

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**REGULACIÓN DEL SISTEMA SOMATOTRÓPICO DE LA DORADA
(*Sparus aurata*). EFECTO DE LA EDAD, LA ALIMENTACIÓN Y LAS
VARIACIONES ESTACIONALES.**

Memoria presentada por
Hilario Martí Palanca
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas



Valencia, Abril de 1996

UMI Number: U607679

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607679

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

• Biològics

Nº Registre: 9118

DATA: 21.6.96

SIGNATURA

405.T.D

Nº LIBIS: j20496205


30 ms.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL
SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE FISIOLÓGÍA ANIMAL

REGULACIÓN DEL SISTEMA SOMATOTRÓPICO
DE LA DORADA (*Sparus aurata*).
EFFECTO DE LA EDAD, LA ALIMENTACIÓN Y LAS VARIACIONES
ESTACIONALES.

Memoria presentada por D. Hilario Martí Palanca para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas



Fdo.: Hilario Martí Palanca

Valencia, Abril de 1996

LA PRESENTE TESIS DOCTORAL HA SIDO DIRIGIDA POR EL DOCTOR
JAUME PÉREZ SÁNCHEZ, COLABORADOR CIENTÍFICO DEL INSTITUTO DE
ACUICULTURA DE TORRE DE LA SAL (CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS), Y CUMPLE TODOS LOS REQUISITOS
EXIGIDOS POR LA LEGISLACIÓN VIGENTE.



Fdo.: Jaume Pérez Sánchez

**A mi familia: mis padres Hilario y Concepción;
mis hermanos Inma, Belén, Baltasar y Carolina;
y mi abuela Concha.**

AGRADECIMIENTOS

A la hora de recordar a todas aquellas personas que han colaborado en la elaboración de un trabajo tan largo y laborioso como una Tesis, siempre existe el temor de olvidar a alguien. No obstante, siempre se puede afirmar con total seguridad que aunque no estén todos los que son, sí son todos los que están.

Para comenzar quisiera agradecer al Dr. Jaume Pérez Sánchez la confianza depositada en mí desde el principio. El haber podido trabajar con él, codo con codo, ha sido sin lugar a dudas un verdadero lujo. Su constante seguimiento e inestimable ayuda han hecho posible que este trabajo sea una realidad.

Me gustaría también ofrecer mi mayor gratitud por la colaboración prestada al grupo del Dr. Kaushik del *Laboratoire de Nutrition des Poissons* (IFREMER-INRA) y al del Dr. Manuel Valdivia de la Facultad de Ciencias (Universidad de Cádiz), muy especialmente a los doctores Juan Pedro Martínez y Carlos Pendón.

De igual modo agradezco la colaboración al Departamento de Medicina Nuclear del Hospital Provincial de Castellón y a todos sus componentes, por ceder de forma desinteresada sus instalaciones para llevar a cabo los diferentes marcajes radioactivos.

Por otro lado quiero hacer una mención especial al Dr. Francisco Amat Domenech, actual Director del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. Además de brindarme la oportunidad de emprender este proyecto, me dio toda la confianza y el apoyo necesarios para llevarlo a cabo.

Agradecimientos

También deseo agradecer la ayuda desinteresada a los doctores Juan Carlos Navarro, Ariadna Sitjà, Francisco Hontoria y Pilar Álvarez. A mis compañeros José Miguel Cerdá, Concha Ríos, Ximo Canales, Manolo Redón, Oswaldo Palenzuela, Alicia Felip, Lucinda Rodríguez, Johnny Asturiano y a los doctores Mercedes Blázquez, Inma Varó, Evaristo Mañanós, Joan Cerdá, Francisco Prat, Sergio Mestre y Gonzalo Martínez. Muy especialmente, a la gente que ha compartido piso conmigo, Chema, Happy y Carlos (protagonistas estelares de un sinfín de historias para no dormir), y a mi compañero de equipo, Josep Alvar, con quien he compartido durante estos últimos años las alegrías y sinsabores de un trabajo tan duro y apasionante como éste.

No quiero olvidar al resto de equipos de investigación, ni a los componentes de los diferentes servicios que componen el IATS (animalario, química, histología, biblioteca, secretaría, vigilancia, mantenimiento y limpieza), pues me han sido de gran ayuda en infinidad de ocasiones.

Por último, quisiera expresar mi más sincero reconocimiento a toda mi familia y amigos de toda la vida, por su estímulo, apoyo y comprensión durante todo este tiempo, y especialmente, durante los momentos más difíciles.

Gracias a todos por todo.

Índice

1. CONTROL ENDOCRINO DEL CRECIMIENTO EN VERTEBRADOS E INVERTEBRADOS

1.1. DEFINICIÓN DEL TÉRMINO HORMONA.....5

1.2. CONTROL HORMONAL DEL CRECIMIENTO EN INVERTEBRADOS

1.2.1. Invertebrados no Artrópodos.....7

1.2.2. Artrópodos.....8

1.3. CONTROL HORMONAL DEL CRECIMIENTO EN VERTEBRADOS

1.3.1. Hipófisis y crecimiento.....13

1.3.2. Características de la familia GH/PRL.....14

1.3.3. Especificidad de la GH.....17

1.3.4. Control de la secreción de GH

1.3.4.1. Eje hipotalámico-hipofisario.....20

1.3.4.2. Control hipotalámico: GHRH, SS y TRH.....22

1.3.4.3. Neurotransmisores.....25

1.3.4.4. Esteroides sexuales.....26

1.3.4.5. Glucocorticoides y hormonas tiroideas.....28

1.3.4.6. Factores abióticos.....29

1.3.4.7. Retroalimentación.....30

1.3.5. Interacción GH-Receptor	
1.3.5.1. Generalidades.....	34
1.3.5.2. IGFs.....	38
1.3.6. GH y sistema inmune.....	45
2. OBJETIVOS	
2.1. ESPECIE EN ESTUDIO. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS.....	49
3. RECEPTORES HEPÁTICOS DE GH Y ACTIVIDAD SOMATOMEDÍNICA. EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACIÓN	
3.1. INTRODUCCIÓN.....	57
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.2.1. Hormonas.....	59
3.2.2. Iodación.....	61
3.2.3. Procesado de membranas y ensayo de radiorreceptores.....	64
3.2.4. Desaturación de los receptores.....	69
3.2.5. Cromatografía de filtración ácida.....	72

3.2.6. Extracción ácida de IGFs en Sephadex CM-25.....	73
3.2.7. Radioinmunoensayo de IGF-I.....	75
3.2.8. Ayuno.....	78
3.2.9. Análisis estadístico.....	79

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Caracterización del receptor	
3.3.1.1. Cinética.....	80
3.3.1.2. Saturación de la hormona.....	82
3.3.1.3. Receptores de GH en diferentes tejidos de la dorada.....	82
3.3.1.4. Saturación de membranas (<i>Scatchard</i>).....	85
3.3.1.5. Especificidad.....	88
3.3.2. Radioinmunoensayo de IGF-I.....	90
3.3.3. Ayuno.....	93

3.4. DISCUSIÓN.....	95
---------------------	----

4. ONTOGENIA DEL SISTEMA SOMATOTRÓPICO. PRESENCIA/ÉXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE GH DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO DE LA DORADA

4.1. INTRODUCCIÓN.....107

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Cultivo y muestreo de larvas.....110
4.2.2. Hormonas.....112
4.2.3. Procesado de membranas y ensayo de radiorreceptores.....112
4.2.4. Actividad de la GH larvaria.....113
4.2.5. Análisis estadístico.....113

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Unión específica del trazador en cabezas y cuerpos de larvas.....114
4.3.2. Degradación del trazador.....116
4.3.3. Saturación de membranas (*Scatchard*).....118
4.3.4. Especificidad del receptor.....121
4.3.5. GH larvaria.....121

4.4. DISCUSIÓN.....124

5. CAMBIOS ESTACIONALES EN LOS NIVELES CIRCULANTES DE GH, RECEPTORES HEPÁTICOS DE GH Y ACTIVIDAD SOMATOMEDÍNICA DEL PLASMA

5.1. INTRODUCCIÓN.....133

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Experimento I: Crecimiento estacional.....135

5.2.2. Experimento II: Tratamiento con GH.....137

5.2.3. Radioinmunoensayo de GH.....138

5.2.4. Ensayo de radiorreceptores de GH.....140

5.2.5. Radioinmunoensayo de IGF-I.....140

5.2.6. Análisis estadístico.....140

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Experimento I.....141

5.3.2. Experimento II.....146

5.4. DISCUSIÓN.....149

6. EFECTO DE LA RACIÓN Y DEL NIVEL PROTEICO DE LA DIETA SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL SISTEMA SOMATOTRÓPICO

6.1. INTRODUCCIÓN.....159

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1. Animales.....161

6.2.2. Experimento I: Niveles de proteína en la dieta.....161

6.2.3. Experimento II: Ración.....166

6.2.4. Radioinmunoensayo de GH e IGF-I.....166

6.2.5. Ensayo de radiorreceptores de GH.....167

6.2.6. Análisis estadístico.....167

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Experimento I: Niveles de proteína en la dieta.....168

6.3.2. Experimento II: Ración.....172

6.4. DISCUSIÓN.....175

7. EFECTO DE LA EDAD Y DEL COCIENTE PROTEÍNA/ENERGÍA EN LOS NIVELES CIRCULANTES DE GH

7.1. INTRODUCCIÓN.....183

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.1. Interacción proteína/energía.....185

7.2.2. Edad.....188

7.2.3. Radioinmunoensayo de GH.....189

7.2.4. Cuantificación del mRNA de GH.....189

7.2.5. Análisis estadístico.....192

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Interacción proteína/energía.....194

7.3.2. Edad y GH.....200

7.4. DISCUSIÓN.....202

8. CONCLUSIONES

8.1. CONCLUSIONES209

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....213

ÍNDICE DE CUADROS.....219

ABREVIATURAS.....223

BIBLIOGRAFÍA.....227

1. Control Endocrino del Crecimiento en Vertebrados e Invertebrados.

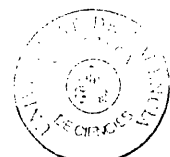


RESUMEN. Este capítulo ofrece una visión global y comparada de los diferentes sistemas endocrinos relacionados con el crecimiento animal. Tras recorrer brevemente algunos de los grupos más representativos de invertebrados, el estudio se centra en los vertebrados, y especialmente en los teleósteos. Aunque son varias las hormonas que afectan al crecimiento de los vertebrados, la hormona de crecimiento o somatotropina (GH) es el factor endocrino con una mayor influencia en el crecimiento somático. Esta hormona se originó a partir de un gen ancestral que por duplicación, delección, inserción y sustitución dio lugar a los diferentes genes que codifican para GH, prolactina (PRL), somatomamotropina coriónica (CS) y somatolactina (SL). Una característica muy importante de esta familia de hormonas es su elevada especificidad, por lo que el análisis de su secuencia aminoacídica puede utilizarse como criterio de proximidad filogenética. El control de la secreción de GH se caracteriza por su naturaleza multifactorial y dinámica. El control hipotalámico, basado en la acción inhibitoria de la somatostatina y en la estimuladora de la somatocrinina, constituye el mecanismo de regulación más conocido. No obstante, existen otros mecanismos y factores que juegan un papel determinante en el sistema regulador de la secreción de GH. Un mecanismo de gran importancia es la regulación ejercida por los productos resultantes de su acción fisiológica (glucosa, ácidos grasos libres, somatomedinas). De igual modo, la tiro liberina, las hormonas tiroideas, los glucocorticoides, los esteroides sexuales y los neurotransmisores ejercen una gran influencia en la secreción de GH. Esta acción, a pesar de estar basada en principios comunes y utilizar sustancias muy similares, difiere enormemente de unos grupos a otros. De hecho, sustancias con una gran influencia en la secreción de GH en un determinado grupo de vertebrados pueden no influir o influir muy poco en otros. Además, sustancias que inhiben la secreción en unas especies pueden estimularla en otras. Todo ello pone de relieve la gran complejidad de los sistemas endocrinos que regulan el crecimiento somático de los vertebrados y, al mismo tiempo, la importancia que tiene la fisiología comparada en el establecimiento de relaciones filogenéticas entre los diferentes grupos de animales.

1.1. DEFINICIÓN DEL TÉRMINO HORMONA

El crecimiento es el resultado de la hiperplasia e hipertrofia celular. Este proceso es enormemente complejo y en él se ven implicados factores ambientales, nutricionales y genéticos, siendo el sistema neuro-endocrino el que ejerce una función reguladora e integradora.

La definición clásica del término hormona (del griego "hormao", poner en movimiento) fue establecida a principios de este siglo, y comprendía *aquellas sustancias que originadas por una única fuente de secreción eran transportadas por la sangre hasta los tejidos-diana, activando toda una serie de reacciones metabólicas*. Más tarde se comprobó el origen múltiple o por lo menos no único de numerosas hormonas como es el caso de la somatostatina (SS), sintetizada tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el páncreas. De igual modo, se pudo observar que muchas de estas sustancias no eran transportadas por el torrente sanguíneo, sino que poseían recorridos extracelulares de apenas unos mm, μ o Å. Tales descubrimientos llevaron a Guillemin en 1977 a modificar aquella primera definición y considerar a las hormonas como *sustancias que actúan sobre la misma célula secretora u otras adyacentes, independientemente de la singularidad o ubicuidad de la fuente, e independientemente también del medio de transporte que podrá ser la corriente sanguínea, el flujo axoplásmico, o el inmediato espacio extracelular*. Por



consiguiente, las hormonas pueden actuar sobre la misma célula secretora (acción **autocrina**), sobre células próximas (acción **paracrina**) o sobre células alejadas (acción **endocrina clásica** o **neuroendocrina**). Sin embargo, esta definición tampoco puede considerarse como definitiva, ya que recientemente se ha puesto de relieve una acción **intracrina** (O'Malley, 1989) y **yuxtacrina** (Massagué, 1990), según la cual las hormonas actúan sobre la misma célula u otras adyacentes sin que estos factores hormonales lleguen a liberarse al medio extracelular. A pesar de toda esta complejidad, diferentes grupos de animales utilizan principios y materiales comunes para desarrollar sistemas de crecimiento muy parecidos en su forma y función. Esta analogía también se observa al comparar vertebrados e invertebrados, tal y como se describe en los apartados siguientes.

1.2. CONTROL HORMONAL DEL CRECIMIENTO EN INVERTEBRADOS

1.2.1 Invertebrados no artrópodos.

La **hidra** de agua dulce es uno de los invertebrados de mayor simplicidad estructural. Sin embargo, se ha comprobado que posee células nerviosas capaces de segregar un factor estimulante del crecimiento. Esta hormona parece tener dos funciones, por una parte la estimulación de la proliferación celular y, por otra, la transformación de las células intersticiales en células somáticas como los nematocistos o cnidoblastos. Con la llegada de la madurez sexual estas células neurosecretoras desaparecen, el crecimiento cesa y las células intersticiales forman gametos, poniendo de manifiesto el conocido antagonismo entre crecimiento somático y reproducción (Highman y Hill, 1969). Este tipo de antagonismo también se da en los **anélidos**, ya que una alta concentración de la hormona inductora de la proliferación regenerativa de los segmentos (crecimiento somático) inhibe la maduración sexual.

1.2.2. Artrópodos.

En los artrópodos el crecimiento difiere notablemente del resto de animales debido a la naturaleza de su exoesqueleto. Se trata de un proceso marcado por una serie de mudas o ecdisis, en cada una de las cuales se desprende la cutícula antigua, se dividen las células epidérmicas y se deposita una nueva cutícula. Por tanto, es un crecimiento discontinuo que depende del abandono periódico de la cubierta vieja, produciéndose una expansión del cuerpo antes del endurecimiento de la nueva. Este incremento de tamaño sucede mediante una rápida captación de agua (especies acuícolas) o aire (especies terrestres), de manera que el crecimiento real, que en sentido estricto implica la síntesis de nuevo protoplasma, se produce a través de la intermuda.

El ciclo de la muda ha sido estudiado desde hace bastante tiempo por lo que es un proceso que se conoce de una forma bastante detallada. Dicho ciclo se divide en cuatro etapas: proecdisis (premuda), en la que tiene lugar la preparación para la muda con la eliminación de calcio del exoesqueleto; ecdisis (muda), corta etapa durante la cual se desprende el exoesqueleto; metecdisis (postmuda), vuelta natural a la normalidad con el endurecimiento del esqueleto; intermuda, estado normal. La intermuda puede consistir en un periodo largo (anecdisis) o corto (diecdisis), en cuyo caso se dan varias mudas a lo largo del año.

En los **crustáceos**, Rao (1965) demostró que un neuropéptido presente en los oftalmópodos o pedúnculos oculares era capaz de inhibir el proceso de ecdisis. Más recientemente, Soumoff y O'Connor (1982) demostraron que extractos de la glándula del seno inhibían la secreción de la **ecdisona u hormona de la muda**. Este neuropéptido conocido como hormona inhibidora de la muda (MIH) se sintetiza en el órgano X ganglionar y se transmite a través de fibras neurosecretoras a la glándula del seno para su almacenamiento, liberación y posterior unión al órgano Y, lugar de origen de la ecdisona. Al disminuir la concentración de MIH (proecdisis), el órgano Y entra en completa actividad y segrega ecdisona que estimula la muda o ecdisis. Experiencias *in vitro*, con el órgano entero o con células disociadas, han puesto de manifiesto el carácter agudo y crónico de la acción inhibitoria de la MIH en la producción de ecdisteroides (ver Dauphin-Villemant *et al.*, 1994).

Los **insectos** poseen un sistema endocrino regulador del crecimiento de gran similitud al de los crustáceos. Las células neurosecretoras de la región intercerebral producen una sustancia trópica: ecdisiotropina, toracotropina o protoracotropina (PTTH) que pasa por transporte axónico a un órgano neurohemático, el *corpus cardiacum* (cuerpo cardíaco). Bajo una estimulación apropiada, la PTTH se libera a la sangre y activa a la glándula ecdisial o protorácica para que segregue ecdisona. Al igual que en los crustáceos, esta hormona se presenta en dos formas, α -ecdisona y β -ecdisona. Se cree que la ecdisona es segregada como α -ecdisona para luego transformarse rápidamente en β -ecdisona fuera de la glándula. La ecdisona tiene el

mismo esqueleto de carbono que el colesterol y se ha demostrado que es sintetizada a partir del mismo a través de una serie de pasos enzimáticos, los cuales no han sido todavía elucidados plenamente (ver Koolman, 1994). Cabe destacar la coincidencia o relación de esta hormona con la ecdisona de los crustáceos, no sólo en lo que se refiere a su estructura sino también a su acción sobre la muda. Por tanto no resulta sorprendente que se haya sugerido la existencia de una posible homología entre el órgano Y de los crustáceos y las glándulas torácicas de los insectos (ver Koolman, 1994). El órgano Y está controlado por una neurosecreción cerebral, lo mismo que la glándula torácica de los insectos, si bien este control es inhibitorio en los crustáceos y básicamente estimulador en los insectos (Fig. 1.1)

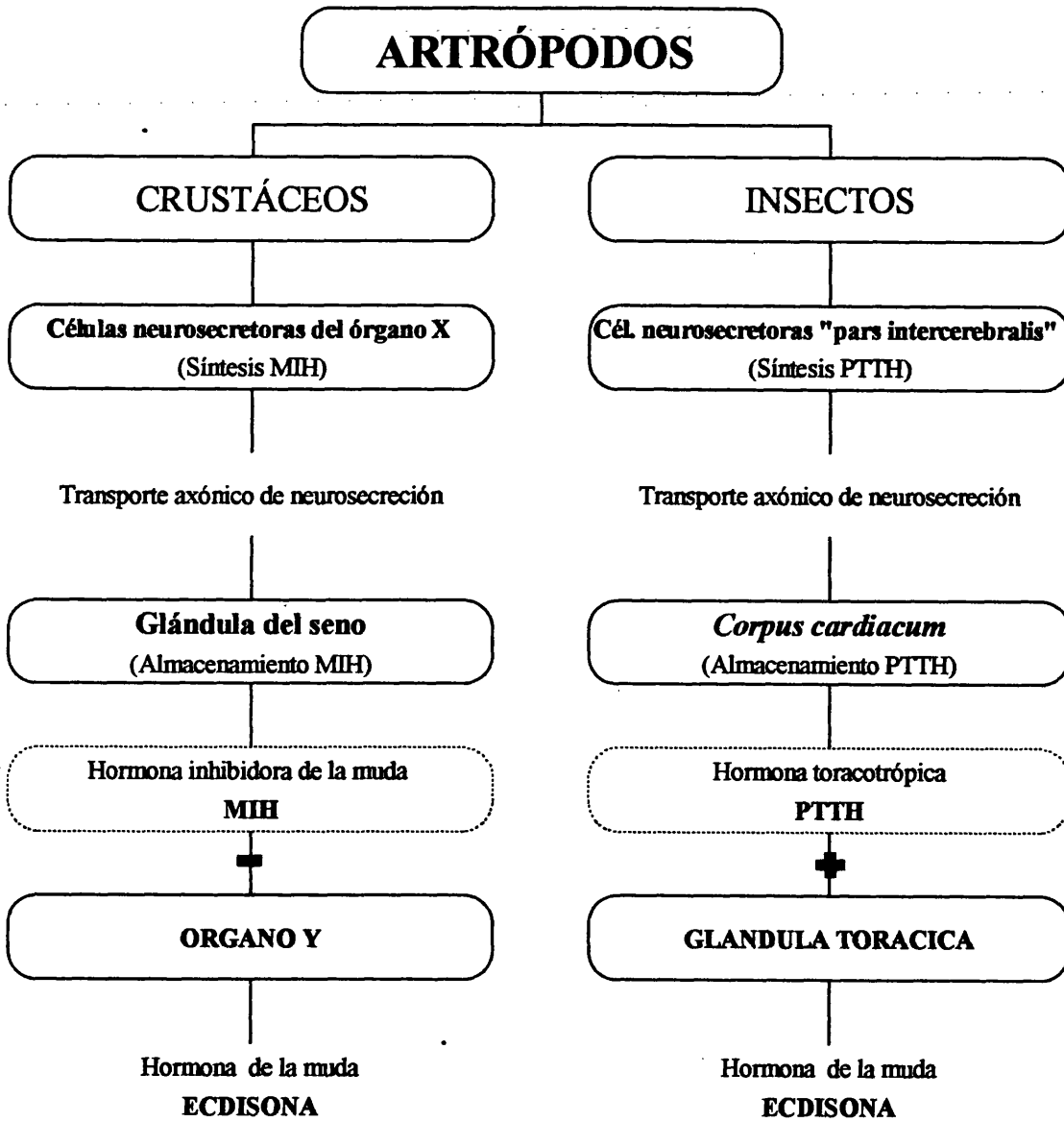


Fig. 1.1. Paralelismo del control endocrino de la muda en crustáceos e insectos.

Por último, cabría destacar la presencia de péptidos relacionados con la insulina en diferentes especies de invertebrados. Estos péptidos [la bombixina de la mariposa de la seda (*Bombix mori*) (Adachi *et al.*, 1989), el péptido insulínico de *Locusta migratoria* (Lagueux *et al.*, 1990), y el péptido insulínico de moluscos (Smit *et al.*, 1988)] forman parte de una antigua y diversa familia de hormonas basada principalmente en sus grandes similitudes estructurales. Todas las hormonas de vertebrados que pertenecen a esta familia, insulina y somatomedinas, juegan un papel esencial en el crecimiento. Por lo tanto, es muy posible que esta función se dé también en invertebrados.

1.3. CONTROL HORMONAL DEL CRECIMIENTO EN VERTEBRADOS

1.3.1. Hipófisis y crecimiento

El desarrollo postembrionario de los vertebrados carece de las etapas de la muda propias de los artrópodos. Sin embargo, artrópodos y vertebrados poseen unos niveles similares de complejidad respecto a anatomía y fisiología, ya que presentan un esquema común de mensajeros intercelulares (hormonas), utilizando ambos, aunque no exclusivamente, péptidos y esteroides (ver Lachaise *et al.*, 1993).

La temperatura, la época del año, la disponibilidad de alimento y el desarrollo reproductivo son de vital importancia en el crecimiento del animal, y es la glándula pituitaria o hipófisis la que ejerce un mayor control en tales procesos. Sin embargo, no fue hasta principios de siglo, cuando se relacionó el crecimiento de los vertebrados con la actividad hipofisaria. Aschner en 1912 fue el primero en sugerir esta relación, al observar una disminución del crecimiento en perros hipofisectomizados. En años posteriores, Evans y Long (1921) lograron estimular el crecimiento de ratas con extractos hipofisarios de vaca. En la década de los 40, se purificó la proteína hipofisaria capaz de estimular el crecimiento de ratas normales e hipofisectomizadas (Li *et al.*, 1945; Wilhelmi *et al.*, 1948). Dicha proteína se denominó hormona de crecimiento o somatotropina (GH), aunque no fue

totalmente secuenciada hasta finales de los años 60 y principios de los 70 (Li, 1969; Li y Dixon, 1971; Niall, 1971). Desde entonces hasta el momento actual, el desarrollo tecnológico ha permitido un rápido y mayor conocimiento de la estructura de la GH, la regulación de su secreción y sus acciones biológicas. Pese a ello, no han sido plenamente dilucidados gran parte de los mecanismos que modulan la secreción, como los modos de acción, o los aparentemente contradictorios efectos metabólicos de la GH.

1.3.2. Características de la familia GH/PRL

La GH es una proteína de aproximadamente 22 kDa que se sintetiza en las células somatotropas de la parte proximal de la *pars distalis* de la adenohipófisis. Los primeros trabajos de secuenciación pusieron de relieve un elevado grado de homología con la prolactina (PRL) (Bewley y Li, 1970), hormona sintetizada por las mamotropas o lactotropas de la parte rostral de la *pars distalis* de la adenohipófisis, lo que permitió sugerir que estas dos hormonas habían evolucionado a partir de un mismo gen sometido a procesos de duplicación, delección, inserción y sustitución (Niall *et al.*, 1971). Más tarde, se sugirió que este gen ancestral podía ser también el origen de otras hormonas como la somatomamotropina coriónica (CS, exclusiva de la placenta de los mamíferos) y la somatolactina (SL, hormona hipofisaria recientemente descrita en varias especies de teleósteos). Así pues, en base a la secuencia aminoacídica y nucleotídica, la familia GH/PRL queda constituida por

GH, PRL, CS y SL, circunstancia ésta que comporta un cierto solapamiento de funciones (ver Chen *et al.*, 1994). A pesar de haberse caracterizado entidades bioquímicas diferenciadas de PRL y GH en varios grupos de vertebrados, incluidos los peces (Ball, 1965; Farmer *et al.*, 1975, 1976; Komourdjian y Idler, 1979), así como preparaciones cuidadosamente purificadas de ambas hormonas, ha continuado existiendo una considerable superposición de sus respectivos efectos lactogénicos y somatogénicos. De hecho, se ha comprobado que la PRL puede ser tan efectiva como la GH en la aceleración del crecimiento somático. Como prueba de ello, en pollos y palomos hipofisectomizados, el restablecimiento del crecimiento es prácticamente total tras la administración de PRL (Jenkin, 1970; Turner y Bagnara, 1971). Por el contrario, en condiciones experimentales similares, la administración de PRL no ejerce un efecto significativo sobre el crecimiento de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Komourdjian y Idler, 1979).

La somatomamotropina coriónica (CS) es una proteína compuesta por 191 aa, con un peso molecular de 20 kDa y de gran similitud con la GH. Esta hormona fue aislada por Josimovich y McLaren en 1962, y denominada en un principio lactógeno placentario (PL) debido a sus propiedades lactogénicas sobre la mama de conejas pseudoembarazadas. Posteriormente, en vista a su similitud con la GH y a sus efectos anabólicos sobre la madre se decide denominarla somatomamotropina coriónica (CS), término que se mantiene en la actualidad, aunque muchos sigan denominándola PL.

La SL, última incorporación a esta familia de hormonas, se ha detectado mediante inmunocitoquímica en varias especies de teleósteos (Rand-Weaver *et al.*, 1991a). A diferencia de la GH y la PRL, las células que la sintetizan (somatolactotropas) se localizan en la *pars intermedia* de la hipófisis. La secuencia del cDNA y/o de la proteína ha sido determinada en el lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) (Ono *et al.*, 1990), bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (Rand-Weaver *et al.*, 1991b), salmón chum (*Oncorhynchus keta*) (Takayama *et al.*, 1991), liebre de mar (*Cyclopterus lumpus*) (Iraqi *et al.*, 1993), fletán (*Hippoglossus hippoglossus*) (Iraqi *et al.*, 1993), lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Pendón *et al.*, 1994) y dorada (*Sparus aurata*) (Cavari *et al.*, 1995). De estos trabajos se deduce que la SL es una proteína enormemente conservada a lo largo de la evolución. No obstante, falta por establecer su función en el organismo. Estudios recientes relacionan esta hormona con el metabolismo del calcio (Kaneko y Hirano, 1993), la reproducción (Rand-Weaver y Swanson, 1993, Planas *et al.*, 1992; Olivereau y Rand-Weaver, 1994), el estrés (Rand-Weaver *et al.*, 1993b), la luminosidad del fondo (Zhu y Thomas, 1995), la regulación ácido-base o incluso el metabolismo lipídico (véase Kaneko e Hirano, 1993), aunque no se han podido detectar receptores de SL en ninguno de los presuntos tejidos diana.

1.3.3. Especificidad de la GH

A diferencia de la ecdisona de los invertebrados, la naturaleza proteica de la GH confiere a esta hormona una notable especificidad. La GH de aves y mamíferos no presenta reacción cruzada en radioinmunoensayos (RIAs) homólogos para la GH de salmónidos (Bolton *et al.*, 1986; Wagner y McKeown, 1986; Le Bail *et al.*, 1991), carpa (*Cyprinus carpio*) (Cook *et al.*, 1983), anguila (*Anguilla japonica*) (Kishida y Hirano, 1988), dorada (*Sparus aurata*) (Le Bail *et al.*, 1993a) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Ricordel *et al.*, 1995). Es más, la reacción cruzada de los anticuerpos anti-GH de dorada es alta con los extractos hipofisarios procedentes de especies de la misma familia, parcial con las del mismo orden y débil o prácticamente inexistente con las de órdenes distintos. Esta especificidad queda también reflejada en el análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de la GH de diferentes vertebrados (Cuadro 1.I.). En general, la similitud entre las moléculas de GH coincide con el grado de proximidad filogenética de las diferentes especies. La GH de anguila, tiburón y esturión son más similares a la GH de tetrápodos (50-70 % de homología), que a la de los teleósteos (35-45 %). Tal observación está de acuerdo con los estudios biológicos e inmunológicos llevados a cabo durante los últimos 20 años (Hayashida, 1975), según los cuales la divergencia evolutiva es mayor en los peces que en los tetrápodos. No obstante, es importante reseñar que se han identificado regiones notablemente conservadas, especialmente entre los aa 164 y 187 (Nicoll *et al.*, 1986; Kawauchi y Yasuda, 1989; Watahiki *et al.*, 1989). Ello

explica que todas las somatotropinas testadas hasta el momento sean biológicamente activas en los teleósteos (Le Bail *et al.*, 1993b). No obstante, esta homología no es suficiente para que cualquier GH, independientemente de su origen, tenga actividad biológica en todas las especies de vertebrados. Los primates no responden a la GH de otras clases de mamíferos. La rata, por el contrario, responde a la mayoría de los extractos hipofisarios probados, incluidos los procedentes de condrósteos como el esturión (*Acipenser trasmontanus*) y el pez espátula (*Polydon spatula*) (Hayashida y Lagios, 1969). En cualquier caso, debemos ser prudentes al interpretar estos resultados, ya que en algunos casos la falta de respuesta podría atribuirse a una rápida producción de anticuerpos contra estas hormonas de naturaleza proteica (ver Knobil, 1961).

1.3.4. Control de la secreción de GH

1.3.4.1. Eje hipotalámico-hipofisario.

La regulación de la secreción de GH se caracteriza por su naturaleza **multifactorial** y **dinámica**, dependiente en mayor o menor medida de factores externos (fotoperiodo, temperatura y alimentación) e internos (edad, sexo). Estos factores son integrados por el SNC que controla la secreción hipofisaria de GH a través del hipotálamo. El sistema de transporte de las sustancias hipofisiotrópicas desde el hipotálamo hasta la hipófisis varía de un grupo de vertebrados a otros, fundamentalmente en función de la configuración anatómica del eje hipotálamo-hipofisario. En los tetrápodos, los factores hipotalámicos son vertidos al sistema porta-hipofisario que las transporta hasta la adenohipófisis. En cambio, en los teleósteos, no existe un sistema de vasos portales como el descrito anteriormente, por lo que los axones de las neuronas secretoras abandonan el hipotálamo e inervan directamente las células hipofisarias (Hall *et al.*, 1986) (ver Fig. 1.2).

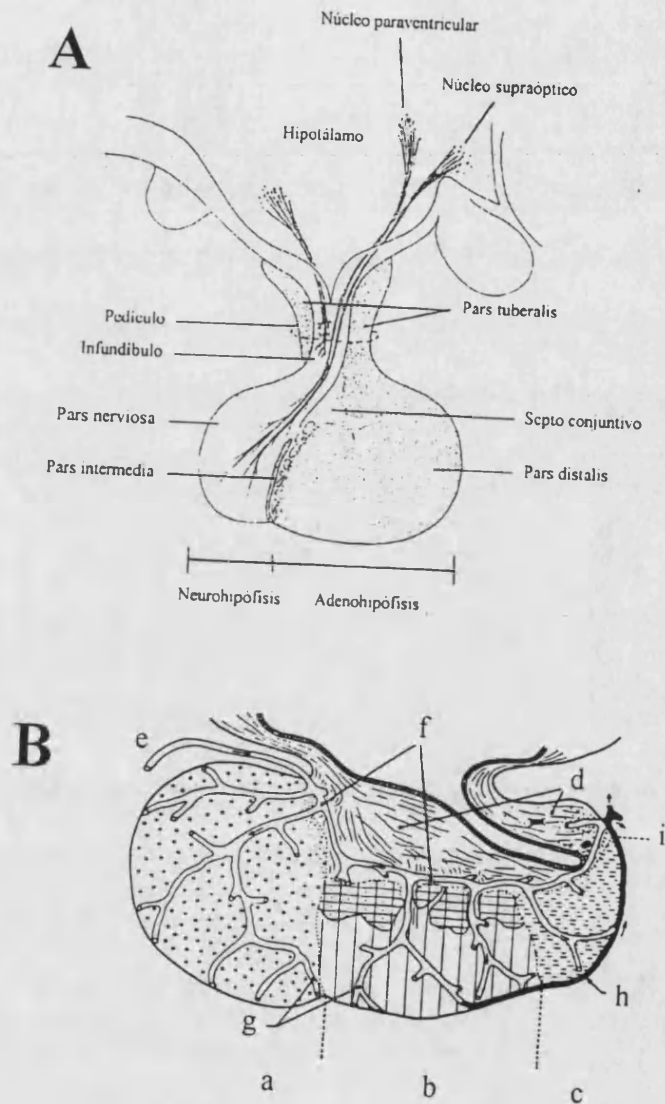


Fig. 1.2. Hipófisis de mamífero (A) y de teleósteo (B). (a) *pars distalis rostralis*, (b) *pars distalis proximalis*, (c) *pars intermedia*, (d) neurohipófisis, (e) arteria hipofisaria, (f) plexo longitudinal primario, (g) plexo centrífugo secundario, (h) red venosa superficial, (i) vena hipofisaria.

1.3.4.2. Control hipotalámico: somatocrinina, somatostatina y tiroliberina

Los dos péptidos hipotalámicos más importantes en la estimulación e inhibición de la secreción de GH son la **somatocrinina (GHRH)** y la **somatostatina (SS)**. No obstante, el carácter multifactorial del control hipotalámico de la secreción de GH implica la existencia de otros factores que pueden tener un papel determinante en unas especies y no influir, o influir muy poco, en otras. En cualquier caso, este control hipotalámico tiene como resultado una secreción de GH de tipo pulsátil, característica común en todos los vertebrados, aunque con una gran variabilidad interespecífica en cuanto a la frecuencia y amplitud de los pulsos (ver Harvey, 1993).

La GHRH fue aislada por primera vez a partir de tumores pancreáticos causantes de acromegalia en humanos (Guillemin *et al.*, 1982, Rivier *et al.*, 1982). En un principio, se detectaron tres péptidos de 37, 40 y 44 aa sin variaciones en el extremo amino terminal, y con una elevada capacidad para estimular la secreción hipofisaria de GH. No obstante, estudios posteriores revelaron que la forma mayoritaria en extractos hipotalámicos era el péptido de 44 aa (Ling *et al.*, 1984). En la actualidad, se han aislado/secuenciado GHRHs de 42 a 45 aa de longitud en ternera (Esch *et al.*, 1983), oveja (Brazeau *et al.*, 1984), cabra (Brazeau *et al.*, 1984), cerdo (Bohlen *et al.*, 1983), rata (Spiess *et al.*, 1983), ratón (Suhr *et al.*, 1989), carpa (Vaughan *et al.*, 1992) y salmón (Parker *et al.*, 1993). Comparativamente con la GHRH humana, el grado de homología de la GHRH de ternera, oveja, cabra y cerdo

es del orden del 86-93 %. Esta homología disminuye hasta el 40-74 %, al comparar la GHRH humana con la de rata, ratón, carpa y salmón (ver Campbell *et al.*, 1995).

La capacidad estimuladora de la GHRH humana en la secreción de GH ha sido demostrada en varias especies de vertebrados, incluidos los teleósteos (Luo *et al.*, 1990; Peter *et al.*, 1984; Calduch-Giner *et al.*, 1994). Sin embargo, en aves y reptiles, esta capacidad estimuladora parece correr a cargo mayoritariamente de otro péptido hipotalámico, la tiroliberina (TRH) (hormona estimuladora de la secreción de tiotropina, TSH). En anfibios, el control de la secreción de GH ha sido poco estudiado. Sin embargo, a partir de los datos existentes en la bibliografía podemos concluir que en los urodelos la secreción de GH es de carácter autónomo (Holmes y Ball, 1974). Schultheiss (1979) lo confirmó al observar como persiste la secreción de GH en pituitarias ectotrópicas de *Ambystoma*. Del mismo modo, el autotransplante de hipófisis estimula el crecimiento y la secreción de GH en pleurodelos y ajolotes mejicanos (Cocchi y Locatelli, 1983), lo que sugiere que en estas especies el control de la secreción de GH es de carácter inhibitorio. Por el contrario, en los anuros, la secreción de GH es dependiente de su conexión con el hipotálamo. Extractos hipotalámicos de *Rana pipiens* (Hall y Chadwick, 1984), *Xenopus laevis* (Hall y Chadwick, 1979) y *Rana catesbeiana* (Hall y Chadwick, 1984) estimulan la secreción de GH en cultivos hipofisarios de mamíferos, aves o anfibios. Ello podría ser debido a la presencia de GHRH, aunque no podemos descartar una posible acción de la TRH u otros factores estimuladores (ver Harvey, 1993).

En peces, los primeros resultados obtenidos con TRH fueron contradictorios. Hall y Chadwick (1983) observaron un efecto estimulador sobre la secreción de GH en cultivos hipofisarios de anguila (*Anguilla anguilla*). En cambio, Wigham y Batten (1984) y Batten y Wigham (1984) no detectaron ningún efecto en cultivos hipofisarios de moli (*Poecilia latipinna*). Por el contrario, en carpa dorada (Trudeau *et al.*, 1992) y carpa común (Lin *et al.*, 1993), se ha descrito un efecto estimulador de la TRH. Dado el poco o inexistente efecto estimulador de la TRH en la secreción de TSH de vertebrados inferiores, algunos autores sugieren que la TRH podría haber evolucionado a partir de un péptido estimulador de la secreción hipofisaria de GH y PRL (Ball, 1981; Hall y Chadwick, 1984). No obstante, para confirmar esta hipótesis deberían examinarse un mayor número de especies.

La SS es un tetradecapéptido que fue aislado por primera vez a partir de extractos hipotalámicos bovinos (Brazeau *et al.*, 1973). Posteriormente, también se ha detectado en otras áreas del cerebro, así como en el páncreas, tracto gastrointestinal, retina y tiroides. La forma inmadura de la SS-14 es un péptido de 28 aa (SS-28), y al igual que la forma madura es capaz de ejercer un efecto inhibitorio sobre la secreción de GH. En mamíferos, existe un único gen que codifica para la SS, mientras que en teleósteos existen dos genes para las distintas variantes de este péptido. El gen I codifica para la SS-14, cuya secuencia se mantiene invariable en todos los vertebrados estudiados hasta el momento. El gen II codifica para SSs que varían en alguno de los 14 aa del extremo carboxilo, dando lugar a péptidos de 22, 25 e incluso 28 aa de longitud (Andrews *et al.*, 1984a,

1984b; Plisetskaya *et al.*, 1986). En salmónidos, se ha demostrado que el gen I se expresa tanto en cerebro como en páncreas. Sin embargo, los péptidos derivados del gen II solamente se han detectado a nivel pancreático (Nozaki *et al.*, 1988). Esta diferente distribución está en consonancia con una menor capacidad de la SS-22, SS-25 y SS-28 para inhibir la secreción de GH (Oyama *et al.*, 1981; Morel *et al.*, 1984; Marchant *et al.*, 1987).

1.3.4.3. Neurotransmisores

Las catecolaminas (DA, dopamina; NE, norepinefrina; E, epinefrina), la serotonina, la acetilcolina, la histamina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) regulan la actividad de las neuronas peptidérgicas hipotalámicas de mamíferos (ver Martin-Du Pan y Gómez, 1981; McCann, 1981; Sonntag *et al.*, 1982; Arimura y Culler, 1985) y aves (ver Scanes *et al.*, 1982; Harvey, 1983a). Existen evidencias de una acción similar en otras especies de vertebrados (ver Ball, 1981; Cocchi y Locatelli, 1983). Por consiguiente, estos neurotransmisores ejercen un importante papel en la regulación de la secreción de GH. Sin embargo, en humanos y otras especies de mamíferos, las catecolaminas tienen poco o ningún efecto sobre la secreción de GH cuando actúan directamente sobre la hipófisis. Por el contrario, en cultivos de hipófisis de pollo, las catecolaminas disminuyen la secreción de GH inducida por GHRH (Donoghue *et al.*, 1990). En reptiles, la NE estimula la secreción de GH en hipófisis inmaduras (tortugas) en ausencia de TRH o GHRH (Hall y Chadwick,



1984). Estos mismos autores observaron como la DA no tenía ningún efecto sobre la secreción basal o estimulada de GH hipofisaria de tortugas adultas. En los anuros, la DA tampoco tiene ningún efecto, aunque la serotonina ejerce un efecto estimulador (Hall *et al.*, 1986). En la carpa dorada también se ha demostrado la presencia a nivel de cerebro de numerosos neurotransmisores capaces de inhibir y/o estimular la secreción de GH, así como de diferentes péptidos hipotalámicos tales como SS, GHRH, TRH, hormona estimuladora de gonadotropinas (GnRH) y neuropéptido Y (NPY) (ver Peter y Marchant, 1995).

