 3).

Se postula que el pico secretor de GH se debe a la coincidencia de un pico de GHRH y un valle de SS, mientras que lo contrario suprime la secreción de GH (Plotsky y Vale 1985, Painsón y cols. 1992, Turner y Tannenbaum 1995, Argente y cols. 1996a, 1996b, Scanlon y cols. 1996). Así los picos de GH se deberían a la GHRH, mientras que los niveles basales estarían regulados por la SS (Jansson y cols. 1985b, Zeitler y cols. 1991, Turner y Tannenbaum 1995, Gevers y cols. 1996b). Sin embargo, basta con la existencia de secreción pulsátil de la SS para que haya picos de secreción de GH, ya que la infusión continua exógena de GHRH mantiene un patrón de secreción de GH pulsátil (Devesa y cols. 1992, Devesa y Tresguerres 1996).

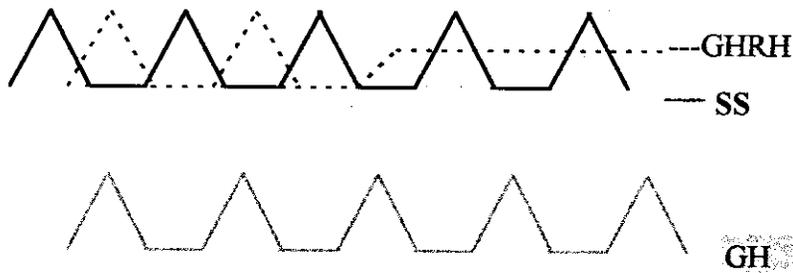


Figura 3. Esquema de la posible secreción de GHRH y SS . Modificada de Devesa y Tresguerres (1996).

Se ha visto mediante estudios *in vitro* que una de las funciones de la SS sería bloquear temporalmente la liberación de GH, permitiendo que se acumule en la hipófisis. De esta forma existe una mayor cantidad de GH para ser liberada en respuesta a la GHRH (Clark y Robinson 1988, Lima y cols. 1993, Turner y Tannenbaum 1995, Clark y Robinson 1996).

No obstante, la naturaleza de la interacción entre la GHRH y la SS no ha sido desvelada, aunque se postula una comunicación intrahipotalámica estrechamente regulada (Zeitler y cols. 1991, Scanlon y cols. 1996), y se sugiere que la SS regula negativamente la secreción de GHRH (Lima y cols. 1993). Esta afirmación se basa en que los axones de las

neuronas somatostatinérgicas, que se proyectan al núcleo arcuato, establecen conexión con las dendritas y somas de las neuronas GHRHérgicas. De hecho hay receptores para SS en la neuronas GHRHérgicas (Zeitler y cols. 1991, Bertherat y cols. 1995, Slama y cols. 1996) (figura 4).

Además la SS parece tener una retroalimentación negativa ultracorta, ya que su administración icv se interpreta como una señal para el bloqueo de secreción de SS endógena, lo que lleva a un aumento en la secreción de GH (Clark y cols. 1988, Devesa y Tresguerres 1996).

Por otra parte existe un control por la propia GH de tal forma que ésta estimula la síntesis y secreción de SS e inhibe la síntesis y secreción de GHRH (Becker y cols. 1995, Chan y cols. 1996a). No está claro si la acción de la GH es directa o medida por la IGF I (Bertherat y cols. 1995, Becker y cols. 1995).

Algunos autores (Sato y Frohman 1993), encontraron que la administración icv de GH disminuía el ARNm de GHRH, sin modificar la cantidad de ARNm de SS. Por otro lado la IGF I sí disminuía el ARNm de GHRH y aumentaba el de SS. Cabe la posibilidad de que este efecto sea específico del modelo utilizado (Becker y cols. 1995) y no excluye otros efectos sobre la liberación.

Sin embargo y aunque el receptor de GH se encuentra expresado en el núcleo periventricular y en el núcleo arcuato (Chan y cols. 1996a, Pellegrini y cols. 1996), son pocas las neuronas de GHRH y SS en el núcleo arcuato que expresan el receptor de GH, por lo que los efectos de la GH en el núcleo arcuato podrían ser transducidos a través de otras neuronas, como por ejemplo las productoras del NPY (Chan y cols. 1996a). Saber si el NPY está implicado en la regulación de GH, y como llega la señal a las neuronas GHRHérgicas y somatostatinérgicas necesita estudios posteriores.

El ARNm del receptor de GH se colocaliza en un 69% de las neuronas con ARNm de SS del núcleo periventricular, y la inyección icv de un oligonucleótido antisentido del GHR, disminuye el ARNm de SS en el núcleo periventricular, sin afectar el ARNm de GHRH, aumentando la secreción de GH (Pellegrini y cols. 1996). Esto parece indicar que los receptores de GH se encuentran directamente envueltos en la regulación de las neuronas somatostatinérgicas del núcleo periventricular, aunque no está claramente establecida la capacidad de la GH para atravesar la barrera hematoencefálica (Pellegrini y cols. 1996). Otros autores (Chan y cols. 1996a, 1996b, Clark y Robinson 1996, Scanlon y cols. 1996) afirman

que la GH ejerce un efecto directo sobre las neuronas somatostatinérgicas estimulando su síntesis y/o secreción (figura 4).

Por otra parte, la IGF I está implicada en la retroalimentación negativa de la GH (Berelowitz y cols. 1981), ya que inhibe la secreción de la GH actuando a nivel hipofisario e hipotalámico (Berelowitz y cols. 1981, Hu y cols. 1993, Becker y cols. 1995, Scanlon y cols. 1996). A nivel hipofisario inhibe la expresión de GH (Cutler 1996), tanto basal como estimulada por GHRH (Bertherat y cols. 1995) y por el Pit 1, reduciendo además la exocitosis de GH (Scanlon y cols. 1996). A nivel hipotalámico aumenta el ARNm de SS, y disminuye el de GHRH, afectando de igual forma su liberación (Becker y cols. 1995). De hecho se han descrito receptores para la IGF I tanto en hipófisis como en hipotálamo (Tresguerres 1996b).

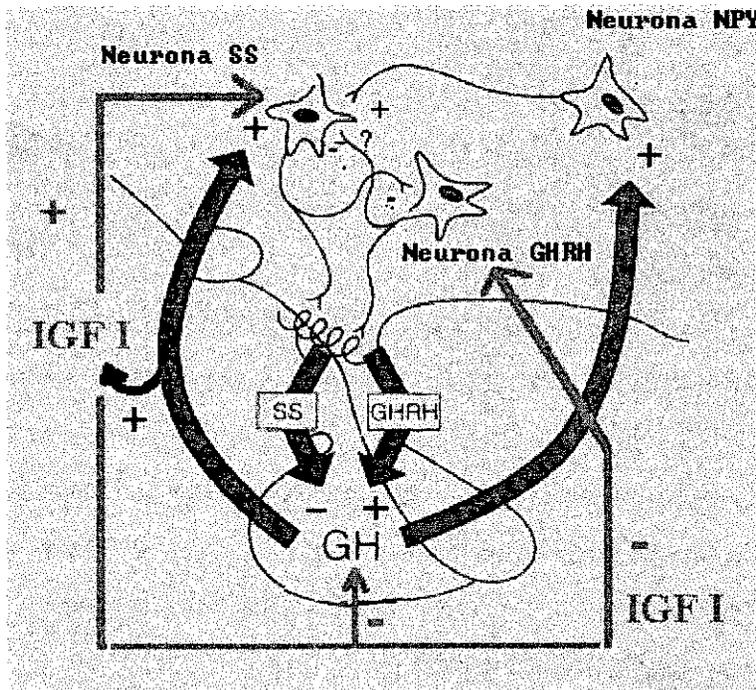


Figura 4. Modelo hipotético de control negativo de la GH sobre su propia secreción. Modificado de Chan y cols. 1996a.

Sin embargo, la fuente de IGF I es un aspecto sujeto a controversia. Se detecta ARNm de IGF I en el hipotálamo que además responde a la administración exógena de GH lo que se apoyaría su origen local (Becker y cols. 1995). La falta de efecto a nivel hipotalámico de la administración sistémica de IGF I corroboran su origen local (Sato y Frohman 1993).

3.1.1.4 NEUROTRANSMISORES Y OTROS PÉPTIDOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE GH.

❖ *Vías adrenérgicas*

Su estímulo parece que actúa inhibiendo la secreción de SS, a través de receptores de tipo α_2 , (Devesa y cols. 1992, Becker y cols. 1995, Devesa y Tresguerres 1996). La disminución de la secreción de la SS podría acompañarse, secundariamente, de un aumento en la liberación de GHRH (Lima y cols. 1993, Bertherat y cols. 1995). Sin embargo, otros autores mantienen que el estímulo de los receptores de tipo α_2 , aumenta directamente la liberación de GHRH (Maszak y cols. 1995, Argente y cols. 1996a) (figura 5).

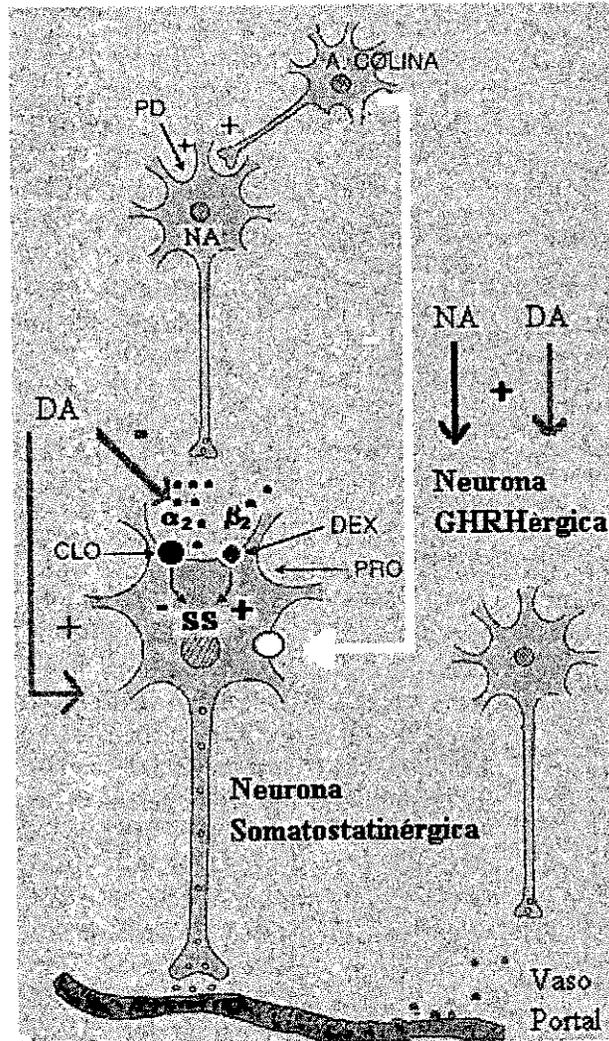


Figura 5. Esquema de la regulación de la secreción de SS y GHRH. Modificada de Devesa y Tresguerres 1996.

Cuando los niveles de NA son bajos se estimularían receptores de tipo β_2 , en las neuronas somatostatinérgicas, llevando a un aumento de la liberación de SS (Devesa y cols. 1992, Argente y cols. 1996a, Devesa y Tresguerres 1996)

❖ Vías colinérgicas

Actúan a través de receptores muscarínicos inhibiendo la secreción de la SS (Bertherat y cols. 1995, Scanlon y cols. 1996). Según otros autores (Devesa y cols. 1992, Lima y cols. 1993, Devesa y Tresguerres 1996) existiría una jerarquía donde la primacía se debería a las vías adrenérgicas con lo que el efecto de las vías colinérgicas sería modulador o estimulante presináptico de las vías adrenérgicas.

❖ Vías dopaminérgicas

Se han descrito efectos tanto estimulantes como inhibitorios sobre la secreción de GH. La dopamina estimula la secreción tanto de SS como de GHRH (Bertherat y cols. 1995), pero su acción sobre la GHRH necesita que los niveles de SS sean bajos. Existe biosíntesis de DA en la neuronas GHRHérgicas, de tal forma que se podría liberar conjuntamente con esta hormona y estimular la SS directamente o bien modular negativamente la disponibilidad de noradrenalina (Devesa y cols. 1992, Lima y cols. 1993, Devesa y Tresguerres 1996). Podría entonces contribuir a establecer una interacción entre las neuronas GHRHérgicas y somatostatinérgicas (Devesa y Tresguerres 1996).

❖ La *Serotonina* podría estimular la GHRH, aunque su papel no está muy claro, y el *GABA* parece actuar bloqueando la liberación de SS (Devesa y Tresguerres 1996).

❖ *Péptidos opióides*: estimulan la secreción de GH mediante el estímulo de la GHRH (Peñalva y cols. 1994, Bertherat y cols. 1995). Por otra parte las neuronas somatostatinérgicas están inervadas por neuronas que contienen péptidos derivados de la POMC (Bertherat y cols. 1995).

❖ *Galanina*: estimula la secreción de GH, disminuyendo el tono somatostatinérgico (Argente y cols. 1996a), que se acompaña de una estimulación de la secreción de GHRH (Bertherat y cols. 1995). Se colocaliza con las neuronas GHRHérgicas y presenta dimorfismo sexual, siendo su ARNm más abundante en los machos (Maszak y cols. 1995). Su expresión aumenta por efecto de la SS (Chan y cols. 1996b).

- ❖ *Neuropéptido Y (NPY)*: inhibe la secreción de GH (Gruenewald y cols. 1996).
- ❖ *Activina*: disminuye la unión de Pit-1 al promotor de GH e inhibe el aumento de AMPc inducido por GHRH (Bertherat y cols. 1995, Lago y cols. 1996).
- ❖ *PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria)*: Es similar a la GHRH ya que también estimula la secreción de GH, pero no se conoce con claridad su papel en dicha regulación (Argente y cols. 1996a, Devesa y Tresguerres 1996).
- ❖ *GHRPs*: son hexapéptidos sintéticos que estimulan la liberación de GH (Clark y Robinson 1996). No son homólogos a la GHRH, y son más potentes que este péptido hipotalámico. De hecho no se unen al receptor de GHRH. Podrían actuar directamente sobre la neuronas GHRHérgicas o neuronas somatostatinérgicas o modular otros factores hipotalámicos que influyen indirectamente la secreción de GH (Argente y cols. 1996b).

3.1.1.5 FACTORES METABÓLICOS Y REGULACIÓN DE GH.

Ya que la GH es un importante regulador metabólico, su secreción se modula por algunos metabolitos: se inhibe por el aumento de la glucosa, y por el aumento de ácidos grasos libres, probablemente por estímulo de la secreción de SS, aunque en este último caso también podría tener un efecto directo a nivel hipofisario (Devesa y Tresguerres 1996, Scanlon y cols. 1996). También la arginina y la ornitina, aminoácidos esenciales, son potentes estimuladores de la GH (Devesa y cols. 1992, Lima y cols. 1993).

3.2 IGF I o somatomedina C

La IGF I es una hormona que se sintetiza preferentemente en el hígado, también se produce localmente en muchos tejidos (Daughaday y Rotwein 1989), como en el cartílago de crecimiento de los huesos largos. La transcripción del gen de IGF I se estimula por GH (Daughaday y Rotwein 1989, Straus 1994). Su similitud estructural con la insulina y su papel en el crecimiento dieron origen a su nombre *Insulin Like Growth Factor*.

❖ *Estructura:*

La IGF I es un péptido básico de 70 aminoácidos, con una estructura muy conservada ya que la IGF I de rata y la de humanos sólo difieren en 3 aminoácidos (Daughaday y Rotwein 1989).

La IGF II es un péptido ligeramente ácido de 67 aminoácidos que en la rata difiere en 5 aminoácidos de la secuencia en humanos (Daughaday y Rotwein 1989). En la rata prácticamente no se expresa en el período postnatal (Nilsson y cols. 1994), salvo en los plexos coroideos y las meninges, por lo que sus niveles en plasma son prácticamente indetectables (Daughaday y Rotwein 1989, Straus 1994). Por el contrario, en humanos adultos, los niveles plasmáticos de IGF II son 2 ó 3 veces superiores a los de IGF I (Tresguerres 1996b).

Ambos péptidos presentan un 70% de homología con la insulina, y presentan acciones insulin-like, por lo que son hipoglucemiantes y antilipolíticos (Froesch y cols. 1990). Se sintetizan en múltiples tejidos y se secretan inmediatamente después de su síntesis (Thissen y cols. 1994).

En vista de que la IGF II no parece jugar ningún papel importante en el desarrollo somático postnatal de roedores (Stewart y Rotwein 1996), nos centraremos principalmente en describir la IGF I.

Los niveles de la IGF I disminuyen con la edad, tanto en humanos como en animales (Tresguerres 1996a). Existe un aumento puberal en los niveles de IGF I tanto en humanos como en la rata (Handelsman y cols. 1987, Daughaday y Rotwein 1989). En la rata los niveles de IGF I aumentan a partir de los 42 días de vida, alcanzando unos valores máximos hacia los 56 días (Handelsman y cols. 1987, Gabriel y cols. 1992).

❖ *Proteínas ligantes:*

Hasta el momento se han caracterizado 6 IGFBPs (Stewart y Rotwein 1996).

Menos del 5% de la IGF I en plasma circula libre y más de un 90% está unida a un complejo ternario de 150 Kd, formado por la IGF I o la II, la IGFBP3 y una subunidad ácido lábil, la ALS (Thissen y cols. 1994).

La IGFBP 3 se considera la mayor reserva de IGF I (Gargosky y cols. 1994), y actúa como un sistema de tampón, (Tresguerres 1996b), no atraviesa el endotelio, y prolonga la

vida media de la IGF en plasma (Thissen 1994). Se regula fundamentalmente por la GH, que induce su expresión en el hígado (Stewart y Rotwein 1996), aunque también por la IGF I (Domené y cols. 1993, Gargosky y cols. 1994) y es dependiente de la edad (Gargosky y cols. 1994).

En el caso de humanos aumenta con el desarrollo puberal pero de forma menos marcada que la IGF I con lo que aumenta la proporción de IGF I libre (Tresguerres 1996a). En general tiene un papel estimulador de las acciones biológicas de la IGF I. Sin embargo, la IGF I presenta mayor afinidad de unión con la IGFBP3 que con su receptor, por lo que si existe un exceso de esta proteína ligante se inhibe la acción de la IGF I al impedir la unión a su receptor (Jones y Clemmons 1995).

La ALS es una glicoproteína cuya expresión y secreción se estimula por la GH y no por la IGF I, siendo el hígado la fuente principal de producción. Sus niveles séricos van aumentando hasta que se alcanza la edad adulta tanto en la rata como en humanos (Dai y Baxter 1994, Stewart y Rotwein 1996).

La unión para la formación del complejo ternario es secuencial, primero se forma el complejo IGF-IGFBP 3 y luego se une la ALS; como la ALS depende de la GH y no de la IGF I, es la GH la que estimula la formación del complejo ternario en la rata (Gargosky y cols. 1994, Fielder y cols. 1996). De esta forma la GH tendría un control preciso sobre este almacén de IGF-I (Jones y Clemmons 1995).

La IGFBP 1 se inhibe por la insulina y la glucosa (Nogami y cols. 1994) y une los dos tipos de IGFs con igual afinidad (Tresguerres 1996b). La IGFBP 2 tiene preferencia por la IGF II y ambas parecen inhibirse por la GH (Tresguerres 1996b). La IGFBP 4 parece tener un papel protector de la posible sobrestimulación por la IGF I, ya que inhibe todas las acciones de la IGF I (Jones y Clemmons 1995). Recientemente, se ha descrito la existencia en el ovario de las IGFBP 5 y 6, que unen fundamentalmente IGF II y tienen menos relación con la GH (Tresguerres 1996b).

Las proteínas ligantes (BPs) de pequeño peso molecular, (como la 1, la 2 y la 4), pueden atravesar la barrera endotelial y transportar las IGFs de la circulación a los tejidos, mientras que la IGFBP 3 sería principalmente responsable de mantener los niveles de IGF en la circulación. De esta forma se podría modular la interacción de la IGF con su receptor, regulando su disponibilidad y por tanto sus acciones biológicas (Ketelslegers y cols. 1996,

Stewart y Rotwein 1996). Parece que las funciones locales de las BPs se modulan por interacciones con la matriz extracelular y con la superficie celular (Jones y Clemmons 1995).

Por ejemplo: en el déficit de GH, la restricción de proteínas o en el ayuno, disminuye la proporción de IGF unida a la IGFBP 3 con respecto a la unida a las proteínas de bajo peso molecular, lo que llevaría a acortar su vida media (Jones y Clemmons 1995). No se sabe como afectan estas redistribuciones al crecimiento, pero sí parece claro que cuanto más IGF I está unida al complejo ternario el animal crece mejor (Fielder y cols. 1996).

❖ *Receptores:*

Están presentes en prácticamente todos los tipos celulares (Thissen y cols. 1994). Existen dos tipos de receptores: el tipo I que une sobre todo IGF I, aunque también insulina e IGF II, y el tipo II que tiene más afinidad por la IGF II y muy débil por la insulina (Thissen y cols. 1994, Tresguerres 1996b).

El receptor de IGF I (IGF-IR) es una proteína heterotetramérica, con dos subunidades de unión (α) y dos subunidades transmembrana (β) (Stewart y Rotwein 1996), y es estructuralmente homólogo al receptor para insulina (Straus 1994). Tiene actividad tirosina cinasa (Tresguerres 1996b), y desencadena una cascada de señales similar a la que ocurre tras la fosforilación del receptor de insulina (Jones y Clemmons 1995). Se encuentra principalmente en células de origen mesenquimático como fibroblastos, condrocitos y osteoblastos (Straus 1994). Este receptor es el que media las acciones biológicas de las IGFs (Jones y Clemmons 1995).

El receptor tipo II es una sola cadena transmembrana, que además de unir IGF II, presenta 2 regiones que unen proteínas con residuos de manosa-6 fosfato; parece implicado en el aclaramiento de IGF II (Stewart y Rotwein 1996) y no une insulina (Jones y Clemmons 1995).

Dada su similitud existen receptores híbridos del IGF-IR y el de insulina, están formados por la unión de dos mitades $\alpha\beta$ de cada receptor, y se encuentran en numerosos tejidos. Estos receptores híbridos tienen alta afinidad por la IGF I y menos por la insulina, y probablemente presenten propiedades de transducción de señal intermedias (Stewart y Rotwein 1996), aunque todavía no se sabe su función fisiológica (Jones y Clemmons 1995).

❖ *Acciones biológicas:*

Se sabe que la IGF I *in vitro* es un mitógeno en un amplio abanico de tipos celulares, y promueve la diferenciación de mioblastos, osteoclastos, osteoblastos, condrocitos, células neurales, y adipocitos. También estimula la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular, sobre todo colágeno y proteoglicanos, en condrocitos y osteoblastos. Por otra parte, estimula la secreción de las células de Leydig, de las células tecaes y de las células de la granulosa ovárica, así como de las células foliculares tiroideas (Jones y Clemmons 1995).

Tiene acciones agudas similares a la insulina ya que promueve la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno en el músculo esquelético, estimula en general, la síntesis proteica (Jones y Clemmons 1995). Los estudios *in vivo* también han demostrado que se produce una disminución en la glucemia por infusión con IGF I (Tresguerres 1996b).

La IGF I promueve tanto la ganancia de peso como el crecimiento, y produce un efecto mayor que la GH sobre el tamaño del hígado, el timo y el riñón cuando se administra exógenamente (Jones y Clemmons 1995).

La síntesis local de IGF I en muchos tejidos (cartilago de crecimiento, ovario, riñón) estaría en parte regulada por la GH, pero no en todos los casos, como por ejemplo en el útero (Jones y Clemmons 1995).

4. ÓRGANO DIANA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CARTÍLAGO DE CRECIMIENTO.

El órgano diana del crecimiento es el cartilago de crecimiento o de conjunción, que mediante el proceso de osificación endocondral permite la elongación de los huesos largos. El cartilago de crecimiento se divide longitudinalmente en varias zonas (figura 6), cada una de las cuales presenta condrocitos en distintos estadios (Poirier 1985, Burkitt y cols. 1993, Ariznavarreta 1996a, Rodríguez-Hierro y Torres 1996):

♦ Zona germinal, o de reserva: En esta zona se encuentran las células progenitoras o precursoras. Los condrocitos están dispuestos en pequeños racimos, rodeados de una gran cantidad de matriz y se dividen con poca frecuencia (Nilsson y cols. 1994). El colágeno es de tipo II, que tiene la propiedad de no permitir la calcificación (Ohlsson y cols. 1993).

♦ Zona proliferativa: Los racimos de células experimentan continuas divisiones mitóticas para formar columnas de condrocitos, paralelas al eje longitudinal del hueso, separadas por una matriz rica en proteoglicanos. En esta capa ocurre la mayoría de la replicación celular.

♦ Zona de maduración: cesa la división celular y los condrocitos aumentan de tamaño.

♦ Zona de hipertrofia y calcificación: Los condrocitos son muy grandes y vacuolados, su citoplasma acumula glucógeno y la matriz extracelular se calcifica. El colágeno tipo II es reemplazado por colágeno tipo X, único en el cartílago precalcificado y calcificado.

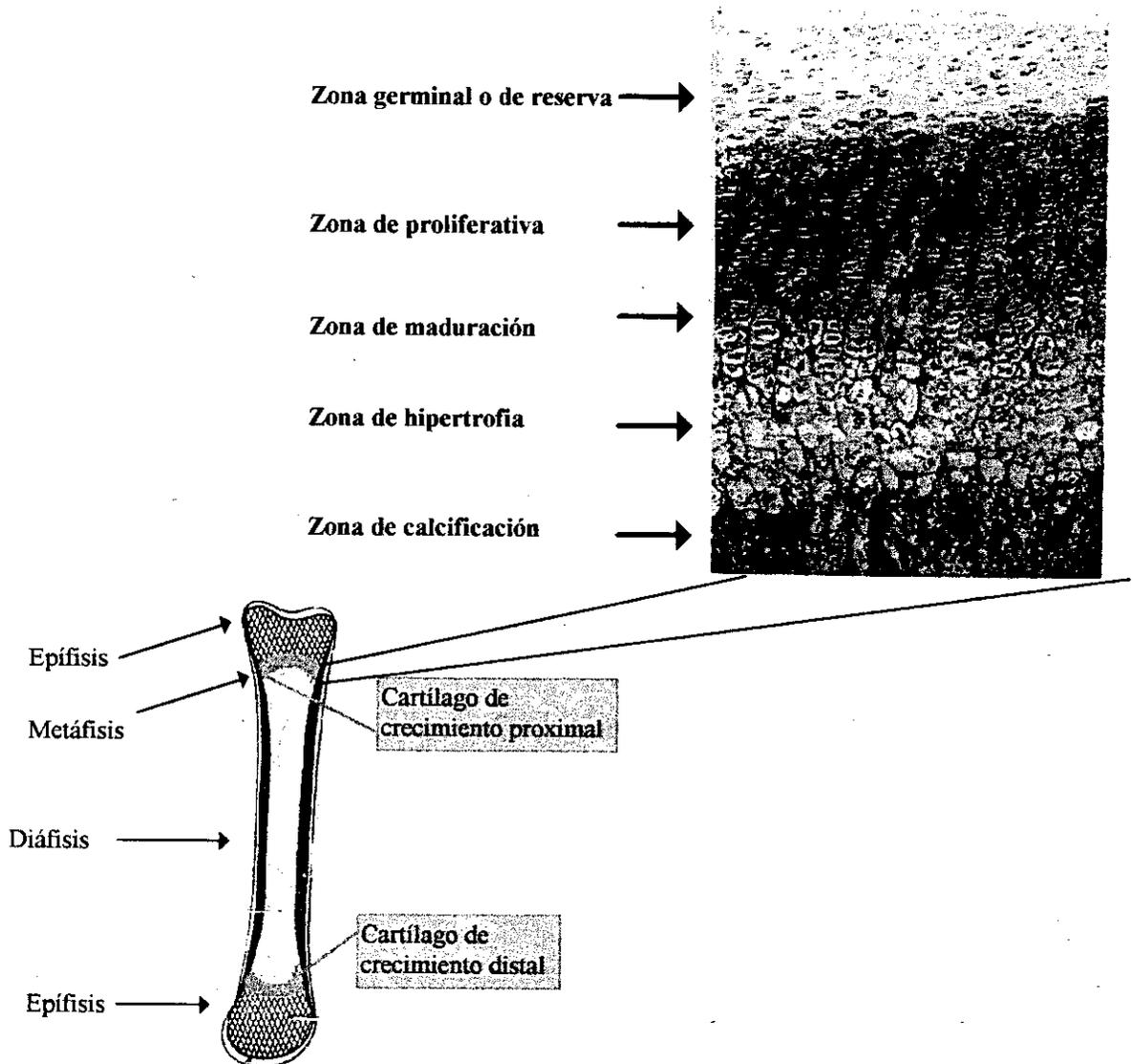


Figura 6. Esquema de las regiones anatómicas en un hueso largo y zonas del cartílago de crecimiento.

♦ Zona de degeneración del cartilago: Los condrocitos degeneran y las lagunas en la matriz calcificada son invadidas por capilares y células osteogénicas desde la cavidad medular de la diáfisis. Unas células se diferencian a células hematopoyéticas y otras a osteoblastos.

♦ Zona osteogénica: Los osteoblastos se acumulan en la superficie de los restos calcificados de la matriz cartilaginosa y comienza la formación del tejido osteoide. Esta zona transicional se conoce como metáfisis.

4.1 Osificación endocondral

La osificación endocondral es el resultado de los procesos que tienen lugar a nivel del cartilago y que comportan la maduración del mismo, hasta la formación del hueso.

Las células de la zona de reserva son reclutadas a la zona proliferativa, donde después de un número de divisiones, entran en una zona de diferenciación donde se hipertrofian, y producen una abundante matriz extracelular que se mineraliza (Gevers y cols. 1996a). El proceso acaba con la degeneración y lisis celular, mineralización e invasión vascular de la matriz del cartilago, transformándola así en nuevo tejido óseo.

En la cara diafisaria de cada placa de crecimiento los condrocitos maduran y mueren, y la zona de degeneración del cartilago es reemplazada por hueso. Así la diáfisis ósea se alarga y las placas de crecimiento son empujadas externamente, es decir se desplazan del centro del hueso. También es importante en el crecimiento el aumento en grosor del hueso por osificación perióstica o aposicional y una adecuada mineralización (Carrascosa y cols. 1994, Reina y cols. 1995).

El crecimiento del cartilago depende de la adecuada combinación de todos los procesos que ocurren en la maduración del cartilago (Carrascosa y Audi 1996) y que están estrictamente regulados (Ohlsson y cols. 1993). Tanto el grosor de la zona proliferativa (Kember y cols. 1993), como el volumen final de los condrocitos hipertróficos (Breur y cols. 1991, 1994) se utilizan como índices de crecimiento.

Por otra parte, cada hueso largo posee dos cartílagos de crecimiento, que crecen de distinta forma pero aún así de manera sincrónica con la otra extremidad, es decir, cada cartilago funciona de forma independiente aún dentro del mismo organismo, a pesar de estar

sujetos a los mismos estímulos hormonales generales, y al mismo aporte de nutrientes (Ariznavarreta 1996a).

Las fuerzas mecánicas que actúan sobre el hueso también son importantes. Se ha visto en la rata macho, que el peroné actúa mediante fuerzas de compresión sobre el cartílago de crecimiento tibial, por lo que ejerce un efecto inhibitor sobre la tibia para evitar un crecimiento excesivo. Ese control depende de las diferentes tasas de crecimiento de ambos huesos. Por ello la rotura parcial del peroné produce un aumento del crecimiento tibial (Ali y Dickson. 1994).

Si se ahonda aún más en la fisiología condral, se ha visto que los cartílagos con tasas de crecimiento más altas presentan ciclos celulares de los condrocitos proliferativos, más cortos (Wilsman y cols. 1996). Por otra parte parece que la síntesis de DNA está más sincronizada entre los condrocitos de una misma columna que con los de otras columnas (Farnum y Wilsman 1993), y que hay picos de síntesis de DNA en los periodos de transición de luz-oscuridad (Simmons y cols. 1988). Aunque se ha especulado sobre la posibilidad de que existiera una relación entre la cinética celular y oscilaciones en el crecimiento (Hermanussen 1989), hasta ahora, los resultados sobre si existe un ritmo circadiano en la tasa de crecimiento no han sido muy concluyentes (Wilsman y cols. 1996). Nosotros presentaremos datos que sí apoyan una oscilación en el crecimiento en periodos inferiores a 24 horas.

Se asume que todos los cartílagos de crecimiento experimentan la misma activación y represión de genes, dando lugar a un patrón de expresión fenotípica característico y secuencial (Wilsman y cols. 1996). Sin embargo el resultado en crecimiento no es el mismo. Estos mismos autores proponen que un cartílago concreto, en un momento dado, presenta un estado estable en el número y el desarrollo de sus condrocitos. Estos estadios irían variando en el tiempo originando las distintas tasas de crecimiento.

Todo esto sugiere una regulación dinámica y compleja del proceso de crecimiento, que comprende herencia genética, secreción hormonal, y mecanismos de regulación paracrino y autocrino. De todas formas, y a pesar de que se conocen muchos elementos que están involucrados en el crecimiento, no se conoce con certeza su control (Ariznavarreta 1996a), ni que mecanismo origina las distintas tasas de crecimiento en la elongación de los huesos (Wilsman y cols. 1996).

4.2 Efecto de la GH y de la IGF I en el cartílago de crecimiento

En un principio se pensaba que la actividad estimulante del crecimiento de la GH estaba mediada únicamente a través de la producción hepática de IGF I, que una vez liberado a la circulación actúa como un factor endocrino a nivel del cartílago.

Por otra parte, se vio que la infusión de GH directamente en el cartílago era capaz de estimular el crecimiento tibial (Isaksson y cols. 1982). También la administración directa de IGF I en el cartílago promueve el crecimiento, por lo que se propuso que la acción de la GH debía estar mediada por la producción local de IGF I (Schlechter y cols. 1986, Isgaard y cols. 1986). Además en ratas hipofisectomizadas puede haber crecimiento en respuesta al tratamiento con pequeñas dosis de GH, sin que aparezcan cambios en los niveles plasmáticos de IGF I (Daughaday y Rotwein 1989).

Sin embargo, la GH parecía ser más eficaz promoviendo el crecimiento que la IGF I (Isgaard y cols. 1986, Domené y cols. 1993, Gosteli-Peter y cols. 1994, Spagnoli y Rosenfeld 1996) lo que sugiere que la existencia de un efecto directo de la GH independiente de la IGF I.

De hecho, la GH tiene efectos directos en el cartílago (Daughaday y Rotwein 1989). Se ha visto en estudios *in vitro* que la GH, y no la IGF I, estimula la multiplicación de las células de proliferación lenta de la capa germinativa (Ohlsson y cols. 1992b), mientras que la IGF I estimula la expansión clonal de células con fenotipo diferenciado (Ohlsson y cols. 1994).

Con estos datos se propone una acción dual de la GH, por la que actuaría por un lado directamente sobre las células progenitoras, iniciando la expansión clonal subsecuente (Ohlsson y cols. 1992b, 1993, 1994, Gevers y cols. 1996a) y por otro estimulando la síntesis local de IGF I por estas células más diferenciadas (Isaksson y cols. 1982, 1987, Goodman 1994). Esta producción local de IGF I, de forma paracrina y/o autocrina, actúa estimulando los condrocitos proliferativos ya diferenciados (Isaksson y cols. 1982, 1987), no sólo la multiplicación celular sino también la síntesis de matriz extracelular (Ohlsson y cols. 1993, Carrascosa y Audi 1996) (figura 7).

Esta teoría está de acuerdo con la respectivas concentraciones de receptores, que son más elevadas en precondrocitos y condrocitos jóvenes para GH, y en condrocitos

proliferativos para IGF I (Loveridge y cols. 1995, Carrascosa y Audi 1996, Spagnoli y Rosenfeld 1996) y parece ser la más aceptada (Carrascosa y Audi 1996, Tresguerres 1996b).

Sin embargo, algunos autores (Hunziker y cols. 1994) proponen que la IGF I también influiría en la diferenciación de los condrocitos por actuación sobre las células progenitoras, y que tanto la GH como la IGF I actuarían en cada nivel de diferenciación, puesto que existen receptores para ambas en todos los estadios de diferenciación en el cartílago (Hunziker y cols. 1994).

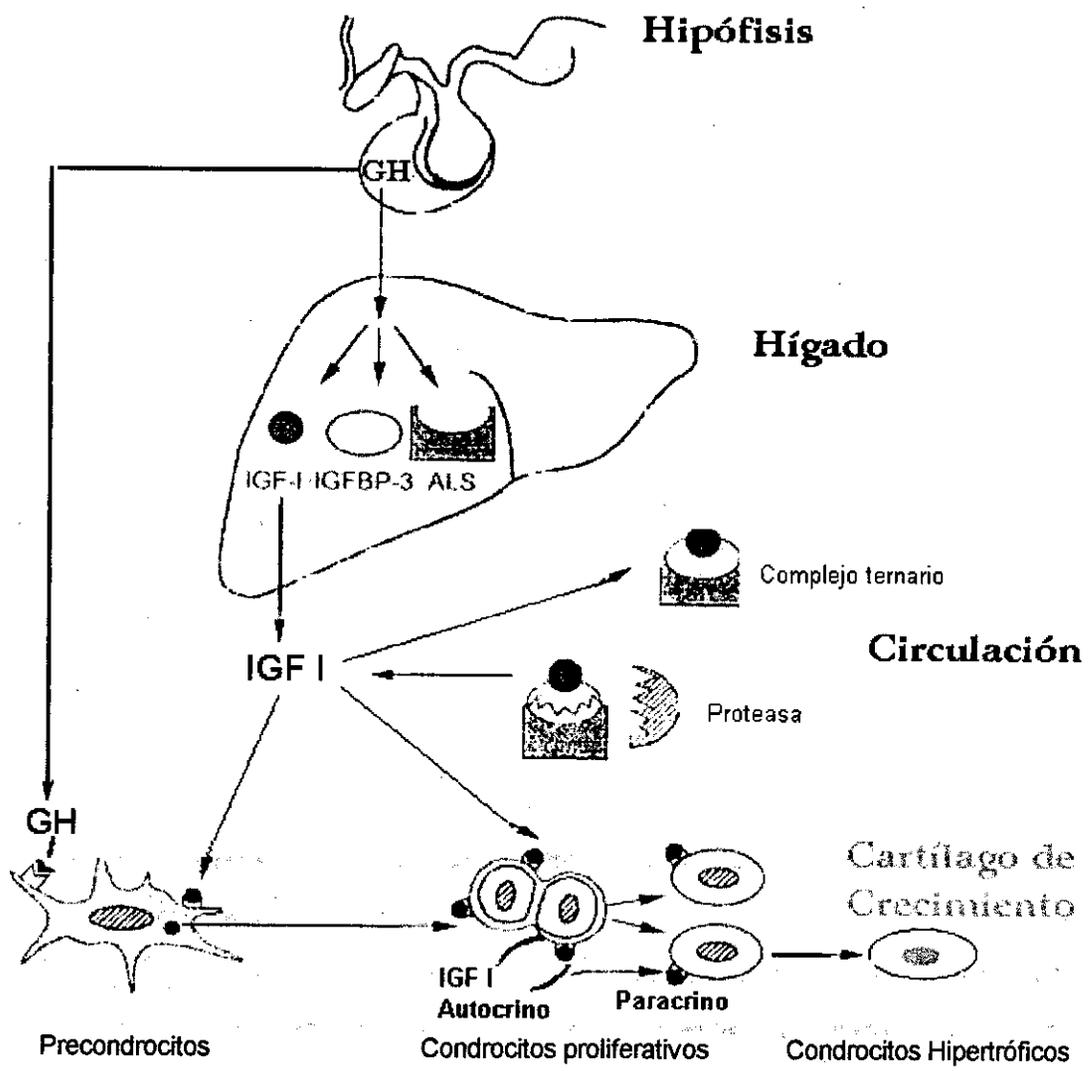


Figura 7. Esquema de las acciones de GH e IGF I a nivel del cartílago de crecimiento. Modificada de Spagnoli y Rosenfeld (1996).

De todas formas, sea por el efecto directo de la GH, o bien modulando esta actuación autocrina/paracrina de la IGF I no se excluye el papel estimulador de la IGF I circulante, ya que la estimulación del crecimiento tibial por dosis relativamente altas de GH, administrada directamente en el cartílago, no es tan potente como la alcanzada por la GH administrada de forma sistémica (Daughaday y Rotwein 1989), y en ratas hipofisectomizadas tanto la infusión local de IGF I (Isgaard y cols. 1986) como la sistémica (Gosteli-Peter y cols. 1994) promueven el crecimiento longitudinal de la tibia, con lo que la IGF I sistémica alcanzará también estas células estimulando la división celular (Goodman 1994).

Por todo esto actualmente se acepta que la IGF I podría promover el crecimiento tanto a través de un mecanismo de acción clásico tipo endocrino, como por un mecanismo autocrino/ paracrino, sin que esté delimitada exactamente la responsabilidad de cada uno de ambos mecanismos en la promoción del crecimiento (Loveridge y cols. 1995, Carrascosa y Audi 1996).

Las proteínas ligantes han cobrado importancia como reguladoras de los niveles locales de IGF I, ya que la GH podría potenciar la acción de la IGF I mediante la estimulación de la producción de IGFBP3 y ALS; por otro lado existen proteasas que degradan la IGFBP3, aumentando la liberación de la IGF en el cartílago. Incluso puede que la GH induzca la producción local de IGFBP3 en el lugar de acción (Spagnoli y Rosenfeld 1996), como se ha visto en condrocitos humanos (Carrascosa y Audi 1996), lo que complicaría aún más el sistema.

4.3 Efecto de otras hormonas y sustancias en el cartílago de crecimiento

Además de los efectos de la GH y de la IGF I, existen otra serie de hormonas y factores que intervienen en la regulación de la elongación de los huesos.

❖ *Hormonas gonadales*

Existen receptores para estrógenos y andrógenos en el cartílago (Ohlsson 1993), y la testosterona actuando directamente en el cartílago, aumenta su grosor (Ohlsson 1993) y estimula tanto la proliferación celular como la síntesis de matriz del cartílago (Carrascosa y

Audi 1996). Los estrógenos favorecen la síntesis de matriz y la mineralización e inhiben la proliferación celular (Carrascosa y Audi 1996).

❖ *Hormonas tiroideas*

Las hormonas tiroideas regulan la proliferación y la maduración condral *in vitro* (Ohlsson y cols. 1993), son necesarias en la hipertrofia condral (Nilsson y cols. 1994), y favorecen los procesos de mineralización (Carrascosa y Audi 1996).

❖ *Insulina*

También tiene efectos proliferativos sobre células de tipo osteoblástico (Leung y cols. 1996) y regula de forma negativa los receptores de GH en osteoblastos, al revés que en el hígado (Leung y cols. 1996), con lo que podría participar limitando la capacidad de GH de estimular el crecimiento en el hueso, y sin embargo potenciar su acción endocrina, según Leung y cols. (1996).

❖ *Glucocorticoides*

En el cartilago de crecimiento los GC inhiben la proliferación (Baron y cols. 1994, Yahya y cols. 1994) y reducen la maduración de los condrocitos (Yahya y cols. 1994).

❖ *Hormona Paratiroidea:*

Aumenta la producción de IGF I en células osteoblásticas (Saggese y cols. 1993). Por un lado estimula la resorción ósea y por otro, favorece la formación hueso nuevo (Hock y cols. 1988). Su acción sobre la resorción se debe tanto a un aumento de la diferenciación celular a osteoclastos como de su actividad, se favorece por IL-1 y necesita de niveles adecuados de vitamina D (Prieto 1996).

❖ *Factores de crecimiento:*

El EGF estimula la proliferación celular en el cartilago (Ohlsson 1993) y el TGF β parece estar implicado en los mecanismos moleculares asociados con la diferenciación de los condrocitos (Loveridge y Farquharson 1993, Ohlsson y cols. 1993).

❖ *Vitamina D*

La proliferación de los condrocitos aumenta con dosis bajas y se inhibe con dosis altas de vitamina D (Ohlsson 1993, Nilsson y cols. 1994). Está implicada en la diferenciación

de los condrocitos (Gevers y cols. 1996a), y estimula la mineralización (Ohlsson 1993, Carrascosa y Audi 1996), probablemente por su efecto estimulador de la absorción intestinal de calcio y fosfato, con lo que aportaría los elementos necesarios para la mineralización. También estimula la reabsorción ósea al favorecer la formación de osteoclastos (Prieto 1996).

❖ *Interleucinas (IL):*

La **IL-6** parece ser crítica para la formación de osteoclastos a partir de células menos diferenciadas, y la **IL-8** parece causar degradación del cartilago (Saggese y cols. 1993).

5. MODIFICACIONES DEL PATRÓN NORMAL DE CRECIMIENTO

5.1 Dimorfismo sexual y manipulación neonatal del ambiente esteroideo

5.1.1 Dimorfismo en el crecimiento y en la secreción de GH

El patrón secretor de GH difiere marcadamente entre machos y hembras (Edén 1979) y se acepta que tiene relación con la diferente tasa de crecimiento entre machos y hembras (Clark y Robinson 1985a, Jansson y cols. 1985a, 1985b, Clark y Robinson 1988, Painsón y Tannenbaum 1991), siendo superior en los primeros (Jansson y cols. 1983, 1984).

Los machos presentan niveles basales de GH bajos o indetectables, y pulsos de amplitud elevada cada 3-4 horas. Las hembras tienen valores plasmáticos más constantes con valles más altos, picos de menor amplitud, más frecuentes y mas irregulares (Edén 1979, Jansson y cols. 1985a, Zeitler y cols. 1991, Painsón y Tannenbaum 1991, Painsón y cols. 1992, Hasegawa y cols. 1992, Peñalva y cols. 1994).

Las diferencias en el patrón secretor de GH aparecen paulatinamente. El aumento en la amplitud de los pulsos de GH en las ratas machos comienza entre los 33 y los 40 días de vida y la disminución de los valores basales entre los 41 y los 54 días (Gabriel y cols. 1992), aunque algunos autores sitúan las diferencias en el patrón secretor entre los 25 y 30 días (Edén 1979).

Así pues las diferencias en el patrón secretor de GH comienzan con la aparición de la pubertad y coinciden con el momento en el que se establecen las tasas de crecimiento diferentes entre machos y hembras, hacia los 40-45 días de vida (Edén 1979, Jansson y cols. 1984, 1985b, Shulman y cols. 1987).

Por otra parte los niveles circulantes de IGF I son superiores en los machos que en las hembras a partir de los 56 días de vida (Gabriel y cols. 1992).

También se ha visto que ambos sexos presentan distinta sensibilidad a la administración exógena de GHRH (Clark y Robinson 1985b), de tal forma que las hembras responden a cada pulso de GHRH con un pico secretor de GH, mientras que los machos presentan períodos “refractarios” (Carlsson y cols. 1990, Painson y Tannenbaum 1991).

Entre machos y hembras existe distinta retroalimentación negativa sobre el hipotálamo ejercida por la GH (Becker y cols. 1995); siendo en la hembra la retroalimentación menos drástica sobre SS (Carlsson y cols. 1990) o sobre SS y GHRH según otros autores (Maiter y cols. 1990, 1991a, Sato y Frohman 1993) lo que llevaría a un patrón secretor de GH más continuo. También se ha visto que los machos son más sensibles a la estimulación α_2 adrenérgica (Maszak y cols. 1995).

Se propone que en las hembras sería preponderante la inhibición de la GHRH mientras que en machos sería dominante la estimulación de la SS (Carlsson y cols. 1990). Carlsson y cols. (1990) postulan que en el macho el pico de GH aumentaría la liberación de SS, e inhibiría la de GHRH (Maiter y cols. 1990), limitando la longitud del pulso. La caída en los niveles de GH implicaría el cese del estímulo sobre SS.

En la rata macho como hemos comentado, la GHRH y la SS se secretarían de forma rítmica y desfásadas 180°.

En la hembra la secreción de SS podría ser más constante (figura 8), situándose a un nivel intermedio entre los picos y los valles de los machos (Clark y Robinson 1985b, Robinson y Clark 1987, Carlsson y cols. 1990, Painson y Tannenbaum 1991). La secreción de GHRH se mantendría pulsátil aunque en un nivel más elevado (Painson y Tannenbaum 1991), lo que podría ser específico de especie (Painson y cols. 1992). La GHRH sería importante para mantener elevados los niveles basales de la hembras (Painson y cols. 1992).

Una de las funciones de la somatostatina sería bloquear temporalmente la liberación de GH, lo que permitiría que la GH se acumulara, con lo que la GHRH tendría un efecto acentuado al liberar una mayor cantidad de GH (Turner y Tannenbaum 1995). Ese momento

de altos niveles de GHRH con bajos niveles de SS, es lo que parece suceder en el caso de los machos en los picos de secreción de GH. Otra posibilidad es que la disminución de la liberación de GHRH, inducida por somatostatina, lleve a una estimulación del receptor de GHRH (up-regulation), lo que contribuiría, en parte, al aumento de la respuesta de GH a GHRH (Tzanela y cols. 1996).

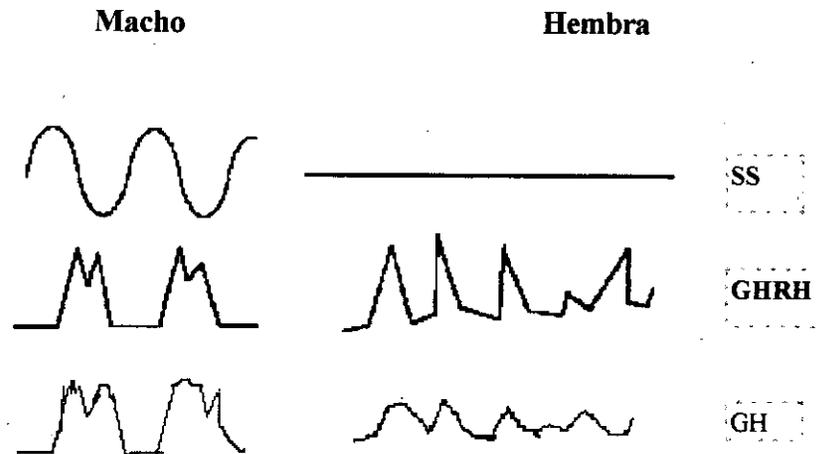


Figura 8. Patrón secretor de GH en la rata macho y en la rata hembra. Modificado de Peñalva y cols. 1994.

Por otra parte el distinto patrón secretor de GH en la rata se acompaña a nivel hipofisario e hipotalámico, de características propias de cada sexo, que se modifican por la eliminación de la respectiva fuente de esteroides sexuales:

Se sabe que el contenido hipofisario de GH y su síntesis en ratas adultas es mayor en machos que en hembras (Wehrenberg y Giustina 1992, Scanlon y cols. 1996), que además los machos tienen mayor contenido y presentan mayor expresión de GHRH y SS (Zeitler y cols. 1990, Hasegawa y cols. 1992, Painson y cols. 1992, Scanlon y cols. 1996).

En el macho la castración disminuye ambos ARNs, efecto que se revierte por la testosterona (Argente y cols. 1990, Zeitler y cols. 1990, Chowen y cols. 1996b, Scanlon y cols. 1996) y por la DHT (Argente y cols. 1990, Lago y cols. 1996), que es un andrógeno no aromatizable. En la hembra la castración disminuye el ARNm de SS (Painson y cols. 1992, Bennet y cols. 1996), revirtiéndose este efecto por la administración de estradiol (Wehrenberg y Giustina 1992). Sin embargo, en el caso de las hembras los efectos de la castración sobre el ARNm de GHRH no son tan claros, ya que se ha descrito que no se

modifica (Maiter y cols. 1991a, Hasegawa y cols. 1992) o que aumenta (Bennet y cols. 1996).

Se postula que la acción ejercida por los estrógenos no sería directa, ya que no existen receptores para ellos en las neuronas somatostatinérgicas del núcleo periventricular o del núcleo arcuato de hipotálamo (Bennet y cols. 1996). Los andrógenos sí actuarían directamente (Argente y cols. 1990, Hasegawa y cols. 1992, Lago y cols. 1996). No obstante sí parece haber unión de estrógenos, en ciertas poblaciones de neuronas GHRHérgicas (Wehrenberg y Giustina 1992).

La manipulación del ambiente esteroideo en la rata adulta también produce cambios en la velocidad de crecimiento: La castración de animales machos disminuye la tasa de crecimiento y en animales hembras la aumenta (Jansson y cols. 1983, 1985b, Shulman y cols. 1987). Además, los estrógenos administrados en dosis terapéuticas inhiben el crecimiento tanto en niños como en animales de experimentación (Goodman 1994).

5.1.2 Diferenciación sexual del cerebro: manipulación neonatal.

Por otra parte, en la rata de laboratorio hay toda una serie de funciones que presentan dimorfismo sexual como consecuencia del ambiente hormonal perinatal. En la rata el período en el que ese ambiente actúa se extiende a los primeros 10 días de vida postnatal, lo que permite una fácil manipulación postnatal. Por ello, se sabe que los andrógenos tanto fetales como neonatales inducen masculinización (Jansson y cols. 1985b). Parece un paso obligado que la testosterona se aromatice a estradiol en el cerebro para llevar a acabo su efecto masculinizante, lo cual no deja de ser sorprendente.

Frente a la idea inicial de que el cerebro era inherentemente femenino, a no ser que hubiera una inducción hormonal derivada de la testosterona que lo masculinizara, parece que la diferenciación femenina pudiera ser un proceso activo que requiriese niveles moderados de estrógenos (figura 9).

El feto hembra se halla expuesto a elevados niveles de estrógenos, formados por la unidad feto placentaria; existe un proteína con elevada afinidad para el estradiol, la α -feto proteína (α FP), presente en cantidades importantes en los animales hembra. En un principio se pensaba que esa α FP, retenía los estrógenos protegiendo al feto femenino de la masculinización, pero actualmente se sabe, que la α FP es endocitada en las neuronas del

sistema nervioso central. De esa forma constituye una fuente y un reservorio de esteroides, extendiendo el ambiente estrogénico a los primeros días de vida posnatal y modulando la cantidad de estrógenos que interaccionan con el receptor.

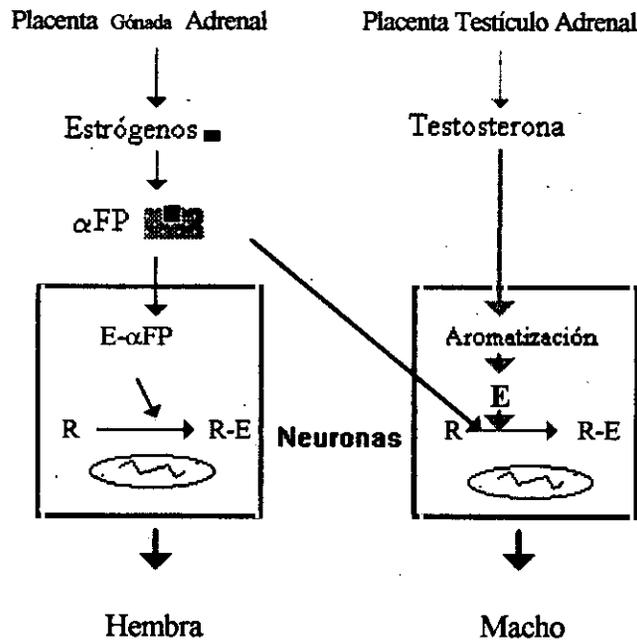


Figura 9. Modelo secuencial o cuantitativo en la diferenciación sexual. Modificado de Vaticón 1996. (R= receptor, RE= complejo estrógenos-receptor, T= testosterona) La disociación del complejo α FP-estrógeno dentro de la neurona libera el esteroide, que se une a su receptor citosólico (Tresguerres 1992).

En última instancia la diferenciación sexual del cerebro depende de los estrógenos, tanto en machos como en hembras, y parece tratarse mas bien de un proceso cuantitativo.

Por otra parte se han detectado receptores para andrógenos en el hipotálamo lo que abre la posibilidad de que la testosterona *per se* tenga alguna función en la diferenciación neuronal. De hecho estimula el sistema enzimático aromatizante por interacción con receptores androgénicos potenciando su propio metabolismo (Tresguerres 1992, Vaticón y Alvarez 1996, García Segura 1996, Vaticón 1996).

5.1.3 Manipulación del ambiente esteroideo neonatal y secreción de GH.

Hemos visto que existe un dimorfismo marcado en el patrón secretor de GH, en el contenido y la expresión de los péptidos hipotalámicos, y en las tasas de crecimiento en el

animal adulto; teniendo en cuenta que en la rata se puede alterar el desarrollo dimórfico del cerebro se comenzaron a hacer estudios en los que se manipulaba el ambiente esteroideo en la etapa neonatal o en el animal adulto, tratando de modificar con ello el patrón secretor de GH propio de cada sexo y sus tasas de crecimiento.

La manipulación neonatal produce marcados efectos sobre el eje somatotropo: el número de neuronas que expresan GHRH disminuye en los machos por la castración neonatal, y aumenta en las hembras tratadas con testosterona neonatalmente. Sin embargo, el ARNm de GHRH parece regularse preferentemente, y de forma positiva, por los niveles de testosterona en el animal adulto. En el caso de las neuronas que expresan SS, no existen cambios en su número por ninguna de estas manipulaciones, mientras que su capacidad sintética está influida fundamentalmente por el ambiente esteroideo neonatal, aunque es importante también el ambiente esteroideo en el animal adulto, siendo la testosterona la que aumenta su ARNm (Chowen y cols. 1993, 1996b). Para una revisión de datos más amplia puede consultarse los trabajos de Wehrenberg y Giustina (1992).

El tratamiento neonatal con niveles elevados de andrógenos o estrógenos parece condicionar la respuesta en adultos al ambiente esteroideo postpuberal (Chowen y cols. 1993, 1996b). Así según Devesa y cols. (1996), en el período neonatal se determinaría el establecimiento del patrón dimórfico sexual en la secreción de GH y los esteroides gonadales liberados a partir de la pubertad modularían ese patrón prefijado.

Pero el sistema parece ser aún más complejo, ya que podrían existir cambios en las sinapsis modulados por esteroides sexuales (Painson y cols. 1992, Chowen y cols. 1996a, 1996b). Además la testosterona tiene efectos organizadores y activadores en la astrogliosis (Chowen y cols. 1996a).

Por otra parte, además de la testosterona, hay factores testiculares no androgénicos secretados por células distintas de las de Leydig que también influyen en la expresión de SS y GHRH (Lago y cols. 1996, Scanlon y cols. 1996), disminuyendo el contenido de ARNm de SS en el núcleo periventricular, y evitando el aumento del ARNm de GHRH inducido por DHT, con lo que parecen estar implicados en la neuroregulación y en el mantenimiento del patrón dimórfico de la secreción de GH (Lago y cols. 1996).

5.2 Alteraciones de la nutrición en la rata

En la rata tanto el ayuno como el déficit proteico llevan a una disminución en los niveles de IGF I, y de los niveles plasmáticos de GH (Maes y cols. 1991, Nogami y cols. 1994, Oster y cols. 1996). Estos niveles de IGF I no se recuperan si se administra GH (Thissen y cols. 1991, Asakawa y cols. 1992), y en humanos en las mismas condiciones la disminución de IGF I ocurre en presencia de niveles plasmáticos elevados de GH (Maes y cols. 1991, Straus 1994, Thissen y cols. 1994, Ogawa y cols. 1996); así se habla de un estado de resistencia a la GH. Esta misma idea se apoya en los resultados obtenidos por la administración de GH e IGF I a ratas sometidas a ayuno, en los que únicamente la IGF I era capaz de prevenir parcialmente la pérdida de peso ocasionada por el ayuno (Asakawa y cols. 1992).

Se han llevado a cabo numerosos estudios tratando de dilucidar los mecanismos por los que se producen estas alteraciones del eje somatotropo.