1.3.4.4. Esteroides sexuales

En los vertebrados superiores, los esteroides gonadales regulan la secreción de GH tanto a nivel hipotalámico como hipofisario (Kerrigan y Rogol, 1992; Wehrenberg y Giustina, 1992). Concretamente, en ratas, la amplitud de los picos de GH es mayor en machos que en hembras, pero los niveles basales son más bajos en los machos. Este patrón de secreción parece asociado a un diferente comportamiento de los andrógenos y de los estrógenos. Los andrógenos potencian la secreción de GHRH, sin embargo también estimulan, y en mayor medida, la secreción de SS. Como resultado la frecuencia de picos, los niveles interpicos y el crecimiento somático son mayores en las hembras que en los machos. En peces, no hay evidencias de que exista un dimorfismo sexual en el patrón de secreción de GH, pero lo más probable es que sea una de las razones por las que en muchas especies

de teleósteos el crecimiento es dependiente del sexo. Los estrógenos estimulan la actividad secretora de las células somatotropas de moli, carpa dorada, y anguila. En la carpa dorada, este efecto estimulador se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (ver Harvey, 1993).

En aves, los esteroides gonadales también juegan un papel importante en la secreción de GH. Las hipófisis de pollo preincubadas con testosterona, estrógeno o progesterona reducen su capacidad de respuesta frente a la acción estimuladora de TRH. Del mismo modo, implantes de testosterona disminuyen la secreción de GH en pollos y pavos (Harvey, 1983a). Esta capacidad de los esteroides para alterar la respuesta de las somatotropas hipofisarias parece ser una característica común de todos los vertebrados. De hecho, en los terrapenes (*Chrysemys picta*), el estradiol y la testosterona aumentan la secreción de GH inducida por extractos hipotalámicos (Hall *et al.*, 1978).

1.3.4.5. Glucocorticoides y hormonas tiroideas.

Los glucocorticoides y las hormonas tiroideas son otros de los factores a tener en cuenta. En humanos y otras especies de mamíferos, la secreción de GH está condicionada por la disponibilidad de hormonas tiroideas. El hipotiroidismo disminuye la cuantía de GH hipofisaria y de GHRH hipotalámico (Hervas *et al.*, 1975; Katakami *et al.*, 1986). Por el contrario, tanto la secreción basal como la inducida por GHRH se ven potenciadas en presencia de hormonas tiroideas y glucocorticoides (Michel *et al.*, 1984; Root *et al.*, 1985). Resultados similares han sido descritos por Luo y McKeown (1991) en cultivos de células hipofisarias de carpa. Por el contrario, en pollos, las hormonas tiroideas inhiben la secreción de GH (Harvey, 1983b). Esta respuesta podría ser debida a que en las aves, la TRH, además de estimular la secreción de TSH y en consecuencia la de hormonas tiroideas, es el principal estimulador hipotalámico de la secreción de GH (Harvey, 1983a). Un fenómeno similar es el que se da en los reptiles, en los que la TRH vuelve a jugar un papel crucial en el control hipotalámico de la secreción de GH (Denver y Licht, 1988).

1.3.4.6. Factores abióticos

Se ha comprobado que tanto el estrés como el ejercicio estimulan la secreción de GH en muchas especies de mamíferos (Sonntag *et al.*, 1982). En consecuencia, los ritmos diarios de actividad están asociados a un determinado patrón de secreción hormonal. En humanos, se ha podido comprobar como los niveles de GH son más elevados por la noche durante el sueño (ver Hartman *et al.*, 1993). El estrés también afecta a la secreción de GH en las aves, sin embargo de una manera opuesta a la mayoría de mamíferos (Harvey, 1983a). La temperatura ambiental y otros factores estacionales afectan a los perfiles anuales de secreción de GH en varias especies de aves (Scanes *et al.*, 1983). Sin embargo, es en los poiquiloterms donde se observa una mayor incidencia de todos estos factores externos. En los teleósteos, a los factores mencionados anteriormente se añaden factores osmóticos, de especial importancia en especies eurihalinas (Ball, 1981). Se ha comprobado que el estrés hiposmótico, originado al volver al medio hipohalino al salmón chum (*Oncorhynchus keta*) adaptado al agua salada, aumenta los niveles circulantes de GH (Hirano *et al.*, 1990). Por el contrario en *Poecillia*, medios hiper e hiposmóticos estimulan la secreción de GH (Batten *et al.*, 1983, Wigham y Batten, 1984). En la trucha arco iris, la disminución de la presión osmótica disminuye *in vitro* la secreción de GH (Luo *et al.*, 1990). Igualmente, la hipo e hiperosmolaridad reducen *in vivo* e *in vitro* la secreción de GH en anguilas eurihalinas (Baker y Ingleton, 1975, Suzuki *et al.*, 1990). En tilapias adultas, medios hiper e hiposmóticos no tienen efectos significativos en la secreción hipofisaria de GH, aunque medios

hiperosmóticos estimulan la secreción de GH en los alevines (Helms *et al.*, 1987). Por consiguiente, existen grandes diferencias entre especies en cuanto a los efectos de los estímulos osmóticos en la secreción de GH. No debemos descartar que esta situación sea consecuencia del estrés originado por las variaciones de los estímulos medioambientales.

1.3.4.7. Retroalimentación

La retroalimentación o *feedback* es un sistema de control endocrino consistente en que la misma hormona, o los productos resultantes de su acción fisiológica, actúan como reguladores de su propia síntesis y/o secreción. Por consiguiente, éste es uno de los mecanismos más importantes en la regulación de la secreción hormonal.

- Retroalimentación corta (*shortloop feedback*). La interrelación entre hipotálamo e hipófisis se ve complementada con la capacidad que posee la GH de estimular la secreción de SS e inhibir la de GHRH. Dicha interrelación constituye un sistema de retroalimentación negativa corto (Müller, 1987) que ha sido demostrado en mamíferos y aves (Lea y Harvey, 1990), pero no en poiquiloterms. Pese a ello, la presencia de receptores de GH a nivel hipotalámico aboga por la existencia de un sistema similar en vertebrados inferiores (Pérez-Sánchez *et al.*, 1991). Es más, se ha detectado la presencia de receptores en telencéfalo, tálamo y cerebelo (Pérez-Sánchez *et al.*, 1991), por lo que podría darse otro sistema de retroalimentación entre

GH y SNC, que en última instancia podría regular la secreción rítmica de SS y GHRH hipotalámico. Por otro lado, cabe destacar que algunos autores plantean la posibilidad de que exista una retroalimentación ultracorta (*ultrashortloop feedback*) a nivel de hipotálamo o de hipófisis, es decir que la GH, la GHRH y/o la SS inhiban su propia secreción. Esta hipótesis surgió al observar que las inyecciones intraventriculares de GHRH disminuían la secreción de GH (Lumpkin *et al.*, 1985). Más tarde, otros estudios revelaron que la causa más probable de esta disminución no era la inhibición de la secreción de GHRH sino la estimulación de la SS por parte de la GHRH exógena (Katakami *et al.*, 1986). La existencia de una retroalimentación ultracorta en la hipófisis, aún parece más improbable. De hecho, se ha podido comprobar que la GH humana no afecta a la secreción de GH en cultivos hipofisarios de rata (Richman *et al.*, 1981), y que la GH bovina tampoco altera la cinética de secreción en cultivos hipofisarios de trucha arco iris (Blaise *et al.*, 1995). En contraste, otros estudios demuestran que la GH humana es capaz de inhibir la secreción basal en bovinos (Rosenthal *et al.*, 1991), lo que podría indicar la existencia de este tipo de retroalimentación en determinadas especies. Sin embargo, no se puede concluir que esto sea así, pues la GH podría no actuar directamente sobre la célula somatotropa y hacerlo mediante un factor hipofisario asociado como podrían ser las somatomedinas. Por lo tanto, con los datos disponibles, no se puede asegurar que este tipo de retroalimentación ultracorta forme parte del control de la secreción de GH.

- Retroalimentación larga (*longloop feedback*). La producción de GH también puede ser inhibida a nivel de hipófisis e hipotálamo por los productos resultantes de su acción metabólica en el órgano diana. En tilapia, Rodgers *et al.* (1992) han demostrado que la glucosa inhibe la secreción de GH pero, por el momento, no hay evidencia de un efecto similar de los ácidos grasos. La inhibición de la secreción de GH por parte de las somatomedinas (IGFs) constituye otro ejemplo de retroalimentación. En varias especies de teleósteos se ha detectado un incremento de los niveles circulantes de IGFs después de la administración de GH (Funkenstein *et al.*, 1989; Ng *et al.*, 1991; Niu *et al.*, 1993). Asimismo, Pérez-Sánchez *et al.* (1992) han demostrado en cultivos de células hipofisarias de trucha que la IGF-I humana inhibe la secreción de GH. No obstante, queda por determinar si esta acción inhibitoria también puede establecerse a través del hipotálamo estimulando la secreción de SS y/o inhibiendo la de GHRH, tal y como se ha descrito en vertebrados superiores (Berelowitz *et al.*, 1981; Müller, 1987).

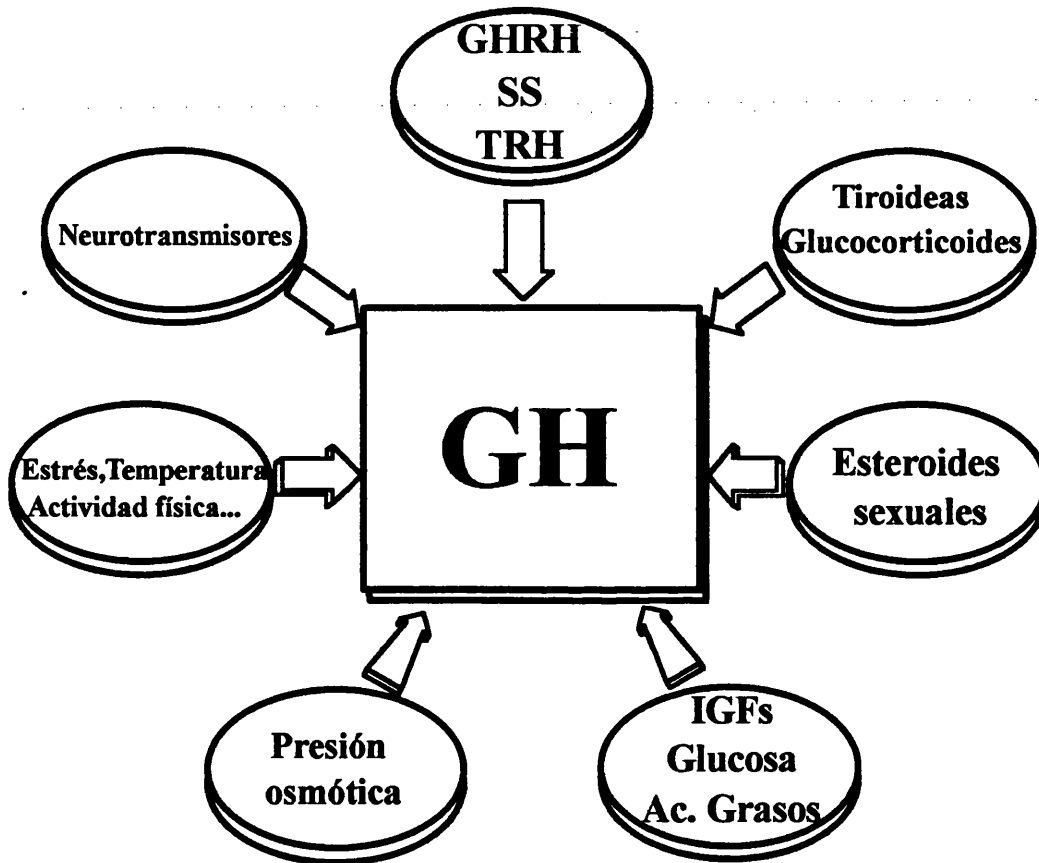


Fig. 1.3. Factores reguladores de la secreción de GH.

1.3.5. Interacción GH-Receptor.

1.3.5.1. Generalidades

La GH ejerce un efecto pleiotrópico como resultado de su acción sobre el metabolismo proteico, lipídico e hidrocarbonado. En consecuencia, la acción de la GH en el organismo responde a un proceso enormemente complejo, en el que se diferencia una acción **catabólica** y otra **anabólica**, dependiente esta última de las IGFs o somatomedinas. Ambas acciones metabólicas se encuentran muy interrelacionadas y, en última instancia, preservan la masa corporal proteica al favorecer la oxidación de los ácidos grasos frente al catabolismo aminoacídico. Este efecto lipolítico de la GH, que incluye la síntesis y/o activación de las lipasas, ha sido descrito en varias especies de peces (ver O'Connor *et al.*, 1993).

El primer paso en la acción de la GH es la interacción de la hormona con su receptor. Los receptores de GH se han detectado y caracterizado en hígado, gónadas, branquias, tejido adiposo, músculo, piel, cartilago, células hematopoyéticas y SNC. No obstante, en todas las especies estudiadas, el hígado es el tejido diana por excelencia de la GH (ver Cap. 3). Los cDNAs codificantes para el receptor de GH han sido clonados y secuenciados en el hombre, el ratón, la rata, el conejo, la oveja, la vaca y el cerdo (ver Beattie y Flint, 1993). En humanos, el receptor de GH es una proteína de transmembrana de 620 aa, formada por una región extracitoplasmática de 246 residuos, un segmento transmembrana de 24 aa, y una única región

intracitoplasmática de 350 aa (Kelly *et al.*, 1993). La parte extracelular del receptor es idéntica a la proteína de transporte de la GH circulante (GHBP) (Leung *et al.*, 1987; Kelly *et al.*, 1993). Esta GHBP, todavía sin caracterizar en los teleósteos, es el resultado de la digestión proteolítica del receptor de GH (Leung *et al.*, 1987).

Al igual que los receptores de prolactina y otras citoquinas (eritropoyetina, trombopoyetina, interleuquinas, interferón, factores estimuladores de macrófagos y granulocitos), la dimerización del receptor de GH es un paso previo para el desencadenamiento de una determinada señal intracelular (Kelly *et al.*, 1993, Cosman *et al.*, 1990, Miyajima *et al.*, 1992). Ello se ha podido comprobar en varias líneas celulares, en donde la interacción ligando-receptor no responde a un modelo bimolecular y reversible (Ilondo *et al.*, 1986; De Meyts, *et al.*, 1988; Ilondo *et al.*, 1991; Donner *et al.*, 1978; Donner, 1980; Barrazone *et al.*, 1980, Ilondo *et al.*, 1994). Estudios cristalográficos con rayos X demuestran que la estequiometría de la interacción GH-receptor sigue una proporción de 2 a 1 (De Vos *et al.*, 1992; ver Fig 1.4). Mediante análisis mutacionales, se ha podido comprobar la existencia de dos *loci* de unión en la GH humana, que a su vez son reconocidos por un único *locus* del receptor (Cunningham *et al.*, 1989, Cunningham y Wells, 1989; Bass *et al.*, 1991). Estos mismo autores sugieren que la dimerización del receptor tiene lugar secuencialmente. La primera molécula de receptor se une a uno de los *loci* de la GH (*locus* I), induciendo un cambio conformacional que posibilita el reconocimiento del *locus* II de la GH por un segundo receptor. En consecuencia, GHs con mutaciones en el *locus* II son capaces de unirse al receptor, pero administradas *in vivo* inhiben

la acción de la GH endógena al competir por el receptor y no desencadenar la subsecuente dimerización y activación celular.

La señal intracelular desencadenada por la dimerización del receptor requiere la presencia de la tirosina-quinasa JAK-2 (Lobie *et al.*, 1994a; 1994b; Möller *et al.*, 1992). La quinasa JAK-2 pertenece a la familia de tirosina-quinasas Janus, a la que también pertenecen la JAK-1 y la TyK-2. La unión y posterior dimerización del complejo GH-receptor induce la asociación de la JAK-2 al receptor, concretamente a una zona de la región intracelular cercana al segmento de transmembrana conocida como Box 1. Esta región rica en prolinas está presente en toda la familia de receptores de citoquinas y factores de crecimiento (ver Wang *et al.*, 1995). Tras esta asociación Box 1/JAK-2, tiene lugar la activación de la JAK-2 y la fosforilación de tirosinas. Otras proteínas como las STATs (conocidas como proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción) o las MAPs (quinasas activadas por mitógenos), también intervienen en la transmisión de las señales derivadas de la dimerización del complejo GH-receptor, circunstancia ésta que implica su fosforilación (Heldin, 1995; Anderson, 1992).

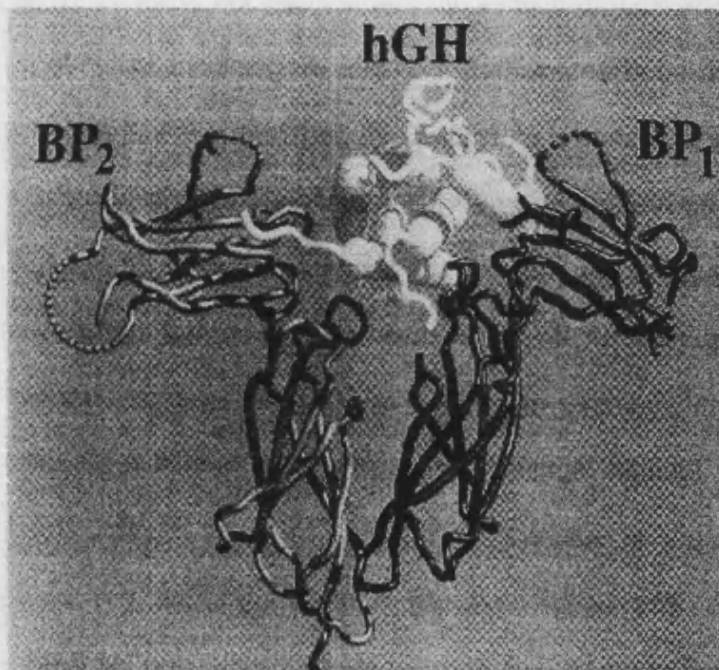


Fig. 1.4. Esquema del complejo GH-receptor (De Vos *et al.*, 1992). hGH, GH humana; BP, componente extracelular del receptor de GH.

1.3.5.2. IGFs

La acción anabólica de la GH es quizá la más conocida, y consiste básicamente en una rápida activación de todos los procesos implicados en la neosíntesis proteica, desde el incremento en la captación celular de aa hasta la síntesis de mRNA y aumento de la actividad enzimática. Los efectos anabolizantes de la GH ocurren en tejidos tan diferentes como el hueso, el cartílago, el músculo, el hígado y las vísceras, pero es a nivel hepático y muscular donde es más notoria. No obstante, fue en el cartílago donde se encontraron los primeros indicios de que la acción anabólica de la GH es dependiente de las somatomedinas o IGFs (Salmon y Daughaday, 1957). Este descubrimiento sentó las bases de lo que se conoce como hipótesis somatomédica. La idea original consistía en que la GH segregada por la hipófisis era transportada por el sistema circulatorio hasta el hígado, donde estimulaba la síntesis de IGFs que posteriormente eran conducidas por la sangre hasta los presuntos tejidos diana. Estudios posteriores revelaron que las IGFs eran sintetizadas en otros tejidos además del hígado (D'Ercole *et al.*, 1984), lo que supuso la modificación de este concepto clásico de acción somatomédica. De hecho, la GH puede actuar directamente sobre los tejidos u órganos en crecimiento estimulando la producción local de IGFs, que actúan entonces de modo autocrino y/o paracrino (Isaksson *et al.*, 1987) (ver Fig. 1.5).

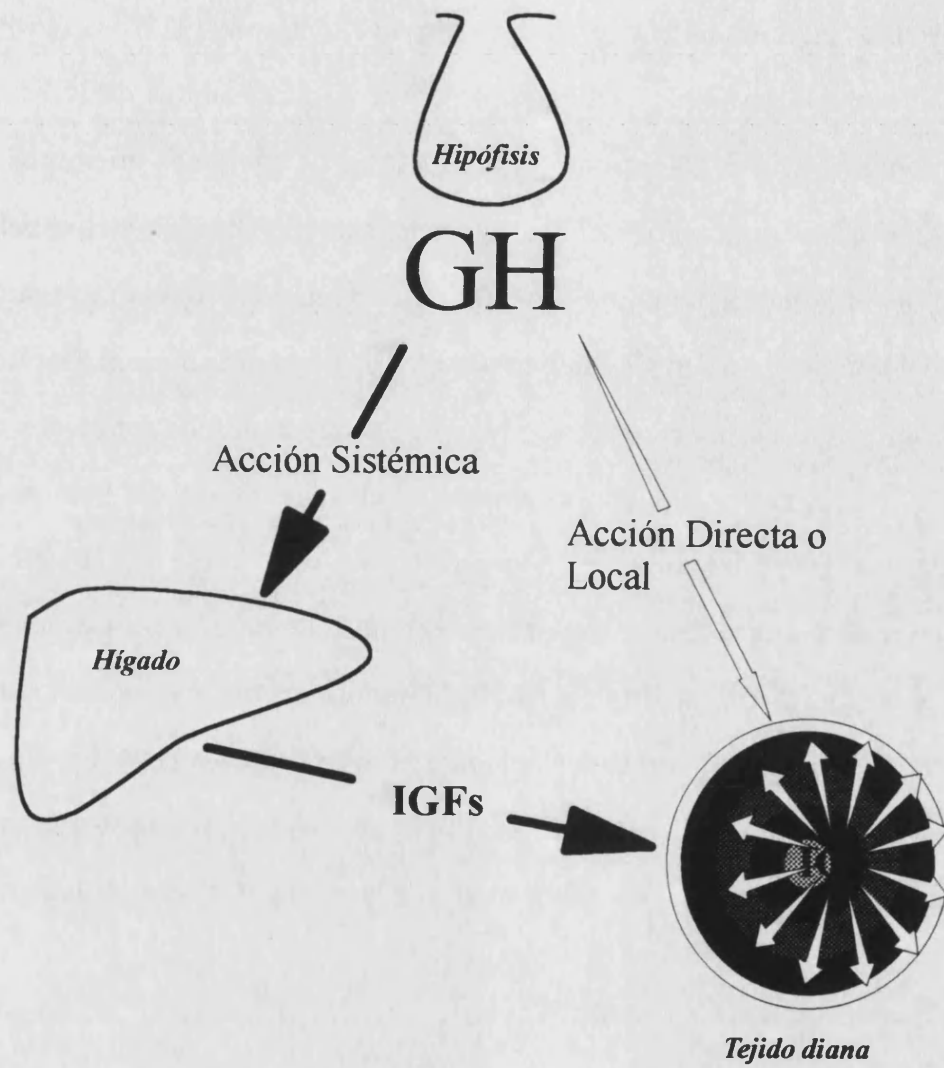


Fig. 1.5. Esquema de la acción de GH.

En la actualidad, se desconoce la contribución relativa de los dos tipos de IGFs (hepáticas-extrahepáticas) en la estimulación del crecimiento. Posiblemente, ello dependa del tejido y de la fase de desarrollo (Holly y Wass, 1989). Una complicación adicional es la existencia de dos tipos moleculares de IGFs, IGF-I e IGF-II. Ambas IGFs son péptidos de unos 70 aa de longitud, miembros de una antigua familia de hormonas relacionadas con la insulina (Blundell y Humbel, 1980). Comparten similitudes, tanto en su estructura primaria y terciaria, como en su actividad biológica. Las tres proteínas se transcriben como una prohormona que contiene un péptido señal en el extremo amino, y tres dominios conocidos como B, C y A. Los dominios A y B presentan un elevado grado de homología, y a diferencia de la proinsulina, el dominio C no se elimina en el proceso de maduración de la hormona. Así pues, las regiones con homología estructural entre las formas maduras de insulina y de IGFs se reducen a los dominios A y B. Tanto la IGF-I como la IGF-II presentan dos dominios adicionales (D y E), ausentes en la insulina. El dominio E se elimina a lo largo del proceso post-transcripcional conducente a la obtención de las formas maduras de IGF (ver Ellsworth *et al.*, 1994).

Las similitudes estructurales y funcionales entre insulina e IGFs, así como su amplia distribución por el reino animal, sugieren la existencia de un gen ancestral común. En el procordado *Amphioxus californiensis*, se ha identificado un péptido con características de ambas proteínas que podría representar el prototipo de esta molécula ancestral insulina/IGF (Chan *et al.*, 1990). Sin embargo, *Myxine glutinosa*,

especie perteneciente a uno de los grupos de vertebrados más primitivos (Agnatha), ya presenta entidades bioquímicas diferenciadas de insulina y de IGF, lo que sugiere que la duplicación y divergencia del presunto gen ancestral tuvo lugar en las etapas más tempranas de la evolución de los vertebrados (Nagamatsu *et al.*, 1991). Por otro lado, esta molécula de IGF presente en este agnato comparte similitudes con la IGF-I y con la IGF-II de los gnatóstomos, por lo que podría representar el prototipo de una molécula ancestral de IGF, cuyo gen habría dado lugar a los de IGF-I e IGF-II. Se han aislado y secuenciado ambos tipos moleculares de IGF, en mamíferos, aves, anfibios, teleósteos, y recientemente, en elasmobranquios (ver Duguay *et al.*, 1995). Esto indica que la duplicación y divergencia de este gen ancestral tuvo lugar antes de la aparición de los condrosteos, hace más de 440 millones de años. Además, la comparación de las secuencias de ambas IGFs demuestra su gran conservación a lo largo de la evolución. De hecho, el grado de homología entre las IGFs de diferentes vertebrados suele ser mayor que entre la IGF-I y la IGF-II de una misma especie. Ello es especialmente evidente para la IGF-I (ver Cuadros 1.II y 1.III).

CUADRO 1.II. Grado de homología de las secuencias aminoacídicas de ambas IGFs en diferentes especies de vertebrados. IGF-I vs IGF-I, mitad superior derecha. IGF-II vs IGF-II, mitad inferior izquierda (Duguay *et al.*, 1995).

		IGF-I							
		hombre	pollo	rana	trucha	tiburón	mixina		
IGF-II	hombre		89	84	80	66	55	IGF-I	
	pollo	84		89	84	68	56	pollo	
	---	---	---		84	63	55	rana	
	trucha	79	73	---		62	55	trucha	
	tiburón	66	59	---	60		54	tiburón	
	mixina	62	56	---	58	59		mixina	
		hombre	pollo	---	trucha	tiburón	mixina		
		IGF-II							

CUADRO 1.III. Grado de homología entre las secuencias aminoacídicas de IGF-I e IGF-II (Duguay *et al.*, 1995).

		IGF-I							
		hombre	pollo	rana	trucha	tiburón	mixina		
IGF-II	hombre	63	62	64	60	62	62		
	pollo	63	61	65	57	58	56		
	trucha	67	66	67	62	62	58		
	tiburón	55	55	53	59	55	59		
	mixina	55	56	55	55	54	---		

Tal como hemos podido comprobar las IGFs se encuentran estrechamente relacionadas con la insulina, pero a diferencia de ésta, la mayor parte circulan en la sangre unidas a proteínas de transporte (IGFBP). En los últimos años se han aislado y clonado en humanos y ratas hasta 6 tipos de IGFBPs (Shimasaki y Ling, 1991). Para su denominación se les ha asignado un número que corresponde al orden de publicación de su secuencia. Cada una de las IGFBPs se produce mayoritariamente en un tejido determinado, lo que sugiere que este grupo de proteínas podrían haber evolucionado para regular acciones tisulares específicas de las IGFs. No se conoce demasiado acerca de su acción fisiológica, si bien se ha comprobado que además de controlar el transporte de las IGFs en la circulación y prolongar su vida media en el plasma, pueden regular su acción y su distribución entre los fluidos corporales y los tejidos (Sara y Hall, 1990; Baxter, 1991; Holly, 1991). Por otro lado, protegen de un posible efecto hipoglucémico de las IGFs, ya que la IGF acomplejada a su proteína de transporte, a diferencia de la IGF libre, es incapaz de unirse a los receptores de insulina (Zapf *et al.*, 1986). La IGFBP-3 (40-45 kDa) es la más abundante en el plasma humano, y se encuentra formando un complejo de 150 kDa. Este complejo está constituido por la IGFBP-3 (subunidad β), una molécula de IGF-I o IGF-II (subunidad γ) y una proteína inestable en medio ácido sin capacidad de unión a la IGF (subunidad α) (Baxter y Martin, 1989). La IGFBP-3 es dependiente de la GH, está relacionada con los niveles de IGF-I y al parecer, también con la insulina. Está distribuida ampliamente por el organismo y puede estimular o inhibir la acción de las IGFs en función del equilibrio existente entre la membrana celular y el fluido extracelular (Conover, 1992; DeMellow y Baxter, 1988). Por el contrario,

la IGFBP-1 (25-29 kDa) no es dependiente de la GH y está inversamente relacionada con los niveles de insulina. Los factores que regulan la IGFBP-2 (30-35 kDa) son menos claros todavía, aunque todo indica que podría ser inducida específicamente por la IGF-II, y por tanto tener un papel más importante durante el desarrollo fetal. A diferencia de la IGFBP-3, la expresión de IGFBP-2 e IGFBP-1 está muy restringida por el tejido y estado de desarrollo del organismo (Shimasaki y Ling, 1991). La IGFBP-5 (\approx 30 kDa) se halla localizada principalmente en la matriz extracelular donde potencia la acción de las IGFs. No obstante, cuando se encuentra en forma soluble es capaz de inhibir la acción de éstas (Jones *et al.*, 1993; Kiefer *et al.*, 1992). También se ha comprobado que la IGFBP-4 (\approx 25 kDa) y la IGFBP-6 (\approx 29 kDa) son potentes inhibidores de la mitogénesis inducida por IGFs en células del hueso y otros tipos celulares (Kiefer *et al.*, 1992). Recientemente, se ha demostrado que las células del estroma expresan predominantemente la IGFBP-4, la IGFBP-5 y la IGFBP-6, lo que ha llevado a sugerir que estas IGFBPs podrían regular la acción hematopoyética de las IGFs (Grellier *et al.*, 1995).

Por último es importante destacar que se han detectado IGFBPs en otros grupos de vertebrados, incluidas varias especies de poiquilotermos como tortugas (*Pseudemys scripta elegans*), sapos (*Bufo marinus* y *Bufo woodhousei*) y peces (trucha arco iris, tilapia y salmón coho) (ver Bern *et al.*, 1991). Sin embargo, el conocimiento alcanzado en estas especies está todavía muy lejos del existente en vertebrados superiores.

1.3.6. GH y sistema inmune

En mamíferos, está plenamente demostrado que el sistema hematopoyético requiere la presencia de GH para el normal funcionamiento y diferenciación de células eritroides, mieloides y linfoides. Así, la deficiencia en GH suele ir acompañada de anemia, trombocitopenia y leucopenia (Berczi y Nagy, 1991; Murphy *et al.*, 1992), mientras que un exceso de GH puede inducir esplenomegalia y leucemia aguda (Frohman, 1985; Stahnke y Zeisel, 1989). Estudios *in vitro* demuestran que la GH sola y/o mediante la producción de IGF-I estimula la eritropoyesis (Merchav *et al.*, 1988a), la granulopoyesis (Merchav *et al.*, 1988b), la proliferación de linfocitos (Marelli *et al.*, 1992) y la secreción de anión superóxido por parte de neutrófilos y macrófagos (Edwards *et al.*, 1988; 1992; Fu *et al.*, 1991). Se ha observado también que la administración de GH aumenta la actividad de las células agresoras naturales *in vivo* (Davila *et al.*, 1987). Por último, se ha visto que varias interleuquinas producidas por monocitos y macrófagos pueden incrementar la liberación de GH hipofisaria (Spangelo *et al.*, 1989; Bernton *et al.*, 1987). Se han detectado receptores de GH e IGF-I en leucocitos mononucleares (Kiess y Butenandt, 1985; Kooijman *et al.*, 1992), que son capaces de sintetizar y segregar GH e IGF-I (Weigent y Blalock, 1991; Varma *et al.*, 1993). Además, de acuerdo con Weigent *et al.* (1992), ambas hormonas son sintetizadas por la misma población de células, lo que podría constituir una regulación autocrina y/o paracrina dentro del sistema inmune.

En los teleósteos no se ha estudiado prácticamente esta acción de la GH sobre el sistema inmune, aunque hay evidencias de que existe. Tan solo se conocen un par de trabajos llevados a cabo en trucha arco iris. En ellos se demuestra la capacidad de la GH para aumentar la respuesta citotóxica inespecífica (Kajita *et al.*, 1992), así como la respuesta quimioluminiscente de las células fagocíticas (Sakai *et al.*, 1995). No obstante, cabe destacar otro más reciente, llevado a cabo por nuestro equipo, en el que se demuestra la presencia de receptores de GH en células de la serie eritroide, mieloide y linfoide. La funcionalidad de estos receptores se ha demostrado *in vitro*, al comprobar que la GH ejerce un efecto mitogénico en cultivos primarios de leucocitos procedentes del riñón anterior de la dorada (Calduch-Giner *et al.*, 1995). Actualmente, se están llevando a cabo experiencias *in vivo* e *in vitro* que demuestran la capacidad de la GH para estimular la actividad fagocítica de neutrófilos y monocitos/macrófagos.

2. Objetivos

2.1. ESPECIE EN ESTUDIO. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL Y OBJETIVOS.

La dorada (*Sparus aurata*) es un teleósteo marino perteneciente a la familia de los espáridos. Esta familia, incluida en el orden Perciformes, agrupa 29 géneros y unas 100 especies. Poseen un cuerpo oval y comprimido, y su carne suele ser muy apreciada. De todas estas especies, la dorada es la que tiene una mayor importancia económica. En los últimos años se ha extendido su cultivo por toda el área mediterránea, llegando a ser junto con la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y el lenguado (*Solea solea*) las especies de mayor interés para la acuicultura marina de la Unión Europea.

Su área de distribución comprende el Mediterráneo, el Mar Negro, y la parte Este del Océano Atlántico desde Senegal hasta las Islas Británicas. Es una especie euriterma y eurihalina. Su hábitat natural son las zonas costeras, pudiéndose encontrar en desembocaduras de ríos, deltas y esteros. Es una especie hermafrodita proterándica con una primera etapa en la que actúa como macho, y otra posterior, en la que sufre un proceso de inversión sexual y se comporta como hembra. Este proceso de inversión sexual consiste en la degeneración de la zona testicular de la gónada, al tiempo que se desarrolla la zona ovárica.

Los primeros cultivos de dorada se remontan a la época de los romanos, si bien es en la última década cuando empiezan a adquirir gran importancia como consecuencia de los grandes avances en su cría larvaria. La generalización de su cultivo ha hecho aumentar notablemente los conocimientos sobre su fisiología, si bien en ésta como en otros teleósteos siguen existiendo notables lagunas.

Es un hecho reconocido que la hormona de crecimiento (GH) es el factor endocrino con una mayor incidencia en el crecimiento de los vertebrados. En varias especies de peces, se ha aislado, secuenciado, y clonado el cDNA que codifica para la GH. Sin embargo, la disponibilidad de formas nativas y/o recombinantes de GH sigue siendo un factor limitante en el estudio de los procesos que regulan el crecimiento de los vertebrados inferiores. De ahí, que uno de los objetivos prioritarios del grupo de Endocrinología del Crecimiento del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS) haya sido la obtención de GH nativa de dorada, lo que ha permitido el desarrollo de un radioinmunoensayo (RIA) para cuantificar niveles circulantes e hipofisarios en varias especies de espáridos (Le Bail *et al.*, 1993a). Paralelamente, y a lo largo del transcurso de esta Tesis Doctoral, se ha aislado, clonado, secuenciado y expresado el cDNA codificante para la GH de dorada (Martínez-Barberá *et al.*, 1994). Por consiguiente, actualmente, la disponibilidad de GH de dorada es prácticamente ilimitada, lo que ha permitido en estos 4 años abordar, por primera vez en un teleósteo marino, diferentes aspectos relacionados con el sistema somatotrópico:

- **Desarrollo de un ensayo homólogo de receptores de GH. *Validación de un RIA heterólogo para cuantificar la actividad somatomédica del plasma de dorada.***
- **Estudio de la ontogenia del sistema somatotrópico.**
- **Interrelación entre las variaciones estacionales de crecimiento y la actividad del sistema somatotrópico.**
- **Desarrollo de un modelo de regulación nutricional en el que se consideran factores como la edad y las variaciones interespecíficas en los niveles de GH circulante.**

3. Receptores Hepáticos de GH y Actividad Somatomedínica. Efecto del Ayuno y la Realimentación.

RESUMEN. El objetivo de este capítulo fue desarrollar un ensayo homólogo de radioligandos para cuantificar y caracterizar los receptores de GH en la dorada. Asimismo, se puso a punto un ensayo heterólogo de IGF-I que nos permitió valorar la actividad somatomédica del plasma. La unión específica de la GH de dorada (dGH) a los preparados de membranas hepáticas resultó ser un proceso dependiente del tiempo y de la temperatura, siendo además saturable con cantidades crecientes de membranas hepáticas. La transformación *Scatchard* evidenció la existencia de uno o más *loci* de unión con la misma afinidad. La prolactina ovina (oPRL), la prolactina recombinante de tilapia (rtiPRL), la gonadotropina de carpa (cGtH) y la gonadotropina de salmón chinook (sGtH) no compitieron por los receptores hepáticos de GH. En cambio, la GH recombinante de trucha (rtGH), la GH bovina (bGH) y la GH humana (hGH) desplazaron de una forma dosis-dependiente la ¹²⁵I-dGH unida específicamente a sus receptores. El plasma de dorada, previa acidificación y eliminación de las proteínas de transporte de las IGFs (IGFBPs), mostró reacción cruzada en un radioinmunoensayo (RIA) de IGF-I humana (hIGF-I). Para validar fisiológicamente este ensayo, se llevó a cabo una experiencia de ayuno y realimentación en la que se valoró la actividad somatomédica y los receptores hepáticos de GH. La actividad somatomédica del plasma disminuyó con el ayuno, alcanzándose de nuevo los valores controles durante el periodo de realimentación. Se observó un comportamiento similar con los receptores hepáticos de GH.

Nota: Este trabajo ha sido publicado recientemente en la revista *Journal of Fish Biology* 44: 287-301 (1994).

3.1. INTRODUCCIÓN

Los receptores de GH han sido caracterizados en unas pocas especies de peces, y en ocasiones, utilizando ensayos heterólogos como es el caso de *Gillichthys mirabilis* y *Acipenser transmontanus* (Tarpey y Nicoll, 1985). La obtención de GHs nativas y recombinantes ha permitido desarrollar ensayos homólogos capaces de caracterizar estos receptores en anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Hirano, 1991), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Gray *et al.*, 1990), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Yao *et al.*, 1991) y en varias especies del género *Oreochromis* (Fryer, 1979; Ricordel *et al.*, 1995). También se ha demostrado la presencia de receptores en el hipotálamo, telencéfalo, tálamo y cerebelo de la trucha arco iris (Pérez-Sánchez *et al.*, 1991). Además, recientemente, Le Gac *et al.* (1992) han caracterizado los receptores de GH en el testículo de trucha. No obstante, no se han desarrollado ensayos similares en especies del orden Perciformes, grupo de teleósteos en el que se encuentra la dorada. Por consiguiente, ante la necesidad de disponer de un ensayo capaz de cuantificar y caracterizar estos receptores, se planteó como primer objetivo el desarrollo de un ensayo homólogo para la GH de dorada (dGH). Como radioligando se utilizó una GH nativa que ya había sido empleada en un radioinmunoensayo (RIA) homólogo de elevada sensibilidad y especificidad (Le Bail, Mourot, Zohar y Pérez-Sánchez, 1993a).

Tal y como se ha descrito en el primer capítulo, el gen que codifica la molécula de IGF-I ha variado muy poco a lo largo de la evolución. De hecho, la secuencia nucleotídica-aminoacídica del mRNA y de la proteína madura se ha conservado notablemente en los vertebrados (Ellsworth *et al.*, 1994). Esta similitud ha hecho posible la utilización de RIAs de mamíferos para valorar la actividad somatomedínica en diferentes especies de peces (Furlanetto *et al.*, 1977; Wilson y Hintz, 1982; Lindhal *et al.*, 1985; Daughaday *et al.*, 1985; Funkenstein *et al.*, 1989; Ng *et al.*, 1991). Este también es el caso de la dorada, tal y como se desprende de nuestros resultados. Para validar fisiológicamente un ensayo de IGF-I humana se llevó a cabo una experiencia de ayuno y realimentación. En cualquier caso, conscientes de las limitaciones que supone la utilización de ensayos heterólogos, estamos trabajando actualmente con el grupo del Dr. Manuel M. Valdivia de la Facultad de Ciencias (Universidad de Cádiz) en el aislamiento, clonaje y secuenciación de los cDNAs que codifican para la IGF-I y la IGF-II de dorada.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Hormonas.

La hormona de crecimiento de dorada se purificó a partir de extractos hipofisarios de acuerdo con el protocolo descrito para la GH de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), sGH (Le Bail *et al.*, 1989). La caracterización electroforética de la dGH evidenció 2 bandas monoméricas que correspondían a las formas reducida y oxidada, siendo esta última la mayoritaria. Mediante inmunocitoquímica se comprobó que los anticuerpos de conejo contra la dGH reconocían las células somatotropas de la parte proximal de la *pars distalis* de la hipófisis de dorada (Le Bail *et al.*, 1993a).

La IGF-I humana recombinante (rhIGF-I) fue proporcionada por el Dr. K. Müller (Ciba-Geigy, Basel, Suiza). El antisuero de conejo (UB3-189) contra la hIGF-I fue preparado por L. Underwood y J.J. Van Wyk (*University of North Caroline at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA*) y distribuido a través del *National Hormone and Pituitary Distribution Program* (Baltimore, MD, USA). Este anticuerpo de conejo no presenta reacción cruzada con la insulina ni con la IGF-II.

Capítulo 3

La prolactina ovina (oPRL), la GH humana (hGH) y la GH bovina (bGH) fueron suministradas por el *National Hormone and Pituitary Distribution Program*. La gonadotropina de salmón chinook (sGtH) y de carpa (cGtH) fueron proporcionadas por el Dr. B. Breton (*Lab. Physiologie des Poissons*, Rennes, Francia). La prolactina recombinante de tilapia (rtiPRL) y la GH recombinante de trucha (rtGH) fueron donadas por el Dr J. Smal (Eurogentec, Liège, Bélgica).

3.2.2. Iodación.

Tanto la dGH como la rhIGF-I se iodaron por el método de la cloramina-T (Greenwood *et al.*, 1963) modificado por Martal (1972) (Fig. 3.1). A 5-10 µg de proteína, inicialmente disuelta en 2-3 µl de NaOH 10 mM (dGH) ó 2-3 µl de HCl 10 mM (rhIGF-I), se añadieron 7 µl de tampón fosfato 0,3 M, NaCl 1 %, (pH=7,2). Para el marcaje propiamente dicho, se agregaron 0,6-0,7 mCi (3,7 GBq·ml⁻¹) de ¹²⁵I y 2,8 µg de cloramina-T en 7 µl de tampón fosfato. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 3 min, parándose la reacción con 2,8 µg de metabisulfito sódico disuelto en tampón fosfato. La separación del iodo libre se llevó a cabo por cromatografía de filtración en Sephadex G-25 (columna PD10, Pharmacia), utilizando como eluyente Tris-HCl 20 mM con azida sódica al 0,05 % y albúmina bovina (BSA) al 1 % (pH=7,2). La hormona marcada se recromatografió en una columna de Sephacryl S-200 (100 x 1 cm), calibrada previamente con azul dextrano (2.000 kDa), gammaglobulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa), mioglobina de caballo (17 kDa), ¹²⁵I-rhIGF-I (7,5 kDa) y vitamina B-12 (1,35 kDa). La columna se eluyó con tampón Tris-HCl 20 mM (pH=7,5) en presencia de NaCl 0,15 M, azida sódica al 0,02 % y BSA al 0,3 %, a un flujo de 10-15 ml·h⁻¹. Tanto para la GH como para la IGF-I, la actividad específica osciló entre 40-60 µCi·µg⁻¹. Ambas hormonas se mantuvieron estables durante 2 meses en glicerol (1:1 v/v) a -20°C.

Dado que la cromatografía en Sephacryl S-200 no supuso una mejora en la calidad del trazador, se eliminó de forma rutinaria esta segunda cromatografía. No obstante, cabe destacar la importancia que tuvo en un principio, ya que nos permitió comprobar que después del marcaje la dGH y la rhIGF-I seguían apareciendo como formas monoméricas de aproximadamente 20 y 7,5 kDa, respectivamente.

5-10 μg de hormona en tampón fosfato 0,3 M



+ 7 μl de cloramina T ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)

+ 7 μl de ^{125}I



Incubación 2-3 min a temp. ambiente



+ 7 μl de metabisulfito ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)



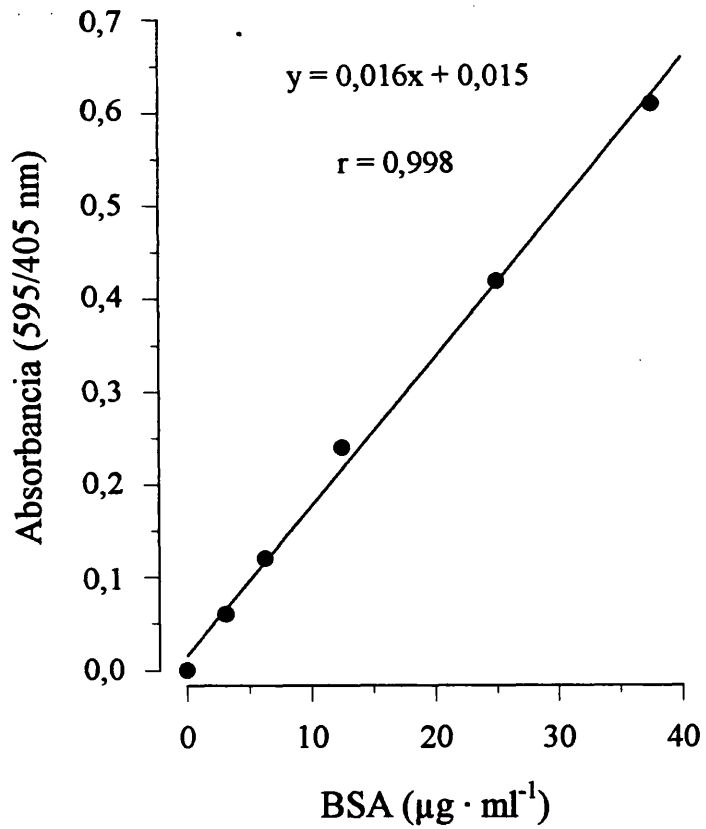
Elución en Sephadex G-25 (PD10 Pharmacia), equilibrada previamente con 25 ml de Tris 20 mM con azida sódica y BSA

Fig. 3.1. Iodación de dGH y rhIGF-I por el método de la cloramina-T. BSA, albúmina de suero bovino. Tampón fosfato, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$.

3.2.3. Procesado de membranas y ensayo de radiorreceptores (RRA).

Diferentes muestras de hígado, músculo, cerebro y grasa visceral se lavaron con tampón A (Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM y azida sódica 0,1 %, pH=7,5) y se llevaron a una concentración de 1 g de tejido inicial por 2,5 ml de tampón. Dicha suspensión se homogeneizó con un Polytron, filtrándose posteriormente por una malla de nylon con un poro de 1 mm de diámetro. El homogeneizado se centrifugó a 3.000 g durante 15 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en el tampón A y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Finalmente, se llevó a cabo una nueva resuspensión del precipitado con el tampón B (tampón A suplementado con inhibidor de tripsina al 1,5 % y ácido ascórbico 3 mM) diluido 1:1 en glicerol, con el fin de mejorar la preservación de las muestras durante su almacenamiento a -20 °C.

Momentos antes del ensayo de receptores, se procedió a la eliminación del glicerol presente en las preparaciones de membranas. El método de Bradford (1976), adaptado a microplacas, se utilizó para cuantificar el contenido proteico de las muestras analizadas (Fig. 3.2).



160 μl de estándar o muestra
+ 40 μl de Coomassie G-250



Incubación 5 min a temp. ambiente



Lectura en el Lector de Placas

Fig 3.2. Ensayo de proteínas solubles por el método de Bradford adaptado a microplacas. BSA, albúmina de suero bovino.

Capítulo 3

El ensayo de receptores, propiamente dicho, consistió en incubar las membranas con ^{125}I -dGH en presencia o ausencia de un exceso de hormona fría ($1\mu\text{g}$). Después de 14-20 h de incubación a $15\text{ }^\circ\text{C}$, se añadieron 3 ml de tampón A para separar por centrifugación (3.000 g, 15 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$) la ^{125}I -dGH unida de la libre. El sobrenadante se eliminó por decantación y la radioactividad presente en el precipitado se cuantificó en un contador gamma (Packard, Cobra 5002) (ver Fig. 3.3).

La unión total (Bt) (específica (B) + inespecífica (N)) se define como la radioactividad presente en los tubos incubados en ausencia de un exceso de hormona fría.

La unión inespecífica (N) se define como la radioactividad presente en los tubos incubados en presencia de un exceso de hormona fría ($1\text{ }\mu\text{g}/\text{tubo}$).

La unión específica (B) es el resultado de la diferencia entre la unión total (Bt) y la inespecífica (N).

Bt, N y B se expresan como porcentaje del número total de cpm añadidas a cada tubo (actividad total, AT).

$$\text{Bt (\%)} = \text{Bt}_{\text{cpm}} \cdot (\text{AT}_{\text{cpm}})^{-1} \cdot 100$$

$$\text{N (\%)} = \text{N}_{\text{cpm}} \cdot (\text{AT}_{\text{cpm}})^{-1} \cdot 100$$

$$\text{B (\%)} = (\text{Bt}_{\text{cpm}} - \text{N}_{\text{cpm}}) \cdot (\text{AT}_{\text{cpm}})^{-1} \cdot 100$$

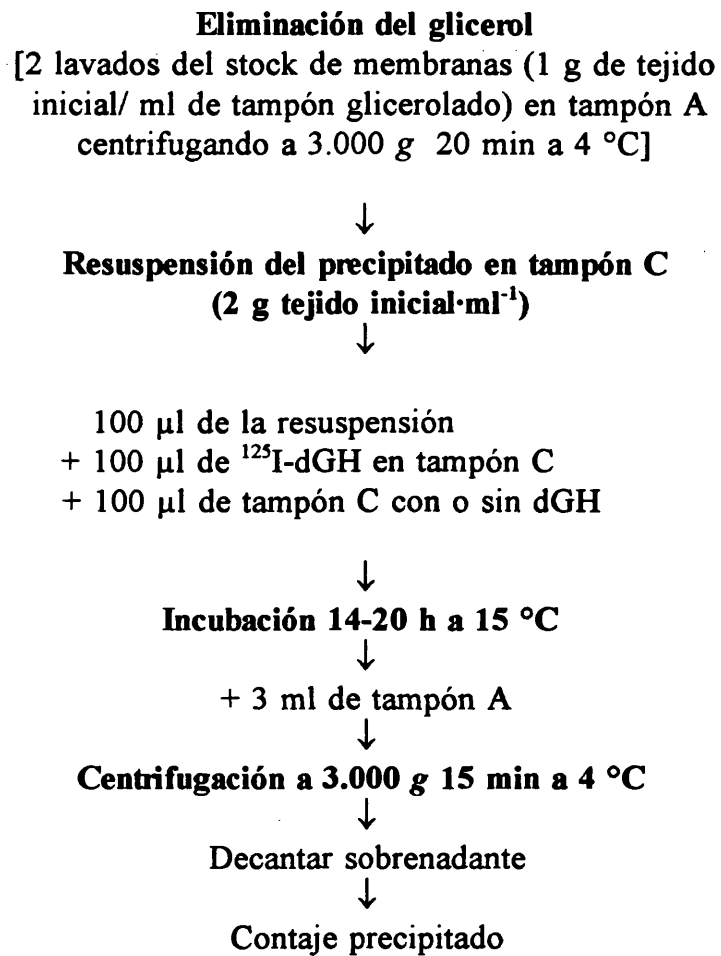


Fig. 3.3. Ensayo de receptores libres de GH. Para la composición de los tampones véase Cuadro 3.I.

CUADRO 3.I Tampones utilizados en el ensayo de radiorreceptores.

■Tampón de lavado (A), pH= 7,5:	Tris-HCl	20 mM
	MgCl ₂	5 mM
	Azida sódica	0,1 %
■Tampón de conservación (B), pH= 7,5:	Inhibidor tripsina	1,5 mg·ml ⁻¹
	Ácido ascórbico en tampón A	3 mM
■Tampón de ensayo (C), pH=7,5:	Inhibidor tripsina	0,25 mg·ml ⁻¹
	Ácido ascórbico	0,5 mM
	BSA	0,75 %
	en tampón A	
■Tampón D (tampón C sin BSA), pH=7,5:	Inhibidor tripsina	0,25 mg·ml ⁻¹
	Ácido ascórbico en tampón A	0,5 mM
■Tampón E (tampón A + BSA al 0,1 %), pH=7,5:	Tris-HCl	20 mM
	MgCl ₂	5 mM
	Azida sódica	0,1 %
	BSA	0,1 %

Nota: BSA, albúmina de suero bovino.

3.2.4. Desaturación de los receptores.

Para determinar el número total de receptores hepáticos, se llevó a cabo una desaturación de los mismos tratando las membranas con $MgCl_2$ 4 mM, tal y como ha sido descrito en mamíferos (Kelly *et al.*, 1979; Maiter *et al.*, 1988) (ver Fig. 3.4).

Para verificar la eficacia de la disociación, se saturaron las membranas hepáticas con dGH fría ($200\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ o $50\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), se centrifugaron a 3.000 g, y el precipitado se sometió al tratamiento con $MgCl_2$. El número de receptores libres, disminuido por la preincubación con dGH, se restableció mediante la disociación con $MgCl_2$ (Cuadro 3.II).

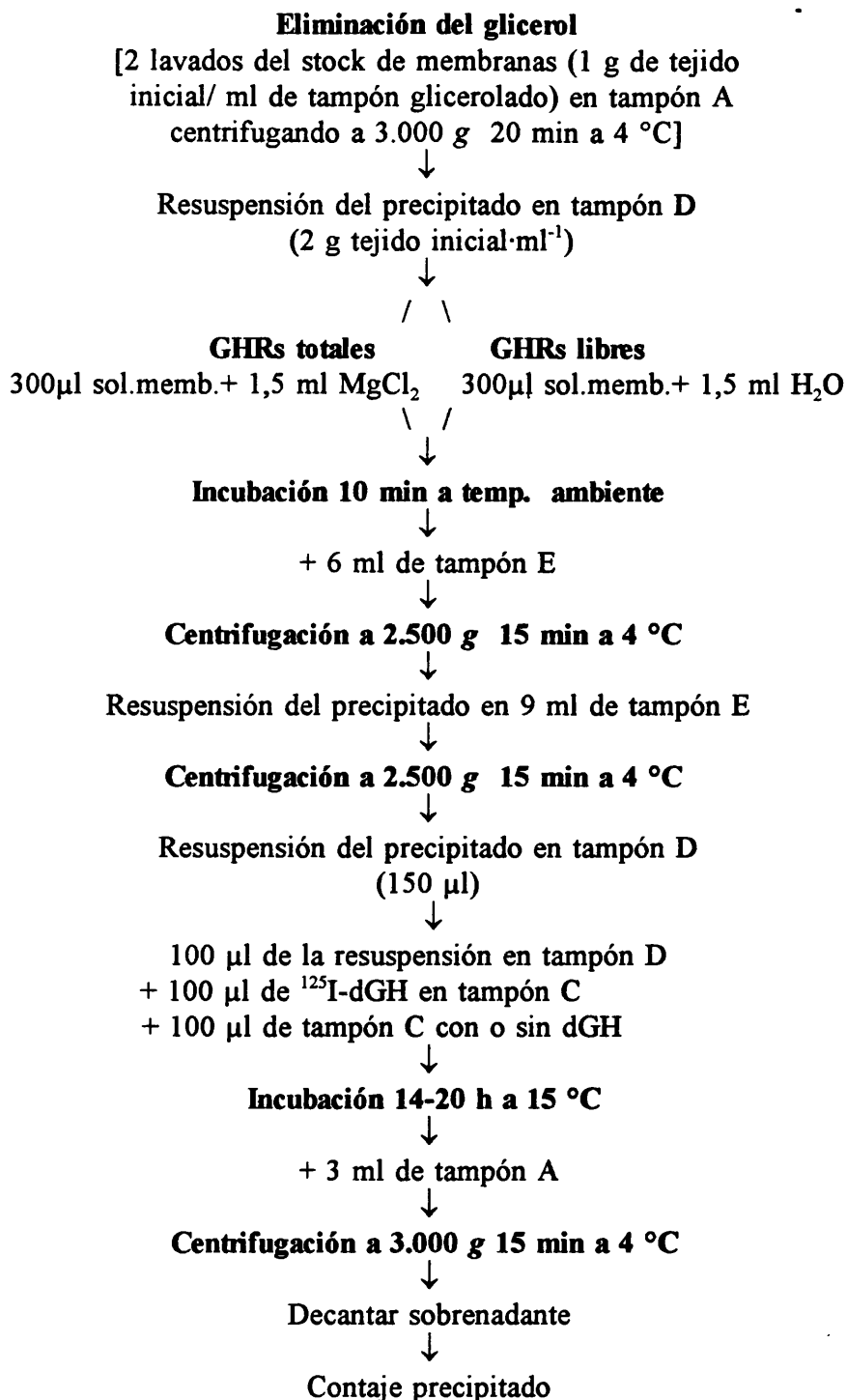


Fig. 3.4. Receptores totales y libres de GH. GHRs, receptores de GH. Para la composición de los tampones véase Cuadro 3.I.

CUADRO 3.II Desaturación de los receptores hepáticos de GH.

Preincubación	Tratamiento	Unión Específica	
		B (%)	% Control
Tampón ensayo (control)	H ₂ O destilada	14,1 ± 0,5	100
Tampón ensayo	MgCl ₂ 4 M	18,2 ± 0,8	129
+ dGH (50 ng·ml ⁻¹)	H ₂ O destilada	4,2 ± 0,3	29,7
+ dGH (50 ng·ml ⁻¹)	MgCl ₂ 4 M	17,2 ± 1,5	121,9
+ dGH (200 ng·ml ⁻¹)	H ₂ O destilada	0	0
+ dGH (200 ng·ml ⁻¹)	MgCl ₂ 4 M	18,4 ± 0,9	130,9

Nota. Los valores se expresan como la media±EEM de 3 determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media. La unión específica (B) se expresa como el porcentaje de la radioactividad unida específicamente a 200 µg de proteínas, B (%); y como tanto por ciento de los valores detectados en los controles, % Control.

3.2.5. Cromatografía de filtración ácida.

La disociación de las IGFs de sus proteínas de transporte (IGFBPs) constituye un paso previo indispensable para evitar las interferencias de estas últimas en el RIA. Ello se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de Zapf *et al.* (1980). El primer paso consistió en acidificar el plasma (1 ml), llevándolo a una concentración final de 0,5 M en ácido acético e incubándolo 1 h a 4 °C. Este plasma se cromatografió en una columna (50 x 0,7 cm) de Sephadex G-75, previamente calibrada con albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), quimiotripsinógeno (25 kDa) y ¹²⁵I-rhIGF-I (7,5 kDa). El volumen muerto o de vacío de la columna (V₀), definido como el volumen de elución del azul dextrano (2.000 kDa), fue de 7,5 ml. Las muestras se eluyeron a un flujo de 8 ml·h⁻¹ con ácido acético 1 M que contenía NaCl 150 mM y BSA al 0,1 % (pH=3,2). Se recogieron fracciones de 300 µl (15 gotas) para posteriormente ser neutralizadas con Tris base (200 mM, pH=9) en una proporción 1:5 (v/v).

3.2.6. Extracción ácida de IGFs en Sephadex CM-25.

Como proceso alternativo a la cromatografía de filtración, se procedió a la extracción de las IGFs en resinas de intercambio iónico (Sephadex CM-25). Un volumen de plasma (250 μ l) se acidificó con un volumen de ácido acético 1 M (pH=3,2) que contenía NaCl 150 mM. A continuación se incubaron las muestras durante 1 h a 4 °C, siguiéndose el protocolo descrito por Niu, Pérez-Sánchez y Le Bail (1993) en la trucha (ver Fig. 3.5). Para ello, se añadieron al plasma acidificado 500 μ l de una solución de Sephadex CM-25, previamente equilibrada en ácido acético. A continuación, se incubaron los tubos durante 30 min a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante obtenido al centrifugar los tubos a 3.000 g. El precipitado se incubó con 2 ml de ácido acético 10 mM (pH=3,2) durante 30 min a temperatura ambiente. De nuevo, se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Con ello se eliminaron las IGFBPs y se procedió a recuperar las IGFs, embebidas en la resina, mediante 3 lavados del precipitado con Tris-base (200 mM, pH=9). Los sobrenadantes se unieron y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis en el RIA de IGF-I. Para conocer el grado de recuperación de este método de extracción, se añadió una cantidad conocida de 125 I-rhIGF-I a varias muestras de plasma de dorada, se llevo a cabo la extracción y se midió la radioactividad que había quedado al final del proceso.

250 μ l de plasma + 250 μ l de Ácido acético 1 M
con NaCl 0,15 M (pH=3,2)



Incubación 1 h a 4 °C



+ 0,5 ml de Sephadex CM-25 hidratado en
Ácido acético 1 M con NaCl 0,15 M (pH=3,2)



Incubación 30 min a temp. ambiente
Centrifugación a 3.000 g 15 min a 4 °C



Decantación del sobrenadante



+ 2 ml de Ácido acético 10 mM (pH=3,2)



Incubación 30 min a temp. ambiente
Centrifugación a 3.000 g 15 min a 4 °C



Decantación del sobrenadante



▶ + 750 μ l de Tris-HCl 200 mM (pH=9)



▶ **Incubación 30 min a temp. ambiente**
▶ **Centrifugación a 3.000 g 15 min a 4 °C**



Recuperación del sobrenadante
(S1,S2,S3)



Reunión de los 3 sobrenadantes
(S1+S2+S3)

Fig. 3.5. Extracción de IGFs en CM-25. ▶, este proceso se repite 3 veces.

3.2.7. Radioinmunoensayo (RIA) de IGF-I.

A 100 μ l de estándar o plasma, sometido a extracción ácida, se añadieron 100 μ l de suero de conejo (1:2.500 en tampón de ensayo) anti-hIGF-I. Las muestras se incubaron 14-20 h a 15 °C, tras lo cual se añadieron 100 μ l de 125 I-rhIGF-I (15.000 cpm) en tampón de ensayo (tampón A', Cuadro 3.III). Después de una segunda incubación (14-20 h a 15 °C), se llevó a cabo la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo, añadiendo 100 μ l de suero de cabra (1:5, v/v) con anticuerpos dirigidos contra gamma-globulinas de conejo. Las muestras volvieron a incubarse durante 14-20 h a 15 °C. El ensayo finalizó al añadir 3 ml de tampón de lavado (tampón B', Cuadro 3.III) y centrifugar a 3.000 g, 45 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó por decantación y se midió la radioactividad presente en el precipitado (ver Fig. 3.6). La sensibilidad del ensayo, definida como la mínima cantidad de ligando capaz de desplazar significativamente ($p < 0,05$) el trazador unido al anticuerpo, fue de 0,2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. La unión inespecífica (BI) o porcentaje de trazador que precipitó en ausencia del 1^{er} anticuerpo (inmunoglobulinas de conejo anti-IGF-I) fue del 1 %. La unión específica en ausencia de hormona fría (Bo), definida como porcentaje del total de cuentas añadidas, fue del 40 %.



CUADRO 3.III Tampones utilizados en el radioinmunoensayo de IGF-I humana.

■ Tampón de ensayo (A'), pH=7,5:	Triton x100	0,1	%
	BSA (<i>RIA grade</i>) en tampón B'	1	%
■ Tampón de lavado (B'), pH= 7,5:	Tris-HCl	50	mM
	MgCl ₂	10	mM
	Azida sódica	0,05	%

Nota: BSA, albúmina de suero bovino.

100 μ l de estándar o extracto de plasma (1:2; v/v) en tampón A'
+ 100 μ l de suero anti-IGF-I en tampón A'
con NRS al 0,5 %



Incubación 14-20 h a 15 °C



+ 100 μ l de 125 I-IGF-I (15.000 cpm)
en tampón A'



Incubación 14-20 h a 15 °C



+ 100 μ l de 2° anticuerpo (ARMS)
al 20 % en tampón B'



Incubación 14-20 h a 15 °C



+ 3 ml de tampón B'



Centrifugación a 3.000 g 45 min a 4 °C



Decantación del sobrenadante



Contaje precipitado

Fig. 3.6. Radioinmunoensayo de hIGF-I para valorar la actividad somatomédica del plasma de dorada. NRS, suero de conejo no inmunizado. ARMS, suero de cabra anti-conejo. BSA, albúmina de suero bovino. Para la composición de los tampones véase Cuadro 3.III.

3.2.8. Ayuno.

En la experiencia de ayuno-realimentación se distribuyeron 140 doradas de 1 año de edad en 4 tanques de fibra de vidrio de 500 litros (35 doradas/tanque), con un flujo de agua de $15 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ y aireación constante. Después de un periodo de aclimatación de 3 semanas, se asignaron 2 tanques a cada tratamiento. Un tratamiento consistió en privar a los animales de su ración alimenticia durante 9 semanas (periodo de ayuno) y en alimentarlos normalmente durante las 2 semanas siguientes (periodo de realimentación). El otro tratamiento se utilizó como control y consistió en alimentar normalmente a los animales durante las 11 semanas que duró el experimento. Al inicio de la experiencia y a los 7, 21, 63 y 77 días de experimentación, se muestrearon 10 peces de cada tratamiento (ayunados y controles). Los animales se anestesiaron con MS-222 (etil-m-aminobenzoato) (Sigma) disuelto en agua ($0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) y se pesaron con una precisión de $\pm 0,1 \text{ g}$. La tasa instantánea de crecimiento (SGR) se calculó para cada lote experimental:

$$\text{SGR (\%)} = (\text{Ln } P_f - \text{Ln } P_0) \cdot d^{-1} \cdot 100$$

P_0 : peso medio inicial

P_f : peso medio final

d : días de experimentación

La sangre se extrajo por punción caudal y se colocó inmediatamente en tubos heparinizados. El plasma, obtenido por centrifugación a 3.000 g durante 20 min a 4 °C, se almacenó a -20 °C hasta ser analizado. Las membranas hepáticas se procesaron inmediatamente y se almacenaron a -20 °C en tampón B diluido en glicerol (1:1, v/v).

3.2.9. Análisis estadístico.

En las curvas de desplazamiento, obtenidas a partir de diluciones seriadas de hormonas y plasma, se llevó a cabo la transformación *logit* de los datos, se calcularon las pendientes y se compararon con las de rhIGF-I o dGH mediante un análisis de covarianza ($p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo). En la experiencia de ayuno-realimentación, se utilizó el análisis de la varianza de una vía y el test de Duncan para evaluar el efecto del tratamiento, así como la evolución temporal de los parámetros estudiados dentro de cada grupo.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Caracterización del receptor.

3.3.1.1. Cinética.

La unión de la GH a las membranas hepáticas resultó ser dependiente del tiempo y de la temperatura (Fig. 3.7):

A 4 °C, la unión específica de la ¹²⁵I-dGH a una cantidad fija de proteínas (250 µg) aumentó del 10 % al 22 % después de 1,5 y 22 h de incubación, respectivamente.

A 15 °C, la unión específica aumentó del 12 % (1,5 h) al 24 % a las 6 h de incubación, alcanzándose un estado estacionario entre las 14 y las 24 h.

A 24 °C, la unión específica fue máxima (22 %) a las 3 h, pero disminuyó gradualmente después de 6 h de incubación como consecuencia de la degradación del trazador y/o del receptor. Así pues, en busca de la mayor reproductibilidad posible de los resultados, todas las incubaciones posteriores se llevaron a cabo durante 14-20 h a 15 °C.

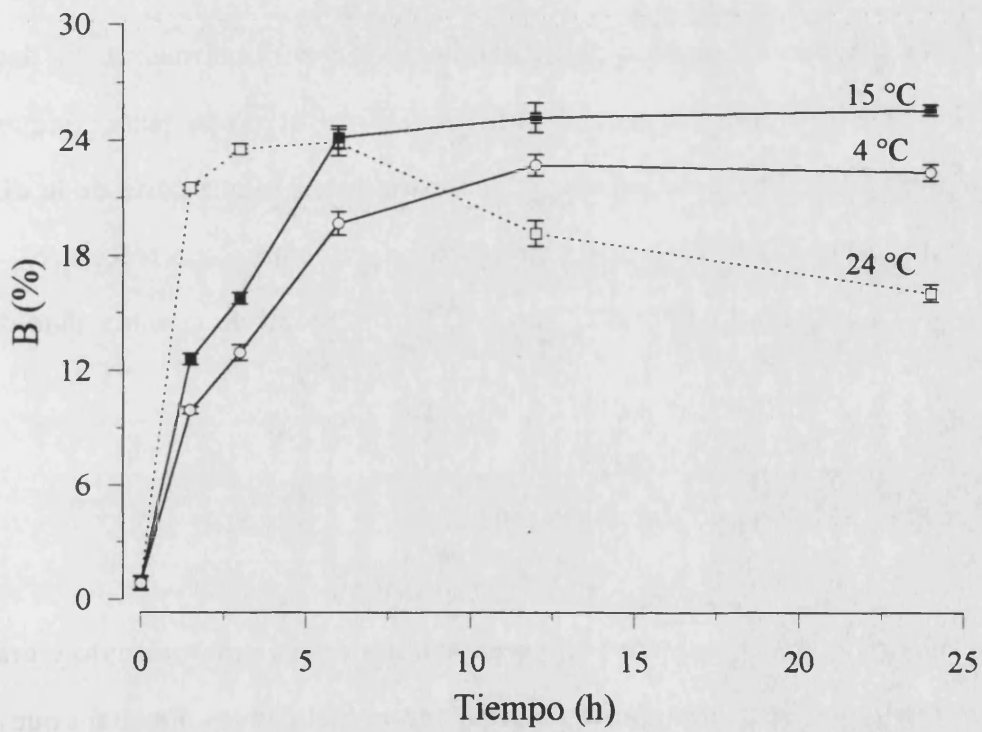


Fig. 3.7. Efecto del tiempo y de la temperatura de incubación en la unión específica (B) de ^{125}I -dGH (24.000 cpm) a membranas hepáticas de dorada. Cada punto representa la media \pm EEM de tres determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media.

3.3.1.2. Saturación de la hormona.

En la Fig. 3.8 se muestra cómo varió la unión de la GH con cantidades crecientes de membranas hepáticas. La unión específica (B) aumentó con la cantidad de proteínas hasta alcanzar un punto a partir del cual se formó una meseta. Es decir, la unión específica no siguió aumentando sino que se mantuvo constante aunque la cantidad de membranas fuese mayor. Ello demuestra que sólo una parte de la dGH marcada (hasta un 45 %) es capaz de unirse específicamente a sus receptores. La unión inespecífica (N) osciló entre el 7 % y el 15 % del total de cuentas añadidas.

3.3.1.3. Receptores de GH en diferentes tejidos.

Se detectó una unión considerable en las preparaciones de cerebro, músculo y grasa visceral. En cualquier caso, la unión específica fue notablemente más baja que en el hígado (Fig. 3.9).

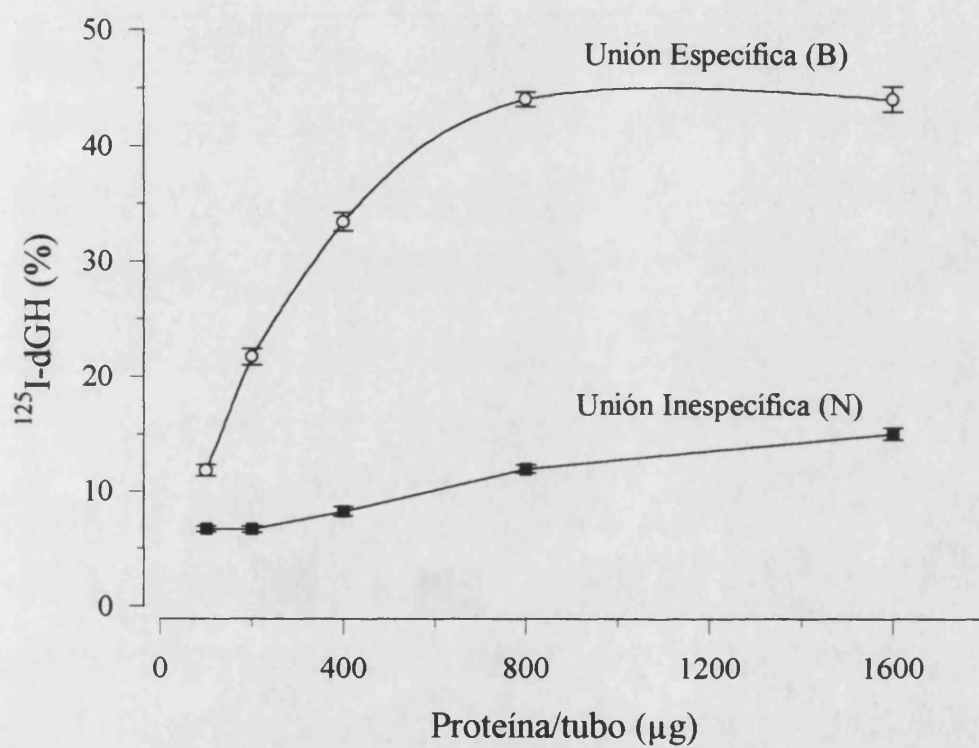


Fig. 3.8. Efecto de la cantidad de membranas hepáticas en la unión específica (o) e inespecífica (■) de ¹²⁵I-dGH (25.000 cpm). Cada punto representa la media±EEM de tres determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media.

3.3.1.2. Saturación de la hormona

En la Fig. 3.9 se muestra la unión total (Bt) y la unión inespecífica (N) de ^{125}I -dGH (30.000 cpm) a membranas de diferentes órganos de dorada. El valor de Bt se expresa como la media \pm EEM de 5 determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media.

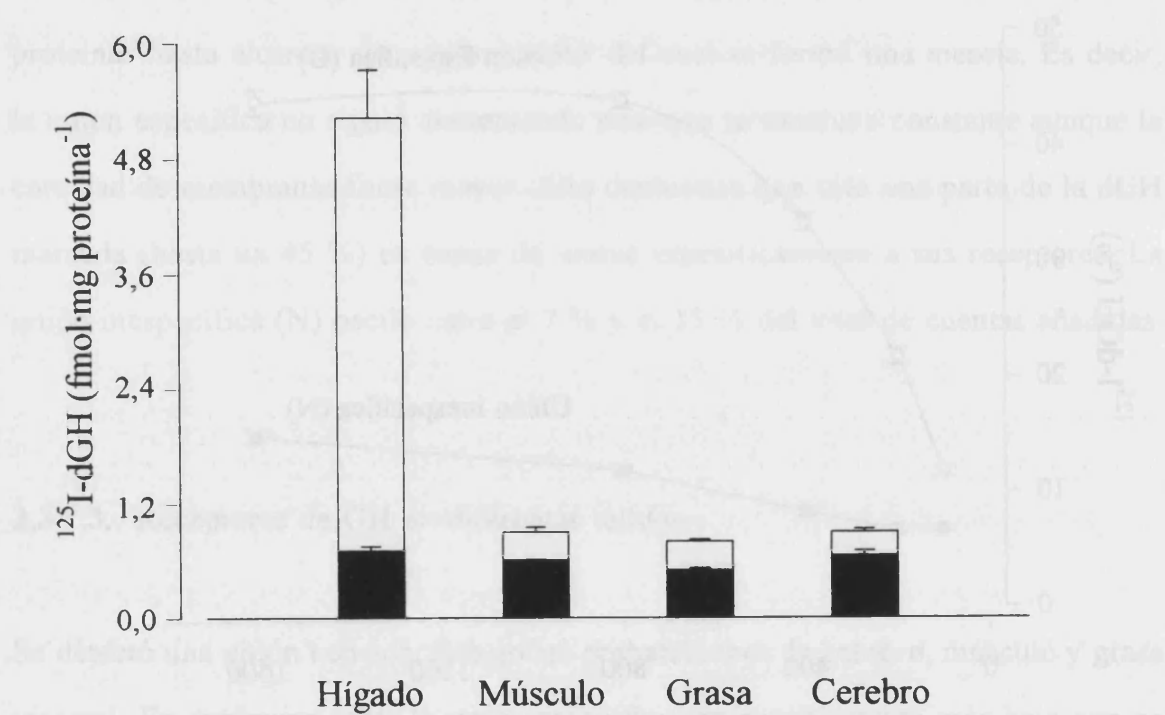


Fig. 3.9. Unión total (Bt, \square) e inespecífica (N, \blacksquare) de ^{125}I -dGH (30.000 cpm) a membranas de diferentes órganos de dorada. Los resultados se expresan como la media \pm EEM de 5 determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media.

3.3.1.4. Saturación de membranas (*Scatchard*).

Los análisis *Scatchard* se llevaron a cabo incubando una cantidad fija de membranas hepáticas con cantidades crecientes de dGH marcada (Fig. 3.10). La constante de afinidad (K_a) se definió como la pendiente/s de la recta/s de regresión. El número de receptores (B_{max}) se calculó como la intersección de esta recta con el eje de abcisas (Eje Y: unión específica/hormona libre presente en el incubado; Eje X: unión específica expresada como concentración picomolar). El ajuste lineal, con una sola pendiente, denota la presencia de uno o más *loci* de unión con la misma afinidad.

El cuadro 3.IV resume el efecto del tratamiento con $MgCl_2$ sobre el B_{max} y la K_a . La constante de afinidad (K_a) no varió prácticamente con el tratamiento, mientras que se observó un aumento estadísticamente significativo en el número total de receptores (libres + ocupados por la GH endógena), cuya magnitud dependió de la muestra analizada.

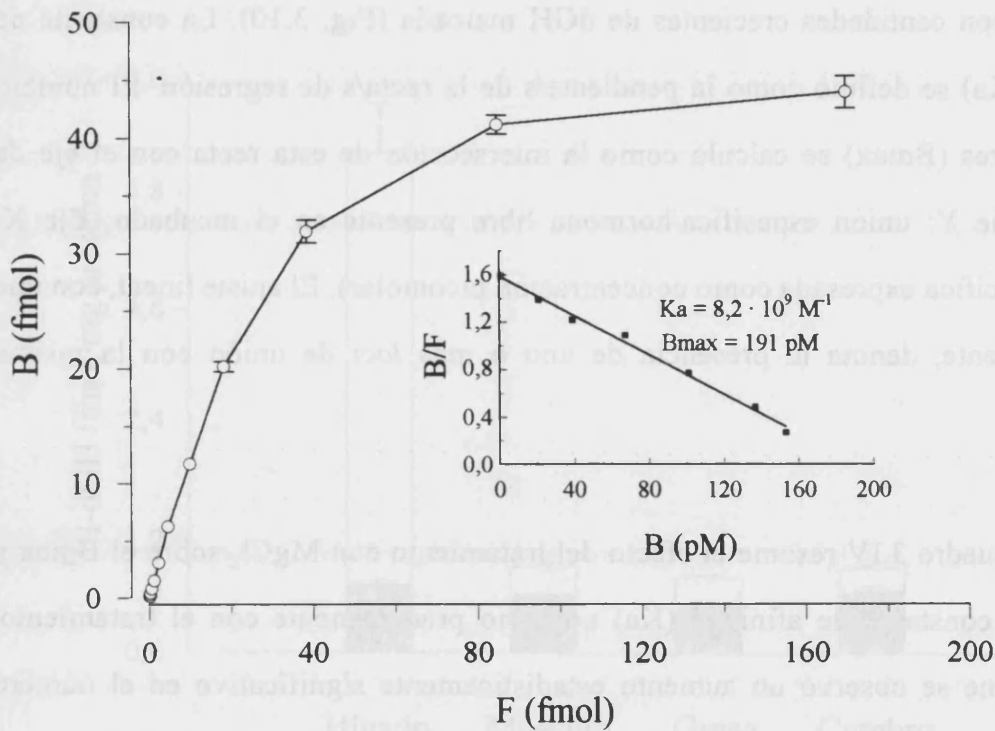


Fig. 3.10. Saturación de las membranas hepáticas (250 µg de proteína) con cantidades crecientes de ¹²⁵I-dGH.

B, unión específica.

F, ¹²⁵I-dGH libre.

$$F = ({}^{125}\text{I-dGH añadida} - B_t) \cdot B' \cdot 100^{-1}$$

B_t, unión total.

B', valor asintótica (40-45 %) alcanzado en la saturación de la ¹²⁵I-dGH con cantidades crecientes de membranas hepáticas (ver Fig. 3.8).

Cada valor representa la media±EEM de tres determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media. La gráfica insertada muestra la transformación *Scatchard* de los datos. K_a, constante de afinidad. B_{max}, número de receptores.

CUADRO 3.IV. Afinidad (Ka) y capacidad (Bmax) de suspensiones de membranas hepáticas de dorada tratadas (MgCl₂, 4 M) y no tratadas (H₂O destilada).

Membranas hepáticas	Ka (M ⁻¹)	(Bmax) (fmol·mg proteína ⁻¹)
No Tratadas	6,8 ± 0,7 · 10 ⁹	150,5 ± 15,3
Tratadas	7,1 ± 1,1 · 10 ⁹	195,8 ± 20,2

Nota. Los valores se expresan como la media±EEM de 3-4 determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media.

3.3.1.5. Especificidad.

Para determinar la especificidad del ensayo, se incubó una cantidad fija de membranas hepáticas (250 μ g) y de dGH iodada (30.000 cpm) con diluciones seriadas de hormonas no marcadas (Fig. 3.11). La oPRL, la rtiPRL, la cGtH y la sGtH no desplazaron la 125 I-dGH unida específicamente a sus receptores. La hGH y la bGH desplazaron la dGH iodada de una forma dosis-dependiente. Sin embargo, en comparación con la dGH, su ED₅₀ (cantidad de hormona que disminuye al 50 % la unión específica del ligando) fue 20-40 veces mayor. En contraste, el poder inhibitorio de la rtGH resultó ser muy similar al de la dGH, su ED₅₀ fue tan sólo 2 veces mayor.

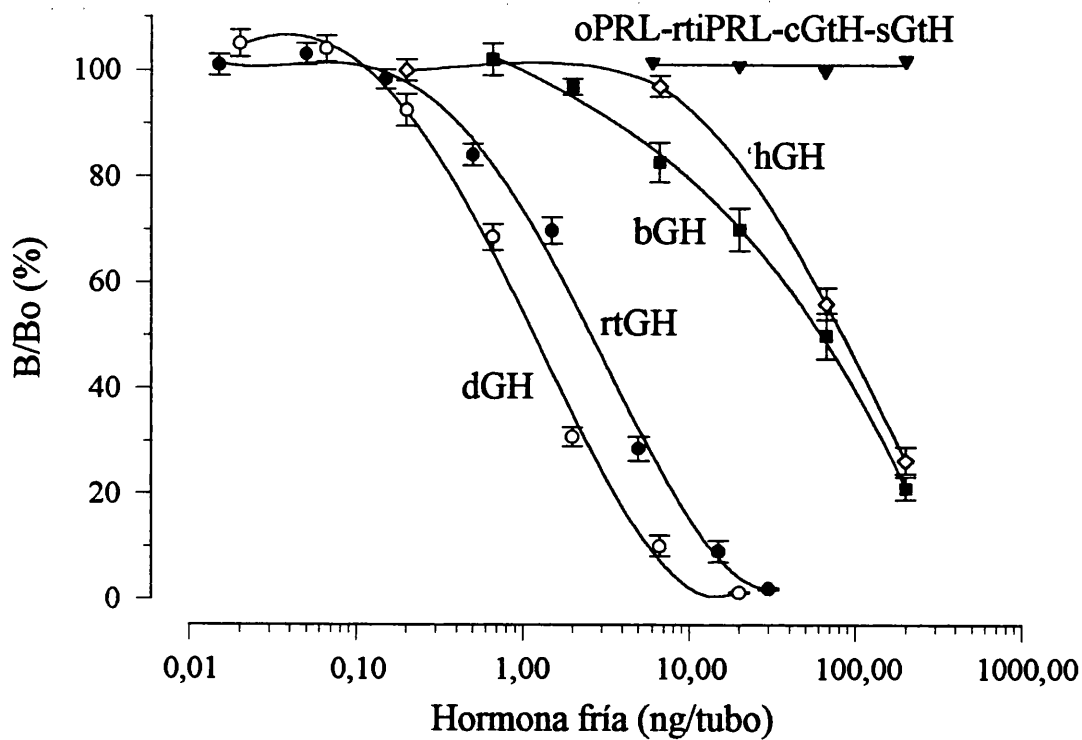


Fig 3.11. Desplazamiento de ^{125}I -dGH (30.000 cpm) unida específicamente a membranas hepáticas de dorada (250 μg de proteína). B_0 , unión específica en ausencia de hormona no marcada. B , unión específica en presencia de cantidades crecientes de hormona no marcada. dGH, GH de dorada; rtGH, GH recombinante de trucha; hGH, GH humana; bGH, GH bovina; oPRL, prolactina ovina; rtiPRL, prolactina recombinante de tilapia; cGtH, gonadotropina de carpa; sGtH, gonadotropina de salmón chinook. Cada valor representa la media \pm EEM de 4 determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media.

3.3.2. RIA IGF-I

En la Fig. 3.12A se muestra el perfil cromatográfico del plasma de dorada sometido a acidificación y separación en Sephadex G-75. Al analizarse las muestras con el RIA de IGF-I, se detectó un pico de 50-60 kDa (pico I) y otro de 7-8 kDa (pico II).

También se caracterizaron las muestras de plasma sometidas a extracción ácida con Sephadex CM-25. Cuando estos extractos plasmáticos fueron concentrados en filtros Millipore (*ultrafree-MC filters*, peso molecular de corte 5 kDa) y cromatografiados en columna de Sephadex G-75, no se detectó el pico I sin que ello supusiera la desaparición del pico II (Fig. 3.12B).

A lo largo del proceso de extracción con Sephadex CM-25, la recuperación de ^{125}I -rhIGF-I añadida al plasma osciló entre el 85 % y el 95 %. Diluciones seriadas de los extractos plasmáticos obtenidos con Sephadex CM-25 generaron curvas de desplazamiento paralelas al estándar de rhIGF-I (Fig. 3.13).