Se ha visto que en la rata el ayuno, lleva a una disminución del número de receptores de GH en el hígado (Maes y cols. 1991, Thissen 1994, Ketelslegers y cols. 1996), y de los niveles de la GHBP (Ketelslegers y cols. 1996, Oster y cols. 1996). Disminuyen los niveles séricos de la IGFBP3 (Oster y cols. 1996), y de la ALS (Dai y Baxter 1994, Oster y cols. 1996), mientras que aumentan los niveles de IGFBP 1 y 2 (Straus 1994), y aumenta la expresión del receptor de IGF I en muchos tejidos (Straus 1994).

La restricción de proteínas acelera el aclaramiento de IGF I (Ketelslegers y cols. 1996), y puesto que la ALS se induce directamente por la GH y no por la IGF I (Gargosky y cols. 1994), se ha propuesto que el déficit de GH ocasionado por la restricción de proteínas, llevaría a una reducción en la formación del complejo ternario, IGF I-IGFBP3-ALS, contribuyendo a la reducción de los niveles plasmáticos de IGF I (Harel y Tannenbaum 1993).

Por otra parte los cambios producidos en las proteínas ligantes de IGF I influirían en su disponibilidad a nivel tisular (Straus 1994, Ogawa y cols. 1996). Ésta sería una forma de limitar el crecimiento y de que los nutrientes fueran principalmente utilizados para el metabolismo (Zhao y cols. 1995).

Los mecanismos que influyen en la secreción de GH no están completamente aclarados. Parece que la disminución en la secreción de GH, se debería a un aumento en el

tono somatostatinérgico (Tannenbaum y cols. 1989), junto con una disminución tanto en la expresión como en la liberación de GHRH (Okada y cols. 1994, Thissen 1994). Se sabe que los niveles SS en la circulación periférica aumentan, sin que se modifique el contenido hipotalámico (Tannenbaum y cols. 1979), ni su ARNm (Okada y cols. 1994, Thissen 1994), por lo que su origen parece ser periférico (Thissen 1994), aunque no está muy claro como se altera el sistema somatostatinérgico (Turner y Tannenbaum 1995). También se ha propuesto que la falta de aminoácidos esenciales en la dieta alteraría otros sistemas de neurotransmisores o neuropéptidos que modularían la secreción de GH a través de la GHRH y/o la SS (Harel y Tannenbaum 1993, 1995, Okada y cols. 1994). Por ejemplo, el NPY, que es un potente orexigénico en animales de experimentación e inhibe la secreción de GH al ser administrado centralmente, aumenta su síntesis y liberación en respuesta al ayuno (Gruenewald y cols. 1996), con lo que podría participar en la inhibición de la secreción de GH.

Es importante añadir que otras hormonas como la insulina o las hormonas tiroideas, que disminuyen en el ayuno (Thissen 1994), pueden estar contribuyendo a los efectos de la falta de nutrientes sobre el eje somatotropo. Se ha propuesto que la insulina interviene junto con la GH y la nutrición en la regulación de los niveles de IGF I (Froesch y cols. 1990) y en la regulación de la expresión génica o en la estabilidad del ARNm de la ALS (Dai y Baxter 1994). Además disminuye la transcripción de la IGFBP 1 (Straus 1994, Ketelslegers y cols. 1996), y promueve la traslocación esta proteína ligante fuera del compartimento vascular (Jones y Clemmons 1995), sin modificar los niveles de la IGFBP2 ó de la IGFBP3 (Tresguerres 1996b). Por otro lado el tratamiento con T₃ en ratas sometidas a ayuno previene parcialmente la disminución en la concentración de IGF I en suero y del ARNm de GH en hipófisis (Thissen 1994).

Debido a que, como hemos descrito, se puede alterar el patrón de crecimiento por malnutrición quisimos utilizar este hecho para estudiar el proceso de crecimiento compensatorio (catch up) tras al ayuno.

5.3 Crecimiento compensatorio

El crecimiento compensatorio es un fenómeno fisiológico normal por el que tras un período de no crecimiento o crecimiento disminuido, se tiende a recuperar la línea de

incremento estatural que se esperaría en ausencia de alteraciones, lo que en algunos casos lleva a producir un crecimiento suprafiológico (Baron y cols. 1994, Hermanussen y cols. 1996). Estos períodos de no crecimiento pueden producirse por deficiencia de GH, exceso de glucocorticoides, malnutrición, o enfermedad (Baron y cols. 1994).

Los mecanismos que controlan la recuperación del tamaño corporal tras un período de no crecimiento no parecen estar claros.

Mosier (1986, 1990) propone que el crecimiento compensatorio estaría controlado, por un regulador central que recibiría información del tamaño del cuerpo y lo contrastaría con una referencia aumentando o disminuyendo la tasa de crecimiento. Los organismos siguen un patrón predecible de crecimiento proporcionado. En las interrupciones del crecimiento aparecen desproporciones entre la longitud del esqueleto y el peso, pero siempre se tiende a recuperar las proporciones normales, lo que sugiere un control activo.

No obstante, estudios de crecimiento compensatorio en la tibia de conejo (Baron y cols. 1994) sugieren que esta capacidad sería intrínseca del propio cartilago de crecimiento ya que era específico del cartilago en el que se había producido la inhibición, descartando que se debiera a un fenómeno exclusivamente neurológico o a las diferentes fuerzas mecánicas. Proponen que la tasa proliferativa de los condrocitos del cartilago disminuye con cada división contribuyendo a la senescencia del cartilago, y que una paralización de esas divisiones retrasaría el envejecimiento permitiendo el crecimiento compensatorio al cesar la inhibición. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las diferencias en presión pueden modificar la forma y tamaño de los huesos (Prieto 1996).

En cabras, corderos y cerdos, se ha intentado utilizar la rápida ganancia de peso que se produce tras períodos de malnutrición para aumentar la producción de carne (Hermanussen y cols. 1996).

Los factores que contribuyen a la rápida ganancia de peso durante la realimentación y a su pérdida con la malnutrición parecen ser múltiples y dependientes del tipo de malnutrición al que son sometidos los animales.

Con una restricción de dieta del 30% Phillips (1981) encuentran que la eficacia en la utilización de nutrientes aumentaba en el hueso, disminuía en el tejido adiposo y no se modificaba en el músculo. También se ha descrito que el organismo pierde agua (Azain y cols. 1995, Zhao y cols. 1995), con lo que existe una rehidratación del mismo al comenzar la realimentación (Zhao y cols. 1995).

Algunos autores estudiando la malnutrición crónica neonatal (Zhao y cols. 1995) observaron que la realimentación estimula preferentemente el depósito de grasa, al igual que la restricción lo disminuye y que un soporte nutricional adecuado permite la repleción de la masa magra. También se ha postulado (Tawa y Golberg 1992), que la realimentación produce una rápida estimulación de la síntesis de proteínas en el músculo, acompañada de una degradación de proteínas que permanece baja durante 2 días, lo que podría explicar el rápido crecimiento del músculo y el aumento de peso, ya que el músculo supone un 30-40% del la masa corporal.

En la rata normalmente el fenómeno del crecimiento compensatorio se ha estimado por cambios en peso (Phillips y Young 1975, Tannenbaum y cols. 1979, Lanz y cols. 1992, Azain y cols. 1995). Nosotros quisimos estudiar en la rata que evolución presentaba su longitud tibial tras una restricción en el acceso de nutrientes y si el tratamiento con GH era beneficioso en promover la recuperación.

5.4 Tratamiento neonatal con glutamato monosódico (GMS)

Además del estudio del crecimiento en la rata normal, utilizamos un modelo deficitario en GH, cuyas características detallamos a continuación.

El tratamiento neonatal con glutamato monosódico (GMS) produce una destrucción selectiva de las neuronas secretoras de GHRH del núcleo arcuato del hipotálamo, sin afectar aparentemente, a las neuronas secretoras de LHRH, SS o CRH. Ésto permite la obtención de un modelo con deficiencia selectiva de GH de origen hipotalámico (Bloch y cols. 1984) que es ampliamente utilizado en estudios de crecimiento, en muchos casos como alternativa a una manipulación más drástica como es la hipofisectomía.

Se sabe que este tratamiento conlleva otras modificaciones neuroendocrinas y metabólicas. En general son animales obesos (Bakke y cols. 1978, Greely y cols. 1980, Nemeroff y cols. 1981, Maiter y cols. 1991b, Kubota y cols. 1994) aunque no sufren hiperfagia (Redding y cols. 1971), presentan disminución del peso de la hipófisis, por la falta de efecto trófico de la GHRH sobre la hipófisis (Maiter y cols. 1991b) y de los testículos (Bakke y cols. 1978, Terry y cols. 1981; Wakabayashi y cols. 1986, Villanúa y cols. 1992). También presentan una disminución en el contenido de proteínas tanto

hipofisarias (Maiter y cols. 1991b) como en la eminencia media (DePaolo y Negro-Vilar 1982). El contenido hipotalámico de TRH parece no estar modificado (Millard y cols. 1982), y tampoco se ha encontrado disminución en el contenido hipofisario de TSH (Jennes y cols. 1984), aunque sí se ha descrito un descenso en los niveles plasmáticos de TSH (Bakke y cols. 1978). Respecto al peso del tiroides, algunos autores lo encuentran disminuido (Bakke y cols. 1978), mientras otros no detectan modificaciones del mismo (Redding y cols. 1971). Tampoco se detectan cambios en los niveles de prolactina (Nemeroff y cols. 1981, Millard y cols. 1982). En ratas hembras, este tratamiento se acompaña de la aparición de ciclos estrales irregulares (Greely y cols. 1981, Nemeroff y cols. 1981, Dada y cols. 1984). Los niveles de estrógenos se han descrito tanto reducidos (Nemeroff y cols. 1981, Dada y cols. 1984) como no modificados (Villanúa y cols. 1992). También se ha descrito que el tratamiento con GMS adelanta la apertura vaginal (MacDonald y Wilkinson 1990) aunque en este caso sería porque se elimina parte del control negativo de la secreción de gonadotropinas, o que se retrasa (Badger y cols. 1982, Dada y cols. 1984).

Es importante resaltar que de todas las hormonas hipofisarias, es probablemente la GH la hormona más dramáticamente afectada por este tratamiento (Dada y cols. 1984, Corder y cols. 1990), debido a la falta de producción de GHRH (Kubota y cols. 1994).

Estos animales presentan una disminución en la amplitud de los picos de secreción de GH (Clark y Robinson 1985a), y en sus niveles plasmáticos (Terry y cols. 1981, Katakami y cols. 1984), así como en el contenido hipofisario de esta hormona (Dada y cols. 1984, Maiter y cols. 1991b, Hu y cols. 1993, Arce y cols. 1995).

Por ello, presentan una marcada disminución en su tasa de crecimiento (Greely y cols. 1980, Nemeroff y cols. 1981, Badger y cols. 1982, DePaolo y Negro-Vilar 1982, Millard y cols. 1982, Kubota y cols. 1994), evaluada tanto en peso corporal, como en longitud tibial o de la cola (Katakami y cols. 1984, Maiter y cols. 1991b, Kovács y cols. 1996).

OBJETIVOS

- ① Validar la microknemometría como técnica para el seguimiento del crecimiento diario de los huesos largos de la rata. Tratar de poner de manifiesto las similitudes o discrepancias existentes entre la evolución diaria del peso y de la longitud tibial como estimaciones del crecimiento del animal.
- ② Estudiar el patrón normal de crecimiento de la rata:
 - a. Constatar la existencia de dimorfismo sexual en el patrón de crecimiento de los huesos largos en la rata.
 - b. Evaluar la posibilidad de oscilaciones en la velocidad de crecimiento en cortos períodos de tiempo.
 - c. Estudiar en la rata macho la existencia de cambios ultradianos de la longitud tibial mediante medidas realizadas cada 3 horas a lo largo de 24 horas cada 7 días, para detectar las horas del día en las que el crecimiento es mayor.
- ③ Estudiar en la rata macho normal:
 - a. Si es posible potenciar su crecimiento mediante distintas pautas de administración de hormona de crecimiento a dosis altas.
 - b. Dada la interrelación existente entre crecimiento y hormonas sexuales, se investigará el efecto sobre el crecimiento de la castración química inducida mediante la administración de un análogo de LHRH.
- ④ Estudiar el proceso de crecimiento en ratas macho tratadas con GMS neonatalmente, que destruye la mayoría de las neuronas GHRHérgicas, y que constituye un modelo experimental de enanismo hipotalámico. Se comprobará en este modelo, el efecto de la castración, así como la repercusión de la administración de GH, PT o ambas en animales intactos o castrados.
- ⑤ Estudiar del patrón de crecimiento en la rata hembra.
 - a. Comprobar la posible potenciación del crecimiento mediante el tratamiento con GH exógena a dosis elevadas.
 - b. Al igual que en machos estudiar el proceso de crecimiento tras el tratamiento neonatal con GMS, así como el efecto de la administración de GH de la misma forma que en la rata normal.
 - c. Estudiar el papel de la GHRH en el crecimiento mediante su administración en inyecciones o de forma continua, combinada o no con SS, tanto en la hembra normal como en la deficitaria en GH.
- ⑥ Evaluar la repercusión sobre el crecimiento de las alteraciones del proceso de diferenciación sexual del hipotálamo en la rata, por medio de la administración neonatal de PT a los animales hembras o castración neonatal a los animales machos.
- ⑦ Analizar en la rata macho la dinámica del proceso de crecimiento compensatorio producido tras períodos de inhibición del mismo, como el ayuno. Explorar la posible potenciación de este fenómeno por la administración exógena de GH, ya sea en el animal normal o deficitario en GH.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, cuyos progenitores procedían de Interfauna-Harlan, criados por el animalario de la Universidad Complutense de Madrid. Nº de Registro del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 28079-15 ABC.

1.2 Régimen de mantenimiento

Las ratas se mantuvieron en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid, con un régimen luminoso de 12 horas luz-12 oscuridad (encendido a las 8.00 horas). Temperatura y humedad de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y $50 \pm 5\%$, respectivamente. El destete se llevó a cabo a los 21/22 días de vida. Los animales adultos fueron homogeneizados por peso previamente a cada experimento; en los casos de tratamientos neonatales las camadas fueron homogeneizadas a 8-10 animales por madre.

Los animales se mantuvieron en grupos de 7-8 animales/jaula desde los 21 días hasta los 30 días, pasando entonces a 4-5 animales/jaula. Las jaulas utilizadas fueron de policarbonato (Macrolon®, Panlab) de $46,5 \times 21,5 \times 14,5$ cm, lo que supone una superficie basal de 1000 cm^2 . Las hembras preñadas o con crías recién nacidas, así como las ratas aisladas para reducción de su ingesta, se mantuvieron en jaulas del mismo material pero superficie basal de 500 cm^2 ($22 \times 20 \times 14,5$ cm). Las madres durante el periodo de cría y las crías hasta los 30 días de vida fueron alimentadas con pienso de cría A-03 (Panlab), pasando a pienso de mantenimiento A-04 (Panlab) a partir de ese momento. Tanto el agua como la dieta se suministró “*ad libitum*”, salvo esta última en los protocolos de ingesta reducida o ayuno total.

2. SEGUIMIENTO DE LOS ANIMALES

2.1 Estudio del ciclo estral y comienzo de la pubertad

En los experimentos diseñados con ratas hembras se observó la aparición de apertura vaginal y se monitorizó el ciclo estral, mediante el estudio por microscopía del

tipo de células presentes en el frotis vaginal, a partir del día siguiente a dicha apertura y hasta el final del experimento.

Para prevenir infecciones al realizar dichos frotis, se utilizó una pipeta Pasteur por jaula, lavándola en solución salina después de cada frotis. Cada día las pipetas se lavaron al terminar en una solución de Hibitane® diluido en agua destilada.

En el caso del diseño experimental 6.4 se observó la aparición de separación balano-prepucial.

2.2 Peso de los animales

Los animales se pasaron a diario con una balanza Soehnle, cuyo error es de 1 g para pesos inferiores a 320 g, a partir de este peso y hasta 1 Kg el error asciende a 2 g.

2.3 Microknemometría

La microknemometría es una nueva técnica no invasiva que permite una medida muy exacta de la longitud tibial de la rata, estando el animal despierto, y cuyo error técnico medio, tras entrenamiento, es inferior a 100 μm (Hermanussen y cols. 1995). Este error es muy inferior al incremento de longitud diario, o tasa de crecimiento, de la rata que está en torno a los 500 $\mu\text{m}/\text{día}$ en animales peripuberales, lo que permite no sólo un seguimiento del crecimiento diario sino incluso en períodos inferiores a 24 horas.

El microknemometro fue diseñado por Dr. Fahrentholz en Kiel. Alemania.

❖ *Microknemómetro*

El microknemometro es un goniómetro digital conectado a una pantalla electrónica y está compuesto por dos brazos articulados, que acaban en dos enganches metálicos (figura 10). Los enganches son dos anillos huecos diseñados de tal manera que el superior “encaja” la rodilla del animal y el inferior su talón, permitiendo una fijación temporal de la tibia del animal (Hermanussen y cols. 1995, 1996). Un muelle entre ambos brazos garantiza que la presión ejercida sobre los tejidos blandos sea constante y de aproximadamente 2,5 Newtones.

La pantalla electrónica muestra números enteros (unidades arbitrarias) en función del ángulo de apertura entre los brazos (α), correspondiendo cada unidad (U) a $0,0033^\circ$, que representan aproximadamente $12 \mu\text{m}$ para ángulos de apertura pequeños. La previa calibración del aparato permite establecer esta equivalencia la cual, facilita la lectura de los datos en micras en lugar de en unidades arbitrarias. La calibración consiste en la medida de una tablilla marcada en puntos concretos; esos mismos puntos se miden a continuación con un calibre, para transformar esas distancias en grados de apertura ($\text{Distancia} = \text{longitud brazo} * 2 [\text{sen } \alpha/2]$). Así, se deduce que un aumento en 302 unidades supone un aumento en la apertura de 1° (o sustituyendo ahora α por su valor por unidad, la distancia en μm).

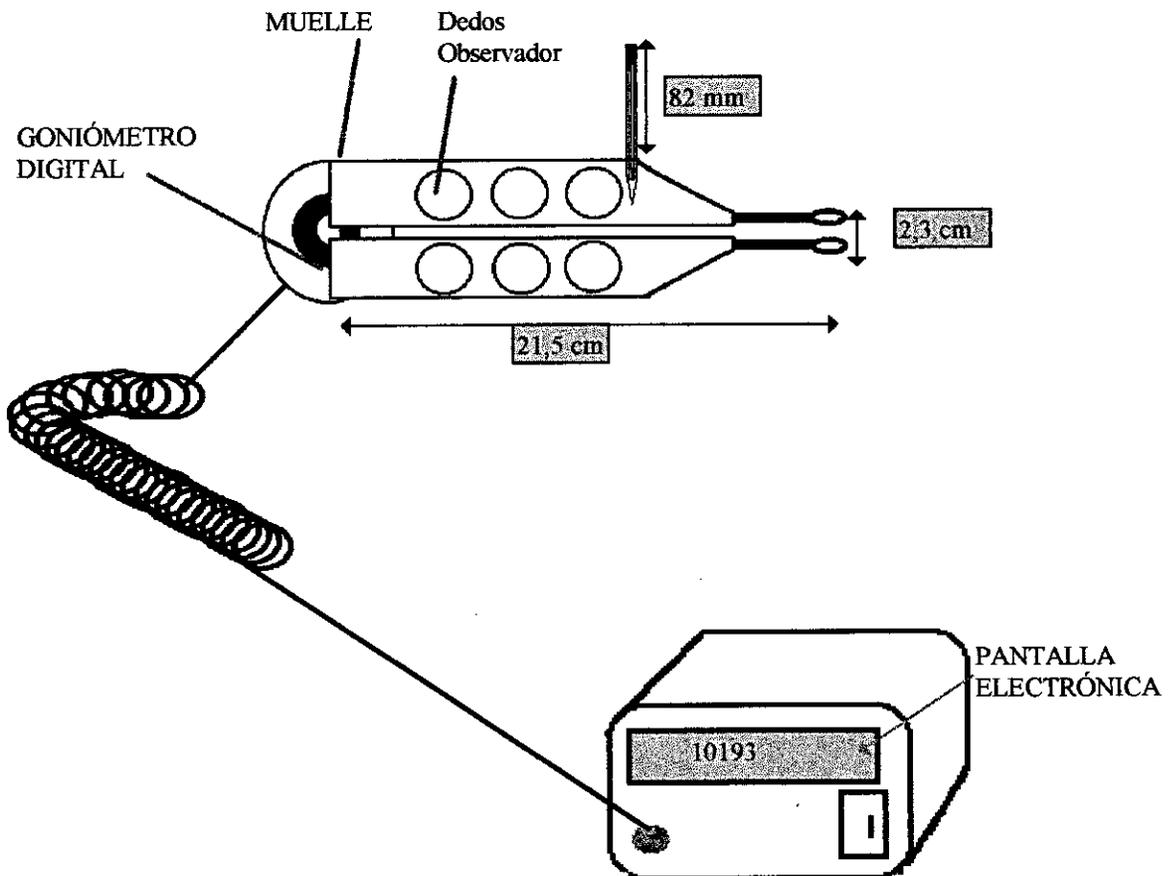


Figura 10: Esquema del microknemómetro

En la medida están incluidos los tejidos blandos y el grosor de la articulaciones que rodean el hueso por lo que la longitud tibial expresada en micras es una

aproximación de la distancia real, aunque son detectados muy sensiblemente cambios en este parámetro.

Sin apertura alguna de los brazos aparece en la pantalla un valor inicial de 10193 U (ángulo 0), estando los brazos separados entre sí 2,3 cm. Al valor obtenido para cada medida hay que restarle el valor inicial, multiplicarlo por 12 para expresarlo en μm y sumarle la distancia entre los enganches en μm .

$$[(\text{valor de la medida (U)} - 10193(\text{U})) * 12] + 23000 (\mu\text{m})$$

❖ *Procedimiento de medida*

La rata se sitúa frente al observador con la cabeza hacia la derecha. Antes de comenzar la medida es importante que el animal se encuentre relajado, y permanezca en una posición más o menos fija. Previamente a realizarse las medidas, los animales fueron acostumbrados a su manejo (figura 11).

Los brazos del aparato, abiertos por el observador, abrazan la extremidad posterior derecha de la rata, dejando que sea el muelle el que ejerza sobre ésta una presión constante. Debido a que la medida de esta distancia puede verse influenciada por la posición del animal y el ángulo que formen talón, tibia y fémur, se estandarizaron las condiciones de medida, tal y como se ha recomendado con anterioridad en la knemometría (Gibson y cols. 1993). Una luz vertical proyecta, sobre una cuadrícula milimetrada, la sombra de una estructura longitudinal, colocada en el brazo superior del aparato, (en nuestro caso un lapicero) buscando con cada medida una sombra de longitud e inclinación constante (en nuestro caso de 43° , calculado a partir de la inversa del coseno de la división: mm en la gradilla/ longitud del lápiz).

La longitud tibial se determina a través de 4 estimaciones subsecuentes e independientes de esta distancia, dejando que el animal se mueva entre cada una de ellas, una vez descartada la primera medida (suele ser el valor más alejado del resto, al igual que se observa en la knemometría, Wit y cols. 1987, Hermanussen y cols. 1988a) se calcula la mediana de las otras 3 estimaciones. El tiempo total empleado varía en función del animal, pero puede llegar a ser inferior a 2 minutos.

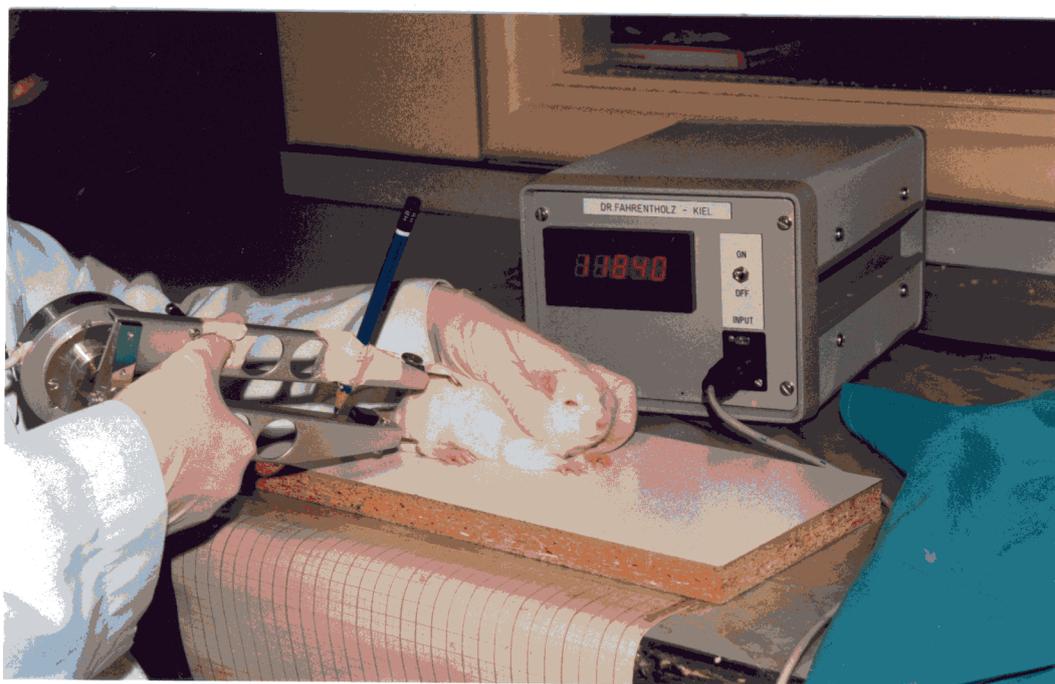


Figura 11: Medida de un rata por microknemometría

3. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.1 Sacrificio y recogida de sangre

El sacrificio de todos los animales se realizó mediante decapitación con guillotina, recogiendo sangre del tronco. Se utilizó como anticoagulante EDTA al 2% disuelto en suero salino. La sangre era rápidamente centrifugada a 3000 r.p.m. durante 15 minutos, decantando el plasma que fue congelado a -20°C , hasta la realización de los radioinmunoanálisis (RIA).

Los órganos se pesaron en seco en una balanza de precisión, previa limpieza de los mismos de grasa. Las vesículas seminales eran vaciadas de semen.

3.2 Procesamiento de la hipófisis

Las hipófisis se recogieron en 500 μl de suero salino y se congelaron a -20°C hasta su posterior procesamiento. Las hipófisis se homogeneizaron en 1 ml de suero salino (previa adición de otros 500 μl) al 9 % por ultrasonidos. Se sonicaron 10 ciclos,

siempre bajo las mismas condiciones de sonicación (Frecuencia 50%, Intensidad 3), a continuación se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 minutos, decantando el sobrenadante que era de nuevo congelado a -20°C .

3.3 Procesamiento de los hipotálamos

Los hipotálamos se recogieron en seco y fueron inmediatamente congelados en nieve carbónica, manteniéndose a continuación a -80°C hasta su procesamiento.

Los hipotálamos se procesaron en 500 μl de acético 2 M, sonicando 10 ciclos, a continuación se añadieron otros 500 μl y se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron (30 minutos a 17000 r.p.m.), se decantaron los sobrenadantes y se liofilizaron. El liofilizado se guardó a -20°C hasta su posterior cuantificación por RIA.

4. DROGAS EMPLEADAS

4.1 Tratamiento neonatal con glutamato monosódico

El glutamato monosódico (GMS) se preparó a una concentración de 100 mg/200 μl en solución salina al 9%. Los animales fueron inyectados subcutáneamente en el lomo en días alternos durante los diez primeros días de vida (2, 4, 6, 8 y 10), con 4 mg/g peso corporal del animal. Sus correspondientes controles recibieron un volumen equivalente de solución salina. El orificio de la piel se selló con colodión. Antes de devolver las crías a la madre y para evitar su rechazo, por el olor del colodión, éstas se “envolvían” en el serrín de la jaula.

4.2 Hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento utilizada procedía de Laboratorios Serono S.A. (rhGH Saizen®) y fue reconstituida en suero salino para su inyección subcutánea.

4.3 Hormona liberadora de hormona de crecimiento

La GHRH utilizada procedía de Laboratorios Serono S.A. (Geref®, análogo 1-29 NH_2) y fue en todos los casos utilizada previa reconstitución del liofilizado en solución salina para su inyección intraperitoneal.

4.4 Somatostatina

La somatostatina utilizada fue Sandostatin®, (octreótida, DCI) de Laboratorios Sandoz, presentada en envase de 1 mg /5 ml; para su inyección subcutánea fue previamente diluida 1:10 en solución salina estéril.

5. ESTUDIOS ANALÍTICOS

5.1 Radioinmunoanálisis

Se basa en una reacción competitiva, entre la hormona presente en la muestra (hormona fría) y una cantidad constante de esa misma hormona marcada con I^{125} (hormona radiactiva) para unirse a un anticuerpo específico.

La afinidad del anticuerpo, que se añade en una cantidad constante a todos los tubos, es la misma por ambas hormonas, por lo que la cantidad de hormona radiactiva ligada al anticuerpo dependerá de la cantidad de hormona fría presente en la muestra. Es decir, a mayor concentración de hormona fría menor oportunidad tendrá la hormona radiactiva de unirse al anticuerpo.

Una curva patrón con cantidades crecientes conocidas de hormona fría se utiliza para calcular las concentraciones de la hormona presentes en las muestras problema. En esta curva se representan en una escala semilogarítmica las cantidades conocidas de hormona fría frente al % de unión de la hormona radiactiva al anticuerpo (%B). Cada punto de la curva se valora por triplicado. La unión se calcula mediante siguiente fórmula :

$$\frac{\text{punto} - N}{B_0 - N}$$

Donde B_0 representa la hormona radiactiva ligada por el anticuerpo en ausencia de hormona fría (unión específica) y N representa uniones inespecíficas, como es lógico estos tubos no llevan ni anticuerpo ni hormona fría. La precipitación de la hormona unida al anticuerpo se logra de diversas maneras: 2° anticuerpo (anticuerpo-anti anticuerpo), carbón dextrano o *Staphilococcus*, por tanto este reactivo será añadido tanto a los tubos B_0 , como a los N . Además ha de existir un At como control de actividad radiactiva total, que permite además calcular la unión específica $[(B_0 - N) / At]$ e inespecífica (N/At) de la hormona

marcada. Con cada hormona ha de buscarse trabajar con un % de unión constante (% Bo).

Como trazador para las hormonas hemos utilizado el I^{125} , ya que, este isótopo ofrece las ventajas de obtener una mayor actividad específica que el H^3 y además el conteo de su emisión es más sencillo que el de un emisor beta que requiere líquido de centelleo. En todos los casos las muestras se pipetea por duplicado.

5.1.1 Radioinmunoanálisis de GH

A. Inmunorreactivos y soluciones tampón:

Se utilizó como hormona patrón la NIDDK-rGH-RP-2. Para la yodación se utilizó NIDDK-rGH-I-6. El anticuerpo utilizado fue el NIDDK-anti-rGH-S-5.

Tanto estos reactivos, como los utilizados en el radioinmunoanálisis para LH, así como el anticuerpo para IGF I fueron amablemente cedidos por el *National Hormone and Pituitary Program* (NHPP) del *National Institute for Diabetes and Digestive and Kidney* (NIDDK) y en todos los casos fueron reconstituídos siguiendo las instrucciones que los acompañan.

Las soluciones tampón utilizadas para la realización del radioinmunoanálisis fueron:

- ❖ Tampón fosfato 0,5 M: Se prepara mezclando una solución 0,5 M de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ y otra solución 0,5 M de KH_2PO_4 . pH= 7,6.
- ❖ Tampón fosfato 0,01M: Se prepara por dilución 1:50 del tampón anterior y añadiendo NaCl 0,15M. pH= 7,6.
- ❖ Tampón BSA: Se prepara a partir de un tampón fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M, BSA (albúmina sérica bovina) 1%. pH= 7,6.
- ❖ Tampón EDTA: Es un tampón fosfato 0,01 M, EDTA 0,025 M, NaCl 0,15 M, Tritiplex 0,025 M. pH= 7,6.

B. Radioyodación de la hormona:

El marcaje, o radioyodación de la hormona, consiste en incorporar el I^{125} en la hormona por medio de alguna reacción enzimática. Se pueden utilizar varios métodos, nosotros hemos utilizado el de la lactoperoxidasa.

Sobre la alícuota de la hormona (2,5 μ g en 25 μ l de tampón fosfato 0,5 M) se añaden sucesivamente los siguientes reactivos:

- 10 μl de tampón fosfato 0,5 M.
- 5 μl (0,5 mCi) de I^{125} .
- 10 μl de dilución de lactoperoxidasa (0,5 μg).
- 1 μl de dilución 1:10000 de H_2O_2 .

Después de 4 minutos de reacción se añaden 100 μl de tampón BSA para detener la reacción.

La oxidación por H_2O_2 , en presencia de lactoperoxidasa, consigue que el yoduro radiactivo pase a yodo atómico, así éste último, sustituye a los átomos de hidrógeno que forman parte de la estructura molecular de las proteínas, fundamentalmente en el núcleo fenólico de la tirosina.

Con el fin de separar la hormona yodada del yodo libre y los reactivos añadidos, una vez finalizada la reacción, el producto de reacción se purifica por cromatografía en una columna de $16 \times 0,8$ cm rellena con Sephadex G-50 Fine, equilibrado en tampón fosfato 0,01 M, y previamente saturada con tampón BSA, lo que previene la adsorción de la hormona al Sephadex o su fijación a las paredes de la columna.

La hormona marcada y almacenada debe ser purificada el mismo día en que se realiza el análisis. Esta purificación se realiza por cromatografía en una columna de $24 \times 1,5$ cm rellena con Sephadex G-100 equilibrado en tampón fosfato 0,01 M, y previamente saturada con BSA. Las fracciones tanto del marcaje como de la purificación se recogen en tampón BSA.

El rendimiento y la actividad específica de la hormona se determina por el método del ácido tricloro-acético (TCA), que es un método inespecífico de precipitación de proteínas. Una vez diluida una pequeña parte del producto del marcaje, se toman alícuotas de 50 μl , añadiendo a la mitad de ellos 500 μl de tampón BSA, para aumentar el precipitado, y 2 ml de TCA al 10 %, se agitan, se incuban 15 minutos a 4°C , y se centrifugan otros 15 minutos a 3000 r.p.m., aspirando el sobrenadante, a continuación se cuenta tanto el precipitado como la otra mitad de las alícuotas 1 minuto en un contador de radiactividad.

La actividad específica y el rendimiento se calculan con las siguientes fórmulas:

$$\text{Rendimiento (Rto)} = \text{c.p.m. precipitado} / \text{c.p.m sin precipitar} \cdot 100$$

$$\text{Actividad Especifica} = \text{Rto (no \%)} \cdot \mu\text{Ci } \text{I}^{125} / \mu\text{g hormona}$$

En el caso de la GH la actividad específica media fue de 68,7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ y el rendimiento medio de un 34%.

C. Realización y Cinética del RIA:

Las muestras de plasmas se pipetea directamente y las hipófisis, una vez procesadas, se diluyen en tampón BSA en una relación de 1:100000. La curva patrón de GH abarca un rango de concentraciones desde 5 hasta 2500 pg/tubo (figura 12).

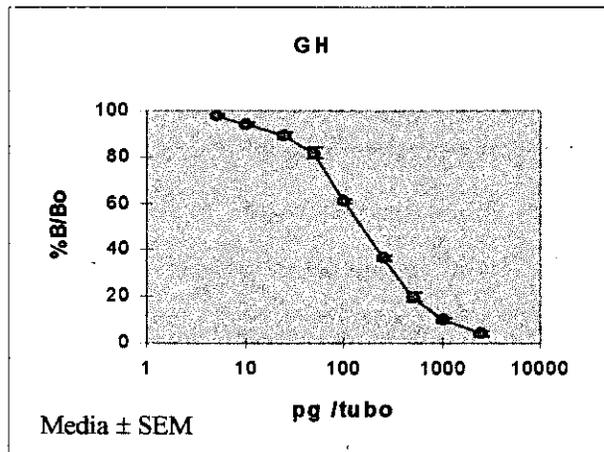


Figura 12: Curva patrón media del RIA de GH.

Para control interno en todos los RIA valoramos los niveles de GH en un pool de suero.

También por triplicado se pipetea:

- **At** o controles de radiactividad que sólo contendrán GH yodada.
- **N** o controles de actividad inespecífica, que contienen 200 μl de tampón EDTA, la hormona yodada y *Staphilococcus aureus*. En nuestro caso su valor medio es del 2.7 %.
- **Bo** o controles de actividad específica, que contienen además el anticuerpo específico. Su valor medio fue del 27.7 %.

Todos los tubos antes de la adición del anticuerpo se completan a un volumen final de 300 μl con tampón BSA.

Un vez pipeteadas las muestras:

- Se añade, excepto a los N y At, un volumen de 200 μl por tubo del anticuerpo a una dilución final de 1:75000 disuelto en tampón EDTA.

- Se preincuba durante 24 horas a 4°C con objeto de aumentar la sensibilidad del ensayo.
- Se añade a todos los tubos 20.000 c.p.m. aproximadamente de GH marcada, en un volumen de 100 µl disuelta en tampón BSA.
- Se incuba durante 3 días a 4°C. Al final de este período de incubación se separa la GH unida al anticuerpo de la GH libre mediante la adición de 50 µl de una suspensión de *Staphylococcus aureus* en tampón fosfato EDTA con Tritón al 1%. Se incuban durante 20 minutos a 4°C. Después se centrifugan los tubos a 4 °C y 3000 r.p.m., durante 15 minutos. Se aspira el sobrenadante y se cuenta el precipitado, que contiene la hormona yodada ligada al anticuerpo específico, durante 1 minuto en un espectrofotómetro de centelleo sólido.

La sensibilidad del RIA es de 5 pg/tubo con un coeficiente de variación interensayo e intraensayo del 7,5 % y del 9 %, respectivamente.

5.1.2 Radioinmunoanálisis de LH

A. Inmunorreactivos y soluciones tampón:

Se utilizó como hormona patrón la NIDDK-rLH-RP-3. Para la yodación se utilizó NIDDK-rLH-I-9. El anticuerpo utilizado fue el NIDDK-anti-rLH-S-10. Las soluciones tampón utilizadas para la realización del radioinmunoanálisis fueron las mismas que las utilizadas en el caso de la GH, comunes para las hormonas hipofisarias.

B. Radioyodación de la hormona:

Tanto el marcaje, como la purificación por cromatografía del producto de reacción y la hormona marcada y almacenada se realizan de la misma forma que para la GH. La actividad específica media fue de 116,5 µCi / µg y el rendimiento medio de un 46,6 %.

C. Realización y Cinética del RIA:

Las muestras de plasma se pipetea directamente y las hipófisis, una vez procesadas, se diluyen en una relación de 1:5000. La curva patrón de LH abarca un rango de concentraciones desde 1 hasta 2500 pg/tubo (figura 13).

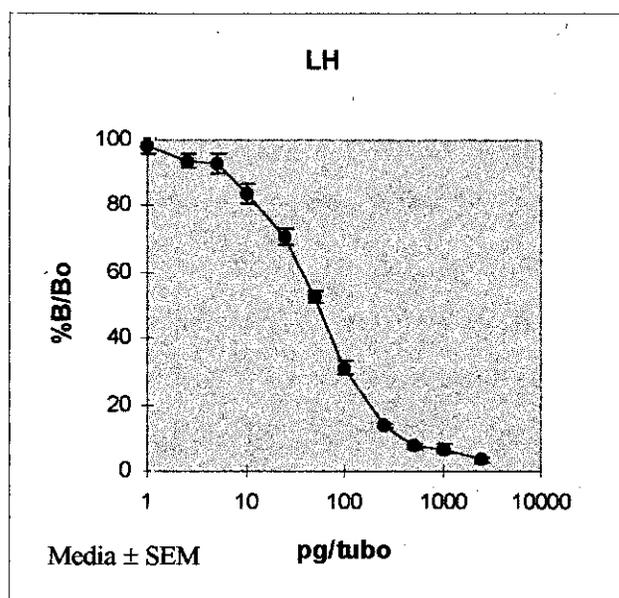


Figura 13: Curva patrón media del RIA de LH.

En este caso los controles de actividad inespecífica (N) contienen 200 µl de la mezcla de tampón EDTA con tritón al 1% y suero de conejo al 0,25%, la hormona yodada y el segundo anticuerpo, y cuyo valor medio fue del 1,4 %. El valor medio de los controles de actividad específica (B₀), fue del 13,1 %.

Todos los tubos antes de la adición del anticuerpo se completan a un volumen final de 200 µl con tampón BSA. Un vez pipeteadas las muestras:

- Se añaden 50 µl por tubo del anticuerpo, excepto a los N y At, a una dilución final de 1:80000 disuelto en tampón EDTA con 0,25 % de suero de conejo.
- Se preincuba durante 3 días a 4°C con objeto de aumentar la sensibilidad del ensayo.
- Se añade a todos los tubos 10.000 c.p.m. aproximadamente de LH marcada, en un volumen de 50 µl disuelta en BSA.
- Se incuba durante 2 días a 4°C. Al final de este período de incubación se separa la LH unida al anticuerpo de la LH libre mediante la adición de 500 µl de una mezcla que contiene el 2º anticuerpo (tampón fosfato 0,01 M con 10 % Polietilenglicol, 10 µl/tubo de antigammaglobulina de conejo, obtenida mediante la inmunización de ovejas en nuestro propio laboratorio por los doctores C. Ariznavarreta y J.A.F. Tresguerres). Procediendo a la separación de la misma forma que en el RIA de GH.

La sensibilidad del RIA es de 5 pg/tubo con un coeficiente de variación interensayo e intraensayo del 5 % y del 8 %, respectivamente.

5.1.3 Radioinmunoanálisis de IGF I

Este radioinmunoanálisis fue puesto a punto por nuestro grupo basándonos en el método descrito por Daughaday y cols. (1980), así como en la metodología utilizada en nuestro laboratorio para la realización de otros radioinmunoanálisis. Se utilizó un RIA de no-equilibrio, con preincubación de la muestra con el anticuerpo previamente a la adición de hormona marcada, aumentando la sensibilidad del ensayo (Furlanetto y cols. 1977).

A. Inmunorreactivos y soluciones tampón:

Se utilizó como hormona patrón y para yodación la A 52-EPD 186, amablemente cedida por Eli Lilly and Company. El anticuerpo utilizado fue el NIDDK UB2- 495, el cual presenta una reactividad cruzada con IGF II del 1,5-1,9 %, reconstituido siguiendo las instrucciones que acompañan a los reactivos. La adición de protamina sulfato al tampón de RIA disminuye la unión inespecífica y la variabilidad interensayo (Copeland y cols. 1980, Chatelain y cols. 1983). La composición del tampón utilizada salvo ligeras variaciones fue amablemente facilitada junto con el anticuerpo por L.E. Underwood.

Las soluciones tampón utilizadas para la realización del radioinmunoanálisis fueron:

- ❖ Tampón fosfato 0,5 M. pH= 7,6.
- ❖ Tampón fosfato 0,01M, NaCl 0,15M. pH= 7,6.
- ❖ Tampón BSA: tampón fosfato 0,01 M, NaCl 0,15, BSA (albúmina sérica bovina) 1%, pH= 7,6.
- ❖ Tampón IGF I : tampón fosfato 0,04M, azida sódica 0,02%, Tween 20 0,05%, EDTA 0,01M, protamina sulfato 20 % (protamina Rovi ®). pH= 7,5.
- ❖ Tampón Trizma base (hidroximetil amino metano) 1 M.
- ❖ Tampón Trizma base 0, 855 M: obtenido por dilución 1:1,17 del anterior.
- ❖ Tampón etanol ácido : 87,5 % etanol, 12,5 % HCl 2 N.

B. Radioyodación de la hormona:

El marcaje, se realiza en este caso, por el método de la cloramina T, (Daughaday y cols. 1980, Chatelain y cols. 1983) con un efecto oxidante más general, no específico en el

aminoácido tirosina. Sobre una alícuota de 1 µg de IGF I disuelto en 100 µl de tampón IGF I añadimos los siguientes radiactivos:

- 25 µl de tampón fosfato 0,5 M.
- 0,5 mCi de I¹²⁵ (5 µl).
- 2,5 µg de cloramina T (2,5 µl una vez disuelta en tampón fosfato 0,05 M).
- Incubar 30 segundos
- Añadir 1 ml de 0,025 tris HCl para detener la reacción.

El rendimiento y la actividad específica de la hormona se determina por el método del ácido tricloro-acético (TCA), al igual que se realiza para la GH. La actividad específica media fue de 162 µCi/µg y el rendimiento medio de un 33%.

El producto de reacción se purifica por cromatografía en una columna de 56 * 1 cm rellena con Sephadex G-50 Fine, equilibrado en tampón Tris HCl (Tampón trizma base 0,025M tris HCl 0,25 % BSA. pH= 7,4) (Daughaday 1980, Daughaday y cols. 1982) y previamente saturada con tampón BSA. Obteniéndose 3 picos de radiactividad, el 1º con agregados de la hormona, el 2º con la hormona marcada y el 3º con el yodo libre.

C. Realización y Cinética del RIA:

Las muestras de plasma se pipetea diluidos 1:100. Para separar la IGF I de sus proteínas ligantes se utiliza la extracción con etanol ácido (Daughaday 1980).

*** PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN:**

Las muestras (50 µl) se incuban 30 minutos a temperatura ambiente con 450 µl de etanol ácido, se centrifugan 30 minutos a 3000 r.p.m., se decantan 250 µl de sobrenadante que se neutralizan añadiendo 100 µl de trizma base 0,855 M., se agitan y se diluyen para en tampón de RIA.

La recuperación de hormona marcada en plasma fue de 83,2 % y de hormona fría del 102% (Una recuperación por encima del 100%, es debido al error analítico intrínseco según Daughaday 1980).

Este método de extracción libera el 98% de la IGFBP-3, y del 25-40 % de la proteínas ligantes de bajo peso molecular, aunque éstas muestran muy poca interferencia en el RIA probablemente debido a una competición directa con el anticuerpo utilizado en el RIA,

sin embargo la IGFBP-3 parece mostrar una afinidad similar a la del anticuerpo, por lo tanto una efectiva separación de esta proteína permite al anticuerpo ser el lugar preferente de unión para la IGF I (Crawford y cols. 1992).

★ VALIDACIÓN DEL RIA:

Se comprobó por separación del extracto con carbón dextrano que éste estaba libre de proteínas ligantes en un 98%, frente al 43% en el caso de plasma sin extraer. También se comprobó que las diluciones del plasma extraído fueran paralelas a la curva patrón (Recommendations from the 3rd International Symposium on Insulin-Like Growth Factors. 1995), (figura 14).

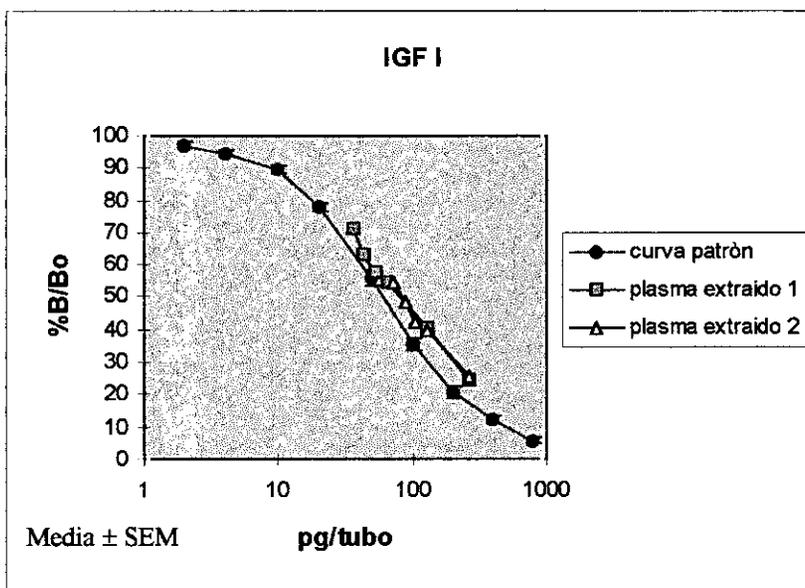


Figura 14: Curva patrón media del RIA de IGF I.

La curva patrón se pipetea en un volumen 200 μ l, en un rango de concentraciones que abarca desde 2 hasta 800 pg/tubo. Para control interno en todos los RIA valoramos los niveles de IGF I en un pool de suero.

También por triplicado se pipetea: **At**, **N**, cuyo valor medio fue del 2,2 % y **Bo**, cuyo valor medio fue del 21,5 %. Todos los tubos antes de la adición del anticuerpo se completan a un volumen final de 400 μ l (450 μ l en el caso del **N**) con tampón IGF I.

Un vez pipeteadas las muestras:

- Se añaden 50 µl por tubo del anticuerpo a una dilución final de 1:20000 disuelto en tampón IGF I.
- Se preincuba durante 24 horas a 4°C.
- Se añade a todos los tubos 15.000 c.p.m., de hormona marcada, en un volumen de 50 µl disuelta en tampón IGF I.
- Se incuba durante 24 horas a 4°C. Al final de este período de incubación se separa la IGF I unida al anticuerpo de la hormona libre mediante la adición de 500 µl de la mezcla que contiene el 2º anticuerpo, tal y como se describe para la LH, procediendo a continuación de la misma forma. La sensibilidad del RIA es de 10 pg/tubo con un coeficiente de variación interensayo e intraensayo del 7,2 % y del 5 %, respectivamente.

5.1.4 Radioinmunoanálisis de LHRH

Este método fue puesto a punto en nuestro laboratorio por la Dra. C. Alvarez (Tesis doctoral 1989).

A. Inmunorreactivos y soluciones tampón:

Se utilizó como hormona patrón y para yodar la NR564 adquirida a U.B.L. (Universal Biological Limited). El anticuerpo utilizado fue el anti-LHRH (Ferring). Reconstituidos siguiendo las instrucciones que acompañan a los reactivos.

La solución tampón (Tampón LHRH) utilizada para la realización del radioinmunoanálisis es una mezcla al 50% de los tampones BSA y EDTA, pH= 7,6.

B. Radioyodación de la hormona:

Marcamos con lactoperoxidasa 2,5 µg en 25 µl de ácido trifluoroacético (TFA) de hormona con 0,5 mCi de I¹²⁵, tal y como se ha descrito anteriormente, salvo que en este caso se utiliza para detener la reacción 1 ml de TFA al 0,1 %. En el caso de este péptido no se puede utilizar el método inespecífico de precipitación de proteínas con TCA para conocer el rendimiento.

El producto de reacción se purifica por cromatografía en una columna de carboximetilcelulosa CM-52, reconstituida en acetato amónico 0.2 mM. La purificación se hace de acuerdo con un gradiente iónico desde 0,2 mM hasta 0,2 M a pH= 7,4, utilizando

para ello una bomba peristáltica que mezcla ambas diluciones a una velocidad de 1 ml/minuto. Las fracciones se recogen en 50 µl de albúmina humana.

C. Realización y Cinética del RIA:

Los hipotálamos una vez procesados se diluyen 1:100 en tampón LHRH. La curva patrón de LHRH abarca un rango de concentraciones desde 0,25 hasta 50 pg/tubo.

En este caso los controles de actividad inespecífica (**N**), contienen 250 µl de tampón LHRH, la hormona yodada y 1,5 ml de etanol absoluto. En nuestro caso su valor fue del 3 %, y del 32 % para los controles de actividad específica (**Bo**). Todos los tubos antes de adicionar del anticuerpo se completan a un volumen final de 200 µl con tampón LHRH.

Un vez pipeteadas las muestras:

- Se añaden 50 µl por tubo del anticuerpo a una dilución final de 1:90000 disuelto en tampón LHRH.
- Se preincuba durante 24 horas a 4°C.
- Se añade a todos los tubos 10.000 c.p.m. aproximadamente de LHRH marcada en un volumen de 50 µl y disuelta en tampón de RIA.
- Se incuba 24 horas a 4°C. Al final de este período de incubación se separa la LHRH unida al anticuerpo de la LHRH libre mediante la adición de 1,5 ml de etanol absoluto a 4°C. Procediendo, a partir de ese momento, de la misma forma que en los RIAs anteriores. La sensibilidad del RIA es de 0,25 pg/tubo con un coeficiente de variación interensayo e intraensayo del 18 % y del 4 %, respectivamente.

5.1.5 Radioinmunoanálisis de somatostatina

El RIA de SS ha sido ampliamente validado por la Dra. Elena Vara, del departamento de Bioquímica de esta facultad.

A. Inmunorreactivos y soluciones tampón:

La hormona patrón utilizada fue somatostatina cíclica y para la yodación la Tyr-SS. El anticuerpo utilizado fue obtenido por la Dra. Elena Vara por inmunización de conejos con SS cíclica.

Las soluciones tampón usadas para la realización del RIA fueron:

- ❖ Tampón SS: Na_2HPO_4 0,04M, NaCl 0,14 M y EDTA 0,025 M, albúmina bovina 0,25%, pH= 7,4.
- ❖ Acetato amonio 0,2 M, pH= 4,4.
- ❖ Acetato amonio 0,002 M, dilución 1:100 del anterior, pH= 4,4.

B. Radioyodación de la hormona:

El marcaje, se realiza por el método de la lactoperoxidasa. Se marcan 5 μg de hormona con 0,5 mCi de I^{125} . El rendimiento y la actividad específica de la hormona se determina por el método del ácido tricloro-acético (TCA).

El producto de reacción se purifica por cromatografía en una columna de 5 * 0,9 cm de carboximetil celulosa CM-50, conectada a una bomba peristáltica con un flujo de 1 ml/minuto, a su vez conectada a un reservorio de tampón acetato 0,002 M, conectado a su vez a otro reservorio de tampón acetato 0,2 M, estableciendo un gradiente de concentraciones lineal.

C. Realización y cinética del RIA:

Los hipotálamos deben diluirse del orden de 1/200 en un tampón SS. En tubos de 4 ml se pipetearon 100 μl de anticuerpo específico para somatostatina diluido (dilución final del anticuerpo 1: 77.000), 500 μl de somatostatina marcada con I^{125} , con unas 7000 cpm, 100 μl de muestra o las soluciones estándar de somatostatina. Se incubaron a 4°C durante 48 horas.

La separación de la somatostatina libre de la ligada al anticuerpo se hizo añadiendo a todos los tubos excepto a los que sólo contienen la actividad total 1 ml de una suspensión de carbón-dextrano (0,25 % carbón y 0,025 % dextrano) en tampón fosfato 0,01 M.

Finalmente se mide la radiactividad del precipitado en un espectrofotómetro de centelleo sólido. Este precipitado debido a la separación con carbón dextrano contiene la fracción libre de la hormona, en vez de la unida como ocurre en el caso de la GH.

La sensibilidad del radioinmunoanálisis es de 0,032 pg/tubo y la zona del mínimo error corresponde al rango de concentraciones comprendido entre 10 y 80 pg/tubo (la curva se define entre 1,25 y 160 pg/tubo).

5.2 Valoración de proteínas

Se realizó mediante el método de Bradford, con azul brillante (Bradford 1976). La curva estándar se prepara partir de un stock de BSA (albúmina de suero bovina), cuya concentración inicial es de 1 mg/ml en tampón fosfato 0,01 M, abarca un rango de concentraciones desde 2 hasta 50 µg/ tubo, en solución salina en el caso de las hipófisis o HCl 0,1 N en el caso de los hipotálamos. Las muestras se midieron por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm.

6. DISEÑOS EXPERIMENTALES:

DISEÑO EXPERIMENTAL 6.1: Estudio del patrón de crecimiento por microknemometría en la rata macho normal

DISEÑO 6.1.1: Efecto de distintas pautas de administración de GH sobre el crecimiento. Estudio de la existencia de variaciones ultradianas en la velocidad de crecimiento.

El estudio se subdividió en dos diseños experimentales.

❖ Dosis única y diaria de GH.

Se utilizaron 20 ratas machos de 23 días de vida divididos en 2 grupos experimentales:

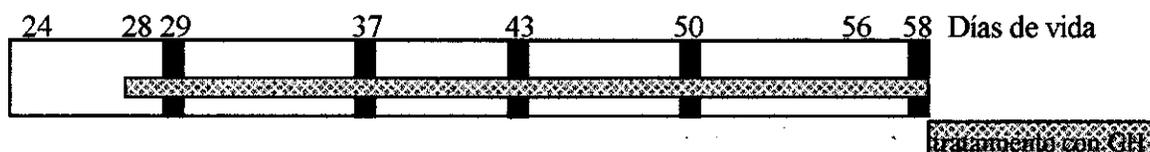
- Grupo A: Control. N=10.
- Grupo B: Tratadas con GH. N=10.

El grupo B recibió, desde los 28 a los 58 días de vida, una inyección s.c. diaria en el lomo de 1 U.I de GH en un volumen de 100 µl de suero salino, a las 10.00 horas, de lunes a viernes. El grupo control recibió el correspondiente volumen de suero salino.

Los animales fueron medidos por microknemometria y pesados a diario desde los 24 días de vida hasta los 57. Estos mismos animales fueron utilizados para el estudio de las variaciones ultradianas en la velocidad de crecimiento.

★Variaciones ultradianas

Con objeto de evaluar el momento del día de máximo crecimiento, se llevaron a cabo medidas cada 3 horas durante 24, de la longitud tibial por microknemometría, realizando las medidas nocturnas bajo luz roja para no alterar el patrón de iluminación, en los días especificados en negro en el siguiente esquema:



❖Administración intermitente o continua de GH.

41 machos fueron divididos en grupos de 7 animales (salvo el grupo E, con 6) y sometidos a las siguientes pautas de administración de GH:

- Grupo A: GH a las 10 horas.
- Grupo B: GH a las 14 h.
- Grupo C: GH a las 19 h.
- Grupo D: GH a las 10h., 14h. y 19 h.
- Grupo E: Administración continua de GH.
- Grupo F: Control.

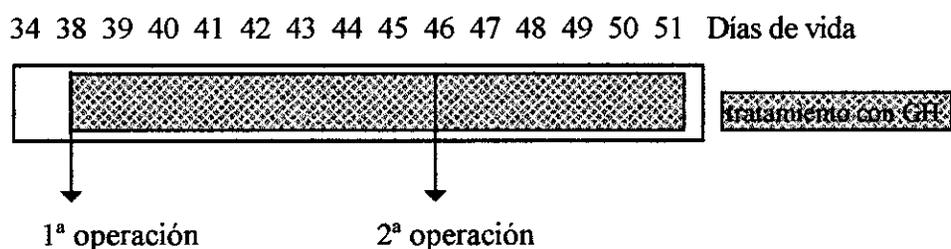
La dosis de GH administrada s.c. en 24 horas fue la misma para todos los grupos (1 U.I./rata). El grupo control recibió s.c. un volumen equivalente al de GH de solución salina, a las 3 horas descritas.

El implante subcutáneo de mini bombas osmóticas Alzet 2001 (flujo de 1µl/hora, capacidad de 250µl) garantizó la misma dosis de esta hormona liberada de forma constante, en el grupo E. El implante de la bomba (3 cm longitud * 0,7 cm de diámetro) se llevó a cabo haciendo un incisión dorsal, bajo anestesia con éter, entre el omóplato y la línea media. Debido a que la duración de las bombas era sólo de 7 días, hubo que realizar un segundo implante de las mismas al grupo E; para evitar daños tisulares mayores sobre la zona ya

erosionada por el primer implante, el segundo implante se llevo a cabo sin extraer la primera bomba, colocando la segunda en el lado simétrico del dorso del animal.

Los animales fueron medidos por microknemometría y pesados a diario desde los 38 días de vida hasta los 51. Al final del experimento los animales fueron sacrificados por decapitación, habiendo recibido los grupos A y D la inyección de GH de las 10 horas, recogándose la sangre, la hipófisis y los hipotálamos.

El esquema del diseño fue el siguiente:



Se cuantificó mediante RIA específico el contenido plasmático e hipofisario de GH, el contenido hipotalámico de SS y los niveles plasmáticos de IGF I.

DISEÑO 6.1.2: Efecto de la castración química sobre el crecimiento en el macho normal.