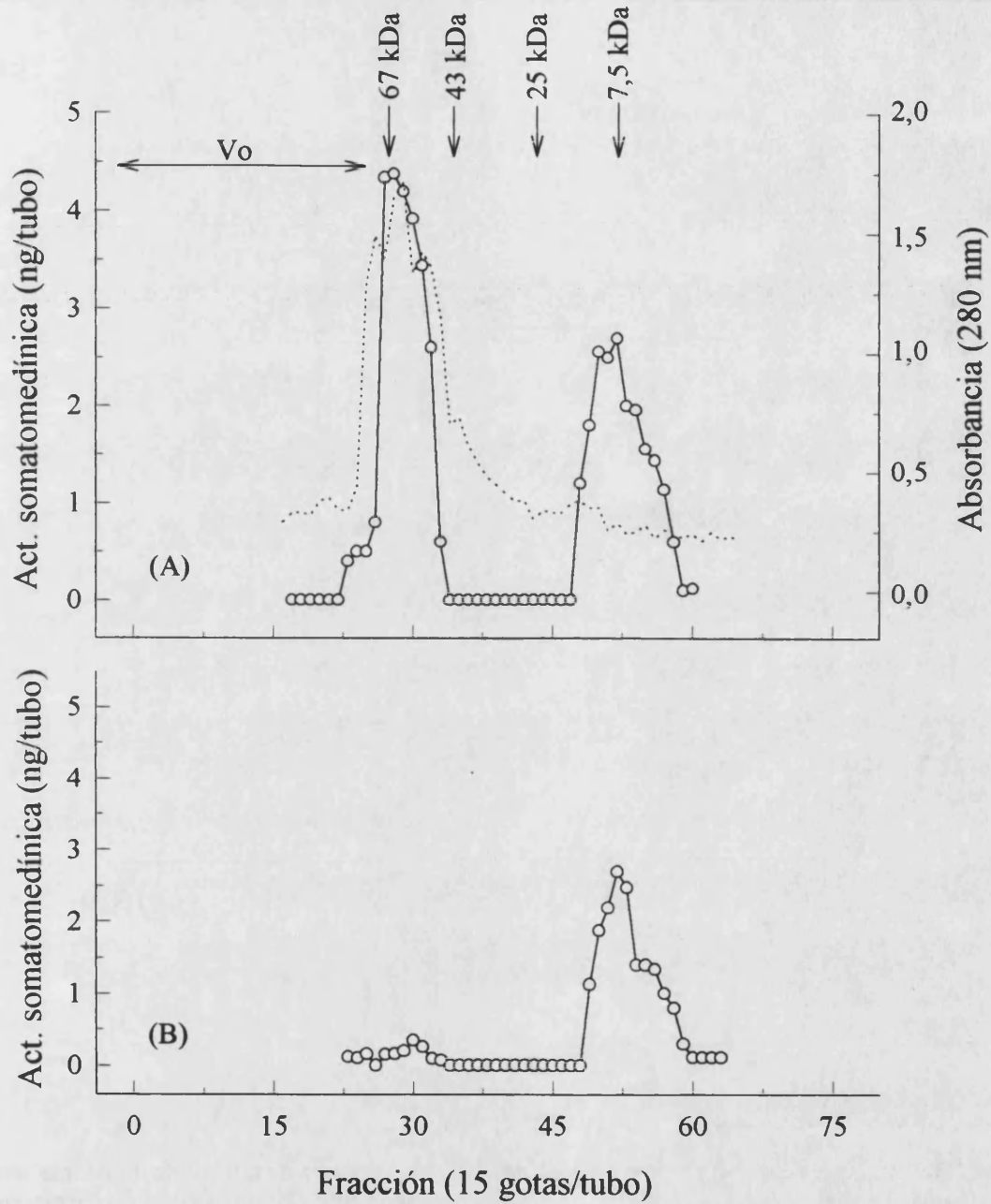


Fig. 3.12. Cromatografía de filtración ácida del plasma de dorada en columna de Sephadex G-75 antes (A) y después (B) de la extracción con CM-25. Actividad somatomedínica de las fracciones colectadas (-o-). La absorbancia a 280 nm se muestra en la misma gráfica (--). Vo; volumen muerto. Las flechas indican los marcadores de peso molecular utilizados; albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), quimiotripsinógeno A (25 kDa) y ^{125}I -rhIGF-I (7,5 kDa).

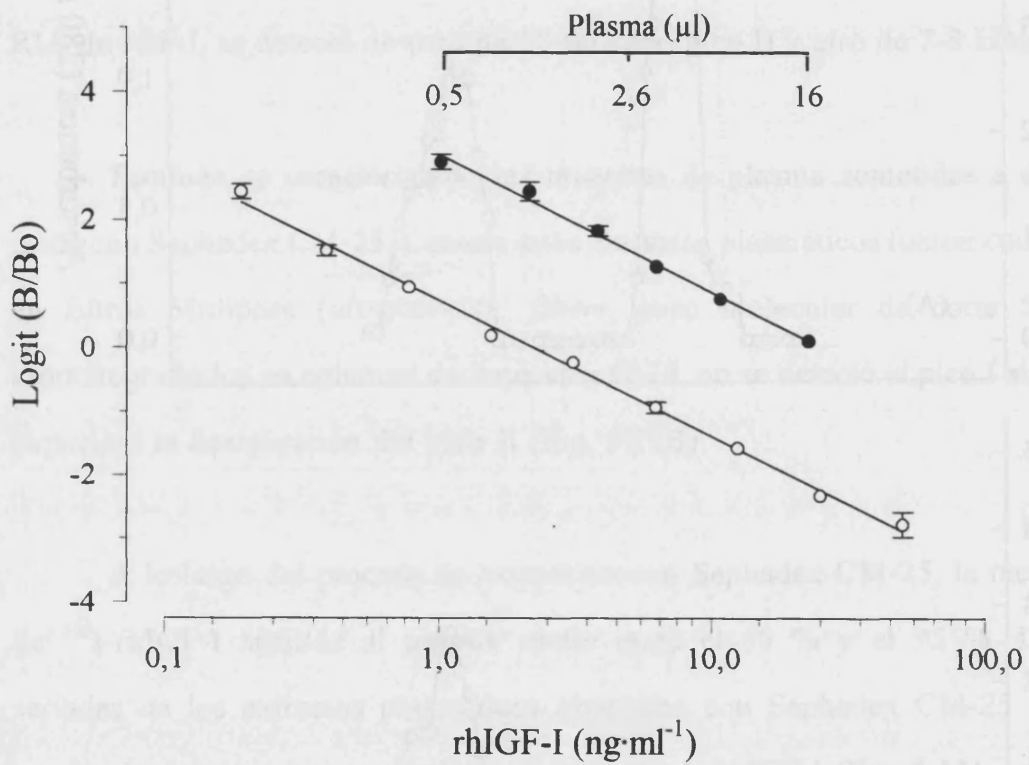
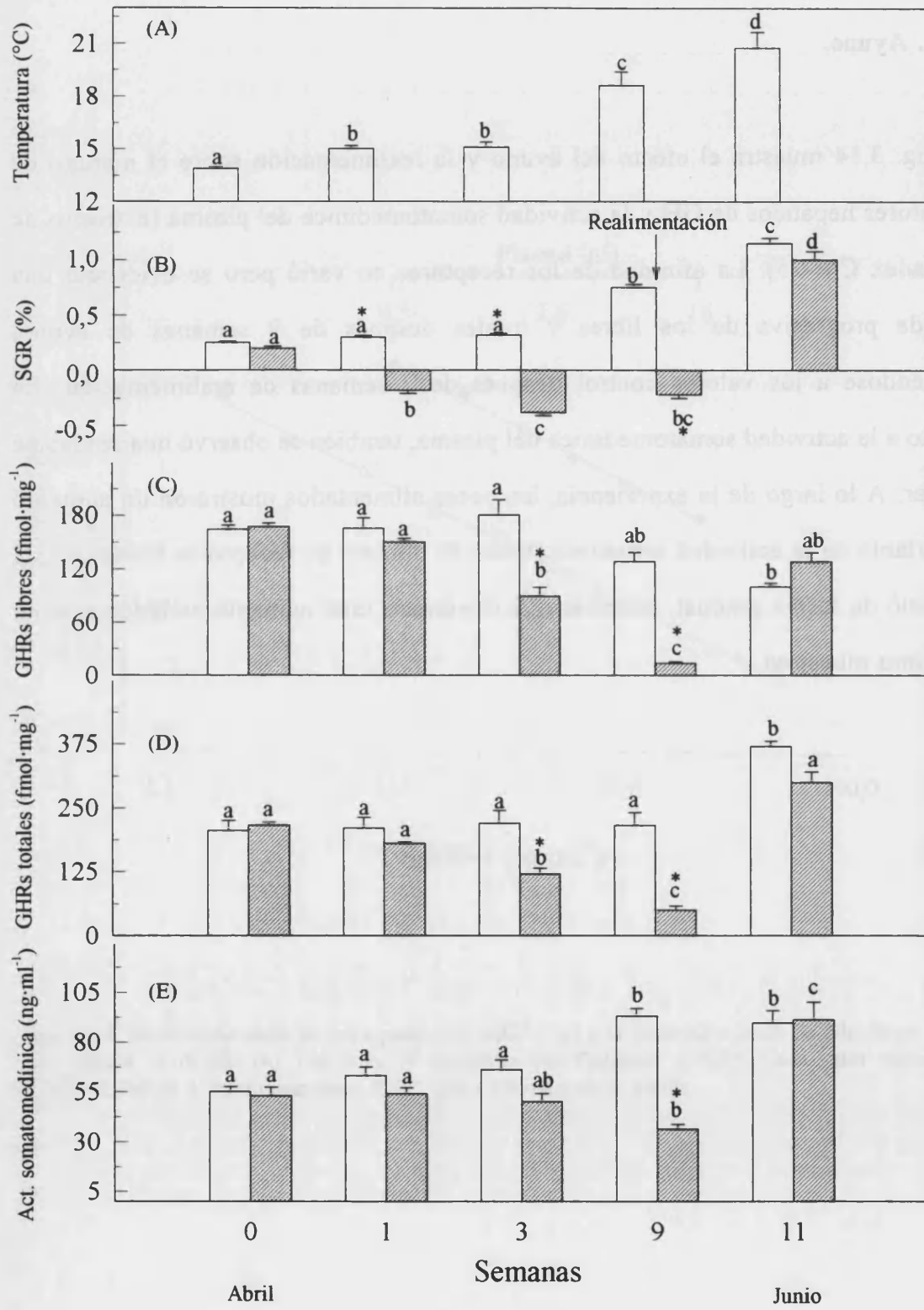


Fig. 3.13. Paralelismo entre la curva patrón de rhIGF-I (o) y la obtenida a partir de diluciones seriadas del plasma de dorada (●). Las IGFs se extrajeron con Sephadex CM-25. Cada valor representa la media±EEM de 4 determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media.

3.3.3. Ayuno.

La Fig. 3.14 muestra el efecto del ayuno y la realimentación sobre el número de receptores hepáticos de GH y la actividad somatomédica del plasma (extractos de Sephadex CM-25). La afinidad de los receptores no varió pero se evidenció una pérdida progresiva de los libres y totales después de 9 semanas de ayuno, volviéndose a los valores control después de 2 semanas de realimentación. En cuanto a la actividad somatomédica del plasma, también se observó una tendencia similar. A lo largo de la experiencia, los peces alimentados mostraron un aumento importante de la actividad somatomédica. El número de receptores libres de GH decreció de forma gradual, mientras que el número total aumentó notablemente en el último muestreo.



3.4. DISCUSIÓN

En este capítulo se demuestra, por primera vez en un pez marino, la presencia de receptores específicos de GH. Como cabía esperar, el hígado aparece como la principal fuente de receptores de GH, corroborando la idea de que este órgano es el tejido diana por excelencia de la GH (ver Mendelshon, 1988). La unión específica detectada en tejido adiposo y músculo esquelético está en consonancia con los resultados descritos en mamíferos (Daughaday, 1977; Fagin *et al.*, 1980; Gavin *et al.*, 1982, Digirolamo *et al.*, 1986) y otras especies de peces (Ikuta *et al.*, 1989; Yao *et al.*, 1991). Asimismo, la unión detectada en cerebro, corrobora los resultados obtenidos por nosotros mismos en trucha arco iris, en donde se ha demostrado la presencia de receptores de GH tanto en áreas hipotalámicas como suprahipotalámicas (Pérez-Sánchez *et al.*, 1991).

Fig. 3.14. Efecto del ayuno y la realimentación en los parámetros de crecimiento. Grupo de peces alimentados (□) y ayunados (▣). (A) Temperatura del agua. (B) Tasa instantánea de crecimiento en peso. Cada valor representa la media±EEM de 2 réplicas. EEM, Error Estándar de la Media. (C) Receptores hepáticos de GH (GHRs) libres y (D) totales (fmol·mg proteína⁻¹). Cada valor representa la media±EEM de 4 o 5 determinaciones. (E) Actividad somatomédica del plasma. Cada valor representa la media±EEM de 8 a 10 determinaciones. Diferencias significativas entre tratamientos (*, p<0,01). Valores con diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,01) dentro de cada tratamiento a lo largo del periodo experimental (análisis de la varianza de una vía seguido del test de Duncan).

La unión específica de ^{125}I -dGH a membranas hepáticas resultó ser dependiente del tiempo, de la temperatura y de la concentración de proteínas, en coincidencia con lo que se ha descrito para otras hormonas polipeptídicas (Cuatrecasas *et al.*, 1977). A 15 °C, la unión específica alcanzó el máximo a las 6 h, manteniéndose estable a las 24 h. En cambio, a 24 °C, se observó una disminución importante de la unión específica después de 14 h de incubación, lo cual podría ser debido a la desnaturalización y/o degradación del ligando y/o del receptor. A 20 y 35 °C, se ha descrito un fenómeno similar en RRAs de trucha (Yao *et al.* 1991) y anguila (Hirano, 1991), respectivamente. Tarpey y Nicoll (1985) también observaron una disminución en la unión específica de la GH bovina a las membranas hepáticas de *Gillichthys mirabilis* después de 8 h de incubación a 37 °C.

Una vez fueron determinadas las condiciones óptimas de incubación, en cuanto a tiempo y temperatura, se procedió a la caracterización propiamente dicha del receptor. Las transformaciones *Scatchard* se ajustaron a una regresión lineal de primer orden, evidenciando la presencia de uno o más *loci* de unión con la misma afinidad. Tanto la capacidad como la afinidad de estos receptores por la dGH está en consonancia con los valores obtenidos en RRAs hepáticos de mamíferos, (Gerasimo *et al.*, 1979; Hughes, 1979), aves (Leung *et al.*, 1987a) y peces (Fryer, 1979; Gray *et al.*, 1990; Hirano, 1991; Yao *et al.*, 1991; Ng *et al.*, 1992). En este contexto, es interesante reseñar que en ocasiones, y siempre a bajas concentraciones de ligando, se detectó una segunda recta con una pendiente mayor que la descrita de modo rutinario. De acuerdo con el modelo descrito recientemente en mamíferos

(De Vos *et al.*, 1992), esta segunda pendiente podría indicar la unión de una molécula de GH con dos de receptor, ya que se ha comprobado, mediante análisis mutacionales de alta resolución, la presencia de dos *loci* de unión en la molécula de GH de mamíferos que reconocen un único *locus* del receptor (ver De Vos *et al.*, 1992). El segundo *locus* sólo se une al receptor una vez unido el primero (Cunningham *et al.*, 1991). De ahí, que a bajas concentraciones de receptores (membranas) y cantidades crecientes de GH marcada suele detectarse solamente la unión 1:1 de la GH con el receptor.

Las similitudes estructurales entre GH y PRL sugieren la posibilidad de que ambas moléculas hayan evolucionado a partir de un único gen ancestral, del cual también se habría originado el resto de hormonas que conforman la familia GH/PRL (ver Chen *et al.*, 1994). A pesar de ello, tanto la oPRL como la rtiPRL no compitieron por los receptores de GH de dorada. Otras hormonas hipofisarias, como la cGtH y la sGtH, tampoco compitieron con la dGH marcada, lo cual no es de extrañar dadas las diferencias estructurales y funcionales entre GHs y GtHs. En cambio, la rtGH, la hGH y la bGH sí fueron capaces de desplazar la ¹²⁵I-dGH, si bien las dos últimas (GHs de mamíferos) lo hicieron con una menor eficacia que la primera, lo que denota una baja afinidad por los receptores hepáticos de dorada. Se han obtenido resultados similares en RRAs de tilapia (Fryer, 1979; Ng *et al.*, 1992) y salmónidos (Gray *et al.*, 1990; Yao *et al.*, 1991). Por el contrario, la potencia inhibidora de la rtGH fue comparable a la de la dGH, hecho que concuerda con la observación de que la dGH muestra una gran afinidad por los receptores de trucha

arco iris (Yao *et al.*, 1991).

Hasta este momento, la información concerniente a la actividad somatomédica en el plasma de dorada se limitaba a un estudio previo de Funkenstein y colaboradores (1989). Nuestros resultados confirman que los anticuerpos anti-IGF-I de mamífero pueden ser usados para detectar la actividad somatomédica en el plasma de dorada. Los sueros de trucha arco iris (Daughaday *et al.*, 1985), tilapia (Ng *et al.*, 1991) y pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Delahunty *et al.*, 1992) también presentan reacción cruzada en los RIAs de IGF-I de mamíferos. No obstante, el suero de pez azul del Atlántico (*Pomatomus saltatrix*) (Furlanetto *et al.*, 1977), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Lindhal *et al.*, 1985), mixina (*Myxine atlantica*), tiburón leopardo (*Triakis semifasciata*) y carpa (*Cyprinus carpio*) (Wilson y Hintz, 1982) no muestran una reacción cruzada apreciable. Estas discrepancias permanecen todavía sin aclarar, y podrían ser debidas a la utilización de diferentes anticuerpos y/o métodos de extracción de IGFs plasmáticas, ya que es esencial una buena disociación y posterior eliminación de las IGFBPs para obtener una valoración fiable de las IGFs circulantes.

La presencia de IGFBPs se ha demostrado en trucha (Niu y Le Bail, 1993) y pez gato (Delahunty *et al.*, 1992), así como en salmón coho, lubina rayada (*Morone saxatilis*), tilapia y *Gillichthys mirabilis* (Kelley *et al.*, 1992). La forma más abundante tiene un peso molecular de 40-50 kDa. Tras la cromatografía de filtración ácida detectamos un falso positivo en la zona correspondiente a moléculas de 40-50

kDa. Probablemente, esta inmunorreactividad es debida a la presencia de IGFBPs, las cuales se unen al trazador rhIGF-I sin llegar a precipitarlo en un RIA de doble anticuerpo (Nissley y Rechler, 1985). Los estudios realizados en mamíferos indican que estas subunidades de 40-50 kDa (IGFBPs) deben estar unidas a las IGFs para que puedan combinarse con la subunidad de unión no estable en medio ácido, y formar el complejo de 150 kDa (Furlanetto, 1980; Baxter, 1986). La posibilidad de que exista en los peces una proteína homóloga a esta última subunidad es una cuestión que todavía está por dilucidar.

Otro punto de considerable interés es la acción coordinada de GH e IGFs. Estudios previos en mamíferos indican que el número de receptores hepáticos de GH decrece durante el ayuno (Postel-Vinay *et al.*, 1982, Maes *et al.*, 1983). Si tenemos en cuenta que la GH actúa como regulador positivo de la síntesis de IGF-I, esta disminución en el número de receptores podría explicar, al menos en parte, la resistencia del hígado a la acción de la GH, así como la disminución de la síntesis hepática de IGF-I que ocurre como consecuencia de la privación de alimento. La evidencia más clara de ello es que la magnitud y cinética de la disminución de los niveles de mRNA que codifican para la IGF-I y los receptores hepáticos de GH es del mismo orden (Straus y Takemoto, 1990). Desgraciadamente, lo que se sabe de la regulación de la acción de GH en peces está muy lejos del grado de conocimiento alcanzado en los mamíferos. Utilizando como medida indirecta de la actividad somatomédica la incorporación de $^{35}\text{SO}_4$ por el cartílago ceratobranquial, se ha sugerido que el ayuno disminuye la secreción hepática de IGF-I en trucha

(Komourdjian e Idler, 1978), *Gillichthys mirabilis* (Gray y Kelley, 1991) y salmón coho (McCormick *et al.*, 1992). De hecho, en anguilas japonesas (Duan e Hirano, 1992) y salmónidos (Duan *et al.*, 1994), se ha observado una disminución importante de los niveles hepáticos del mRNA que codifica para IGF-I. En salmón coho, después de 3 semanas de ayuno, se ha observado una disminución importante en el número de receptores hepáticos de GH (Gray *et al.*, 1992). De nuestros resultados se deduce que la disminución de la actividad somatomédica durante el ayuno viene condicionada por la disminución de receptores hepáticos de GH. En tilapia no se observó la disminución de la actividad somatomédica (Drakenberg *et al.*, 1989; Ng y Leung, resultados sin publicar). Esta aparente discrepancia podría reflejar un periodo demasiado corto de privación del alimento o bien, la coincidencia del periodo de ayuno con un periodo estacional de bajo crecimiento somático. De hecho, en nuestro caso, el aumento estacional del crecimiento somático (abril-junio) pudo contribuir a aumentar la diferencia en actividad somatomédica entre peces ayunados y alimentados. En los peces alimentados observamos un aumento importante de la actividad somatomédica, que coincide con una disminución progresiva del número de receptores libres. Esta disminución estuvo acompañada, en el último muestreo, por un aumento del número total de receptores hepáticos de GH. Esta *up-regulation* (regulación positiva) del número de receptores podría ser debida al aumento de los niveles plasmáticos de GH, que precede al incremento estival de las tasas de crecimiento (ver Cap. 5). De acuerdo con esta idea, Mori *et al.* (1992) han demostrado que una única inyección de GH aumenta el número de receptores hepáticos de GH en la anguila japonesa.

En resumen, en este trabajo se desarrolló un ensayo homólogo de receptores de elevada sensibilidad y especificidad. Además, se comprobó que es posible utilizar un ensayo heterólogo de IGF-I humana para determinar la actividad somatomédica del plasma de dorada. No obstante, tal y como se ha mencionado con anterioridad, estamos a la espera de obtener la forma recombinante de IGF-I de dorada, y así desarrollar un RIA homólogo que confiera mayor sensibilidad y especificidad.

4. Ontogenia del Sistema Somatotrópico.

**Presencia/Expresión de los Receptores de
GH durante el Desarrollo Larvario de la
Dorada**

RESUMEN. En este capítulo se estudió el posible papel de la GH en el desarrollo larvario. Para ello se investigó la presencia de receptores de GH en los primeros estadios del desarrollo de la dorada, usando GH recombinante de trucha (rtGH) como trazador. En todas las larvas examinadas (de 5, 17, 27 y 40 días a partir de la eclosión del huevo) se encontraron receptores de GH. En las de 40 días, se observó una mayor concentración de estos receptores en la región de la cabeza. La unión específica de la GH con su receptor fue dependiente de la concentración de proteínas. El análisis *Scatchard* demostró la existencia de un sólo tipo de receptor, de gran afinidad y baja capacidad. La GH ovina (oGH) desplazó de forma dosis-dependiente la ^{125}I -rtGH unida a los receptores. La prolactina (sPRL) y la gonadotropina (sGtH) de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) no compitieron por estos receptores. Estos resultados demuestran, por primera vez en un vertebrado inferior, la presencia de receptores de GH en los primeros estadios del desarrollo.

Nota: Este trabajo ha sido publicado recientemente en la revista *Growth Regulation* 4: 14-19 (1994).

4.1. INTRODUCCIÓN

Se han detectado niveles elevados de GH en el feto de varias especies de mamíferos. Sin embargo, está plenamente aceptado que el desarrollo embrionario de estos animales es independiente de la GH (Cooke y Nicoll, 1983). Ello se ha atribuido a la ausencia o a la baja expresión de receptores de GH en el feto y en el recién nacido (Gluckman, 1984; García Aragón *et al.*, 1992). De hecho, la hipofisectomía del feto de mono no altera el peso o la talla del recién nacido (Smith, 1954). Jost en 1979 demostró que el crecimiento del feto de conejo no se ve afectado por la ablación de la hipófisis. Los niños nacidos sin hipófisis funcional o con una deficiencia en la secreción y/o expresión de GH también presentan un peso normal al nacer (Cooke y Nicoll, 1983; Reid, 1970; Rimoin *et al.*, 1966). Además, los ratones transgénicos que llevan incorporado en su genoma varias copias del gen de GH no muestran una aceleración del crecimiento hasta cumplir las 3 semanas de vida, lo que coincide con un incremento notable del número de receptores de GH (Palmiter *et al.*, 1983; Mathews *et al.*, 1988). Estudios más recientes (Kim *et al.*, 1993) sugieren la existencia de un cierto efecto de la GH sobre el crecimiento en las últimas etapas del desarrollo fetal, pero en cualquier caso, esta dependencia es mucho menor que la que se alcanza después del parto.

A diferencia de la mayoría de mamíferos, el crecimiento del embrión de pollo se ve afectado por la presencia o ausencia de hipófisis. Sin embargo, la administración de GH en el embrión de pollo decapitado no restablece la disminución del crecimiento ocasionada por la falta de hipófisis (Thommes *et al.*, 1992). Es más, durante gran parte del desarrollo embrionario no se han detectado cantidades significativas de GH plasmática (Harvey *et al.*, 1979; Decuypere y Scanes, 1983) ni de receptores (Burnside y Cogburn, 1992) en los presuntos tejidos diana, lo que restringe una vez más el papel de esta hormona en el desarrollo embrionario.

Actualmente, se dispone de poca información sobre la ontogenia del sistema somatotrópico de los peces. Cambré y colaboradores (1990) detectaron células somatotropas en hipófisis de larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) recién eclosionadas (1 día post-eclosión del huevo), usando suero inmunizado contra la GH de trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Con estos mismos anticuerpos, también se han detectado células somatotropas en larvas (2 días post-eclosión) de dorada (*Sparus aurata*) (Power y Canario, 1992). En esta misma especie, Funkenstein y colaboradores (1992) han detectado, a los 6 días post-eclosión, la presencia de mRNA que codifica para GH. Estudios inmunocitoquímicos también revelan la presencia de células somatotropas en los primeros estadios larvarios de la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Arakawa *et al.*, 1992). Es más, según Vandeputte (1990), el embrión de trucha responde transitoriamente al tratamiento con GH. Sin embargo, la presencia de receptores queda todavía por establecer. De ahí que el

objetivo de este trabajo haya sido demostrar la presencia de los mismos durante los primeros estadios del desarrollo larvario de la dorada.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Cultivo y muestreo de larvas.

La eclosión y cultivo de las larvas de dorada se llevó a cabo en la *hatchery* de Tina Menor (Santander). La eclosión tuvo lugar 2 días después de la fertilización. A los 4 días de la eclosión, una vez había sido consumido el saco vitelino, se alimentaron las larvas con *Brachionus plicatilis* y/o *Artemia salina*. Las condiciones de iluminación imitaron a las naturales de esa época del año (diciembre-enero). La temperatura osciló entre los 16 y 17 °C. Las muestras se tomaron a los 5, 17, 27, y 40 días después de la eclosión (ver Fig. 4.1). Además, se muestrearon varios cientos de larvas de 40 días de edad, separando la cabeza del resto del cuerpo con unas tijeras de disección muy finas. Larvas enteras, cabezas y cuerpos fueron almacenados a -20 °C hasta su posterior análisis.











Días Post-eclosión		Muestra	
	5		Larva entera
	17		Larva entera
	27		Larva entera
	40		Larva entera
			Cabeza
			Cuerpo

Fig. 4.1. Esquema del muestreo de las larvas.

4.2.2. Hormonas.

La GH recombinante de trucha (rtGH) fue proporcionada por Eurogentec (Liège, Bélgica). La GH ovina (oGH) fue suministrada por el *National Institute of Health* (NIH), Bethesda, Maryland, USA. La prolactina (sPRL) y la gonadotropina (sGtH) de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) fueron donadas por el Dr. Prunet y el Dr. Breton (*Laboratoire Physiologie des Poissons*, INRA, Rennes, Francia), respectivamente.

4.2.3. Procesado de membranas y ensayo de radiorreceptores (RRA).

Tanto el ensayo de radiorreceptores (RRA) como el procesado de membranas se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el Cap. 3. El hecho de utilizar rtGH como trazador se debió a la limitada disponibilidad de GH de dorada en el momento de llevar a cabo esta experiencia. Recientemente, este problema ha sido resuelto tras la secuenciación, clonaje y expresión del cDNA codificante para la GH de dorada (Martínez-Barberá *et al.*, 1994), lo que comporta una disponibilidad prácticamente ilimitada de hormona.

4.2.4. Actividad de la GH larvaria.

Se homogeneizaron larvas enteras en tampón de lavado del RRA (A) (ver Cuadro 3.I, Cap. 3). El homogeneizado se centrifugó a 3.000 g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se utilizó en un RRA con el fin de determinar si la GH larvaria era capaz de reconocer los receptores hepáticos de GH procedentes de doradas de 2 años de edad.

4.2.5. Análisis estadístico.

Para valorar las diferencias de unión específica detectadas en las suspensiones de membrana, se utilizó el análisis de la varianza de una vía y el test *t* de Student ($p < 0,05$).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Unión específica del trazador en cabezas y cuerpos de larvas.

La Fig. 4.2 muestra el porcentaje de ^{125}I -rtGH unida a cantidades crecientes de membranas correspondientes a cabezas y cuerpos de larvas de 40 días. La unión específica fue dependiente de la concentración de membranas, siendo lineal en el intervalo comprendido entre 300 y 2.400 μg de proteína. A la concentración más alta, la unión específica fue de $11,2\% \pm 0,2$ para la cabeza, y de $2,99\% \pm 0,16$ para el cuerpo de la larva. Bajo las mismas condiciones de ensayo, la unión específica de ^{125}I -rtGH a membranas hepáticas de doradas de 2 años se mantuvo prácticamente lineal hasta los 400 μg de proteína. A partir de esta concentración, se formó una meseta que indica que prácticamente el 45 % de la hormona marcada es reconocida por los receptores. La unión inespecífica fue en todos los casos bastante baja, oscilando entre el 5 y el 13 % en función de la cantidad de proteínas.

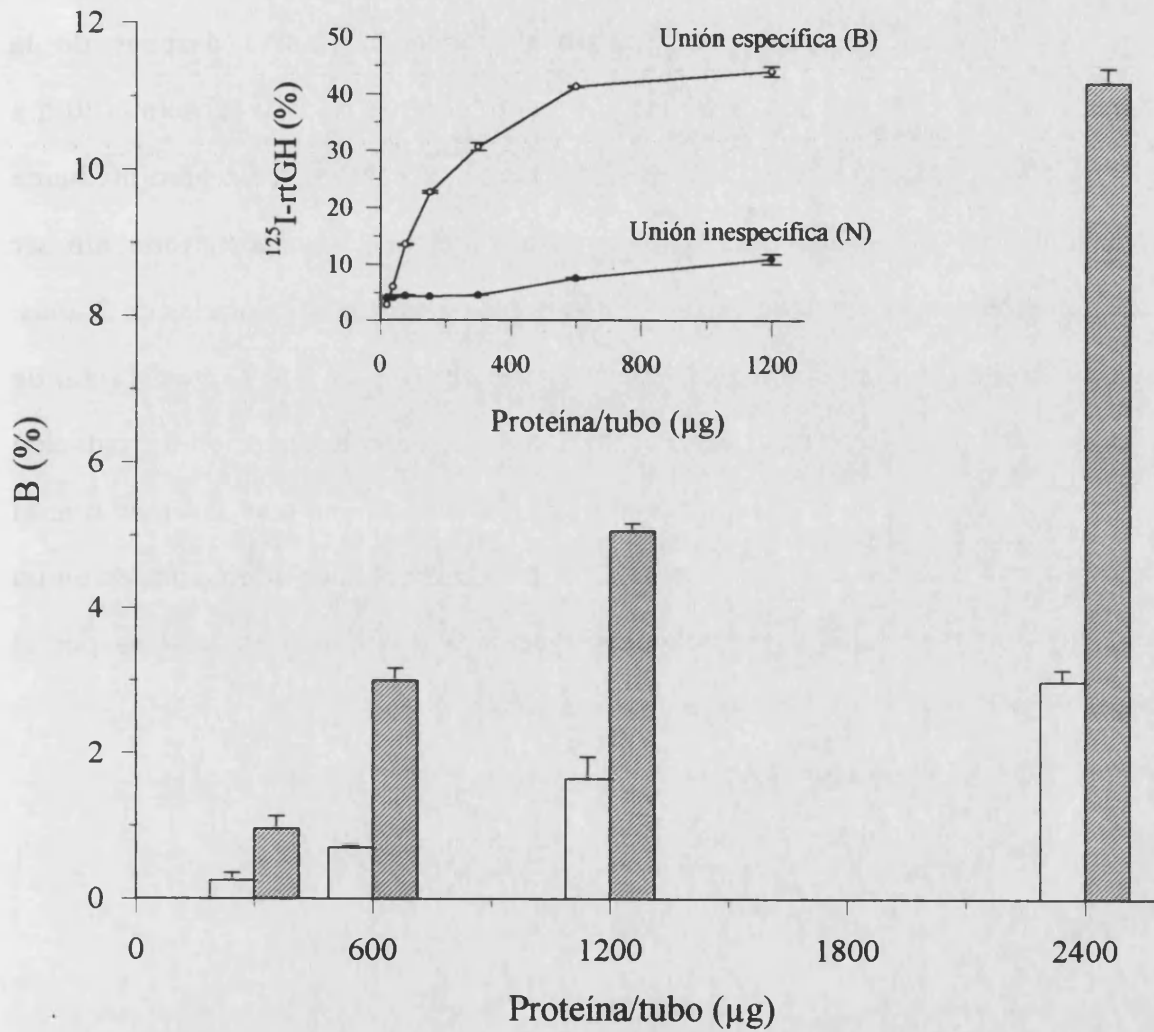


Fig. 4.2. Efecto de la cantidad de membranas [de cabezas (▨) y cuerpos (□)] en la unión específica de ¹²⁵I-rhGH (25.000 cpm). El inserto muestra la unión de ¹²⁵I-rhGH a membranas hepáticas de doradas de 2 años. La unión (específica e inespecífica) se expresa como porcentaje del total de cuentas añadidas. Cada valor representa la media±EEM de 2-3 determinaciones.

4.3.2. Degradación del trazador.

También se estudió qué cantidad de rtGH permanece activa después de la incubación con los extractos de larvas. Para ello, después de la incubación (20 h a 14 °C) con las membranas procedentes de cuerpos y cabezas, se separó mediante centrifugación la ^{125}I -rtGH libre (no unida al receptor), para posteriormente ser incubada con cantidades crecientes de membranas hepáticas de doradas de 2 años. El máximo porcentaje de unión específica osciló entre el 41 y el 43 % del total de cuentas añadidas (ver Fig. 4.3). Por lo tanto, la desnaturalización-degradación proteolítica del trazador es mínima durante la incubación con las membranas larvarias, con lo que a su vez se descarta la posibilidad que las diferencias en unión específica entre cabezas y cuerpos fuesen debidas a alteraciones sufridas por el trazador.

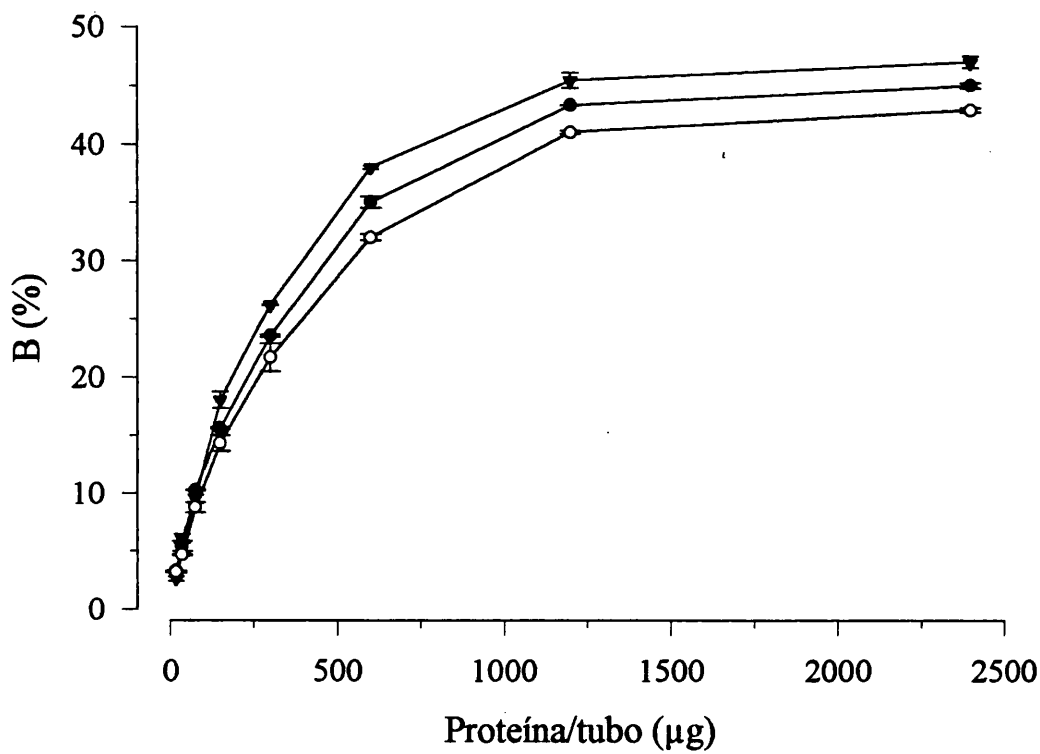


Fig. 4.3. Unión específica de ^{125}I -rtGH a membranas hepáticas de dorada después de incubar en ausencia (-▽-) o presencia de extractos larvarios procedentes de cabezas (-●-) (674 μg proteína/tubo) y cuerpos (-○-) (1586 μg proteína/tubo) de larva. La unión específica (B) se calculó como porcentaje del total de cuentas añadidas. Cada valor representa la media \pm EEM de 2-3 determinaciones.

4.3.3. Saturación de membranas (*Scatchard*).

Aumentando la cantidad de ^{125}I -rtGH se saturaron las suspensiones de membranas procedentes de los diferentes grupos de larvas. La transformación *Scatchard* evidenció una sólo pendiente, hecho que denota un único tipo de receptor de elevada afinidad. La afinidad del receptor por la ^{125}I -rtGH ($K_a = 6\text{-}7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) resultó ser de una magnitud similar a la encontrada en membranas hepáticas de doradas de 2 años. Sin embargo, la capacidad o cantidad de receptores (B_{max}) de la larva entera fue 25-35 veces más baja que la observada en las suspensiones de membranas hepáticas ($170 \pm 25 \text{ fmol}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$). La cantidad de receptores tendió a aumentar con la edad aunque no se detectaron diferencias significativas con el test *t* de Student. Donde se encontraron diferencias significativas, en cuanto a número de receptores, fue entre el cuerpo y la cabeza de larvas de 40 días (Fig. 4.4 y Cuadro 4.I).

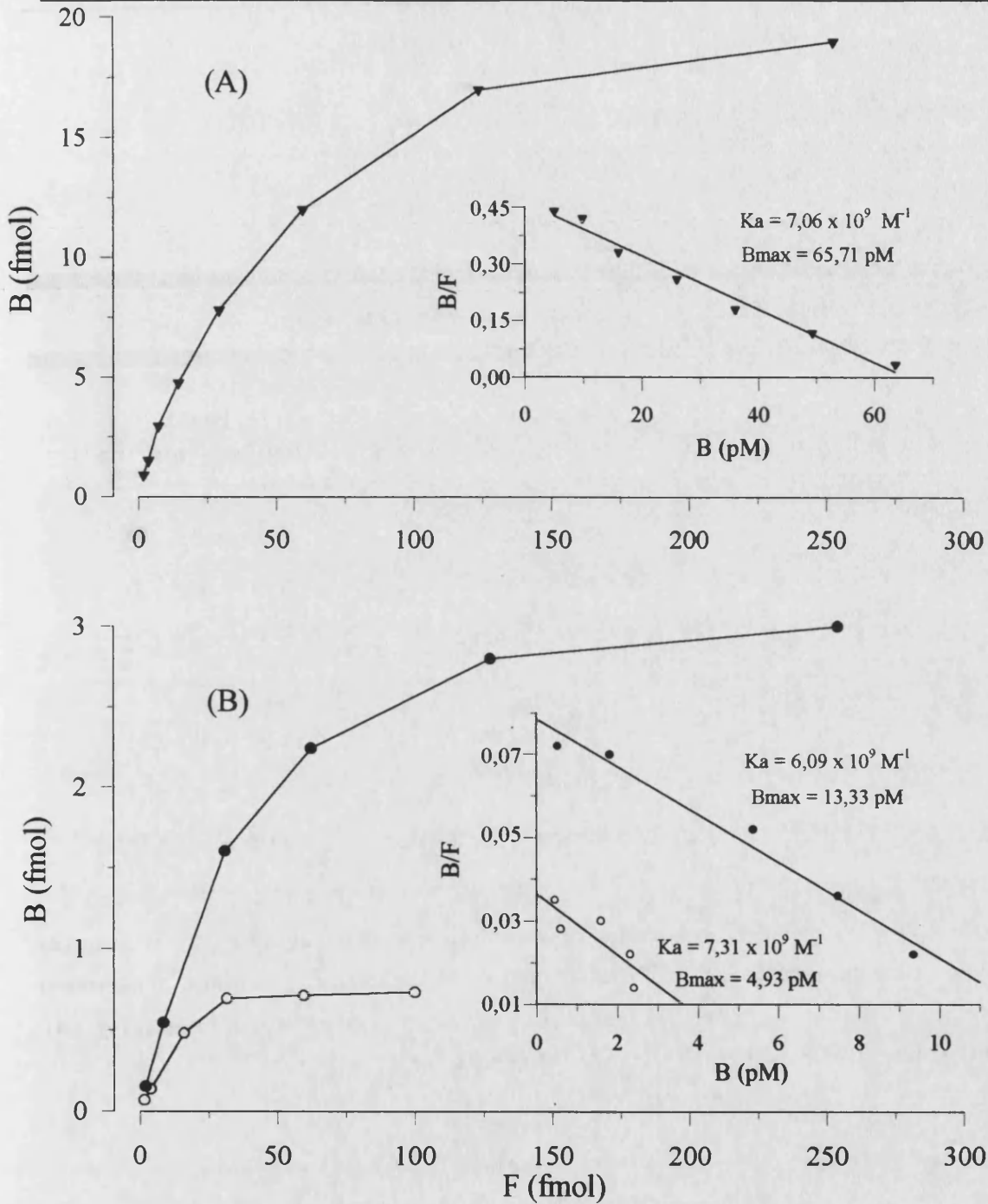


Fig. 4.4. Saturación de membranas **(A)** hepáticas de doradas de 2 años (\blacktriangledown , 250 μg proteína/tubo); **(B)** de cabezas (\bullet , 500 μg proteína/tubo) y cuerpos (\circ , 450 μg proteína/tubo) de larvas de 40 días. La gráfica insertada muestra la transformación *Scatchard* de los datos.

F (^{125}I -rtGH libre) = $[^{125}\text{I}$ -rtGH añadida - B_t] $\cdot B'$. B_t , unión total. B' , valor asintótico (40-45 %) alcanzado en la saturación de la ^{125}I -dGH con cantidades crecientes de membranas hepáticas (ver gráfica insertada en Fig. 4.2). B , unión específica. B_{max} , capacidad. K_a , constante de afinidad.

CUADRO 4.I Capacidad (Bmax) de las suspensiones de membranas larvarias.

Días Post-Eclosión	Muestra	Bmax (fmol·mg proteína ⁻¹)
5	Larva entera	5,33 ± 0,6 (2)
17	Larva entera	5,20 ± 0,8 (2)
27	Larva entera	6,82 ± 0,9 (2)
40	Larva entera	6,91 ± 0,6 (3)
	Cabeza	9,00 ± 1,1 (2)*
	Cuerpo	3,96 ± 0,5 (3)*

Nota: Se detectaron diferencias significativas en el número de receptores de la cabeza y el cuerpo de larvas de 40 días mediante un test *t* de Student (*, p<0.05). Bmax (capacidad o cantidad de receptores) se calculó como el punto de intersección entre el eje X y la recta resultante del *Scatchard* (ver Fig. 4.4). Todos los valores son la media±EEM de 2 ó 3 determinaciones.

4.3.4. Especificidad del receptor.

La Fig. 4.5 muestra el resultado de los estudios de competitividad utilizando una cantidad constante de ^{125}I -rtGH y diluciones seriadas de rtGH, oGH, sPRL y sGtH. En cabezas y cuerpos de larvas de 40 días, la unión específica de ^{125}I -rtGH disminuyó de una forma dosis-dependiente en presencia de rtGH y oGH. El ED_{50} (cantidad de hormona que disminuye al 50% la unión específica del ligando) de la oGH fue unas 10 veces mayor que el de la rtGH. La sPRL y la sGtH no desplazaron la ^{125}I -rtGH unida al receptor con ninguna de las concentraciones utilizadas .

4.3.5. GH larvaria.

La Fig. 4.6 muestra la avidéz que presentan los extractos larvarios por los receptores hepáticos de GH en un RRA hepático. La curva de desplazamiento fue siempre paralela a la del estándar de rtGH, y el ED_{50} aumentó progresivamente en larvas de 5 a 27 días. En las de 40 días, se observó una aparente disminución en la cantidad de GH presente en los extractos larvarios (larvas enteras). Ello podría reflejar una disminución del número de somatotropas respecto al número total de células de la larva.

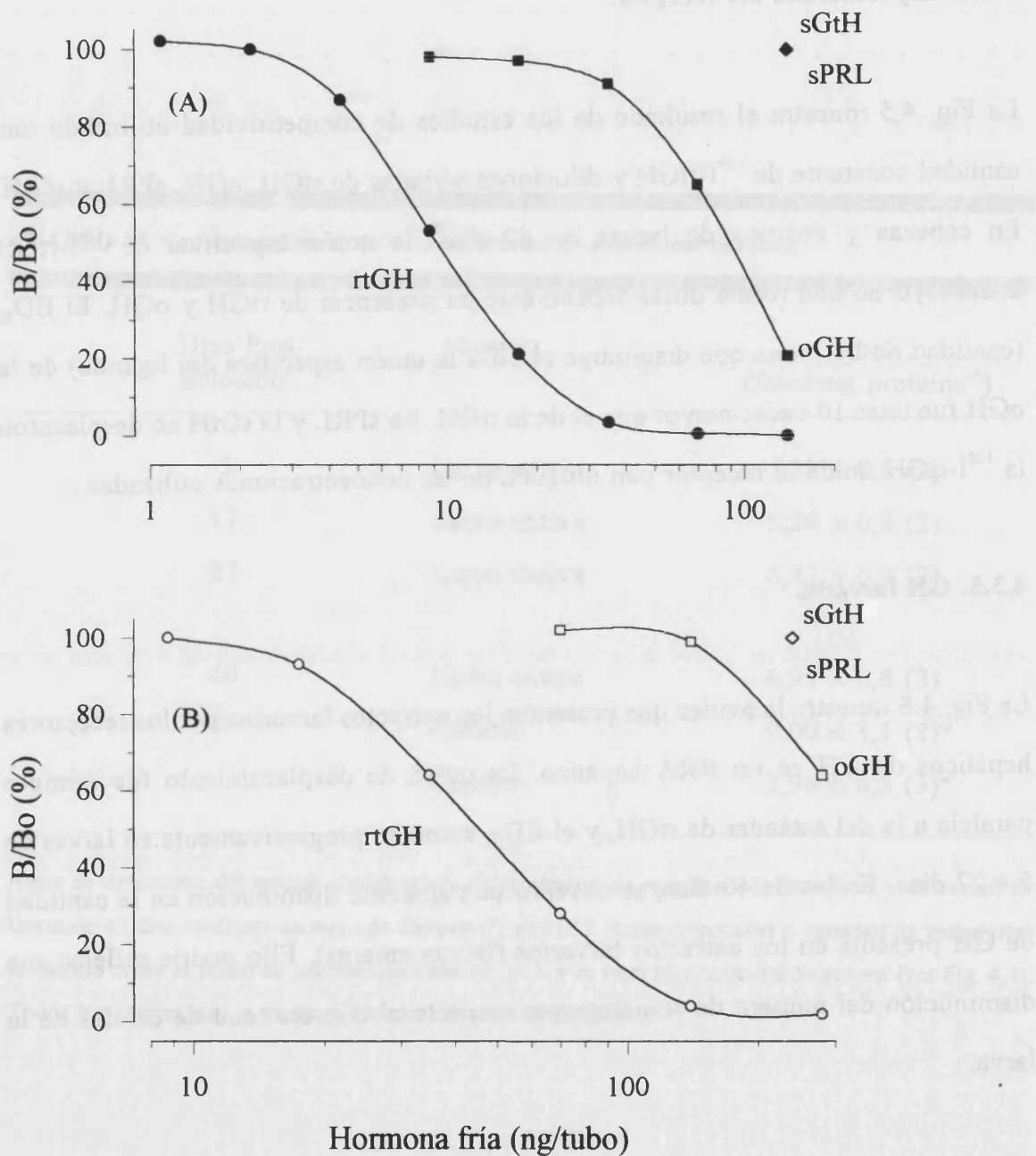


Fig. 4.5. Desplazamiento de la ^{125}I -rGH unida a membranas de cabezas (A) (400 µg de proteína/tubo) y cuerpos (B) (1.600 µg de proteína/tubo). B_0 , porcentaje de ^{125}I -rGH unida específicamente en ausencia de hormona no marcada (rGH, sPRL, sGtH); B, porcentaje de ^{125}I -rGH unida específicamente en presencia de cierta cantidad de hormona no marcada.

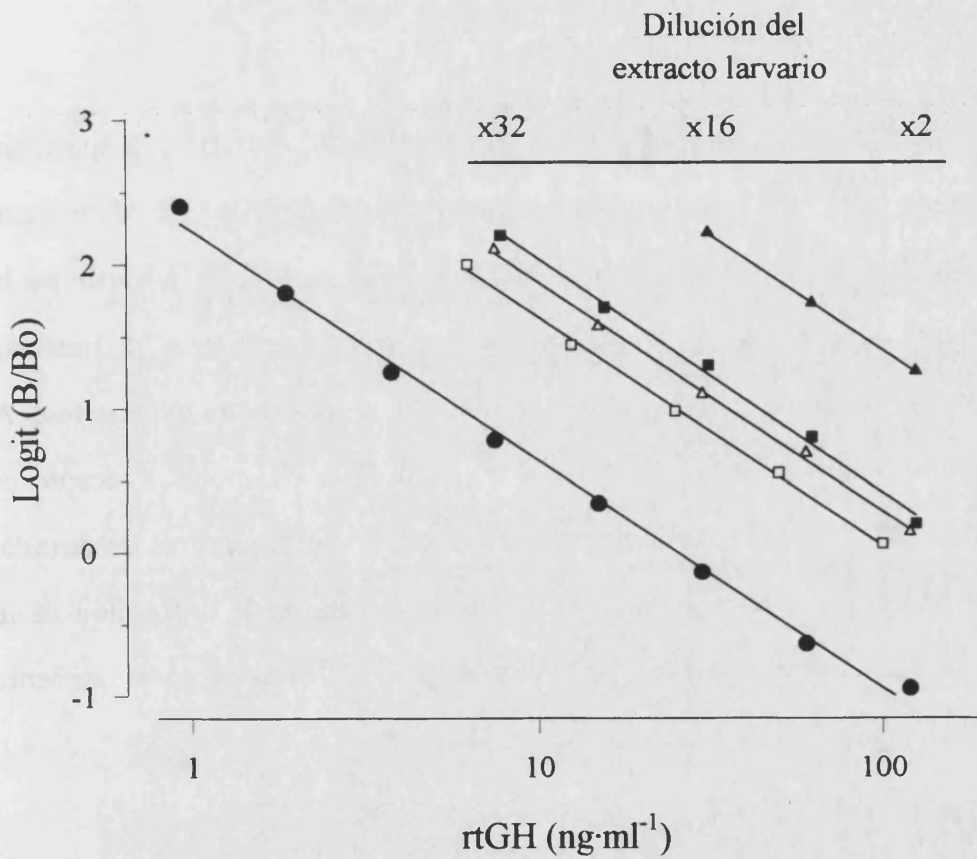


Fig. 4.6. Desplazamiento de la ^{125}I -rtGH unida específicamente a membranas hepáticas de dorada de 2 años por rtGH fría (●) y diluciones seriadas de extractos larvarios (1 g de tejido inicial/2 ml de tampón C) de 5 (▲), 17 (■), 27 (□) y 40 (△) días post-eclosión. Bo, porcentaje de ^{125}I -rtGH unida específicamente en ausencia de rtGH fría o extracto larvario; B, porcentaje de ^{125}I -rtGH unida específicamente en presencia de rtGH o extracto larvario.

4.4. DISCUSIÓN

En este capítulo se estudió, por primera vez en un vertebrado inferior, la aparición de receptores de GH en los primeros estadios del desarrollo. Se detectaron receptores en todas las larvas examinadas (de 5, 17, 27 y 40 días a partir de la eclosión del huevo). Se utilizó como trazador la rtGH, debido a la limitada disponibilidad de GH de dorada en el momento en que se realizó la experiencia. A pesar de las diferencias interespecíficas en la afinidad de la GH por sus receptores (Fryer, 1979), la rtGH presenta una elevada afinidad por los receptores de dorada, tal y como se ha demostrado en el Cap.3. Este hecho posibilitó la utilización de la rtGH como trazador en los ensayos de radiorreceptores descritos en el presente trabajo.

La unión de ^{125}I -rtGH a membranas de larvas de dorada exhibió las características propias de los receptores hormonales (especificidad, alta afinidad y un número finito de receptores). Tal como ha sido observado en otros RRAs de salmón coho (Gray *et al.*, 1990), trucha arco iris (Yao *et al.*, 1991), tilapia (Ng *et al.*, 1992) y dorada (ver Cap. 3), la GH de mamífero mostró poca afinidad por los receptores de peces, concretamente la GH ovina presentó una afinidad 10 veces menor que la rtGH. Este hecho, junto con la observación de que la PRL y la GtH de salmón chinook no compitieron por los receptores de GH, proporcionó una clara

evidencia de la especificidad hormonal de estos receptores.

La transformación *Scatchard* demostró la presencia de un sólo tipo de receptor. La afinidad de estos receptores por la GH fue comparable a la observada con anterioridad en ensayos similares llevados a cabo con preparaciones de membrana procedentes de áreas hipotalámicas y suprahipotalámicas del sistema nervioso central de la trucha (Pérez-Sánchez *et al.*, 1991). Estos valores también fueron equivalentes a los observados en ensayos de receptores hepáticos de mamíferos (Gerasimo *et al.*, 1979; Hughes, 1979), aves (Leung *et al.*, 1987a) y peces, tal y como se indica en el Cap.3. El número de receptores fue más bajo (25-35 veces) que el encontrado en las preparaciones de membranas hepáticas de doradas de 2 años (170 ± 25 fmol·mg proteína⁻¹). La desaturación con MgCl₂ demostró una baja ocupación de los receptores por la GH endógena (datos no mostrados). No obstante, no se debe menospreciar el potencial de unión de la GH a los tejidos larvarios, ya que es probable que este número tan pequeño de receptores refleje una distribución desigual de los mismos. Curiosamente, se observó una mayor concentración de receptores en la cabeza, que también presenta un crecimiento acelerado con respecto al resto del cuerpo (Fuiman, 1983; Strauss y Fuiman, 1985). Por lo tanto, es factible que la GH ejerza su acción somatogénica mediante una interacción directa sobre los tejidos/órganos en crecimiento. Los primeros trabajos que demostraron este tipo de acción (ver Isaksson *et al.*, 1982) supusieron la modificación de la hipótesis somatomédica (Salmon y Daughaday, 1957), que abogaba única y exclusivamente por una acción sistémica a través de las



IGFs hepáticas. Esta acción directa implica que la síntesis de IGFs también puede ocurrir en el mismo tejido diana, en cuyo caso las IGFs actúan de forma autocrina y/o paracrina. De acuerdo con ello, el efecto local de la GH en la larva también podría estar mediado, al menos en parte, por las IGFs. Recientemente, Cohen *et al.* (1994) han demostrado la presencia de mRNA de IGF-I en huevos y embriones de dorada. Incluso, mediante técnicas inmunocitoquímicas, se ha podido comprobar la aparición temprana (11 días post-eclosión) de células inmunorreactivas de IGF-I en islotes pancreáticos de larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Berwert *et al.*, 1995).

En cualquier caso, queda por establecer si las IGFs presentes en los primeros estadios larvarios son consecuencia de la acción local de la GH. De hecho, de acuerdo con la *dual effector theory*, la GH y la IGF-I actúan preferentemente sobre determinados tipos celulares del tejido en desarrollo. La GH actúa principalmente sobre células en fase de diferenciación, mientras que la IGF-I lo hace sobre las células en fase proliferativa estimulando la expansión clonal. Esta teoría fue postulada a mediados de los 80 (Green *et al.*, 1985) y es apoyada por numerosos estudios que demuestran la acción directa de GH en la diferenciación de fibroblastos (Morikawa *et al.*, 1982; Nixon y Green, 1984), condrocitos (Isaksson *et al.*, 1987; Lindahl *et al.*, 1987; Ohlsson *et al.*, 1992; Bentham *et al.*, 1993) y osteoblastos (Morel *et al.*, 1993). Es más, recientemente, nuestro grupo ha demostrado la existencia de este tipo de acción en diferentes células hematopoyéticas, al comprobar la presencia y funcionalidad de receptores específicos de GH en células de la serie

eritroide, linfoide y mieloide del riñón anterior de la dorada (Calduch-Giner *et al.*, 1995).

Por otra parte, también podría existir una acción aditiva o sinérgica entre la GH y las hormonas tiroideas ya que estas hormonas, esenciales en el desarrollo temprano de la larva del pez (Brown *et al.*, 1987; Kobuke *et al.*, 1987; Reddy y Lam, 1992; Reddy *et al.*, 1992), ejercen su acción estimuladora del crecimiento no sólo mediante efectos específicos sino también aumentando la actividad de la GH y las IGFs (Cabello y Wrutniak, 1989).

De nuestros resultados también se deduce que la GH presente en extractos larvarios es capaz de reconocer los receptores de GH en un RRA hepático. La unión por sí sola no implica una activación del péptido señal intracelular, pero está de acuerdo con la idea de que GH biológicamente activa está presente desde los primeros estadios en larvas de dorada. Así pues, teniendo en cuenta éste y otros estudios previos en los que se demuestra la expresión de GH en los primeros estadios larvarios (Cambre *et al.*, 1990; Power y Canario, 1992; Funkenstein *et al.*, 1992; Arakawa *et al.*, 1992), podemos concluir que tanto la GH como sus receptores están presentes durante el desarrollo y crecimiento larvario. Este hecho es de gran relevancia, ya que sugiere un comportamiento diferencial entre vertebrados superiores e inferiores, al menos en lo que se refiere a los teleósteos.

5. Cambios Estacionales en los Niveles Circulantes de GH, Receptores Hepáticos de GH y Actividad Somatomedínica del Plasma.

RESUMEN. El objetivo de este capítulo consistió en relacionar la actividad del sistema somatotrópico con el crecimiento de juveniles-adultos de dorada. Con este fin, se estudió la variación estacional del crecimiento en función de los niveles de GH circulante, receptores hepáticos de GH y actividad somatomédica del plasma. La actividad somatomédica del plasma y el crecimiento se correlacionaron positivamente a lo largo de todo el periodo experimental, probablemente como consecuencia de la acción de la GH sobre el hígado. Sin embargo, no se encontró una correlación positiva entre los niveles de GH circulante y crecimiento. El pico de GH plasmática se dio varias semanas antes de que tuviera lugar el incremento estival de las tasas de crecimiento. No obstante, en el periodo de máximo crecimiento aumentó la sensibilidad (número total de receptores) del hígado a la acción de la GH. Asimismo, durante el periodo invernal, se comprobó que la inyección intracelómica de GH recombinante de trucha (rtGH) aumenta los niveles circulantes de somatomedinas, alcanzándose niveles similares a los que se dan durante el periodo estival (máximo crecimiento). Por consiguiente, a pesar de no encontrarse una correlación positiva entre GH y crecimiento, se sugiere que la disponibilidad de GH circulante puede actuar como factor limitante del crecimiento.

Nota: Este trabajo ha sido publicado recientemente en la revista *Fish Physiology and Biochemistry* 13 (3): 199-208 (1995).

5.1. INTRODUCCIÓN

La hormona de crecimiento (GH) forma parte de la cascada hormonal con una mayor influencia en el crecimiento somático. Su acción anabólica está mediada por las somatomedinas (IGFs) que actúan de forma endocrina, paracrina y/o autocrina (Holly y Wass, 1989). En la mayoría de vertebrados, incluidos los teleósteos (Donaldson *et al.*, 1979; Weatherley y Gill, 1987; Danzmann *et al.*, 1990), ha quedado demostrada la eficacia de la GH como factor estimulador del crecimiento. Sin embargo, en las condiciones probadas hasta la fecha, no se puede afirmar que la administración de GH sea capaz de acelerar el crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*) (Cavari *et al.*, 1993; Donaldson, comunicación personal). Una complicación adicional es que frecuentemente no existe una correlación positiva entre los niveles de GH circulante y las tasas de crecimiento (Clarke *et al.*, 1989; Marchant y Peter, 1986; Stefansson *et al.*, 1991; Sumpter *et al.*, 1991; Sumpter, 1992). De hecho, las concentraciones de GH circulante aumentan con el ayuno en la mayor parte de vertebrados estudiados hasta la fecha (ver Farbridge y Leatherland, 1992). Este aumento de los niveles de GH va acompañado de resistencia a la insulina e incremento de la actividad lipolítica. A su vez, disminuye el número de receptores hepáticos de GH y los niveles de mRNA hepático que codifican para IGF-I, así como la actividad somatomédica del plasma (ver Cap. 3). Todo ello pone de manifiesto la necesidad de considerar el sistema somatotrópico como un todo. Es por

ello que en el presente capítulo se estudió la variación estacional del crecimiento en relación a los niveles de GH circulante, receptores hepáticos de GH y actividad somatomédica del plasma.

A su vez, se analizó el efecto de la administración de GH sobre la actividad somatomédica del plasma para evaluar si la disponibilidad de GH circulante puede actuar como factor limitante del crecimiento en el periodo invernal (bajo crecimiento).

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Experimento I: Crecimiento estacional

A comienzos de octubre de 1991, se distribuyeron 400 doradas de 50-100 g de peso en dos tanques experimentales de 4000 l de capacidad. En cada tanque se empleó un flujo de agua de mar de $20 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ y aireación constante. Se mantuvo el fotoperiodo natural y la temperatura del agua disminuyó desde los $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ alcanzados en noviembre hasta los $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de febrero. Posteriormente, la temperatura aumentó hasta alcanzar un máximo de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en agosto. Los peces fueron alimentados dos veces al día con una dieta comercial (55 % de proteína, 12 % de lípidos y 15 % de carbohidratos) suministrada por Ewos (España). La ingesta se ajustó al peso del animal ($0,7-1,9 \text{ \%P}\cdot\text{d}^{-1}$) intentando mantener un nivel cercano a la saciedad.

A lo largo de todo el periodo experimental, concretamente el 13 de noviembre de 1991 y el 14 de enero, 16 de marzo, 20 de mayo, 28 de junio, 8 de agosto y 18 de septiembre de 1992, se determinó el peso y la talla de todos los peces con una precisión de $\pm 0,1 \text{ g}$ para el peso y $\pm 0,1 \text{ cm}$ para la talla. La tasa instantánea de crecimiento (SGR) y la tasa de conversión del alimento (IC) se calcularon según las siguientes fórmulas:

$$\text{SGR (\%)} = (\text{Ln}P_f - \text{Ln}P_o) \cdot d^{-1} \cdot 100$$

$$\text{IC} = \text{peso seco del alimento} \cdot (P_f - P_o)^{-1}$$

P_o : peso medio inicial P_f : peso medio final

d : número de días

En cada muestreo se sacrificaron 10 peces de cada tanque. Tras anestesiarlos con MS-222 disuelto en el agua ($0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), se extrajo el hígado y una muestra de sangre de cada uno de ellos (1 ml aproximadamente). Las muestras de sangre obtenidas mediante punción caudal se distribuyeron en tubos heparinizados. El plasma obtenido por centrifugación (3.000 g , 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$) se congeló a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta ser utilizado en análisis posteriores. Los hígados se procesaron inmediatamente con el fin de evitar la posible degradación o alteración de sus receptores (ver Cap. 3).

5.2.2. Experimento II: Tratamiento con GH

En esta experiencia se utilizaron 240 juveniles de dorada de unos 100 g de peso distribuidos al azar en 8 tanques circulares de 500 l de capacidad (30 peces/tanque), con un flujo de agua de $15 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$. Las condiciones de fotoperiodo y temperatura del agua (11-13 °C) fueron las propias de esa época del año (febrero y marzo). El tratamiento consistió en inyectar intracelómicamente a los peces, anestesiados con MS-222, 200 μl de GH recombinante de trucha (rtGH) (Eurogentec, Liège, Bélgica). La hormona se administró disuelta en NaCl al 0,9 % con BSA al 0,1 % (0,75; 1,5 y 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). A los controles se les inyectó el mismo volumen de solución salina con 0,1 % de BSA. A cada tratamiento se asignaron aleatoriamente 2 tanques de 30 animales. La inyección se llevó a cabo, en menos de 10 min, mediante un dispensador de repetición al que le habíamos acoplado una aguja de 23G. Los 5 primeros peces inyectados de cada tanque proporcionaron las muestras de plasma correspondientes a "tiempo cero", mientras que los restantes volvieron a sus respectivos acuarios para ser muestreados de 5 en 5 a diferentes intervalos (1,5; 3; 6; 10 y 24 h). La sangre extraída por punción caudal se distribuyó en tubos heparinizados y se centrifugó a 3.000 g durante 20 min a 4 °C. El plasma se almacenó a -20 °C hasta su utilización en análisis posteriores.

5.2.3. Radioinmunoensayo de GH.

Los niveles plasmáticos de GH endógena se determinaron mediante un RIA homólogo de doble anticuerpo (ver Fig. 5.1) que no presenta reacción cruzada con la rtGH. Como trazador y estándar se utilizó la GH nativa de dorada (dGH). La sensibilidad del ensayo fue de 30 pg, y su ED₅₀ osciló entre 250 y 275 pg. Los coeficientes de variación intra e interensayo, calculados respecto al ED₅₀, fueron 3,3 y 5,8 %, respectivamente (Le Bail *et al.*, 1993a).

Los niveles plasmáticos de rtGH se determinaron también mediante un RIA homólogo de doble anticuerpo en condiciones de desequilibrio (ver Fig. 5.1). La proteína usada como trazador y estándar fue la misma que la inyectada en los peces. El primer anticuerpo se obtuvo al inyectar GH de salmón chinook (*Onchorhynchus tshawytscha*) en conejos de Nueva Zelanda (Le Bail *et al.*, 1991). La sensibilidad del ensayo fue de 0,2 ng·ml⁻¹ y el ED₅₀ de 3,1 ng·ml⁻¹. El plasma sin diluir de los peces control no desplazó de forma significativa (8-10 %) el trazador unido al primer anticuerpo.

100 μ l de muestra de plasma o de estándar en tampón A'
+ 100 μ l de suero de conejo anti-dGH o anti-rtGH
en tampón A' con NRS al 0,5 %

↓
Incubación 14-20 h a 15 °C
↓

+ 100 μ l de 125 I-dGH (15.000 cpm)
en tampón A'

↓
Incubación 14-20 h a 15 °C
↓

+ 100 μ l de 2° anticuerpo (ARMS)
al 20 % en tampón B'

↓
Incubación 14-20 h a 15 °C
↓

+ 3 ml de tampón B'

↓
Centrifugación a 3.000 g 45 min a 4 °C
↓

Decantación del sobrenadante

↓
Contaje del precipitado

Fig. 5.1. Radioinmunoensayo de dGH y rtGH. NRS, suero de conejo no inmunizado. ARMS, suero de cabra anti-conejo. Tampón de ensayo (tampón A': Tris-HCl 50mM, MgCl₂ 10 mM, azida sódica 0,05 %, triton x100 al 0,1 % y BSA (*RIA grade*) al 1 %, pH= 7,5). BSA, albúmina de suero bovino. Tampón de lavado (tampón B': Tris-HCl 50mM, MgCl₂ 10 mM, azida sódica 0,05 %, pH=7,5).

5.2.4. Ensayo de radiorreceptores de dGH.

Los receptores hepáticos de GH se determinaron de acuerdo con el RRA homólogo descrito en el Cap. 3.

5.2.5. Radioinmunoensayo de IGF-I.

La actividad somatomédica se determinó con el RIA heterólogo de IGF-I humana, previa extracción ácida de las IGFs (ver Cap.3).

5.2.6. Análisis estadístico.

Todos los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza de una vía. Cuando los valores analizados dieron diferencias significativas ($p < 0,05$), se compararon las medias entre sí con el test de Duncan. Se utilizó el análisis de la covarianza para el estudio de la correlación entre crecimiento y actividad somatomédica del plasma.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Experimento I.

El Cuadro 5.I muestra los valores de crecimiento de juveniles-adultos de dorada bajo condiciones naturales de fotoperiodo y de temperatura. La tasa instantánea de crecimiento (SGR) más baja se encontró en los peces muestreados en marzo. Las SGRs calculadas en enero y mayo fueron similares y significativamente diferentes a las del resto del año. La SGR más elevada se encontró a principios de agosto. En septiembre y finales de junio se registraron valores similares. Los valores más bajos de alimento ingerido correspondieron a los muestreos de enero, marzo y mayo. En estos tres muestreos, las ingestas fueron significativamente diferentes a las obtenidas a finales de junio, agosto y septiembre. En marzo, el índice de conversión (IC) alcanzó un valor máximo. Disminuyó significativamente en mayo, y alcanzó un valor mínimo durante el periodo estival.

CUADRO 5.1 Cambios estacionales en peso (P), talla (T), ingesta (I, %P·d⁻¹), tasa instantánea de crecimiento (SGR, %P·d⁻¹), e índice de conversión [IC, peso seco del alimento · (P_f - P_o)⁻¹].

Periodo de muestreo	P _o (g)	T _o (cm)	I	SGR	IC
13/11/91 - 14/01/92	80,83	13,27	1,00	0,25 ^a	4,01 ^a
14/01/92 - 16/03/92	94,25	14,50	0,72	0,11 ^b	6,50 ^b
16/03/92 - 20/05/92	101,39	14,97	0,66	0,25 ^a	2,63 ^c
20/05/92 - 28/06/92	121,40	15,81	1,60	0,73 ^c	2,18 ^d
28/06/92 - 08/08/92	165,12	17,13	1,90	0,89 ^c	2,11 ^d
08/08/92 - 18/09/92	241,15	19,52	1,70	0,77 ^c	2,19 ^d
18/09/92 -	328,10	21,5			

Nota. Peso medio inicial (P_o) y talla media inicial (T_o) para cada periodo de muestreo. Cada valor es la media de dos replicados. Los valores de SGR e IC con la misma letra no son diferentes significativamente (p<0,05).

En la Fig. 5.2 se muestran las variaciones de los niveles plasmáticos de GH y de la cantidad de receptores hepáticos de GH a lo largo del año de experimentación. El nivel más bajo de GH circulante se observó en enero. En marzo, abril y mayo se detectó un aumento progresivo de la GH circulante. Este incremento coincidió en mayor medida con el ciclo fotoperiódico que con el de la temperatura del agua. A finales de junio, agosto y septiembre se observó una disminución significativa y progresiva de los niveles de GH (Fig. 5.2A). También se observaron variaciones significativas en el número de receptores hepáticos de GH. En enero y marzo se detectaron los niveles más altos de receptores libres, mientras que los niveles más bajos se registraron en los peces muestreados en junio y agosto. En este último muestreo, el número total de receptores hepáticos de GH alcanzó un valor máximo.

La Fig. 5.3 muestra las variaciones estacionales de la actividad somatomédica del plasma. El nivel más bajo correspondió a los peces muestreados en marzo. En mayo y finales de junio se observó un incremento progresivo y significativo de la actividad somatomédica que tendió a disminuir en septiembre. Mediante el análisis de la covarianza, se comprobó la existencia de una correlación positiva ($p < 0,05$) entre la actividad somatomédica del plasma y el crecimiento.

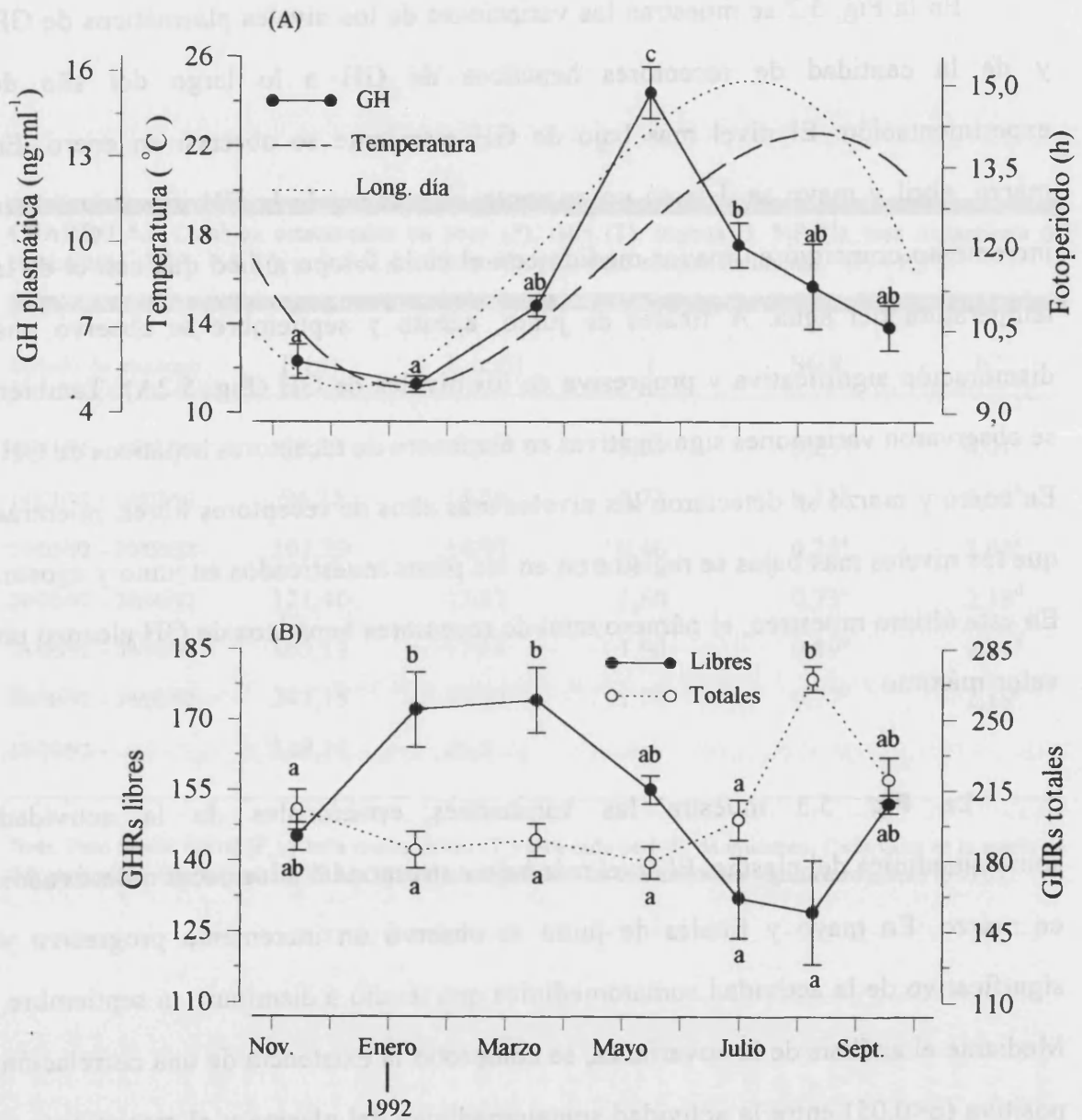


Fig. 5.2. Variaciones estacionales de fotoperiodo, temperatura del agua y niveles plasmáticos de GH (A). Variaciones estacionales del número de receptores hepáticos de GH (GHRs), libres y totales (fmol·mg proteína⁻¹) (B). Cada valor (GH plasmática y GHRs) es la media±EEM de 14-19 determinaciones. Los valores con la misma letra no difieren significativamente entre sí (p<0,05).

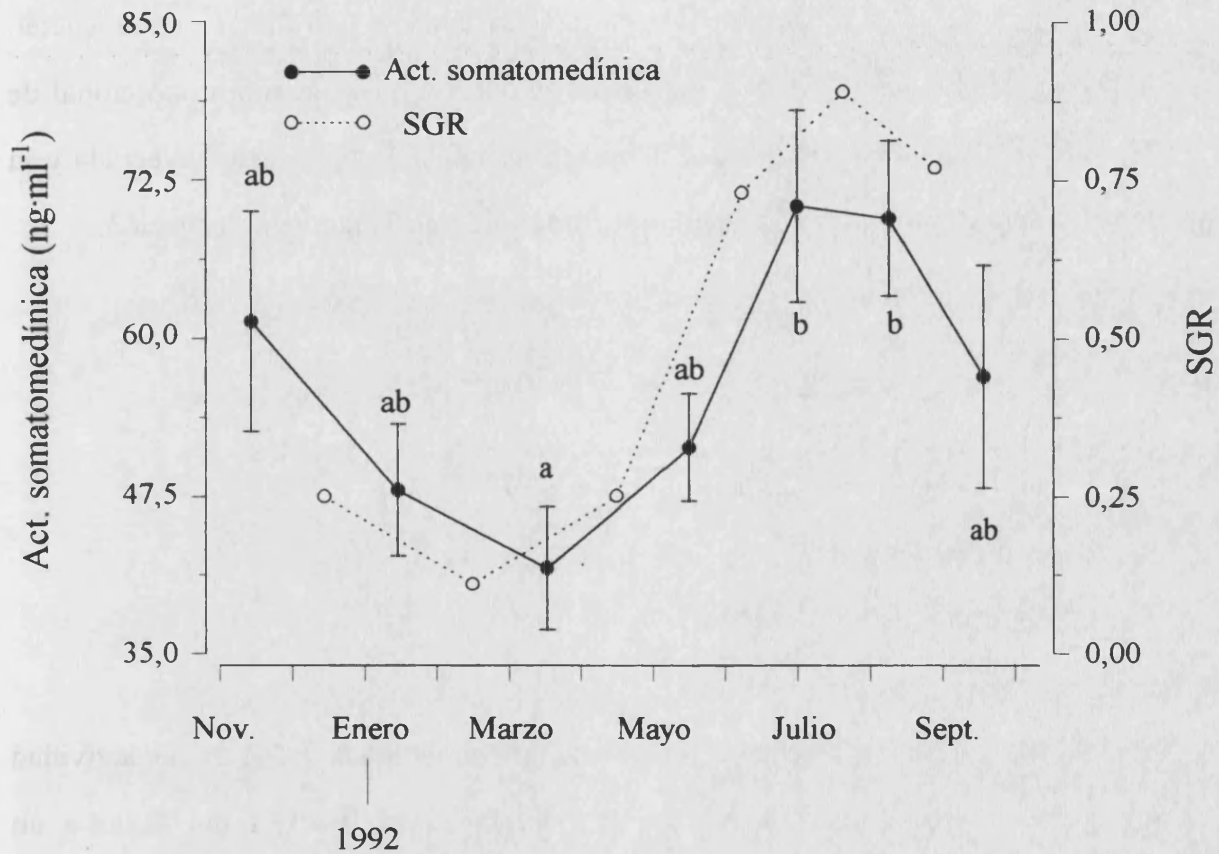


Fig. 5.3. Variaciones estacionales de la actividad somatomedínica del plasma. Cada valor es la media \pm EEM de 13-18 determinaciones. Los valores con la misma letra no difieren significativamente entre sí ($p < 0,05$). Las tasas instantáneas de crecimiento (SGR) están representadas en el mismo gráfico y corresponden al intervalo de tiempo entre dos muestreos consecutivos.

5.3.2. Experimento II.

La Fig. 5.4 muestra los niveles circulantes de rtGH después de la inyección de 0,75; 1,5 y 3 $\mu\text{g rtGH}\cdot\text{g}^{-1}$. La curva de desaparición se ajustó a una función exponencial. Al incrementar 4 veces la dosis inyectada, se observó un aumento proporcional de los niveles plasmáticos de rtGH. Esta relación directa entre la dosis inyectada y la concentración plasmática resultante quedó definida en la siguiente ecuación:

$$C = (234,4 \cdot R) \cdot T^{-1,11}$$

C : concentración plasmática de rtGH ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)

R : dosis inyectada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

T : tiempo transcurrido desde la inyección (min)

La Fig. 5.5 representa el efecto del tratamiento de rtGH en la actividad somatomédica del plasma. El aumento en la dosis de rtGH dio lugar a un incremento proporcional de la actividad somatomédica del plasma. En todos los casos, esta actividad aumentó significativamente a la hora y media de la inyección, alcanzando el máximo a las 3 h para disminuir progresivamente a las 6, 10 y 24 h post-inyección, en coincidencia con la disminución de los niveles circulantes de rtGH.

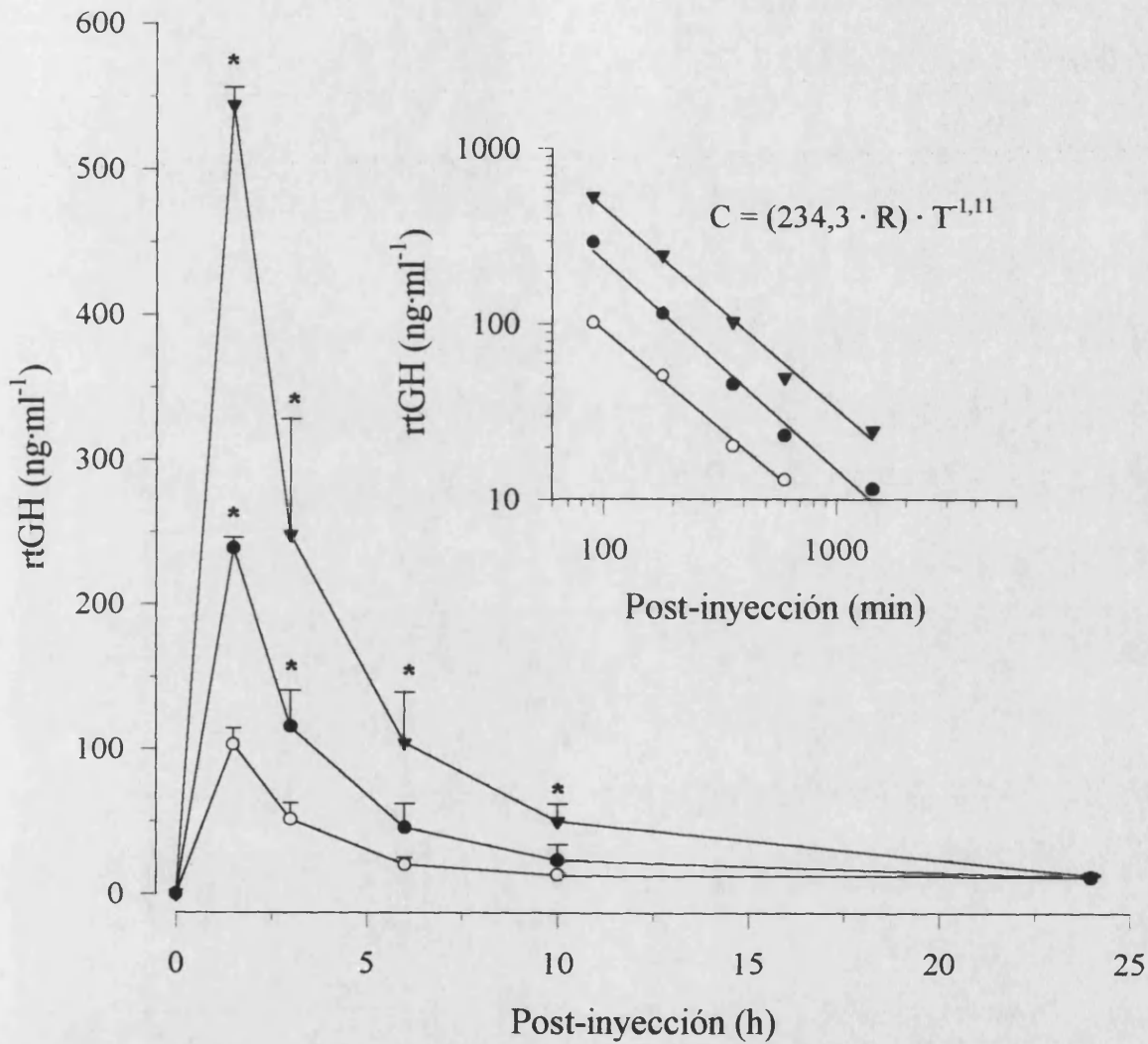


Fig. 5.4. Niveles plasmáticos de GH exógena después de la inyección intracelómica de GH recombinante de trucha (rtGH); (o) $0,75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, (●) $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, (▼) $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Cada valor es la media \pm EEM de 8-10 determinaciones. *, diferente significativamente ($p < 0,05$) de la dosis más baja. La gráfica insertada en la parte superior muestra la relación entre la dosis inyectada y la concentración plasmática resultante: C es la concentración plasmática de rtGH ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), R la dosis inyectada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y T es el tiempo transcurrido desde la inyección (h).