20 machos de 24 días de vida se sometieron a los siguientes tratamientos:

- Grupo A: Control. N=10.
- Grupo B: Tratados con un análogo de LHRH. N= 10.

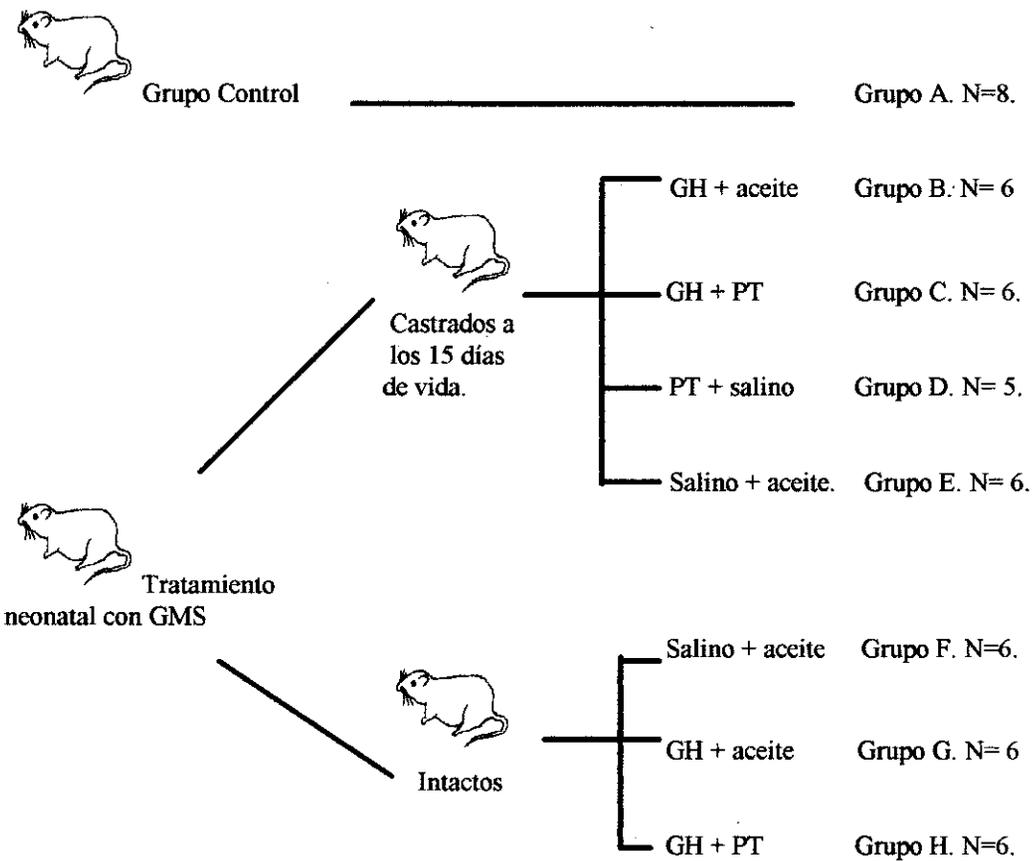
El análogo de LHRH inyectado fue Triptoreline® (LASA), cuya diferencia con el péptido hipotalámico es la sustitución del aminoácido triptófano por glicina en la posición 6ª. La primera inyección se llevó a cabo a los 27 días de vida a una dosis de 1,875 $\mu\text{g/g}$ peso corporal y la segunda a los 48 días a una dosis de 0,7 $\mu\text{g/g}$ peso corporal.

Se pesaron y se midió la longitud tibial diariamente, desde los 28 a los 60 días de vida. Se sacrificaron a los 62 días de vida, extrayéndose la sangre y la hipófisis; para la posterior determinación mediante RIA de los niveles plasmáticos de GH y LH, y el

contenido hipofisario de estas hormonas; además se pesaron los testículos y las vesículas seminales.

DISEÑO EXPERIMENTAL 6.2: Estudio del crecimiento en la rata macho tratada con GMS. Efecto de la castración, y repercusión de la administración de GH, PT o ambas en animales intactos o castrados.

49 machos fueron divididos en los siguientes grupos experimentales:



Estos animales fueron pesados diariamente desde su nacimiento hasta el final del experimento. Se midieron por microknemometría a diario desde los 22 días de vida hasta los 58, coincidiendo con el tratamiento de GH, que fue administrado en dos inyecciones s.c. de 0,5 U.I. cada una a las 10:30 y a las 15.30; sus correspondientes controles recibieron s.c. un volumen equivalente de suero salino (150 µl).

La castración se llevó a cabo a los 15 días de vida, bajo anestesia con éter, haciendo una incisión en el abdomen por encima del pene, cosiendo el músculo con catgut® y la piel con seda. Por último, se aplicó colodión sobre la herida para terminar de sellarla.

El propionato de testosterona fue administrado de la forma siguiente:

* En los días 31 y 34 de vida se inyectó s.c. 100 µg de esta droga (Testex Leo®, laboratorios Leo S.A.) disuelto en 160 µl de aceite de maíz.

* Los días 37, 44 y 51 días recibieron una inyección s.c. de 0,3 mg de Testoviron Depot® en un volumen de 150 µl de aceite de maíz; ya que este medicamento debido a su composición (25 mg de PT y 110 mg de enantato de testosterona, equivalentes a 100 mg de testosterona) presenta una acción más lenta y prolongada.

Los grupos B, E, F y G recibieron subcutáneamente un volumen equivalente del vehículo (aceite de maíz), 160 y 150 µl respectivamente.

Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos sobre los ejes hipotálamo-hipófiso-gonadal y somatotropo, al final del experimento los animales se sacrificaron por decapitación, conservando la hipófisis y el hipotálamo para posteriores determinaciones hormonales de GH, LH, LHRH y SS. Se evaluaron los niveles plasmáticos de IGF I. Se pesó el hígado, los testículos, y las vesículas seminales.

DISEÑO 6.3: Estudio del proceso de crecimiento en la rata hembra.

Subdividido a su vez en dos partes experimentales:

DISEÑO 6.3.1: Estudio del papel de la GH en la rata hembra normal o deficitaria en GH.

49 ratas hembras fueron sometidas a los siguiente tratamientos:

- Grupo A: Control. N=10.
- Grupo B: Control + GH. N= 9.
- Grupo C: Tratamiento neonatal con GMS + GH. N =8.
- Grupo D: Tratamiento neonatal con GMS + GHRH. N =8.
- Grupo E: Tratamiento neonatal con GMS + salino i.p. N= 7

➤ Grupo F: Tratamiento neonatal con GMS + salino s.c. N= 7.

Se realizó el seguimiento diario del peso desde el nacimiento y de la longitud tibial desde el día 25 de vida hasta el 60, así como del inicio de la pubertad (apertura vaginal) realizando frotis vaginales desde ese momento hasta el final del experimento controlando así, la regularidad del ciclo estral.

El tratamiento con 1 U.I de GH s.c. (dividida en dos inyecciones de 0,5 U.I cada una a las 10.00 h. y 16.00 h.) y con GHRH i.p. (igualmente dividida en dos inyecciones de 100 µg cada una, a las mismas horas) comenzó a los 24 días de vida manteniéndose hasta el día del sacrificio, día 61, en el que los animales fueron inyectados únicamente a las 10.00 horas. El grupo control (A) y el grupo GMS (F) no tratados con GH fueron inyectados con 150 µl/inyección de suero salino s.c.; el grupo tratado con GMS (E) fue inyectado intraperitonealmente con 200 µl/inyección de suero salino, volúmenes equivalentes en ambos casos a los inyectados en cada tratamiento.

Una vez sacrificados se recogió la sangre, la hipófisis y el hipotálamo, tal y como se ha descrito anteriormente, para la posterior cuantificación mediante RIA del contenido hipofisario y de los niveles plasmáticos de LH e IGF I, así como el contenido hipotalámico de SS. Además se procedió a pesar el hígado, el útero y los ovarios.

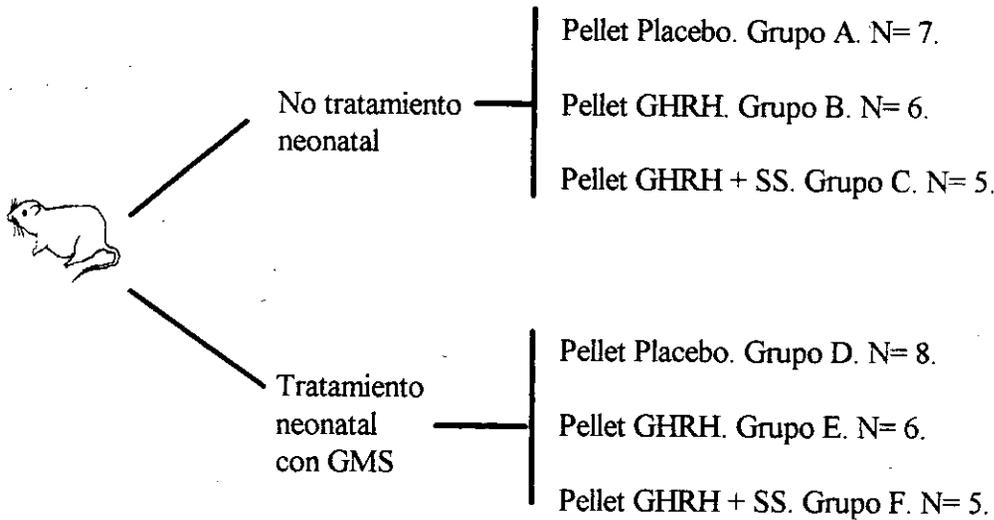
El día del sacrificio se extrajeron ambas tibias de algunas hembras control y algunas hembras tratadas con GMS, conservándose en formol al 4%, para posteriores estudios histológicos del cartilago de crecimiento.

Estos estudios fueron llevados a cabo por el Dr. Emilio Delgado Baesa del Departamento de Histología de la Universidad Autónoma de Madrid:

Se procedió en primer lugar a retirar el componente femoral y la región del tarso, liberando al máximo los componentes de partes blandas, a continuación las piezas fueron fijadas en formol al 10%, descalcificadas en ácido nítrico al 7%, e incluidas en parafina, tallando un corte según el plano frontal (tercio medio) en láminas de 5 µm para su posterior tinción por hematoxilina y eosina.

DISEÑO 6.3.2: Estudio del papel de la GHRH en el proceso de crecimiento mediante su administración continua, de forma aislada o combinada con SS.

37 ratas hembras de 33 días de vida fueron tratadas como sigue:



La operación para el implante s.c. de los pellets se realizó a los 34 días de vida bajo anestesia con éter. Se procedió a una incisión dorsolateral cortando únicamente la piel, que una vez introducido el pellet se cosió con seda.

Los pellets fueron fabricados por *Innovative Research of America*; son similares a una pequeña pastilla de aproximadamente 0,3 mm, y constan de una matriz biodegradable que libera de manera continua y eficaz el producto activo. La matriz se diseña en cada caso en función del producto a incluir en la misma. Su duración fue de 21 días liberando una dosis constante de GHRH de 595 $\mu\text{g}/\text{día}$. A un grupo de ratas normal y a otro deficitario en GH se les implantó un pellet placebo en las mismas condiciones que los grupos tratados.

La somatostatina utilizada fue Sandostatin®, y la dosis suministrada fue 2 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ s.c. en un volumen de 100 μl /inyección a las 17.00 horas. A los grupos B y E se les inyectó el mismo volumen de solución salina.

Se comenzó a observar la apertura vaginal y a medir diariamente por microknemometría a los 36 días, y fueron pesadas desde el nacimiento. Desde el momento en que presentaban apertura vaginal se procedió a la observación al microscopio de los frotis vaginales.

Los animales fueron sacrificados por decapitación a los 56 días de vida. Se extrajo la hipófisis, el hipotálamo y el hígado. La hipófisis, una vez pesada en seco, el hipotálamo y el plasma fueron congelados para el posterior análisis por RIA de las siguientes niveles hormonales: contenido hipotalámico de SS, contenido hipofisario de GH, y niveles plasmáticos de IGF I.

DISEÑO 6. 4: Estudio de la repercusión sobre el crecimiento de la alteración en la diferenciación sexual del hipotálamo.

16 ratas hembras y 16 machos fueron distribuidos en los siguientes grupos experimentales:

- Grupo A: Hembras normales. N= 8.
- Grupo B: Hembras tratadas neonatalmente con propionato de testosterona. N= 8.
- Grupo C: Machos normales. N= 8.
- Grupo D: Machos castrados neonatalmente en el 2º día de vida. N= 8.

Las hembras se inyectaron con 1 mg de propionato de testosterona disuelto en 100 µl de aceite de maíz (Testex Leo®, Laboratorios Leo) subcutáneamente en el día quinto de vida, sellando el orificio de la aguja con colodión (Vaticón y cols. 1985). Sus correspondientes controles se inyectaron con 100 µl del vehículo.

Los machos fueron anestesiados por frío, se practicó una incisión abdominal que fue sellada con pegamento quirúrgico (Histoacryl®) tras la extirpación de los testículos. Las camadas se reanimaron por calor, con una manta eléctrica a 37° C, y fueron inmediatamente devueltos a su madre (Chowen y cols. 1993). El grupo C se sometió a operación simulada. Debido a la posible pérdida de animales, por infección u otras causas, en este caso las camadas fueron homogeneizadas a 11 crías por madre, manteniendo machos y hembras juntos hasta el destete.

Los animales se midieron por microknemometría y se pesaron desde el día 23 al 57 de vida, comenzando en ese momento a observar la aparición de pubertad (separación balano-prepucial o apertura vaginal), y realizando en el caso de las hembras, frotis vaginales desde el día de apertura vaginal. Fueron sacrificados por decapitación a los 58 días de edad. Se

procedió a pesar en seco la hipófisis, los ovarios, las vesículas seminales, cuando eran observables, el útero y el hígado.

DISEÑO 6.5: Estudio del proceso de crecimiento compensatorio producido tras ayuno e ingesta reducida, y su posible potenciación por administración exógena de GH.

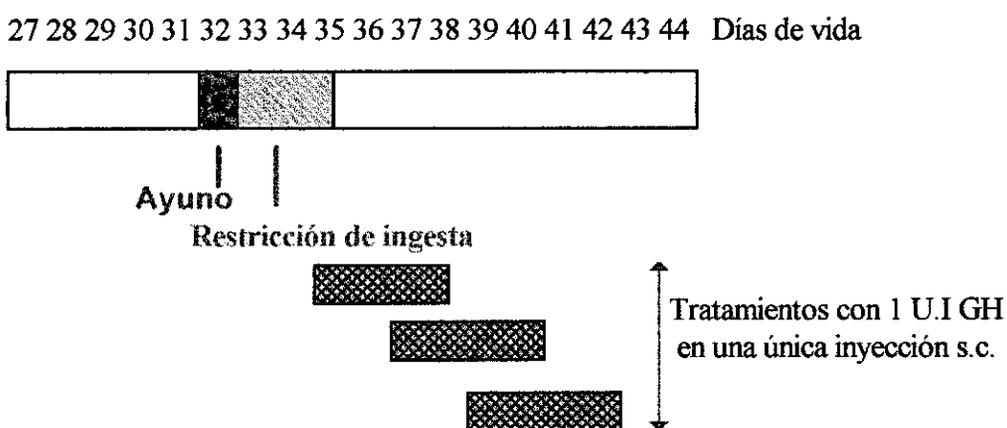
Este estudio se subdividió en tres diseños experimentales diferentes:

DISEÑO 6.5.1: Estudio en la rata macho normal.

31 ratas macho fueron divididas en los siguientes grupos experimentales:

- Grupo A: Ayuno (N=7).
- Grupo B: Ayuno + GH del día 35 al 38 de edad (N=6).
- Grupo C: Ayuno + GH del día 37 al 40 de edad (N=6).
- Grupo D: Ayuno + GH del día 39 al 42 de edad (N=6).
- Grupo E: No ayuno (N=6).

De acuerdo con el siguiente esquema:



En el día 32 de vida los animales fueron separados en jaulas individuales y sometidos a una privación total de comida; en los días 33 y 34 se les alimentó con un pellet de pienso de 4 g, que se introducía en cada una de las jaulas, lo que supone una alimentación del 30% de lo

habitual, y en el día 35 volvieron a ser agrupados y alimentados “*ad libitum*”. El aislamiento permitió asegurar que cada animal comía únicamente su ración. Cada una de estas operaciones se realizaba posteriormente a ser pesados y/o medidos.

Antes de comenzar la restricción de dieta, los animales se midieron a diario por microknemometría, como referencia de crecimiento normal. Al comienzo del período de restricción de dieta los animales pesaban de media 112 g.

La medida de longitud tibial se interrumpió momentáneamente en estos días para evitar molestar aún más a los animales y se reanudó en el día 35. En este mismo día comenzó el tratamiento con GH al grupo B. Los animales se inyectaban una vez había terminado su manipulación para la medida de crecimiento y peso (12.30 h.). Acabado el último tratamiento con GH, al grupo D, se continuó midiendo y pesando a los animales hasta su sacrificio el día 44. Durante todo el período de ayuno el agua estuvo disponible “*ad libitum*”.

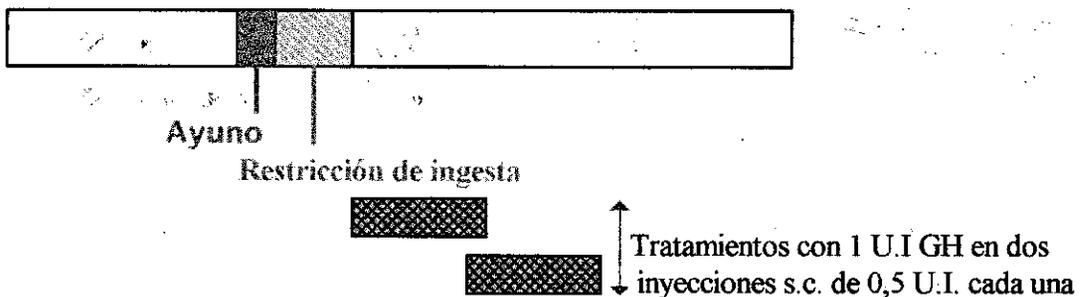
DISEÑO 6.5.2: Estudio en la rata macho tratada con GMS.

El diseño experimental utilizando 26 ratas macho fue el siguiente:

- Grupo A: Tratamiento neonatal con GMS + ayuno N= 6.
- Grupo B: Tratamiento neonatal con GMS + ayuno + GH del día 62 al 65 de vida. N= 6.
- Grupo C: Tratamiento neonatal con GMS + ayuno + GH del día 65 al 68 de vida. N= 5.
- Grupo D: Sin tratamiento neonatal + ayuno. N= 4.
- Grupo E: Sin tratamiento neonatal ni ayuno. N= 5.

El esquema del desarrollo temporal del experimento se detalla a continuación :

53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 Días de vida



En el día 59 de vida los animales se separaron en jaulas individuales con privación total de comida; en los días 60 y 61 se les alimentó con un pellet de pienso de 6 g, introducido en las jaulas, lo cual supone una restricción al 30% de la alimentación habitual (aproximadamente 20 g), y en el día 62 volvieron a ser agrupados y alimentados “*ad libitum*”. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo después de ser medidos y pesados. En este caso no hubo interrupción alguna de la medida de longitud tibial.

Al igual que en el diseño experimental anterior, hubo un período de observación previo a la restricción de dieta, midiendo por microknemometría y pesando a diario. Al comienzo del período de ayuno los animales control pesaban de media 330 g y los tratados con GMS 260 g.

En el día 62 con la realimentación, comenzó el tratamiento con GH en dos inyecciones s.c. de 0,5 U.I cada una, a las 10.00 y a las 16.00 h. Durante todo el período de ayuno el agua estuvo disponible “*ad libitum*”.

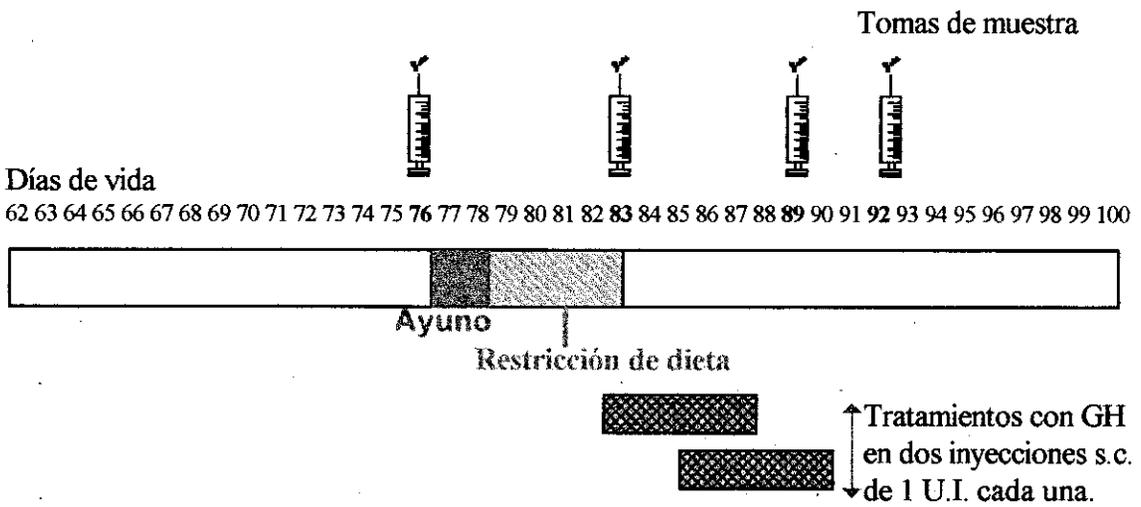
Una vez finalizado el tratamiento con GH en los diversos grupos, se continuaron midiendo y pesando hasta los 73 días, en que se sacrificaron.

DISEÑO 6.5.3 : Estudio en la rata macho tratada con GMS prolongando el período de ayuno.

El diseño experimental utilizando 48 ratas macho fue llevado a cabo de la siguiente manera:

- Grupo A: Sin tratamiento neonatal con GMS pero con ayuno N= 7.
- Grupo B: Sin tratamiento neonatal con GMS ni ayuno. N= 7.
- Grupo C: Tratamiento neonatal con GMS, sin ayuno. N= 7.
- Grupo D: Tratamiento neonatal con GMS + ayuno. N= 7.
- Grupo E: Tratamiento neonatal con GMS + ayuno + GH del día de vida 83 al 87. N= 7.
- Grupo F: Tratamiento neonatal con GMS + ayuno + GH del día de vida 86 al 90. N= 7.

En el siguiente esquema se detalla el desarrollo temporal de experimento:



En el día 76 de vida se llevó a cabo una extracción de sangre basal a 10 ratas sin tratamiento con GMS, y a otras 10 con dicho tratamiento.

En el día 77 se separaron en jaulas individuales con privación total de comida, que se mantuvo también en el día 78. Desde el día 79 al 82 se les alimentó con un pellet de pienso de 6 g cada día, introducido en las jaulas, lo que supone una restricción del 70% de la alimentación habitual (aproximadamente 20 g).

En el día 83 previamente a ser agrupados y realimentados “*ad libitum*”, se realizó una nueva extracción de sangre, bajo anestesia con éter a los grupos A, B, C, y 10 ratas al azar entre D, E y F; en este mismo día comenzó el tratamiento con GH en dos inyecciones s.c. de 1 U.I cada una, a las 10.00 y a las 16.00 h, su correspondiente grupo control también sometido a ayuno recibía el mismo volumen inyectado en solución salina (200 µl). Durante todo el período de ayuno el agua estuvo disponible “*ad libitum*”. Dos días después de haber finalizado cada uno de los tratamientos con GH, es decir, los días 89 (grupo E) y 92 (grupo F), se procedió de nuevo a extraer de sangre bajo anestesia con éter, tanto al grupo sometido al tratamiento como a su control “ayunado” (E, D, F y D).

Todas estas manipulaciones se realizaban después de que los animales fueran medidos y pesados. Estas muestras fueron utilizadas para posteriores determinaciones del los niveles plasmáticos de GH e IGF I.

Los animales fueron medidos por microknemometría y pesados a diario durante todo el experimento desde el día 62 de edad hasta el 100, en que fueron sacrificados. Al comienzo

del período de ayuno los animales control pesaban de media 360 g y los tratados con GMS 300 g.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS:

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar de la media, excepto donde se especifique lo contrario.

Debido a las diferencias existentes entre los diseños experimentales, se aplicaron distintos análisis estadísticos para su estudio. En general la evolución ponderal o de longitud se analizó a través de un ANOVA de medidas repetidas, que proporciona información sobre las diferencias existentes entre los grupos y su comportamiento en función del tiempo.

La mayoría de los parámetros estudiados fueron analizados a través de un ANOVA factorial de una vía, procediendo a establecer comparaciones *a posteriori* con el test de Sheffé.

En el caso de los diseños experimentales 6.2, 6.3 y 6.4 se ha utilizado el análisis ANOVA factorial de dos vías. En este tipo de análisis se plantea la hipótesis nula de no interacción entre los efectos principales, pasando a realizar análisis para los efectos principales en el caso de no interacción. En el caso de interacción, las diferencias entre los distintos factores para cada diferente nivel se contrastaron con los mismos test *a posteriori* que en el ANOVA de una vía.

En algún caso debido a que las comparaciones a establecer se centraban en dos grupos se analizaron por una T de Student.

El paquete estadístico utilizado fue de Apple Inc. Se considera como límite de significación el valor de $p < 0.05$.

Además en los diseños experimentales 6.5.* se utilizó el análisis de regresión lineal para estudiar la velocidad de crecimiento en cada grupo una vez transcurrido el período de ayuno.

MEDIA MÓVIL

En los diseños experimentales 6.1.1, 6.3.1 y 6.5.3 con objeto de visualizar las diferencias en velocidad de crecimiento en cortos intervalos de tiempo, se calcularon las

“tasas de crecimiento tibial diarias” de forma similar a una media móvil (Hermanussen y cols. 1985).

Cada serie individual de datos se dividió en intervalos solapados de 4 días, evaluando la pendiente de la regresión lineal para cada intervalo y asignando el valor al día central del mismo, comenzando el siguiente intervalo 0,5 días después. Es decir, el primer intervalo contiene los días de observación 1, 2, 3, 4 y 5 (día central 3), el siguiente intervalo comienza en 1,5 y acaba en 5,5 (día central el 3,5) por lo que queda excluido el día 1, y todavía no estaría incluido el 6.

La fórmula utilizada fue la siguiente, donde la pendiente (b) de la regresión lineal, se calcula en función de los días (x), la longitud tibial (y) y el número de datos incluidos en el intervalo (n).

$$b = \frac{\sum xy - 1/n (\sum x)(\sum y)}{\sum x^2 - 1/n (\sum x)^2}$$

También se calculó el límite superior e inferior de confianza al 95% de la pendiente (Hermanussen y cols. 1995).

FUNCIONES GOMPERTZ

Para caracterizar el patrón de crecimiento y describir los incrementos de velocidad se desarrolló una técnica matemática que busca estructuras locales (Burmeister y cols. 1997, Hermanussen y cols. 1997a, 1997b), representadas por funciones de tipo doble exponencial, es decir en forma de S. Para cada serie individual de medidas de longitud, se analizaron intervalos o “ventanas” de 4 o mas días, definidas por la siguiente expresión en función del tiempo (t):

$$g(t) = a_1 + a_0 e^{-(\beta + \gamma t)}$$

El programa proporciona una representación gráfica de los datos de longitud con el ajuste a la doble exponencial y define para cada una de esas dobles exponenciales 5 parámetros :

- amplitud/ a_0 .

- longitud inicial (a_1).
- amplitud del ajuste (a_0).
- parámetro de tiempo (β).
- pendiente (γ).

El parámetro amplitud/ a_0 nos indica, en forma de proporción, la similitud que existe entre la amplitud real del intervalo (en términos de diferencia entre máximo y mínimo) y la calculada mediante el ajuste a la función, a_0 . Debido a que sólo trabajaremos con esta amplitud calculada, a partir de este momento la designaremos como amplitud.

La longitud inicial antes del miniestirón está definida por a_1 .

Gamma representa la pendiente y guarda relación entre la altura y la anchura de la ventana en la que tenemos definida la función, es decir relaciona la amplitud del miniestirón con su duración en el tiempo.

El punto de inflexión, es el punto donde la función pasa de ser creciente a decreciente, por lo que nos indicaría el punto donde la velocidad de crecimiento es máxima, y viene definido por $-\beta/\gamma$, este valor aparece en la gráfica marcado sobre el eje de abscisas (figura 15).

El programa informático desarrollado a este efecto busca dobles exponenciales dentro de esos intervalos, es decir, recorre cada serie de medidas de la longitud tibial de manera individualizada: comienza con 4 puntos (medidas), avanzando y cerrando el intervalo cuando la dispersión es demasiado alta como para que los nuevos puntos incluidos correspondan a la misma función exponencial. Entonces comienza una nueva búsqueda a derecha e izquierda. De esta forma algunas medidas se solapan entre dos intervalos al ajustarse, y por tanto pertenecer, a ambos.

De esta forma, se puede acceder a información sobre la existencia o no de incrementos individuales significativos, así como la forma de estos estirones.

Se consideraron como funciones significativas, aquellas que :

- presentaban una amplitud superior a dos veces el error de la medida por microknemometría.
- mostraban al menos un 70% de coincidencia entre la amplitud real y la amplitud de la respectiva función exponencial (a_0), es decir la ventana contiene una función completa o casi completa.

- tenían una pendiente superior a 10, ya que un valor superior indica una ventana muy estrecha y de muy rápido incremento (Burmeister y cols. 1997, Hermanussen y cols. 1997a, 1997b).

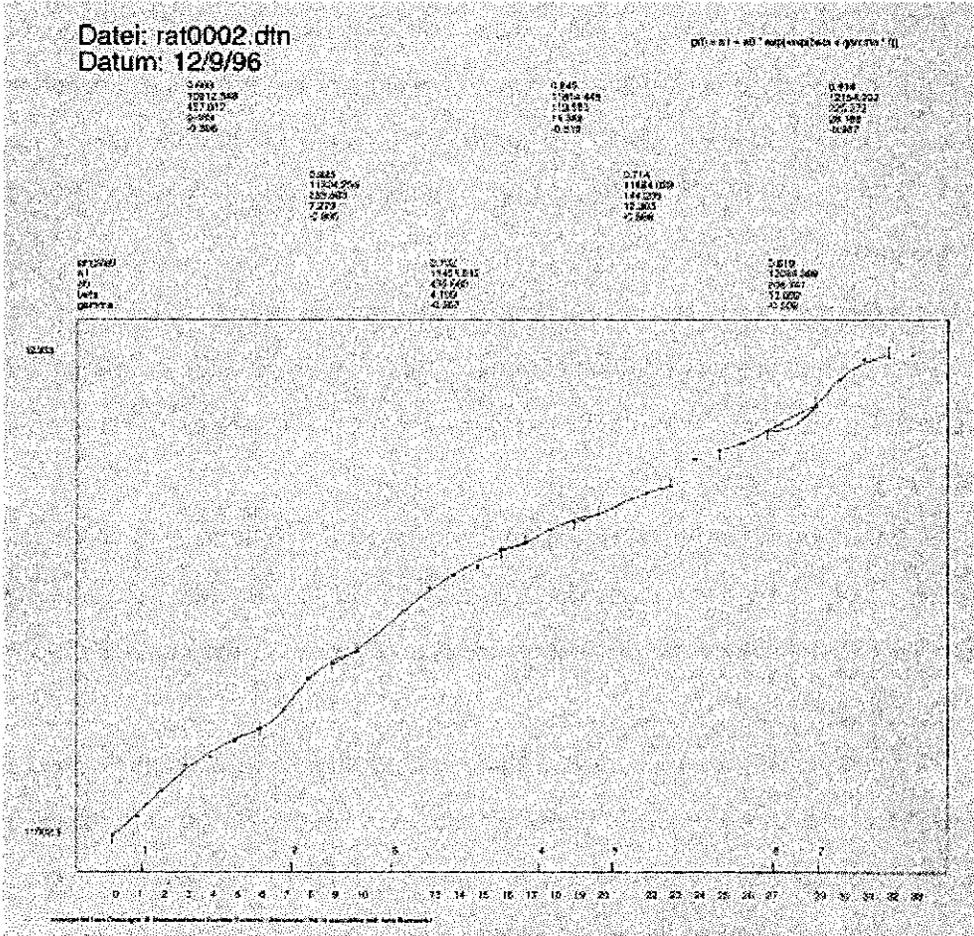


Figura 15: Representación gráfica de las funciones Gompertz de una rata macho normal.

Este modelo matemático se desarrolló en el departamento de matemáticas, cátedra de matemática práctica, en la Universidad Christian-Albrechts de Kiel, Alemania, por los doctores L. Grasedyck y J. Burmeister.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL PATRÓN DE CRECIMIENTO EN LA RATA NORMAL.

La aplicación de la microknemometría a la medida diaria de la longitud tibial en la rata, ha permitido la obtención de los siguientes resultados:

1.1 Crecimiento espontáneo

La rata macho normal muestra una ganancia de longitud media diaria de alrededor de 550 μm , y de 400 μm en el caso de la hembra normal, en animales de aproximadamente 40 días de vida, siendo el error técnico medio de 100 μm .

En la figura 16a puede observarse el patrón de crecimiento en ratas normales evaluado como longitud tibial, y la correspondiente evolución ponderal, en la figura 16b, poniendo de manifiesto las diferencias existentes entre estos parámetros, así como el diferente comportamiento según el sexo del animal.

No existe una diferencia inicial ni en peso ni en la longitud tibial, sin embargo las hembras mantienen un incremento total, tanto ponderal como de longitud tibial significativamente inferior a los machos, comenzando a separarse a partir de los 35 días en peso y de los 40 en longitud, aproximadamente, y llegando a una talla y un peso final inferior, tal y como se recoge en la tabla I.

Tabla I. INCREMENTO MEDIO EN LONGITUD TIBIAL (mm) E INCREMENTO PONDERAL MEDIO (g) DESDE LOS 26 HASTA LOS 57 DÍAS DE VIDA.

	Inicial (mm)	Final (mm)	Incremento (mm)	Inicial (g)	Final (g)	Incremento (g)
Machos	29,15 \pm 0,3	48,47 \pm 0,25	19,32 \pm 0,2	56,44 \pm 1,4	306,87 \pm 5,9	250,4 \pm 4,9
Hembras	28,6 \pm 0,17	44,17 \pm 0,36*	15,59 \pm 0,29*	55,37 \pm 0,99	216,12 \pm 5,8*	160,75 \pm 5,3*

* $p < 0,0001$ vs machos normales. Media \pm SEM.

Tal y como puede observarse las diferencias entre machos y hembras son más marcadas en peso que en longitud tibial: por ejemplo, a los 57 días, las hembras presentan una longitud inferior en un 8,8% a la de sus hermanos, mientras que en peso pasa a ser de casi un 30%.

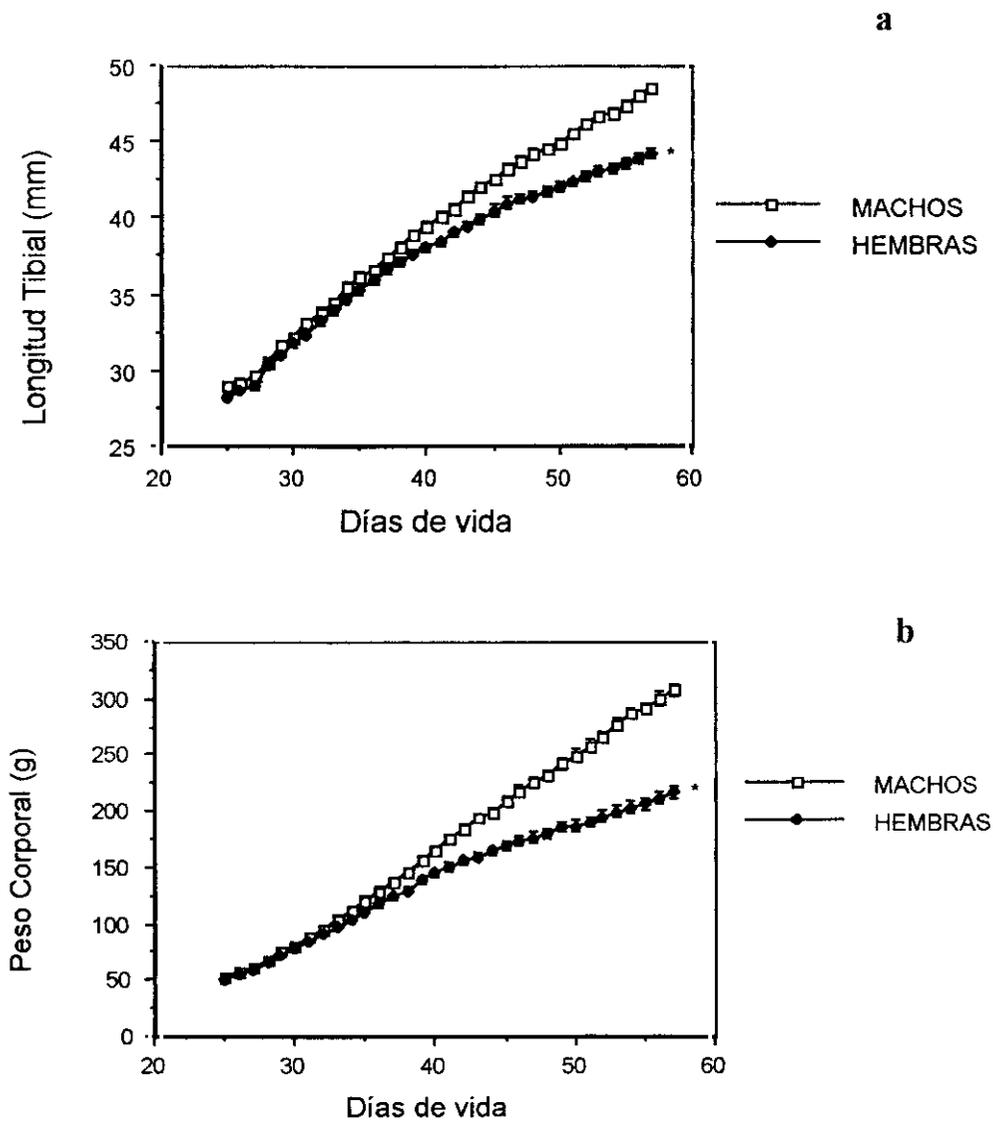


Figura 16. Longitud tibial media \pm SEM de animales machos y hembras normales (a) y evolución ponderal media de animales machos y hembras normales (b), desde los 26 hasta los 57 días de vida. * $p < 0,0001$ vs machos.

1.1.1 Variaciones Infradianas

La microknemometría permite, además observar la existencia de oscilaciones periódicas en la velocidad de crecimiento de estos animales.

La representación de la velocidad de crecimiento, utilizando una modificación de la media móvil, tal y como se ha descrito en material y métodos, muestra una dinámica particular con variaciones espontáneas de la velocidad de crecimiento. El rango de confianza (al 95%) es muy estrecho lo que excluye la posibilidad de una tasa de crecimiento lineal con una cierta variación debida al azar, sugiriendo la existencia de

“miniesticiones”. Este fenómeno se presenta tanto en animales machos como hembras, tal y como puede observarse en la figura 17. La amplitud de los miniesticiones es máximo en las edades más tempranas de los animales, y va disminuyendo según avanza la edad.

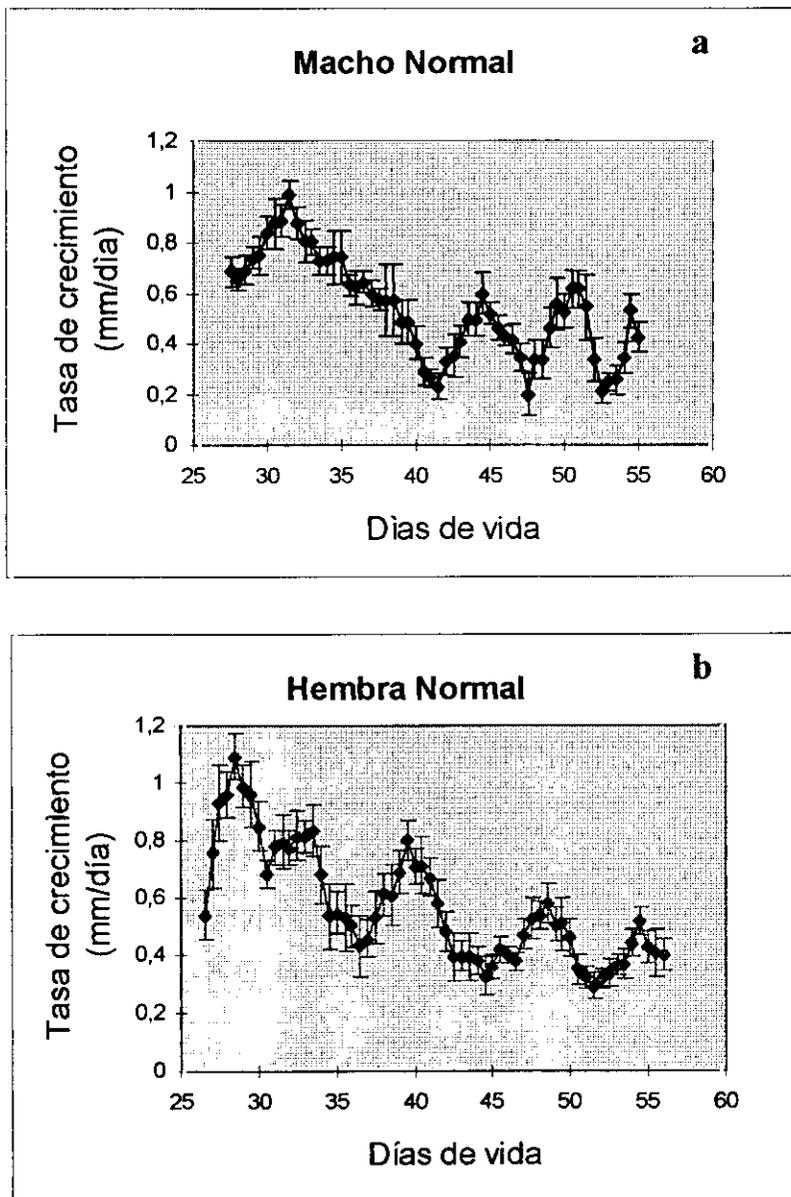


Figura 17. Media móvil de la tasa de crecimiento media de una rata macho normal (a) y una rata hembra normal (b). Se incluyen sus límites de confianza al 95 %.

1.1.2 Variaciones Ultradianas

La sensibilidad del microknemómetro permite también, la realización de medidas repetidas cada 3 horas en un periodo de 24 horas.

La figura 18 presenta la variación media en los incrementos de longitud tibial, en un grupo de machos normales, medidos cada 3 horas en los días 29, 37, 43, 50 y 58 de edad. La longitud de la tibia no se incrementa de manera constante y continua de un periodo al siguiente, sino que entre las 6 y las 9 horas aparece un “estirón“, que supone el $44,5 \pm 3,7$ % del incremento total correspondiente a las 24 horas, y es significativamente mayor que el resto de los tiempos estudiados ($p < 0,005$), con la excepción del incremento entre las 21 y 24 horas que supone un $21 \pm 4,8$ % del incremento total.

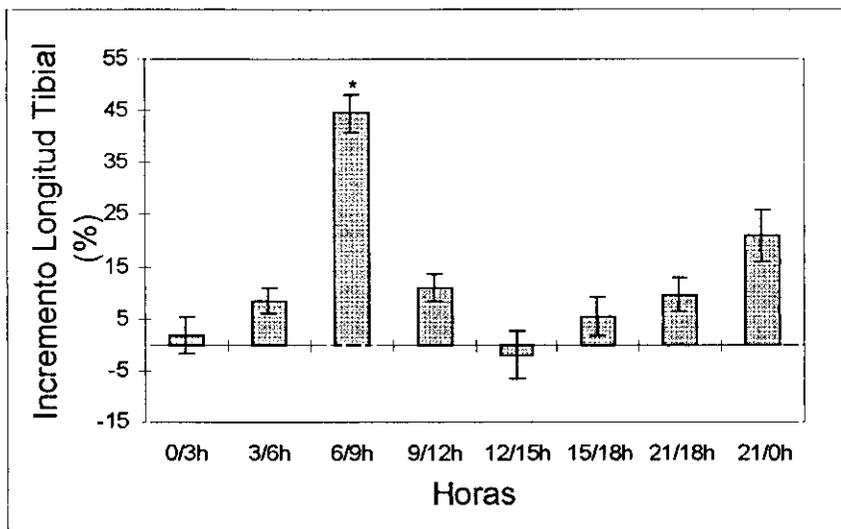


Figura 18. Incremento medio \pm SEM de la longitud tibial expresado en % sobre el crecimiento correspondiente a 24 horas en animales macho normales. * $p < 0,005$.

1.2 Estudio del efecto de distintas pautas de administración de GH sobre el patrón de crecimiento en la rata macho normal.

El tratamiento con 1 U.I./día/rata de GH a ratas macho normales desde los 28 a los 58 días de vida, no modifica la evolución ponderal ni la medida diaria de longitud tibial (figura 19).

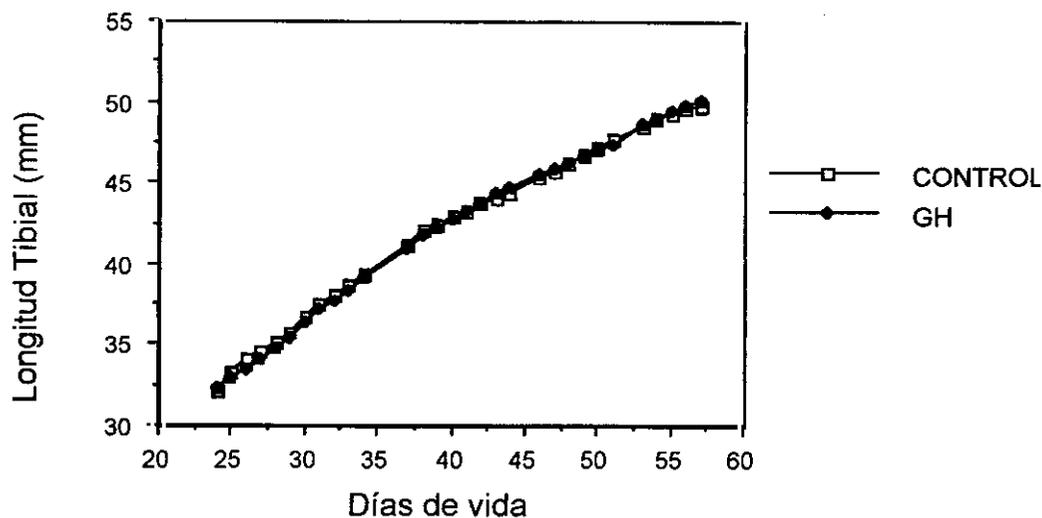


Figura 19. Longitud tibial media de ratas machos normales desde los 24 hasta los 58 días de vida.

El incremento medio total a lo largo del período de estudio de ambos parámetros se recoge en la tabla II.

Tabla II. INCREMENTO MEDIO DE LA LONGITUD TIBIAL Y PONDERAL DESDE LOS 24 HASTA LOS 58 DÍAS DE VIDA.

Media \pm SEM	Grupo control	Grupo GH
Δ Peso (g)	269,4 \pm 4,5	262,55 \pm 6,58
Δ Longitud Tibial (mm)	17,449 \pm 0,21	17,462 \pm 0,24

La administración de GH a ratas macho normales a la misma dosis que en el caso anterior, pero siguiendo distintas pautas (inyecciones puntuales a distintas horas del día, de manera pulsátil o en infusión continua), no produjo cambios significativos ni en incremento de longitud tibial o ponderal (tabla III), ni en la evolución de estos parámetros a lo largo del tiempo.

Tabla III. INCREMENTO DE LONGITUD TIBIAL Y PONDERAL MEDIO DESDE LOS 38 HASTA LOS 50 DÍAS DE VIDA.

Media \pm SEM.	Control	10 horas	14 horas	19 horas	10+14+19h	continua
Δ Peso (g)	111,71 \pm 2,57	112,57 \pm 3,2	111,14 \pm 1,44	118,28 \pm 5,45	107,86 \pm 2,53	103,33 \pm 4,26
Δ Longitud (mm)	5,77 \pm 0,055	5,96 \pm 0,23	6,16 \pm 0,24	6,33 \pm 0,23	5,95 \pm 0,3	5,53 \pm 0,25
GH plasma(ng/ml)	59 \pm 6,6*	8 \pm 1,4	20 \pm 6,4	25 \pm 8,7	1,8 \pm 0,6	9,7 \pm 3,4

*p < 0,01 vs resto de los grupos.

El estudio endocrinológico posterior en estos últimos animales no ha puesto de manifiesto diferencias significativas en el contenido hipotalámico de SS, ni en el contenido hipofisario de GH, o en los niveles plasmáticos de IGF I. Sin embargo todos los grupos tratados muestran un descenso significativo ($p < 0,01$) en los niveles plasmáticos de GH, con respecto al grupo control (tabla III)

1.3. Efecto de las hormonas sexuales sobre el crecimiento en la rata macho normal: Administración de un análogo de LHRH.

El tratamiento con un análogo de LHRH en ratas machos normales desde los 28 hasta los 60 días de vida, no produce ningún cambio ni en la longitud tibial (figura 20) ni en el peso corporal, ya sea calculando la diferencia entre los valores al comienzo de la observación y el final de la misma, o la posible modificación de estos parámetros en el transcurso del tiempo.

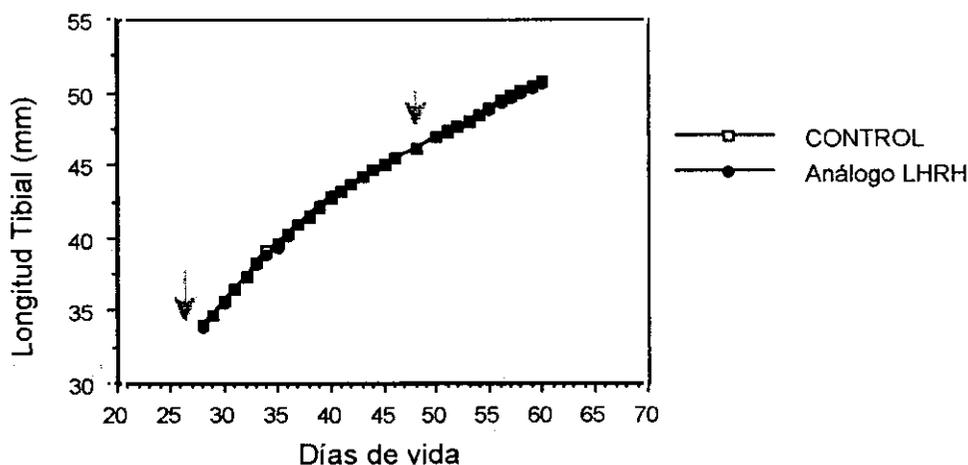


Figura 20. Longitud tibial media \pm SEM de ratas macho normales y tratadas con análogo de LHRH desde los 28 hasta los 60 días de vida. La flecha marca las inyecciones de análogo de LHRH (Triptoreline®). 1ª inyección 1,875 $\mu\text{g/g}$ Peso Corporal (P.C.), 2ª inyección 0,7 $\mu\text{g/g}$ P.C.

El estudio de los diferentes parámetros hormonales para comprobar la correcta actuación del análogo, muestra una disminución muy marcada del contenido hipofisario de LH en el grupo tratado frente a su correspondiente control (figura 21a, $p < 0,0001$), reducción que no llega a ser significativa en los niveles plasmáticos (figura 21b). El

incremento en el contenido hipofisario de GH, o la disminución de sus niveles plasmáticos (figura 21, c y d) no son significativos.

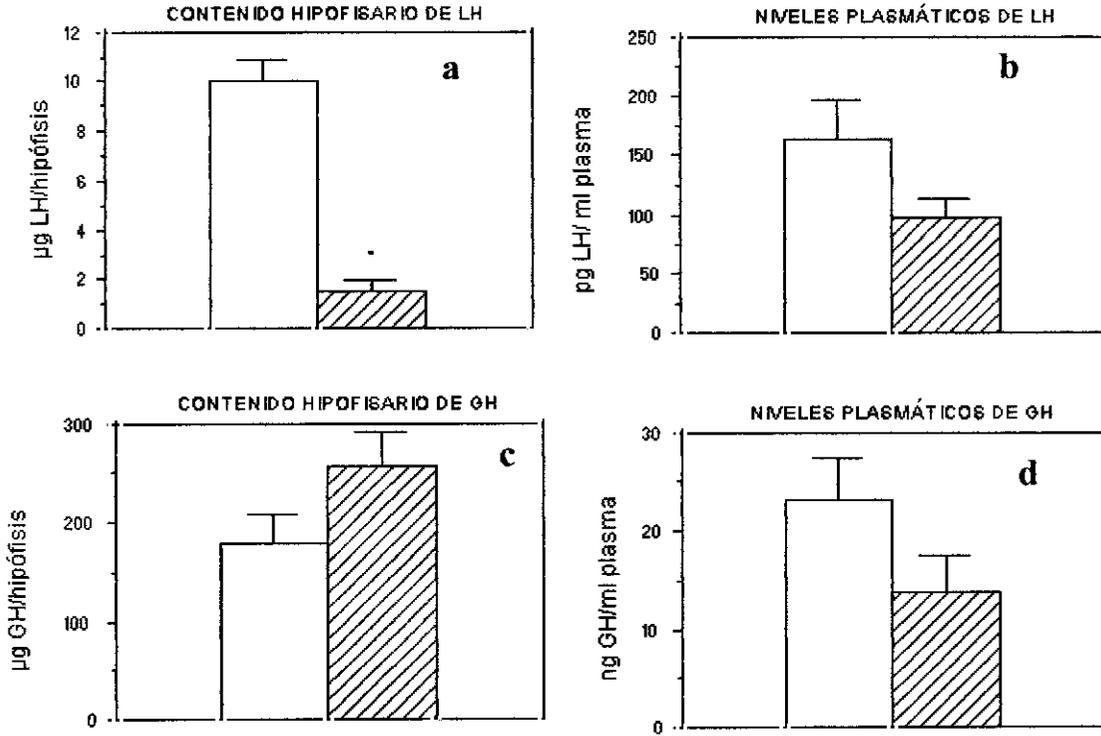


Figura 21. Contenido hipofisario y niveles plasmáticos de GH y LH en ratas macho normales y tratadas con análogo de LHRH. a. Contenido hipofisario de LH. * $p < 0,0001$ vs control. b. Niveles plasmáticos de LH. c. Contenido hipofisario de GH. d. Niveles plasmáticos de GH. Media \pm SEM.

2. ESTUDIO DEL PROCESO DE CRECIMIENTO EN RATAS MACHOS TRATADAS NEONATALMENTE CON GMS: REPERCUSIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE GH Y EFECTO DE LOS ESTEROIDES SEXUALES.

2.1 Longitud Tibial

Todos los grupos de animales sometidos a tratamiento neonatal con GMS muestran una menor longitud tibial, desde el inicio de las medidas a los 22 días de vida (figuras 22, 24, 25), que el grupo control no tratado (control $28,3 \pm 0,25$ mm, tratados con GMS $25,75 \pm 0,38$ mm, tratados con GMS y castrados $25,8 \pm 0,32$ mm, $p < 0,005$).

El incremento de longitud en el período de estudio es menor que la de sus correspondientes controles no tratados con GMS, tal y como se observa en la figura 22.

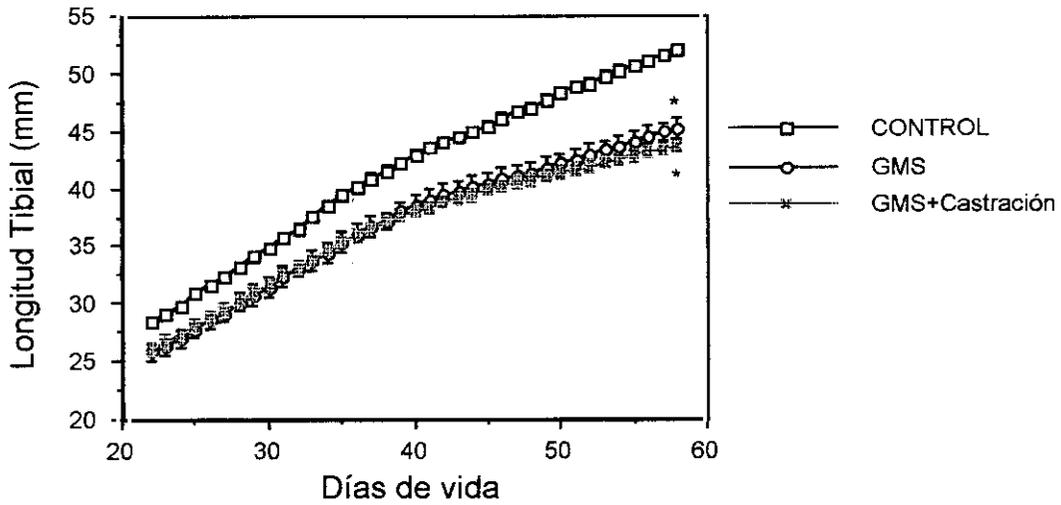


Figura 22. Evolución de la longitud tibial media \pm SEM desde los 22 hasta los 58 días de vida en animales control, tratados neonatalmente con GMS, y tratados con GMS y castrados.
* $p < 0,05$ vs control.

❖ *Efecto de la castración asociada al tratamiento neonatal con GMS:*

Los animales tratados neonatalmente con GMS y sometidos a castración a los 15 días de vida, no presentaron, al comienzo del período de observación, diferencia alguna en longitud con el grupo tratado únicamente con GMS, tal y como se ha descrito en los datos incluidos en el párrafo anterior. La castración, en este modelo lleva a una reducción adicional en la velocidad de crecimiento ($p < 0,05$), calculada como incremento total de longitud durante el período de observación (figura 23), y por tanto a una distinta tendencia en la evolución de la longitud tibial a lo largo del tiempo (figura 22). Sin embargo, esa disminución de la velocidad de crecimiento tibial no fue suficiente como para mostrar diferencias significativas en la talla final con el grupo GMS intacto (animales tratados con GMS intactos $45,2 \pm 0,94$ mm, animales tratados con GMS y castrados $43,6 \pm 0,52$ mm). Prolongando el tiempo de observación hasta los 75 días esas diferencias en longitud de la tibia sí llegan a ser significativas (GMS intactos $48,3 \pm 0,22$ mm, GMS y castración $46,48 \pm 0,39$ mm, $p < 0,005$).

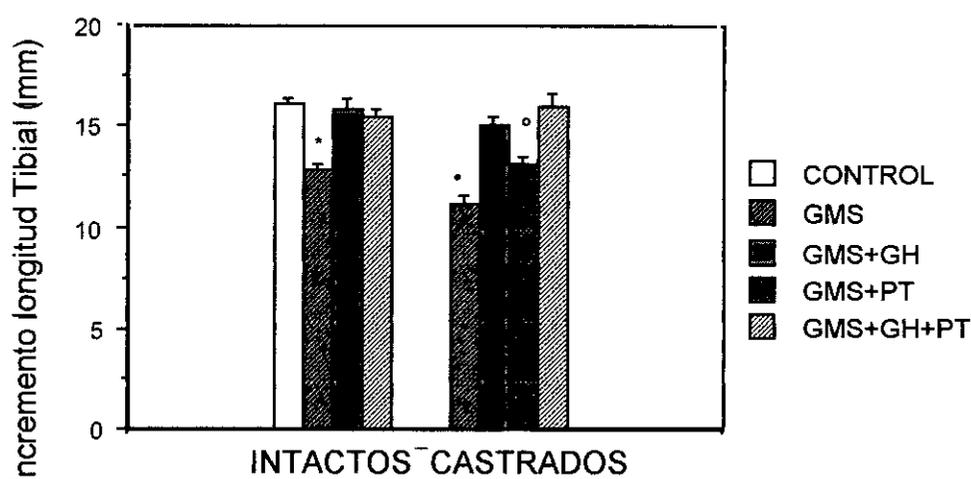


Figura 23. Incremento en longitud tibial medio \pm SEM desde los 31 hasta los 58 días de vida.