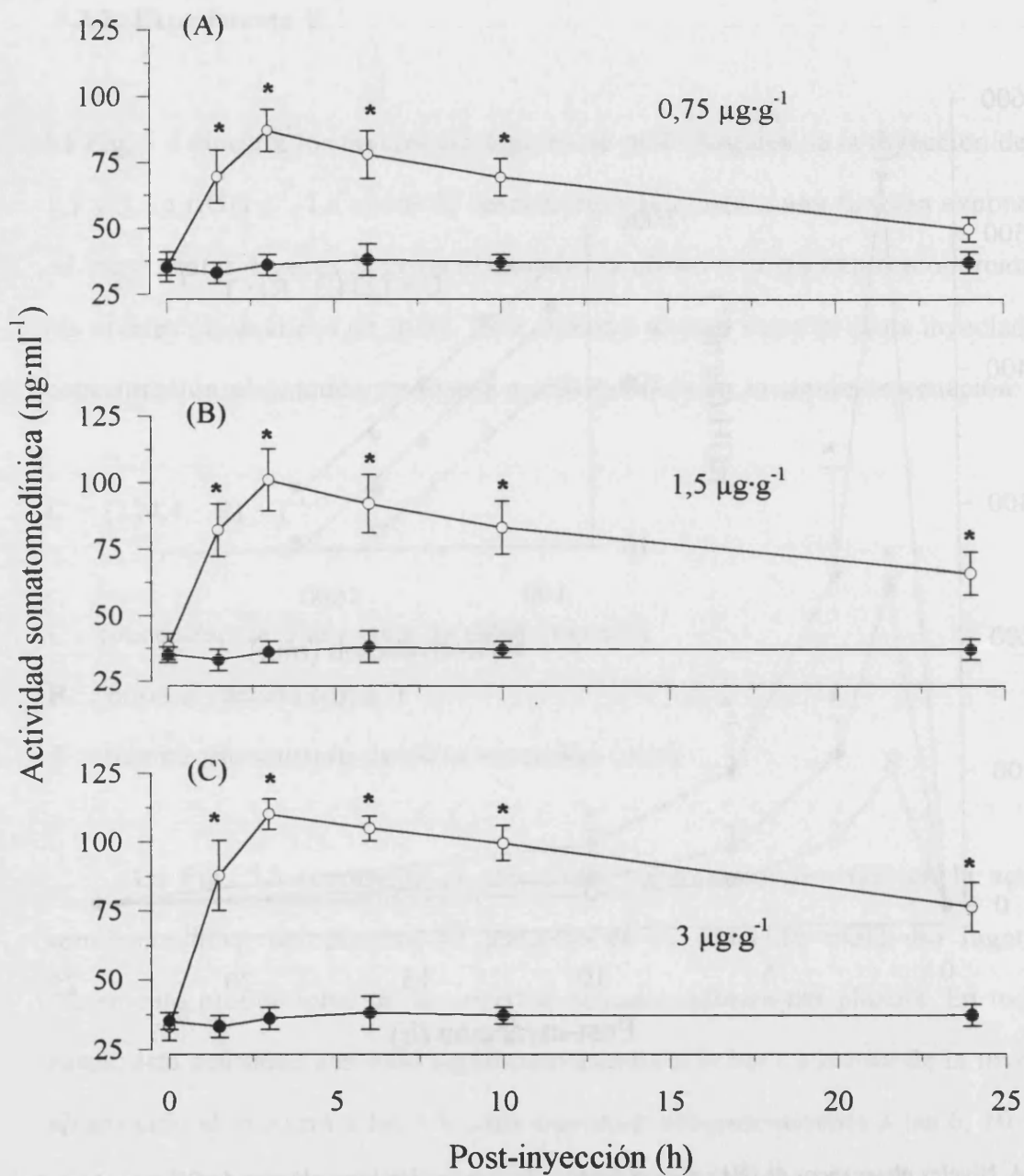


Fig. 5.5. Efecto de una única inyección intracelómica de GH recombinante de trucha (rtGH) en la actividad somatomédica del plasma. Pez control (●), pez tratado (○). Cada valor es la media±EEM de 8-10 determinaciones. *, diferente significativamente ($p < 0,05$) del control.

5.4. DISCUSIÓN

La variación estacional del crecimiento es una característica común de todos los poiquiloterms que viven en climas templados (Ricker, 1979). Los primeros estudios realizados en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) indican que el incremento de la tasa de crecimiento está acompañado de un aumento de la actividad celular de las células somatotropas de la hipófisis (Komourdjian *et al.*, 1976; Komourdjian *et al.*, 1989). Sin embargo, estudios posteriores han evidenciado una compleja y a veces discutida relación entre crecimiento y GH circulante. Se ha descrito un aumento simultáneo de los niveles plasmáticos de GH, capacidad hipoosmorreguladora y tasas de crecimiento durante el estadio esguín del salmón del Atlántico (Björnsson *et al.*, 1989; Prunet *et al.*, 1989) y del salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Young *et al.*, 1989a). En cambio, también se ha descrito una falta de correlación positiva entre niveles plasmáticos de GH y crecimiento en peces post-esguín (Stefansson *et al.*, 1991). Además, en individuos mal desarrollados (*stunt*) de salmón del Atlántico y coho, en los que el crecimiento es prácticamente despreciable, los niveles de GH se encuentran aumentados enormemente (Bolton *et al.*, 1987; Björnsson *et al.*, 1988, Young *et al.*, 1989b, Duan *et al.*, 1995).

Nota: *stunt*, alevines de salmónidos anadromos mal desarrollados como consecuencia del paso al agua de mar sin haber completado el estadio esguín (*smolt*).

Es más, al comparar distintas líneas de trucha seleccionadas por crecimiento, las que presentan niveles más altos de GH circulante corresponden a las de menor crecimiento (Sumpter, 1992).

Otra evidencia de esta falta de correlación positiva la encontramos en la carpa dorada (*Carassius auratus*), cuyo pico estacional de GH circulante tiene lugar entre primavera y principios de verano, mientras que el máximo crecimiento se da en julio (Marchant y Peter, 1986). En salmón coho se ha descrito un fenómeno similar, las mayores tasas de crecimiento tienen lugar un mes después del pico de GH detectado en primavera (principios de mayo) (Duan *et al.*, 1995). De igual modo, en la dorada, se observa que los niveles más altos de GH circulante se dan en mayo, mientras que la mayor tasa de crecimiento tiene lugar durante el periodo estival.

La aparente disociación entre GH y crecimiento se ha descrito en otras especies de vertebrados, incluso en aquellas especies en las que se ha demostrado el enorme efecto estimulador de la GH sobre el crecimiento (Bacon *et al.*, 1987; Goddard *et al.*, 1988; Norton *et al.*, 1989). Una posible explicación podría ser que la acción estimuladora del crecimiento depende de otros factores además de la concentración plasmática de GH circulante (vida media, densidad de receptores e interacciones con otras hormonas o factores de crecimiento). De hecho, en mamíferos está plenamente aceptado que un dilatado periodo de ayuno provoca una caída en el número de receptores hepáticos de GH (Postel-Vinay *et al.*, 1982; Maes *et al.*, 1983; Straus y Takemoto, 1990), mientras que la realimentación está asociada

al aumento del número y afinidad de estos receptores (Breier *et al.*, 1988). En salmónidos *stunt*, que se caracterizan por presentar un marcado retraso del crecimiento, niveles elevados de GH circulante están asociados a una disminución del número de receptores hepáticos (Fryer y Bern, 1979; Gray *et al.*, 1992). En la dorada, el ayuno también comporta una disminución del número de receptores hepáticos de GH y de la actividad somatomédica del plasma (ver Cap. 3). Por el contrario, tras varias semanas de realimentación, se observa un marcado aumento del número de receptores unido a un nivel de ocupación más alto (receptores totales / receptores libres). Este balance o relación compensatoria entre GH y receptores hepáticos de GH también se dio a lo largo del presente estudio, siendo especialmente evidente durante el periodo estival en donde el incremento de la actividad somatomédica y del número total de receptores hepáticos de GH estuvo acompañado de una disminución de la GH circulante. Se ha descrito una relación similar en mamíferos y aves, no sólo en base a una relación temporal (Eigenmann *et al.*, 1984; Merimee *et al.*, 1981) sino también cuando se hacen comparaciones entre líneas seleccionadas por crecimiento (Blair *et al.*, 1988; Scanes *et al.*, 1989).

Es necesario un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de la secreción y acción de la GH. No obstante, si tenemos en cuenta la conocida acción inhibitoria de la IGF-I en la secreción hipofisaria de GH (Pérez Sánchez *et al.*, 1992), parece lógico que el aumento del número de receptores hepáticos y de los niveles plasmáticos de IGFs vaya acompañado de una disminución de la secreción de GH, y en consecuencia de la GH circulante. Por otra

parte, el incremento primaveral de los niveles plasmáticos de GH podría ser atribuido a cambios estacionales, como el aumento de la longitud del día o de la temperatura (Björnsson *et al.*, 1989; Okumoto *et al.*, 1989; Sweeting y McKeown, 1989, Duan *et al.*, 1995). Es bien conocido el efecto de la temperatura sobre el crecimiento, aunque la mayor parte de los autores sugieren que el fotoperiodo es el responsable por excelencia de este aumento estacional de la GH (Okumoto *et al.*, 1989; Sweeting y McKeown, 1989). Björnsson *et al.* (1989) demostraron cómo al aumentar artificialmente el fotoperiodo, se elevaban los niveles circulantes de GH en el salmón del Atlántico. En este estudio también se observó como el aumento primaveral de los niveles plasmáticos de GH coincide con el aumento estacional del fotoperiodo. No obstante, el corto desfase temporal entre fotoperiodo y temperatura hace difícil discernir cual de estos parámetros es el que ejerce una mayor influencia en la secreción de GH.

En cualquier caso, las variaciones estacionales de GH deben reflejar cambios en la actividad hipotalámica. En la carpa dorada, la somatostatina (SS) presente en hipófisis y parte anterior del cerebro está inversamente correlacionada con los niveles plasmáticos de GH (Marchant *et al.*, 1989). De este modo, los bajos niveles de GH circulante detectados en la dorada durante el periodo invernal podrían reflejar un aumento del tono inhibitorio de la SS hipotalámica. En estas condiciones, demostramos que la administración de GH induce un aumento en la actividad somatomédica, comparable al observado durante el periodo de máximo crecimiento. No obstante, es interesante destacar que otros estudios no apoyan tal

afirmación. Cavari *et al.* (1993) no consiguieron incrementar el crecimiento con la administración de GH de mamífero. Este hecho podría reflejar que la dosis inyectada (1 $\mu\text{g/g}/2$ semanas) no es suficientemente alta. En salmónidos, la dosis mínima efectiva suele oscilar entre 0,1 y 1 $\mu\text{g/g}/\text{semana}$ (Weatherley y Gill, 1987; Le Bail *et al.*, 1993b). Sin embargo, en la dorada, a los dos días de la administración de rtGH (0,75 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), los niveles plasmáticos de esta hormona están por debajo de los niveles detectables. Es difícil establecer comparaciones dadas las diferencias de las condiciones experimentales (hormonas y animales utilizados). No obstante, teniendo en cuenta que la afinidad de la rtGH por los receptores de GH de dorada es mucho mayor que la mostrada por las GHs de mamíferos (ver Cap. 3), no sorprende que Cavari *et al.* (1993) no consiguieran establecer un efecto positivo sobre el crecimiento.

En resumen, en este capítulo se evidenció la regulación de la secreción de GH y de sus receptores hepáticos. Este hecho podría explicar, al menos en parte, la aparente disociación entre crecimiento y niveles de GH circulante. Por otra parte se comprobó que un aumento sostenido de la GH circulante incrementa la actividad somatomédica del plasma. Ello sugiere que la GH puede actuar como factor limitante del crecimiento, a pesar de no encontrarse una correlación positiva entre crecimiento y niveles circulantes.

6. Efecto de la Ración y del Nivel Proteico de la Dieta sobre el Crecimiento y el Sistema Somatotrópico.

RESUMEN. En este capítulo se determinó el efecto de la ración y de los niveles de proteína en la dieta sobre el crecimiento, niveles circulantes de GH, receptores hepáticos de GH y actividad somatomedínica del plasma. Tanto la ración como la cantidad de proteína afectaron al crecimiento y a los factores hormonales considerados. Se observó una disminución significativa y progresiva de los niveles plasmáticos de GH con el aumento de las tasas de crecimiento y del nivel de proteína en la dieta. En cambio, el número de receptores hepáticos de GH y la actividad somatomedínica aumentaron con el incremento de proteína. Este hecho reflejaría una mayor sensibilidad por parte del hígado a la acción de GH. En animales alimentados con dietas comerciales, los niveles plasmáticos de GH disminuyeron significativamente con el aumento de las tasas de ingesta. Sin embargo, en los animales alimentados *ad libitum* (5,5 %P·d⁻¹), los niveles de GH aumentaron con respecto a los alimentados al 2,7 %P·d⁻¹. La actividad somatomedínica y el número de receptores hepáticos de GH siguieron una tendencia opuesta. Este comportamiento, aparentemente anómalo, podría formar parte del mecanismo que disminuye la utilización del alimento en un estado de sobrealimentación.

Nota: Este trabajo ha sido publicado recientemente en la revista *Journal of Nutrition* 125: 546-552 (1995).

6.1. INTRODUCCIÓN

En capítulos anteriores se ha visto que la secreción de GH esta sujeta a un control preferentemente hipotalámico. No obstante, también se ha puesto de relieve que la regulación de esta secreción comporta un complejo sistema de control neuroendocrino que conlleva la participación de neurotransmisores y procesos de retroalimentación por parte de sustratos metabólicos y hormonales (ver Cap. 1). Tal circunstancia explica que no suele darse una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de GH y la tasa de crecimiento (ver Cap. 5). De hecho, en humanos, la restricción energética y proteica está asociada a un aumento de la secreción de GH y a una disminución de los niveles plasmáticos de IGFs (Pell y Bates, 1990; Ross y Buchanan, 1990). De igual modo, la diabetes va ligada a un aumento de la secreción de GH y a una disminución de la actividad somatomédica (Asplin *et al.*, 1989). La sobrealimentación también está unida a un aumento de la actividad catabólica para minimizar la ganancia de peso y facilitar la normalización del peso corporal después de dicho trastorno alimenticio (Schwartz *et al.*, 1992). Por consiguiente, ante la disminución de la secreción de GH en individuos obesos (Buonomo y Kindt, 1993; Leidy *et al.*, 1993), es difícil establecer si ello es una consecuencia y/o uno de los factores que favorece la obesidad.

En los peces, se ha demostrado reiteradamente que la restricción del alimento va unida a un aumento de la secreción de GH (Sumpter *et al.*, 1991; Farbridge y Leatherland, 1992). Sin embargo, la respuesta de la GH ante diferentes estados nutricionales sigue siendo un campo prácticamente inexplorado. De acuerdo con ello, el objetivo de este capítulo fue establecer el efecto de la ración y del nivel de proteína en la dieta sobre el crecimiento, niveles de GH plasmática, número de receptores hepáticos de GH y actividad somatomédica del plasma.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1. Animales.

Los alevines-juveniles de dorada fueron proporcionados por la piscifactoría Aquadelt (Delta del Ebro, Tarragona). Antes de ser distribuidos en los tanques de experimentación, fueron sometidos a un periodo de aclimatación de 3 semanas. Los tanques utilizados eran de fibra de vidrio con una capacidad de 500 l. El flujo de agua fue de $10 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ y la aireación constante. El fotoperiodo y la temperatura fueron los naturales.

6.2.2. Experimento I: Niveles de proteína en la dieta.

Se formularon 3 dietas experimentales (B1, B2 y B3) con distintas proporciones de proteína (Cuadro 6.I). El contenido energético se fijó en $20\text{-}20,9 \text{ kJ}\cdot\text{g peso seco}^{-1}$, mientras que la proporción proteína/energía osciló entre 17 y $26 \text{ mg}\cdot\text{kJ}^{-1}$. La formulación y elaboración de las dietas corrió a cargo del Dr. Kaushik, *Laboratoire de Nutrition des Poissons (UNITE MIXTE IFREMER-INRA)*. Las dietas se fabricaron en seco sin la aplicación de vapor y se almacenaron a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

CUADRO 6.1 Composición de las dietas experimentales¹

	B1	B2	B3
	g · 100g peso húmedo ⁻¹		
Ingredientes			
Harina de arenque (CP:70) ²	33	44	56
Harina de semilla de soja (CP:49) ³	21	28	32
Almidón de maíz gelatinizado ⁴	33,5	16,5	2
Alginato sódico	2	2	2
Complejo vitamínico ⁵	1	1	1
Complejo de sales minerales ⁶	1	1	1
Aceite de hígado de bacalao	8,5	7,5	6
Análisis			
Peso seco, g·100g	91,1	91,2	90,7
Energía bruta, kJ·g peso seco ⁻¹	20,1	20,4	20,9
	g · 100g peso seco ⁻¹		
Proteína	34,5	44,6	54,7
Lípidos	12,9	12,6	12,4
Cenizas	10,0	12,2	14,3
Proteína/energía, mg·kJ ⁻¹	17,2	21,8	26,2

¹Para determinar la composición de las dietas se utilizaron los métodos recomendados por la AOAC (1990); AOAC, *Association of Official Analytical Chemists*. CP, porcentaje proteína cruda. ²Sopropeche, Boulogne, Francia. ³Descal, Pomarez, Francia. ⁴Teustar, Aquitane, Bourdeaux, Francia. ⁵Suministrado como sigue (mg·kg dieta⁻¹): retinil acetato, 2,58; DL-colecalciferol, 0,037; DL-alpha tocoferol acetato, 30; bisulfato sódico menadiona, 2,5; tiamina, 7,5; riboflavina, 15; piridoxina, 7,5; ácido nicotínico, 87,5; ácido fólico, 2,5; pantotenato cálcico, 2,5; vitamina B12, 0,025; ácido ascórbico, 250; inositol, 500; biotina, 1,25 y cloruro de colina, 500; usándose celulosa como sustrato. ⁶Suministrado como sigue (mg o g·kg dieta⁻¹): carbonato cálcico (40 % Ca), 2,15 g; hidróxido magnésico (60 % Mg), 1,24 g; cloruro potásico, 0,9 g; citrato férrico, 0,2 g; yoduro potásico, 4 mg; cloruro sódico, 0,4 g; fosfato de calcio e hidrógeno, 50 g; sulfato de cobre, 0,3 mg; sulfato de zinc, 40 mg; sulfato de cobalto, 2 mg; sulfato de manganeso, 30 mg; seleniato sódico, 0,3 mg.

Alevines-juveniles de 11,5 g de peso medio fueron distribuidos al azar en 6 tanques de experimentación (75 peces/tanque). La temperatura del agua osciló entre 19,5 y 22 °C a lo largo del periodo experimental (7 semanas entre junio y julio). Cada una de las dietas fue asignada aleatoriamente a dos réplicas. El alimento fue suministrado mediante un comedero de autodemanda (ver Fig. 6.1), a razón de 6 %P·d⁻¹. Esta cantidad fue reducida gradualmente hasta un 3,5 %P·d⁻¹, con el fin de minimizar la sobrealimentación (*overfeeding*), manteniendo un nivel lo más cercano posible a la saciedad. Cada 10-12 días se determinó la biomasa total del tanque, con el subsiguiente ajuste de la ración.

Al final del periodo experimental, 10 peces de cada tanque (20 peces por tratamiento) fueron anestesiados con MS-222 disuelto en el agua (0,1 g·l⁻¹). Seguidamente, mediante punción caudal, se extrajeron muestras de sangre y se centrifugaron a 3.000 g durante 20 min. El plasma obtenido fue almacenado a -20°C hasta su utilización en los análisis posteriores. La extracción de sangre se realizó antes de que pasaran 20 h desde la última ingesta. Los peces fueron sacrificados mediante sección cervical, una vez tomada la muestra sanguínea. A continuación se extrajo el hígado e inmediatamente se procesó para obtener las preparaciones de membrana para el ensayo de receptores hepáticos (ver Cap. 3). Al inicio (20 peces) y al final (20 peces/tratamiento) del periodo experimental se analizó la composición corporal. Estos animales se homogeneizaron con una picadora. Una parte del homogeneizado se destinó a la cuantificación del contenido en agua mediante secado en una estufa a 110 °C durante 24 h. El resto fue liofilizado con el fin de analizar

su composición de acuerdo con los métodos de la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1990). La cantidad de proteína se determinó por el método de Kjeldahl (N·6,25), las grasas siguiendo el método de Folch *et al.* (1957), y el contenido energético utilizando una bomba calorimétrica adiabática.

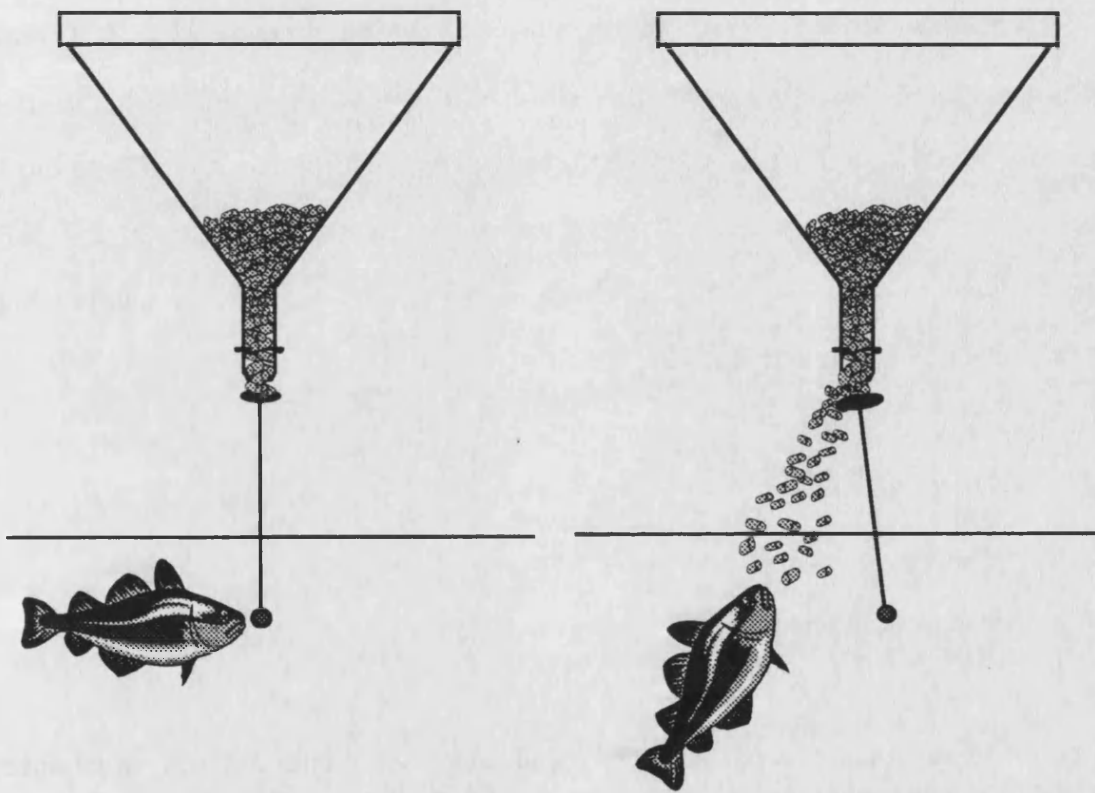


Fig. 6.1. Esquema del comedero de autodemanda.

6.2.3. Experimento II: Ración.

Alevines-juveniles de dorada (34,5 g de peso medio) se distribuyeron al azar en 8 tanques de experimentación (40 peces/tanque). Fueron alimentados con un pienso comercial de la casa Ewos (55 % proteína, 15 % lípidos), mediante un comedero de autodemanda (ver Fig. 6.1). La temperatura del agua osciló entre 22 y 24 °C durante el periodo experimental (7 semanas, entre julio y agosto). A uno de los grupos en tratamiento (2 tanques por tratamiento) se le privó de alimento, a otro se le dio libre acceso (5,5 %P·d⁻¹), y a los 2 restantes se les racionó al 1,2 y al 2,7 %P·d⁻¹, respectivamente. Al final del experimento, se extrajeron muestras de sangre e hígado (20 peces por tratamiento).

6.2.4. Radioinmunoensayo GH e IGF-I

Los niveles plasmáticos de GH endógena se determinaron mediante el radioinmunoensayo (RIA) homólogo de doble anticuerpo para la GH de dorada (Cap. 5). La actividad somatomédica se determinó siguiendo el protocolo descrito en el Cap. 3 (extracción ácida de las IGFs y análisis mediante el RIA de IGF-I humana).

6.2.5. Ensayo de radiorreceptores de GH.

El número de receptores hepáticos de GH, libres y totales, se determinó según el protocolo descrito en el Cap. 3. Como trazador se utilizó la GH nativa de dorada.

6.2.6. Análisis estadístico.

Todos los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza de una vía. Cuando los valores analizados dieron diferencias significativas ($p < 0,05$), se compararon las medias entre sí con el test de Duncan.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Experimento I: Niveles de proteína en la dieta.

El cuadro 6.II muestra los distintos índices de crecimiento de los peces alimentados durante 7 semanas con las dietas B1, B2 y B3. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las tasas de crecimiento (SGR), siendo la tasa de ingesta del mismo orden en los tres grupos experimentales. La SGR osciló entre 1,8 y 2,5, valores que corresponden a los peces alimentados con la dieta B1 y B3, respectivamente. El índice de conversión (IC) de los peces alimentados con B1 fue significativamente más alto ($p < 0,05$) que el de los alimentados con B2 y B3. La ganancia de nitrógeno diaria también varió con el nivel de proteína en la dieta, alcanzando valores de 464, 505 y 582 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en los peces alimentados con la dieta B1, B2 y B3, respectivamente. El depósito de grasas también aumentó con el incremento de proteína en la dieta, si bien las diferencias no fueron significativas. La ganancia de energía se vio afectada significativamente ($p < 0,05$) por la dieta, oscilando entre 1,26 (B1) y 1,53 $\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (B3).

CUADRO 6.II. Índices de crecimiento de los animales alimentados con las dietas experimentales durante 7 semanas¹.

	Dieta experimental		
	B1	B2	B3
P _o , peso inicial (g)	11,51±0,39	11,53±0,15	11,54±0,12
P _f , peso final (g)	28,50±2,29 ^a	33,20±0,95 ^{ab}	38,72±0,27 ^b
T _o , talla inicial (cm)	7,62±0,07	7,62±0,02	7,63±0,03
T _f , talla final (cm)	9,99±0,18 ^a	10,59±0,01 ^{ab}	11,05±0,01 ^b
SGR ²	1,82±0,12 ^a	2,15±0,02 ^{ab}	2,46±0,005 ^b
Ingesta, %P·d ⁻¹	5,02±0,04	5,15±0,029	4,96±0,03
IC ³	2,56±0,01 ^a	2,08±0,001 ^b	1,85±0,01 ^c
Ganancia de nitrógeno, mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	464,3±0,01 ^a	505,9±0,01 ^b	582,5±0,01 ^c
Ganancia de grasa, g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	1,63±0,03	1,77±0,05	1,86±0,12
Ganancia energética, MJ·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	1,26±0,06 ^a	1,35±0,04 ^b	1,53±0,04 ^c

¹Cada valor corresponde a la media±EEM de dos tanques. EEM, Error Estándar de la Media. Los valores de una misma fila que no comparten la misma letra, son diferentes significativamente (p<0,05).

²Tasa instantánea de crecimiento, $SGR = (\ln P_f - \ln P_o) \cdot d^{-1} \cdot 100$.

³Índice de conversión, $IC = \text{peso seco del alimento} \cdot (P_f - P_o)^{-1}$.

La Fig. 6.2 muestra el efecto del nivel de proteína en la dieta sobre los niveles de GH circulante, actividad somatomédica del plasma y número de receptores hepáticos de GH. El aumento de la ingesta proteica y de la SGR estuvo asociado a una disminución progresiva y significativa de los niveles plasmáticos de GH, los cuales oscilaron entre los $15,2 \pm 1,11 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, correspondientes a los peces alimentados con la dieta B1, y los $8,98 \pm 1,00 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, correspondientes a los peces alimentados con la dieta B3 (ver Fig. 6.2A). La actividad somatomédica del plasma aumentó significativamente ($p < 0,05$) desde los $66,3 \pm 2,95 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, detectados en los peces alimentados con la dieta B1, hasta los $95,2 \pm 2,57 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, correspondientes a los de la dieta B3 (Fig. 6.2B). El número de receptores hepáticos de GH mostró una tendencia similar. La afinidad de la hormona por el receptor no se vio afectada por el tratamiento (datos no mostrados). Sin embargo, tanto los receptores totales como los libres, aumentaron significativamente ($p < 0,05$) con el incremento del nivel de proteína en la dieta (ver Figs. 6.2C y 6.2D).

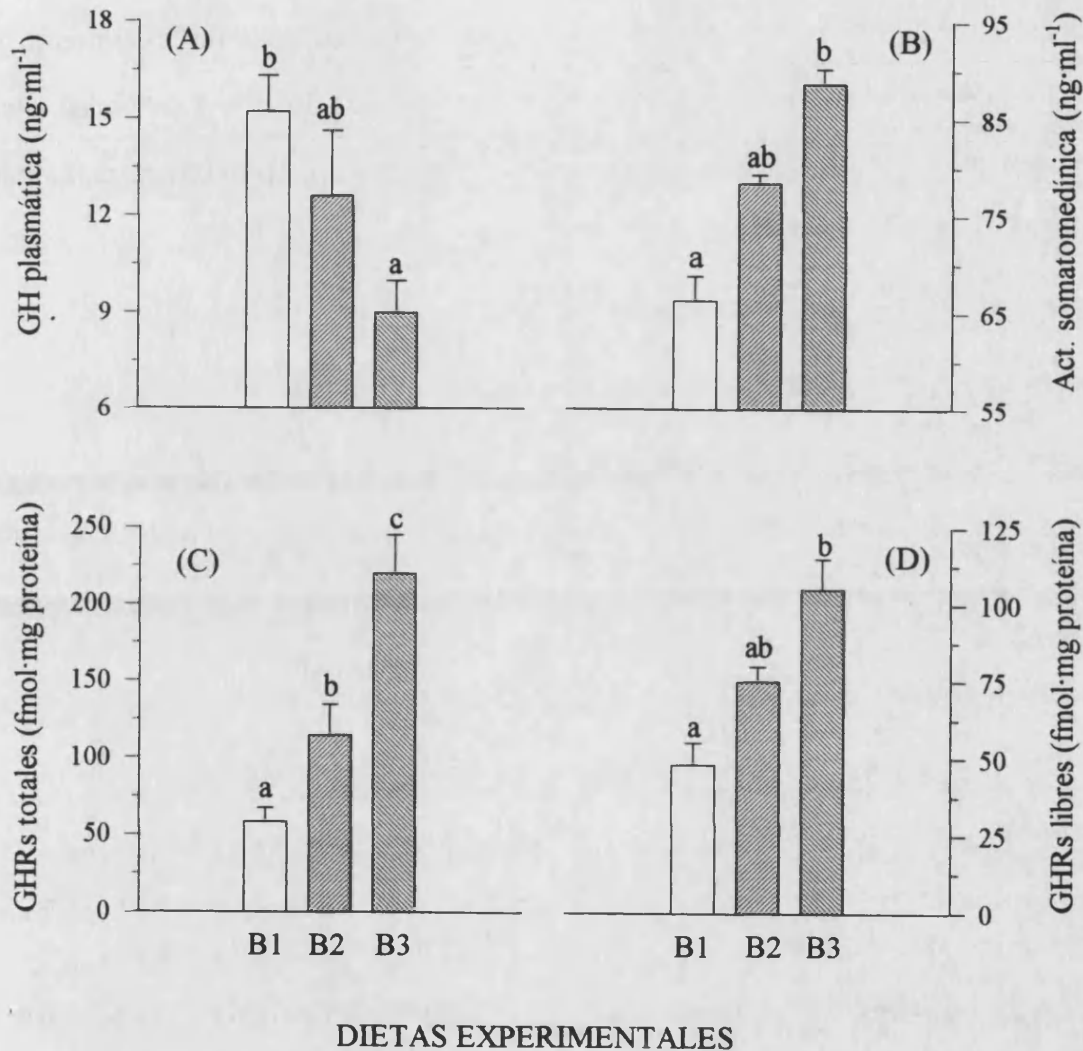


Fig. 6.2. Efecto de la proteína en la dieta (B1, 34,5; B2, 44,6; B3, 54,7 g·100g peso seco⁻¹) sobre los niveles plasmáticos de GH (A), actividad somatomedínica del plasma (B), número total de receptores hepáticos (C) y número de receptores libres del hígado (D). Cada valor es la media±EEM de 15-20 determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

6.3.2. Experimento II: Ración.

El cuadro 6.III muestra el efecto de la ración sobre las tasas de crecimiento y el índice de conversión del alimento en peces alimentados durante 7 semanas. Ambos valores mostraron un aumento progresivo y significativo ($p < 0,05$) al aumentar la ración (0, 1,2, 2,7, 5,5 %P·d⁻¹).

CUADRO 6.III Índices de crecimiento de los animales alimentados durante 7 semanas con diferentes tasas de ingesta¹.

	Ingesta, %P·d ⁻¹			
	0	1,2	2,7	5,5
P _o , peso inicial (g)	34,34±0,69	34,54±0,59	34,29±0,43	34,51±0,43
P _f , peso final (g)	28,50±0,71 ^a	59,27±0,42 ^b	76,14±0,78 ^c	86,50±0,78 ^d
T _o , talla inicial (cm)	10,81±0,02	10,88±0,06	10,80±0,02	10,84±0,02
T _f , talla final (cm)	10,85±0,01 ^a	13,06±0,09 ^b	13,90±0,03 ^c	14,36±0,02 ^d
SGR ²	-0,40±0,01 ^a	1,09±0,02 ^b	1,59±0,04 ^c	1,83±0,01 ^d
IC ³		1,00±0,01 ^a	1,54±0,01 ^b	2,71±0,02 ^c

¹Cada valor corresponde a la media±EEM de dos tanques. EEM, Error Estándar de la Media. Los valores de una misma fila que no presentan letras distintas son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

²Tasa instantánea de crecimiento, $SGR = (\ln P_f - \ln P_o) \cdot d^{-1} \cdot 100$.

³Índice de conversión, $IC = \text{peso seco del alimento} \cdot (P_f - P_o)^{-1}$.

Al modificar la ración, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los niveles de GH circulante, actividad somatomédica del plasma y número de receptores hepáticos de GH. Los niveles de GH disminuyeron progresivamente desde los $36,1 \pm 3,10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de los peces ayunados hasta los $6,6 \pm 0,26 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de los alimentados al 2,7 %P·d⁻¹. Se observó un aumento significativo en los peces alimentados al 5,5 %P·d⁻¹ al compararlos con los peces alimentados al 2,7 %P·d⁻¹ (Fig. 6.3A). La actividad somatomédica del plasma siguió una tendencia totalmente opuesta, aumentó desde los $36,0 \pm 2,5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ detectados en los peces ayunados hasta los $100,6 \pm 4,66 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de los peces alimentados al 2,7 %P·d⁻¹ (Fig 6.3B). Siguiendo con esta tendencia opuesta, se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) de estos niveles, al comparar los peces alimentados al 5,5 %P·d⁻¹ con los alimentados al 2,7 %P·d⁻¹. De un modo similar, el número de receptores hepáticos de GH, tanto libres como totales, aumentó conjuntamente con los niveles de ingesta. Sin embargo, al igual que la actividad somatomédica, decreció en los peces alimentados al 5,5 %P·d⁻¹ (Fig. 6.3C). La afinidad de los receptores no varió de forma significativa (datos no mostrados).

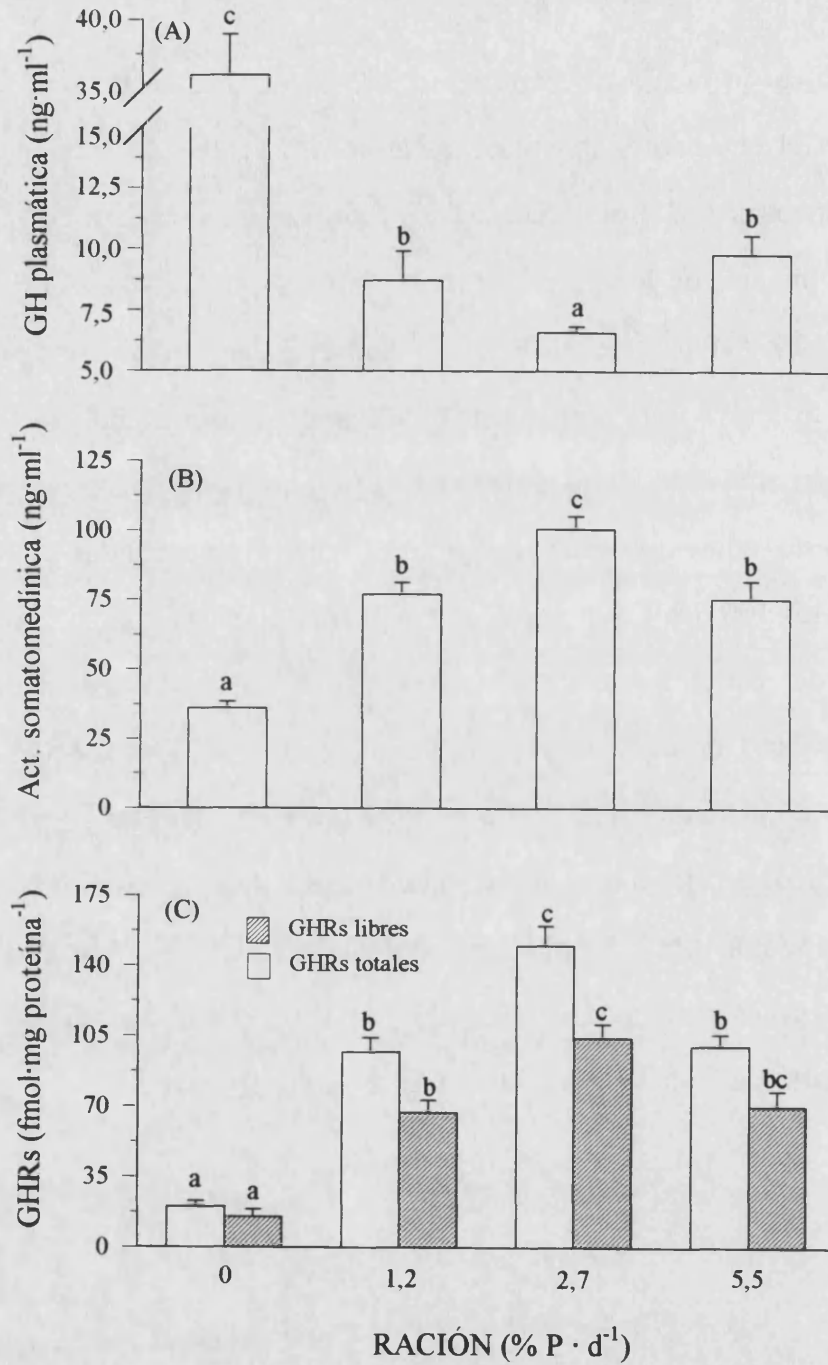


Fig. 6.3. Efecto de la ración en los niveles de GH circulante (A), actividad somatomedínica del plasma (B) y número de receptores hepáticos de GH (GHRs) (C). Cada valor es la media±EEM de 15-20 determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

6.4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta experiencia indican claramente que las tasas de crecimiento de los alevines-juveniles de dorada aumentan con los niveles de proteína en la dieta. El crecimiento fue similar o mejor que el observado en estudios previos en dorada (Klaoudatos y Apostopoulos, 1986; Davies *et al.*, 1993) u otras especies afines (Tswis *et al.*, 1992). Sin embargo, en todos los grupos experimentales, la conversión del alimento siguió siendo alta con respecto a los salmónidos, en donde el IC suele ser igual o inferior a 1 con un incremento de peso del 2 %P·d⁻¹ (Austreng *et al.*, 1987, Cho y Kaushik, 1990). Este hecho ha sido asociado a unos requerimientos proteicos más bajos. En cualquier caso, los peces utilizan una parte importante de las proteínas de la dieta para la obtención de energía, incluso cuando son alimentados con dietas de bajo contenido proteico. Así pues, en la trucha, el 40 % de la proteína presente en la dieta tiene un uso energético (Kim *et al.*, 1991).

En mamíferos, el balance proteína/energía es uno de los factores que afectan a la producción de IGF-I, sintetizada mayoritariamente en el hígado en respuesta a la acción de la GH (Pell y Bates, 1990, Ross y Buchanan, 1990). En este estudio, la disminución del crecimiento y de los niveles de proteína en la dieta estuvo unida a un descenso de la actividad somatomédica del plasma y del número de receptores hepáticos de GH. Asimismo, se observó un aumento de los niveles



circulantes de GH con la disminución de las tasas de crecimiento. En este contexto, debemos recordar que en la dorada, y posiblemente en otras especies de teleósteos, el aumento estival de la tasa de crecimiento está más relacionado con el número de receptores hepáticos que con un aumento de la GH circulante (ver Cap. 5). Por consiguiente, al igual que en los vertebrados superiores (ver Leung *et al.*, 1987b; Houseknecht *et al.*, 1988), estos resultados sugieren que la disminución de la tasa de crecimiento en presencia de niveles altos de GH y de un número bajo de receptores hepáticos refleja la insensibilidad del hígado a la acción de la GH, y en consecuencia, la disminución del tono inhibitorio ejercido por las IGFs en la secreción hipofisaria de GH (ver Pérez-Sánchez *et al.*, 1992).

En la trucha, los niveles circulantes de GH disminuyen con el aumento de la ración, de manera que la ganancia diaria de energía y de nitrógeno está inversamente correlacionada con la concentración de GH plasmática (Storebakken *et al.*, 1991). En la dorada, también observamos una disminución significativa y progresiva de la GH circulante con el aumento de la cantidad de alimento (0, 1,2 y 2,7 %P·d⁻¹). Sin embargo, en los peces alimentados *ad libitum* (5,5 %P·d⁻¹), la concentración plasmática de GH fue mayor que la observada en los alimentados al 2,7 %P·d⁻¹. Este aumento de los niveles de GH estuvo unido a una disminución del número de receptores hepáticos de GH y de la actividad somatomédica del plasma, proceso que podría formar parte del mecanismo que disminuye la utilización del alimento en un estado de sobrealimentación. En este contexto, es interesante señalar que en la trucha la síntesis de proteínas hepáticas es mayor con una tasa de ingesta

la trucha la síntesis de proteínas hepáticas es mayor con una tasa de ingesta intermedia que a elevados niveles de ingesta (McMillan y Houlihan, 1992).

En los últimos años, ha aumentado el interés por conocer los efectos presuntamente beneficiosos que comporta la restricción moderada de la ingesta. En mamíferos, se ha demostrado que este régimen alimenticio aumenta la esperanza de vida (Yu *et al.*, 1982; Iwasaki *et al.*, 1988) y la síntesis proteica (Ricketts *et al.*, 1985; Ward, 1988). D'Costa *et al.* (1993) observaron que este aumento de la síntesis proteica es consecuencia, al menos en parte, de una mayor respuesta tisular a la acción de las IGFs, así como de un aumento de los niveles circulantes de IGF-I y GH.

Por otra parte, es un hecho reconocido que en los individuos obesos no genéticos aumenta el metabolismo basal para minimizar la ganancia de peso que acompaña a todo estado de sobrealimentación (Schwartz *et al.*, 1992). Según Yamamoto y Kato (1993), esta alteración está asociada a una disminución de la concentración plasmática de IGF-I. En este trabajo no se analizaron los niveles de GH circulante. Sin embargo, en base a nuestros resultados, podemos sugerir que la disminución de la actividad somatomédica unida a un aumento de la GH es un hecho esencial para desencadenar una acción catabólica tanto en animales sobrealimentados como en subalimentados. En este contexto, es de interés que en los casos de deficiencia de GH, la administración de esta hormona contrarresta el aumento de la masa del tejido adiposo preservando el resto de masa corporal

(Slootweg, 1993). Esta acción lipolítica es independiente de la IGF-I y se ha observado en gran número de especies de vertebrados, incluidos los peces (Leatherland y Nuti, 1981; Sheridan, 1986; Leung *et al.*, 1991).