* $p < 0,001$ vs control. • $p < 0,05$ vs intactos + GMS. ° $p < 0,05$ vs castrados + GMS.

❖ Efecto del tratamiento con GH en la rata macho tratada neonatalmente con GMS

El tratamiento con GH desde el día 22 hasta el día 58 de vida, bien sea de manera aislada o en combinación con PT desde el día 31 de vida, incrementa significativamente la velocidad de crecimiento, independientemente de que se trate de animales castrados o intactos (Δ Longitud en los distintos tratamientos: Salino $11,978 \pm 0,365$ mm, GH $15,383 \pm 0,38$ mm, GH + PT $15,679 \pm 0,39$ mm, $p < 0,01$, figura 23). De esta forma la evolución del crecimiento en el tiempo es paralela para todos los grupos sometidos al tratamiento con GH, no encontrándose en ningún caso diferencias entre ellos (figura 24). Los grupos tratados con GH alcanzan la misma talla final, que además es superior, tanto a la del grupo tratado con GMS como a la del grupo tratado con GMS y castrado (figuras 22 y 24).

El tratamiento con GH no recupera la diferencia inicial de longitud producida por el tratamiento neonatal con GMS, y por tanto estos animales no llegan a alcanzar la longitud de los animales control, siendo las diferencias significativas ($p < 0,05$). El tratamiento con GH no parece ser efectivo hasta los 35 días de vida, aproximadamente.

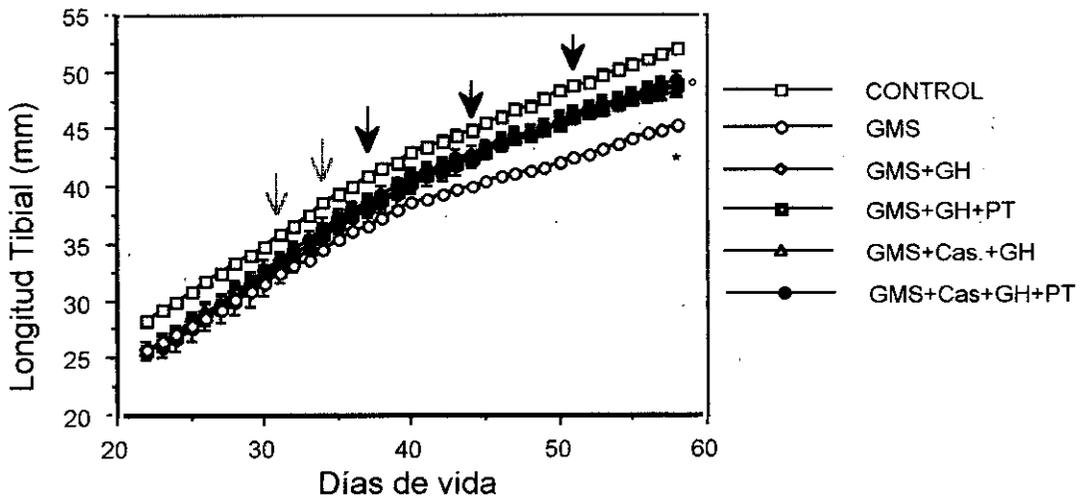


Figura 24. Evolución de la longitud tibial desde los 22 hasta los 58 días de vida en animales intactos o castrados, tratados con GMS y GH, aisladamente o en combinación con PT. Se incluyen además, tanto el grupo control como el grupo de animales intactos y tratados con GMS. La GH se administró desde el día 22 hasta el día 58 de vida. Las flechas indican los distintos tratamientos con PT, siendo la flecha clara PT de corta duración y la flecha oscura de larga duración. * $p < 0,05$ vs control. o $p < 0,05$ vs resto de los grupos. Media \pm SEM

❖ Efecto del tratamiento con testosterona en la rata macho tratada neonatalmente con GMS

El tratamiento con testosterona en los animales tratados con GMS y castrados, produce un incremento discreto de longitud tibial con respecto al grupo de animales castrados no tratados (Δ Longitud: PT $13,037 \pm 0,469$ mm, $p < 0,05$, figura 23), pero suficiente como para conseguir una longitud final diferente entre estos dos grupos (GMS y castrados $43,6 \pm 0,52$ mm, GMS castrados y tratados con PT $45,8 \pm 0,36$ mm, $p < 0,01$, figura 25), y alcanzar al grupo de animales intactos tratados neonatalmente con GMS ($45,2 \pm 0,94$ mm, figura 22).

Ni el tratamiento con testosterona ni la castración parecen tener un efecto estimulante del crecimiento hasta pasados los 40 días de vida (figuras 22 y 25).

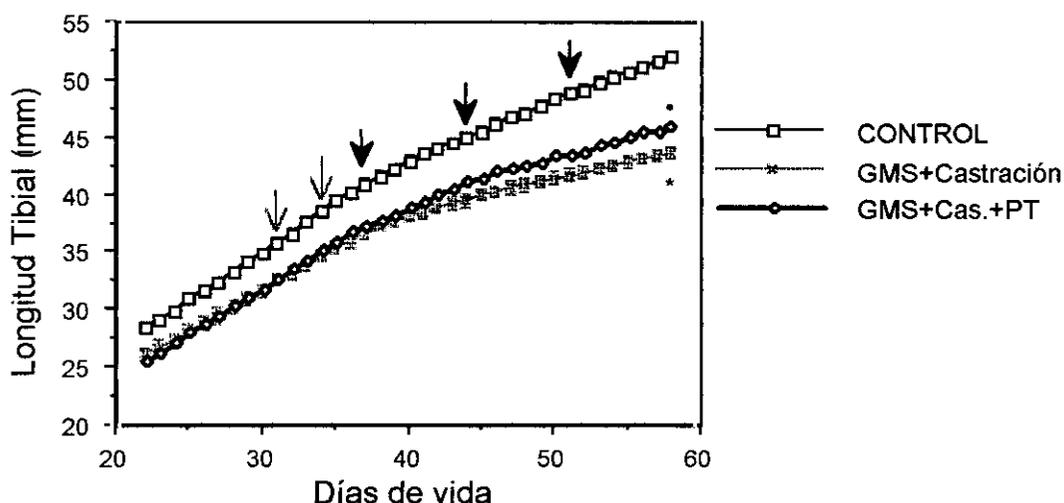


Figura 25. Evolución de la longitud tibial media desde los 22 hasta los 58 días de vida de los grupos control, animales tratados con GMS y castrados, y animales tratados con GMS castrados y tratados con PT. Las flechas indican los distintos tratamientos con PT, siendo la flecha clara PT de corta duración y la flecha oscura de larga duración.
* $p < 0,05$ vs castrados + PT. • $p < 0,05$ vs control.

2.2 Evolución Ponderal

El tratamiento con GMS lleva a una disminución significativa en peso ($p < 0,01$) a partir del 4º día de vida, tal y como recogen los datos de la tabla IV.

Tabla IV. PESO MEDIO EXPRESADO EN g EN ANIMALES CONTROLES, ANIMALES DEFICITARIOS EN GH, Y DEFICITARIOS EN GH Y CASTRADOS.

	Día 2 de vida	Día 4 de vida	Día 21 de vida
Control	7,111 ± 0,101	10,25 ± 0,25	49 ± 0,779
GMS	7,5 ± 0,267	9,42 ± 0,124*	38,5 ± 1,59•
GMS + Castración	-----	-----	39,3 ± 1,15•

* $p < 0,05$ vs control. • $p < 0,001$ vs control. Media ± SEM.

La evolución ponderal, en cuanto a los efectos producidos por los distintos tratamientos, es similar a lo observado en longitud tibial, aunque a diferencia de lo que acabamos de ver, el tratamiento con GH en los distintos grupos permite llegar a alcanzar el peso de los animales control. No hay diferencias significativas entre estos grupos en el peso final, aunque sí muestran un comportamiento en el tiempo ligeramente diferente del grupo control ($p < 0,05$), tal y como puede observarse en la figura 26.

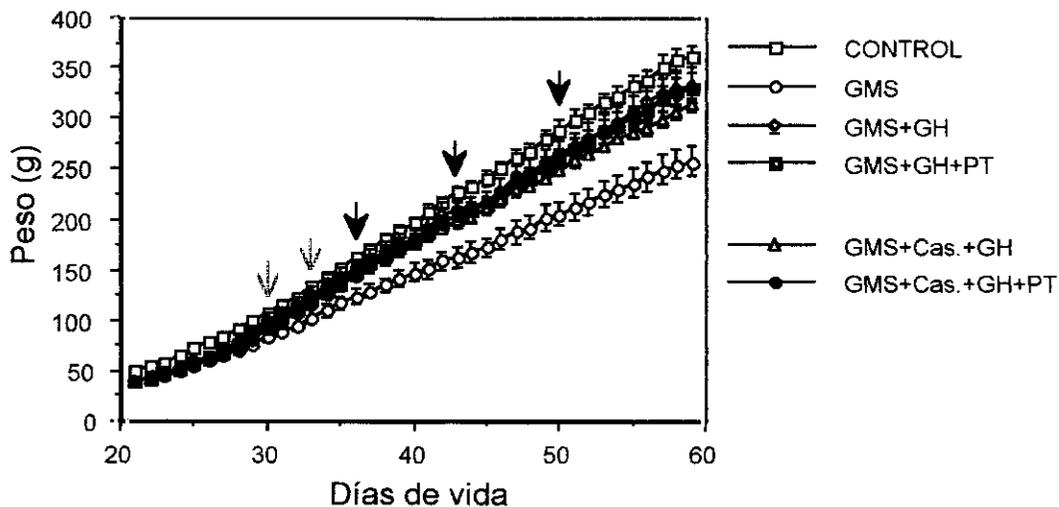


Figura 26. Evolución ponderal media \pm SEM desde los 22 hasta los 58 días de vida, en todos los grupos. La GH se administró desde el día 22 hasta el día 58 de vida. Las flechas indican los distintos tratamientos con PT, siendo la flecha clara PT de corta duración y la flecha oscura de larga duración. * $p < 0,05$ vs resto de los grupos.

2.3 Eje Somatotropo

Los animales tratados neonatalmente con GMS presentan un descenso significativo del peso hepático (control $16,33 \pm 0,61$ g vs GMS $9,97 \pm 0,68$ g, $p < 0,0001$). El tratamiento con GH, de forma aislada o en combinación con PT, ya sea en animales castrados o intactos, tratados con GMS, aumenta significativamente el peso del hígado respecto a los no tratados (salino $9,31 \pm 0,41$ g, castrados o intactos tratados con GH $13,48 \pm 0,44$ g, castrados o intactos tratados con GH y PT $14,26 \pm 0,82$ g, $p < 0,0001$).

❖ IGF I

El tratamiento con GMS produce un descenso significativo en los niveles plasmáticos de IGF I (figura 27) comparado con el grupo control ($p < 0,0001$). El tratamiento con GH, ya sea en animales castrados o intactos, tratados con GMS eleva estos niveles (tratamiento con salino $636,97 \pm 101,7$ ng/ml plasma, tratamiento con GH $1431,2 \pm 200,4$ ng/ml plasma, tratamiento con GH + PT $1499,7 \pm 208,6$ ng/ml plasma, $p < 0,05$), sin llegar a los valores observados en el grupo control. El tratamiento con PT por sí solo en animales castrados, también es capaz de elevar los niveles plasmáticos de esta hormona ($843,95 \pm 91,9$ ng/ml plasma) con respecto a los animales castrados no

sometidos a dicho tratamiento ($p < 0,01$). La castración sólo tiende a disminuir ligeramente este parámetro.

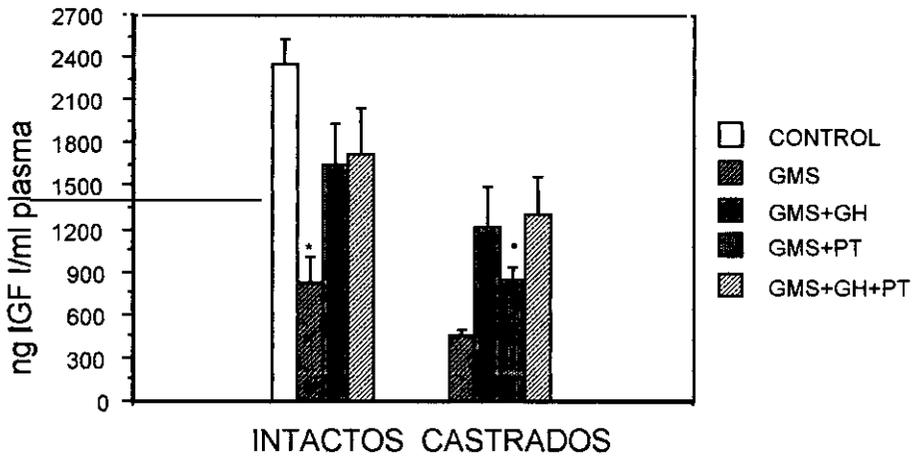


Figura 27. Niveles plasmáticos de IGF I expresados como media \pm SEM en todos los grupos.
* $p < 0,0001$ vs control. • $p < 0,01$ vs GMS + castración.

❖ GH

Todos los grupos tratados con GMS muestran un menor contenido hipofisario de GH que el grupo control ($p < 0,05$, figura 28). La castración tiende a disminuir todavía más el contenido aunque no significativamente, mientras que el grupo tratado con PT muestra un aumento del contenido hipofisario de GH con respecto a todos los demás grupos de animales castrados. Este hecho no se produce si la PT se administra conjuntamente con GH ($p < 0,05$).

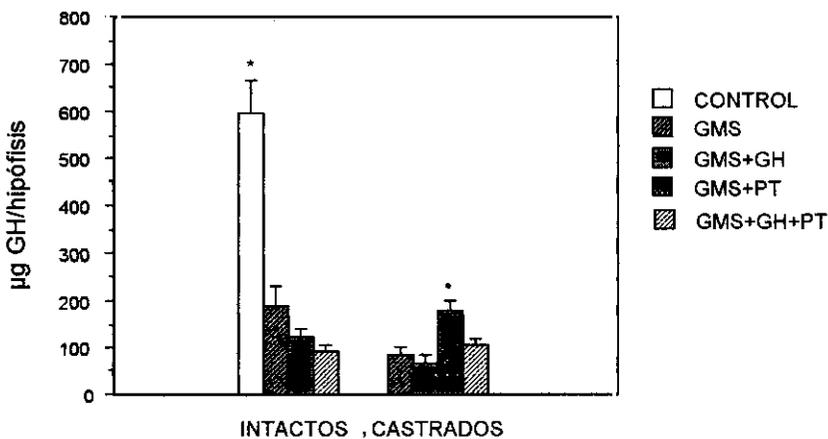


Figura 28. Contenido hipofisario de GH, expresado como media \pm SEM en todos los grupos.
* $p < 0,05$ vs resto de grupos. • $p < 0,05$ vs resto de animales castrados.

❖ SS

El tratamiento con GMS disminuye el contenido hipotalámico de SS (control $57,915 \pm 11,46$ ng/ hipotálamo vs grupo GMS $15,75 \pm 3,96$ ng/ hipotálamo, $p < 0,01$), (figura 29)

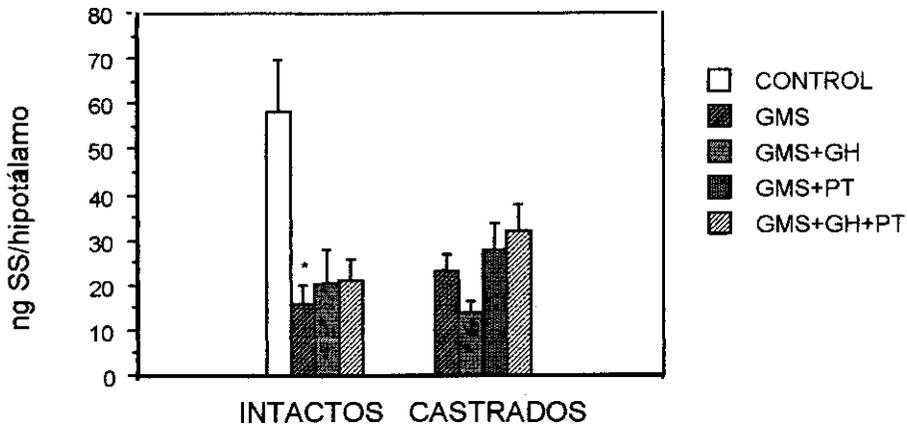


Figura 29. Contenido hipotalámico de somatostatina, expresado como media \pm SEM en todos los grupos. * $p < 0,01$ vs control.

Ninguno de los tratamientos es capaz de modificar este parámetro (figura 29), aunque el grupo castrado y tratado con GH, tiende a niveles inferiores que el resto de los animales castrados.

2.4 Eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal

El tratamiento neonatal con GMS ocasiona un descenso significativo tanto en el peso testicular (control $2,84 \pm 0,09$ g vs GMS $1,77 \pm 0,18$ g, $p < 0,0001$), como en el peso de las vesículas seminales (control 254 ± 22 mg vs GMS 106 ± 28 mg, $p < 0,005$). La castración independientemente del tratamiento adicional, disminuye el peso de las vesículas seminales respecto el de los animales intactos (media de animales intactos 126 ± 17 mg vs media de animales castrados $34 \pm 5,8$ mg, $p < 0,0001$).

El tratamiento con PT en animales castrados, aumenta significativamente el peso de las vesículas seminales (grupo GMS y castración $21 \pm 2,7$ mg vs grupo GMS + castración + PT $68 \pm 3,5$ mg, $p < 0,01$). La administración adicional de GH no ejerce ningún efecto sobre el peso de las vesículas seminales (castrados + GH + PT $53 \pm 7,7$ mg), como tampoco lo ejerce su administración aislada.

❖ LH

El grupo GMS muestra un descenso significativo ($p < 0,05$) del contenido hipofisario de LH respecto al grupo control ($3,6 \pm 0,4 \mu\text{g/hipófisis}$ vs $8,15 \pm 0,51 \mu\text{g/hipófisis}$, figura 30). La castración eleva de manera significativa este parámetro, independientemente de los tratamientos posteriores (media de animales intactos $3,5 \pm 0,4 \mu\text{g/hipófisis}$ vs media de castrados $11,2 \pm 1,1 \mu\text{g/hipófisis}$, $p < 0,0001$). La administración conjunta de PT y GH tiende a disminuir este valor tanto en animales intactos ($2,2 \pm 0,5 \mu\text{g/hipófisis}$) como castrados ($8,6 \pm 1,8 \mu\text{g/hipófisis}$).

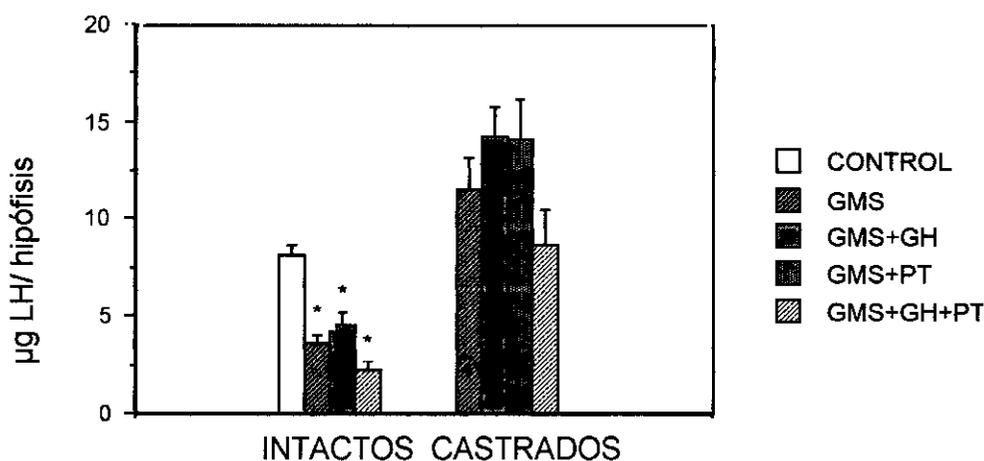


Figura 30. Contenido hipofisario de LH, expresado como media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs control.

❖ LHRH

El grupo GMS presenta un contenido hipotalámico de LHRH menor que el grupo control ($p < 0,05$). La castración no modifica este parámetro de manera significativa (figura 31).

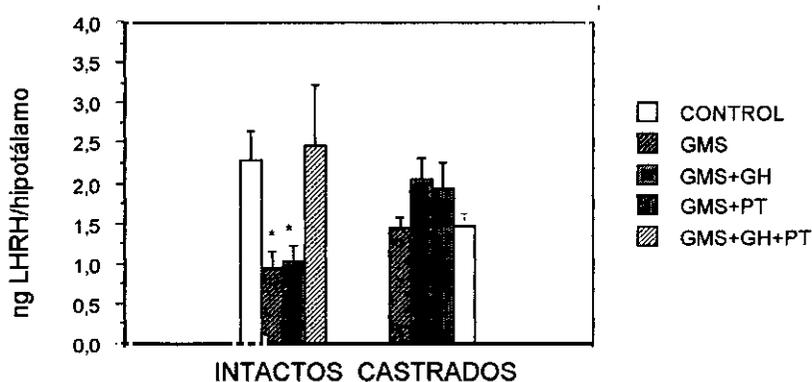


Figura 31. Contenido hipotalámico de LHRH, expresado como media \pm SEM en todos los grupos. * $p < 0,05$ vs control.

3. ESTUDIO DEL PATRÓN DE CRECIMIENTO EN LA RATA HEMBRA

3.1 Efecto de la administración de GH en hembra normal o tratada con GMS. Tratamiento con GHRH en inyecciones en ésta última.

3.1.1 Longitud Tibial

No existen diferencias significativas en la longitud tibial a los 25 días de vida, entre hembras normales y tratadas con GMS (figura 33a).

Sin embargo, el incremento de longitud total desde los 25 a los 60 días de vida (figura 32), que presenta el grupo de hembras tratadas neonatalmente con GMS es menor que su correspondiente grupo control, lo que lleva a una talla menor ($p < 0,05$) y distinta evolución en el tiempo (figura 33a).

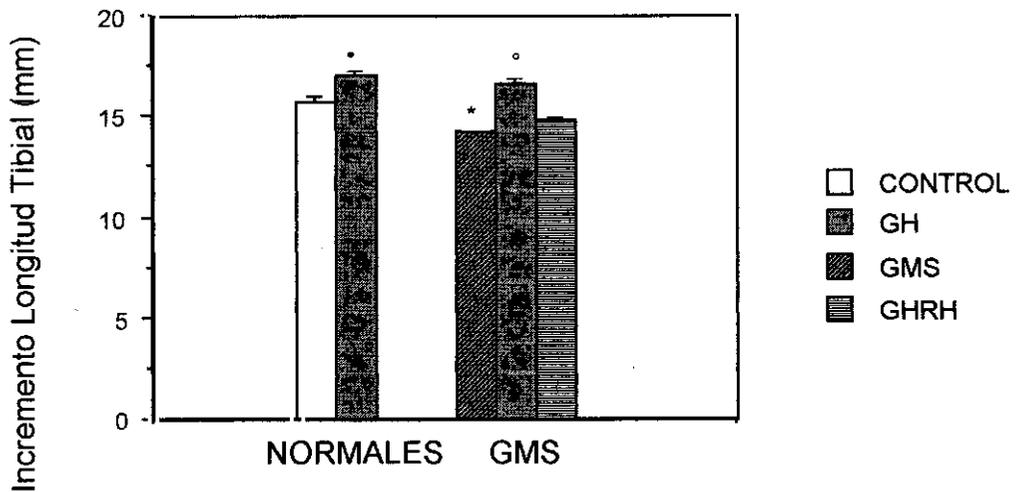


Figura 32. Incremento medio, expresado como media \pm SEM en la longitud tibial de ratas hembras desde los 25 hasta los 60 días de vida. * $p < 0,005$ vs respectivo normal. • $p < 0,05$ vs respectivo control sin GH. ° $p < 0.005$ vs tratadas con GMS y no tratadas con GH.

El tratamiento con GH (1 U.I./rata/día desde los 24 hasta los 61 días de vida) aumenta significativamente la tasa de crecimiento tanto en hembras normales como en hembras tratadas con GMS, tal y como puede apreciarse en la figura 32. En ambos casos se llega a una talla final superior a la de sus correspondientes grupos no tratados

(hembras normales vs normales + GH $p < 0,05$, figura 33a, hembras GMS vs hembras GMS + GH $p < 0,001$, figura 33b). Las hembras normales tratadas con GH comienzan a separarse de su grupo control a los 35 días de vida, aproximadamente, mientras que en hembras tratadas neonatalmente con GMS esto no ocurre hasta los 40 días.

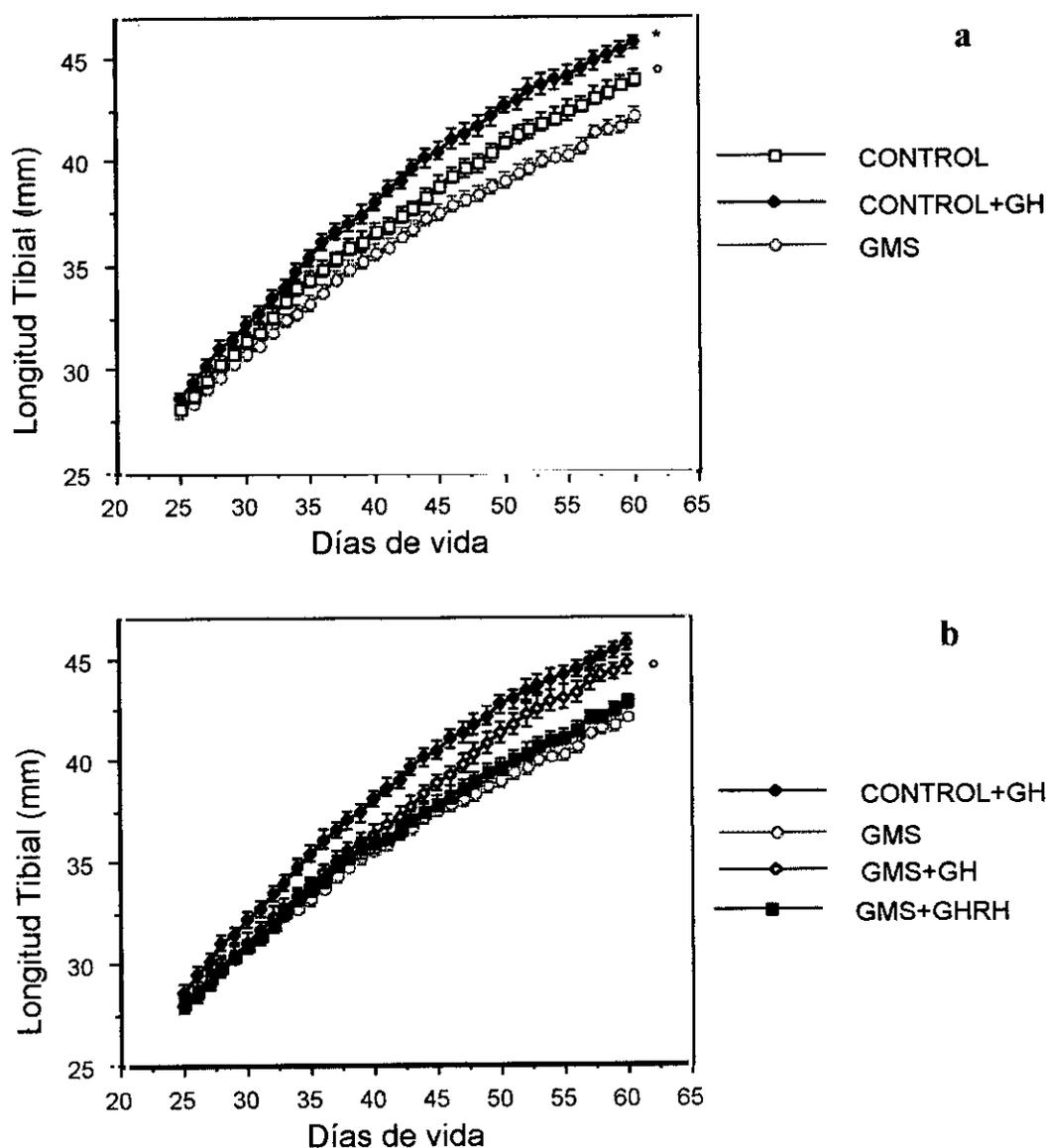


Figura 33. a. Evolución de la longitud tibial desde los 25 hasta los 60 días de las hembras control no tratadas, controles + GH y hembras tratadas neonatalmente con GMS. * $p < 0,05$ vs control. ° $p < 0,001$ vs GMS.

b. Evolución de la longitud tibial desde los 25 hasta los 60 días de vida de las hembras tratadas con GH, y los grupos GMS tanto sin tratar como tratados con GH o GHRH. Expresada como media \pm SEM. ° $p < 0,001$ vs GMS.

Las hembras tratadas con GMS y GH presentan una talla final intermedia entre las hembras normales y las normales + GH, no siendo significativamente diferente de ninguno de estos dos grupos, pero sí muestran una interacción significativa ($p < 0,0001$) en la evolución en el tiempo de la longitud con respecto a ambos grupos.

El tratamiento con GHRH (200 $\mu\text{g}/\text{rata}/\text{día}$ desde los 24 hasta los 61 días de vida) no modifica el patrón de crecimiento normal en estos animales (figura 33b).

En figura 34 puede observarse la diferencia entre ambas tibias de una hembra normal y una hembra deficitaria en GH por tratamiento neonatal con GMS, así como la desestructuración de placa de crecimiento producida en ésta última.

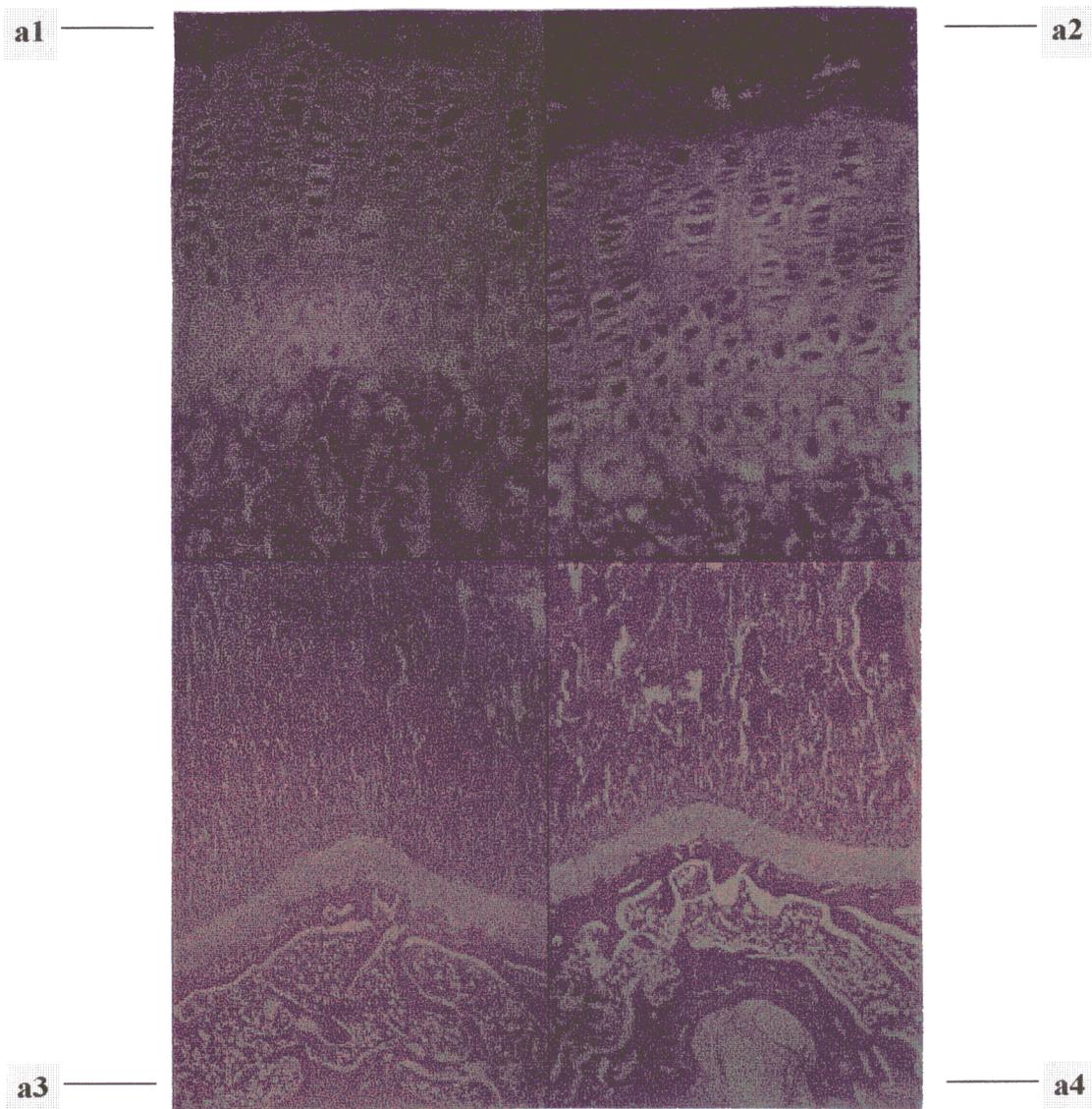


Figura 34. a1. Corte de la placa de crecimiento de una rata control (a un aumento de 40*(a1) o de 4*(a3)), y de una rata tratada con GMS (a un aumento de 40*(a2), o de 4* (a4).

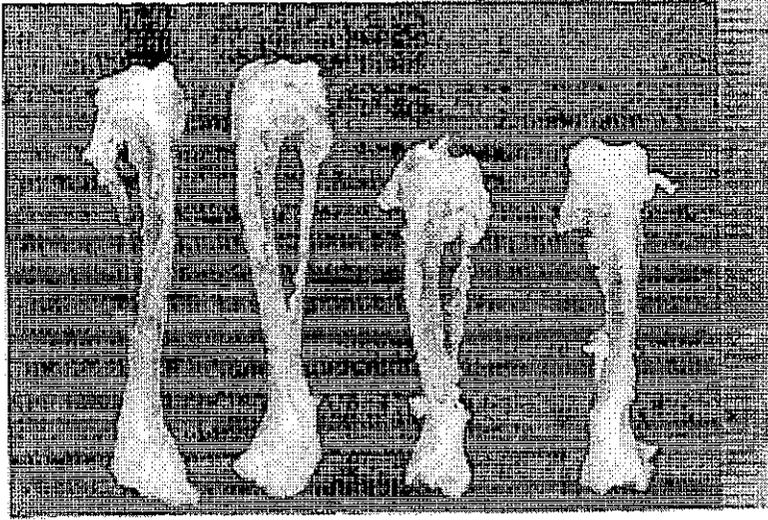


Figura 34. b. Estudio fotográfico de las tibias derecha e izquierda de una hembra normal (derecha) y una hembra deficitaria en GH (izquierda) acompañada de una escala milimétrica.

3.1.2 Evolución ponderal

No se encuentran diferencias significativas a los 25 días por el tratamiento neonatal con GMS. El incremento ponderal y la evolución de este parámetro son semejantes a lo descrito en longitud, aunque en este caso, el tratamiento con GMS no produce un efecto tan drástico como en longitud, ya que no llegan a existir diferencias significativas en el peso final entre hembras control o tratadas con GMS. Existe una ligera tendencia a un valor inferior en los animales tratados con GMS (figura 35).

El tratamiento con GH en ratas tratadas con GMS provoca una respuesta en incremento ponderal más marcada que la observada en longitud tibial, llevando a un peso final significativamente superior al del grupo control ($p < 0,01$), y quedando por encima incluso del grupo control con GH.

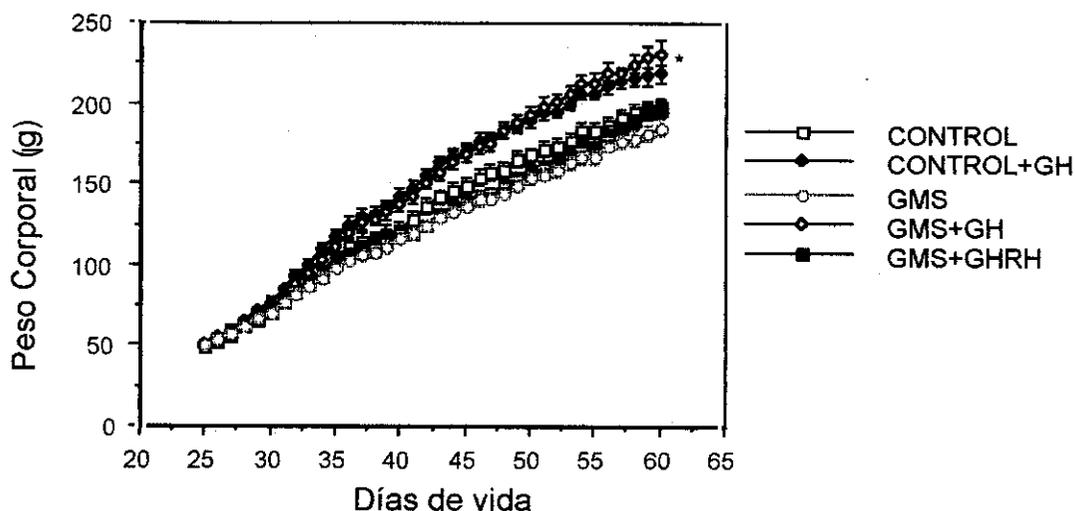


Figura 35. Evolución ponderal desde los 25 hasta los 60 días de vida de ratas hembras normales y deficitarias en GH, tratadas o no con esta hormona y hembras deficitarias en GH y tratadas con GHRH. Expresada como media \pm SEM. * $p < 0,01$ vs control y GMS.

3.1.3 Eje Somatotropo

El tratamiento con GMS disminuye el peso del hígado, mientras que el tratamiento con GH lo incrementa, tal y como puede verse en la tabla V.

Tabla V. PESO MEDIO ABSOLUTO DE HÍGADO EN HEMBRAS NORMALES O GMS, TRATADAS O NO CON GH, Y HEMBRAS GMS TRATADAS CON GHRH.

	Control	GH	GMS	GMS + GH	GMS + GHRH
Hígado (g)	7,79 \pm 0,28	9,28 \pm 0,33•	6,6 \pm 0,2•	10,74 \pm 0,88*	7,6 \pm 0,26

* $p < 0,01$ vs GMS y GMS + GHRH. • $p < 0,005$ vs control. Media \pm SEM.

❖ IGF I

El tratamiento con GMS provoca un descenso significativo ($p < 0,01$) de los niveles plasmáticos de IGF I (figura 36). El tratamiento con GH no modifica este parámetro en los animales control, pero aumenta en las tratadas con GMS. El tratamiento con GHRH no produce ninguna respuesta.

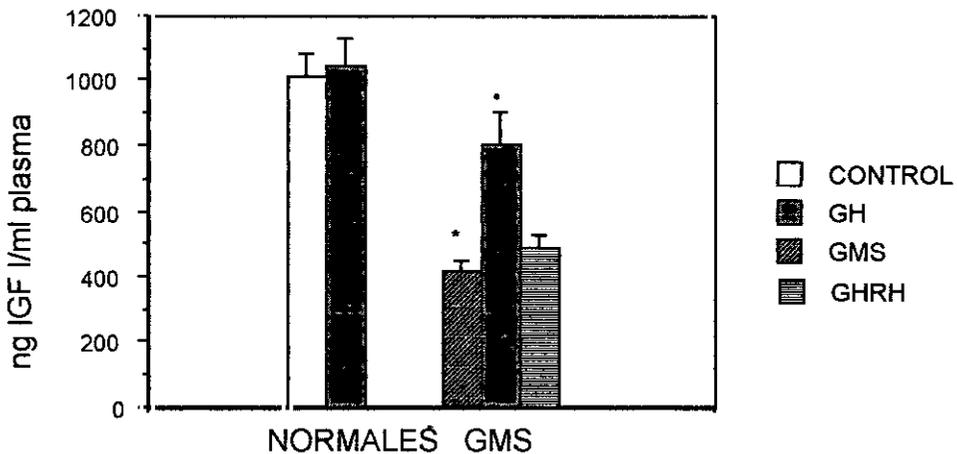


Figura 36. Niveles plasmáticos medios \pm SEM de IGF I en hembras normales o GMS, tratadas o no con GH, y hembras GMS tratadas con GHRH. * $p < 0,05$ vs respectivo normal. • $p < 0,01$ vs GMS.

❖ GH

Las ratas tratadas con GMS muestran un menor contenido hipofisario de GH ($p < 0,0001$, figura 37), pero no se observa ninguna modificación debida al tratamiento con GH, ni en estos animales ni en las hembras normales. En este caso, el tratamiento con GHRH lleva a una recuperación del contenido hipofisario de GH, que no es significativamente diferente del contenido encontrado en los grupos control.

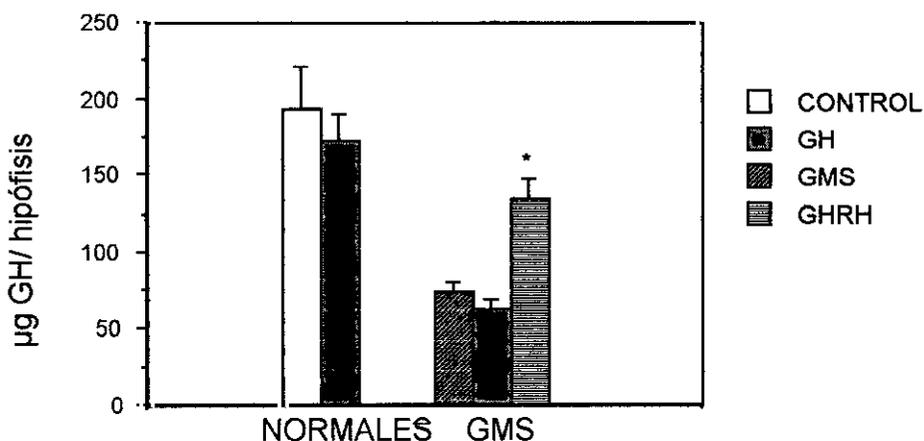


Figura 37. Contenido hipofisario medio de GH, expresado como media \pm SEM, en hembras normales o GMS, tratadas o no con GH, y hembras GMS tratadas con GHRH. * $p < 0,001$ vs tratadas con GMS.

❖ SS

No se encuentra ninguna diferencia significativa en el contenido hipotalámico de SS por ninguno de los tratamientos.

Tabla VI. CONTENIDO MEDIO DE SS EN EL HIPOTÁLAMO EN HEMBRAS.

GRUPOS	Control	GH	GMS	GMS + GH	GMS + GHRH
SS (ng/hipotálamo)	40,29 ± 3,5	33,4 ± 4,6	38,3 ± 2,8	49 ± 4,5	41,7 ± 6,3

3.1.4 Eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal

El estudio de los frotis vaginales diarios, desde la aparición de apertura vaginal, en estos animales, permite observar una disminución en el porcentaje de ciclos regulares en las hembras tratadas con GMS (control 90%, GMS 35%). El tratamiento con GH lleva a una alteración en la ciclicidad en hembras normales (44% ciclos regulares, 33% diestro constante) y a la aparición en las tratadas con GMS de diestro o estro constante en igual proporción. El tratamiento con GHRH no produce ninguna modificación adicional al tratamiento neonatal con GMS.

La disminución del peso del útero y los ovarios por el tratamiento neonatal con GMS o GMS y GHRH no es significativa (Tabla VII). El tratamiento con GH incrementa significativamente el peso del útero y de los ovarios en hembras GMS, mientras que en hembras normales solamente se aprecia una ligera tendencia en el mismo sentido.

Tabla VII. PESO ABSOLUTO MEDIO ± SEM DEL ÚTERO Y LOS OVARIOS EN HEMBRAS.

	Control	GH	GMS	GMS + GH	GMS + GHRH
Útero (mg)	313,7 ± 27,18	339,3 ± 27	274,9 ± 21,8	365,7 ± 37,4	282,6 ± 18
Ovarios (mg)	71,5 ± 3,9	85,2 ± 5,7	66 ± 2,4*	91,85 ± 2	70,7 ± 4,3*

* p<0,05 vs GMS

❖ LH

El modelo GMS presenta una disminución no significativa en los niveles plasmáticos de LH (figura 38). El tratamiento con GH, incrementa los valores basales

tanto en ratas normales como en GMS ($p < 0,0001$), mientras que el tratamiento con GHRH no hace ningún efecto.

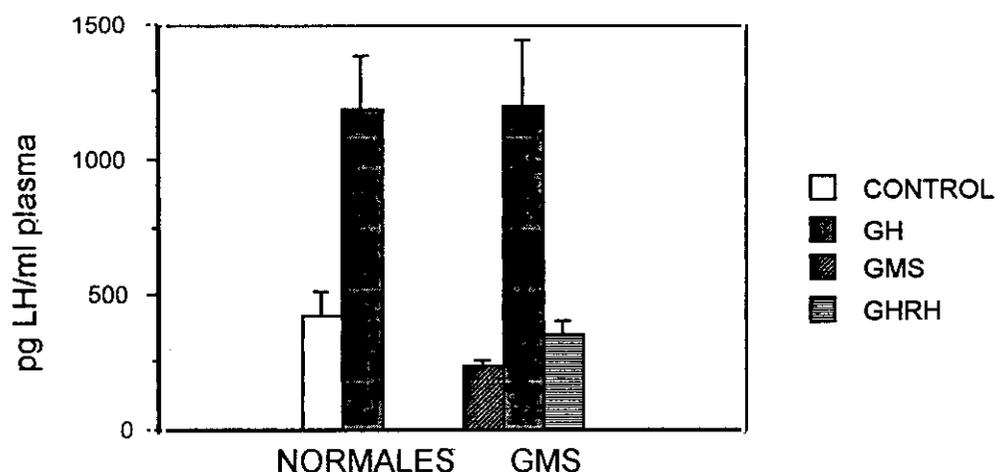


Figura 38. Niveles plasmáticos medios de LH \pm SEM en hembras normales o normales + GH, y deficitarias en GH, no tratadas, tratadas con GH o tratadas con GHRH.

No se aprecian diferencias significativas en el contenido hipofisario de LH en ninguno de los grupos.

3.2 Efecto de la administración continua de GHRH de forma aislada, o combinada con SS, en la hembra normal o tratada con GMS.

3.2.1 Longitud Tibial

La longitud inicial a los 36 días de vida, es significativamente mayor en las hembras control que en las hembras GMS (controles $35,98 \pm 0,168$ mm vs GMS $33,57 \pm 0,167$ mm, $p < 0,0001$). Además, las hembras GMS muestran un menor incremento total, calculado como la diferencia entre el comienzo y el final de la observación a los 56 días de vida, (GMS $6,77 \pm 0,15$ mm vs controles $7,77 \pm 0,153$ mm, $p < 0,0001$), por lo que existe una clara diferencia en la talla final (figura 39). La administración de GHRH, ya sea aislada o en combinación con SS, no produce ninguna modificación significativa en el patrón de crecimiento, ni en animales control, ni en tratados con GMS.

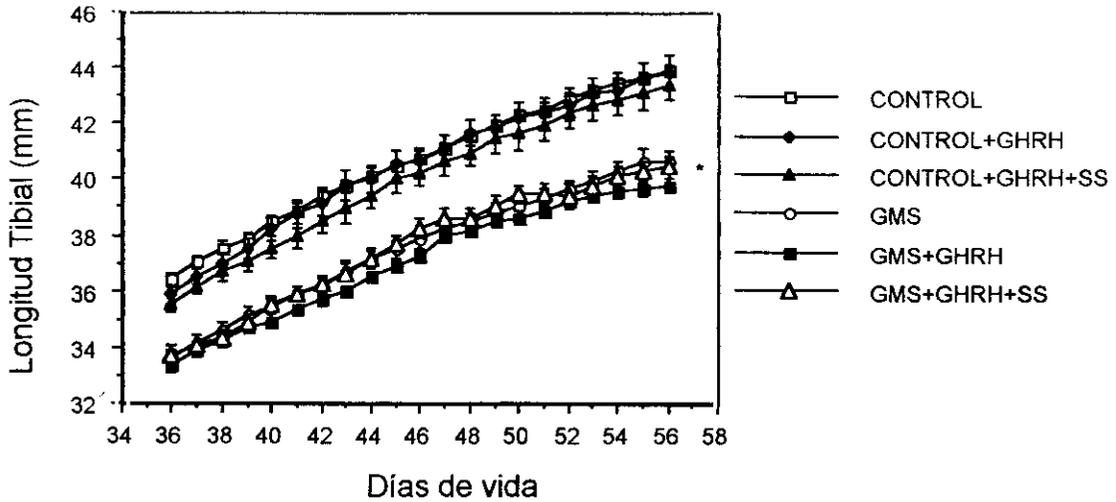


Figura 39. Evolución de la longitud tibial media \pm SEM, desde los 36 hasta los 56 días de vida en hembras normales o GMS. * $P < 0,001$ vs normales.

3.2.2 Evolución ponderal

Es semejante a lo observado en longitud.

3.2.3 Eje Somatotropo

El tratamiento neonatal con GMS, independientemente del tratamiento posterior, disminuye tanto el peso del hígado ($p < 0,0001$) como el peso hipofisario (Tabla VIII).

El tratamiento combinado con GHRH y SS en ratas normales provoca una disminución en el peso de la hipófisis ($p < 0,05$), mientras que en ratas tratadas con GMS no determina ninguna modificación significativa, aunque presenta una tendencia a valores mayores.

Tabla VIII. PESO MEDIO ABSOLUTO DE HIPÓFISIS E HÍGADO.

Grupos	Normales			GMS		
	Placebo	GHRH	GHRH+SS	Placebo	GHRH	GHRH+SS
Hipófisis (mg)	10,58 \pm 0,13	9,75 \pm 0,47	8,5 \pm 0,45*	5,17 \pm 0,25●	5,13 \pm 0,37●	5,48 \pm 0,35●°
Hígado (g)	8,33 \pm 0,22	8,68 \pm 0,49	8,6 \pm 0,48	6,5 \pm 0,23	6,47 \pm 0,4	7,18 \pm 0,07

* $p < 0,05$ vs placebo . ● $p < 0,0001$ vs correspondiente normal. ° $p < 0,005$ vs correspondiente normal.

Media \pm SEM.

❖ *IGF I*

Aparece una disminución significativa en los niveles plasmáticos de IGF I debida al tratamiento neonatal con GMS ($p < 0,0001$). Ninguno de los tratamientos posteriores modifica estos niveles.

❖ *GH*

Se observa una disminución significativa en el contenido hipofisario de GH, como consecuencia del tratamiento neonatal con GMS. No se encuentran diferencias significativas por los diferentes tratamientos con GHRH.

❖ *SS*

Se observa una tendencia a una disminución en el contenido hipotalámico de SS provocada por el tratamiento neonatal con GMS. No se encuentran diferencias significativas por los tratamientos posteriores.

3.2.4 Eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal

Independientemente de los tratamientos adicionales, las hembras normales, presentaron un 88,9% de ciclos regulares frente a un 47,4% de ciclos regulares de 5 días en las hembras con GMS.

4. EFECTO DE LA ALTERACIÓN EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL HIPOTÁLAMO SOBRE EL CRECIMIENTO.

4.1 Longitud Tibial

Al comienzo del estudio a los 23 días de edad, los machos normales presentan una longitud inicial ($27,57 \pm 0,28$ mm) significativamente superior al grupo de machos castrados neonatalmente ($26,15 \pm 0,44$ mm, $p < 0,05$), aunque no llegan a existir diferencias significativas de ambos con los grupos de hembras normales ($26,64 \pm 0,24$ mm) o de hembras tratadas neonatalmente con PT ($26,98 \pm 0,28$ mm).

No se encontraron diferencias significativas en el incremento de longitud total en el tiempo de observación de los 23 a los 57 días de vida (figura 40a) debidas a la administración de testosterona neonatal, aunque los machos castrados mostraban valor ligeramente inferior que sus controles ($P < 0,05$). Sí hubo diferencias entre los sexos, mostrando los machos, castrados o no, una velocidad de crecimiento superior a la de las hembras ($p < 0,0001$).

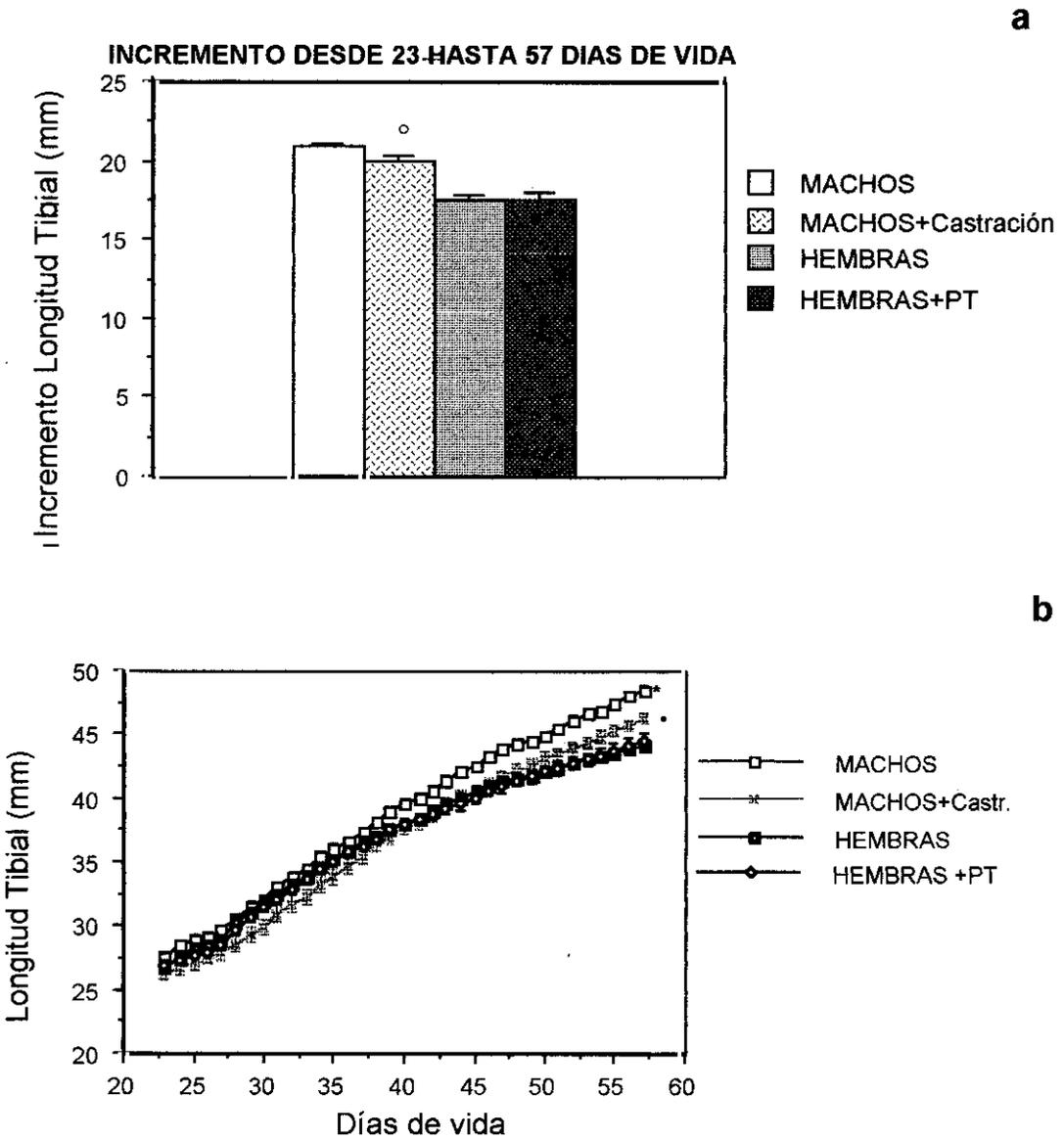


Figura 40. a. Incremento de longitud tibial medio \pm SEM. desde los 23 hasta los 57 días de vida.

b. Evolución de la longitud tibial media \pm SEM. desde los 27 a los 57 días de vida.

* $p < 0,001$ vs resto de los grupos. • $p < 0,05$ vs grupos de hembras. ° $p < 0,05$ vs machos.

Los machos normales presentan una talla final significativamente superior que el resto de los grupos ($p < 0,001$, figura 40b). Los machos castrados alcanzan una talla final

superior a la de las hembras y muestran distinta evolución de la longitud tibial a lo largo del tiempo ($p < 0,05$). Entre los dos grupos de hembras no existen diferencias significativas entre sí, aunque se detecta una interacción significativa ($p < 0,05$) en la evolución de la longitud tibial en el tiempo, debido probablemente al cruce de las curvas en los días finales de observación.

4.2 Evolución ponderal

Es similar a lo observado en longitud, aunque en este caso los machos normales muestran un incremento ponderal superior ($p < 0,005$) al resto de los grupos incluidos los machos castrados (figura 41a).

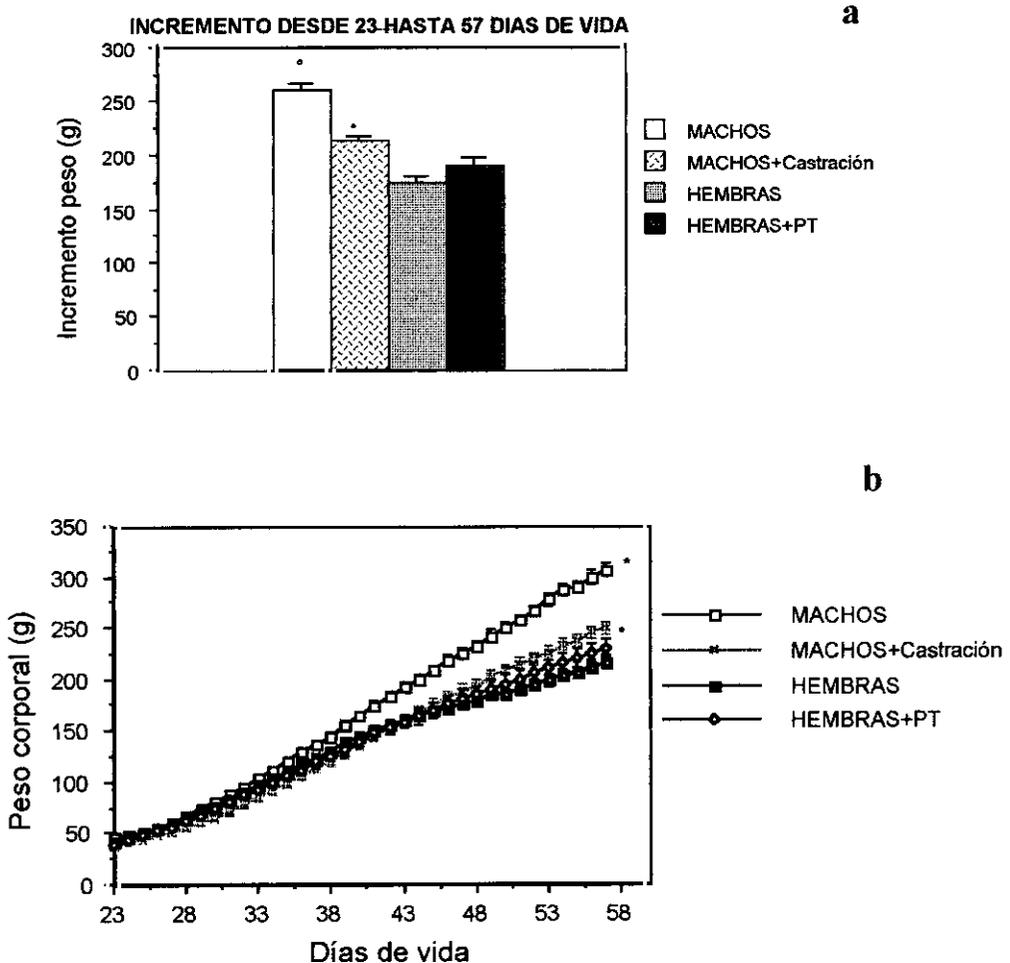


Figura 41. a. Incremento ponderal medio \pm SEM desde los 23 hasta los 57 días de vida. $^{\circ}p < 0,005$ vs resto de los grupos $\bullet p < 0,05$ vs hembras normales. **b.** Evolución ponderal media \pm SEM desde los 27 hasta los 57 días de vida. $* p < 0,001$ vs resto de los grupos. $\bullet p < 0,05$ vs hembras normales.

4.3 Eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal y Somatotropo

Las hembras control presentan ciclos regulares mientras que las hembras tratadas con PT neonatalmente muestran una fase de estro constante, así como una disminución en el peso del útero y los ovarios (Tabla IX). Los machos castrados neonatalmente no presentan separación balano-prepucial, con una disminución del peso de las vesículas seminales comparados con los machos normales.

No se encuentran diferencias en el peso hipofisario debidas a la castración neonatal o a la administración de PT neonatal, pero sí como consecuencia del sexo, presentando las hembras un peso superior ($p < 0,05$), aunque esta significación parece deberse a que los machos normales presentan un valor inferior. En el peso hepático los machos normales presentaron un peso superior al del resto de los grupos.

Tabla IX. PESO ABSOLUTO DEL ÚTERO, LOS OVARIOS, LAS VESÍCULAS SEMINALES, LA HIPÓFISIS, Y EL HÍGADO.

GRUPOS	Machos	Machos Castrados	Hembras	Hembras + PT
Útero (mg)			387,37 ± 28,2	301,12 ± 25,5°
Ovarios(mg)			135,75 ± 9,2	73 ± 3,89•
Vesículas Seminales(mg)	250,5 ± 58,5	58,5 ± 52,5*		
Hipófisis(mg)	9,29 ± 0,42	10,27 ± 0,43	10,94 ± 0,37	10,65 ± 0,34
Hígado (g)	16,75 ± 6 ◊	12,45 ± 0,38	11,02 ± 0,4	12,32 ± 0,68

* $p < 0,005$ vs machos normales. • $p < 0,0001$ vs hembras normales. ° $p < 0,05$ vs hembras normales

◊ $p < 0,0005$ vs resto grupos. Media ± SEM.

5. ESTUDIO DEL PROCESO DE CRECIMIENTO COMPENSATORIO PRODUCIDO TRAS AYUNO E INGESTA REDUCIDA, Y SU POSIBLE POTENCIACIÓN POR LA ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE GH.

5.1 Estudio en la rata macho normal

5.1.1 Longitud Tibial

En el día 31 de vida, justo antes del comienzo del período de ayuno, no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos de machos normales, ni en peso ni en longitud tibial. Los animales sometidos a 3 días de ayuno muestran en ese tiempo un

incremento de longitud significativamente inferior al grupo control (ayunados $1,55 \pm 0,072$ mm, control $3,48 \pm 0,1$, $p < 0,0005$).

No se encuentra diferencia significativa en el incremento de longitud tibial, ni durante el período temprano de realimentación desde los días 36 hasta los 40 de vida, ni en los días en los que los distintos grupos fueron sometidos a los distintos tratamientos con GH (detallados en el pie de la figura 42). A los 44 días de vida los grupos de animales sometidos a ayuno, tratados con GH o no, muestran una longitud significativamente menor que el grupo control no ayunado ($p < 0,005$).

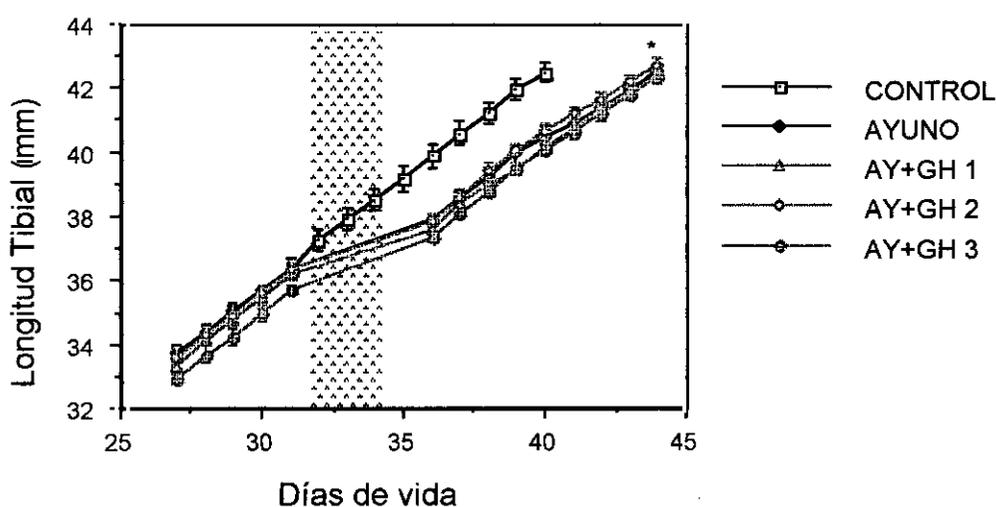


Figura 42. Evolución de la longitud tibial media \pm SEM, desde los 27 hasta los 44 días de vida en machos normales. Los 3 días que comprenden el período de ayuno aparecen con fondo moteado en la gráfica. ① tratamiento con GH desde los días 35 hasta los 38 de vida. ② tratamiento con GH desde los 37 hasta los 40 días. ③ tratamiento con GH desde los 39 hasta los 42 días. * $p < 0,005$ vs control.

Tampoco se observan diferencias significativas en las pendientes obtenidas del análisis de regresión lineal de la longitud tibial con respecto a los días de vida, desde el final del ayuno hasta el final de la observación.

5.1.2 Evolución ponderal

La evolución ponderal es similar a lo observado en longitud (figura 43). El ayuno provoca un descenso significativo del peso en todos los grupos ayunados (ayunados $-13,4 \pm 0,59$ g, control $38,3 \pm 1,48$, $p < 0,001$).

No se encuentran diferencias significativas producidas por los distintos tratamientos con GH tras el ayuno.

Durante el primer día de realimentación, del día 35 al 36, los grupos sometidos a ayuno evidencian un incremento de peso superior al del grupo con dieta normal (ayunados $21,6 \pm 0,76$ g, control $7,5 \pm 0,56$ g $p < 0,0001$), aunque la recuperación no es suficiente como para que alcancen el peso de los animales control, por lo que persiste la diferencia significativa en su peso final ($p < 0,005$).

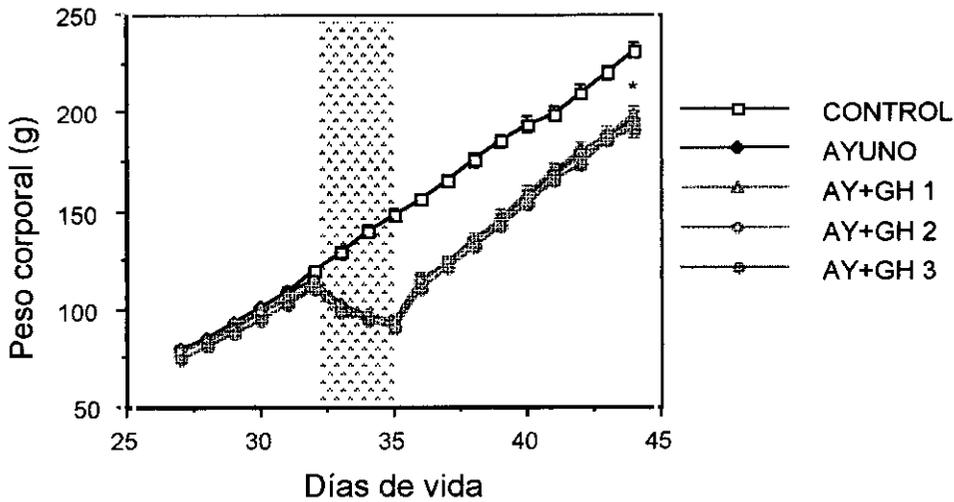


Figura 43. Evolución ponderal media \pm SEM, desde los 27 hasta los 44 días de vida en machos normales. Los 3 días que comprenden el período de ayuno aparecen con fondo moteado en la gráfica. ① tratamiento con GH desde los días 35 hasta los 38 de vida. ② tratamiento con GH desde los 37 hasta los 40 días. ③ tratamiento con GH desde los 39 hasta los 42 días. * $p < 0,005$ vs control

El análisis de regresión lineal del peso (Tabla X), desde los días 36 hasta los 44 de vida, es decir, excluyendo el primer día de realimentación, pone de manifiesto una pendiente mayor en los grupos ayunados con respecto al grupo control, ya que éste queda fuera del límite de confianza al 95 % de las rectas correspondientes a los grupos ayunados.

Tabla X. PENDIENTE DE LA RECTA DE REGRESIÓN LINEAL SIMPLE DEL PESO Y LOS DÍAS DE VIDA EN MACHOS NORMALES. Desde los 36 hasta los 40 días de vida.

GRUPOS	No ayuno	Ayuno	Ayuno+GH ①	Ayuno+GH ②	Ayuno+GH ③
Pendiente	9,211	10,515	10,586	10,338	10,334

5.2 Estudio del crecimiento compensatorio en la rata macho tratada con GMS

5.2.1 Longitud Tibial.

En el día 59 de vida, justo antes del comienzo del período de ayuno, los animales tratados neonatalmente con GMS presentan una menor longitud tibial y menor peso corporal que los machos normales ($p < 0,0001$, figura 44).

Los animales normales o tratados con GMS, sometidos a ayuno muestran durante este período, un incremento en longitud tibial significativamente inferior al grupo control (ayunados normales $0,072 \pm 0,071$ mm, ayunados y tratados con GMS $0,145 \pm 0,11$ mm, vs no ayunados normales $1,38 \pm 0,23$ mm, $p < 0,005$).

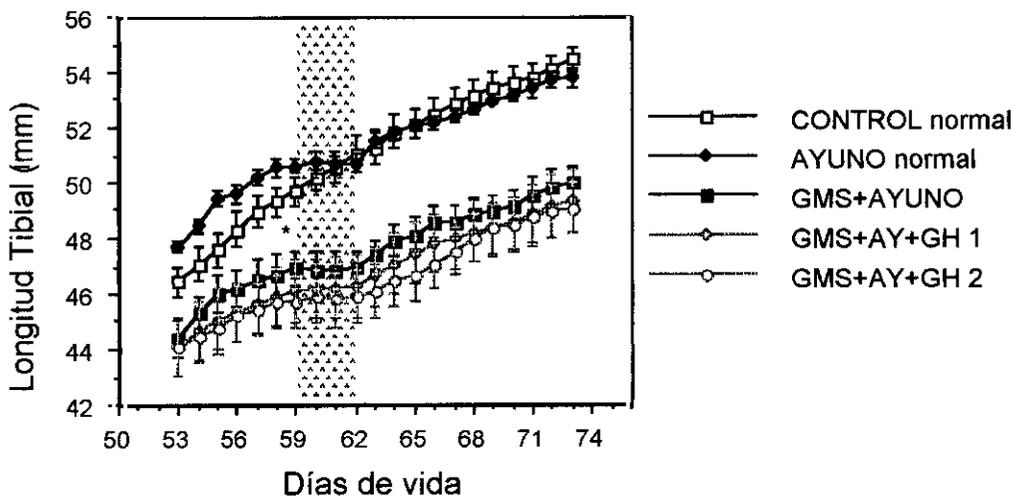


Figura 44. Evolución longitud tibial media \pm SEM, desde los 53 hasta los 73 días de vida en machos normales o deficitarios en GH. Los 3 días que comprenden el período de ayuno aparecen con fondo moteado en la gráfica. ① tratamiento con GH desde los días 62 hasta los 65 de vida ② tratamiento con GH desde los 65 hasta los 68 días.
* $p < 0,0001$ vs animales normales.

En el día siguiente a la realimentación, el grupo de machos normales sometidos a ayuno presentó un incremento en longitud significativamente superior a su control con dieta normal (normal ayunado $0,816 \pm 0,142$ mm vs normal no ayunado $0,2 \pm 0,15$ mm, $p < 0,05$). Éste parece un hecho aislado ya que no se detectó nada similar en el

experimento anterior, y tampoco los grupos de machos tratados con GMS y ayuno mostraron ese incremento.

En cuanto al efecto de la administración de GH, en animales neonatalmente tratados con GMS, únicamente el tratamiento más tardío (desde los 65 hasta los 68 días de vida) eleva de manera significativa la velocidad de crecimiento durante el período de tratamiento (grupo GMS y ayuno $0,82 \pm 0,15$ mm vs GMS y GH $1,65 \pm 0,063$, $p < 0,005$).

Sin embargo el análisis de regresión lineal desde el día 63 hasta el final del experimento (Tabla XI) presenta un pendiente superior en el grupo control no ayunado y en el grupo de animales tratados con GMS ayuno y tratados con GH $\textcircled{2}$ que el resto de los grupos.

Tabla XI. PENDIENTE DE LA RECTA DE REGRESIÓN LINEAL SIMPLE DE LA LONGITUD TIBIAL Y LOS DÍAS DE VIDA EN MACHOS NORMALES O DEFICITARIOS EN GH.

GRUPOS	No ayuno (normal)	Ayuno (normal)	Ayuno+GMS	Ayuno+GMS+GH del día 62 al 65	Ayuno+GMS+GH del día 65 al 68
Pendiente	299,4	231,9	235,2	251,2	314,3

5.2.2 Evolución ponderal

El ayuno provoca un descenso significativo en el peso en todos los grupos ayunados (ayunados $-43,25 \pm 2,6$ g, tratados con GMS y ayunados $-23,7 \pm 1,07$ g, no ayunados $24,4 \pm 2,04$ g, $p < 0,0001$, figura 45). Ésto supone una pérdida ponderal del 9,1% en los animales tratados con GMS, y de un 13,2 % en los normales.

En el día siguiente a la realimentación todos los grupos sometidos a ayuno muestran un incremento ponderal superior al grupo no ayunado ($p < 0,001$), siendo de mayor magnitud en el grupo de animales ayunados normales, $p < 0,001$, (control ayunado $34 \pm 2,2$ g, control no ayunado $4 \pm 1,3$ g, GMS y ayuno $21,9 \pm 0,9$ g, GMS ayuno y GH $22,33 \pm 1,3$ g).

En cuanto al efecto de la GH en animales tratados con GMS, el resultado es el mismo que el obtenido en longitud (grupo GMS y ayuno $19 \pm 1,1$ g vs GMS y GH de los 65 a los 68 días $31,4 \pm 2,1$, $p < 0,001$).

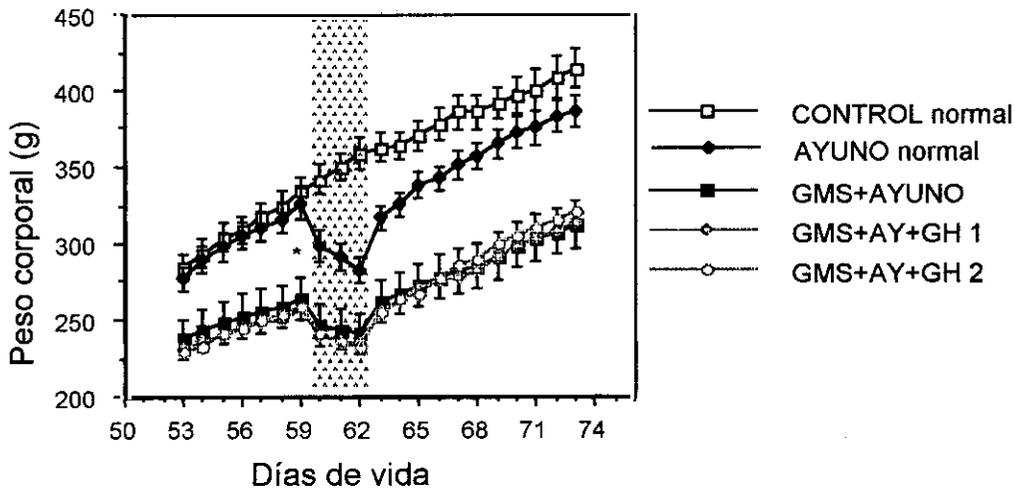


Figura 45. Evolución ponderal media \pm SEM, desde los 53 hasta los 73 días de vida en machos normales o tratados con GMS. Los 3 días que comprenden el período de ayuno aparecen con fondo moteado en la gráfica. ① tratamiento con GH desde los días 62 hasta los 65 de vida ② tratamiento con GH desde los 65 hasta los 68 días. * $p < 0,0001$ vs animales normales.

En el análisis de regresión (Tabla XII), a diferencia de lo descrito en longitud, donde era el grupo de animales normales y no ayunados el de mayor pendiente, son los grupos de machos normales ayunados y los 2 grupos ayunados y tratados con GMS y GH, los que muestran una pendiente superior, aunque es el tratamiento con GH más tardío el que parece ser más efectivo.

Tabla XII. PENDIENTE DE LA RECTA DE REGRESIÓN LINEAL SIMPLE DEL PESO Y LOS DÍAS DE VIDA EN ANIMALES MACHOS NORMALES O TRATADOS CON GMS.

GRUPOS	No ayuno (normal)	Ayuno (normal)	Ayuno+GMS	Ayuno+GMS+GH ①	Ayuno+GMS+GH ②
Pendiente	5,2	6,9	5,02	5,7	6,6

A pesar de esto, la pérdida ponderal ocasionada por el ayuno en el grupo de animales normales, no se llega a recuperar totalmente, ya que el peso final, sin que la

diferencia sea significativa, es ligeramente inferior al de su correspondiente control (figura 45).

5.3 Estudio del crecimiento compensatorio en la rata macho tratada con GMS, sometida a 2 días de ayuno y 4 de ingesta reducida.

5.3.1 Longitud Tibial

En el día 77 de vida, justo antes del comienzo del ayuno, los animales tratados con GMS presentan una menor longitud tibial y menor peso corporal que los machos normales ($p < 0,0001$, figura 46a).

El ayuno, en animales normales o tratados con GMS, ocasiona un incremento en longitud significativamente menor que el observado en animales con dieta normal, durante el tiempo en que la ingesta está reducida (control $1,09 \pm 0,178$ mm, normales y ayuno $-0,054 \pm 0,13$, GMS $0,812 \pm 0,083$, GMS y ayuno $0,204 \pm 0,088$, $p < 0,005$).

En animales GMS, el tratamiento con GH tanto en la fase más temprana (GHⓐ), como en la más tardía (GHⓑ) incrementa significativamente la longitud tibial durante estos períodos (Tabla XIII, figura 46b). En el primer caso este incremento fue 1,6 veces superior al de su correspondiente grupo GMS y ayuno, y en el segundo caso de 2,9 veces.

Tabla XIII. INCREMENTO MEDIO DE LONGITUD EXPRESADO EN mm, EN LOS DISTINTOS PERÍODOS DE TRATAMIENTO CON GH EN ANIMALES TRATADOS CON GMS.

Incremento Longitud (mm)	GMS y ayuno	GMS ayuno+GH de 83 a 87 días	GMS ayuno+GH de 86 a 90 días
De 83 a 88 días de vida	$0,94 \pm 0,11$	$1,54 \pm 0,13^*$	-----
De 86 a 91 días de vida	$0,46 \pm 0,13$	-----	$1,33 \pm 0,16^\bullet$

* $p < 0,05$ vs GMS y ayuno. • $p < 0,005$ vs GMS y ayuno. Media \pm SEM.

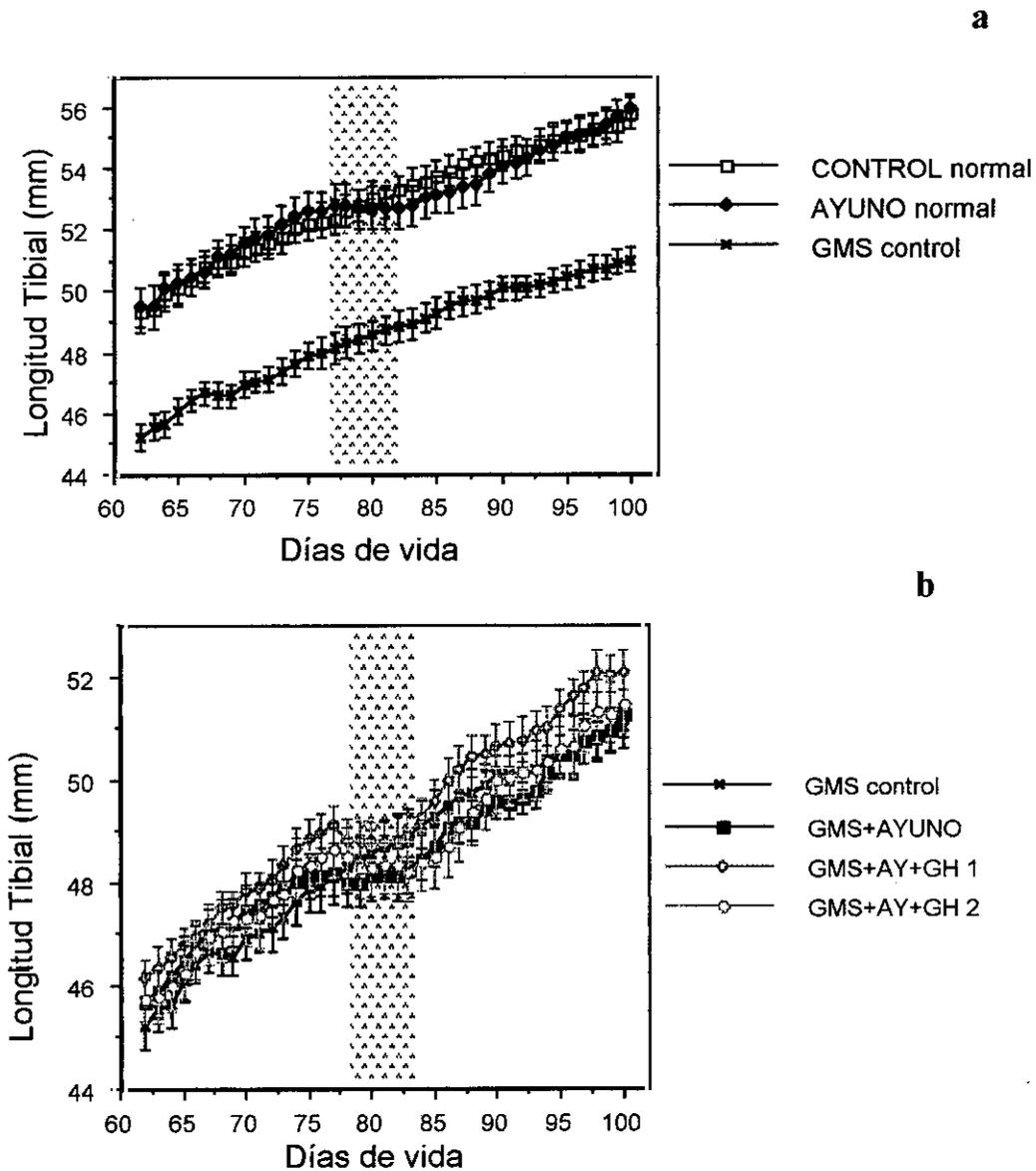


Figura 46. Evolución de la longitud tibial media \pm SEM, desde los 62 hasta los 100 días de vida.

Los 6 días que comprenden el período de ayuno aparecen con fondo moteado en la gráfica. ① tratamiento con GH desde los 83 hasta los 87 días de vida. ② tratamiento con GH desde los 87 hasta los 90 días.

a. Animales normales sometidos o no a ayuno y animales tratados con GMS.

* $p < 0,0001$ vs animales normales.

b. Animales tratados con GMS, sometidos a ayuno y tratados o no con GH.

No existen diferencias significativas en la velocidad de crecimiento, calculada como diferencia en longitud tibial, entre el grupo control con dieta normal, el grupo de

animales normales ayunados, y el grupo con GMS ayunados en el período de realimentación más temprano (desde los 83 hasta los 87 días de vida). Sin embargo en el análisis de regresión lineal (Tabla XIV), considerando desde el día 84 al final del experimento, los grupos ayunados muestran una pendiente superior que los animales con dieta normal; también se detecta un aumento de esta pendiente por efecto del tratamiento con GH más tardío (②). No llegan a existir diferencias en la longitud final en ninguno de los grupos por la restricción de dieta, aunque se mantiene la diferencia por el tratamiento neonatal con GMS.

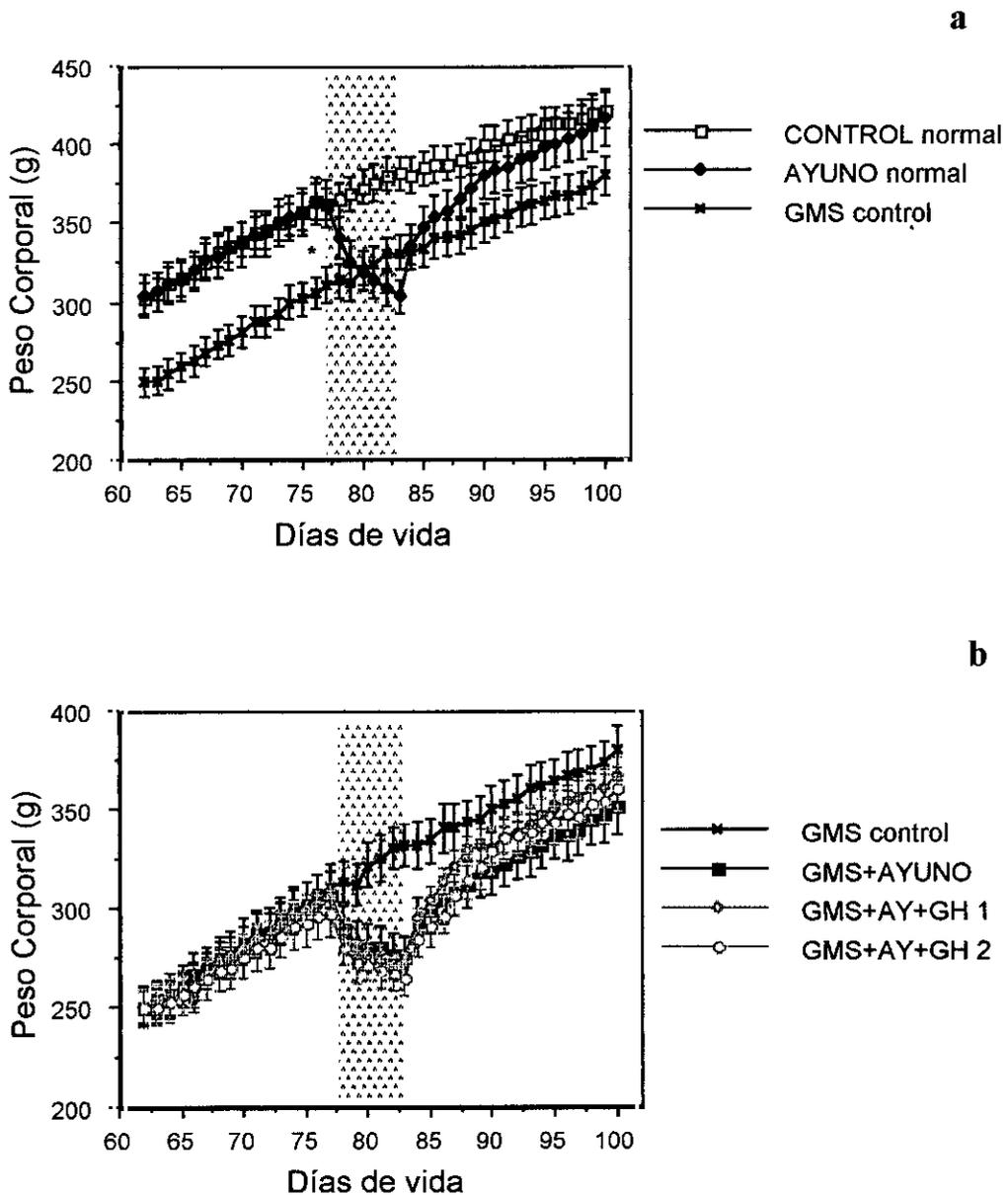
Tabla XIV. PENDIENTE DE LA RECTA DE REGRESIÓN LINEAL SIMPLE DE LA LONGITUD TIBIAL Y LOS DÍAS DE VIDA EN ANIMALES NORMALES O TRATADOS CON GMS DESDE LOS 84 DÍAS DE VIDA HASTA EL FINAL DEL EXPERIMENTO

GRUPOS	No ayuno (normal)	Ayuno (normal)	GMS (control)	GMS + ayuno	GMS+Ayuno +GH①	GMS+Ayuno +GH②
Pendiente	123,62	187,37	110,23	163,2	167,4	192,49

5.3.2 Evolución ponderal

A los 77 días de vida existe una diferencia significativa de peso entre animales normales y tratados con GMS, siendo éstos menores (figura 47a).

Durante el tiempo en que se mantiene el ayuno se ocasiona una pérdida ponderal significativa, tanto en animales normales como en los GMS (figura 47b), aunque este efecto es más dramático en los primeros que en los segundos (control $19,14 \pm 1,3$ g, normales con ayuno $-59 \pm 6,2$ g, GMS $20,86 \pm 2,03$ g, GMS y ayuno $-33 \pm 1,48$ g, $p < 0,0001$), ya que la disminución ponderal es de un 16,3% en los normales y de un 10,9% en los animales tratados con GMS.



Todos los grupos sometidos a ayuno mostraron un incremento ponderal postrealimentación significativamente superior a los animales mantenidos con dieta normal.

La administración de GH incrementa significativamente el peso durante el tiempo en que se administra, y siendo proporcionalmente más eficaz en el tratamiento que comienza más tarde, tal y como puede verse en la figura 48.

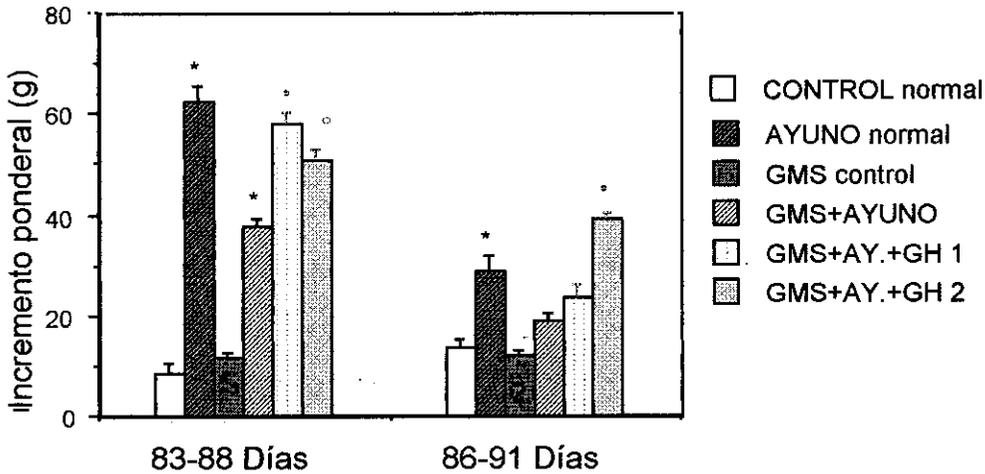


Figura 48. Incremento ponderal medio \pm SEM, desde los 83 hasta los 88 días de vida (derecha) y desde los 86 hasta los 91 días de vida (izquierda). ① tratamiento con GH desde los 83 hasta los 87 días de vida. ② tratamiento con GH desde los 87 hasta los 90 días. * $p < 0,01$ vs grupo correspondiente sin ayuno, • $p < 0,01$ vs grupo correspondiente sometido a ayuno, ° $p < 0,05$ vs grupo correspondiente sometido a ayuno.

En el análisis de regresión lineal (Tabla XV), puede observarse que el grupo de menor pendiente es el control no sometido a ayuno. No llegan a existir diferencias en las pendientes de los dos grupos sometidos a tratamiento con GH, aunque ambos son superiores al grupo GMS ayunado y sin GH. No llegan a existir diferencias en el peso final en ninguno de los grupos por la restricción de dieta, aunque se mantiene la diferencia por el tratamiento neonatal con GMS.

Tabla XV. PENDIENTE DE LA RECTA DE REGRESIÓN LINEAL SIMPLE DEL PESO Y LOS DÍAS DE VIDA DESDE EL DÍA 84 HASTA EL FINAL DEL EXPERIMENTO.

GRUPOS	No ayuno (normal)	Ayuno (normal)	GMS (control)	GMS + ayuno	GMS+Ayuno +GH①	GMS+Ayuno+ GH②
Pendiente	2,63	4,62	2,83	3,43	4,5	4,46

El cálculo de una modificación de la media móvil para la longitud tibial y el peso corporal, pone de manifiesto las diferencias existentes en el comportamiento de estos dos parámetros. En peso aparece un claro rebote tras el periodo de ayuno, que no es observable en longitud (figuras 49 y 50).

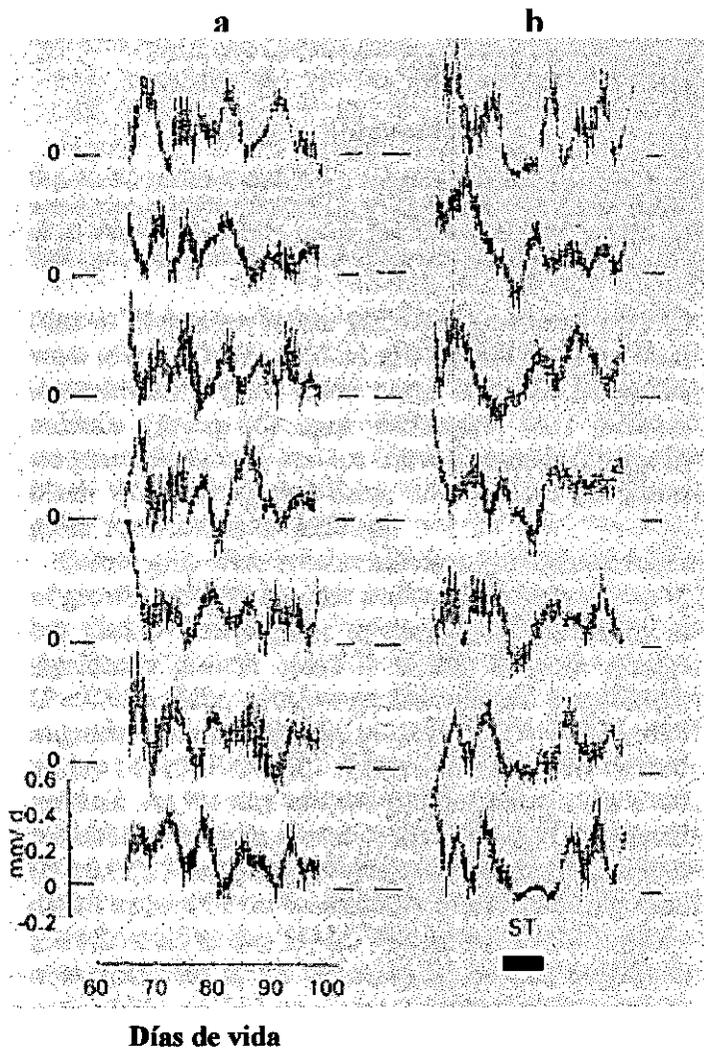


Figura 49. “Tasas medias diarias de crecimiento tibial”, calculadas de forma similar a la media móvil, y el límite de confianza al 95%, representadas de manera individualizada. El período de ayuno se indica con una barra negra horizontal en la parte inferior derecha a. Machos normales. b. Machos normales sometidos a ayuno.

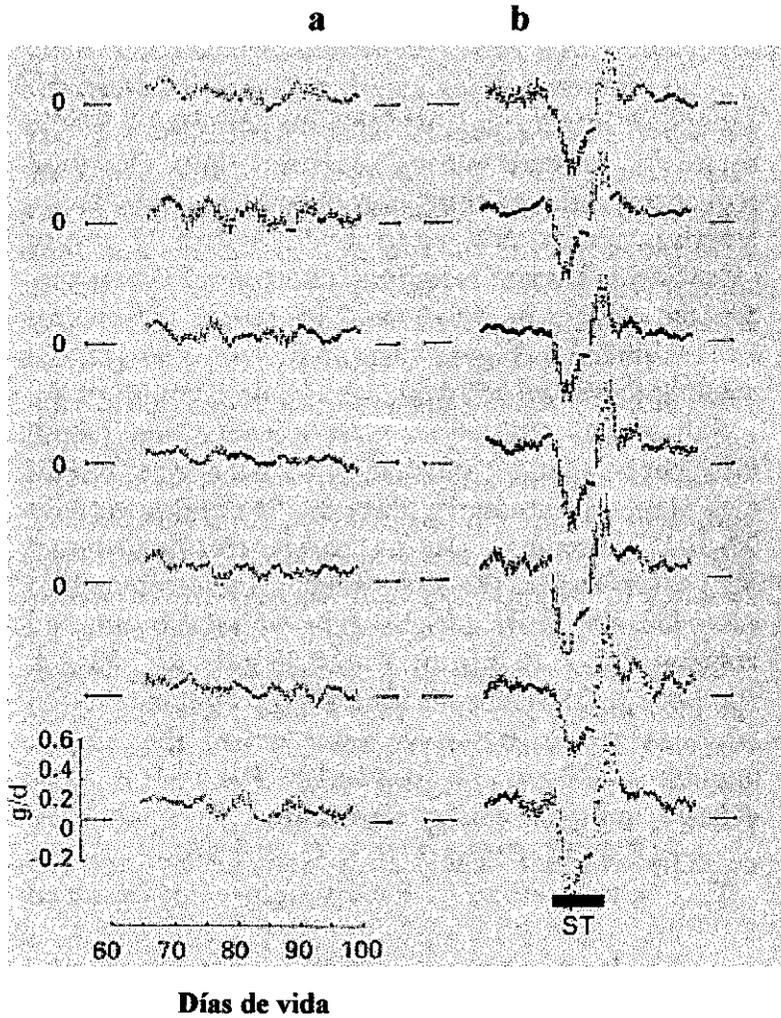


Figura 50. “Tasas medias ponderales diarias”, calculadas de forma similar a la media móvil, y el límite de confianza al 95%, representadas de manera individualizada. El período de ayuno se indica con una barra negra horizontal en la parte inferior derecha. **a.** Machos normales. **b.** Machos normales sometidos a ayuno.

5.3.3 Eje Somatotropo

Tal y como se ha descrito previamente el tratamiento con GMS disminuye significativamente los niveles plasmáticos de IGF I (figura 51). El ayuno conduce igualmente a un descenso en este valor, pero únicamente en animales normales, no disminuyendo en los animales GMS. Tampoco el tratamiento posterior con GH, a los animales previamente tratados con GMS, eleva dichos niveles.

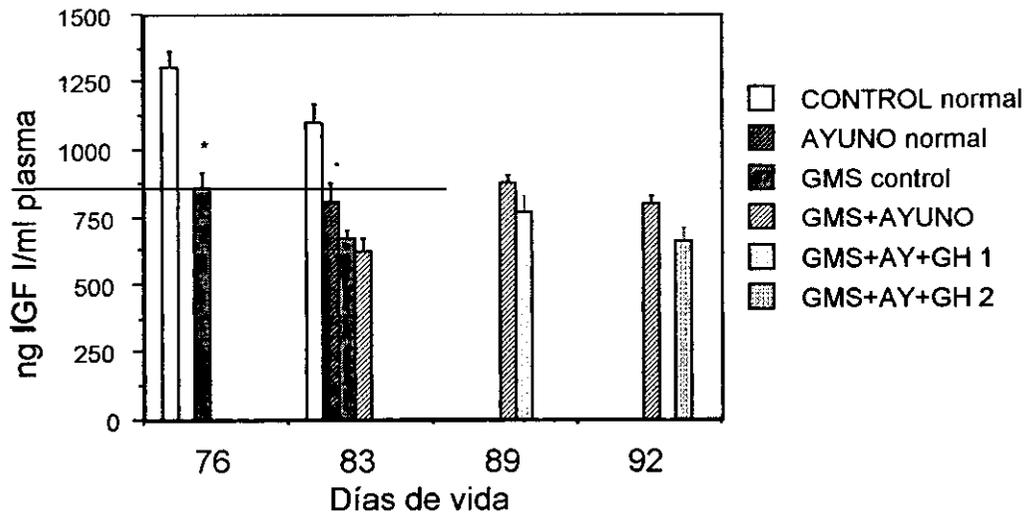


Figura 51. Niveles plasmáticos medios \pm SEM de IGF I. Los 76 días de vida corresponden al día anterior al comienzo del ayuno. Los 83 días corresponden al final del período de ayuno pero con anterioridad al comienzo de la realimentación. Los 89 y 92 días corresponden, respectivamente a dos días después de finalizados cada uno de los tratamientos con GH. ① tratamiento con GH desde los 83 hasta los 87 días de vida. ② tratamiento con GH desde los 87 hasta los 90 días. * $p < 0,0001$ vs control. • $p < 0,05$ vs control.

6. ANÁLISIS MATEMÁTICO ESPECIAL DEL CRECIMIENTO OSCILATORIO (CARACTERIZACIÓN DE LOS MINIESTIRONES)

El último aspecto a analizar son las características que presentan los miniestirones, es decir los cambios no lineales en la velocidad de crecimiento observados en todas las ratas; para ello se analizaron los datos de longitud tibial de la mayoría de los animales utilizados a lo largo de los diversos experimentos, agrupándose por sexo y tratamiento, encontrando más de 600 “formas S” significativas (según los criterios previamente descritos en material y métodos), lo que supone un 73% del total de miniestirones detectados.

Se utilizaron 42 ratas macho y 25 ratas hembra normales, 9 ratas macho y 9 ratas hembra normales tratadas con GH, 21 ratas macho y 20 ratas hembra tratadas con GMS, y 9 ratas macho y 8 ratas hembra tratadas con GMS y GH. Todos ellos con edades comprendidas

entre los 22 y los 100 días de vida. Del total de los animales macho normales y tratados con GMS, 7 de cada uno de estos grupos corresponden a animales de más de 60 días.

En la tabla XVI se detallan los valores de amplitud (a_0), pendiente (γ), y el número de miniestirones, considerados como significativos, obtenidos para cada grupo de animales, con edades comprendidas entre los 22 y los 60 días de vida. Recordemos que a_0 es una amplitud ajustada a la función doble exponencial (Gompertz), y que γ guarda relación entre la altura y la anchura del intervalo, es decir determina la rapidez y la anchura del estirón, indicando indirectamente si éste se prolonga en el tiempo, cuanto mayor es γ más brusco será el estirón. Para una misma amplitud una disminución en la pendiente supone una elongación en el tiempo.

Tabla XVI. AMPLITUD MEDIA EXPRESADA EN mm Y PENDIENTE MEDIA, EN ANIMALES MACHOS Y HEMBRAS. A la izquierda de cada grupo se representa el número de miniestirones incluidos en estas medias.

	MACHOS			HEMBRAS		
	n	Amplitud (mm)	Gamma	n	Amplitud (mm)	Gamma
Normales	164	3,15 ± 0,12	0,9 ± 0,04	130	2,15 ± 0,09♦	1,22 ± 0,06♦
Normales + GH	42	3,07 ± 0,23	0,92 ± 0,08	46	2,47 ± 0,17	1,21 ± 0,12
GMS	68	2,91 ± 0,17	0,85 ± 0,05	96	1,74 ± 0,08*	1,7 ± 0,13*
GMS + GH	29	3,5 ± 0,28	0,73 ± 0,07	50	2,19 ± 0,11•	1,37 ± 0,12

* $p < 0,005$ vs normales. • $p < 0,005$ vs GMS. ♦ $p < 0,0001$ vs machos normales. Media ± SEM.

Existe un claro dimorfismo sexual al comparar los machos normales frente a las hembras normales; los primeros presentan mayor amplitud y menor pendiente que las hembras, es decir, miniestirones de mayor duración, más altos que éstas pero también más anchos, por lo que arrojan una pendiente más suave (figura 52). Este dimorfismo se pone también de manifiesto, en su distinto comportamiento frente los distintos tratamientos:

La administración de GH en animales normales, sólo parece afectar a la amplitud de los miniestirones de las hembras, tendiendo a aumentarla, sin modificar la pendiente, por lo que indirectamente el miniestirón ha de elongarse en el tiempo.

El tratamiento con GMS, disminuye la amplitud y aumenta la pendiente únicamente en hembras, llevando a miniestirones más bruscos y pequeños. En machos,

sólo los hace más pequeños, al tender a amplitudes y pendientes ligeramente más pequeñas.

El tratamiento con GH, en los grupos GMS, tiende a restablecer los valores normales de amplitud y pendiente. En los machos la amplitud presenta valores incluso superiores a los machos normales, pero la pendiente tiende a ser inferior, así los miniestirones serán parecidos a los normales en forma, sólo que un poco más altos y anchos. En hembras se consigue igualmente restaurar la forma de los miniestirones normales, aunque al ser la pendiente un poco superior serán ligeramente más abruptos.

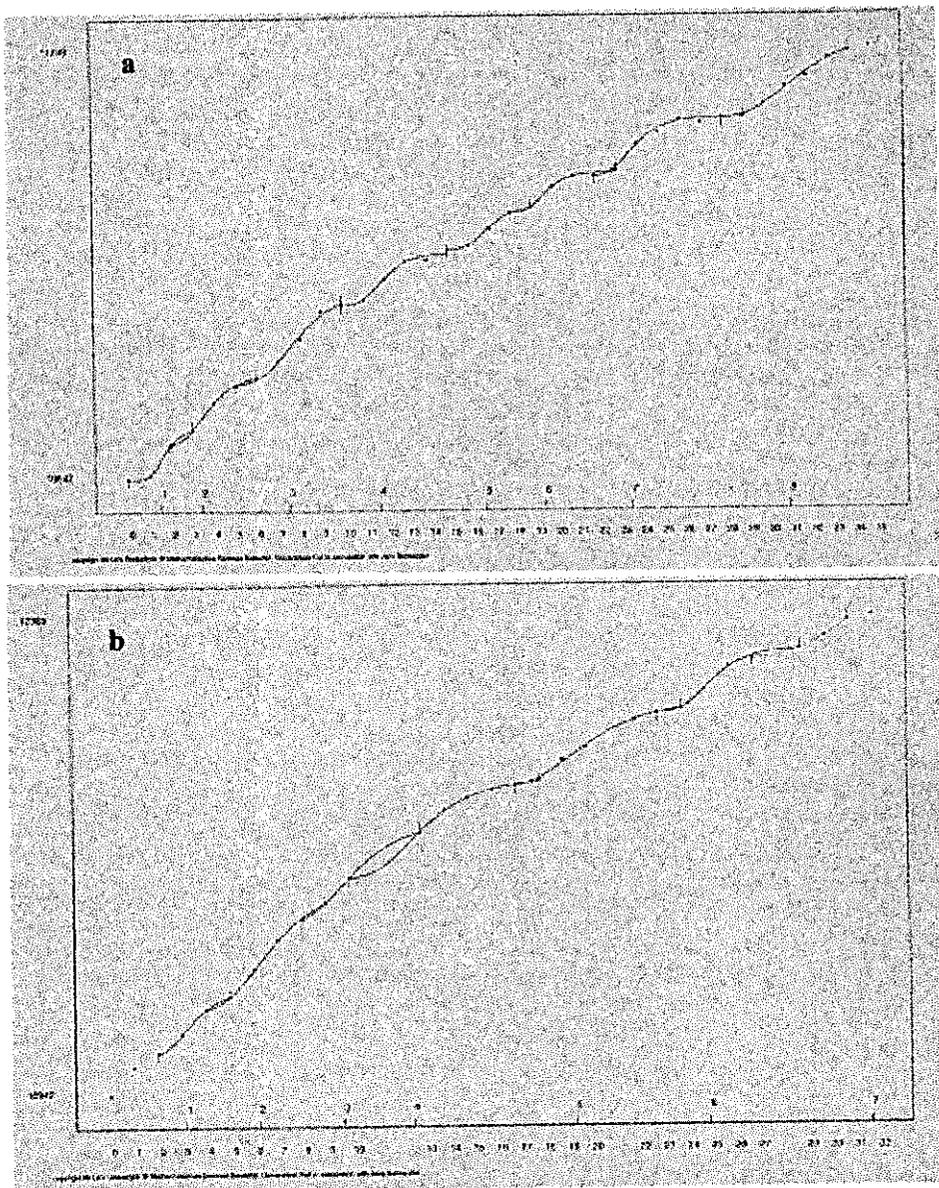


Figura 52. Representación de la longitud tibial en mm frente a los días de observación, del ajuste a la función doble exponencial de una rata hembra normal (a) y una rata macho normal (b).

Se estudió, además, la posible existencia de correlaciones entre amplitud y pendiente en función de la edad:

Se encuentra una correlación negativa entre amplitud y edad, que fue moderada pero significativa, es decir, la amplitud de los miniestirones disminuye al avanzar la edad, en machos y hembras (normales o tratados con GMS), y en hembras normales tratadas con GH (tabla XVII y en la figura 53).

En los grupos de machos normales y tratados con GMS existen animales de mayor edad que en el caso de las hembras, por lo que para poder establecer comparaciones entre machos y hembras para edades similares, se procedió a la exclusión de los análisis de correlación edad-amplitud a los machos mayores de 60 días de vida. De esta forma ρ disminuye marcadamente, aunque todavía sigue existiendo una correlación negativa (machos normales, $\rho = -0,32$, $p < 0,001$), pero deja de ser significativa en el caso de los machos tratados con GMS.

Tabla XVII. CORRELACIÓN ENTRE AMPLITUD Y DÍAS DE VIDA.

AMPLITUD	MACHOS	HEMRAS
Normales	-0,502*	-0,513*
Normales + GH	-0,316●	-0,508*
GMS	-0,638*	-0,459*
GMS + GH		-0,326●

* $p < 0,001$. ● $p < 0,05$

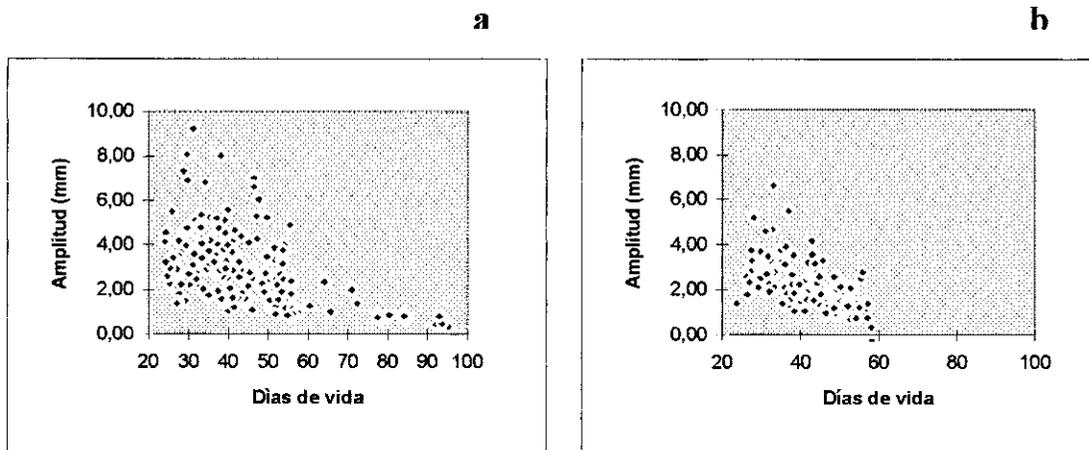


Figura 53. a. Amplitud (mm) frente a la edad (días de vida) correspondientes a machos normales.
b. Amplitud (mm) frente a la edad (días de vida) correspondientes a hembras normales.

En cuanto a la pendiente (figura 54), solamente los animales machos normales ($\rho = -0,28$, $p < 0,001$) y los tratados con GMS presentan una correlación negativa significativa ($\rho = -0,548$, $p < 0,001$), no siendo significativa al haber excluido los animales mayores de 60 días, por lo que en general este parámetro parece ser más independiente de la edad que la amplitud.

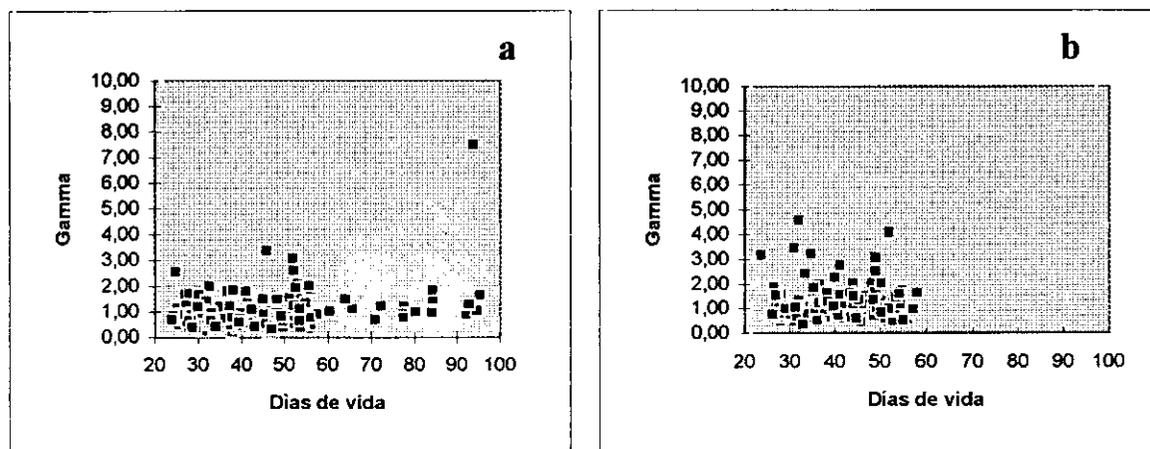


Figura 54. a. Pendiente (gamma) frente a la edad (días de vida) correspondientes a machos normales.

b. Pendiente (gamma) frente a la edad (días de vida) en hembras normales.

Además de la caracterización de la forma de los miniestirones, también estudiamos el tiempo entre miniestirones subsecuentes (período), y su correlación con la edad. Algunos de los intervalos fueron descartados para los análisis, por lo que existen huecos en la secuencia de funciones y no todos los miniestirones son consecutivos. Esos huecos, producidos por la eliminación de lo considerado como “no estirones” y cuya significación biológica desconocemos, influirían de forma notable en el tiempo que separa los miniestirones. Por ello sólo se utilizaron miniestirones consecutivos.

No llegan a existir diferencias significativas en el período en que ocurre el pico del miniestirón (machos $4,35 \pm 0,17$ días, hembras $4,2 \pm 0,17$ días) y cuya media según los diferentes tratamientos está entre 4 y 5 días. En este parámetro es importante recordar que comparamos el tiempo en el que ocurre el máximo, y no su duración, por lo que la distinta forma de los miniestirones influye.

En general con el aumento de la edad, aumenta el período espaciándose el tiempo entre estos miniestirones (figura 55, tabla XVIII), alcanzando una correlación moderada en los machos normales ($\rho = 0,608$) y que continua siendo significativa incluso sin animales mayores de 60 días, tanto normales como con GMS.

Tabla XVIII. CORRELACIÓN ENTRE PERÍODO Y DÍAS DE VIDA.

	MACHOS	HEMRAS
Normales	0,608*	0,3*
Normales + GH	0,2	0,3
GMS	0,43 *	0,35*
GMS + GH	0,45	0,44*

* $p < 0,005$.

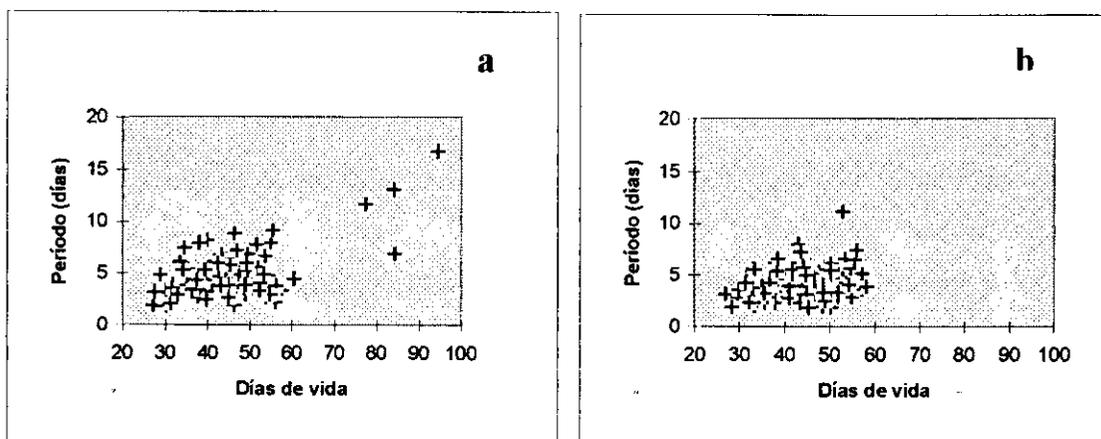


Figura 55. a. Período (días) frente a la edad (días) en machos normales.

b. Período (días) frente a la edad (días) en hembras normales.

También estudiamos la correlación existente entre amplitudes consecutivas. Se encuentran correlaciones positivas significativas, es decir cada miniestirón pequeño es seguido de otro miniestirón pequeño, y un miniestirón grande es seguido por otro grande ($p < 0,05$, figura 56). Ésto sucede en machos normales ($\rho = 0,23$), machos tratados con GMS ($\rho = 0,44$) y hembras normales ($\rho = 0,24$). La significación desaparece en los grupos de machos, tanto normales como tratados con GMS, cuando se excluyen los animales mayores de 60 días.

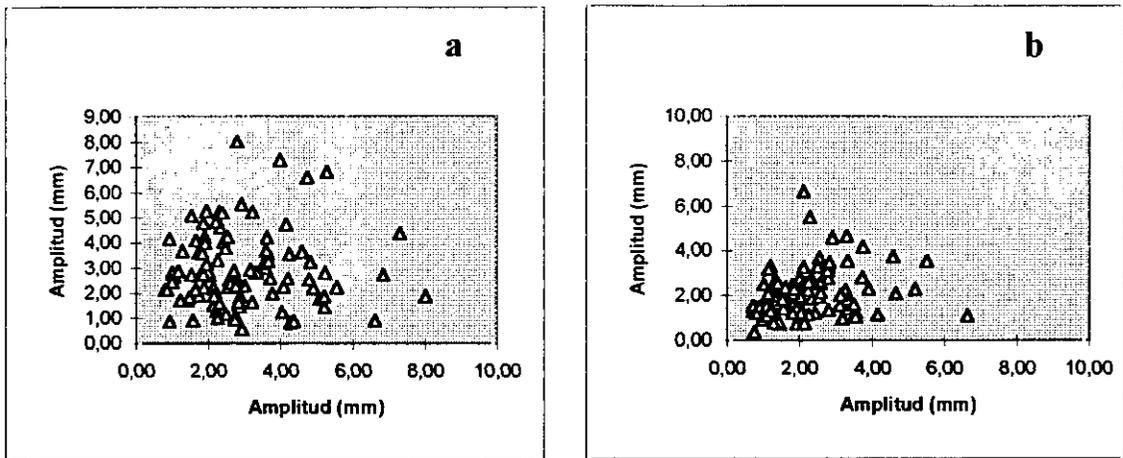


Figura 56. a. Amplitud (mm) frente a amplitud (mm) de miniestirrones subsecuentes correspondientes a machos normales.
 b. Amplitud (mm) frente a amplitud (mm) de miniestirrones subsecuentes correspondientes a hembras normales.

No se encontró ninguna correlación entre los períodos de los miniestirrones, (figura 57), es decir si es momento en el que ocurría un máximo influía sobre el momento en el que tendría lugar el próximo.