En resumen, este estudio evidencia una compleja y a veces controvertida relación entre crecimiento y sistema somatotrópico. No obstante, podemos afirmar que ante un inadecuado estado nutricional (composición de dieta, tasa de alimentación), peces u otros vertebrados, aumentan los niveles circulantes de GH. En cualquier caso, es necesario profundizar en este aspecto para poder establecer con mayor claridad la interacción entre alimentación y factores endocrinos.

7. Efecto de la Edad y del Cociente Proteína/Energía en los Niveles Circulantes de GH.

RESUMEN. En este capítulo, se pretende averiguar, mediante un diseño multifactorial, el efecto de la relación proteína/energía sobre el crecimiento y los niveles circulantes de GH. Para esta experiencia, se formularon 9 dietas con 3 niveles de proteína (45 %, 52 %, 60 %) y lípidos (8 %, 12 %, 17 %), con un cociente proteína/energía entre 21,7 y 29,2 mg·kJ peso seco⁻¹. Los peces alimentados con dietas con una relación alta en proteína/energía presentaron tasas de crecimiento (SGR=2,6-2,9) e índices de conversión del alimento (IC=1,1-1,3) comparables a los registrados en truchas de rápido crecimiento. Sin embargo, la disminución de la relación proteína/energía de la dieta provocó un aumento de la hiperfagia unido a una disminución del crecimiento y a un empeoramiento del índice de conversión del alimento. Este fenómeno estuvo acompañado de un aumento de los niveles circulantes de GH, lo que podría hacer más acusada la intolerancia a la ingesta de sustratos no proteicos.

También se estudiaron las variaciones de crecimiento, GH circulante y expresión hipofisaria de GH en función de la edad del pez. Los resultados obtenidos nos llevan a sugerir que tanto en peces como en vertebrados superiores, la secreción hipofisaria de GH disminuye con la edad.

7.1. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso de gran complejidad que tiene por resultado una reducción paulatina del funcionamiento de todos los sistemas corporales. Tal disfunción comienza con la madurez del individuo y progresa rápidamente con la edad. Una consecuencia de este proceso degenerativo es el aumento de la masa adiposa corporal, acompañado de una disminución de la potencia muscular, masa corporal no grasa y densidad ósea (Forbes, 1976; Mazess, 1982; Ross *et al.*, 1990). Estos cambios en la composición corporal y crecimiento óseo están asociados, en humanos y animales domésticos, a una disminución de la concentración basal y pulsátil de GH (Corpas *et al.*, 1993). El hecho de que un gran número de efectos biológicos de la GH sean opuestos a los cambios corporales ocasionados por el envejecimiento, ha aumentado el interés por el uso clínico de la GH en individuos adultos. No obstante, muchas de las cuestiones relacionadas con la dosis, beneficios y tolerancia no han sido contestadas todavía, y por tanto, deben ser estudiadas más a fondo (Ho y Hoffman, 1993; Allen *et al.*, 1994; Riedel *et al.*, 1994; Sassolas, 1994; Rosen, 1994). Por otra parte, tal y como se ha descrito en capítulos anteriores, no suele existir una correlación positiva entre niveles de GH y crecimiento. En tales circunstancias, niveles bajos de GH no reflejan un verdadero hiposomatotropismo ya que esta aparente deficiencia va asociada a un incremento del número de receptores hepáticos que origina un aumento de la síntesis y secreción de IGFs y, en consecuencia, de la retroalimentación negativa ejercida sobre la secreción hipofisaria de GH (ver Cap. 5 y 6).

El grado de conocimiento alcanzado en aves y mamíferos es notablemente superior al de vertebrados inferiores. No obstante, tal y como hemos podido comprobar, los peces constituyen un modelo adecuado para el estudio de la acción y regulación de este sistema. Como prueba de ello, se han caracterizado los receptores de GH en hígado (ver Cap. 3), testículo (Le Gac *et al.*, 1992), sistema nervioso central (Pérez-Sánchez *et al.*, 1991), y células hematopoyéticas (Calduch-Giner *et al.*, 1995). Se han detectado cantidades apreciables de GH y receptores en larvas recién eclosionadas (ver Cap. 4). Se han descrito cambios estacionales en los niveles circulantes de GH, así como en el número de receptores hepáticos (ver Cap. 5). A su vez, se ha podido comprobar que la restricción proteica y energética está asociada al aumento de los niveles de GH circulante, así como a la disminución del número de receptores hepáticos de GH y de la actividad somatomédica del plasma (ver Cap. 6). Este defecto a nivel de receptores hepáticos, unido a un aumento de la GH circulante también ocurre en los peces alimentados *ad libitum*. No obstante, queda por establecer si esta resistencia a la acción de GH, es el resultado de una sobrealimentación prolongada o de un efecto más específico (relación proteína/energía). Por otra parte, no se conoce el alcance de la disfunción hipofisaria que tiene lugar con el avance de la edad.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, en este capítulo se estudia, mediante un diseño multifactorial, el efecto de la relación proteína/energía sobre el crecimiento y los niveles circulantes de GH de alevines-juveniles de dorada alimentados a voluntad con comederos de autodemanda. Además, se estudia el efecto de la edad del animal sobre el crecimiento, GH circulante y expresión hipofisaria de GH.

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.1 Interacción Proteína/Energía.

Se formularon 9 dietas con 3 niveles de proteína (45 %, 52 %, 60 %) y lípidos (8 %, 12 %, 17 %). Con la suplementación de distintas cantidades de almidón gelatinizado, se obtuvieron 3 niveles de energía (20,8; 21,7 y 22,4 kJ·peso seco⁻¹), que dieron como resultado una relación proteína/energía entre 21,7 y 29,2 mg·kJ peso seco⁻¹ (Cuadro 7.I). La formulación y elaboración de las dietas corrió a cargo del Dr. Kaushik, *Laboratoire de Nutrition des Poissons (UNITE MIXTE IFREMER-INRA)*. Las dietas se fabricaron en seco, sin la aplicación de vapor, y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

CUADRO 7.1 Composición de las dietas experimentales*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	g · 100g peso húmedo ⁻¹								
Ingredientes									
CPSP G ¹	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Harina de arenque (CP:70) ²	33	43	55	33	43	55	33	43	55
Harina semilla de soja (CP:49) ³	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Gluten	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Almidón de maíz	0	6	10	6	0	0	0	0	0
Almidón de maíz gelatinizado ⁴	30	15	0	20	17	6	22	13	2
Alginato sódico	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Complejo vitamínico ⁵	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Complejo de sales minerales ⁶	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Aceite de hígado de bacalao	2	1	0	6	5	4	10	9	8
	g · 100g peso seco ⁻¹								
Análisis									
Peso seco (%)	86,3	84,9	86,2	87,3	87,1	87,1	89,4	88,4	87,6
Energía bruta (kJ·g peso seco ⁻¹)	20,7	20,8	20,9	21,6	21,9	21,8	22,4	22,4	22,5
	g · 100g peso seco ⁻¹								
Proteínas	45	53	61,3	45,7	52,4	60,7	44,7	51,7	59,5
Lípidos	8,1	7,9	8,1	11,5	12,4	12,5	16,9	16,7	16,5
Cenizas	8,3	10,3	11,9	8,4	10,1	12,1	9,2	10,9	13,1
Proteína/energía (mg·kJ ⁻¹)	21,7	25,4	29,2	21,1	23,9	27,9	19,9	23,1	26,4

*Para determinar la composición aproximada se utilizaron los métodos recomendados por la AOAC (1990); AOAC, *Association of Official Analytical Chemists*. ¹Proteína sintética comercial. ²Sopropeche, Boulogne, Francia. ³Descal, Pomarez, Francia. ⁴Tenstar, Aquitaine, Bourdeaux, Francia. ⁵Suministrado como sigue (mg·kg dieta⁻¹): retinil acetato, 2,58; DL-colecalciferol, 0,037; DL-alfa tocoferol acetato, 30; bisulfato sódico menadiona, 2,5; tiamina, 7,5; riboflavina, 15; piridoxina, 7,5; ácido nicotínico, 87,5; ácido fólico, 2,5; pantotenato cálcico, 2,5; vitamina B12, 0,025; ácido ascórbico, 250; inositol, 500; biotina, 1,25 y cloruro de colina, 500; usándose celulosa como sustrato. ⁶Suministrado como sigue (mg o g·kg dieta⁻¹): carbonato cálcico (40 % Ca), 2,15 g; hidróxido magnésico (60 % Mg), 1,24 g; cloruro potásico, 0,9 g; citrato férrico, 0,2 g; yoduro potásico, 4 mg; cloruro sódico, 0,4 g; fosfato de calcio e hidrógeno, 50 g; sulfato de cobre, 0,3 mg; sulfato de zinc, 40 mg; sulfato de cobalto, 2 mg; sulfato de manganeso, 30 mg; seleniato sódico, 0,3 mg.

Alevines-juveniles, de aproximadamente 15 g de peso, se distribuyeron aleatoriamente y por duplicado, en 18 tanques de fibra de vidrio, de 100 l de capacidad con un flujo de agua de $2 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ y aireación constante (30 peces/tanque) (ver Fig. 7.1). Los peces se alimentaron a voluntad mediante comederos de autodemanda. Se les dio libre acceso al alimento durante 7 h al día. La temperatura del agua osciló entre 21 y 23 °C (junio y julio). Al final del experimento (7 semanas), 15 peces de cada tanque (30 por tratamiento) se anestesiaron con MS-222 al 0,1 %. La sangre se extrajo por punción caudal 18 h después de la última ingesta, y las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta ser analizadas. Adicionalmente, 5 peces/tanque, correspondientes al inicio del experimento, y 10 del final, se sacrificaron por decapitación. Estos animales se homogeneizaron con una picadora. Una parte del homogeneizado se destinó a la cuantificación del contenido en agua mediante secado en una estufa a 110 °C durante 24 h. El resto se liofilizó con el fin de analizar su composición de acuerdo con los métodos recomendados por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1990). La cantidad de proteína se determinó por el método de Kjeldahl (N \cdot 6,25), las grasas siguiendo el método de Folch *et al.* (1957), y el contenido energético utilizando una bomba calorimétrica adiabática.



Fig. 7.1. Tanques y comederos de autodemanda utilizados en la experiencia de nutrición.

7.2.2. Edad.

A finales de julio, se extrajeron muestras de sangre e hipófisis de doradas cultivadas en nuestras instalaciones (+0, ≤ 12 meses; +1, entre 12 y 24 meses; +2, ≥ 24 meses). Estos peces habían sido alimentados con dietas comerciales (Ewos, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de plasma fueron almacenadas a -20 °C. Las hipófisis se extrajeron en condiciones estériles y se congelaron a -70 °C hasta el momento de ser analizadas.

7.2.3. Radioinmunoensayo de GH.

Los niveles de GH plasmática e hipofisaria se determinaron mediante el radioinmunoensayo (RIA) homólogo de doble anticuerpo descrito en el Cap. 5. La GH hipofisaria se cuantificó a partir de la homogeneización individual con tampón de ensayo de cada una de las hipófisis.

7.2.4. Cuantificación del mRNA de GH.

La extracción del RNA hipofisario se llevó a cabo de acuerdo con el método del isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987) (ver Fig. 7.2). Los precipitados de RNA se secaron al vacío y se disolvieron en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1 %. La lectura de la densidad óptica (D.O., 260/280 nm) se utilizó para estimar la cantidad y pureza de las muestras.

$$D.O._{260}/D.O._{280} = 1,8-2$$

$$D.O._{260} = 1 \dots\dots\dots \approx 40 \mu\text{g RNA}\cdot\text{ml}^{-1}$$

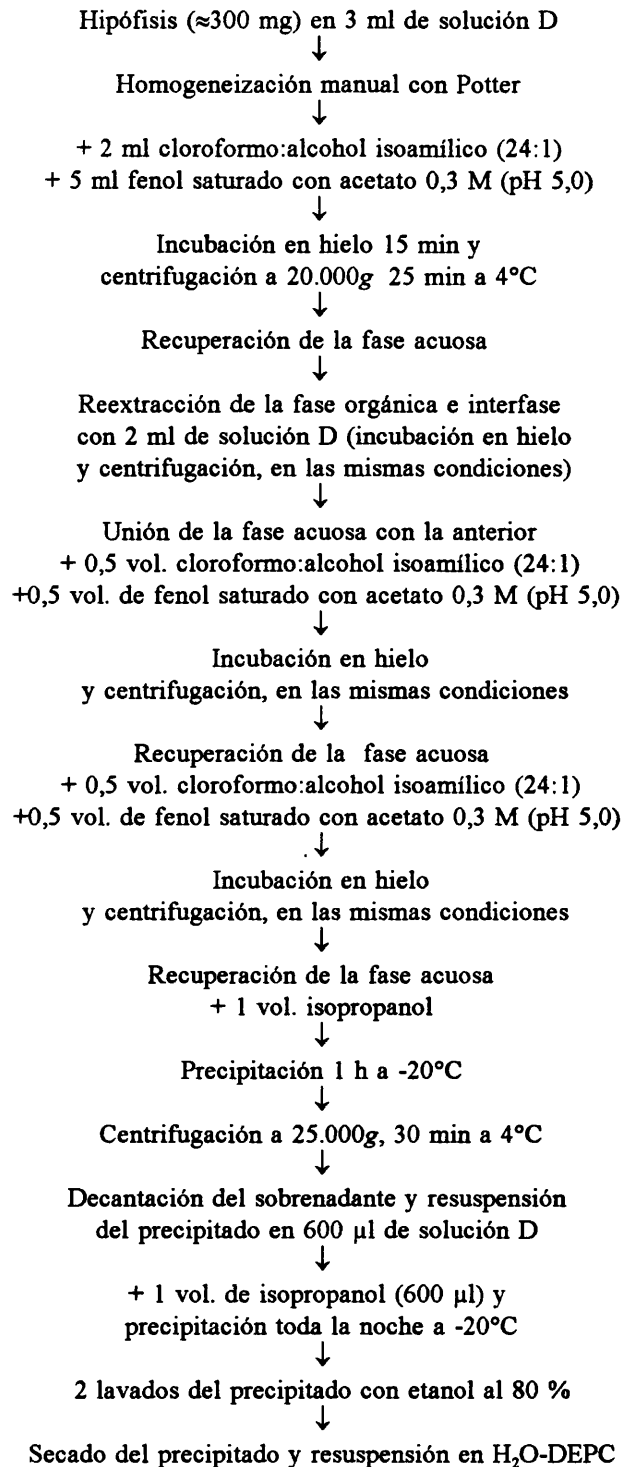


Fig. 7.2. Extracción del RNA total hipofisario. Solución D (tiocianato de guanidina 4M, Tris-HCl 0,1M, β -mercaptoetanol al 1 % , sarcosil al 0,5 %). H₂O-DEPC, agua tratada con dietil pirocarbonato.

Los muestras de RNA se corrieron en condiciones desnaturalizantes, en geles de agarosa (1 %) con un 6 % de formaldehído. Se cargaron cantidades iguales de RNA total (1, 0,5 y 0,25 μg), y los errores de carga fueron controlados por el grado de similitud en las bandas de RNA ribosómico (subunidades 28S y 18S). Después de la electroforesis, el RNA se transfirió por capilaridad en SSC x 20 (NaCl 3 M, citrato sódico 300 mM, pH=7) en membranas de nylon cargadas positivamente (*Boehringer Mannheim*). La fijación del RNA a las membranas se realizó mediante incubación a 120 °C durante 30 min, y la prehibridación de éstas se llevo a cabo con una solución compuesta por fosfato sódico 0,25 M, EDTA 1 mM, SDS (dodecil-sulfato sódico) al 20 % y leche desnatada (*Boehringer Mannheim*) al 0,5 % (pH=7,5). La hibridación se llevó a cabo a 68 °C durante 9-10 h, en el mismo tampón de prehibridación al que se le había añadido la sonda de DNA que codifica para la proteína madura de GH (Martínez-Barberá *et al.*, 1994). La sonda (560 pares de bases) se marcó con digoxigenina, siendo la concentración final de 40-50 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tanto la detección como el marcaje de la sonda se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*Boehringer Mannheim*). La reacción anticuerpo-enzima (anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina) se llevó a cabo a temperatura ambiente (30 min). La reacción de color tiene lugar al añadir, en pH básico, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (*X-phosphate*) y una sal de tetrazolio, NBT. La reacción da un precipitado azul que se interrumpió a las 5-6 h, lavando la membrana con TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH=8). Las bandas identificadas como mRNA de GH ($\approx 0,9$ kb) se cuantificaron en un densitómetro. Los valores se expresaron como porcentaje de los niveles detectados en hipófisis de doradas de ≤ 12 meses (+0).

La Fig. 7.3 muestra de forma esquemática todo el proceso seguido para la detección-cuantificación de los mensajeros de GH.

7.2.5. Análisis estadístico.

Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza de una y dos vías con un nivel de significación de $P < 0,05$. La comparación de medias se llevó a cabo con el test de Duncan.

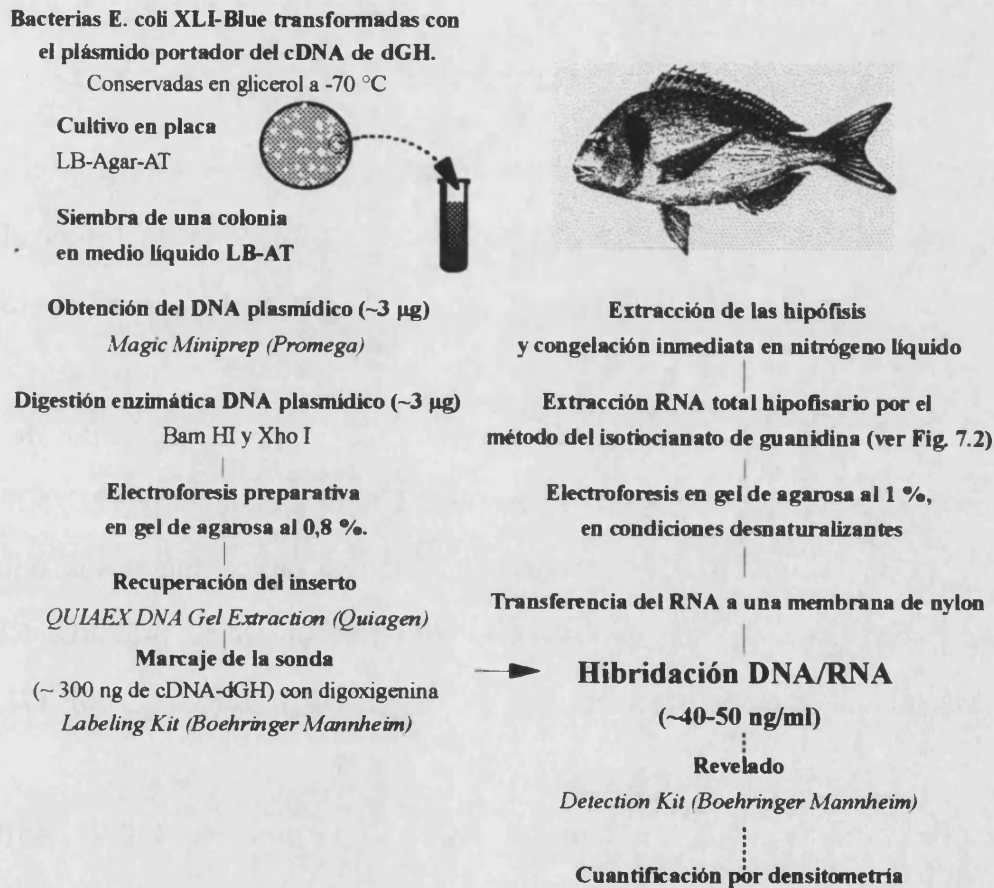


Fig. 7.3. Organigrama del proceso seguido para la detección-cuantificación del mRNA de GH de dorada. LB-AT, medio de cultivo Luria-Bertani (triptona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 %), ampicilina 0,01 %, tetraciclina, 0,0012 %; LB-Agar-AT, LB-AT + agar 1,5 %.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Interacción proteína/energía.

En el Cuadro 7.II se muestra la tasa de crecimiento (SGR), la ingesta (I) y el índice de conversión (IC). Se puede comprobar un efecto significativo de los niveles de proteína en la dieta sobre la ganancia diaria de peso. Las tasas de crecimiento (SGRs) aumentaron con el incremento de la concentración de proteína en la dieta (45 % a 60 %). Para una misma cantidad de proteína, el mayor incremento de peso correspondió a los animales alimentados con un 12 % de lípidos (45P:12L, 52P:12L, 60P:12L). No se encontraron diferencias significativas al comparar los animales alimentados con dietas de una concentración lipídica del 8 % (45P:8L, 52P:8L, 60P:8L) con los alimentados con dietas del 17 % (45P:17L, 52P:17L, 60P:17L).

Los peces alimentados con dietas de un 45 % de proteína (45P:8L, 45P:12L, 45P:17L) comieron más que los alimentados con dietas del 52 % (52P:8L; 52P:12L; 52P:17L) y del 60 % (60P:8L, 60P:12L, 60P:17L) de proteína. La ingesta no se vio afectada significativamente por los niveles de lípidos en la dieta.

El índice de conversión del alimento disminuyó al aumentar la concentración de proteína en la dieta del 45 % al 60 %. La mejor conversión del alimento (1,19-1,23) se obtuvo en los peces alimentados con un 60 % de proteína y un 8-12 % de lípidos.

CUADRO 7.II Índices de crecimiento de los animales alimentados con 9 dietas experimentales durante 7 semanas.

Dieta experimental	P _o ¹	P _f ²	SGR ³	I ⁴	IC ⁵
1 (45P:8L)	14,9±0,10	39,1±1,80 ^a	2,28±0,09 ^a	5,09±0,23 ^b	2,08±0,018 ^c
2 (52P:8L)	15,1±0,04	42,7±0,37 ^{ab}	2,48±0,03 ^{ab}	4,23±0,10 ^{ab}	1,56±0,05 ^{ab}
3 (60P:8L)	14,9±0,10	45,3±0,70 ^b	2,64±0,03 ^{bc}	3,30±0,14 ^a	1,19±0,06 ^a
4 (45P:12L)	14,9±0,12	42,4±0,27 ^{ab}	2,49±0,03 ^{ab}	4,76±0,01 ^b	1,83±0,01 ^{bc}
5 (52P:12L)	14,9±0,05	45,1±1,50 ^b	2,63±0,05 ^{bc}	4,22±0,11 ^{ab}	1,55±0,08 ^{ab}
6 (60P:12L)	14,8±0,03	51,1±1,68 ^c	2,95±0,08 ^d	3,78±0,28 ^a	1,23±0,07 ^a
7 (45P:17L)	15,3±0,59	39,9±1,33 ^{ab}	2,29±0,01 ^a	4,92±0,42 ^b	2,08±0,17 ^c
8 (52P:17L)	14,9±0,31,	41,9±0,88 ^{ab}	2,46±0,09 ^{ab}	5,01±0,52 ^b	1,98±0,21 ^{bc}
9 (60P:17L)	14,7±0,23	45,3±1,36 ^b	2,68±0,02 ^{bc}	4,45±0,39 ^{ab}	1,63±0,13 ^{ab}

*Cada valor corresponde a la media±EEM de dos tanques. EEM, Error Estándar de la Media. Los valores de una misma columna que no comparten la misma letra, son diferentes significativamente (p<0,05).

¹Peso corporal inicial, g

²Peso corporal final, g

³Tasa instantánea de crecimiento: $SGR = (\ln P_f - \ln P_o) \cdot d^{-1} \cdot 100$

⁴Ingesta: $I = \%P \cdot d^{-1}$

⁵Índice de conversión: $IC = \text{peso seco del alimento} \cdot (P_f - P_o)^{-1}$

En el Cuadro 7.III se muestra el efecto de la dieta sobre la composición corporal del pez. La concentración lipídica corporal disminuyó con el incremento del nivel de proteína en la dieta. La tendencia fue totalmente opuesta con el aumento de la concentración lipídica en la dieta. Así, la mayor concentración corporal de lípidos (11,2 %) se encontró en peces alimentados con un 45 % de proteína y un 17 % de lípidos, mientras que la menor concentración (6,4 %) correspondió a los peces alimentados con un 60 % de proteína y un 8 % de lípidos. La cantidad de agua, proteína y energía corporal no varió significativamente entre los diferentes grupos experimentales.

CUADRO 7.III Composición corporal de los animales alimentados con 9 dietas experimentales durante 7 semanas*

Dieta experimental	% <i>Peso húmedo</i>			<i>kJ/g Peso seco⁻¹</i>
	Agua	Proteínas	Lípidos	Energía
1 (45P:8L)	70,1±0,18	16,9±0,26	9,1±0,08 ^{bc}	24,2±0,51
2 (52P:8L)	69,8±0,40	17,7±0,26	7,9±0,14 ^{ab}	23,1±0,32
3 (60P:8L)	71,1±0,17	18,2±0,21	6,4±0,37 ^a	22,4±0,54
4 (45P:12L)	69,7±0,07	16,9±0,29	9,5±0,22 ^{bc}	23,7±0,53
5 (52P:12L)	69,6±0,18	17,2±0,33	8,9±0,15 ^b	23,4±0,12
6 (60P:12L)	71,2±0,12	16,9±0,08	7,8±0,20 ^{ab}	22,9±0,34
7 (45P:17L)	68,6±0,13	16,1±0,50	11,2±0,43 ^c	24,4±0,61
8 (52P:17L)	70,0±0,46	16,9±0,04	9,0±0,50 ^{bc}	23,3±0,24
9 (60P:17L)	70,2±0,02	17,2±0,39	8,2±0,41 ^{ab}	23,1±0,22

*Cada valor corresponde a la media±EEM de dos tanques. EEM, Error Estándar de la Media. Los valores de una misma columna que no comparten la misma letra, son diferentes significativamente ($p<0,05$).

En la Fig. 7.4 se muestra el efecto de las diferentes dietas en los niveles de GH circulante. La mayor concentración (15-16 ng·ml⁻¹) se registró en los peces alimentados con dietas de un 45 % de proteína. En los peces alimentados con dietas de un 8 % de lípidos, los niveles de GH plasmática disminuyeron un 40 % con el aumento del porcentaje de proteína. Este efecto del porcentaje de proteína desapareció al aumentar la proporción de lípidos (12, 17 %). Al relacionar los niveles de GH con los valores de ganancia diaria de nitrógeno, la GH aumentó linealmente, si bien se observó la tendencia a formar una meseta en los niveles más bajos de ganancia de nitrógeno.

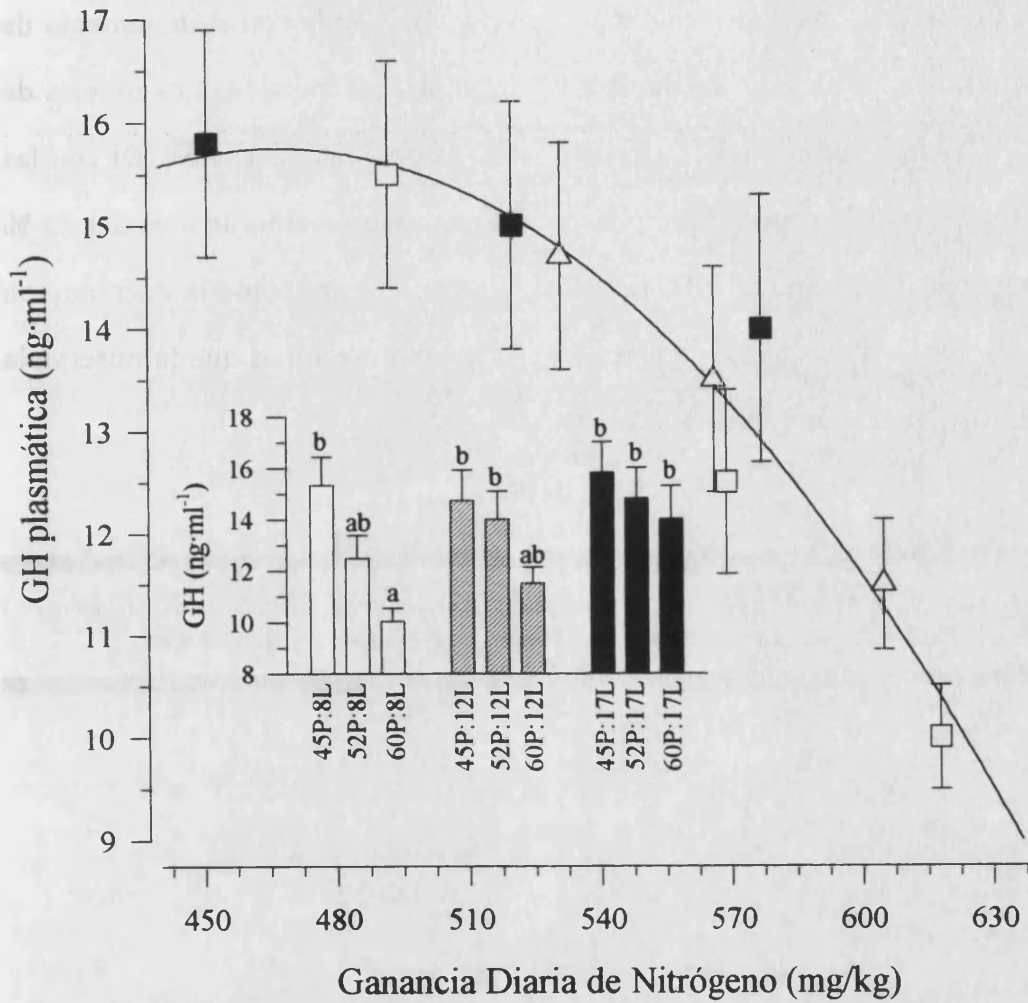


Fig. 7.4. Correlación entre los niveles circulantes de GH y la ganancia diaria de nitrógeno. La gráfica insertada muestra los niveles de GH circulante en los animales alimentados con las 9 dietas experimentales. Los valores son la media±EEM de 15-20 determinaciones. EEM, Error Estándar de la Media. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes significativamente ($p < 0,05$).

7.3.2. Edad y GH.

En el Cuadro 7.IV se muestra el efecto de la edad sobre los niveles de GH circulante e hipofisaria. Las SGRs mostraron una disminución significativa con el incremento de la edad. En contraste, se observó un aumento del factor de condición. Los niveles de GH plasmática disminuyeron un 50 % al comparar las doradas de 1 año (+0) con las de 2-3 años (+1, +2). Ello estuvo acompañado del una disminución de más del 75 % en la concentración hipofisaria de GH. En la Fig. 7.5 se muestra como la disminución de la concentración de mensajeros de GH es de la misma magnitud que la observada con la concentración de hormona.

CUADRO 7.IV. Valores medios de peso corporal (P), tasa instantánea de crecimiento (SGR), factor de condición (FC) y niveles de GH plasmática e hipofisaria. +0, ≤ 12 meses; +1, entre 12 y 24 meses y +2, ≥ 24 meses*.

	Edad		
	+0	+1	+2
P ¹	15-50 ^a	200-300 ^b	>600 ^c
Sexo	♂	♂	♀
SGR ²	1,4-1,8 ^c	0,8-1,1 ^b	0,4-0,5 ^a
FC ³	2,51±0,03 ^a	2,75±0,06 ^b	3,01±0,07 ^c
GH plasmática (ng·ml ⁻¹)	15,50±0,69 ^b	11,16±0,75 ^{ab}	8,94±0,36 ^a
GH hipofisaria (µg·kg P ⁻¹)	22,87±2,68 ^c	12,24±0,81 ^b	5,15±0,5 ^a

* Tanto el factor de condición, como los valores de GH, son la media±EEM de 25-30 réplicas. EEM, Error Estándar de la Media. Los valores de una fila que no comparten la misma letra, son diferentes significativamente (p<0,05).

¹Peso corporal, g.

²Tasa instantánea de crecimiento: $SGR = (\ln P_f - \ln P_o) \cdot d^{-1} \cdot 100$

³ Factor de condición: $FC = (P \cdot 100) \cdot \text{longitud estándar}^{-3}$.

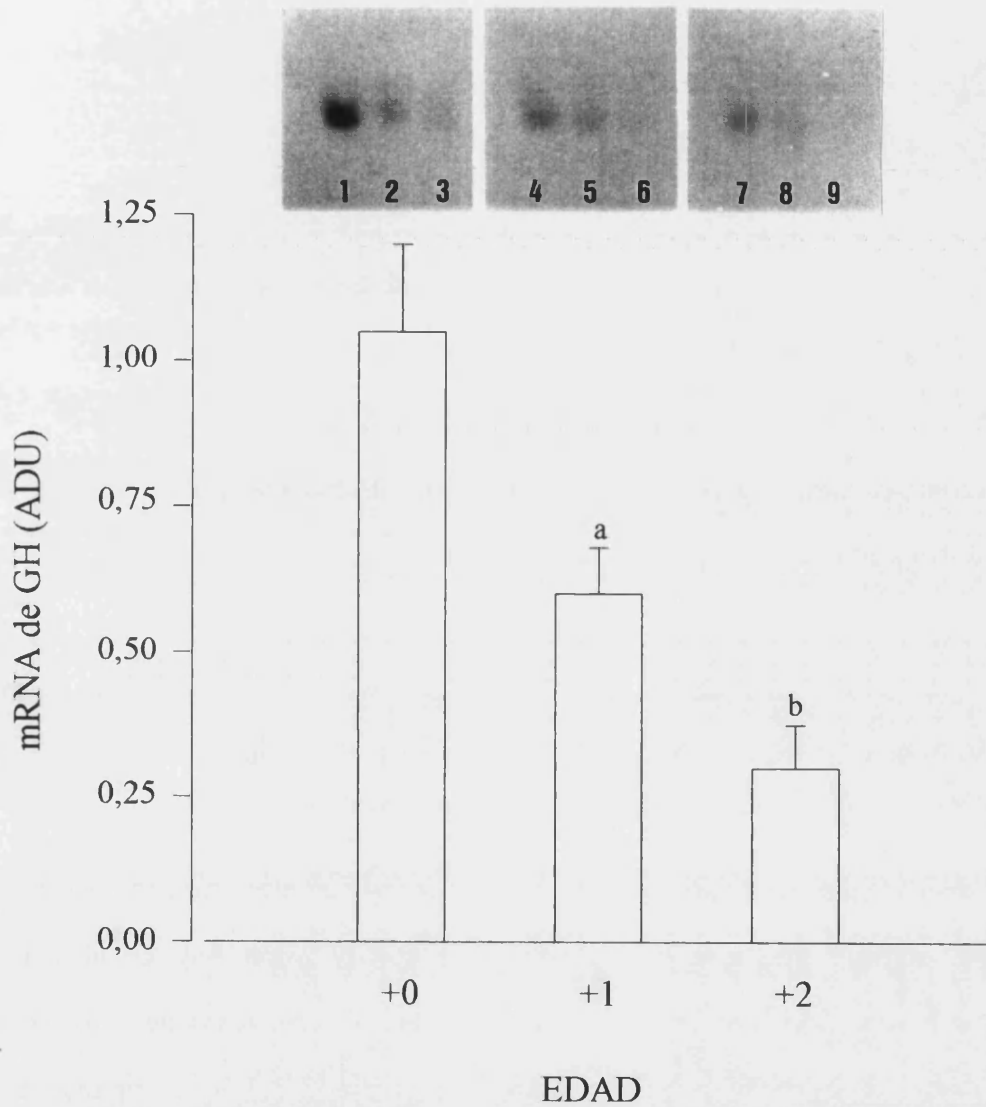


Fig. 7.5. Cuantificación de mRNA de GH presente en la hipófisis de doradas de diferentes edades (+0, +1 y +2). En la parte superior se muestran las señales obtenidas en la hibridación (1,2,3: 1 µg de RNA total; 4,5,6: 0,5 µg de RNA total; 7,8,9: 0,25 µg de RNA total). En la gráfica se muestra la media±EEM de todas las determinaciones (5 por grupo). EEM, Error Estándar de la Media. Los valores que no comparten la misma letra son diferentes significativamente respecto a + 0 ($p < 0,05$).

7.4. DISCUSIÓN

El cultivo de un número cada vez mayor de teleósteos ha permitido comprobar su elevada eficiencia en la conversión del alimento. Este hecho se atribuye a varios factores (Cho y Kaushik, 1990; Kaushik y Medale, 1994):

- son animales poiquiloterms y por tanto, no gastan energía en regular su temperatura corporal.
- su modo de vida es acuático, menos costoso energéticamente que el terrestre.
- son amoniotélicos, la excreción pasiva de los productos nitrogenados en forma de amonio es energéticamente menos costosa para el animal.

Consecuentemente, la proporción del componente energético no proteico en la dieta se ve disminuida con respecto a la de mamíferos y aves. Así, en alevines juveniles de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), las mejores tasas de conversión alimentaria y proteica se obtienen con una ración intermedia (3-3,5 %) compuesta por un 35-40 % de proteína y un 15-18 % de lípidos (Tacon y Cowey, 1985; Austreng *et al.*, 1987; Cho y Kaushik, 1990). No obstante, en otras especies, las tasas de crecimiento no superan el 2 % y el índice de conversión es igual o mayor que 1,5. Ello llega a ser especialmente relevante para algunas especies marinas como la dorada y la lubina (*Dicentrarchus labrax*), ampliamente cultivadas en toda el área mediterránea (ver Tsevis *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1993; Ballestrazi *et al.*, 1994). Se podría pensar que esta situación no deseada (costes elevados de alimentación y gran producción de

deshechos) es inherente a la naturaleza de estas especies, aunque no se puede excluir la posibilidad de la no idoneidad de las dietas y/o de los regímenes alimenticios utilizados con fines prácticos y/o experimentales.

En este trabajo se comprobó que peces alimentados con dietas altas en proteínas y de bajo contenido lipídico (60P:8L, 60P:12L) presentan tasas de crecimiento (2,6-2,9) e índices de conversión del alimento (1,1-1,2) similares a los obtenidos con líneas de crecimiento rápido de trucha. No obstante, también se comprobó que la disminución de la proporción proteína/energía en la dieta conlleva a un aumento de la hiperfagia y del porcentaje de grasa corporal, unido a una menor ganancia de peso y a una peor conversión del alimento. Todo ello, unido al aumento de los niveles de GH circulante, sugiere que este empeoramiento del crecimiento es el resultado de un ayuno intracelular causado por un desequilibrio metabólico y/u hormonal.

Esta idea está en consonancia con los resultados obtenidos en el capítulo anterior, en donde la mejor conversión del alimento en animales alimentados con piensos comerciales (relación proteína/energía baja) se obtuvo con una baja tasa de ingesta (1,2-1,5 %). De hecho, tasas de ingesta demasiado altas pueden provocar resistencia a la acción de la GH, reflejada en un aumento de los niveles circulantes de GH, y en una disminución de los receptores hepáticos, así como de la actividad somatomédica del plasma. Este comportamiento también se da en los peces ayunados y en los mal desarrollados (*stunt*) (Duan *et al.*, 1995; ver Cap. 6). La situación se repite en estados diabetogénicos (Pell y Bates, 1990; Ross y Buchanan, 1990). Así pues, tal y como han sugerido éstos y otros autores (Ross y Chew, 1995), los factores asociados con la disfunción del crecimiento pueden tener diferentes causas, pero la

resistencia del hígado a la acción de la GH, unido a un hipersomatotropismo compensatorio son parte de un patrón común de situaciones de baja retención proteica.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, en este capítulo se ha encontrado una relación inversa entre los niveles circulantes de GH y la ganancia diaria de nitrógeno. El aumento de la GH posibilita un suplemento constante de energía durante estados de hipoglucemia, ayuno y estrés. Los efectos hiperglucémicos y lipolíticos de la GH se han demostrado en diferentes especies de peces (Leatherland y Nuti, 1981; Sheridan, 1986; Leung *et al.*, 1991). Sin embargo, cuando este desarreglo metabólico es debido a una dieta no equilibrada es probable que este hipersomatotropismo compensatorio incremente la intolerancia a los azúcares y a las grasas. Es difícil hacer comparaciones entre las distintas especies de peces, si bien teniendo en cuenta éste y otros estudios previos (ver Cap. 5 y 6), parece concluyente que, independientemente del régimen alimenticio, la concentración de GH circulante en juveniles y adultos de dorada es más alta que en la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Duan e Hirano, 1990), tilapia (*Tilapia mossambica*) (Ricordel *et al.*, 1995), trucha arco iris (Pickering *et al.*, 1991; Sumpter *et al.*, 1991), salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Le Bail *et al.*, 1991) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Björnsson *et al.*, 1994). Por otra parte, Párrizas *et al.* (1994) han demostrado que el número de receptores de insulina y la actividad tirosina-kinasa del músculo esquelético de dorada son menores que las de carpa (*Cyprinus carpio*) y tilapia. Por consiguiente, si tenemos en cuenta la acción antagónica de GH (lipolítica e hiperglucemiante) e insulina (lipogénica e hipoglucemiante), no es de extrañar que la dorada presente una cierta intolerancia a dietas con una relación proteína/energía baja, circunstancia que debe verse aumentada con altos niveles de ingesta.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, los sujetos acromegálicos tienen un mayor riesgo a desarrollar hipertensión, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Molitch, 1992). Paradójicamente, a pesar de la disminución de la síntesis y secreción de GH (Valsania y Micossi, 1994), la edad puede ser considerada un factor de riesgo. No obstante, estudios recientes, indican que esta situación responde preferentemente al modo de vida sedentario y al aumento de la obesidad abdominal (Cefalu *et al.*, 1995). De hecho, se podría especular que la disminución de la secreción de GH con el avance de la edad es un fenómeno permisivo frente a la disminución de la proporción óptima de proteína/energía en la dieta. Por el momento, en los peces, no se ha establecido claramente un cambio en la relación óptima de proteína/energía (Kaushik y Médale, 1994). Es más, éste es el primer trabajo que demuestra una disminución de la actividad secretora de GH a medida que aumenta la edad del animal. Prueba de ello es que la disminución de la GH circulante e hipofisaria va unida a una disminución de los mensajeros codificantes para la GH hipofisaria. En cualquier caso, estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio sugieren que este hiposomatotropismo es debido preferentemente a un defecto hipotalámico. Esta hipótesis está de acuerdo con estudios previos llevados a cabo en ratas de edad avanzada (Müller *et al.*, 1993), que demuestran como se mantiene la capacidad secretora de GH, al restablecer (GHRH) o atenuar (SS) la secreción de diferentes factores hipotalámicos.

En resumen, la relación entre GH y crecimiento es compleja y controvertida. Es importante destacar que, bajo nuestras condiciones experimentales, doradas alimentadas con dietas de una elevada proporción de sustratos no proteicos son incapaces de controlar de una forma efectiva la ingesta de alimento. Por tanto, en términos de

rentabilidad económica y calidad de producto (porcentaje de grasa corporal), es necesaria una evaluación más precisa de las diferentes estrategias de cultivo. Para lo cual es conveniente adecuar en todo momento el nivel de ingesta a una determinada relación proteína/energía, parámetros éstos que variarán en función de la edad, de la estación y de la especie en estudio. De hecho, a nuestro juicio, concentraciones elevadas de GH pueden actuar como un factor de riesgo ante dietas de una baja relación proteína/energía, ya que puede desembocar en un estado de ayuno metabólico (hipersomatotropismo, resistencia hepática a la GH), en el que el comportamiento alimentario y la eficiencia alimentaria son alteradas ampliamente.