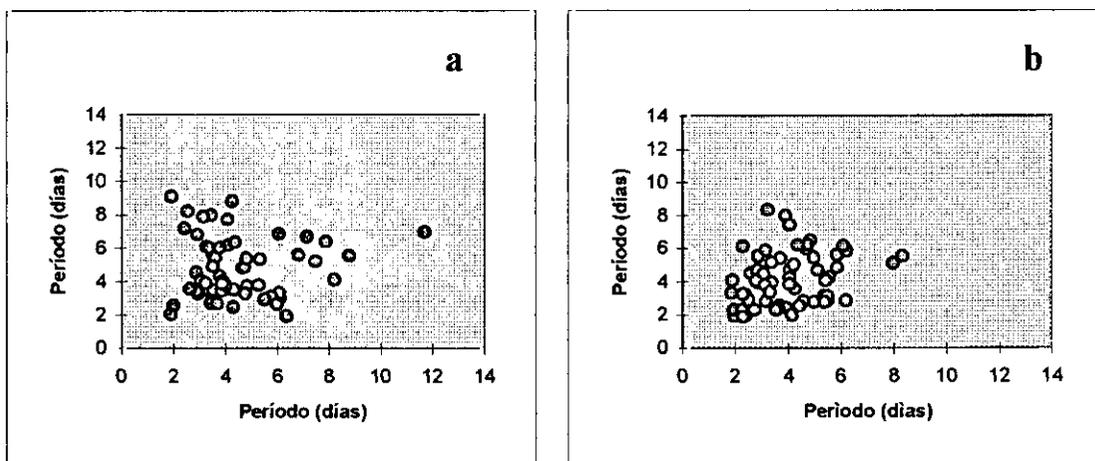


Figura 57. a. Período (días) frente a período (días) de miniestirrones subsecuentes, correspondientes a machos normales.
 b. Período (días) frente a período (días) de miniestirrones subsecuentes, correspondientes a hembras normales.

DISCUSIÓN

1. MICROKNEMOMETRÍA

Hemos fundamentado parte de los resultados presentados en esta tesis, en la aplicación de una nueva técnica de medida de crecimiento, llamada microknemometría, que compararemos con otras técnicas de medida de la longitud tibial, así como con otros parámetros que se utilizan habitualmente para evaluar el crecimiento, como la longitud del cuerpo o el peso corporal.

La microknemometría (Tresguerres y cols. 1994, 1995, Hermanussen 1995, Hermanussen y cols. 1995, 1996, 1997b, Rol de Lama y cols. 1997) es una técnica no invasiva que puede ser aplicada sin dañar el proceso de crecimiento, estando el animal consciente, y con un error técnico muy inferior a la tasa de crecimiento diaria de la rata, lo que permite una medida precisa y un seguimiento diario de la evolución de este parámetro en el mismo animal durante largos periodos de tiempo. Además, los animales previamente acostumbrados a la manipulación, no extrañan al observador y están relajados y tranquilos durante las mediciones, lo que permite la repetición de las mismas. Por otra parte ofrece la ventaja de ser un sistema *in vivo*.

Se han desarrollado numerosas técnicas que permiten una medida muy precisa de la longitud tibial, estudiando además con detalle el proceso de elongación de los huesos largos.

El marcaje con timidina tritiada (Walker y Kember 1972a), que se incorpora en células donde está habiendo síntesis de ADN, permite detectar el número de células proliferativas, y calcular una tasa de crecimiento utilizando el índice de marcaje, el tamaño de las células hipertróficas, y la duración de la fase de síntesis.

La inyección de sustancias fluorescentes que se incorporan al cartilago de crecimiento (oxitetraciclina, calceína) proporciona la tasa de crecimiento longitudinal del hueso ocurrida entre el momento del marcaje y el sacrificio del animal. En el marcaje con oxitetraciclina (Hansson 1967), se estudia el cartilago longitudinalmente en intervalos de espacio regulares, midiendo las distancias entre 2 marcas fluorescentes; la media de estas distancias permite calcular la tasa de crecimiento con un error de pocos μm (Jansson y cols. 1982a, 1982b, Aspenberg y cols. 1985, Breur y cols. 1991, Wilsman y cols. 1996). El marcaje con calceína además permite determinar la formación de hueso nuevo y la tasa de mineralización (Stevenson y cols. 1990). En general estas técnicas no radiactivas tienden a substituir el marcaje con timidina tritiada (Wilsman y cols. 1996).

Otra técnica habitual es el implante de marcadores metálicos en el hueso, en la parte superior e inferior del cartílago proximal; la medición con un calibre o micrómetro de la distancia entre estos marcadores sobre posteriores series radiográficas, permite estimar el crecimiento del cartílago proximal (Baron y cols. 1992, 1994). Otro método es la medida directa de la tibia sobre una radiografía (Hughes y Tanner 1970a, 1970b, Ali y Dickson 1994).

La mayoría de las técnicas que implican marcajes, buscan la caracterización de la cinética celular implicada en el crecimiento, más que una medida de éste como tal. En cualquier caso, la tasa de crecimiento obtenida se limita al corto periodo de tiempo que transcurre entre el marcaje y el sacrificio del animal, suponiendo además un crecimiento constante durante esos días.

Muchas de ellas, y a diferencia de la microknemometría, requieren manipulaciones invasivas tales como implantes, o irradiación de los animales. Otras precisan anestesia (Hughes y Tanner 1970a, 1970b, Baron y cols. 1992, Ali y Dickson y cols. 1994) para la realización de las radiografías, las cuales pueden producir reacciones inflamatorias si se repiten con mucha frecuencia (Ariznavarreta 1996a). Todo ello puede influir sobre el propio proceso de crecimiento, puesto que la cirugía y la anestesia alteran el ritmo secretor normal de GH (Robinson y Clark 1987) además del riesgo que ésta implica (Hughes y Tanner 1970a, Reina y cols. 1995), y la radiación puede impedir el crecimiento de los huesos a causa de una depleción de la población de células progenitoras (Walker y Kember 1972a). A veces, la técnica empleada en medir el crecimiento supone incluso el sacrificio del animal impidiendo una observación continuada.

Nuestro grupo encontró una tasa de crecimiento media diaria de 550 μm en los machos y 400 μm en el caso de animales hembras de alrededor de 40 días de vida, aunque las referencias a este valor son muy diferentes según el método utilizado, la raza (Hughes y Tanner 1970a) y la edad (Walker y Kember 1972b, Reina y cols. 1995) del animal.

Walker y Kember (1972b) utilizando series radiográficas muestran tasas de crecimiento en machos Wistar de 400 $\mu\text{m}/\text{día}$ y de 280 $\mu\text{m}/\text{día}$ a los 28 y a los 42 días de vida, respectivamente. Breur y cols. (1991) con la técnica del marcaje con oxitetraciclina presentan tasas de 360 μm diarios en ratas de 35 días agrupando machos y hembras al azar, o de 534 μm en machos Long Evans de 28 días (Wilsman y cols. 1996), mientras que Isgaard y cols. (1988) con el mismo método, encuentran una tasa de 485 μm en ratas machos Sprague-

Dawley de 55 días de edad, o Gosteli-Peter y cols. (1994) con otra cepa (Tif RAI) y utilizando calceína como marcador, muestran tasas de crecimiento en ratas machos de 56 días de vida de 1135 μm . Estos datos son un claro ejemplo de las diferencias en los resultados obtenidos por los distintos autores, incluso utilizando el mismo método, debido como ya se ha comentado, a la diferente edad, raza o al hecho de agrupar machos y hembras.

En la microknemometría además de la longitud de la tibia, se incluye la medida del tejido blando que recubre el hueso (Wit y cols. 1987), la rótula y el grosor de la epífisis distal del fémur, así como parte del talón (Hermanussen y cols. 1988c, 1995), lo que puede explicar las discrepancias existentes en cuanto a las tasas de crecimiento obtenidas por otros métodos invasivos y la microknemometría. Así lo pusieron de manifiesto Hermanussen y cols. (1992) en los estudios llevados a cabo en conejo, en los que compararon la tasa de crecimiento obtenida en 24 horas con un aparato similar al nuestro, el kyniklómetro (987 μm), frente a la utilización de estereofotogrametría de rayos X (715 μm).

Hemos usado la microknemometría para medir la tibia derecha en la rata, y aunque no hemos realizado estudios de crecimiento en la tibia contralateral, se admite la misma tasa de crecimiento en ambas tibias (Wilsman y cols. 1996). Hermanussen y cols. (1992) encontraron una alta correlación entre el crecimiento de la tibia derecha y la izquierda en el conejo. Es además una práctica común, cuando se utilizan técnicas invasivas, realizar manipulaciones en una de las tibias utilizando la opuesta como control intacto no manipulado (Isaksson y cols. 1982, Ali y Dickson. 1994, Baron y cols. 1994).

La tasa de crecimiento longitudinal depende de una combinación de la tasa proliferativa, que añade nuevas células al cartilago de crecimiento, de la tasa de maduración o hipertrofia, y de la síntesis de matriz, todo lo cual lleva, en última instancia, a la expansión del cartilago de crecimiento (Loveridge y Farquharson 1993, Wilsman y cols. 1996). La importancia relativa concedida a la proliferación de condrocitos (Ohlsson y cols. 1993, 1994, Kember 1993), al volumen final de los condrocitos hipertróficos (Breur y cols. 1991, 1994), o a la duración del ciclo celular varía según los autores (Hunziker y cols. 1994, Wilsman y cols. 1996). Aunque es probable que las contribuciones al crecimiento de la proliferación y la hipertrofia, varíen significativamente en función de la edad del animal y de la especie (Farnum y Wilsman 1993).

Muchos estudios se centran en el crecimiento del cartilago proximal tibial (Clark y Robinson 1985a, 1985b, Isgaard y cols. 1986, Ohlsson y cols. 1992b, Baron y cols. 1994),

probablemente debido a que presenta mayor velocidad de crecimiento que el cartilago distal tibial o los cartilagos del radio (Breur y cols. 1991). Nuestra técnica estudia el hueso completo con lo que se considera también la contribución del cartilago distal a la elongación de hueso, si bien esta contribución es característica del hueso y de la especie (Wilsman y cols. 1996) y se atenúa conforme el animal se hace mayor (Walker y Kember 1972b, Breur y col. 1991).

Por otra parte, existen otras formas habituales de evaluar el crecimiento, como puedan ser la longitud corporal (medida como distancia naso-anal), la longitud de la cola o el peso corporal.

La medida de longitud tibial refleja, por otra parte una medida de un hueso largo cuyo desarrollo longitudinal depende del cartilago de crecimiento, siendo la GH la única hormona que estimula el crecimiento longitudinal del hueso de forma dosis dependiente (Ohlsson y cols. 1993, 1994). A diferencia de éstos, los huesos del cráneo y de la cara parecen tener un crecimiento primordialmente genético (Tresguerres 1992); así la bóveda del cráneo y la base craneal están afectados por el crecimiento del cerebro y la cavidad ocular (Moreno y cols. 1996). La GH estimula el crecimiento longitudinal *in vivo* mediante su acción en el cartilago, siendo más importante en el cartilago de crecimiento epifisario (Daughaday 1981). Por ello la mayoría de las investigaciones posteriores a esta observación estudiaron principalmente este efecto (Daughaday 1981).

Resulta por tanto más lógico, la utilización de una técnica que mida un hueso largo, frente a la medida de la longitud del cuerpo o de la cola constituidas por huesos cortos. Además se ha comprobado que medidas precisas del crecimiento longitudinal del hueso son un buen índice de aumento de crecimiento (Martínez y cols. 1996).

Aunque existe cierta correlación entre el peso corporal y la longitud tibial (Jansson y cols. 1982a), existen diferencias entre estos dos parámetros, en algunos casos sutiles, y en otras más evidentes, pero suficientes como para poder establecer un distinto comportamiento. Así por ejemplo, Schlechter y cols. (1986) encuentran un efecto estimulador del crecimiento por el tratamiento con GH, en ratas hipofisectomizadas, sin detectar cambios ponderales. También se ha visto en recién nacidos (Gibson y cols. 1993), que los cambios en crecimiento de la longitud de la pierna no siempre se acompañan por cambios en peso y *viceversa*.

El peso está influido por cambios en la hidratación y en los depósitos de grasa (Gibson y cols. 1993), sobre todo en aquellos casos en los que este depósito es importante

(Michaelsen 1994), como sucede por ejemplo, en el caso de los niños pequeños (Michaelsen 1994, Lampl y cols. 1995), en los sujetos obesos, o en la rata tratada con glutamato monosódico (Redding y cols. 1971). Por eso, un aumento en el peso no se acompaña necesariamente de un aumento de la longitud (Isaksson y cols. 1987).

Esto puede ser consecuencia de que la GH presenta por un lado acciones metabólicas y por otro actúa estimulando el crecimiento longitudinal de los huesos largos. En general las diferencias obtenidas en peso por las distintas manipulaciones, son mucho menos evidentes en el crecimiento de la tibia (Jansson y cols. 1985b, Clark y cols. 1985a): Maiter y cols. (1991a) encuentran una diferencia ponderal entre machos y hembras de aproximadamente el 40 %, que se reduce a un 20% en el caso de la longitud de la cola y a un 12% en la longitud tibial; Jansson y cols. (1985b) encuentran que la diferencia entre machos y hembras, en peso es del 44 % y en crecimiento longitudinal del hueso del 17%; Groesbeck y cols. (1987), observaron que la estimulación de crecimiento por GH en ratas hembras, es también menos evidente en la longitud de la cola que en el peso corporal.

2. PATRÓN NORMAL DE CRECIMIENTO

2.1 Dimorfismo sexual y crecimiento en la pubertad

La existencia de dimorfismo sexual entre machos y hembras, presentando éstas una menor tasa de crecimiento (Hughes y Tanner 1970a, Jansson y cols. 1982b, 1983, 1985a, Reina y cols. 1995), es un hecho claramente establecido que se confirma en nuestros datos. De hecho algunos autores justifican la elección del animal hembra para sus trabajos basándose en que presenta una tasa de crecimiento intrínsecamente inferior (Groesbeck y cols. 1987, Robinson y Clark 1987).

En nuestros datos, las curvas de peso de machos y hembras comienzan a separarse a los 35 días de vida, y en longitud tibial a los 40 días, aproximadamente. Los datos bibliográficos apoyan nuestros resultados, ya que describen diferencias en el peso corporal y en la longitud tibial a los 30 días de vida que son muy marcadas a los 40 - 45 días (Jansson y cols. 1983, 1984, 1985b, Chowen y cols. 1993). Estas diferencias en el peso corporal y la longitud tibial entre machos y hembras coinciden con la aparición del distinto patrón secretor

de GH (Edén 1979, Jansson y cols. 1985a, 1985b) y con la entrada en la pubertad (Gabriel y cols. 1989).

Hay que resaltar que la rata, a diferencia de lo que ocurre en humanos y en conejos (Baron y cols. 1992), presenta un crecimiento del cartilago proximal de la tibia que persiste durante la mayoría de su vida y no se detecta la existencia de un estirón puberal en el crecimiento tibial ni en animales machos ni en hembras (Hughes y Tanner 1970a, 1970b, Walker y Kember 1972a). De igual forma, nuestro grupo no encontró incrementos superiores en longitud tibial durante el período peripuberal (Tresguerres y cols. 1995). Las tasas de crecimiento desde los 22 días de vida fueron muy elevadas, para ir declinando poco a poco con la edad. De forma similar, Breur y cols. (1991) encuentran en el cartilago un crecimiento superior en un 14-39% en ratas de 21 días de vida (prepuberales) frente a animales de 35 días (peripuberales). Sin embargo, es cierto que sí se encuentra un incremento en la tasa de crecimiento, evaluado como peso corporal, coincidente con la aparición de la pubertad (Chowen y cols. 1993, Hu y cols. 1993).

2.2 Variaciones en la velocidad de crecimiento:

Nuestros datos, obtenidos por seguimiento diario, que impediría la interferencia con cualquier tipo de ritmo infradiano, apoyan la existencia de “ministirones” en la ratas, es decir oscilaciones en la velocidad de crecimiento, presentes en prácticamente todos los animales estudiados, siendo este fenómeno independiente del sexo. Estudios previos en conejo, ya pusieron de manifiesto una periodicidad en el crecimiento tibial de 8 a 14 días, apareciendo incluso oscilaciones ultradianas al medir los animales cada 3 horas, encontrando un estirón máximo durante el final de la noche y las primeras horas de la mañana (Hermanussen y cols. 1992).

Para excluir la posibilidad de variaciones debidas a una oscilación ultradiana las medidas diarias se llevan a cabo a la misma hora del día, tal y como se ha sugerido anteriormente (Stevenson y cols. 1990).

Los primeros trabajos de Valk y cols. en 1983 en niños, ya documentaban cambios semanales, diarios e incluso en el mismo día, de la longitud tibial. Proponían por tanto, un patrón intrínsecamente irregular del crecimiento tibial, explicable en algunos casos por enfermedades intercurrentes (Wales y Milner 1987), con desconcertantes picos y valles en la

tasa de crecimiento (Wales 1994, Wit y cols. 1987). La exclusión de los posibles errores sistemáticos y de la diferente actividad física anterior a la medida aún mostraba un crecimiento no lineal en al menos, el 70% de los niños sanos estudiados, con marcados incrementos en crecimiento de la longitud tibial, que llamaron "miniesticiones" (Hermanussen y cols. 1987, 1988b). La actividad física parece aumentar la longitud tibial en adultos y disminuirla en niños, desapareciendo el efecto a las 2 horas (Hermanussen y cols. 1988a). Las variaciones observadas excedían lo que se podía atribuir al error técnico de la medida, que explicaría un 10% de las fluctuaciones, y superaban ampliamente la tasa media de crecimiento diario (Hermanussen y cols. 1988a); si bien es cierto que existe influencia del grosor de la grasa subcutánea que se incluye en la medida, la correlación entre los cambios ponderales y los incrementos en longitud tibial era demasiado baja como para explicar que las fluctuaciones en la longitud de la tibia se debieran exclusivamente a esa grasa (Hermanussen y cols. 1988a).

Los estudios por knemometría en niños de 3 a 15 años, con medidas semanales, muestran un patrón de crecimiento oscilante, con cambios en la velocidad de crecimiento que presentan una periodicidad de 30 a 55 días (Hermanussen y cols. 1988b, Hermanussen y Burmeister 1993). Estos autores encontraron además, una correlación positiva, aunque baja, entre la frecuencia de los miniesticiones y la altura del individuo: cuanto más alto era el individuo más frecuentes eran los miniesticiones, sin apreciar diferencias atribuibles al sexo, la edad o efectos estacionales (Hermanussen 1989). Si las medidas se realizaban diariamente se encontraba un ritmo circaseptano en la aparición de los miniesticiones, con un dimorfismo sexual con periodos de 7 a 9 días en niñas y de 13 a 16 en niños, poniendo además de manifiesto que el periodo se ve afectado por el espacio de tiempo entre las medidas (Hermanussen 1989, Hermanussen y Burmeister 1993). Esta disparidad apoyaría la idea del crecimiento como un fenómeno oscilatorio, donde aparecen interferencias entre los intervalos regulares entre las medidas y el ritmo endógeno de este proceso, por lo que la descripción más exacta pasaría por un seguimiento continuo (Hermanussen 1989).

Así, la no-linealidad del crecimiento parece ser cada vez más aceptada (Togo y Togo 1982, Valk y cols. 1983a, 1983b, Wit y cols. 1987, Hermanussen 1995, Hermanussen y cols. 1985, 1988b, 1992, Hermanussen y Burmeister 1993, Hermanussen y cols. 1995, Tresguerres y cols. 1995, Wolthers 1996, Rol de Lama y cols. 1997), o al menos se acepta que el crecimiento presente fluctuaciones en su velocidad (Wales y Milner 1987, Gibson y cols. 1993, Michaelssen 1994).

Otra cuestión todavía objeto de controversia es si el crecimiento es o no un proceso continuo. Algunos autores como Lampl y cols. (1992, 1995), proponen un modelo de crecimiento en el niño llamado "saltation and stasis", con discontinuidades y picos aperiódicos con una amplitud media de 0,9 cm en el primer año de vida, observando crecimiento únicamente en 33 días de un total de 372, lo que arroja un tasa anual de 31 cm durante ese primer año, es decir encuentran que el incremento en altura no es continuo. Este modelo ha sido discutido por Heinrichs (1995) y Klein y cols. (1994), que apoyan un crecimiento continuo; estos últimos autores trabajando con conejos, proponen además, un incremento de longitud constante aunque sus resultados se limitan a un período de sólo 9 días, y una inspección minuciosa de sus gráficas sugiere incrementos no constantes en algunos animales. Hermanussen y Geiger-Benoit (1995) no encontraron tampoco "saltos" tal y como los describe Lampl, si bien concluyen que los períodos de estancamiento de crecimiento son un fenómeno normal en el patrón de crecimiento humano; estos estancamientos como un fenómeno normal ya se apuntaron en 1982 (Togo y Togo 1982). No obstante los mecanismos de control que expliquen tanto el crecimiento continuo (Lampl y cols. 1995) o a "saltos" (Heinrichs 1995) no están aclarados.

De la constatación de la existencia de un crecimiento no lineal, se deriva otra pregunta: ¿Se trata de un fenómeno periódico?. Este aspecto lo retomaremos al final de la discusión.

❖ *Variaciones ultradianas:*

Además quisimos estudiar la posible existencia de un ritmo de crecimiento en períodos inferiores a 24 horas, por lo que realizamos medidas de la longitud tibial en rata cada 3 horas, de igual forma que los estudios llevados a cabo en el conejo (Hermanussen y cols. 1992).

Nuestros datos pusieron de manifiesto la existencia de variaciones espontáneas en la velocidad de crecimiento, con incrementos máximos entre las 6 y las 9 horas (Tresguerres y cols. 1994, Hermanussen y cols. 1995), hallazgo que coincide con observaciones previas acerca de la hora en la que el índice mitótico de los condrocitos es máximo (Walker y Kember 1972b, Stevenson y cols. 1990). Estos últimos autores también detectaron variaciones diarias en el grosor del cartilago de crecimiento proximal, aunque no fueron capaces de establecer

una correlación entre el índice mitótico o el grosor del cartílago y el crecimiento longitudinal diario. La relación del crecimiento con la cinética celular parece sin embargo clara, ya que los cartílagos que muestran condrocitos proliferativos con ciclos celulares más cortos, son los que presentan tasas de crecimiento más rápidas (Wilsman y cols. 1996).

También se han detectado variaciones en la síntesis de matriz condral, que ocurre principalmente durante el día, en la mineralización, que parece darse principalmente por la noche (Simmons y cols. 1988, Stevenson y cols. 1990) y en la actividad de los osteoclastos, que es más alta durante el día (Simmons y cols. 1988). Con todos estos datos parece fácil pensar en la existencia de cambios en la longitud de los huesos largos producidos por la influencia de todos estos factores y cuya detección es posible con una técnica lo suficientemente precisa.

3. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN LA RATA MACHO NORMAL

Una vez conocido el crecimiento normal quisimos estudiar de que forma actuaba la GH sobre el crecimiento, investigando diversas pautas de administración de GH, para ver cual permitía una mejora en la tasa de crecimiento.

3.1 Efecto de la administración de GH sobre el crecimiento en la rata macho normal

En animales machos, no pudimos detectar ningún efecto sobre el crecimiento tratándolos con una inyección diaria de 1 U.I de GH durante 34 días. Puesto que la administración de 2 ó 4 inyecciones de GH al día parecía ser la forma más adecuada para estimular el crecimiento longitudinal del hueso (Jansson y cols. 1982a, 1982b), y otros autores habían encontrado que es más eficaz la administración continua que una única inyección diaria (Cotes y cols. 1980, Jansson y cols. 1985b, Clark y cols. 1996b), quisimos tener la completa seguridad de que la ausencia de efecto no se debía a un administración inadecuada. Por este motivo, se procedió a la administración de una sola inyección de 1 U.I a tres horas distintas del día, en un intento de encontrar la hora más apropiada para la inyección de GH, o bien una administración más reiterada mediante 3 inyecciones al día, o una infusión continua, manteniendo siempre la misma dosis total y que supone 40 veces la dosis

terapéutica habitual en niños. Tampoco esta vez encontramos ningún efecto sobre el crecimiento, independientemente de la pauta de administración de la GH, descartando por tanto, que ésta fuera inadecuada (Tresguerres y cols. 1994, 1995, Hermanussen y cols. 1996). Dosis muy inferiores (0,2 U.I.) a las nuestras son suficientes para estimular el crecimiento en ratas hipofisectomizadas (Jansson y cols. 1982a), y se sabe que la GH de primates tiene efectos somatogénicos en otras especies (Ohlsson y cols. 1993), por lo que tampoco hay motivo para pensar que nuestra GH sea inefectiva en la rata.

Existe un amplio rango en las dosis de GH utilizadas por los distintos autores, desde 200 mU/rata/día (Gosteli-Peter y cols. 1994) hasta 10 U.I. /rata/día, aunque esta última llega a ser tóxica (Groesbeck y cols. 1987). En cualquier caso la dosis utilizada por nuestro grupo (1 U.I./rata/día) fue considerablemente superior a la utilizada en humanos, que suele encontrarse entre 0,1-0,3 U.I./Kg/día (Zegher y cols. 1994, Arrigo y cols. 1995).

La estimulación del crecimiento, normalmente evaluado como peso, tanto por la administración de GH (Rogers y cols. 1988, Maiter y cols. 1990, Ohashi y cols. 1995) como por tratamiento con el péptido hipotalámico GHRH (Wehrenberg 1986, Garrel y cols. 1991, Dubreil y cols. 1994), en ratas machos no muestra generalmente resultados positivos. Sin embargo, algunos trabajos parecen estar en desacuerdo. Se ha descrito una estimulación en la ganancia ponderal en animales jóvenes, tanto por la administración de rhGH durante 7 días (Domené y cols. 1993), o por tratamiento con IGF I (Hizuka y cols. 1986, 1988), también tras 7 días, encontrando además un aumento en la longitud corporal.

No obstante la GH, en general, promueve el crecimiento de manera más efectiva que la IGF I (Isgaard y cols. 1986, Domené y cols. 1993, Gosteli-Peter y cols. 1994), con lo que nuestro tratamiento debiera haber sido más efectivo que el utilizado por el grupo de Hizuka. La dosis de GH que empleamos fue muy superior a la de Domené y cols. (1993) y sin embargo, no encontramos ningún aumento en la ganancia ponderal ni en 7 días ni en tiempos mayores. Tampoco Turner (1995) encontró ningún efecto ni en peso ni en la tasa de crecimiento longitudinal del fémur, con un tratamiento durante 5 días con rhGH en ratas de la cepa Wistar de 39 días de vida. Este efecto puede ser edad dependiente, ya que en animales macho de la cepa Wistar de 3 meses de edad, un tratamiento con GH durante 30 días determina un aumento significativo en el peso corporal y en la longitud del fémur (Ørtoft y cols. 1992).

En estudios realizados en ratas machos transgénicas, que expresan el gen para la hGH y secretan esta hormona a dosis altas, se ha descrito que estos animales presentan un incremento ponderal superior a los animales controles a los 63 días de vida, es decir a un tiempo ligeramente mayor que en nuestro estudio (Ikeda y cols. 1994). Pero además, el efecto es mucho más importante en la rata hembra (Ikeda y cols. 1994). El implante de tumores secretores de GH (Maiter y cols. 1990) también produce un incremento ponderal, pero este aumento no se detecta hasta 15 días tras el implante, cuando el animal tiene alrededor de 90 días de vida.

La administración exógena de altas dosis de GH es capaz de incrementar la ganancia de peso en ratas Wistar y Sprague Dawley pero si se trata de animales hembras (Aspenberg y cols. 1985, Groesbeck y cols. 1987, Gelato y cols. 1992).

En estudios *in vitro*, se ha descrito que la GH ejerce un efecto estimulador de la síntesis de ADN, y de la producción de matriz en condrocitos epifisarios de ratas machos normales de la cepa Sprague Dawley (Ohlsson y cols. 1992a). No obstante, estos autores afirman que el efecto depende de las condiciones del cultivo. También la GH estimula la formación de colonias de clones indiferenciados (Ohlsson y cols. 1994). Kember y cols. (1993) sin embargo, afirman que la inyección de GH en ratas normales no tiene prácticamente efecto sobre la tasa proliferativa del cartilago de crecimiento. En cualquier caso, estos trabajos están realizados *in vitro* lo cual no siempre refleja las condiciones existentes *in vivo* (Kember 1993).

Además la utilización de distinta cepa de animales (Sprague Dawley) que según algunos autores presenta una menor tasa de crecimiento que los de la cepa Wistar (Stevenson y cols. 1990), podría explicar los efectos obtenidos por la GH.

El estudio hormonal realizado en el experimento con distintas pautas de administración de GH durante 14 días, apoya la ausencia de efectos sobre el crecimiento, ya que ninguno de los tratamientos realizados fue capaz de modificar el contenido hipotálamico de SS, el contenido hipofisario de GH o los niveles plasmáticos de IGF I. Datos similares a los nuestros han sido descritos por Maiter y cols. (1990) que no encuentran modificaciones en estos parámetros tras 15 días de implante de un tumor secretor de GH y PRL. Han de pasar cuatro semanas para que aumente el contenido hipotalámico de SS, y los niveles de IGF I en plasma, y disminuya el contenido hipotalámico de GHRH e hipofisario de GH. Es decir, se deben mantener dosis muy elevadas de GH durante largo tiempo para lograr efectos (Clark y

cols. 1988); Maiter y cols. (1990) tampoco encuentran diferencias en el contenido hipotalámico de GHRH o SS, secundarias a la inyección s.c. de GH, aunque sí se consigue una disminución en los niveles plasmáticos de GH, disminución que nosotros también observamos, al igual que otros autores (Domené y cols. 1993).

Es posible que los niveles circulantes de GH alcanzados tras las inyecciones, se mantengan elevados un cierto tiempo sin llegar a producir modificaciones a nivel hipotalámico (Maiter y cols. 1990). Se ha descrito que un tratamiento con inyecciones de GH, a una dosis menor y durante 7 días, aumenta el contenido hipotalámico de SS (Berelowitz y cols. 1981). También la infusión continua de una dosis inferior a la nuestra de GH, durante 5 días, aumenta el ARNm de SS en el núcleo periventricular del hipotálamo (Rogers y cols. 1988). La diferencia en el tiempo de tratamiento podría justificar estos resultados, ya que también 7 días de tratamiento con IGF I provocan un incremento en el contenido hipofisario de GH (Hizuka y cols. 1988), sugiriendo una inhibición de la liberación de esta hormona.

La falta de respuesta de IGF I tras tratamiento con GH en la rata macho (Robinson y Clark 1987, Lanzi y Tannenbaum 1992, Domené y cols. 1993) o GHRH (Hu y cols. 1993, Kovács y cols. 1996) ya ha sido observada previamente. En nuestro caso no podemos justificar que la ausencia de incremento aumento se deba al tiempo transcurrido tras la última inyección de GH como apuntaron otros autores (Domené y cols. 1993). Cabe la posibilidad de que el aumento puberal en los niveles circulantes de IGF I, que comienzan a elevarse alrededor de los 35 días de vida, alcanzando un máximo hacia los 55 días (Handelsman y cols. 1987, Gabriel y cols. 1992) enmascare un aumento simultáneo, lo que no parece probable en todos los casos, ya que Dubreil y cols. (1994) utilizaron animales de 40 días de vida y sí obtuvieron aumento en los niveles de IGF I. Por otra parte pueden estarse produciendo cambios en la síntesis local de IGF I que no se reflejan en los niveles plasmáticos (Robinson y Clark 1987, Lanzi y Tannenbaum 1992).

La ausencia de efecto sobre el crecimiento del tratamiento con GH en machos normales podría explicar porqué la mayoría de los estudios de crecimiento se limitan a animales hembras, ratas hipofisectomizadas (Cotes y cols. 1980, Isgaard y cols. 1988), animales tratados neonatalmente con glutamato monosódico (Clark y Robinson 1985a, Robinson y Clark 1987), o ratas genéticamente enanas (Martínez y cols. 1996). En cualquiera de estos casos se trata de animales con tasas de crecimiento muy inferiores a la del macho

normal, sugiriendo la posibilidad de que el patrón de crecimiento somático sea máximo en estos animales (Jansson y cols. 1982b, Froesch y cols. 1990), por lo que cantidades adicionales de GH no sean capaces de incrementarlo. Posibilidad que ha sido apuntada anteriormente (Froesch y cols. 1990).

En general los resultados positivos obtenidos por otros autores no parecen muy concluyentes; y en cualquier caso se limitan a efectos ponderales, donde una dosis tan elevada como la utilizada en nuestro estudio no fue capaz de modificar ni siquiera este parámetro, por lo menos durante el tiempo de observación, y en animales jóvenes.

Dada la interrelación existente entre las hormonas sexuales y el crecimiento quisimos estudiar el efecto de la manipulación del eje gonadal sobre el patrón de crecimiento en la rata macho normal.

3.2 Efecto de la castración química sobre el crecimiento en la rata macho normal

La administración de análogos de LHRH, produce un fenómeno de desensibilización y disminución del número de receptores para LHRH en la hipófisis, reduciendo así significativamente el contenido de LH en hipófisis (Fraser y Baird 1987), inhibiendo su secreción (Garnelo y cols. 1991), y disminuyendo el tamaño testicular y los niveles de testosterona en plasma (Negro-Vilar y cols. 1988, Garnelo y cols. 1991). Nuestros animales mostraron un descenso del contenido hipofisario y de los niveles plasmáticos de LH, y una disminución del peso de los testículos y de las vesículas seminales, lo que garantiza la adecuada administración del fármaco y la alteración del eje gonadal.

La castración disminuye tanto la tasa de crecimiento tibial como la ganancia de peso en animales machos (Jansson y cols. 1983, Shoutens y cols. 1984, Schot y Schuurs 1990, Hope y cols. 1992), aunque en algún caso aislado se encuentran discrepancias, ya que Hock y cols. (1988) a pesar de detectar una disminución ponderal no encontraron diferencias en la longitud del fémur a los 47 días de vida de machos castrados a los 28 días de vida.

No obstante, con la administración del análogo de LHRH, no llegamos a detectar modificaciones en el crecimiento tibial (Tresguerres y cols. 1995), ni en la evolución ponderal, en el contenido hipofisario o en los niveles plasmáticos de GH, si bien el contenido hipofisario

de GH tendía a incrementarse y sus niveles plasmáticos a disminuir, indicando aparentemente una menor liberación hipofisaria. De hecho, en humanos los análogos de LHRH reducen la secreción de GH directa o indirectamente a través de la reducción en la concentración de los esteroides sexuales (Saggese y cols. 1995). Los trabajos de Pinilla y cols. (1983) demuestran que la administración en la rata del análogo D-Ala de LHRH entre los días 15 y 29 de vida tampoco producía ninguna modificación ponderal, aunque su dosis fue inferior.

La aparente contradicción de resultados entre la castración y la administración del análogo puede haberse originado por que la extirpación de las gónadas supone un tratamiento más drástico, ya que implica la eliminación no sólo de la principal fuente secretora de andrógenos, sino también de factores peptídicos testiculares no androgénicos secretados por otros tipos celulares distintos de las células de Leydig (Aguilar y cols. 1993, Scanlon y cols. 1996), todavía no identificados (Lago y cols. 1996). Así la respuesta secretora de la GH a la estimulación con GHRH se atenúa tras castración pero no tras tratamiento con EDS, que es una toxina específica para las células de Leydig (Aguilar y cols. 1993).

En vista de que no pudimos potenciar la tasa de crecimiento en la rata macho normal por la administración de GH, pasamos a estudiar este efecto en un modelo deficitario en GH.

4. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN LA RATA MACHO DEFICITARIA EN GH.

4.1 Efecto de la administración de GMS en la rata macho

Como ya hemos comentado el tratamiento neonatal con glutamato monosódico produce una destrucción selectiva de las neuronas secretoras de GHRH del núcleo arcuato del hipotálamo, lo que permite la obtención de un modelo con déficit selectivo de GH de origen hipotalámico (Bloch y cols. 1984).

En nuestro caso la administración neonatal de GMS a ratas machos y de acuerdo a los datos obtenidos por otros autores, provocó una disminución de la longitud tibial (Kovács y cols. 1996), del peso corporal (Hu y cols. 1993, Arce y cols. 1995), del contenido hipofisario de GH (Maiter y cols. 1991b, Hu y cols. 1993), de los niveles plasmáticos de IGF I (Hu y cols. 1993, Kubota y cols. 1994), así como del peso de los testículos y de las vesículas seminales (Villanúa y cols. 1992).

Algunos autores presentan descripciones puntuales de la longitud tibial, a los 28 y a los 42 días de vida (Kovács y cols. 1996) o en el momento del sacrificio (Maiter y cols. 1991b). En nuestro caso, los animales tratados con GMS, no sólo muestran menor peso y menor longitud tibial a los 22 ó a los 60 días de vida, sino que las diferencias se van incrementando a lo largo del tiempo de observación. La diferencia en la longitud tibial se acentúa a partir de los 35-40 días de vida. Anteriormente ya se ha descrito un aumento progresivo en la diferencia ponderal (Corder y cols. 1990).

Esta edad de la rata coincide con el período en el que se establece el patrón secretor adulto de GH, ya que a los 35 días los machos normales ya presentan un contenido elevado de GHRH en la eminencia media (Gabriel y cols. 1989). Además está descrito que el tratamiento con GMS evita (Handelsman y cols. 1987) o atenúa el aumento puberal de IGF I (Hu y cols. 1993), lo que también puede influir en su menor tasa de crecimiento.

También encontramos disminuido el contenido hipotalámico de SS, de acuerdo con los resultados de Terry y cols. (1981) en el hipotálamo medio basal, y a diferencia de lo hallado por otros autores que han descrito valores normales (Millard y cols. 1982, Maiter y cols. 1991b, Arce y cols. 1995). Ese descenso sería lógico por la disminución de secreción espontánea de GH (Arce y cols. 1995). Terry y cols. (1981) proponen precisamente que el efecto del GMS sobre la SS no sería debido a su neurotoxicidad, sino a una alteración de los mecanismos de retroalimentación de GH sobre la SS; esta propuesta se refuerza con la inexistencia de daños debidos a la administración de GMS sobre las neuronas somatostatinérgicas del núcleo periventricular del hipotálamo (Katakami y cols. 1984, Slama y cols. 1993), donde se da la mayor concentración de este tipo de neuronas, aunque sí se afectan las del núcleo arcuato (Slama y cols. 1993). El equilibrio entre la síntesis y la liberación de SS podría también explicar que el contenido hipotalámico de esta hormona no se encuentre modificado.

También encontramos una disminución del contenido hipotalámico de LHRH, y del contenido hipofisario de LH, en consonancia con la existencia de un hipofuncionamiento del eje gonadal. Otros autores no encuentran modificaciones en la concentración de LHRH hipotalámica (Nemeroff y cols. 1981), a pesar de detectar reducciones de esta hormona en el núcleo arcuato del hipotálamo, que se compensan, no obstante, con un incremento de la misma en la eminencia media (DePaolo y Negro-Vilar

1982). También se ha sugerido que exista una liberación inadecuada de LHRH (Nemeroff y cols. 1981, Dalkin y cols. 1985). Respecto a la LH hipofisaria se ha observado desde una disminución del contenido absoluto de LH en hipófisis (Redding y cols. 1971), como en nuestros datos, hasta ligeros aumentos en su concentración en la hipófisis (Millard y cols. 1982). Estas diferencias son debidas, probablemente, al hecho de expresar sus resultados en función de la concentración de proteínas o por mg de tejido, ya que como hemos comentado el peso hipofisario también se encuentra disminuido.

Nosotros creemos que en este caso, es más lógico expresar los resultados por glándula, en lo que a la hipófisis se refiere, puesto que de esta forma valoramos la cantidad total de GH disponible y no una relación por mg de proteína que puede ser engañosa.

Al igual que en la rata macho normal quisimos saber en animales deficitarios en GH, qué papel desempeñaban los esteroides sexuales en el crecimiento y su interrelación con la GH, para lo que procedimos a estudiar el efecto producido por la castración y la terapia substitutiva con andrógenos, así como el efecto de la administración de GH combinada o no con PT en animales tanto intactos como castrados.

4.2 Efecto de la castración y tratamiento con PT sobre el crecimiento, en el modelo de la rata macho tratada con GMS

La castración en el modelo GMS lleva a una reducción adicional de la velocidad de crecimiento tibial, que no fue suficiente como para que viéramos diferencias significativas a los 60 días de vida (Tresguerres y cols. 1994, 1995), aunque sí llegan a ser significativas cuando se prolonga el tiempo de observación. Ni la castración ni el tratamiento con testosterona parecen comenzar a tener efecto hasta los 40 días de vida aproximadamente, coincidiendo con el período puberal.

La castración unida al tratamiento con GMS disminuye aún más el peso corporal, como vieron otros autores (Villanúa y cols. 1992), siendo las diferencias más marcadas en peso que en longitud, ya que en el peso se reflejaría además la falta del efecto anabolizante de los esteroides sexuales sobre el músculo (Goodman 1994), puesto que los machos castrados

pierden más masa magra que grasa (Woodward 1993). Esta reducción adicional por la gonadectomía en la velocidad de crecimiento tibial y en la ganancia ponderal también se ha descrito en ratas machos enanas por déficit de GH, aunque comparando con animales normales el efecto es menos drástico (Gevers y cols. 1995).

El tratamiento con PT en nuestros animales revierte el efecto de la castración tanto en peso como en longitud tibial (Tresguerres y cols. 1994, 1995), al igual que se ha visto en ratas normales (Daughaday 1981, Jansson y cols. 1983, Shoutens y cols. 1984, Hope y cols. 1992, Woodward 1993), en las que el tratamiento con PT sólo es capaz de prevenir el efecto inhibitorio de la castración sobre el crecimiento, sin que exista tras dicha administración un aumento del crecimiento por encima de lo normal (Shoutens y cols. 1984). En animales normales el tratamiento con testosterona no estimula la ganancia ponderal (Woodward 1993), aunque sí se ha descrito que ejerce un efecto anabólico aumentando la retención de nitrógeno (Kochakich y cols. 1950) y la ganancia ponderal en animales de 3 (Rubinstein y Solomon 1941) o 4 meses de vida (Kochakich y cols. 1950).

No existen muchos trabajos sobre el efecto de la castración y la terapia substitutiva con testosterona sobre el crecimiento en animales tratados con GMS. Jansson y cols. (1983) con ratas machos castradas e hipofisectomizadas, no encontraron un efecto estimulante en la longitud tibial debida al tratamiento con testosterona; ni existía efecto adicional si se administraba en combinación con GH. Concluyeron que el efecto estimulador de la testosterona sería a través de una modulación del patrón secretor de la GH (Jansson y cols. 1983), de tal forma que la secreción de testosterona en la vida adulta sería importante para mantener la baja secreción basal de GH característica de los machos (Jansson y cols. 1985a, 1985b). Para ésto ciertamente ha de existir la hipófisis.

Este efecto de la testosterona podría ser especie dependiente ya que sí que es capaz de estimular el crecimiento en corderos hipofisectomizados (Gevers y cols. 1995). Por el contrario la testosterona administrada, tanto de forma aislada como en combinación con la GH, sí aumenta la ganancia de peso corporal en ratas machos castradas e hipofisectomizadas (Jansson y cols. 1983) o únicamente hipofisectomizadas (Woodward 1993).

Nuestras ratas machos tratadas con GMS y castradas tienden a presentar niveles inferiores de IGF I y un contenido hipofisario de GH disminuido, aunque las diferencias no son significativas tal y como se ha descrito en animales normales castrados (Handelsman y cols. 1987, Guang Ren y cols. 1989, Painson y cols. 1992). El tratamiento con PT en nuestras

ratas tratadas con GMS eleva de manera significativa los niveles plasmáticos de IGF I, tal y como cabría esperar tras observar su efecto estimulador del crecimiento. Así algunos autores (Gabriel y cols. 1992), sugieren que la acción positiva de la testosterona sobre los niveles plasmáticos de IGF I junto con su acción anabólica contribuirían a promover el crecimiento de los animales machos, si bien las concentraciones de IGF I en plasma no siempre reflejan su acción tisular.

El tratamiento con PT en nuestro caso, también revierte el ligero efecto de la castración sobre el contenido hipofisario de GH. El contenido de SS no se encuentra modificado por ninguna de las manipulaciones que llevamos a cabo en este modelo, aunque no podemos discernir si existen cambios en la síntesis y liberación que permitan mantener el contenido, ya que en machos normales la castración, en general, disminuye el ARNm de SS en el núcleo periventricular (Argente y cols. 1990, Wehrenberg y Giustina 1992), y sin embargo el contenido de SS en hipotálamo permanece constante (Gabriel y cols. 1989).

La castración en animales tratados con GMS, produce la normal elevación del contenido hipofisario de LH, aunque no detectamos cambios en el contenido de la LHRH hipotalámica, tal y como han descrito previamente otros autores (Badger y cols. 1982). Ésto puede deberse, probablemente, a una alteración producida por el GMS en la regulación de la LHRH; se propone que un desarreglo a nivel hipotalámico sería causa, en parte, del hipogonadismo observado (Greely y cols. 1980, Jennes y cols. 1984, Handelsman y cols. 1987).

En el modelo GMS también observamos que la castración disminuye el peso de las vesículas seminales, efecto que se revierte por la administración de PT, tal y como se ha visto en machos normales (Whalen y Edwards 1969) o hipofisectomizados (Scow y Hagan 1965) aunque con dosis algo superiores. Sin embargo nuestro tratamiento, no es capaz de revertir el aumento de la LH hipofisaria, ni modifica el contenido de la LHRH hipotalámica. Una posible explicación a este hecho puede ser el tiempo transcurrido entre la castración y la instauración de la terapia substitutiva con testosterona, al no haber comenzado justamente tras la operación (Conne y cols. 1982), o a que la dosis, a pesar de promover el crecimiento, fuera insuficiente como para provocar cambios a nivel hipofisario e hipotalámico. En machos normales, se necesitan al menos 100 µg de PT, es decir una dosis superior a la utilizada por nosotros, para revertir el efecto de la castración en el contenido LHRH en el hipotálamo y el

número de receptores para esta hormona en la hipófisis, existiendo además una respuesta dosis-dependiente (Conne y cols. 1982).

4.3 Efecto de la administración de GH, aislada o en combinación con PT, sobre el crecimiento en la rata macho tratada con GMS.

La GH estimula el crecimiento longitudinal del hueso en animales hipofisectomizados (Isaksson y cols. 1987, Isgaard y cols. 1988).

En nuestros animales el tratamiento con GH de forma aislada o en combinación con PT, consigue incrementar la velocidad de crecimiento tibial, ya fueran animales castrados o intactos (Tresguerres y cols. 1994, 1995), sin llegar en este caso, a alcanzar la longitud del grupo control. La pérdida inicial de longitud tibial ocasionada por el tratamiento con GMS no llega a recuperarse, al menos durante nuestro tiempo de observación. Kovács y cols. (1996) administrando un análogo de GHRH, en animales machos tratados con GMS, encuentran que la recuperación de la longitud tibial es prácticamente total, pero el distinto método de medida podría justificar la discrepancia con nuestros datos.

Sin embargo, el tratamiento con GH permite una recuperación total del peso con respecto al grupo control, al igual que encuentran Kovács y cols. (1996). La GH no parece hacer efecto, ni en peso ni en longitud tibial, hasta los 30-35 días de vida a pesar de que el tratamiento con GH se instauró a los 22 días de vida. No observamos un aumento adicional en peso o en longitud por el tratamiento conjunto con PT y GH, a pesar de que el PT por si solo fue capaz de incrementar la longitud tibial en nuestros animales castrados (Tresguerres y cols. 1994, 1995).

En ratas hipofisectomizadas, se ha descrito que existe un efecto sinérgico del tratamiento combinado con GH y PT sobre la evolución ponderal (Klindt y cols. 1990, Woodward 1993), sin que otros autores llegaran a detectar por esta administración conjunta, diferencias significativas en peso o en la longitud del cuerpo (Scow y Hagan 1965).

En nuestro caso parece ser que la elevada dosis de GH administrada, aumenta de tal forma la velocidad de crecimiento que ésta no puede ser potenciada más aún por los andrógenos (Tresguerres y cols. 1995).

Klindt y cols. (1990) apoyan esta idea ya que afirman que dosis elevadas de GH pueden enmascarar el efecto positivo del tratamiento con PT. Además el efecto de la GH es prácticamente el mismo en nuestros animales tratados con GMS castrados o intactos. En ratas machos enanos se ha descrito que el tratamiento pulsátil con GH, produce la misma respuesta en animales intactos que en animales castrados tanto en peso, como en longitud del cuerpo o crecimiento en longitud de la tibia (Gevers y cols. 1995).

El efecto de la administración de GH, que en nuestros datos no se comienza a detectar hasta los 30 días de vida del animal, se observa en ratas enanas tras solamente dos o tres días de tratamiento, al menos en peso (Sato y Frohman 1993, Martínez y cols. 1996). Crawford y cols. (1994) también encontraron, trabajando con ratas enanas, que a pesar de comenzar el tratamiento con GH a los 28 días, el grupo tratado no comenzaba a mostrar un peso superior al de su control hasta los 42 días de vida.

Ni en machos tratados neonatalmente con anticuerpos anti-GHRH (Wehrenberg y cols. 1984, Cella y cols. 1990), ni en ratas mutantes deficitarias en GH (Charlton y cols. 1988) se encuentran diferencias en peso, con respecto a sus controles, hasta los 25 días de vida. Este fenómeno podría ser equivalente a lo que ocurre en el caso de los humanos, en los que la ausencia de GH no parece afectar al crecimiento fetal.

Los datos sin embargo, son contradictorios, ya que nuestros propios animales tratados con GMS presentan valores inferiores a los controles en peso y longitud tibial con anterioridad a ese período, aunque otras deficiencias hormonales, podrían explicar las diferencias con otros modelos. Cella y cols. (1994), encuentran que la administración de anticuerpos anti-GHRH disminuye el peso desde los 6 días de vida. Ambler y cols. (1993) trabajando con ratas enanas han descrito un efecto estimulante en el peso corporal, por la administración de bGH, a los 12 días de vida postnatal, sin encontrar efecto en la longitud nariz-cola, ni detectar tampoco respuesta si la administración era de IGF I; Glasscok y cols. (1992) encuentran en ratas hipofisectomizadas a los 6 días de vida un efecto estimulante en el peso y en la longitud de la cola tras tratamiento con rhGH de los 10 a los 18 días de vida, aunque en este caso también se reflejaría la falta de otras hormonas hipofisarias.

Con todos estos datos, se admite que existe una dependencia parcial de GH y de tiroxina en el crecimiento neonatal hasta las 3 semanas de vida, pasando entonces a ser casi un fenómeno completamente dependiente de la hipófisis (Palmer y cols. 1994), por

lo que el crecimiento postnatal va siendo cada vez más dependiente de la GH (Isaksson y cols. 1987).

El tratamiento con GH, aislado o asociado con PT en animales castrados o intactos tratados con GMS, aumenta tanto los niveles de IGF I, como el peso del hígado en nuestros animales, sin existir efecto aditivo entre ambas hormonas, como veíamos en crecimiento. Tampoco Scow y Hagan (1965) encontraron efecto aditivo en el peso del hígado por la administración conjunta de GH y PT en ratas hipofisectomizadas. La GH aumenta los niveles de IGF I tanto en ratas jóvenes enanas (Crawford y cols. 1994, Gargosky y cols. 1994), como en ratas hipofisectomizadas (Hunziker y cols. 1994). No hay modificaciones en el contenido hipofisario de GH, al igual que veíamos en animales normales, y no se llegan a detectar variaciones en el contenido hipotalámico de SS. En ratas hipofisectomizadas 5 días de tratamiento con GH aumentan en el contenido de SS, restableciendo los niveles normales (Rogers y cols. 1988). No obstante en ratas enanas, más parecidas a nuestro modelo, la administración de GH durante 3 días tampoco modifica el ARNm de SS a pesar de producir un aumento ponderal y de los niveles de IGF I, así como una disminución en el ARNm de GHRH (Sato y Frohman 1993).

En el peso de las vesículas seminales no detectamos efecto trófico debido al tratamiento con GH, al igual que se ha visto en ratas enanas (Crawford y cols. 1994); únicamente detectamos incremento de peso en animales castrados si se acompaña de administración de PT. Otros autores (Scow y Hagan 1965) utilizando ratas hipofisectomizadas tampoco detectaron aumento del peso de las vesículas seminales por tratamiento con GH, ni aumento adicional sobre el producido con el tratamiento con PT. Estos datos indican que el efecto parece deberse únicamente a los andrógenos.

El contenido de LH en la hipófisis tiende a disminuir, ya se trate de animales intactos o castrados, como consecuencia del tratamiento conjunto con GH y PT, quizá debido a un aumento de la liberación, aunque no observamos ningún efecto si la administración de GH o PT se realiza aisladamente. Tampoco Crawford y cols. (1994) vieron modificación en los niveles plasmáticos de LH tras tratamiento con GH en ratas enanas. Sin embargo, parece ser que en ratones (Chandrashekar y cols. 1988) y en ratas (Ikeda y cols. 1994) transgénicas para hGH, si se produce un estímulo de la secreción de LH.

El tratamiento conjunto de GH y PT, por otro lado, restablece el contenido hipotálamico de LHRH producido por el GMS, únicamente en los animales intactos, por lo que parece que han de sumarse el efecto de los andrógenos endógenos con el tratamiento exógeno, en este modelo, para que existan modificaciones en la hipófisis y el hipotálamo.

5. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN LA RATA HEMBRA

5.1 Efecto de la administración de GH en la rata hembra normal

En nuestro estudio la administración exógena de GH incrementa el crecimiento tibial de la hembra normal, como ya vieron otros autores (Aspenberg y cols. 1985, Bak y cols. 1990, Jørgensen y cols. 1991), y a diferencia de lo que hemos visto en el macho normal. También aumenta el peso corporal, en concordancia con los datos existentes en la literatura (Groesbeck y cols. 1987, Gelato y cols. 1992, Byatt y cols. 1993). Las curvas de peso y longitud tibial comienzan a separarse hacia los 35 días de vida, aunque comenzamos el tratamiento a los 24 días de vida.

Encontramos también un aumento en el peso del hígado, al igual que Byatt y cols. (1993). Sin embargo, y a pesar de que éste guarda relación con los niveles circulantes de IGF I (Handelsman y cols. 1987), sorprendentemente no encontramos ni modificaciones en los niveles plasmáticos de IGF I, ni disminución en el contenido hipofisario de GH, al contrario de lo que encuentran otros autores (Groesbeck y cols. 1987, Maiter y cols. 1990).

No parece que la ausencia de incremento en los niveles de IGF I de nuestras hembras, se deba a la elevación puberal fisiológica de esta hormona, como comentamos en el caso de los machos, puesto que en otros estudios sí se detecta aumento en hembras puberales (Groesbeck y cols. 1987), aunque no en todos los casos (Byatt y cols. 1993). Parece ser que la GH puede actuar sobre el crecimiento sin producir cambios en los niveles plasmáticos de IGF I (Palmer y cols. 1994, Loveridge y cols. 1995), y que las concentraciones locales de IGF I son mucho más importantes para el crecimiento que sus niveles circulantes (Flyvbjerg y cols. 1991). Nuestros datos apoyan este hecho, y también Byatt y cols. (1993) al estudiar los efectos del tratamiento con GH, encontraron un

aumento ponderal y en la longitud del fémur sin que existieran cambios significativos en los niveles circulantes de IGF I.

Nuestros resultados muestran una ligera tendencia a la disminución del contenido de SS en el hipotálamo, aunque las diferencias no fueron significativas. Lo mismo observaron Maiter y cols. (1990), ya que ni siquiera las altas dosis de GH secretadas durante 4 semanas por un tumor implantado eran capaces de modificar la concentración hipotalámica de SS, y aunque causaban una disminución de la concentración hipotalámica de GHRH, era mucho menor que en el caso de los machos. Así, se acepta que entre ambos sexos existe una sensibilidad distinta a la retroalimentación negativa de la GH sobre la SS y la GHRH (Carlsson y cols. 1990, Maiter y cols. 1990).

El tratamiento con GH aumenta el número de ciclos estrales irregulares, así como los niveles plasmáticos de LH, sin llegar a producir modificaciones en el contenido hipofisario de esta hormona, en el peso de útero o de los ovarios. Se postula que la GH podría ejercer una acción trófica en el ovario (Gruaz y cols. 1994), aunque Groesbeck y cols. (1987), con dosis elevadas de GH tampoco encuentran un efecto estimulador sobre el peso ovárico. Como ya hemos comentado, parece ser que la GH estimula la secreción de LH, y aumenta la expresión del gen de la subunidad β de la LH (Ikeda y cols. 1994). Ésto justificaría el aumento en los niveles plasmáticos de LH, sin producir modificaciones a nivel del contenido hipofisario por existir un aumento simultáneo de la síntesis. La modificación en la secreción normal de LH podría interferir en la regularidad en los ciclos. Otros autores (Gruaz y cols. 1994) no detectaron modificaciones ni en el contenido hipofisario de LH ni en la longitud de los ciclos estrales por la falta de GH.

De forma paralela a los estudios en rata macho quisimos observar el efecto de la administración de GH sobre el crecimiento en la rata hembra deficitaria en GH, con objeto de estudiar si existía un comportamiento diferente con respecto a la respuesta de los machos.

5.2 Efecto de la administración de GMS sobre el crecimiento en la rata hembra

En primer lugar, se observaron diferencias entre las medidas de longitud y peso en los dos experimentos en los que las hembras fueron tratadas neonatalmente con GMS, encontrando, en general un efecto menos marcado en el diseño experimental 6.3.1, al compararlas con sus correspondientes controles. No se detectó una razón aparente que justificase las diferencias. Causas no determinadas pueden haber influido en que las hembras control del diseño experimental 6.3.2. fueran ligeramente mayores, lo que aumentaría sus diferencias con las ratas tratadas con GMS.

En cualquier caso la administración neonatal de GMS en hembras provocó en nuestros animales una disminución de la longitud tibial y del peso corporal menos drástica que la observada en machos tratados con GMS, sobre todo en el peso corporal. Este hecho ya ha sido descrito tanto en peso (Corder y cols. 1990, Maiter y cols. 1991b, Kubota y cols. 1994) como en la longitud tibial (Maiter y cols. 1991b), aunque ésta únicamente se evaluó al final del experimento.

En la longitud tibial no detectamos diferencias a los 25 días de vida como ocurría en los machos, pero de nuevo, con el paso del tiempo el déficit de GH, lleva también en las hembras a una longitud tibial a los 60 días inferior a la de los animales control (los machos presentan una reducción del 13%, las hembras del 4 y 7%, en los diseños 6.3.1 y 6.3.2, respectivamente). Las curvas de longitud de las hembras tratadas con GMS comienzan a separarse hacia los 40-45 días en el primer experimento (6.3.1), mientras que en el segundo (6.3.2) ya existían diferencias a los 36 días.

Respecto al peso, en las hembras tratadas con GMS, existe una tendencia a presentar valores inferiores, de tal forma que el peso final no llegó a ser significativamente menor en el primer experimento pero sí en el segundo. En ambos casos el incremento ponderal fue menor que el de sus controles y las curvas de evolución ponderal se separaban a lo largo del tiempo, como vieron Corder y cols. (1990). En machos la diferencia en peso era notable desde los primeros días de vida (a los 60 días de vida la reducción en peso de los machos fue del 29%, y en hembras del 7 y 17% en el primer y segundo experimento respectivamente), como ya se observó anteriormente (Bakke y cols. 1978). En el caso de las hembras se han descrito que las diferencias con

sus controles comienzan a los 25 días (MacDonald y Wilkinson 1990) o a los 35 días de vida (Malozowsky y cols. 1995).

Se ha sugerido (Maiter y cols. 1991b) que el tratamiento neonatal con GMS en hembras produce un efecto menos marcado, en el descenso del peso corporal, por el desarrollo de una obesidad más severa, que en el caso de los machos. Ratonos tratados con GMS presentan dimorfismo en la capacidad de activar la termogénesis en la grasa parda, de tal forma que la hembra presenta una supresión más específica, lo que contribuiría a una disminución en el gasto energético y a un aumento en la eficacia metabólica, pudiendo llevar al desarrollo de esa obesidad más severa en hembras (Tokuyama y Himms-Hagen 1986, Maiter y cols. 1991b). Sin embargo no se explicarían las diferencias en longitud tibial. Estos mismos autores también proponen que las diferencias en crecimiento entre machos y hembras producidas por el tratamiento con GMS, se deberían al distinto patrón secretor de GH. Se sabe que el tratamiento con GMS disminuye la amplitud de los picos de secreción de GH (Clark y Robinson 1985a) y que la secreción de GH en la rata hembra es más continua, con picos de menor amplitud y más frecuentes que en el macho (Edén 1979, Painson y Tannenbaum 1991). Teniendo en cuenta ambos factores, el tratamiento con GMS tendría un efecto menos drástico en hembras, al disminuir unos picos de secreción de GH que *per se* son menores que en el macho (Maiter y cols. 1991a).

El tratamiento con GMS en nuestros animales hembras disminuyó el contenido hipofisario de GH, al igual que sucedió en los machos y de acuerdo con los resultados descritos por otros autores (Dada y cols. 1984, Corder y cols. 1990). También descendieron los niveles plasmáticos de IGF I (Kubota y cols. 1994), el peso de la hipófisis (Bakke y cols. 1978) y el peso del hígado (Handelsman y cols. 1987). No encontramos modificaciones en el contenido hipotalámico de SS, pero en el caso del diseño 6.3.2. hubo una tendencia a presentar valores inferiores al igual que encontraron Maiter y cols. (1991b).

No detectamos diferencias en el contenido hipofisario de LH, que se encuentra disminuido según Redding y cols. (1971), como tampoco disminuye en hembras con el tratamiento con anticuerpo anti-GHRH (Gruaz y cols. 1994). Los niveles plasmáticos de LH solamente tienden a ser menores, diferencia que en los machos tratados con GMS era significativa. Esta discrepancia entre los niveles plasmáticos de los machos y los de las

hembras ya ha sido observada con anterioridad (Bakke y cols. 1978, Nemeroff y cols. 1981). Tampoco la disminución en el peso de útero u ovarios llegó a ser significativa, aunque los datos de otros autores apuntan que se afecta principalmente el peso de los ovarios (Redding y cols. 1971, Badger y cols. 1982, Villanúa y cols. 1992). A pesar de todo ello las ratas tratadas con GMS mostraron un aumento en la aparición de ciclos irregulares, como ya se ha descrito (Bakke y cols. 1978, Nemeroff 1981) y como reflejo de la afectación sobre la regulación de LHRH (Nemeroff y cols. 1981, Dalkin y cols. 1985)

5.3 Efecto de administración de GH sobre el crecimiento en la rata hembra tratada con GMS

Al igual que en hembras normales y en machos deficitarios en GH, el tratamiento con GH en nuestras hembras tratadas con GMS incrementa la longitud tibial. En este caso, y a diferencia de lo observado en machos tratados con GMS, la recuperación de la longitud tibial es total ya que las hembras tratadas con GMS y GH alcanzan la longitud tibial de las hembras normales (Rol de Lama y cols. 1997), logrando una longitud tibial intermedia entre las hembras normales y las normales tratadas con GH, que también responden como hemos visto antes.

La respuesta en incremento ponderal es más marcada que la observada en longitud tibial, ya que estos animales llegan a presentar un peso final que no difiere de las hembras normales tratadas con GH, incluso con valores superiores a éstas. Ésto demuestra que la dosis de GH utilizada es muy elevada, ya que no se trata únicamente de compensar la falta de GH ocasionada por el tratamiento neonatal con GMS, sino obtener un crecimiento suprafisiológico, que no pudo ser conseguido en animales machos normales con la misma dosis de GH y el mismo tiempo de tratamiento.

De igual forma que vimos en la longitud tibial, el tratamiento con GH incrementa el peso del hígado por encima del valor de las hembras normales, y restaura los niveles normales de IGF I. Sin embargo y tal y como hemos descrito en otras ocasiones, no se modifica el contenido hipofisario de GH, ni el contenido hipotalámico de SS, como tampoco se modifica el ARNm de SS en la rata enana (Sato y Frohman 1993).

En ratas hembras tratadas con GMS se ha descrito, que tras 2 semanas de tratamiento con GH, ni la recuperación ponderal ni la de los niveles hepáticos del ARNm de IGF I, llega a ser total (Malozowski y cols. 1995). La diferencia con nuestros datos parece deberse a que tanto el tiempo de observación, como la dosis de GH administrada por estos autores fue menor que en nuestro caso.

En este modelo el tratamiento con GH llega a producir un incremento significativo en el peso del útero y los ovarios, mientras que en hembras normales sólo existía cierta tendencia en este sentido. Aparte de la posible acción trófica de la GH (Gruaz y cols. 1994), ésta parece tener un papel en la función ovárica ya que, en este modelo restaura la producción de ARNm de IGF I en el ovario (Malozowski y cols. 1995).

El tratamiento con GH en hembras con GMS, al igual que vimos en hembras normales, aumenta la secreción de LH, sin llegar a modificar el contenido de la hormona en hipófisis. No obstante, no se produce una mejoría en la regularidad de los ciclos estrales, ya que el aumento en la secreción de LH, no implica que dicha secreción ocurra con el patrón fisiológico normal.

Vistos los distintos resultados obtenidos en machos y hembras tratados con GMS y GH, parece que en las hembras tratadas con GMS el tratamiento con GH es más efectivo que en el macho. Se ha descrito (Wakabayashi y cols. 1986), que la respuesta secretora de GH al estímulo con GHRH era comparable entre las hembras normales y las tratadas con GMS, mientras que en los machos tratados con GMS la respuesta era menor que la de sus controles. Wakabayashi y cols. (1986) también encontraron que la reducción en los valores plasmáticos basales de GH, era mayor en machos que en hembras tratadas con GMS. Estas diferencias de efecto puede que se deban, como ya hemos comentado, al distinto patrón secretor de GH en hembras y machos. De la misma forma, parecen no responder igual a su administración exógena. Así en ratas enanas, se ha visto que las hembras son más sensibles al tratamiento con infusión continua con GH que los machos (Gevers y cols. 1995).

Una vez descritos los efectos por tratamiento con GH tanto en la rata normal como deficitaria en GH, y ya que la hembra parece ser un modelo más adecuado para estudiar el crecimiento, investigamos en ellas que efecto producía la administración del péptido hipotalámico GHRH.

5.4 Efecto sobre el crecimiento de la administración continua de GHRH, de forma aislada o combinada con SS, en la rata hembra normal

La administración continua de GHRH no produjo en nuestros animales ninguna modificación en el patrón normal de crecimiento de la tibia, ni en la evolución ponderal, al igual que observaron Clark y Robinson (1985a) o Robinson y Clark (1987).

Tampoco detectamos modificaciones en el contenido hipofisario de GH, tal y como se ha descrito anteriormente (Clark y Robinson 1985a, Robinson y Clark 1987), en el peso de la hipófisis, como ya señalaron Clark y Robinson (1985a), en los niveles plasmáticos de IGF I o en el contenido hipotalámico de SS. Se ha descrito que la hembra responde a cada estímulo con GHRH sin períodos refractarios con un pico secretor de GH (Robinson y Clark 1987, Painson y Tannenbaum 1991). Parece ser que el patrón de estimulación óptimo de GHRH a nivel del sistema porta hipofisario sólo se alcanzaría mediante una administración pulsátil, mientras que presumiblemente con la infusión continua se está superando, el nivel de secreción endógena de GHRH (Clark y Robinson 1985a) y por lo tanto habrá una continua llegada a la hipófisis. Kovács y cols. (1994) proponen que la administración continua de GHRH a una dosis suficientemente elevada estimularía el crecimiento, evaluado como peso. Nosotros utilizamos una dosis (600 µg/día) muy superior a la de estos autores, (36 µg/día de un análogo de GHRH, con una potencia 1,6 veces superior al GHRH (1-29) NH₂, sin encontrar ningún cambio en la evolución ponderal. Además se trata de animales hembras en los que hemos sido capaces de estimular el crecimiento al tratarlas con GH.

Nuestro tratamiento con GHRH administrada de forma continua y combinada con SS tampoco ocasionó ningún cambio ni en la longitud tibial ni en el peso corporal. Con este tipo de tratamiento buscábamos potenciar el efecto del GHRH, ya que se sabe que la administración aislada de un análogo de somatostatina de larga duración (Octreotida), prácticamente elimina los pulsos secretores espontáneos de GH durante 3 horas, y mantiene unos niveles plasmáticos de GH reducidos durante al menos 6 horas, mostrando después una respuesta de GH aumentada al estímulo con GHRH (Turner y Tannenbaum 1995). La SS permitiría que la GH se acumule en la hipófisis, por lo que aumentaría la cantidad de GH que puede ser liberada tras estímulo con GHRH (Lima y cols. 1993, Turner y Tannenbaum 1995).

Además, intentamos imitar la secreción fisiológica de SS por lo que se procedió a la inyección del análogo a las 5 de la tarde, hora en la que en condiciones normales, no hay secreción espontánea marcada de GH, es decir, el tono somatostatinérgico es alto (Lima y cols. 1993).

Cuando administramos GHRH y SS de forma combinada, no encontramos modificaciones en ninguno de los parámetros estudiados, salvo una disminución del peso de la hipófisis, en la que las somatotropas y lactotropas conforman la mayoría de la glándula (Gelato y cols. 1992), probablemente debido a que la SS inhibe el efecto trófico de GHRH sobre las somatotropas (Devesa y Tresguerres 1996).

El estudio hormonal, en el que no detectamos ninguna modificación, corrobora la ineficacia del tratamiento combinado GHRH-SS sobre el crecimiento. Ésto puede deberse a una dosis insuficiente de análogo de SS (2 $\mu\text{g/rata día}$), ya que las dosis utilizadas por otros autores fueron superiores (Flyvbjerg y cols. 1991, Turner y Tannenbaum 1995) y no fueron administradas junto con GHRH. Sin embargo, los niveles circulantes de SS en la rata estarían entre 40-300 pg/ml (Spencer y Hallet 1985), y nuestro tratamiento con SS es muy superior a esos niveles circulantes y superior a la dosis que en humanos suprime perfectamente la secreción de GH, (4,5 $\mu\text{g/Kg}$), (Wilson y Tanner 1994). Pese a ello no conseguimos ninguna modificación en el efecto de la administración continua de GHRH.

Una posibilidad es que al tratarse de animales hembras, y tener un patrón de secreción de GH más irregular, y una secreción más constante de SS, (Clark y Robinson 1985b, Painson y Tannenbaum 1991), no sean tan sensibles a la administración de este péptido, ya que según proponen Robinson y Clark (1987) y Painson y Tannenbaum (1991) el patrón secretor de GH en la hembra dependería más de GHRH que de SS.

De hecho se ha descrito en hembras que la neutralización de la SS con anticuerpos incrementa el peso corporal (Spencer y Hallet 1985), y aumenta los niveles plasmáticos de GH (Painson y Tannenbaum 1991). Su administración continua no modifica el peso corporal (Spencer y Hallet 1985, Robinson y Clark 1987, Clark y Robinson 1988), aunque sí disminuye la tasa de crecimiento tibial (Robinson y Clark 1987, Clark y Robinson 1988), mientras que su administración pulsátil, más parecida al patrón secretor de GH del macho, aumenta el peso pero no es capaz de modificar la longitud tibial (Robinson y Clark 1987, Clark y Robinson 1988). Este último resultado contrasta con lo que cabría esperar al "imitar" el patrón secretor de los machos. De todas formas, e independientemente de sus efectos sobre

el crecimiento, ambas pautas de administración de SS permiten que las reservas de GH en la hipófisis aumenten (Clark y cols. 1988, Clark y Robinson 1988).

Tampoco detectamos ningún cambio en el ciclo estral por ninguno de estos tratamientos. Parece ser que el tratamiento con GHRH tampoco modifica la entrada en la pubertad (González y cols. 1989).

Ya que el tratamiento con GMS produce un déficit de GHRH quisimos estudiar que efecto podía tener sobre el crecimiento la reversión de este déficit.

5.5 Efecto de administración continua de GHRH, de forma aislada o combinada con SS, en la rata hembra tratada con GMS

Hemos utilizado 2 inyecciones al día de GHRH, e infusión continua de forma aislada o en combinación con SS. Ninguno de estos tratamientos ha sido capaz de modificar el patrón de crecimiento observado tras el tratamiento neonatal con GMS. Se detectó únicamente una tendencia a incrementar el peso corporal mediante la administración en inyecciones, pese a que la dosis era inferior que en la administración continua.

Nuestros resultados no están de acuerdo con los de Kovács y cols. (1995) en ratas hembras tratadas con GMS, ya que estos autores sí que encuentran un efecto estimulador sobre el peso corporal, por el tratamiento con un análogo de GHRH de doble potencia que el GHRH(1-29) NH₂, con una única inyección al día de 10 µg, e incluso un aumento moderado en este parámetro por infusión continua. Por otro lado, dos dosis al día de 2 µg de otro análogo (JI-38) revertían totalmente la deficiencia ocasionada por el tratamiento con GMS en ratas hembras Sprague Dawley, tanto en peso como en la longitud tibial (Kovács y cols. 1996), aunque esta medida se realizó con un calibre, con lo que no siempre se ejerce la misma presión sobre los tejidos circundantes de la tibia. Nuestras dosis de GHRH son muy superiores que las utilizadas por estos autores, y mantenidas a más largo plazo, y sin embargo no pudimos detectar ninguna modificación, salvo la ligera tendencia al incremento ponderal con la administración en inyecciones. La distinta ruta de administración (i.m. vs s.c. o i.p.), o las diferencias entre los análogos y el péptido utilizado por nosotros, así como la distinta cepa de los animales podrían justificar las diferencias.

No encontramos modificaciones en el peso del hígado, ni en los niveles plasmáticos de IGF I en nuestras hembras tratadas con GMS, de acuerdo con los resultados de otros autores en este modelo (Hu y cols. 1993). No obstante, sí aumentó el contenido hipofisario de GH, únicamente en los animales sometidos a inyecciones, demostrando que con este tratamiento se alcanzan niveles efectivos de GHRH a nivel de la hipófisis, y se recupera el déficit de GHRH ocasionado por el GMS, posiblemente incrementando la síntesis de GH. A pesar de ello, este tratamiento no es capaz de promover una liberación suficiente de GH, que incremente los niveles plasmáticos de IGF I y el crecimiento. Este aumento de contenido hipofisario de GH por tratamiento con GHRH administrado de forma intermitente se ha descrito en animales tratados con GMS y GHRH, tanto machos (Clark y Robinson 1985a) como en hembras (Kovács y cols. 1996). Otros autores (Hu y cols. 1993) no detectaron cambios significativos a este nivel, pero sus datos muestran una clara tendencia a aumentar el contenido y el ARNm de GH en hipófisis. La administración continua de GHRH, por el contrario no producía cambios en el contenido de GH (Clark y Robinson 1985a).

Ninguno de los tratamientos ocasionó modificaciones en el contenido de SS en hipotálamo, como sucedía en la hembra normal.

La ineffectividad de nuestros tratamientos para incrementar la longitud tibial, y el peso corporal puede deberse a la corta duración del incremento de GH en plasma ocasionada por la administración de GHRH en inyecciones, ya que la recuperación de los valores plasmáticos basales de GH tras estímulo con GHRH se produce a los 15 minutos (Coude y cols. 1984). Este argumento ya fue apuntado por González y cols. (1989) en la rata hembra normal, tratada con el mismo péptido que usamos nosotros y en la misma cepa, en las que no encontraron ningún cambio en la evolución ponderal, ni en la longitud corporal, ni en el peso de los órganos. Del mismo modo que en la hembra normal no hubo respuesta por la administración combinada de GHRH y SS en ninguno de los parámetros estudiados.

Al igual que describimos en el caso de la hembra normal no se detectó ningún efecto estimulador sobre el peso del útero o de los ovarios, ni en los niveles plasmáticos de LH. Tampoco se detectaron más modificaciones en los ciclos estrales que las ocasionadas por el tratamiento neonatal con GMS.

Ya que las respuestas del patrón de crecimiento a los distintos tratamientos diferían entre machos y hembras, y para estudiar este dimorfismo con más profundidad llevamos a cabo un experimento en el que se manipuló neonatalmente la diferenciación dimórfica del hipotálamo.

6. EFECTO DE LA ALTERACIÓN EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL HIPOTÁLAMO SOBRE EL CRECIMIENTO.

La castración neonatal de los machos llevó a una disminución en la velocidad de crecimiento, y a una longitud tibial final inferior que la de los machos normales, hecho descrito anteriormente por otros autores (Jansson y cols. 1984, 1985a, 1985b). No detectamos ninguna diferencia en la longitud tibial al tratar neonatalmente a las hembras con PT (hembras PT). Sin embargo la longitud final de los machos castrados fue superior a la observada en hembras. La diferencia entre machos castrados y ambos grupos de hembras se fue acentuando a lo largo del tiempo, ya que al comienzo de la observación, a los 23 días de vida, no existían diferencias entre ellos.

Las diferencias en peso que encontramos entre machos normales y castrados neonatalmente, ya habían sido descritas anteriormente (Chowen y cols. 1993), y fueron más patentes que las que observamos en longitud tibial. En las hembras tratadas con PT detectamos una tendencia a incrementar su peso corporal, a pesar de que las diferencias con el peso de las hembras normales no llegaron a ser significativas. Por otra parte, el incremento ponderal observado en las hembras PT, no fue suficiente como para que hubiese diferencia en el peso final frente a los machos castrados neonatalmente, que a su vez presentaban un peso final superior a las hembras normales. Anteriormente se había descrito que este tratamiento determinaba un aumento significativo, tanto ponderal (Somana y cols. 1978, Chowen y cols. 1993) como de la longitud del cuerpo (Somana y cols. 1978).

Las hembras PT mostraban estro constante en el estudio de los frotis vaginales, como ya observaron otros autores (Chowen y cols. 1993, Dueñas y cols. 1994). La falta de ciclicidad revelaría la existencia de una secreción tónica de gonadotropinas, lo que demuestra la correcta administración del fármaco. También detectamos una disminución del peso del útero y de los ovarios, aunque algunos autores sólo encontraron diferencias en el peso de los ovarios (Pinilla y cols. 1993). Igualmente se comprobó que los machos estaban bien

castrados; no presentaban separación balano-prepucial y mostraban una disminución muy marcada en el peso de las vesículas seminales como consecuencia de la falta de andrógenos.

La castración neonatal llevó a una disminución del peso hepático en machos, mientras que en hembras no encontramos ninguna diferencia significativa entre las tratadas con PT y las no tratadas. Los machos castrados y las hembras, independientemente de su tratamiento neonatal, presentaron un peso hipofisario similar, que tendía a ser superior al de los machos normales, tal y como han descrito Somana y cols. (1978), aunque otros autores encontraron un efecto estimulante sobre el peso hipofisario por el tratamiento neonatal con testosterona en hembras (Jansson y Frohman 1987b).

En vista de los resultados obtenidos parece que el tratamiento neonatal con testosterona en las hembras, no es capaz de masculinizar totalmente el patrón secretor de GH de forma que se llega a modificar el patrón de crecimiento en longitud tibial, aunque sí existe un ligero efecto en el peso corporal.

Fishman y cols. (1993), encontraron que el tratamiento neonatal con testosterona en hembras no modificaba el patrón secretor de GH. Lo mismo encontraron Jansson y Frohman (1987b), pero si el tratamiento con testosterona neonatal se acompañaba de castración neonatal, aparecían unas alturas de los pulsos secretores y unos niveles medios de GH similares a los de los machos, aunque más irregulares y con valores basales más altos. El contenido de GH en la hipófisis se igualaba también con el de los machos. De forma semejante, el tratamiento neonatal con testosterona (Jansson y cols. 1985a), reforzado o no del mismo tratamiento en el animal adulto, estimulaba la longitud tibial en hembras gonadectomizadas neonatalmente, mientras que no encontraron un efecto significativo por la castración neonatal aislada, ni a los 60 ni a los 100 días de vida. Estos autores (Jansson y cols. 1984) habían descrito anteriormente un efecto estimulante de la longitud tibial por la gonadectomía neonatal. Con estos datos Jansson y cols. (1985a, 1987b) proponen, al igual que Fishman y cols. (1993), que la secreción ovárica, podría ejercer un papel inhibitor del efecto masculinizante de la testosterona administrada neonatalmente en la secreción de GH, ya que la mucosa vaginal cornificada indicaría la existencia de secreción de estradiol (Jansson y Frohman 1987b), tal y como apreciamos nosotros con la presencia de una fase de estro constante en los frotis vaginales de estas ratas.

Estos autores (Jansson y cols. 1985a), no presentaban medidas de la longitud tibial en hembras intactas tratadas neonatalmente con PT, y basaban su hipótesis del efecto inhibitor

de la secreción ovárica en las diferencias entre hembras gonadectomizadas, y gonadectomizadas tratadas con PT. A pesar de ello, nuestros datos apoyan su hipótesis dada la falta de efecto en longitud tibial debida al tratamiento neonatal con PT, y también los datos de otros autores que demuestran la falta de efecto sobre el patrón secretor de GH.

Asimismo se sabe que los estrógenos inhiben el crecimiento longitudinal de la tibia (Jansson y cols. 1983, 1985b) y la ganancia de peso (Jansson y cols. 1983, 1985b, Shulman y cols. 1987, Borski y cols. 1996) en hembras gonadectomizadas. También impiden el aumento de los niveles circulantes de IGF I que se produce en la hembra tras la castración (Borski y cols. 1996).

De hecho parece que para lograr una masculinización total del patrón secretor de GH y una tasa de crecimiento prácticamente idéntica a la del macho en animales hembras, éstas han de ser gonadectomizadas neonatalmente, y tratadas no sólo neonatalmente sino también de adultas con testosterona (Jansson y cols. 1985a, Jansson y Frohman 1987b, Wehrenberg y Giustina 1992). También los trabajos de Chowen y cols. (1993) apoyan esta hipótesis ya que el tratamiento con testosterona en hembras adultas, que aumenta el peso, y la longitud tibial según Joss y cols. (1962), no promueve el incremento ponderal con la misma eficacia que en las hembras que además fueron tratadas con andrógenos neonatalmente, si bien siguen pesando menos que los machos normales.

Por otra parte, en nuestros datos los machos castrados neonatalmente muestran valores superiores a las hembras normales tanto en longitud como en peso, lo que parece indicar que tampoco se logró una completa feminización de su patrón de crecimiento.

Los estudios de Jansson y cols. (1984) también presentan unas tasas de crecimiento en el macho gonadectomizado neonatalmente ligeramente superiores a las hembras normales. Sin embargo, estas tasas de crecimiento longitudinal están calculadas en base al crecimiento en los 2 últimos días de experimentación, tiempo comprendido entre el marcaje del cartílago y el sacrificio del animal, por lo que pequeñas diferencias en el valor obtenido, y suponiendo que se mantenga la misma evolución, pueden dar lugar a que la diferencia en la longitud tibial vaya aumentando a lo largo del tiempo.

Por otra parte el peso corporal de los machos castrados neonatalmente es superior al de las hembras normales (Jansson y cols. 1984, 1985b, Chowen y cols. 1993), separándose paulatinamente a partir de los 40 días, de forma similar a lo que se observa en nuestros datos.

Dado el papel inhibitor que la secreción ovárica de las hembras ejerce sobre el crecimiento, se podría suponer que los machos también necesiten una exposición a estrógenos para lograr un crecimiento idéntico a éstas. De hecho, la exposición a estrógenos en machos adultos, castrados o no, modifica también el patrón secretor de la GH, aumentando sus niveles basales, disminuyendo los intervalos entre los picos, y disminuyendo la ganancia de peso del animal (Painson y cols. 1992).

En el caso de los machos, la tasa de crecimiento tibial se ve más afectada cuando la gonadectomía se lleva a cabo en la etapa neonatal que en la prepuberal. El tratamiento neonatal con testosterona en machos castrados neonatalmente permite una recuperación total de la ganancia ponderal, pero en el caso de la tasa de crecimiento en longitud de la tibia sólo es parcial (Jansson y cols. 1985a). Tampoco se logra una reversión total del efecto de la castración neonatal de los machos sobre el patrón secretor de GH si no se acompaña de tratamiento neonatal y en edad adulta con testosterona (Jansson y Frohman 1987a, Argente y cols. 1990).

De todos estos datos se deduce que los esteroides gonadales parecen ser importantes no sólo en la etapa neonatal sino también en la vida adulta (Argente y cols. 1990, Maiter y cols. 1991a), para mantener tanto el crecimiento, como el patrón secretor de GH propio de cada sexo en animales adultos (Argente y cols. 1990, Maiter y cols. 1991a, Painson y cols. 1992, Wehrenberg y Giustina 1992, Chowen y cols. 1993, 1996b).

Un último aspecto a estudiar es la existencia de crecimiento compensatorio en la rata macho, fenómeno que se ha descrito en conejos (Baron y cols. 1994) y en humanos (Arrigo y cols. 1995), y que se produce tras períodos de no crecimiento ocasionados por enfermedad, malnutrición u otras causas (Hermanussen y cols. 1996).

7. ESTUDIO DEL PROCESO DE CRECIMIENTO COMPENSATORIO PRODUCIDO TRAS AYUNO E INGESTA REDUCIDA, Y SU POSIBLE POTENCIACIÓN POR ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE GH EN LA RATA MACHO NORMAL O DEFICITARIA EN GH.

Tratamos de estudiar la existencia de crecimiento compensatorio en la rata macho tras un período de arresto del crecimiento, producido por la restricción de nutrientes. La

restricción de ingesta utilizada en nuestro caso fue del 70%, sin enriquecerla en proteínas, precedida por 1 ó 2 días de ayuno total.

La malnutrición en general y la deficiencia proteica en particular llevan a un fallo en la ganancia de peso y del crecimiento esquelético (Phillips 1981, Thissen y cols. 1991, Harel y Tannenbaum 1993, 1995, Tirapegui y cols. 1994, Yahya y Millward 1994, Yahya y cols. 1994). Así Yahya y cols. (1990) consiguen una completa inhibición del crecimiento en animales jóvenes con 3 días de dieta baja en proteínas y Tawa y Golberg (1992) afirman que el crecimiento cesa en ratas jóvenes con dietas por debajo del 5-8% en proteínas, aunque no disminuya la cantidad de calorías. En nuestro caso la ingesta de proteínas está muy cerca del límite que estanca el crecimiento, pero además se une la severa restricción energética, con lo que el efecto es muy evidente.

Nosotros no tratamos de establecer diferencias en la recuperación del crecimiento mediante distintos regímenes de realimentación sino de esclarecer la dinámica del proceso de crecimiento compensatorio y sus diferencias con el peso corporal, por lo que las ratas fueron realimentadas *ad libitum*.

Se realizó un análisis de regresión lineal para intentar detectar variaciones en las pendientes del peso y de la longitud tibial. A pesar de que hemos visto que el crecimiento no es un proceso lineal, y por tanto no parecería muy adecuado un análisis de este tipo, pensamos en eliminar precisamente interferencias con la pulsatilidad, ya que la coincidencia con un miniestirón podía influir en los incrementos calculados. También se excluyó de estos cálculos el primer día de realimentación, ya que existe un incremento muy importante en peso en ese primer día de realimentación que aumentaría notablemente el valor de la pendiente enmascarando la estimulación posterior. Como ya hemos comentado, existe una rehidratación del organismo al comenzar la realimentación (Zhao y cols. 1995), lo que puede estar contribuyendo a la ganancia ponderal. Para estudiar la evolución de la longitud tibial en los mismos períodos de tiempo, también se excluyó el primer día.

En el primer experimento utilizamos animales jóvenes en los que el período de ingesta reducida se realizó a los 32 días de vida. Durante este período la falta de nutrientes llevó a una disminución significativa del incremento en longitud, al comparar con los animales con dieta normal como ya se ha descrito (Tirapegui y cols. 1994, Yahya y cols. 1994, Hermanussen y cols. 1996). En el crecimiento tibial no encontramos un incremento superior a

los controles ni en los primeros días de realimentación, ni después. Tampoco se detectó un aumento en la pendiente de la recta de regresión lineal de los valores de longitud tibial de todo el período tras el ayuno.

La pérdida ponderal ocasionada por el ayuno tampoco se recupera totalmente, al menos dentro del período de observación, a pesar de que en el primer día en el que los animales tuvieron acceso *ad libitum* a la comida, se observó un incremento ponderal importante, coincidiendo con las observaciones de otros autores (Mosier y Jansons 1975, Phillips y Young 1975, Mosier y cols. 1978, Tannenbaum y cols. 1979, Zhao y cols. 1995). En el análisis de regresión lineal del peso, a diferencia de lo que ocurre en la longitud tibial, todos los grupos sometidos a ayuno presentaban una mayor pendiente que los controles no ayunados, es decir tienden a recuperar el peso más que la longitud.

La administración de GH no determina ningún efecto adicional, ni en el incremento de longitud tibial ni en el de peso (Tresguerres y cols. 1994, 1995), de igual forma que vimos con el tratamiento crónico con esta hormona. No existen muchos estudios en los que la administración de GH se haya realizado simultáneamente a la instauración de la realimentación. En ratas malnutridas desde el nacimiento, la administración de GH producía un ligero efecto adicional al de la realimentación en la ganancia de peso corporal sin que se modifiquen los niveles de IGF I (Zhao y cols. 1995). En este caso la malnutrición es crónica y además puede obtenerse un efecto por el tratamiento con GH por incluir animales hembras, en las que hemos visto que la GH sí estimula la ganancia ponderal. En hembras incluso se ha descrito que la GH tendría efecto durante la restricción crónica de la ingesta, revirtiendo la disminución en el crecimiento tibial, del fémur, y del peso corporal (Azain y cols. 1995).

Además, Dearden y Mosier (1974) en machos de la cepa Long Evans de 42 días, encontraron tras 2 días de ayuno, una mínima respuesta de crecimiento compensatorio en la longitud tibial, entre los 3 y los 7 días después de la realimentación, para luego mantener una tasa normal de crecimiento, señalando que las diferencias en longitud ocasionadas por el ayuno persistían a los 21 días de realimentación. Mosier y Jansons (1975, Mosier y cols. 1978), sostienen que con la realimentación se produce una recuperación total del peso ideal y de la longitud tibial. Sin embargo, a los 28 días de la realimentación ambos parámetros tendían a ser inferiores en los animales sometidos a ayuno. Puede que transcurrido un tiempo mayor nuestras ratas pudieran recuperar totalmente su peso, aunque no parecen seguir esa tendencia en la longitud tibial.

Como hemos visto la rata macho parece crecer a una velocidad máxima difícil de incrementar, por lo menos en animales jóvenes. Phillips y Young (1975) y Phillips (1981), detectan que el ayuno produce una disminución en la incorporación de SO_4 al cartílago, que se revierte con la realimentación, especialmente con dietas ricas en proteínas, aunque esa incorporación no aumenta por encima de los niveles observados en los animales control. Tampoco Mosier y cols. (1978), encontraron una mayor incorporación de SO_4 transcurridos 14 días de realimentación, no obstante aumentó puntualmente por encima del control a los 21 días y volvió a descender a los 28.

En vista de los resultados obtenidos, pasamos a estudiar este fenómeno en la rata macho deficitaria en GH. Además cabía la posibilidad de la influencia de la edad, por lo que el período de ingesta reducida se desplazó a los 59 días.

En este caso no hubo prácticamente crecimiento en longitud tibial de los animales normales ayunados, de acuerdo con los resultados de otros autores, (Dearden y Mosier 1974, Hermanussen y cols. 1996). Puede que la restricción de dieta, supusiera un régimen más drástico en estos animales de mayor peso, y por tanto con efectos más acusados, a pesar de que la dieta se aumentó de 4 g/día en el primer experimento a 6 g/día, con lo que la disminución del 70% de la dieta se ajustó al mayor peso del animal.

En el primer día de realimentación, detectamos un incremento superior de la longitud tibial en los animales normales sometidos a ayuno frente a sus controles no ayunados, pero éste parece ser un hecho aislado, ya que no volvió a repetirse, ni se observó en los animales tratados con GMS. En los días posteriores, no se observó ninguna tendencia a la recuperación de la longitud tibial en los grupos sometidos a ayuno, ya fueran normales o tratados con GMS.

El tratamiento con GH, tendía a aumentar la pendiente de la recta de regresión lineal de la longitud tibial, pero sólo llegó a ser diferente del grupo tratado con GMS y sometido a ayuno cuando el tratamiento comenzaba a los 65 días de vida, es decir 4 días después de finalizar el ayuno, observándose el mismo efecto en el peso.

En este caso, y a diferencia de lo observado en animales más jóvenes (sometidos a ayuno a los 32 días), es importante resaltar que el menor incremento de longitud tibial en los animales normales no fue tan severo como para que llegaran a existir diferencias significativas en la longitud tibial con respecto a los animales con dieta normal. Esta discrepancia podría

explicarse en base a que existe una caída gradual en la velocidad de crecimiento (Walker y Kember 1972a). Por tanto, la disminución en la tasa de crecimiento por el ayuno, en animales que *per se* están creciendo menos, hace que la pérdida potencial ocasionada no sea tan marcada como cuando la tasa de crecimiento es muy superior.

De nuevo la realimentación determinó un incremento ponderal superior en el primer día de realimentación, sobre todo en los animales normales, cuya pérdida ponderal también fue más importante, tanto si se expresan los resultados en valores absolutos como en relativos.

En las ratas tratadas con GMS la tibia continúa su crecimiento durante el ayuno mientras que sus correspondientes controles ayunados dejan de crecer. Su pérdida ponderal es igualmente menor que en los animales normales. Este hecho podría deberse a que los animales tratados con GMS presentan una ingesta reducida (Redding y cols. 1971), por lo que al recibir la misma cantidad de pienso que los controles su régimen de restricción alimentaria es menos severo. Otras alteraciones producidas por el tratamiento con GMS como la obesidad que desarrollan los animales, podrían contribuir también a la diferente respuesta. También la menor actividad física que se ha observado en ratones tratados con esta sustancia (Tokuyama y Himms-Hagen 1986) podría contribuir a un gasto energético más reducido.

Todos los grupos sometidos a ingesta reducida tienden a recuperar su peso al realimentarse, no existiendo diferencias significativas en el peso final entre los animales con dieta normal y los sometidos temporalmente a ayuno. Estos últimos presentan un valor ligeramente inferior, que posiblemente se igualaría con el tiempo. De hecho Ziegler y cols. (1995), con una cepa diferente de ratas pero de edad similar a las nuestras, encuentran que la recuperación del peso tras 3 días de ayuno total, un tratamiento algo más drástico que el nuestro, ocurre con tan sólo 3 días de realimentación.

En un tercer estudio utilizamos animales aún mayores, ya que el ayuno comenzó a los 77 días de vida, y prolongamos el período de restricción al acceso de comida, para descartar que el tiempo utilizado con anterioridad, a pesar de disminuir el crecimiento, no fuera suficiente como para disparar un período de crecimiento compensatorio.

No se detectó un incremento superior en longitud tibial en los días de realimentación más tempranos, ya fueran animales normales o tratados con GMS. Sin embargo, el análisis de

regresión lineal de todo el período posterior al ayuno, por primera vez arrojó una pendiente superior en los grupos con ayuno, es decir, existía una tendencia a recuperar la longitud perdida aunque se trata de una recuperación muy lenta y gradual.

El tratamiento con GH a los animales adultos deficitarios en esta hormona estimula el crecimiento en longitud tibial tanto si se comienza más tempranamente como cuando se comienza 4 días después de finalizar el ayuno, aunque este último régimen es proporcionalmente más efectivo. Este efecto se observó también en la ganancia de peso. Cabe la posibilidad de que el tratamiento con GH nada más terminar el ayuno, llegue a tener efecto en estos animales, porque son animales mayores que en el experimento anterior (con ingesta reducida a los 59 días de vida). Su velocidad de crecimiento es inferior, y por tanto teóricamente más fácil de ser potenciada, aunque también puede deberse a que el tratamiento con GH se prolongó un día más. La dosis se aumentó a 2 U.I./rata/día para que fuera equivalente en peso a la que recibieron los animales más jóvenes. El efecto de la GH también se reflejó en una pendiente superior en la evolución de la longitud tibial.

La evolución ponderal fue similar a la observada en los animales sometidos a ayuno a los 59 días. La recuperación con la realimentación, en este caso, fue más rápida y completa en los animales normales, al igual que vieron otros autores con animales de edad similar (Gruenewald y cols. 1996); mientras que en los tratados con GMS la recuperación parece ser más lenta y puede incrementarse por el tratamiento con GH.

Para evidenciar la posibilidad de un efecto de “rebote” en crecimiento y peso, tras el ayuno, procedimos a calcular una modificación de la media móvil, tal y como se ha descrito en material y métodos, en los animales normales. En peso aparece un claro fenómeno de rebote, siendo los incrementos ponderales tras el ayuno muy superiores a lo que se observa con anterioridad a él, es decir el peso se compensa tan rápidamente como se pierde durante el ayuno. Sin embargo, en longitud tibial los miniestirones inmediatos al ayuno no son superiores a los que se observan en las ratas alimentadas normalmente (Hermanussen y cols. 1996).

Dada la relación existente entre los niveles de IGF I y el estatus nutricional (Yahya y cols. 1990, Bates y cols. 1993, Harel y Tannenbaum 1993) en este último experimento comprobamos los niveles circulantes en plasma de esta hormona.

El ayuno en animales normales lleva a una disminución en los niveles de IGF I en plasma, tal y como vieron otros autores (Mosier y cols. 1978, Yahya y cols. 1990, Maes y

cols. 1991, Asakawa y cols. 1992, Dai y Baxter 1994, Ohashi y cols. 1995), y como cabe esperar además, por la inhibición en la secreción de GH (Tannenbaum y cols. 1979, 1989).

Los animales tratados con GMS presentan, ya antes del ayuno, niveles disminuidos de IGF I, pero a pesar de que los valores tendían a ser menores, no detectamos un descenso significativo ulterior al ayuno. No obstante, en otros animales deficitarios en GH (ratas enanas) 48 horas de ayuno total provocan una disminución en los niveles del ARNm de IGF I en hígado (Nogami y cols. 1994). Las diferencias en el régimen de alimentación y en la cepa de los animales parecen ser responsables de las diferentes respuestas.

Los valores plasmáticos de GH (datos incluidos en Hermanussen y cols. 1996) se encontraban disminuidos en la ratas controles, efecto descrito tanto en el ayuno como en la restricción de proteínas (Tannenbaum y cols. 1979, 1989, Harel y Tannenbaum 1993, 1995, Thissen y cols. 1994, Okada y cols 1994, Oster y cols. 1996), al contrario de lo que ocurre en humanos en los que los niveles se elevan (Maes y cols. 1991, Thissen y cols. 1994, Straus 1994).

Estos experimentos ponen de manifiesto la falta de capacidad de la rata macho, normal o deficitaria en GH, para producir un crecimiento compensatorio en la longitud tibial inmediatamente tras el ayuno. No obstante, y aunque existe una ligera estimulación del crecimiento, indicando una tendencia a recuperar la longitud, la evolución es claramente diferente de lo que se observa en el peso corporal (Hermanussen y cols. 1996).

Así, Yahya y Millward (1994) encuentran tras un periodo prolongado de restricción dietética, que la recuperación de la longitud tibial con la realimentación es mas lenta que la ponderal, y depende de manera proporcional de las proteínas en la dieta. Otros autores también detectan esta diferencia ya que en ratas enanas con obesidad inducida por la dieta, la infusión continua de GH determina una pérdida de peso corporal, acompañada de crecimiento esquelético (Clark y cols. 1996a). De todos estos datos se deduce que existe una disociación entre la ganancia de peso y el crecimiento del hueso como tal.

El hecho de conseguir una disminución del crecimiento, acompañado de un dramático descenso ponderal, habla en favor que el ayuno utilizado debiera haber sido suficiente para provocar el fenómeno de crecimiento compensatorio en la longitud tibial si éste hubiera de tener lugar.

También es cierto que los animales más jóvenes siguen creciendo durante el ayuno, mientras que no observamos este efecto en los animales del segundo y tercer experimento,

sometidos a similar régimen de malnutrición. La edad parece ser un factor primordial, y algunos autores (Tirapegui y cols. 1994), observan en animales de 4 semanas, que la inhibición del crecimiento muestra una respuesta retrasada con respecto al peso, indicando que existe una cierta prioridad para el crecimiento longitudinal (Tirapegui y cols. 1994, Yahya y Millward 1994, Yahya y cols. 1994). Esta prioridad no parece mantenerse en nuestros animales de más edad, en los que el crecimiento se estanca. La detención del crecimiento sería una respuesta adaptativa al ayuno, ya que el crecimiento no es indispensable para la supervivencia por lo menos a corto plazo (Straus 1994), y la adaptación del eje GH-IGF I a la privación nutricional sería protectora, ya que los recursos se usan para el mantenimiento de las funciones metabólicas básicas en vez del crecimiento (Counts y cols. 1992).

Según Mosier (1986) la posibilidad que tiene el animal de alcanzar un crecimiento compensatorio completo tras malnutrición depende del grado de déficit de crecimiento alcanzado, y de la maduración de los tejidos en el momento en el que la detención del crecimiento se produce. Así el daño ocasionado es mayor cuanto más joven es el animal (Maes y cols. 1991), como en el caso de nuestro primer experimento. Por otra parte parece lógico que la falta de nutrientes en una época de activo crecimiento tenga mayores repercusiones.

Hay que tener en cuenta además, que la transición del crecimiento y desarrollo del animal desde la etapa prepuberal a adulto ocurre entre 1 y 2 meses (Oster y cols. 1996). Así 4 semanas de diferencia en la edad del animal, determinan distinta respuesta a una restricción crónica en la dieta: los animales de 4 semanas muestran una mayor depresión del sistema IGF I (es decir disminuciones de los niveles de IGF I en plasma y de su ARNm en hígado, IGFBP 3, e insulina) que los animales de 8 semanas, lo que sugiere una mayor sensibilidad a la restricción de dieta (Oster y cols. 1996).

En nuestro caso, la recuperación ponderal es más rápida cuanto mayor es la rata. Si seguimos avanzando en edad, se ha visto que 3 días de ayuno ocasionan una pérdida ponderal mayor en animales de 3 meses de edad, que en animales de 1 año o 2 años, mientras que la recuperación fue más rápida y total cuanto más jóvenes eran los animales, y no llegaba a ser completa en animales de 2 años, en los que además, pueden existir enfermedades relacionadas con la edad (Gruenewald y cols. 1996).

En los animales deficitarios en GH, parece que el tratamiento con GH es efectivo para acelerar la recuperación, pero esto es más evidente si se comienza más tarde. Parece que

existe una cierta refractariedad por los ajustes metabólicos que se están produciendo. Por ejemplo: el patrón secretor de GH parece no recuperarse inmediatamente con la realimentación, sino que han de pasar 3 días para volver a mostrar el patrón secretor normal de los animales adultos (Tannenbaum y cols. 1979, 1989). De igual forma, algunos autores describen que, tras 3 días de ayuno, los niveles de IGF I aunque aumentan con la realimentación no se recuperan totalmente hasta 3 ó 4 días después (Maes y cols. 1991; Ziegler y cols. 1995). Por otra parte, se ha descrito que la rápida ganancia de peso que ocurre inicialmente tras un período largo de restricción de dieta en ratas hembras (Gruaz y cols. 1994) aparece igualmente si los animales eran tratados con anticuerpo anti-GHRH, aunque luego alcanzan rápidamente una meseta en la ganancia ponderal. Tampoco parece que el efecto de GH sea únicamente metabólico desde el momento en el que observamos aumento en la longitud tibial.

En general el tratamiento con GH en estados catabólicos parece ser beneficioso como han descrito Lanz y cols. (1992), la administración de GH con la realimentación, tras malnutrición crónica en animales machos de 6 meses, aumenta la ganancia ponderal tras 5 semanas de tratamiento, acelera el retorno a valores normales de IGF I y aumenta la recuperación de la masa muscular. Probablemente el efecto de GH pueda deberse a que se trata de animales mucho mayores, y el tratamiento con GH fue crónico.

Los mecanismos que influyen en la secreción de GH y en el control del tamaño corporal adecuado tras la malnutrición aguda o crónica no parecen estar claros (Harel y Tannenbaum 1995).

8. ANÁLISIS MATEMÁTICO DEL CRECIMIENTO OSCILATORIO (CARACTERIZACIÓN DE LOS MINIESTIRONES).

Al ser éste un abordaje novedoso tanto desde el punto de vista de la metodología (microknemometría) como de la elaboración matemática de los resultados obtenidos (aplicación de las funciones Gompertz), resulta difícil discutir éstos con los de otros autores, pues lógicamente no existen. Solamente puede realizarse alguna comparación colateral o bien intentar interpretar directamente los datos.

Para describir los incrementos de velocidad se desarrolló un modelo matemático que caracterizara funciones locales de tipo doble exponencial, con forma de "S" (Burmeister y cols. 1997). Así el algoritmo numérico reconoce el equivalente matemático de lo que llamamos un "ministirón".

Este modelo matemático ofrece la ventaja de un análisis individual, donde los parámetros que caracterizan cada ministirón se obtienen de forma aislada, con lo que los datos no se aplanan como ocurre cuando se aplica la modificación de la media móvil (Hermanussen y cols. 1988a, 1988b), que depende de intervalos (Hermanussen y cols. 1997b).

La mayoría de nuestros experimentos finalizaron alrededor de los 60 días de vida, por lo que únicamente los grupos de machos control y machos tratados con GMS existen datos de edades superiores.

Este modelo matemático pone de manifiesto las diferencias que observamos en el patrón de crecimiento entre machos y hembras ya que existe un dimorfismo sexual, donde los machos presentan ministirones de mayor amplitud y de mayor duración que las hembras, es decir mantienen un crecimiento elevado durante más tiempo y con tasas superiores a las hembras, lo que les permite obtener una longitud tibial superior (Hermanussen y cols. 1997b, Rol de Lama y cols. 1997).

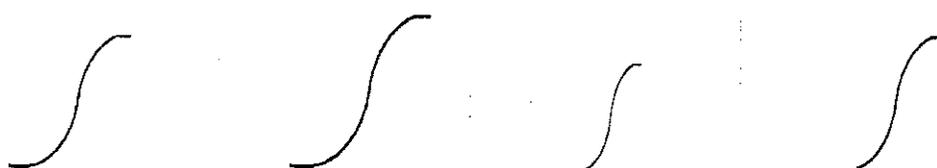
Para clarificar la discusión se representa gráficamente la forma de cada tipo de ministirón. No representan una media de los valores de cada grupo. Tampoco se trata de velocidades de crecimiento sino de datos directos de longitud. La forma doble exponencial indicaría un aumento progresivo en la velocidad de crecimiento hasta alcanzar un máximo, a continuación la velocidad vuelve a decaer de forma exponencial.

MACHOS

Normales Normales +GH GMS GMS+GH



HEMBRAS



Esquema de la forma supuesta de los miniestirones bajo distintos regímenes de experimentación.

El tratamiento con GH en animales normales sólo parece tender a aumentar la amplitud de los miniestirones en los animales hembras, sin llegar a modificar la pendiente del miniestirón. Sin embargo ese aumento en amplitud fue suficiente como para que este tratamiento ocasionara una ganancia en longitud tibial superior a lo normal. Probablemente un insuficiente número de animales justifique que las diferencias no lleguen a ser significativas. En los machos no se produce ningún cambio en los miniestirones por efecto del tratamiento con GH, como cabe esperar de su falta de efecto sobre la longitud tibial de estos animales (Tresguéres 1994, Hermanussen y cols. 1997b).

Por otro lado el déficit de GH producido por el tratamiento neonatal con GMS, sólo llegó a producir cambios significativos en los grupos de hembras, disminuyendo la amplitud y la duración de los miniestirones. En machos a pesar de que el tratamiento con GMS llevó a una clara disminución en la longitud tibial de estos animales, sólo detectamos una tendencia a la disminución de la amplitud de los miniestirones. De hecho, si en el caso de los machos se incluyen los animales de más de 60 días, tanto normales como tratados con GMS, la disminución en la amplitud sí llega a ser significativa y la pendiente aumenta llevando a miniestirones más similares a los observados en hembras (amplitud: machos 2,95 mm vs GMS

2,38 mm, γ : machos 0,96 vs GMS 1,39). Ésto indica que la edad parece influir más a los animales con GMS que a los normales, como ya veremos más adelante, o que al aumentar el número de animales las diferencias llegan a ser significativas.

Hay que indicar que a pesar de que el número de machos y hembras sometidos a tratamiento con GMS fue similar, el número de miniestirones considerados como significativos fue menor en los machos, por lo que esta diferencia puede permitir la observación de efecto en el caso de las hembras.

El tratamiento con GH tanto en machos como en hembras, tratados con GMS, tiende a restablecer la forma de los miniestirones descritos como “normales”, de igual forma que estimulaba el crecimiento longitud tibial en ambos grupos (Tresguerres y cols. 1994, Hermanussen y cols. 1997b, Rol de Lama y cols. 1997).

Para investigar la secuencia de los miniestirones, determinamos el momento (edad) del máximo de velocidad de crecimiento ($-\beta/\gamma$), estudiando el intervalo de tiempo entre dos miniestirones. Nos encontramos con la existencia de intervalos “vacíos” debido a que algunas de las funciones obtenidas tuvieron que ser excluidas por no cumplir los criterios marcados de significación. Se decidió no incluir el tiempo que esas funciones abarcaban, ya que desconocemos su significado biológico. Por tanto, utilizamos únicamente aquellos miniestirones considerados como tales y que fueran consecutivos.

Existía un claro efecto de espaciamiento entre los miniestirones con el aumento de la edad en la mayoría de los grupos estudiados, salvo en los animales normales tratados con GH y en los animales machos tratados con GMS y GH. Este último grupo mostró un valor moderado de correlación con la edad que no llegó a ser significativo, ya que solamente se encontraron 11 miniestirones subsecuentes, frente a 33 en el caso de las hembras sometidas a este mismo tratamiento. Por otra parte, la correlación período/edad detectada existe independientemente de que se incluyan o no animales de más de 60 días.

El tiempo medio transcurrido entre los picos de los miniestirones oscilaba entre los 4 y 5 días, siendo de 4,6 días (SD 2,3) en los machos, (4,35 SD 1,6 sin considerar los animales de más de 60 días), y de 4,2 (SD 1,6) en las hembras normales. Ésto parece apoyar la idea de una cierta periodicidad. A pesar de ello, las altas desviaciones estándar sugieren una secuencia más caótica de miniestirones, o al menos poco predecible, ya que hay que tener en cuenta que existen unos intervalos “vacíos” entre esos miniestirones, de duración variable.

Otra característica de los miniestirones, la amplitud también disminuye con la edad en todos los grupos, aunque en los machos tratados con GMS este efecto se produce principalmente en los animales de más de 60 días, puesto que si se excluyen estos animales la correlación edad/amplitud deja de ser significativa.

Respecto a la pendiente de los miniestirones, el efecto de la edad es mucho menos importante y parece afectar únicamente a los animales normales, aunque con una correlación muy baja, y a los animales tratados con GMS. Este efecto sólo se pone de manifiesto al incluir animales de más de 60 días, no detectándose con anterioridad; así en general, la pendiente sería más independiente de la edad (Hermanussen y cols. 1997b).

Quisimos saber si podíamos predecir de algún modo la amplitud o el momento de un máximo de velocidad de crecimiento en función de lo que hubiera ocurrido en el miniestirón anterior. Para ello se analizaron las amplitudes de miniestirones subsecuentes o tripletes subsecuentes. Los tripletes subsecuentes comprenden 3 miniestirones y 2 intervalos de tiempo.

No encontramos ninguna correlación entre el primer y el segundo intervalo entre miniestirones (Hermanussen y cols. 1997b). En cuanto a las amplitudes se encontró una correlación positiva débil, aunque significativa en algún caso que se debía fundamentalmente a los animales de más de 60 días en los que al disminuir la amplitud de los miniestirones con la edad, era más frecuente encontrar miniestirones de corta amplitud consecutivos.

En conclusión, el crecimiento es un proceso no lineal (Togo y Togo 1982, Valk y cols. 1983a, 1983b, Wit y cols. 1987, Tresguerres y cols. 1995, Hermanussen 1995, Hermanussen y cols. 1995, 1997b, Wolthers 1996, Rol de Lama y cols. 1997), y este procesamiento matemático pone de manifiesto el dimorfismo sexual en el patrón de crecimiento en la rata, y su dependencia de la hormona de crecimiento (Hermanussen y cols. 1997b). Los miniestirones son muy heterogéneos y poco predecibles en cuanto a su amplitud, o el momento en el que van a ocurrir (Hermanussen y cols. 1997b).

De hecho sometiendo a este procesamiento matemático los datos obtenidos en neonatos humanos por mini-knemometría (adaptación para recién nacidos, Michaelssen 1991), se encontró que los miniestirones tendían a aparecer cada 4,2 días pero con una desviación estándar de 1,9 días indicando también una gran dispersión (Hermanussen y cols. 1997a).

Este tipo de comportamiento puede ser la causa de las inadecuadas predicciones de crecimiento (Wales y Milner 1987, Wit y cols. 1987, Hermanussen y cols. 1987, 1988b, 1989) a largo plazo a partir de datos obtenidos a corto plazo por knemometría (Hermanussen y cols. 1997a).

Una cuestión importante es que las oscilaciones en la velocidad de crecimiento siguen existiendo, en nuestros animales, aún durante la administración exógena diaria de GH, lo que parece sugerir que existen variaciones temporales en la sensibilidad del cartilago a esta hormona (Tresguerres y cols. 1994, Ariznavarreta 1996a). De igual forma en humanos, dosis constantes de GH no llevan necesariamente a tasas de crecimiento constantes sino también oscilantes (Hermanussen y cols. 1987, 1988c), más aún, Hermanussen y cols. (1988c) encontraron una mejora en la velocidad de crecimiento, monitorizada por knemometría, en niños en los que la administración de GH se sincronizaba con los estirones endógenos de su velocidad de crecimiento, lo que indicaría que se estaba administrando la GH en los períodos de máxima respuesta.

Retomando un aspecto comentado al principio de nuestra discusión, sobre la existencia de "saltos" o incrementos constantes en la velocidad de crecimiento, cabe la posibilidad según lo que hemos detectado en la rata, que algunos de los incrementos bruscos pudieran ser confundidos con un "salto", mientras que aquellos miniestirones que transcurren de forma más suave pudieran ser confundidos con un incremento constante si el período de observación es corto (Hermanussen y cols. 1997b)

Por otra parte esta técnica matemática requiere un elevado número de datos lo que resulta muy difícil de obtener, por lo que serán necesarios estudios posteriores.

CONCLUSIONES

- ✂ La microknemometría es una técnica válida y muy precisa para el seguimiento diario del crecimiento tibial en la rata.
- ✂ El crecimiento es un proceso no-lineal ya que la velocidad de crecimiento en longitud tibial, no sólo varía con la edad y el sexo del animal, sino que presenta incrementos no constantes (miniestirones) tanto día a día como incluso en períodos inferiores a 24 horas.
- ✂ La rata macho joven presenta un patrón de crecimiento aparentemente máximo, por lo que no resulta posible su incremento, mediante la administración de GH a dosis altas, al menos en los tiempos de observación de nuestros estudios. Por el contrario, las hembras sí son sensibles al tratamiento con GH, incrementando su velocidad de crecimiento.
- ✂ La administración de altas dosis de GH aumenta la velocidad de crecimiento tibial en la rata macho tratada con GMS, efecto que no pudo ser potenciado por la administración de andrógenos, en nuestro estudio.
- ✂ En la rata existe un patrón dimórfico dependiente del sexo tanto en el patrón normal de crecimiento, como en la respuesta a los distintos tratamientos.
- ✂ Los esteroides sexuales son necesarios tanto en la etapa neonatal de la vida del animal como en la vida adulta, por lo que el tratamiento neonatal con PT en la hembra o la castración neonatal en el macho no parecen ser suficientes para, respectivamente, masculinizar y feminizar totalmente sus patrones de crecimiento.
- ✂ La realimentación tras la restricción dietética severa en la rata macho no determina un crecimiento compensatorio inmediato en la longitud tibial como ocurre, sin embargo, en el peso corporal, sino que es un proceso más suave y paulatino. Además la recuperación del animal depende de la edad en la que esta restricción se instaure.
- ✂ Dadas las discrepancias existentes entre el peso y la longitud tibial parece más recomendable para la evaluación del crecimiento del animal, la utilización de técnicas que midan el crecimiento de los huesos largos en vez el peso corporal en el que repercuten factores como el grado de hidratación o los depósitos de grasa.

BIBLIOGRAFÍA

- **Aguilar E.**, Pinilla L., Tena-Sempere M. Growth hormone-releasing hormone-induced growth hormone secretion in adult rats orchidectomized or injected with ethylene dimethane sulphonate. *Neuroendocrinology* 57: 132-134. 1993.
- **Ali K.Z., Dickson G.R.** Influence of the fibula on growth of the rat tibia. *J. Anat.* 184: 347-353. 1994.
- **Ambler G.R.**, Breier B.H., Gluckman P.D., Effects of intermittent growth hormone or insulin-like growth factor I administration in the neonatal dwarf rat. *Horm. Res.* 40: 178-183. 1993.
- **Arce V.**, García Barrios M., Vara E., Lima J., Tresguerres J.A.F., Devesa J. Clonidine potentiates the growth hormone response to a growth hormone releasing hormone challenge in hypothalamic growth hormone releasing hormone deficient rats. *Neuroendocrinology* 61: 552-558. 1995.
- **Argente J.**, Chowen J.A., Steiner R.A., Clifton D.K. Somatostatin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through activation of androgen receptors and not by aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology* 52: 342-349. 1990.
- **Argente J.**, Pozo J., Chowen J.A. The growth hormone axis: control and effects. *Horm. Res.* 45 (Suppl. 1): 9-11. 1996a.
- **Argente J.**, García-Segura L.M., Pozo J., Chowen J.A. Growth hormone-releasing-peptides. *Horm. Res.* 46: 155-159. 1996b.
- **Ariznavarreta C.** El crecimiento, un proceso oscilante. Desde la pulsatilidad de su regulación hasta el incremento estatural. En Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 73. 1996a.
- **Ariznavarreta C.** Nutrición, factores psicosociales y crecimiento. En Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 145. 1996b.
- **Arrigo T.**, De Luca F., Bernasconi S., Bozzola L., Cavallo L., Crisafulli G., Ghizzoni L., Maghnie M., Zecchino C. Catch-up growth and height prognosis in early treated children with congenital hypopituitarism. *Horm. Res.* 44 (Suppl. 3): 26-31. 1995.
- **Asakawa K.**, Hikuza N., Takano K., Horikawa R., Sukegawa I., Demura H., Shizume K. Effects of insulin-like growth factor I or human growth hormone in fasted rats. *Growth Regulation* 2: 40-44. 1992.
- **Aspenberg P.**, Hansson L.I., Thorngren K-G. Modification of bone formation rate by growth hormone, melanocyte-stimulating hormone, and cortisone in the normal rat. *Acta Anat.* 121: 84-88. 1985.
- **Azain M.J.**, Hausman D.B., Kasser T.R., Martin R.J. Effect of somatotropin and feed restriction on body composition and adipose metabolism in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 268 (1 Pt. 1): E1137-E1144. 1995.

- **Badger T.M.**, Millard W.J., Martin J., Rosenblum P.M., Levenson S.E. Hypothalamic-pituitary function in adult rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Endocrinology* **111** (6): 2031-2036. 1982.
- **Bak B.**, Jørgensen P.H., Andreassen T.T. Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human growth hormone. *Bone* **11**: 233-239. 1990.
- **Bakke J.L.**, Lawrence N., Bennett J., Robinson S., Bowers C.Y. Late endocrine effects of administering monosodium glutamate to neonatal rats. *Neuroendocrinology* **26**: 220-228. 1978.
- **Baron J.**, Huang Z., Oerter K.E., Bacher J.D., Cutler Jr. G.B. Dexamethasone acts locally to inhibit longitudinal bone growth in rabbits. *Am. J. Physiol.* **263**: E489-E492. 1992.
- **Baron J.**, Klein K.O., Colli M.J., Yanovski J.A., Novosad J.A., Bacher J.D., Cutler Jr. G.B. Catch-up growth after glucocorticoid excess: A mechanism intrinsic to the growth plate. *Endocrinology* **135** (4): 1367-1371. 1994.
- **Barrios V.**, Argente J. Base molecular del mecanismo de regulación y acción de la hormona de crecimiento. *Endocrinología* **41** (2): 2-8. 1994.
- **Bates P.C.**, Loughna P.T., Pell J.M., Schulster D., Millward D.J. Interactions between growth hormone and nutrition in hypophysectomized rats: body composition and production of insulin-like growth factor-I. *J. Endocrinol.* **139**: 117-126. 1993.
- **Becker K.**, Steganga S. Conway S. Role of insulin-like growth factor I in regulating growth hormone release and feedback in the male rat. *Neuroendocrinology* **61**: 573-583. 1995.
- **Bennet P.A.**, Levy A., Carmignac D.F., Robinson I.C.A.F., Lightman S.L. Differential regulation of the growth hormone receptor gene: Effects of dexamethasone and estradiol. *Endocrinology* **137** (9): 3891-3896. 1996.
- **Berelowitz M.**, Firestone S.L., Frohman L.A. Effects of Growth hormone excess and deficiency on hypothalamic somatostatin content and release and on tissue somatostatin distribution. *Endocrinology* **109** (3): 714-719. 1981.
- **Bertherat J.**, Bluet-Pajot M.T., Epelbaum J. Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur. J. Endocrinol.* **132**: 12-24. 1995.
- **Bloch B.**, Ling N., Benoit, Wehrenberg B., Guillemin R. Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. *Nature* **307**: 272-273. 1984.
- **Borski R.J.**, Tsai W., DeMott-Friberg R. Barkan A.L. Regulation of somatic growth and the somatotrophic axis by gonadal steroids: Primary effect on insulin-like growth factor I gene and expression. *Endocrinology* **137** (8): 3253-3259. 1996.

- **Bradford.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254. 1976.
- **Breur G.J., VanEnkevort A., Farnum C.E., Wilsman N.J.** Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J. Orthop. Research.* 9: 348-359. 1991.
- **Breur G.J., Turgai J., VanEnkevort A., Farnum C.E., Wilsman N.J.** Stereological and serial section analysis of chondrocytic enlargement in the proximal tibial growth plate of the rat. *Anat. record.* 239: 255-268. 1994.
- **Burkitt H.G., Young B., Heath J.W.** *Histología Funcional Wheater.* 3ª Edición. Alhambra Logman. 1993.
- **Burmeister J., Grasedick L., Hermanussen M.** Gompertz-type structures in growth time series. *Ann. Human. Biol.* 1997. En prensa.
- **Byatt J.C., Staten N.R., Salsgiver W.J., Kostelc J.G., Collier R.J.** Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. *Am. J. Physiol.* 6 (Pt. 1): E986-E992. 1993.
- **Carlsson L.M.S., Clark R.G., Robinson I.C.A.F.** Sex difference in growth hormone feedback in the rat. *J. Endocrinology* 126: 27-35. 1990.
- **Carrascosa A., Gussinyé M., Audi L., Enrubia M., Yeste D., Vargas D.** Hormona de crecimiento y mineralización del esqueleto óseo. *Endocrinología* 41 (Suppl. 2): 51-54. 1994.
- **Carrascosa A., Audi L.** El cartílago de crecimiento regulación hormonal de su diferenciación. En *Retrasos del crecimiento.* Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 119. 1996.
- **Cella S.G., Locatelli V., Mennini T., Zanini Á., Bendotti C., Forloni L., Fumagalli G., Arce V.M., Colonna V., Wehrenberg B., Müller E.E.** Deprivation of growth hormone releasing hormone early in the rat's neonatal life permanently affects somatotrophic function. *Endocrinology* 127 (4): 1625-1634. 1990.
- **Cella S.G., Locatelli V., Broccia M.L., Menegola E., Giavini E., De Gennaro Colonna V., Torsello A., Wehrenberg W.B., Müller E.E.** Long-term changes of somatotrophic function induced by deprivation of growth hormone-releasing hormone during the fetal life of the rat. *J. Endocrinol.* 140: 111-117. 1994.
- **Clark R.G., Jansson J.O., Isaksson O., Robinson I.C.A.F.** Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats. *J. Endocrinol.* 104: 53-61. 1985.
- **Clark R.G., Robinson I.C.A.F.** Growth induced by pulsatile infusion of an amidated fragment of human growth hormone releasing factor in normal and GHRF-deficient

- rats. *Nature*. **314**: 281-283. 21 Marzo 1985a.
- **Clark R.G., Robinson I.C.A.F.** Growth hormone responses to multiple injections of a fragment of human growth hormone-releasing factor in conscious male and female normal rats. *J. Endocrinol.* **106**: 281-289. 1985b.
 - **Clark R.G., Robinson I.C.A.F.** Paradoxical growth-promoting effects induced by patterned infusions of somatostatin in female rats. *Endocrinology* **122**: 2675-2682. 1988.
 - **Clark R.G., Carlsson L.M.S., Rafferty B., Robinson I.C.A.F.** The rebound release of growth hormone (GH) following somatostatin infusion in rats involves hypothalamic GH-releasing factor release. *J. Endocrinol.* **119**: 397-404. 1988.
 - **Clark R.G., Mortenssen D.L., Carlsson L.M., Carlsson B., Carmignac D., Robinson I.C.A.F.** The obese growth hormone (GH)-deficient dwarf rat: Body fat responses to patterned delivery of GH and insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* **137** (5): 1904-1912. 1996a.
 - **Clark R.G., Mortensen D.L., Carlsson L.M.S., Spencer S.A., McKay P., Mulkerrin M., Moore J., Cunningham B.C.** Recombinant human growth hormone (GH)-binding protein enhances the growth-promoting activity of human GH in the rat. *Endocrinology* **137**: 4308-4315. 1996b.
 - **Clark R.G., Robinson I.A.C.F.** Up and down in the growth hormone cascade. *Cytokine & Growth Factor Rev.* **7** (1): 65-80. 1996.
 - **Conne B.S., Scaglioni S., Lang U., Sikonenko P.C., Aubert M.L.** Pituitary receptor sites for gonadotropin-releasing hormone: Effect of castration and substitutive therapy with sex steroids in the male rat. *Endocrinology* **110** (1): 70-79. 1982.
 - **Copeland K.C., Underwood L.E., Van Wyk J. J.** Induction of immunoreactive Somatomedin C in human serum by growth hormone : Dose-response relationships and effect on chromatographic profiles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **50** (4): 690-697. 1980.
 - **Corder R., Saudan P., Mazlan M., McLean C., Gaillard R.C.** Depletion of hypothalamic growth hormone-releasing hormone by neonatal administration of monosodium glutamate treatment reveals an inhibitory effect of betamethasone on growth hormone secretion in adult rats. *Neuroendocrinology* **51**: 85-92. 1990.
 - **Cotes P.M., Bartlett W.A., Gaines Das R.E., Flecknell P., Termeer R.** Dose regimens of human growth hormone: Effects of continuous and of gelatin vehicle on growth in rats and rate of absorption in rabbits. *J. Endocrinol.* **87**: 303-312. 1980.
 - **Coude F.X., Díaz J., Morre M., Roskam W., Roncucci R.** Growth hormone releasing factor production and potential uses in human and veterinary medicine. *Trends in Biotechnology* **2** (4): 83-88. 1984.

- **Counts D.R.**, Gwirtsman H., Carlsson L.M.S., Lesem M., Cutler G.B. Jr. The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-binding proteins. *J. Clin. End. Metab.* **75** (3): 762-767. 1992.
- **Crawford B.A.**, Martin J.L., Howe C.J., Handelsman D.J. Baxter, R.C. Comparison of extraction methods for insulin-like growth factor-I in rat serum. *J. Endocrinol.* **134**: 169-176. 1992.
- **Crawford B.A.**, Dobbie P., Bass J.J., Lewitt M.S., Baxter R.C., Handelsman D.J. Growth hormone (GH) regulation of circulating insulin-like growth factor-I levels during sexual maturation in the GH-deficient dwarf (*dw/dw*) male rat. *J. Endocrinol.* **141**: 393-401. 1994.
- **Cutler L.** The regulation of growth hormone secretion. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **25** (3): 541-571. 1996.
- **Chan Y.Y.**, Clifton D.K., Steiner R.A. Role of NPY neurones in GH-dependent feedback signalling to the brain. *Horm. Res.* **45** (Suppl. 1): 12-14. 1996a.
- **Chan Y.Y.**, Grafstein-Dunn E., Delemarre-van de Waal H.A., Burton K.A., Clifton D.K. Steiner R.A. The role of galanin and its receptor in the feedback regulation of growth hormone secretion. *Endocrinology* **137** (12): 5303-5310. 1996b.
- **Chandrashekar V.**, Bartke A., Wagner T.E. Endogenous human growth hormone (GH) modulates the effect of gonadotropin-releasing hormone on pituitary function and the gonadotropin response to the negative feedback of testosterone in adult male transgenic mice bearing human GH gene. *Endocrinology* **123** (6): 2717-2722. 1988.
- **Charlton H.M.**, Clark R.G., Robinson I.C.A.F., Porter Goff A.E., Cox B.S., Bugnon C., Bloch B.A. Growth hormone-deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *J. Endocrinol.* **119**: 51-58. 1988.
- **Chatelain P.G.**, Van Wyk J.J., Copeland K.C., Blethen S.L., Underwood L.E. Effect of *in vitro* action of serum proteases or exposure to acid on measurable immunoreactive somatomedin C in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **56** (2): 376-383. 1983.
- **Chowen J.A.**, Argente J., González-Parra S., García Segura M.L. Differential effects of the neonatal and adult sex steroids environments on the organization and activation of hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons. *Endocrinology* **133** (6): 2792-2802. 1993.
- **Chowen J.A.**, Argente J., Busiguina S. García-Segura M.L. The role of the glia in the hypothalamus: possible implications in hormone secretion. *Horm. Res.* **45** (Suppl 1): 15-18. 1996a.
- **Chowen J.A.**, García-Segura M.L., González-Parra S., Argente J. Sex steroids

- effects on the development and functioning of the growth hormone axis. *Cell. Mol. Neurobiol.* **16** (3): 297-309. 1996b.
- **Dada M.O.**, Campbell G.T., Blake C.A. Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on somatotrophs and growth hormone secretion in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* **115** (3): 996-1003. 1984.
 - **Dai J.**, **Baxter R.C.** Regulation *in vivo* of the acid-labile subunit of the rat serum insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* **135** (6): 2335-2341. 1994.
 - **Dalkin A.C.**, Duncan J.A., Regian S., Marshall J.C. reduction of pituitary GnRH receptor in immature rats treated with monosodium glutamate. *Am. J. Physiol.*: E126-E131. 1985.
 - **Daughaday W.H.**, Mariz I.D., Blethen S.L. Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: A comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J. Clin. End. Metab.* **51** (4): 781-788. 1980.
 - **Daughaday W.H.** Growth hormone and the somatomedins. En "endocrine control of growth". Current in Endocrinology: Basic and clinical aspects. Pp 8. Elviesier. New York. 1981.
 - **Daughaday W.H.**, Parker K.A., Borowsky S., Trivedi B., Kapadia M. Measurement of somatomedin-related peptides in fetal, neonatal, and maternal rat serum by insulin-like growth factor (IGF) I radioimmunoassay, IGF-II radioreceptor assay (RRA), and multiplication-stimulating activity RRA after acid-ethanol-extraction. *Endocrinology* **110** (2): 575-581. 1982.
 - **Daughaday W.H.**, **Rotwein P.**, Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrine. Rev.* **10** (1): 68-91. 1989.
 - **Dearden L.C.**, **Mosier H.D. Jr.** Growth retardation and subsequent recovery of the rat tibia, a histochemical light, and electron microscopic study. II After fasting. *Growth* **38**: 277-294. 1974.
 - **DePaolo L.V.**, Negro-Vilar A. Neonatal monosodium glutamate treatment alters the response of median eminence luteinizing hormone-releasing hormone nerve terminals to potassium and prostaglandin E₂. *Endocrinology* **110** (3): 835-841. 1982.
 - **Devesa J.**, Lima L., Tresguerres J.A.F. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* **3** (5): 175-183. 1992.
 - **Devesa J.**, **Tresguerres J.A.F.** Control de la secreción de GH. En Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 45. 1996
 - **Devesa J.**, García Barrios M., Costoya J.A., Gondar M., Gavrulina T., Gavrilin M.,

- Arce V. Expresión de los genes de hormona de crecimiento, variantes moleculares y acciones biológicas de estas variantes. Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 34. 1996.
- **Domené H.**, Krishnamurthi K., Eshet R., Gilad I., Laron Z., Koch I., Stannard B., Cassorla F., Roberts C.T. Jr, LeRoith D.J. Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth factor I (IGF I) and IGF I-binding protein-3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats. *Endocrinology* 133 (2): 675-682. 1993.
 - **Dubreuil P.**, Brazeau P., Morisset J. Effects of GRF with or without a SIRF antiserum on GH, IGF-I, thyroxin, cholecystokinin, gastrin, and metabolite concentrations in growing rats. *Growth regulation* 4: 56-62. 1994.
 - **Dueñas M.**, Luquin S., Chowen J.A., Torres-Alemán I., Naftolin F., García-Segura L.M. Gonadal hormone regulation of insulin-like growth factor-I-like immunoreactivity in hypothalamic astroglia of developing and adult rats. *Neuroendocrinology* 59: 528-538. 1994.
 - **Edén S.** Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 105 (2): 555-560. 1979.
 - **Farnum C.E.**, **Wilsman N.J.** Determination of proliferative characteristics of growth plate chondrocytes by labeling with bromodeoxyuridine. *Calcif. Tissue Int.* 52: 110-119. 1993.
 - **Fielder P.J.**, Mortensen D.L. Mallet P. Carlsson B., Baxter R.C., Clark R.G. Differential long-term effects of insulin-like growth factors on body growth and IGF binding proteins in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 137 (5). 1913-1920. 1996.
 - **Fishman A.**, Hertz P. Hochberg Z. Ontogenesis of the sexual dimorphism of growth hormone secretion by perfused rat hemipituitaries. *Neuroendocrinology* 57: 782-788. 1993.
 - **Flyvbjerg A.**, Jørgenssen K.D., Marshall S.M., Ørskov H. Inhibitory effect of octreotide on growth hormone-induced IGF-I generation and organ growth in hypophysectomized rats. *Am. J. Physiol.* E569-E576. 1991.
 - **Fraser H.**, **Baird D.T.** Clinical applications of LHRH analogues. *Baillière's. Clin. Endocrinol. Metab.* 1: 43-70. 1987.
 - **Froesch E.R.**, Guler H.P., Schmid C., Binz K., Zapp J. Therapeutic potential of insulin like growth factor I. *Trends Endocrinol. Metab.* May/June: 254-260. 1990.
 - **Furlanetto R.W.**, Underwood L.E., Van Wyk J.J., D'Ercole J. Estimation of Somatomedin C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.* 60: 648-657. 1977.
 - **Gabriel S.M.**, Millard W.J., Koenig J.I., Badger T.M., Russel W.E., Maiter D.M.,

- Martin J.B. Sexual and developmental differences in peptides regulating growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* **50**: 299-307. 1989.
- **Gabriel S.M.**, Roncancio J.R., Ruiz N.S. Growth hormone pulsatility and endocrine milieu during sexual maturation in male and female rats. *Neuroendocrinology* **56**: 619-628. 1992.
 - **García Barros M.** Procesamiento tisular de la hormona de crecimiento humana. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 1996.
 - **García Segura L.M.** Mecanismos celulares de la diferenciación sexual del cerebro. En *Hormonas, Instintos y Emociones*. Ed. Complutense. Madrid. Pp: 31-37. 1996.
 - **Gargosky S.E.**, Tapanainen P., Rosenfeld R. G. Administration of growth hormone (GH), but not insulin-like growth factor I (IGF I), by continuous infusion can induce the formation of the 150-kilodalton IGF-binding protein-3 complex in GH-deficient rats. *Endocrinology* **134** (5): 2267-2276. 1994.
 - **Garnelo P.**, Pinilla L., Gaytan F., Aguilar E. Pituitary-testis function in rats treated neonatally with a gonadotrophin-releasing hormone agonist: short- and long term effects. *J. Endocrinol.* **134**: 269-277. 1991.
 - **Garrel D.R.**, Gaudreau P., Zhang L., Reeves I., Brazeau P. Chronic administration of growth hormone-releasing factor increases wound strength and collagen maturation in granulation tissue. *J. Surgical Res.* **51**: 297-302. 1991.
 - **Gelato M.C.**, Vassalotti J., Spatola E., Rutherford C., Marsh K., Carlson H.E. Differential tissue regulation of the insulin-like growth factors in rats bearing the MStT/W15 pituitary tumor. *Neuroendocrinology* **56**: 765-774. 1992.
 - **Gevers E.F.**, Wit J.M., Robinson I.C.A.F. Effect of gonadectomy on growth and GH responsiveness in dwarf rats. *J. Endocrinol.* **145**: 69-79. 1995.
 - **Gevers E.F.**, Milner J., Robinson I.C.A.F., Loveridge N. Single cell enzyme activity and proliferation in the growth plate: Effects of growth hormone. *J. Bone Miner. Res.* **11**: 1103-1111. 1996a.
 - **Gevers E.F.**, Wit J.M., Robinson I.C.A.F. Growth, growth hormone (GH)-binding protein, and GH receptors are differentially regulated by peak and trough components of the GH secretory pattern in the rat. *Endocrinology* **137** (3): 1013-1018. 1996b.
 - **Gibson A.T.**, Pearse R.G., Wales J.K.H. Knemometry and the assessment of growth in premature babies. *Arch. Dis. Child.* **69**: 498-504. 1993.
 - **Glasscock G.F.**, Hein A.N., Miller J.A., Hintz R.L., Rosenfeld R.G. Effects of continuous infusion of Insulin-like growth factor I and II, alone or in combination with thyroxin or growth hormone, on the neonatal hypophysectomized rat. *Endocrinology* **130** (1): 203-210. 1992.
 - **González D.**, López F., Hernández G., Sánchez-Criado J., Aguilar E. Body growth

- and puberty remain unchanged in female rats after daily treatment with GRF (1-29) NH₂. *Endocrinologia* 36 (1): 13-16. 1989.
- **Goodman H.M.**, Schwartz Y., Tai L.R., Gorin E. Actions of growth hormone on adipose tissue: Possible involvement of autocrine and paracrine factors. *Acta Pædiatr.* 367 (Suppl.): 132-136. 1990.
 - **Goodman W.H.** Hormonal control of growth. En Basic Medical endocrinology. Raven Press Series in Physiology. Pp 225-248. 1994.
 - **Gosteli-Peter M.A.**, Winterhalter K.H., Schimid C., Froesch E.R., Zapf J. Expression and regulation of insulin-like growth-factor-I (IGF I) and IGF-Binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-I and growth hormone. *Endocrinology* 135 (6): 2558-2567. 1994.
 - **Greely G.H. Jr.**, Nicholson G.F., Kizer J.S. A delayed LH/FSH rise after gonadectomy and delayed serum TSH rise after thyroidectomy in monosodium glutamate (MSG)- treated rats. *Brain Res.* 195: 111-122. 1980.
 - **Groesbeck M. D.**, Parlow A.F., Daughaday W.H. Stimulation of supranormal growth in prepubertal adult plateaued, and hypophysectomized female rats by large doses of rat Growth Hormone: Physiological effects and adverse consequences. *Endocrinology* 120 (5): 1963-1975. 1987.
 - **Gruaz N.M.**, Arsenijevic Y., Wehrenberg W.B., Sikonenko P.C., Aubert M.L. Growth hormone (GH) deprivation induced by passive immunization against rat GH-releasing factor does not disturb the course of sexual maturation and fertility in the female rat. *Endocrinology* 135 (2): 509-519. 1994.
 - **Gruenewald D.A.**, Marck B.T., Matsumoto A.M. Fasting-induced increases in food intake and neuropeptide Y gene expression are attenuated in aging male brown Norway rats. *Endocrinology* 137 (10): 4460-4467. 1996.
 - **Guang Ren S.**, Malozowski S., Sanchez P., Sweet D., Lynn Loriaux D., Cassorla F. Direct administration of testosterone increases rat tibial epiphyseal growth plate with. *Acta Endocrinol. Copenh.* 121: 401-405. 1989.
 - **Guyton A.C. Hall J.E.** Tratado de Fisiología Médica. Cap. 80. Pp 1109. 1996.
 - **Handelsman D.J.**, Spaliviero J.A., Scott C.D., Baxter R.C. Hormonal regulation of the peripubertal surge of insulin-like growth factor-I in the rat. *Endocrinology* 120 (2): 491-496. 1987.
 - **Hansson L.I.** Daily growth in length of diaphysis measured by oxytetracycline in rabbit normally and after medullary plugging. *Acta Orthop. Scand.* 101 (Suppl.): 34-84. 1967.
 - **Harel Z.**, Tannenbaum G.S. Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone secretion in the rat.

Endocrinology 133 (3): 1035-1043. 1993.

- **Harel Z., Tannenbaum G.S.** Long term alterations in growth hormone and insulin secretion after temporary dietary protein restriction in early life in the rat. *Pediatr. Res.* 38: 747-753. 1995.
- **Hasegawa O., Sigihara H., Minami S., Wakabayashi I.** Masculinization of growth hormone (GH) secretory pattern by dihydrotestosterone is associated with augmentation of hypothalamic somatostatin and GH- releasing hormone mRNA levels in ovariectomized adult rats. *Peptides* 13: 475-481. 1992.
- **Heinrichs C.** Patterns of human growth. *Science.* 268: 442-445. 21 Abril. 1995.
- **Hermanussen M., Geiger-Benoit K., Burmeister J., Sippell W.G.** Catch-up growth following transfer from three times weekly i.m. to daily s.c. administration of hGH in GH deficient patients, monitored by knemometry. *Acta Endocrinológica* 109: 163-168. 1985.
- **Hermanussen M., Geiger-Benoit K., Burmeister J., Sippell W.G.** Can the knemometer shorten the time for growth rate assessment ? *Acta Pædiatr. Scand.* 337 (Suppl): 30-36. 1987.
- **Hermanussen M., Geiger-Benoit K., Burmeister J., Sippell W.G.** Knemometry in childhood: Accuracy and standardization of a new technique of lower leg length measurement. *Annals. Human Biol.* 15 (1): 1-16. 1988a.
- **Hermanussen M., Geiger-Benoit K., Burmeister J., Sippell W.G.** Periodical changes of short term growth velocity ("minigrowth spurts") in human growth. *Annals. Human Biol.* 15 (2): 103-109. 1988b.
- **Hermanussen M., Geiger-Benoit K., Burmeister J., Sippell W.G.** Synchronization of growth hormone therapy. *Acta Pædiatr. Scand.* 343 (Suppl.): 202-207. 1988c.
- **Hermanussen M.** The measurement of short term growth. Auxology 88. Perspectives in the science of growth and development. Ed. J.M. Tanner. Smith-Gordon 1989.
- **Hermanussen M., Bugiel S., Aronson S., Moell C.** A non-invasive technique for the accurate measurement of leg length in animals. *Growth, Develop. & Aging* 56: 129-140. 1992.
- **Hermanussen M., Burmeister J.** Children do not grow continuously but in spurts. *Am. J. Human. Biol.* 5: 615-622. 1993.
- **Hermanussen M.** Short term growth: past, present and future. *British J. Hos. Med.* 53 (3): 65-65. 1995.
- **Hermanussen M., Rol de Lama M.A., Burmeister J., Trésguerres J.A.F.** Mikroknemometry: An accurate technique of growth measurements in rats. *Physiology and Behaviour.* 58 (2): 347-352. 1995.

- **Hermanussen M., Geiger-Benoit K.** No evidence for saltation in human growth. *Ann. Human Biol.* 22 (4): 341-345. 1995.
- **Hermanussen M., Rol de Lama M.A., Pérez-Romero A., Ariznavarreta C., Burmeister J., Tresguerres J.A.F.** Differential catch up in body weight and bone growth after short-term starvation in rats. *Growth Regulation* 6: 230-237. 1996.
- **Hermanussen M., Thiel C., von Büren E., Rol de Lama M.A., Pérez Romero A., Ariznavarreta C., Burmeister J Tresguerres J.A.F.** Makro and mikro perspectives in auxology: Findings and considerations upon the stability of population derived parameters and the variability of short term and individual growth. *Ann. Human. Biol.* 1997a. En prensa.
- **Hermanussen M., Rol de Lama M.A., Pérez Romero A., Ariznavarreta C., Tresguerres J.A.F., Grasedick L., Burmeister J.** Short term growth: evidence for chaotic series of mini growth spurts in rat and human growth. *Physiol. & Behavior.* 1997b. En prensa.
- **Hernández-Rodríguez M.** El patrón de crecimiento humano. Factores que condicionan y regulan el crecimiento. *An. Esp. Pediatr.* 36 (S50): 9-18. 1992.
- **Hizuka N., Katano K., Shizume K., Asakawa K., Miyakawa M., Tanaka I., Horikawa R.** Insulin-like growth factor I stimulates growth in normal growing rats. *Eur. J. Pharmacol.* 125: 143-146. 1986.
- **Hizuka N., Takano K., Asakawa K., Sukegawa I., Horikawa R., Kikuchi H. Shizume K.** Biological action of insulin-like growth factor-I *in vivo*. Basic and Clinical Aspects of growth hormone. Sero Symposia. Ed. B.B. Bercu. Plenum Press. Pp 223-231. 1988.
- **Hock J.M., Gera I., Fonseca J., Raisz L.G.** Human parathyroid hormone-(1-34) increases bone mass in ovariectomized and orchidectomized rats. *Endocrinology* 122 (6): 2899-2904. 1988.
- **Hope W.G., Ibarra M.J., Thomas M.** Testosterone alters duodenal calcium transport and longitudinal bone growth rate in parallel in the male rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200 (4): 536-541. 1992.
- **Hu Z., Friberg R., Barkan A.L.** Ontogeny of GH mRNA and GH secretion in male and female rats: regulation by GH-releasing hormone. *Am. J. Physiol.* 265: E236-E242. 1993.
- **Hughes P.C.R., Tanner J.M.** A longitudinal study of the growth of the black-hooded rat: Methods of measurement and rates of growth for skull, limbs, pelvis, nose-rump and tail lengths. *J. Anat.* 106: 349-370. 1970a.
- **Hughes P.C.R., Tanner J.M.** The assessment of skeletal maturity in the growing rat. *J. Anat.* 106 (2): 371-402. 1970b.

- **Hunziker E.B.**, Wagher J., Zapt J. Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *J. Clin. Invest.* **93**: 1078-1086. 1994.
- **Ikeda A.**, Matsuyama S., Nishihara M., Tojo H., Takahashi M. Changes in endogenous growth hormone secretion and onset of puberty in transgenic rats expressing human growth hormone gene. *Endocrine J.* **41** (5): 523-529. 1994.
- **Isaksson O.G.P.**, Jansson J.O., Gause I.A.M. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* **216**: 1237-1239. 11 Junio. 1982.
- **Isaksson O.G.P.**, Lindahl A., Nilsson A., Isgaard J. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocrine Rev.* **8** (4): 426-438. 1987.
- **Isgaard J.**, Nilsson A., Lindahl A., Jansson J.O., Isaksson O.G.P. Effects of local administration of local administration of GH and IGF I on longitudinal bone growth in rats. *Am J. Physiol.* E367-E372. 1986.
- **Isgaard J.**, Carlsson L., Isaksson O.G.P., Jansson J.O. Pulsatile intravenous growth hormone (GH) infusion to hypophysectomized rats increases insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in skeletal tissues more effectively than continuous GH infusion. *Endocrinology* **123** (6): 2605-2610. 1988.
- **Jansson J. O.**, Albertsson-Wikland K., Edén S., Thorngren K.G., Isaksson O. Effect of frequency of growth hormone administration on longitudinal bone growth and body weight in hypophysectomized rats. *Acta Physiol. Scand.* **114**: 261-265. 1982a.
- **Jansson J.O.**, Albertsson-Wikland K., Edén S., Thorngren K.G., Isaksson O.G.P. Circumstantial evidence for a role of the secretory pattern of growth hormone in the control of body growth. *Acta Endocrinol.* **99**: 24-30. 1982b.
- **Jansson J.O.**, Edén S, Isaksson O. Sites of action of testosterone and estradiol on longitudinal bone growth. *Am. J. Physiol.* **244**: E135- E140. 1983.
- **Jansson J. O.**, Ekberg S., Isaksson O.G.P. Edén S. Influence of gonadal steroids on age- and sex- related secretory patterns of growth hormone in the rat. *Endocrinology* **114** (4): 1287-1294. 1984.
- **Jansson J.O.**, Ekberg S., Isaksson O., Mode A., Gustafsson J. Imprinting of growth hormone secretion, body growth, and hepatic steroid metabolism by neonatal testosterone. *Endocrinology* **117** (5): 1881-1889. 1985a.
- **Jansson J. O.**, Edén S., Isaksson O. Sexual dimorphism in the control of growth secretion. *Endocrine Rev.* **6** (2): 128-150. 1985b.
- **Jansson J.O.**, Frohman L. Differential effects of neonatal and adult androgen exposure on the growth hormone secretory pattern in male rats. *Endocrinology* **120** (4): 1551-1557. 1987a.
- **Jansson J.O.**, Frohman L. Inhibitory effect of the ovaries on neonatal androgen

- imprinting of Growth Hormone secretion in female rats. *Endocrinology* 121 (4): 1417-1423. 1987b.
- **Jennes L., Stumpf W., Bissette G., Nemeroff C.B.** Monosodium glutamate lesions in rat hypothalamus studied by immunohistochemistry for gonadotropin releasing hormone, neurotensin, tyrosine hydroxylase, and glutamic acid decarboxylase and by autoradiography for (³H) estradiol. *Brain Res.* 308: 245-253. 1984.
 - **Jones J.I., Clemmons D.R** Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Rev.* 16 (1): 3-34. 1995.
 - **Jørgensen P.H., Bak B., Andreassen T.T** Mechanical properties and biochemical composition of rat cortical femur and tibia after long-term treatment with biosynthetic human growth hormone. *Bone* 12: 353-359. 1991.
 - **Joss E.E., Zuppinger K.A., Sobel E.H.** Effect of testosterone propionate and methyl testosterone on growth and skeletal maturation in rats. *Endocrinology* 72: 123-130. 1962.
 - **Katakami H., Kato Y., Matsushita N., Imura H.** Effects of neonatal treatment with monosodium glutamate on growth hormone release induced by clonidine and prostaglandin E₁ in conscious male rats. *Neuroendocrinology* 38: 1-5. 1984.
 - **Kember N.F.** Cell kinetics and the control of bone growth. *Acta Paediatr.* 391 (Suppl.): 61-65. 1993.
 - **Ketelslegers J.M., Maiter D., Underwood L.E., Thissen J.E.** Nutritional regulation of the growth hormone and insulin-like growth factor-binding proteins. *Horm. Res.* 45: 252-257. 1996.
 - **Klein K.O., Munson P.J., Bacher J.D., Cutler Jr. G.B., Baron J.** Linear growth in the rabbit is continuous, not saltatory. *Endocrinology* 134 (3): 1317-1320. 1994.
 - **Klindt J., Ford J.J., MacDonald G.J.** Synergism of testosterone propionate with growth hormone in promoting growth of hypophysectomized rats: effect of sexual differentiation. *J. Endocrinol.* 127: 249-256. 1990.
 - **Kochakian C.D., Moe J.E., Dolphin J.** Protein anabolic effect of testosterone propionate in adrenalectomized and normal rats. *Am J. Physiol.* 162: 581-588. 1950.
 - **Kovács M., Fánicsik A., Mezö I., Teplán I., Flerkó B.** Effects of continuous and repetitive administration of a potent analog of GH-RH(1-30)NH₂ on the GH release in rats. *Neuroendocrinology* 59: 371-379. 1994.
 - **Kovács M., Fánicsik A., Hrabovsky E., Mezö I., Teplán I., Flerkó B.** Effects of continuous and repetitive administration of a potent analog of GH-RH(1-30)NH₂ on the GH release in rats treated with monosodium glutamate. *J. Neuroendocrinol.* 7: 703-712. 1995.
 - **Kovács M., Halmos G., Groot K., Izdebski J., Schally A.V.** Chronic administration of

- a new potent agonist of growth hormone-releasing hormone induces compensatory linear growth in growth hormone-deficient rats: Mechanism of action. *Neuroendocrinology* 64: 169-176. 1996.
- **Kubota A.**, Nakagawa Y., Igarashi Y. Studies on gene expression in liver of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3 and growth hormone (GH) receptor/GH binding protein in rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Horm. Metab. Res.* 26: 497-503. 1994.
 - **Lago F.**, Señaris R.M., Emson P.C., Domínguez F., Diéguez C. Evidence for the involvement of non-androgenic factors in the regulation of hypothalamic somatostatin and GHRH mRNA levels. *Mol. Brain Res.* 35: 220-226. 1996.
 - **Lampl M.**, Veldhuis J.D., Johnson M.L. Saltation and stasis: A model of human growth. *Science* 258: 801-802. 30 Oct. 1992.
 - **Lampl M.**, Cameron N., Veldhuis J.D., Jhonsson M.L. En respuesta a Heinrichs C. Patterns of human growth. *Science* 268: 445-447. 21 Abril. 1995.
 - **Lanz J.K.**, Donahoe M., Rogers R.M., Ontell M. Effects of growth hormone on diaphragmatic recovery from malnutrition. *J. Appl. Physiol.* 73 Sep (3): 801-805. 1992.
 - **Lanzi R.**, Tannenbaum S.G. Time course and mechanism of growth hormone's negative feedback effect on its own spontaneous release. *Endocrinology* 130 (2): 780-788. 1992.
 - **Leung K.C.**, Rajkovic I.A., Peters E., Markus I., Van Wyk J.J. Ho K.K.Y. Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action *Endocrinology* 137 (7): 2694-2702. 1996.
 - **Lima L.**, Arce V., Tresguerres J.A.F., Devesa J. Clonidine potentiates the growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in norepinephrine synthesis-inhibited rats: Evidence for an alpha-2-adrenergic control of hypothalamic release of somatostatin. *Neuroendocrinology* 57: 1155-1160. 1993.
 - **Loveridge N.**, Farquharson C. Studies on growth plate chondrocytes *in situ*: cell proliferation and differentiation. *Acta Paediatr.* 391 (Suppl.): 42-48. 1993.
 - **Loveridge N.**, Farquharson C., Palmer R., Lobleby G.E., Flint D.J. Growth hormone and longitudinal bone growth *in vivo*: Short-term effect of a growth hormone antiserum. *J. Endocrinol.* 146: 55-62. 1995.
 - **MacDonald M.C.**, Wilkinson M. Peripubertal treatment with N-methyl-d-aspartic acid or neonatally with monosodium glutamate accelerates sexual maturation in female rats, an effect reversed by MK-801. *Neuroendocrinology* 52: 143-149. 1990.
 - **Maes M.**, Maiter D., Thissen J.P., Underwood L.E., Ketelslegers J.M. Contributions

- of growth hormone receptor and postreceptor defects to growth hormone resistance in malnutrition. *Trends Endocrinol. Metab.* 2 (3): 92-97. 1991.
- **Maiter D.M.**, Gabriel S.M., Koenig J. I., Russel E., Martin J.B. Sexual differentiation of growth hormone feedback effects on hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Neuroendocrinology* 51: 174-180. 1990.
 - **Maiter D.**, Koenig J.I., Kaplan L.M. Sexually dimorphic expression of the growth hormone-releasing hormone gene is not mediated by circulating gonadal hormones in the adult rat. *Endocrinology* 128 (4): 1709-1716. 1991a.
 - **Maiter D.**, Underwood L.E., Martin J.B., Koenig J.I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: Effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology* 128 (2): 1100-1106. 1991b.
 - **Malozowski S.**, Parmer T.G., Trojan S., Merriam G.R., Gibori G., Roberts C.T., LeRoith D., Werner H., Zilberstein M. Growth hormone (GH) modulates insulin-like growth factor I (IGF I) and type I IGF receptor mRNA levels in the ovary of prepubertal GH-deficient rats. *Eur. J. Endocrinol.* 132: 497-501. 1995.
 - **Martínez D.A.**, Orth M.W., Carr K.E., Vanderby Jr. R., Vailas A.C. Cortical bone growth and maturational changes in dwarf rats induced by recombinant human growth hormone. *Am. J. Physiol.* E51-E59. 1995.
 - **Maszack G.**, Becker K., Conway S. The development of sexually dimorphic sensitivity to growth hormone (GH) feedback of the clonidine-induced surge in the rat. *Neuroendocrinology* 62: 301-307. 1996.
 - **Michaelsen K.F.**, Skov L, Badsberg J.H., Jørgensen M. Short-term measurement of linear growth in preterm infants: validation of a hand-held knemometer. *Pediatr. Res.* 30: 464-468. 1991.
 - **Michaelsen K.F.** Short-term measurements of linear growth using Knemometry. *J. Pediatr. Endocrinol.* 7 (2): 147-154. 1994.
 - **Millard W.J.**, Martin J.B. Jr., Sagar S.M., Martin J.B. Evidence that reduced growth hormone secretion observed in monosodium glutamate-treated rats is the result of a deficiency in growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* 110 (2): 540-549. 1982.
 - **Moreno B.**, Bretón I., E. Vallejo, Moreno F.J., Moreneo S. Valoración del crecimiento y desarrollo: auxología, auxometría y maduración. En Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 85. 1996.
 - **Mosier H.D. Jr.**, **Jansons R.A.** Growth hormone during catch-up growth and failure of catch-up growth in rats. *Endocrinology* 98 (1): 214-219. 1975.
 - **Mosier H.D. Jr.**, Dearden L.C., Jansons R.A., Hill R.R. Cartilage sulfatation during

- catch-up growth after fasting in rats. *Endocrinology* **102** (2): 386-392. 1978.
- **Mosier H.D. Jr.** The control of catch-up growth. *Acta Endocrinol. Copenh.* **279** (Suppl.): 1-7. 1986.
 - **Mosier H.D.** The determinants of catch-up growth. *Acta Paediatr. Scand.* **367** (Suppl.): 126-129. 1990.
 - **Negro-Vilar A.,** Ching M., Culler M., Jhonston C., Valença M. New concepts in the physiology of LHRH and its role in pulsatile gonadotropin secretion. En andrology and human reproduction. Serono symposia. Raven Press. Vol. 47. 1988.
 - **Nemeroff C.B.,** Lamartinieri C.A., Mason G.A., Squibb R.E., Hong J.S., Bondy S.C. Marked reduction in gonadals steroid hormone levels in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate: Further evidence for disruption of hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation. *Neuroendocrinology* **33**: 265-267. 1981.
 - **Nilsson A.,** Ohlsson C., Isaksson O.G.P., Lindahl A., Isgaard J. Hormonal regulation of longitudinal bone growth. *Eur. J. Cli. Nutr.* **48** (Suppl. 1): S150-S160. 1994.
 - **Nogami H.,** Watanabe T., Kobayashi S. IGF-I and IGF-binding protein gene expressions in spontaneous dwarf rat. *Am. J. Physiol.* **267** (3 Pt. 1): E396-401. 1994.
 - **Nyberg F.,** Burman P. Growth hormone and its receptors in the central nervous system-location and functional significance. *Horm. Res.* **45**: 18-22. 1996.
 - **Ogawa E.,** Breier B.H., Bauer M.K., Gallaher B.W., Grant P.A., Walton P.E., Owens J.A., Gluckman P.D. Pretreatment with bovine growth hormone is as effective as treatment during catabolic stress to reduce catabolism in fasted lambs. *Endocrinology* **137** (4): 1242-1248. 1996.
 - **Ohashi S.,** Kaji H., Abe H., Chihara K. Effect of fasting and growth hormone (GH) administration on GH receptor (GHR) messenger ribonucleic acid (mRNA) and GH-binding protein (GHBP) mRNA levels in male rats. *Life Science* **58** (18): 1655-1666. 1995.
 - **Ohlsson C.,** Nilsson A., Isaksson O., Lindahl A. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on DNA synthesis and matrix production in rat epiphyseal chondrocytes in monolayer culture. *J. Endocrinol.* **133**: 291-300. 1992a.
 - **Ohlsson C.,** Nilsson A., Isaksson O., Lindahl A. Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9826-9830. 1992b.
 - **Ohlsson C.,** Isgaard J., Törnell J., Nilsson A., Isaksson O.G.P., Lindahl A. Endocrine regulation of longitudinal bone growth. *Acta Paediatr.* **391** (Suppl): 33-40. 1993.
 - **Ohlsson C.,** Isaksson O., Lindahl A. Clonal analysis if rat tibia growth plate chondrocytes in suspension culture-differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I. *Growth regulation* **4**: 1-7. 1994.

- **Ohyama T.**, Sato M., Wad Y., Takahara J. Diverse effects on the hypothalamic pituitary axis in rat growth hormone secretion. *Endocrine J.* **43 (Suppl.): S115-S117.** 1996.
- **Okada K.**, Suzuki N., Sugihara H., Minami S., Wakabayashi I. Restoration of growth hormone secretion in prolonged food-deprived rats depends on the level of nutritional intake and dietary protein. *Neuroendocrinology* **59: 380-386.** 1994.
- **Orea M.A.** Genética del crecimiento. En Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 127. 1996.
- **Ørtoft G.**, Oxlund H., Jørgensen P.H., Andreassen T.T. Glucocorticoid treatment and food deprivation counteract the stimulating effect of growth hormone on rat cortical bone strength. *Acta Pædiatr.* **81: 912-917.** 1992.
- **Oster M.H.**, Levin N., Fielder P.J. Robinson I.C.A.F. Baxter R.C., Cronin M.J. Developmental differences in the IGF-I system response to severe and chronic calorie malnutrition. *Am. J. Physiol.* **270 (4 Pt 1): E646-E653.** 1996.
- **Painson J.C.**, **Tannenbaum G.S.** Sexual dimorphism of somatostatin and growth hormone-releasing factor signaling in the control of pulsatile growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **128: 2858-2866.** 1991.
- **Painson J.C.**, Thorner M.O., Krieg R.J., Tannenbaum G.S. Short term adult exposure to estradiol feminizes the male pattern of spontaneous and growth hormone-releasing factor-stimulated growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **130 (1): 511-519.** 1992.
- **Palmer R.M.**, Loveridge N., Thomson B.M., Mackie S.C., Tonner E., Flint D.J. Effects of a polyclonal antiserum to rat growth hormone on circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein concentrations and the growth of muscle and bone. *J. Endocrinol.* **142: 85-91.** 1994.
- **Pellegrini E.**, Bluet-Pajot M.T., Mounier F., Bennet P., Kordon C., Epelbaum J. Central administration of a growth hormone (GH) receptor mRNA antisense increases GH pulsatility and decreases hypothalamic somatostatin expression in rats. *J. Neuroscience* **16 (24): 8140-8148.** 1996.
- **Peñalva A.**, Mallo F., Coya R., Lago F., Carballo A., Soto J.L., Casanueva F.F., Diéguez C. Control peptidérgico de la secreción de hormona de crecimiento. *Endocrinología* **41 (Suppl. 2): 9-16.** 1994.
- **Phillips L.S.**, **Young H.** Nutrition and somatomedin I. Effect of fasting and refeeding on serum somatomedin activity and cartilage growth activity in rats. *Endocrinology* **99 (1): 304-314.** 1975.
- **Phillips L.S.** Nutrition, metabolism and growth. En Current Endocrinology: Endocrine control of growth. Elviesier Science Publishers. Nueva York. 1981.

- **Pinilla L.** Maduración postnatal de los mecanismos de control de la secreción de FSH, LH y prolactina en la rata. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 1983.
- **Plotsky P.M., Vale W.** Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophyseal-portal circulation of the rat. *Science* **230**: 461-463. 1985.
- **Poirier J.** Cuadernos de histología. Ed. Marban. Librería Médica. Tomo 1. 1985.
- **Prieto S.** Fisiología del hueso en Fisiología Humana. Interamericana-Macgraw Hill. Pp 1039. 1996.
- Recommendations from the 3rd International Symposium on Insulin-Like Growth Factors. "Valid measurements of total IGF concentrations in Biological Fluids". *Endocrinology* **136** (2): 816-817. 1995.
- **Redding T.W., Schally A.V., Arimura A., Wakabayashi Y.** Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology* **8**: 245-255. 1971.
- **Reina G., Rubinacci A., Moro G.L., Pecile A.** Time-relationship between bone growth and increment of bone mineral content in growing rats. *Minerva Endocrinol.* **20**: 211-216. 1995.
- **Robinson I.C.A.F., Clark R.G.** The secretory pattern of GH and its significance for growth in the rat. Growth Hormone: Basic and clinical aspects. Elviesier Science Pub. Pp 109-127. 1987.
- **Rodríguez-Arno J., Gómez-Pan A.** Glucocorticoides y crecimiento. En Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 187. 1996.
- **Rodríguez-Hierro F., Torres M.** El crecimiento: Bases fisiopatológicas. En Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 15. 1996.
- **Rogers K.V., Vician L., Steiner A., Clifton D.K.** The effect of hypophysectomy and growth hormone administration on pre-prosomatostatin messenger ribonucleic acid in the periventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Endocrinology* **122** (4): 586-590. 1988.
- **Rol de Lama M.A., Pérez Romero A., Ariznavarreta C., Hermanussen M., Tresguerres J.A.F.** Periodic growth in rats. *Ann. Human. Biol.* 1997. En prensa.
- **Roupas P., Herington A.** Postreceptor signaling mechanism for growth hormone. *Trends. Endocrinol. Metab.* **5**: 154-158. 1994.
- **Rubinstein H.S., Solomon M.L.** The growth stimulating effect of small doses of testosterone propionate in the castrated albino rat. *Endocrinology* **28**: 229-231. 1941.
- **Saggese G., Federico G., Cinquanta.** In vitro effects growth hormone and other hormones on chondrocytes and osteoblast-like cells. *Acta Pædiatr.* **391** (Suppl.): 54-59. 1993.
- **Saggese G., Pasquino A.M., Bertelloni S., Baroncelli G.I., Battini R., Pucarelli Y.,**

- Franchi G. Effect of combined treatment with gonadotropin releasing hormone analogue and growth hormone in patients with central precocious puberty who had subnormal growth velocity and impaired height prognosis. *Acta Pædiatr.* **84**: 299-304. 1995.
- **Sato M., Frohman L.A.** Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology* **133** (2): 793-799. 1993.
 - **Scanlon M.F., Issa B.G., Dieguez C.** Regulation of growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* **46**: 149-154. 1996.
 - **Scow O.S., Hagan S.N.** Effect of testosterone propionate and growth hormone on growth and chemical composition of muscle and other tissues in hypophysectomized male rats. *Endocrinology* **77** (5): 852-862. 1965.
 - **Schlechter N.L., Russel S.M., Greeberg S., Spencer R.M., Nicoll C.S.** A direct effect of growth hormone in rats hindlimb shown by arterial infusion. *Am. J. Physiol.* **E231-E235**. 1986.
 - **Schot L.P.C., Schuurs H.W.M.** Pathophysiology of bone loss in castrated animals. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **37** (3): 461-465. 1990.
 - **Shoutens A., Verhas M., L'Hermite-Baleriaux M., L'Hermite M., Verschaeren A., Dourov N., Mone M., Heilporn A., Tricot A.** Growth and bone haemodynamic responses to castration in male rats. Reversibility by testosterone. *Acta Endocrinologica* **107**: 428-432. 1984.
 - **Shulman D.I., Sweetland M., Duckett G., Root A.W.** Effect of estrogen on the growth hormone (GH) secretory response to GH-releasing factor in the castrate adult female rat *in vivo*. *Endocrinology* **120** (3): 1047-1051. 1987.
 - **Simmons D.J., Menton D.N., Russel J.E., Smith R., Walker W.V.** Bone cell populations and histomorphometric correlates to function. *Anat. Rec.* **222**: 228-236. 1988.
 - **Slama A., Bluet-Pajot M.T., Monier F., Videau C., Kordon C., Epelbaum J.** 125I-somatostatin-labelled cells in the anterior arcuate nucleus mediate somatostatin effects on growth hormone but not prolactin secretion. *Neuroendocrinology* **58**: 178-184. 1993.
 - **Slama A., Bluet-Pajot M.T., Mounier F., Videau C., Kordon C., Epelbaum J.** Effects of neonatal administration of octreotide, a long lasting analogue, on growth hormone regulation in the adult rat. *Neuroendocrinology* **63**: 173-180. 1996.
 - **Somana R., Visessuwan S., Samridtong A., Holland R.C.** Effect of neonatal androgen treatment and orchidectomy on pituitary levels of growth hormone in the

- rat. *J. Endocrinol.* **79**: 399-400. 1978.
- **Spagnoli A., Rosenfeld R.G.** The mechanism by which growth hormone brings about growth. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **25** (3): 615-631. 1996.
 - **Spencer G.S.G. Hallet K.G.** Somatostatin analogue stimulates growth in rats. *Life Science* **37**: 27-30. 1985.
 - **Stevenson S., Hunziker E.B., Herrmann W., Schenk R.K.** Is longitudinal bone growth influenced by diurnal variation in the mitotic activity of chondrocytes of the growth plate?. *J. Orthop. Research.* **8**: 132-135. 1990.
 - **Steward C.E.H., Rotwein P.** Growth, differentiation, and survival: Multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.* **76** (4): 1005-1026. 1996.
 - **Straus D.S.** Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. *FASEB J.* **8**: 6-12. 1994.
 - **Sugihara H., Minami S., Okada K., Kamegai J., Hasegawa O., Wakabayashi I.** Somatostatin reduces transcription of the hormone gene in rats. *Endocrinology* **132** (3): 1225-1229. 1993.
 - **Tannenbaum G.S., Rorstad O., Brazeau P.** Effects of prolonged food deprivation on the ultradian growth hormone rhythm and immunoreactive somatostatin tissue levels in the rat. *Endocrinology* **104** (6): 1733-1738. 1979.
 - **Tannenbaum G.S., Painson J.C., Lengyel M.J., Brazeau P.** Paradoxical enhancement of pituitary growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing factor in the face of high somatostatin tone. *Endocrinology* **124** (3): 1380-1388. 1989.
 - **Tanner J.M., Whitehouse R.H., Cameron, Marshall W.A., Healy M.J.R., Golstein H.** Valoración de la maduración esquelética y predicción de la talla adulta (Método TW2). 2ª Ed. Editorial Ancora S.A. 1988.
 - **Tawa N.E. Jr, Golberg A.L.** Suppression of muscle protein turnover and aminoacid degradation by dietary protein deficiency. *Am. J. Physiol.* **263** (2 Pt. 1): E317-E325. 1992.
 - **Terry L.C., Epelbaum J., Martin J.B.** Monosodium glutamate: Acute and chronic effects on rhythmic growth hormone and prolactine secretion, and somatostatin in the undisturbed male rat. *Brain Res.* **217**: 129-142. 1981.
 - **Thissen J.P., Underwood L.E, Maiter D., Maes M., Clemmons D.R., Ketelslegers J.M.** Failure of insulin-like growth factor-I (IGF I) infusion to promote growth in protein-restricted rats despite normalization of serum IGF-I concentration. *Endocrinology* **128** (2): 885-890. 1991.
 - **Thissen J.P., Ketelslegers J.M., Underwood L.E.** Nutritional regulation of the

- insulin-like growth factors. *Endocrine Rev.* 15 (1): 80-101. 1994.
- **Tirapegui J.O.,** Yahya Z.A.H., Bates P.C., Millward D.J. Dietary energy, glucocorticoids and the regulation of long bone growth in the rat. *Clin. Science* 87: 599-606. 1994.
 - **Togo M, Togo T.** Time series analysis of stature and body weight in five siblings. *Ann. Hum. Biol.* 9: 425-440. 1982.
 - **Tokuyama K., Himms-Hagen J.** Brown adipose tissue thermogenesis, torpor, and obesity of glutamate-treated mice. *Am. J. Physiol.* 251: E407-E415. 1986.
 - **Tresguerres J.A.F.** Fisiología Humana. Interamericana-Macgraw Hill. 1992.
 - **Tresguerres J.A.F,** Rol de Lama M.A., Pérez-Romero A., Granados B., Hermanussen M., Ariznavarreta C. El crecimiento como fenómeno oscilatorio. *Anales de la Real Academia de Medicina. Tomo CXI. Cuaderno cuarto.* 1994.
 - **Tresguerres J.A.F,** Pérez-Romero A., Rol de Lama M.A., Granados B., Hermanussen M., Ariznavarreta C. Minigrowth spurts: Influence of sexual hormones and GH. *Frontiers in Endocrinology. Vol. 10. Puberty: Basic and clinical aspects.* 1995.
 - **Tresguerres J.A.F.** Crecimiento y pubertad. En Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 179. 1996a
 - **Tresguerres J.A.F.** Somatomedinas (IGFs) y sus proteínas transportadoras. En Retrasos del crecimiento. Ed. Díaz de Santos. 2ª Ed. Madrid. Pp 61. 1996b.
 - **Tuner R.T.** Effects of short-term spaceflight and recombinant human growth hormone (rhGH) on bone growth in young rats. *Aviat. Space Environm. Med.* 66 (8): 763-769. 1995.
 - **Turner J.P., Tannenbaum G.S.** *In vivo* evidence of a positive role for somatostatin to optimize pulsatile growth hormone secretion. *Am. J. Physiol:* E683-E690. 1995.
 - **Tzanela M.,** Guyda H., Van Vliet G., Tannenbaum G. Somatostatin pretreatment enhances growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone: a potential new diagnostic approach to GH deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 2487-2494. 1996.
 - **Valk I.M.,** Langhout Chabloz A.M.E., Smals A.G.H., Kloppenborg P.W.C., Cassorla F.G., Schutte E.A.S.T. Accurate measurement of the lower leg length and the ulnar length and its application in short term growth measurements. *Growth* 47: 53-66. 1983a.
 - **Valk I.M.,** Langhout Chabloz A.M.E., Van Gilst W. Intradaily variation of the human lower leg length and short term growth- a longitudinal study in 14 children. *Growth* 47: 397-402. 1983b.
 - **Vaticón M.D.** Diferenciación sexual del cerebro. En Hormonas, Instintos y

- Emociones. Ed. Complutense. Madrid. Pp: 59- 70. 1996.
- **Vaticón M.D., Álvarez B.** Diferenciación sexual del cerebro. En Varones y Mujeres. Psicología Pirámide. Pp. 89-97. 1996.
 - **Vaticón M.D.,** Fernández-Galaz M.C., Tejero A., Aguilar E. Alteration of prolactin control in adult rats treated neonatally with sex steroids. *J. Endocrinol.* **105:** 429-433. 1985.
 - **Villanúa M.A.,** Debelkuk L., Ghosh P.K., Bartke A. Effects of neonatal administration of monosodium glutamate and castration on neurokinin A levels in the hypothalamus and anterior pituitary of rats. *Peptides.* **13:** 377-381. 1992.
 - **Wakabayashi Y.,** Hatano H., Minami S., Tonegawa Y., Akira S., Sugihara H., Ling N.C. Effects of neonatal administration of monosodium glutamate on plasma growth hormone (GH) response to GH-releasing factor in adult male and female rats. *Brain Res.* **372:** 361-365. 1986.
 - **Wales J.K.H.,** Milner R.D.G. Knemometry in assessment of linear growth. *Arch. Dis. Child.* **62:** 166-171. 1987.
 - **Wales J.K.H.** Short term growth phenomena in children. *Br. J. Hosp. Medicine* **52:** 134-135. 1994.
 - **Walker K.V.R.,** Kember N.F. Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. II Measurements during ageing. *Cell Tissue Kinet.* **5:** 409-419. 1972a.
 - **Walker K.V.R.,** Kember N.F. Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. I Measurements in young male rats. *Cell Tissue Kinet.* **5:** 401-408. 1972b.
 - **Wehrenberg W.B.,** Bloch B., Phillips B.J. Antibodies to growth hormone-releasing factor inhibit somatic growth. *Endocrinology* **115 (3):** 1218-1220. 1984.
 - **Wehrenberg W.B.** Continuous infusion of growth hormone-releasing factor: Effects on pulsatile growth hormone secretion in normal rats. *Neuroendocrinology* **43:** 391-396. 1986.
 - **Wehrenberg W.B.,** Giustina A. Basic Counterpoint: Mechanisms and pathways of gonadal steroid modulation of growth hormone secretion. *Endocrine Rev.* **13 (2):** 299-308. 1992.
 - **Whalen R.E.,** Edwards D.A. Effects of the antiandrogen Ciproterone acetate on mating behaviour and seminal vesicle tissue in male rats. *Endocrinology* **84:**115. 1969.
 - **Wilsman N.J.,** Farnum C.E., Green E.M., Lieferman E.M., Clyton M. Cell cycle analysis of proliferative chondrocytes in growth plates elongating at different rates. *J. Orthp. Research.* **14:** 562-572. 1996.
 - **Wilson M.E.,** Tanner J.M. Somatostatin analog treatment slows growth and the tempo of reproductive maturation in female rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol.*

- Metab. 79 (2): 495-501. 1994.*
- **Wit J.M.**, van Kalsbeek E.J., van Wijk-Hoek J.M., Leppink G.J. Assessment of the usefulness of weekly knemometric measurements in growth studies. *Acta Pædiatr. Scand. 76: 974-980. 1987.*
 - **Wolthers O.D.** Knemometry in the assessment of systemic activity of exogenous glucocorticosteroids in children with asthma and rhinitis. *FADL Publishers. Copenhagen-Arhus-Odense. 1996.*
 - **Woodward C.J.H.** A re-evaluation of the anabolic effect of testosterone in rats: Interactions with gonadectomy, adrenalectomy and hypophysectomy. *Acta Endocrinológica 128: 473-477. 1993.*
 - **Yahya Z.A.H.**, Bates P.C., Millward D.J. Responses to protein deficiency of plasma and tissue insulin like growth factor-I levels and proteoglycan synthesis rates in rat skeletal muscle and bone. *J. Endocrinol. 127: 497-503. 1990.*
 - **Yahya Z.A.H.**, Millward D.J. Dietary protein and the regulation of long-bone and muscle growth in the rat. *Clin. Sci. 87: 213-224. 1994.*
 - **Yahya Z.A.H.**, Tirapegui J.O., Bates P.C., Millward D.J. Influence of dietary protein, energy and corticosteroids on protein turnover, proteoglycan sulphation and growth of long bone and skeletal muscle in the rat. *Clin. Science 87: 607-618. 1994.*
 - **Zegher F.**, Heinrichs C., Thiry G., Du Caju M.V.L., De Schepper J., Craen M., Chanoine J.P., Doms L., Malvaux P. High dose growth hormone therapy for short children born small for gestational age. *Acta Pædiatr. 399 (Suppl.): 77. 1994.*
 - **Zeitler P.**, Argente J., Chowen J.A., Clifton D.K., Steiner R.A. Growth hormone-releasing hormone messenger ribonucleic acid in the hypothalamus of the adult male rat is increased by testosterone. *Endocrinology 127 (3): 1362-1368. 1990.*
 - **Zeitler P.**, Tannenbaum G., Clifton D.K., Steiner R.A. Ultradian oscillations in somatostatin and growth hormone-releasing hormone mRNAs in the brains of adult male rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 8920-8924. 1991.*
 - **Zhao X.**, Unterman T.G., Donovan S.M. Human growth hormone but not human insulin-like growth factor I enhances recovery from neonatal malnutrition. *J. Nutrition 125 (5): 1316-1327. 1995.*
 - **Ziegler T.R.**, Almahfouz A., Pedrini M.T., Smith R.J. A comparison of rat small intestinal insulin and insulin-like growth factor I receptors during fasting and refeeding. *Endocrinology 136 (11): 5148-5154. 1995.*