8. Conclusiones

8.1. CONCLUSIONES

- 1.- La unión de la GH de dorada a sus receptores tisulares es saturable por la cantidad de membranas, es altamente específica y presenta una elevada afinidad.
- 2.- Anticuerpos de IGF-I de mamífero presentan reacción cruzada con el plasma de dorada.
- 3.- Se demuestra por primera vez en un vertebrado inferior la presencia de receptores de GH en los primeros estadios de desarrollo.
- 4.- La distribución desigual de estos receptores sugiere el predominio de una acción local o directa, a diferencia de la fase adulta en donde tendría una mayor incidencia la acción sistémica.
- 5.- Los niveles más bajos de GH circulante se alcanzan durante el periodo invernal, mientras que en la primavera coincide con el periodo de mayor secreción.
- 6.- La administración intracelómica de GH aumenta los niveles circulantes de IGFs durante el periodo invernal.

7.- La mayor respuesta del hígado a la acción de GH ocurre durante el período estival (máximo crecimiento). Este hecho va acompañado de un aumento de los niveles circulantes de IGFs, con lo que disminuye el efecto inhibitorio generado sobre la secreción hipofisaria de GH.

8.- La retroalimentación negativa entre IGFs y GH es uno de los factores que explican la falta de correlación positiva entre GH y crecimiento.

9.- La restricción proteica y/o energética comporta una disfunción del sistema somatotrópico, reflejada en una disminución de los receptores hepáticos de GH y un aumento de los niveles circulantes de GH.

10.- Esta disfunción del sistema somatotrópico también se da en los animales alimentados *ad libitum*, circunstancia ésta que se ve favorecida por una inadecuada proporción proteína/energía.

11.- La disminución de la secreción de GH con la edad es uno de los factores que podrían favorecer la disminución de la relación óptima de proteína/energía en la dieta.

12.- Las diferencias interespecíficas en los niveles circulantes de GH es uno de los factores que deberían tenerse en cuenta en el diseño de un determinado régimen alimenticio.

Índice Figuras

Capítulo 1

Fig. 1.1. Paralelismo del control endocrino de la muda en crustáceos e insectos..... 11

Fig. 1.2. Hipófisis de mamífero y de teleósteo..... 21

Fig. 1.3. Factores reguladores de la secreción de GH..... 33

Fig. 1.4. Esquema del complejo GH-receptor..... 37

Fig. 1.5. Esquema de la acción de la GH..... 39

Capítulo 3

Fig. 3.1. Iodación de dGH y rhIGF-I por el método de la cloramina-T..... 63

Fig. 3.2. Ensayo de proteínas solubles por el método de Bradford adaptado a microplacas..... 65

Fig. 3.3. Ensayo de receptores libres de GH..... 67

Fig. 3.4. Receptores totales y libres de GH..... 70

Fig. 3.5. Extracción de IGFs en CM-25..... 74

Fig. 3.6. RIA de hIGF-I para valorar la actividad somatomédica del plasma de dorada..... 77

Fig. 3.7. Efecto del tiempo y la temperatura de incubación en la unión específica de ¹²⁵I-dGH a membranas hepáticas de dorada..... 81

Índice Figuras

Fig. 3.8. Efecto de la cantidad de membranas hepáticas en la unión específica e inespecífica de ^{125}I -dGH.....	83
Fig. 3.9. Unión total e inespecífica de ^{125}I -dGH a membranas de diferentes órganos de dorada.....	84
Fig. 3.10. Saturación de las membranas hepáticas con cantidades crecientes de ^{125}I -dGH.....	86
Fig. 3.11. Desplazamiento de ^{125}I -dGH unida específicamente a membranas hepáticas de dorada.....	89
Fig. 3.12. Cromatografía de filtración ácida del plasma de dorada en columna de Sephadex G-75 antes y después de la extracción con CM-25.....	91
Fig. 3.13. Paralelismo entre la curva patrón de rhIGF-I y la obtenida a partir de disoluciones seriadas del plasma de dorada.....	92
Fig. 3.14. Efecto del ayuno y la realimentación en los parametros de crecimiento.....	95

Capítulo 4

Fig. 4.1. Esquema del muestreo de las larvas.....	111
Fig. 4.2. Efecto de la cantidad de membranas de cabezas y cuerpos en la unión específica de ^{125}I -rtGH.....	115
Fig. 4.3. Unión específica de ^{125}I -rtGH a membranas hepáticas de dorada después de incubar en ausencia o presencia de extractos larvarios procedentes de cabezas y cuerpos de larva.....	117

Fig. 4.4. Saturación de membranas hepáticas de doradas de dos años, y de cabezas y cuerpos de larvas de 40 días.....119

Fig. 4.5. Desplazamiento de la ^{125}I -rtGH unida a membranas de cabezas y cuerpos...122

Fig. 4.6. Desplazamiento de la ^{125}I -rtGH unida específicamente a membranas hepáticas de doradas de dos años por rtGH fría y diluciones seriadas de extractos larvarios de 5, 17, 27 y 40 días post-eclosión.....123

Capítulo 5

Fig. 5.1. Radioinmunoensayo de dGH y rtGH.....139

Fig. 5.2. Variaciones estacionales de fotoperiodo, temperatura del agua, niveles plasmáticos de GH y número de receptores hepáticos de GH libres y totales.....144

Fig. 5.3. Variaciones estacionales de la actividad somatomédica del plasma.....145

Fig. 5.4. Niveles plasmáticos de la GH exógena después de una inyección intraperitoneal de GH recombinante de trucha ($0,75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).....147

Fig. 5.5. Efecto de una única inyección intracelómica de GH recombinante de trucha en la actividad somatomédica del plasma.....148

Capítulo 6

Fig. 6.1. Esquema del comedero de autodemanda.....165

Fig. 6.2. Efecto de los niveles de proteína en la dieta en los niveles plasmáticos de GH, actividad somatomédica del plasma, número total de receptores hepáticos y número de receptores libres del hígado.....171

Fig. 6.3. Efecto de la ración en los niveles de GH circulante, actividad somatomédica del plasma y número de receptores de GH en el hígado.....174

Capítulo 7

Fig. 7.1. Tanques y comederos de autodemanda utilizados en la experiencia de nutrición.....188

Fig 7.2. Extracción del RNA total hipofisario.....190

Fig. 7.3. Organigrama del proceso seguido para la detección-cuantificación del mRNA de GH de dorada.....193

Fig. 7.4. Correlación entre los niveles circulantes de GH y la ganancia diaria de nitrógeno. Niveles de GH circulante en los juveniles de dorada alimentados con las 9 dietas experimentales.....199

Fig. 7.5. Cuantificación de mRNA de GH presente en la hipófisis de dorada \leq 12 meses (+0); entre 12 y 24 meses (+1) y \geq 24 meses (+2).....201

Índice Cuadros

Capítulo 1

CUADRO 1.I. Grado de homología entre las secuencias aminoacídicas de GHs
.....19

CUADRO 1.II. Grado de homología de las secuencias aminoacídicas de ambas IGFs
en diferentes especies de vertebrados. IGF-I vs IGF-I. IGF-II vs IGF-II.....42

CUADRO 1.III. Grado de homología entre las secuencias aminoacídicas de IGF-I e
IGF-II. IGF-I vs IGF-II.....42

Capítulo 3

CUADRO 3.I. Tampones utilizados en el ensayo de radiorreceptores.....68

CUADRO 3.II. Desaturación de los receptores hepáticos de GH.....71

CUADRO 3.III. Tampones utilizados en el radioinmunoensayo de hIGF-I.....76

CUADRO 3.IV. Afinidad (K_a) y capacidad (B_{max}) de suspensiones de membranas
hepáticas de dorada tratadas ($MgCl_2$, 4M) y no tratadas (H_2O destilada).....87

Capítulo 4

CUADRO 4.I. Capacidad (B_{max}) de las suspensiones de membranas larvarias.....120

Capítulo 5

CUADRO 5.I. Cambios estacionales en peso, talla, ingesta, tasa instantánea de crecimiento e índice de conversión142

Capítulo 6

CUADRO 6.I. Composición de las dietas experimentales.....162

CUADRO 6.II. Índices de crecimiento de los animales alimentados con las dietas experimentales durante 7 semanas169

CUADRO 6.III. Índices de crecimiento de los animales alimentados durante 7 semanas con diferentes tasas de ingesta.....172

Capítulo 7

CUADRO 7.I. Composición de las dietas experimentales.....186

CUADRO 7.II. Índices de crecimiento de los juveniles de dorada alimentados con 9 dietas experimentales durante 7 semanas.....195

CUADRO 7.III. Composición corporal de los animales alimentados con las 9 dietas experimentales durante 7 semanas.....197

CUADRO 7.IV. Valores medios de peso corporal, tasa de crecimiento, factor de condición y los niveles de GH plasmática e hipofisaria de doradas ≤ 12 meses (+0); entre 12 y 24 meses (+1) y ≥ 24 meses (+2).....200

Abreviaturas

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
cDNA	DNA complementario
CS	Somatomamotropina coriónica
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Epinefrina
EEM	Error estándar de la media
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GH	Hormona de crecimiento
GHBP	Proteína de transporte de GH
GHRH	Somatocrinina
GnRH	Hormona estimuladora de las gonadotropinas
IGF	Somatomedina
IFGBP	Proteína de transporte de IGF
MIH	Hormona inhibidora de la muda
mRNA	RNA mensajero
NE	Norepinefrina
NPY	Neuropéptido Y
PRL	Prolactina
PTTH	Hormona toracotrópica

Abreviaturas

RNA	Ácido ribonucleico
SL	Somatolactina
SNC	Sistema nervioso central
SS	Somatostatina
TRH	Tiroliberina
TSH	Tirotropina

Bibliografía

- Adachi, T., Takiya, Y., Suzuki, Y., Iwami, M., Kawakami, A., Takahashi, S.Y., Ishizaki, H., Nagasawa, H. & Suzuki, A. (1989). cDNA structure and expression of bombyxin, and insulin-like brain secretory peptide of the Silkworm *Bombix mori*. *J. Biol. Chem.* 264: 7681-7685.
- Allen, D.B., Brook, C.G.D., Bridges, P.C., Hindmarsh, P.C., Guyda, H.J. & Frazier, D. (1994). Therapeutic controversies: Growth hormone (GH) treatment of non-GH deficient subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 1239-1248.
- Anderson, N.G. (1992). Growth hormone activates mitogen-activated protein kinase and S6 kinase and promotes intracellular tyrosine phosphorylation in 3T3-F442A preadipocytes. *Biochem. J.* 284: 649-652.
- Andrews, P.C., Hawke, D., Shively, J.E. & Dixon, J.E. (1984a). Anglerfish prosomatostatin II is processed to somatostatin-28 and contains hydroxylysine at residue 23. *J. Biol. Chem.* 259: 15021-15024.
- Andrews, P.C., Pubols, M.N., Hermodson, M.A., Sheares, B.T. & Dixon, J.E. (1984b). Structure of the 22-residue somatostatin from catfish. An O-glycosylated peptide having multiple form. *J. Biol. Chem.* 259: 13267-13272.
- Arakawa, E., Kaneko, T. & Tsukamoto, K. (1992). Immunocytochemical detection of prolactin and growth hormone cells in the pituitary during early development of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Zool. Sci.* 9:1061-1066.

Bibliografia

- Arimura, A. & Culler, M.D. (1985). Regulation of growth hormone secretion. In "The Pituitary Gland" (Imura, H., ed.). pp. 221-259. Raven Press, New York.
- Aschner, B. (1912). Uber die function der hypophyse. Pflügers Arch. Ges. Physiol. 146: 1-146.
- Asplin, C.M., Faria, A.C.S., Carlsen, E.C., Vacaro, V.A., Carr, R.E., Iranmaesh, A., Lee, M.M., Veldhuis, J.D. & Evans W.S. (1989). Alterations on the pulsatile mode of growth hormone release in men and women with insulin-dependent diabetes mellitus. J. Clin. Endocrinol. Metabolism. 69: 239-245.
- Association of Official Analytical Chemists, AOAC (1990). Official methods of analysis (Helrich, K., ed.). Arlington, Virginia, 1298 pp.
- Austreng, E., Storebakken, T. & Asgard, T. (1987). Growth rate estimates for cultured Atlantic salmon and rainbow trout. Aquaculture 60: 157-160.
- Bacon, W.L., Burke, W.H., Anthony, N.B. & Nestor, K.E. (1987). Growth hormone status and growth characteristics of Japanese quail divergently selected for four-week body weights. Poultry Sci. 66: 1541-1544.
- Baker, B & Ingleton, P.M. (1975). Secretion of prolactin and growth hormone by teleost pituitaries *in vitro*. II. Effect of salt concentration during long-term organ culture. J. Comp. Physiol. 100B: 269-282.

- Ball, J.N. (1965). Partial hypophysectomy in the teleost *Poecilia*: separate identities of teleostean growth hormone and teleostean prolactin like hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 5: 654-661.
- Ball, J.N. (1981). Hypothalamic control of the *pars distalis* in fishes, amphibians, and reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44: 135-170.
- Ballestrazi, R., Lanari, D., D'Agaro, E. & Mion, A. (1994). The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 127: 197-206.
- Barrazone, P., Lesniak, M.A., Gorden, P., Van Obberghen, E., Carpentier, J.L. & Orci, L. (1980). Binding, internalization and lysosomal association of ¹²⁵I-human growth hormone in cultured human lymphocytes: a quantitative morphological and biochemical study. *J. Cell Biol.* 87: 360-369.
- Bass, S.H., Mulkerrin, M.G. & Wells, J.A. (1991). A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 4498-4502.
- Batten, T.F.C. & Wigham T. (1984). Effects of TRH and somatostatin on releases of prolactin and growth hormone *in vitro* by the pituitary of *Poecilia latipinna*. II. Electron-microscopic morphometry using automatic image analysis. *Cell Tissue Res.* 237: 595-603.

Bibliografia

- Batten, T.F.C., Young, G. & Ball, J.N. (1983). Secretory activity of *Poecillia latipinna* (Teleostei) pituitary *in vitro*: rostral *pars distalis* and proximal *pars distalis*. Gen. Comp. Endocrinol. 51: 113-130.
- Baxter, R. C. (1986). Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 67: 265-272.
- Baxter, R.C. (1991). Physiological roles of IGF binding proteins. In "Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors" (Spencer, E.M., ed.). Proceedings of the Second International Symposium on Insulin-Like Growth Factors/Somatomedins. San Francisco. California. pp. 371-380. Elsevier Science Publishing Co. Inc. New York-Amsterdam-London-Tokio.
- Baxter, R.C. & Martin, J.L. (1989). Binding proteins for the insulin-like growth factors: Structure, regulation and function. Prog. Growth Factor Res. 1: 49-68.
- Beattie, J. & Flint, D.J. (1993). Growth hormone and its receptor: from structure to function. J. Endocrinol. 139: 349-352.
- Bentham, J., Ohlsson, C., Lindahl, A., Isaksson, O. & Nilsson, A. (1993). A double staining technique for detection of growth hormone and insulin-like growth factor-I binding to rat tibial epiphyseal chondrocytes. J. Endocrinol. 137: 361-367.

Berczi, I. & Nagy, E. (1991). Effects of hypophysectomy in immune function. In "Psychoneuroimmunology" (Ader, R., Felten, D.L. & Cohen, N., eds.). Academic Press. London.

Berelowitz, M., Szabo, M., Frohman L.A., Firestone, S., Chu, L. & Hintz, R.L. (1981). Somatomedin mediates growth hormone negative feedback on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212: 1279-1281.

Bern, H.A., McCormick, Kelley, K.M., Gray, E.S., Nishioka, R.S., Madsen, S.S. & Tsai, P.I. (1991). Insulin-like growth factors "under water": role in growth and function of fish and other poikilothermic vertebrates. In "Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors" (Spencer, E.M., ed.). Proceedings of the Second International Symposium on Insulin-Like Growth Factors/Somatomedins. San Francisco. California. pp. 85-96. Elsevier Science Publishing Co. Inc. New York-Amsterdam-London-Tokio.

Bernton, E.W., Beach, J.E., Holaday, J.W., Smallridge, R.C. & Fein, H.G. (1987). Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 238: 519-521.

Berwert, L, Segner, H. & Reinecke, M. (1995). Ontogeny of IGF-I and the classical islet hormones in the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Peptides* 16: 113-122.

Bibliografia

- Bewley, T.A. & Li, C.H. (1970). Primary structures of human pituitary growth hormone and sheep pituitary lactogenic hormone compared. *Science* 168: 1361-1362.
- Björnsson, B.Th., Ogasawara, T., Hirano, T., Bolton, J.P. & Bern, H.A. (1988). Elevated growth hormone levels in stunted Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 73: 275-281.
- Björnsson, B.T., Taranger, G.L., Hansen, T., Stefansson, S.O. & Haux, C. (1994). The interrelation between photoperiod, growth hormone, and sexual maturation of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 93: 70-81.
- Björnsson, B.Th., Thorarensen, T., Hirano, T., Ogasawara, T. & Kristinsson, J.B. (1989). Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 82: 77-91.
- Blair, H.T., McCutcheon, S.N., McKenzie, D.D.S., Ormsby, J.E., Siddiqui, R.A., Breier, B.H. & Gluckman, P.D. (1988). Genetic selection for insulin-like growth factor-I in growing mice is associated with altered growth. *Endocrinology* 123: 1690-1692.
- Blaise, O., Le Bail, P.-Y. & Weil, C. (1995). Lack of gonadotropin releasing-hormone action on *in vivo* and *in vitro* growth hormone release, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 110C: 133-141.

- Blundell, T.L. & Humbel, R.E. (1980). Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287: 781-787.
- Bohlen, P., Esch, F., Brazeau, P., Ling, N. & Guillemin, R. (1983). Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain. *Nature* 301: 607-608.
- Bolton, J.P., Takahashi, A., Kawauchi, H., Kubota, J. & Hirano, T. (1986). Development and validation of a salmon growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 230-238.
- Bolton, J.P., Young, R.S., Nishioka, T., Hirano, T. & Bern, H.A. (1987). Plasma growth hormone levels in normal and stunted yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *J. Exp. Zool.* 242: 379-382.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brazeau, P., Bohlen, P., Esch, F., Ling, N., Wehrenberg, W.B. & Guillemin, R. (1984). Growth hormone-releasing factor from ovine and caprine hypothalamus: isolation, sequence analysis and total synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125(2): 606-614.

Bibliografia

- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. & Guillemin, R. (1973). Hypothalamic peptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79.
- Breier, B.H., Gluckman, P.D. & Bass, J.J. (1988). The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status and estradiol-17 β on hepatic high and low-affinity somatotrophic binding sites. *J. Endocrinol.* 116: 169-177.
- Brown, C.L., Sullivan, C.V., Bern H.A. & Dickhoff, W.W. (1987). Occurrence of thyroid hormones in early developmental stages of teleost fish. *Am. Fish Soc. Symp.* 2: 144-150.
- Buonomo, F.C. & Kindt, J. (1993). Ontogeny of growth hormone (GH), insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF binding protein-2 (IGFBP-2) in genetically lean and obese swine. *Domest. Anim. Endocrinol.* 10: 257-265.
- Burnside, J. & Cogburn, L.A. (1992). Developmental expression of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in the chicken. *Mol. Cell. Endocrinol.* 89: 91-96.
- Cabello, G. & Wrutniak, C. (1989). Thyroid hormone and growth: relationships with growth hormone effects and regulation. *Reprod. Nutr. Develop.* 29: 387-402.

Calduch-Giner, J.A., Martí-Palanca, H. & Pérez-Sánchez (1994). Release of growth hormone by gilthead sea bream pituitary gland. In abstracts of "17th Conference of European Comparative Endocrinologists". n° 236. Córdoba.

Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, P., Álvarez-Pellitero, P. & Pérez-Sánchez. (1995). Evidence for a direct action of growth hormone on haemopoietic cells of a marine fish, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). J. Endocrinol. 146: 459-467.

Cambre, M., Mareels, G., Corneille, S., Moons, L., Ollevier, F. & Vandesande, F. (1990). Chronological appearance of the different hypophysial hormones in the pituitary of sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) during their early development: and immunocytochemical demonstration. Gen. Comp. Endocrinol. 77: 408-415.

Campbell, R.M., Bongers, J. & Felix, A.M. (1995). Rational design, synthesis, and biological evaluation of novel growth hormone releasing factor analogues. Biopolymers 37: 67-88.

Cavari, B., Funkenstein, B., Chen, T.T. & Powers, D.A. (1993). Recombinant growth hormones. In "Recent Advances in Aquaculture IV" (Muir, J.F. & Roberts, R.J., eds.). pp. 119-129.

Bibliografia

- Cavari, B., Noso, T. & Kawauchi, H. (1995). Somatolactin, a novel pituitary protein: Isolation and characterization from *Sparus aurata*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 4(2): 117-122.
- Cefalu, W.T., Wang, Z.Q., Werbel, S., Bell-Farrow, A., Crouse III, J.R., Hinson, W.H., Terry, J.G. & Anderson, R. (1995). Contribution of visceral fat mass to the insulin resistance of aging. *Metabolism* 44: 954-959.
- Chan, S.J., Cao, Q.-P. & Steiner, D.F. (1990). Evolution of the insulin superfamily: cloning of a hybrid insulin/insulin-like growth factor cDNA from amphioxus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 9319-9323.
- Chen, T.T., Shambloott, M., Lin, C.M., Tang, I.-L., Chan, K.M., Cheng, C.M., Yang, B.-Y. & Marsh A. (1994). Structure and evolution of fish growth hormone and insulin-like growth factor genes. In invited papers from "XII International Congress of Comparative Endocrinology. Perspectives in Comparative Endocrinology." (Davey, K.G., Peter, R.E. & Tobe, S.S., eds.). pp. 352-364. NRC, Toronto. Canadá.
- Cho, C.Y. & Kaushik, S.J. (1990). Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In "Aspects of food production, consumption and energy values" (Bourne, G.H., ed.). Vol. 61, pp. 132-172. *World Rev. Nutr. Diet.* Karger, Basel.

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanadinium thiocyanate-phenol-cloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 5294-5299.
- Clarke, W.C., Shelbourn, J.E., Ogasawara, T. & Hirano, T. (1989). Effect of initial daylength on growth, seawater adaptability and plasma growth hormone levels in underyearling coho, chinook salmon and chum salmon. *Aquaculture* 82: 52-61.
- Cocchi, D. & Locatelli, V. (1983). Growth hormone secretion in non-mammalian species. In "Progress in Non-mammalian Brain Research" (Nistico, G. & Bolis, L., eds.). Vol. 3, pp. 177-205. CRC Press, Boca Raton.
- Cohen, I., Cavari, B, Chan, S.J. & Funkenstein, B. (1994). Expression of growth hormone and insulin-like growth factor I during early development of *Sparus aurata*. In abstracts of "17th Conference of European Comparative Endocrinologists". n° 236. Córdoba.
- Conover, C.A. (1992). Potentiation of insulin-like growth factor (IGF) action by IGF-binding protein-3: studies of underlying mechanism. *Endocrinology* 130: 3191-3199.
- Cook, A.F., Wilson, S.W. & Peter, R.E. (1983). Development and validation of a carp growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50: 335-347.

Bibliografia

Cooke, P.S. & Nicoll, C.S. (1983). Hormonal control of fetal growth. *Physiologist* 26: 317-323.

Corpas, E., Harman, S.M. & Blackman, M.R. (1993). Human growth hormone and human aging. *Endocrine Rev.* 14: 20-39.

Cosman, D., Lyman, S., Idzerda, R.L., Beckmann, M.P. Goodwin, R.G. & March, C.J. (1990). A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 15: 265-270.

Cuatrecasas, P., Hollenberg, M. D., Chang, K. J. & Bennett, V. (1977). Hormone receptor complexes and their modulation of membrane function. *Rec. Progr. Horm. Res.* 3: 37-94.

Cunningham, B.C., Jhurani, P., Ng, P. & Wells, J.A. (1989). Receptor and antibody epitopes in human growth hormone identified by homolog scanning-mutagenesis. *Science* 243: 1330-1336.

Cunningham, B.C., Ultsch, M., De Vos, A.M., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R. & Wells, J.A. (1991). Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 254: 821-825.

Cunningham, B.C. & Wells, J.A. (1989). High-resolution epitope mapping on hGH-receptor interactions by alanine scanning mutagenesis. *Science* 244: 1081-1084.

- Danzmann, R.G., Van Der Kraak, G.J., Chen, T.T. & Powers, D.A. (1990). Metabolic effects of bovine growth hormone and genetically engineered rainbow trout growth hormone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at high temperature. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47: 1292-1301.
- Daughaday, W.H. (1977). GH receptor and radioreceptor assay. In "Endocrine Control of Growth" (Daughaday, W.H.M.D., ed.). pp. 2-8. Elsevier, Amsterdam.
- Daughaday, W.H., Kapadia, M., Yanow, C.E., Fabrick, K. & Mariz, I.K. (1985). Insulin-like growth factors I and II of nonmammalian sera. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 316-325.
- Dauphin-Villemant, Toullec, J-Y, Böcking, D., García, M & Lafont, R. (1994). Acute and chronic effects of the inhibitory neuropeptide MIH on the ecdysteroid biosynthesis by the crustacean molting glands (Y-organs). In abstracts of "17th Conference of European Comparative Endocrinologists". nº 108. Córdoba.
- Davies, S.J., Nengas, I. & Alevis, M. (1993). Partial substitution of fish meal with different meat meal products in diets for sea bream (*Sparus aurata*). In "Fish Nutrition in Practice" (Kaushik, S.J. & Luquet, P., eds.). Vol. 61, pp. 907-911. INRA. Les Colloques, France.
- Davila, D.R., Brief, F., Simon, J., Hammer, R.E., Brinster, R.L. & Kelley, K.W. (1987). Role of growth hormone in regulating T-dependent immune events in aged, nude and transgenic rodents. *J. Neurosci. Res.* 18: 108-116.

Bibliografia

- D'Costa, A.P., Ingram, R.L., Lenham, J.E. & Sonntag, W.E. (1993). The regulation and mechanism of action of growth hormone and insulin-like growth factor I during normal ageing. *J. Reprod. Fert.* 46: 87-98.
- Decuypere, E. & Scanes, C.G. (1983). Variation in the release of thyroxine, triiodothyronine and growth hormone in response to thyrotrophin releasing hormone during development of the domestic fowl. *Acta Endocrinol.* 102: 220-223.
- Delahunty, G., Jedrick, C. & Jedlicka, A. (1992). Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Abstracts of the 2nd International Symposium on Fish Endocrinology, L₅₈, Saint-Malo, France.
- De Mellow, J.S.M. & Baxter, R.C. (1988). Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 156: 199-204.
- De Meyts, P., Smal, J., Ilondo, M.M., Closset, J. & Hennen, G. (1988). Receptors and biological effects of human growth hormone and its natural 20,000-molecular weight variant. In "Human Growth Hormone, Progress and Challenges". (Underwood, L.E., ed). pp. 1-24. Marcel Dekker, New York.

Denver, R.J. & Licht, P. (1988). Thyroid hormones act at the level of the pituitary to regulate thyrotropin and growth hormone secretion in hatching slider turtles. *J. Exp. Zool.* 247: 146-154.

D'Ercole, A.J., Stiles, A.D. & Underwood, L.E. (1984). Tissue concentrations of somatomedin-C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 935-939.

De Vos, A.M., Ultsch, M. & Kossiakoff, A.A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255: 306-312.

Digirolamo, M., Eden, S., Enberg, G., Isaaksson, O., Lonroth, P., Hall, K. & Smith, U. (1986). Specific binding of human growth hormone but not insulin growth factors by human adipocytes. *FEBS* 205:15-19.

Donaldson, E.M., Fagerlund, U.H.M., Higgs, D.A. & McBride, J.R. (1979). Hormonal enhancement of growth in fish. In "Fish Physiology" (Hoar, W.S., Randall, D.J. & Brett, J.R., eds.). Vol. VIII, pp. 455-597. Academic Press, N.Y.

Donner, D.B., Martin, D.W. & Sonenberg, M (1978). Accumulation of a slowly dissociable peptide hormone binding component by isolated target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 672-676.

Bibliografía

- Donner, D.B. (1980). Interconversion between different states of affinity of the human growth hormone receptor on rat hepatocytes: effects of fractional site occupancy on receptor availability. *Biochemistry* 19: 3300-3306.
- Donoghue, D.J., Pérez, F.M., Diamante, B.S.A., Malamed, S. & Scanes, C.G. (1990). Influence of catecholamines, prostaglandins and thyroid hormones on growth hormone secretion by chicken pituitary cells *in vitro*. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7: 35-42.
- Drakenberg, K., Sara, V.R., Lindhal, K.I. & Kewish, B. (1989). The study of insulin-like growth factors in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74: 173-180.
- Duan, C., Duguay, S.J., Swanson, P., Dickhoff, W.W. & Plisetskaya, E.M. (1994). Tissue-specific expression of insulin-like growth factor I ribonucleic acids in salmonids: developmental, hormonal and nutritional regulation. In invited papers from "XII International Congress of Comparative Endocrinology. Perspectives in Comparative Endocrinology." (Davey, K.G., Peter, R.E. & Tobe, S.S., eds.) pp. 365-372. NRC, Toronto. Canadá.
- Duan, C. & Hirano T. (1990). Plasma kinetics of growth hormone in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 95: 179-188.

- Duan, C. & Hirano, T. (1992). Effects of insulin-like growth factor-I and insulin on the *in-vitro* uptake of sulfate by eel branchial cartilage: evidence for the presence of independent hepatic and pancreatic sulphation factors. *J. Endocrinol.* 133: 211-219.
- Duan, C., Plisetskaya, E.M. & Dickhoff, W.W. (1995). Expression of insulin-like growth factor I in normally and abnormally developing coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology* 136: 446-452.
- Duguay, S.J., Chan, S.J., Mommsen, T.P. & Steiner, D.F. (1995). Divergence of insulin-like growth factors I and II in the elasmobranch, *Squalus acanthias*. *FEBS Lett.* 371: 69-72.
- Edwards, C.K. III, Arkins, S., Yunger, L.M., Blum, A., Dantzer, R. & Kelley, K.W. (1992). The macrophage-activating properties of growth hormone. *Cell. Mol. Neurobiol.* 12: 499-510.
- Edwards, C.K. III, Ghiasuddin, S.M., Schepper, J.M., Yunger, L.M. & Kelley, K.W. (1988). A newly defined property of somatotropin: Priming of macrophages for production of superoxide anion. *Science* 239: 769-771.
- Eigenmann, J.E., Patterson, D.F. & Froesch, E.R. (1984). Body size parallels insulin-like growth factor-I levels but not growth hormone secretion capacity. *Acta Endocrinologica* 106: 448-453.

Bibliografia

- Ellsworth, D.L., Hewett-Emmett, D. & Li, W.-H. (1994). Evolution of base composition in the insulin and insulin-like growth factor genes. *Mol. Biol. Evol.* 11: 875-885.
- Esch, F., Bohlen, P., Ling, N., Brazeau, P. & Guillemin, R. (1983). Isolation and characterization of the hypothalamic growth hormone releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117: 772-779.
- Evans, H.M. & Long, J.A. (1921). The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity, and oestrous cycles of the rat. *Anat. Res.* 21: 62-65.
- Fagin, K.D., Lackey, S.L., Reaggan, C.R. & Digirolamo, M. (1980). Specific binding of growth hormone by rat adipocytes. *Endocrinology* 107: 608-615.
- Farbridge, K.J. & Leatherland, J.F. (1992). Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth hormone and free fatty acid concentrations, and hepatic 5'-monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish. Physiol. Biochem.* 10: 245-257.
- Farmer, S.W., Clarke, W.C., Papkoff, H., Nishioka, R.S., Bern, H.A. & Li, C.H. (1975). Studies on the purification and properties of teleost prolactin. *Life Sci.* 16: 149-159.

Farmer, S.W., Papkoff, H., Hayashida, T., Bewley, T.A., Bern, H.A. & Li, C.H. (1976). Purification and properties of teleost growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 30: 91-100.

Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.

Forbes, G. (1976). The adult decline in lean body mass. *Hum. Biol.* 48: 161-163.

Frohman, L.A. (1985). The anterior pituitary. In "Cecil Textbook of Medicine" 17 ed. (Wyngaarden, J.B. & Smith, L.H., eds.). pp. 1251-1265. Philadelphia: Saunders.

Fryer, J. N. (1979). A radioreceptor assay for purified teleost growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39: 123-130.

Fryer, J.N. & Bern, H.A. (1979). Growth hormone binding in tissues of normal and stunted juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *J. Fish Biol.* 15: 527-533.

Fu, Y.K., Arkins, S., Wang, B.S. & Kelley, K.W. (1991). A novel role of growth hormone and insulin-like growth factor-I; priming neutrophils for superoxide anion secretion. *J. Immunol.* 146: 1602-1608.

Bibliografia

- Funkenstein, B., Silbergeld, A., Cavari, B. & Laron, Z. (1989). Growth hormone increases plasma levels of insulin-like growth factor (IGF-I) in a teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Endocrinol.* 120: R19-R21.
- Funkenstein, B., Tandler, A. & Cavari, B. (1992). Developmental expression of the growth hormone gene in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 87: R7-R9.
- Fuiman, L.A. (1983). Growth gradients in fish larvae. *Fish Biol.* 23: 117-123.
- Furlanetto, R.W. (1980). The somatomedin C binding protein: evidence for a heterologous subunit structure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 12-19.
- Furlanetto, R.W., Underwood, L.E., Van Wyk, J.J. & D'Ercole, A.J. (1977). Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.* 60: 648-657.
- García Aragón, P.E, Lobie, G.E.O., Muscat, K.S., Norstedt, G. & Waters, M.J. (1992). Prenatal expression of the growth hormone (GH) receptor/binding protein in the rat: a role for GH in embryonic and fetal development. *Development* 114: 869-876.
- Gavin, J.R., III, Saltman, R.J. & Tollefsen, S.E. (1982). Growth hormone receptor in isolated adipocytes. *Endocrinology* 110: 637-643.

Gerasimo, P., Dyiane, P. & Kelly, P.A. (1979). Titration of total binding sites for growth hormone in rabbit liver. Quantitative modification of these sites during pregnancy. *Mol. Cell. Endocrinol.* 13: 11- 23.

Gluckman, P.D. (1984). The role of pituitary hormones, growth factor and insulin in the regulation of fetal growth. In "Oxford Reviews of Reproductive Biology" (Clarke, J.R. eds.). pp. 1-60. Clarendon Press, Oxford.

Goddard, C.R., Wilkie, S. & Dunn, I.C. (1988). The relationship between insulin-like growth factor-I, growth hormone, thyroid hormones and insulin in chickens selected for growth. *Domest. Anim. Endocrinol.* 5: 165-176.

Gray, E. S. & Kelley, K. M. (1991). Growth regulation in the gobiid teleost, *Gillichthys mirabilis*: roles of growth hormone, hepatic growth hormone receptors and insulin-like growth factor-I. *J. Endocrinol.* 131: 57-66.

Gray, E. S., Kelley, K. M., Law, S., Tsai, R., Young, G. & Bern, H.A. (1992). Regulation of hepatic growth hormone receptors in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 243-252.

Gray, E. S., Young, G. & Bern, H. (1990). Radioreceptor assay for growth hormone in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and its application to the study of stunting. *J. Exp. Zool.* 256: 290-296.

Bibliografia

- Green, H., Morikawa, M. & Nixon, T. (1985). A dual effector theory of growth hormone action. *Differentiation* 29: 195-198.
- Greenwood, F.C., Hunter, W.M. & Glover, J.S. (1963). The preparation of ^{131}I -labelled human GH of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89: 114-123.
- Grellier, P., Yee, M., González, M. & Abboud, S.L. (1995). Characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) and regulation of IGFBP-4 in bone marrow stromal cells. *British J. Haematol.* 90: 249-257.
- Guillemin, R. (1977). The expanding significance of hypothalamic peptides, or, is Endocrinology a branch of Neuroendocrinology?. *Recent Prog. Horm. Res.* 33: 1-21.
- Guillemin, R., Brazeau, P., Bohlen, P., Esch, F., Ling, N. & Wehrenberg, W.B. (1982) Growth hormone-releasing hormone factor from a human pancreatic tumour that caused acromegaly. *Science* 218: 585-587.
- Hall, T.R. & Chadwick, A. (1979). Hypothalamic control of prolactin and growth hormone secretion in different vertebrates species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 37: 333-342.
- Hall, T.R. & Chadwick, A. (1983). The effect of thyrotropin releasing hormone on secretion of prolactine and growth hormone from eel pituitaries incubated *in vitro*. *IRCS Med. Sci.*, 11: 1009-1010.

- Hall, T.R. & Chadwick, A. (1984). Effects of synthetic mammalian thyrotropin releasing hormone, somatostatin and dopamine on the secretion of prolactin and growth hormone from amphibian and reptilian pituitary glands incubated *in vitro*. *J. Endocrinol.* 102: 175-180.
- Hall, T.R., Chadwick, A., Scanes, C.G. & Callard, I.P. (1978). Effects of hypothalamic extract and steroids on the secretion of prolactin, growth hormone and luteinizing hormone by the pituitary gland of the terrapin (*Chrysemis picta*) *in vitro*. *J. Endocrinol.* 76: 169-170.
- Hall, T.R., Harvey, S. & Scanes, C.G. (1986). Control of growth hormone secretion in the vertebrates: A comparative survey. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A: 231-253.
- Hartman, M.L., Iranmanesh, A., Thorner, M.O. & Veldhuis, J.D. (1993). Evaluation of pulsatile patterns of growth hormone release in humans: a brief review. *Am. J. Human Biol.* 5: 603-614.
- Harvey, S. (1983a). Neuroendocrine control of growth hormone secretion in birds. In "Progress in Nonmammalian Brain Research" (Nistico, G. & Bolis, L., eds.). Vol.3, pp. 207-237. CRC Press, Boca Raton.
- Harvey, S. (1983b). Thyroid hormones inhibit growth hormone secretion in domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 96: 329-334.

Bibliografia

- Harvey, S. (1993). Growth hormone secretion in poikilotherms and homeotherms. In "The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates" (Schreibman, M.P., Scanes, C.G. & Pang, P.K.T., eds.). pp. 151-182. Academic Press, New York.
- Harvey, S.T., Davison, F. & Chadwick, A. (1979). Ontogeny of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 39: 270-273.
- Hayashida, T. (1975). In "Hormonal Proteins and Peptides" (Li, C.H., ed.) Vol. 3, pp. 41-146. Academic Press, New York.
- Hayashida, T. & Lagios, M.D. (1969). Fish growth hormone: a biological, immunochemical, and ultrastructural study of sturgeon and paddlefish pituitaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13: 403-411.
- Heldin, C.H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80: 213-223.
- Helms, L.M.H., Grau, E.G., Shimoda, S.K., Nishioka, R.S. & Bern, H.A. (1987). Studies on the regulation of growth hormone (GH) release from the proximal *pars distalis* (PPD) of the tilapia. *Oreochromis mossambicus*, *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 65: 48-55.

- Hervas, F., Morreale de Escobar, G. & Escobar del Rey, A. (1975). Rapid effects of single small doses of L-thyroxine and triiodo-L-thyroxine on growth hormone, as studied in the rat by radioimmunoassay. *Endocrinology* 97: 91-101.
- Highman, K.C. & Hill, L. (1969). *The comparative endocrinology of the invertebrates*. Edward Arnold, London. 270 p.
- Hirano, T. (1991). Hepatic receptor for homologous growth hormone in eel (*Anguilla japonica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 81: 383-390.
- Hirano, T., Ogasawara, T., Hasegawa, S., Iwata, M. & Nagahama, Y. (1990). Changes in plasma hormone levels during loss of hypoosmoregulatory capacity in mature chum salmon (*Oncorhynchus keta*) *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 254-262.
- Ho, K.K.Y. & Hoffman, D.M. (1993). Aging and growth hormone. *Horm. Res.* 40: 80-86.
- Holly, J.M.P. (1991). The physiological role of IGFBP-I. *Acta Endocrinol.* 124: 55-62.
- Holly, J.M.P. & Wass, J.A.H. (1989). Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. *J. Endocrinol.* 122: 611-618.
- Holmes, R.L. & Ball, J.N. (1974). "The Pituitary Gland. A Comparative Account". pp. 1-397. Cambridge Univ. Press, London.

Bibliografía

- Houseknecht, K.L., Boggs, D.L., Campion, D.R., Sartin, J.L., Kiser, T.E., Rampacek, G.B. & Amos H.E. (1988). Effect of dietary source and level on serum growth hormone, insulin-like growth factor 1, growth and body composition in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 66: 2916-2923.
- Hughes, J.P. (1979). Identification and characterization of high and low affinity binding sites from growth hormone in rabbit liver. *Endocrinology* 105: 414-420.
- Ikuta, K., Hirano, T. & Aida, K. (1989). Radioreceptor assay for salmon growth hormone. In "Proceedings, XIth International Symposium on Comparative Endocrinology" p. 168. Málaga.
- Ilondo, M.M., Courtoy, P.J., Geiger, D., Carpentier, J.L., Rousseau, G.G. & De Meyts, P. (1986). Intracellular potassium depletion in IM-9 lymphocytes suppresses the slowly dissociating component of human growth hormone binding and the down-regulation of its receptor but does not affect insulin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6460-6464.
- Ilondo, M.M., Damholt, B.A., Cunningham, B.A., Wells, J.A., De Meyts, P. & Shymko R.M. (1994). Receptor dimerization determines the effects of growth hormone in primary rats adipocytes and cultured human IM-9 lymphocytes. *Endocrinology* 134: 2397-2403.

- Ilondo, M.M., Smal, J., De Meyts, P. & Courtoy, P.J. (1991). Comparison of the effects of Hypertonic sucrose and intracellular potassium depletion of growth hormone receptor binding kinetics and down-regulation in IM-9 cells; evidence for a sequential block of receptor-mediated endocytosis. *Endocrinology* 128: 1597-1602.
- Iraqi, F., Gong, Z. & Hew, C.L. (1993). Isolation and characterization of somatolactin genes from two cold water marine teleost, lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2: 96-103.
- Isaksson, O.G.P., Jansson, J.O. & Gause, I.A.M. (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216: 1237-1238.
- Isaksson, O.G.P., Lindahl, A., Nilsson, A. & Isgaard, J. (1987). Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocrine Rev.* 8: 426-438.
- Iwasaki, K., Gleiser, C.A., Masoro, E.J., McMahan, C.A. Seo, E.J. & Yu, B.P. (1988). Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fisher rats: the fat component and the mineral component. *J. Gerontol. Biol. Sci.* 43: B13-B21.
- Jenkin, P.M. (1970). *Control of growth and metamorphosis*. Pergamon, Oxford.
383 p.

Bibliografia

- Jones, J.I., Gockerman, A., Busby, W.H. Jr, Camacho-Hubner, C. & Clemmons, D.R. (1993). Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding proteins-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J. Cell Biol.* 121: 679-687.
- Josimovich, J.B. & McLaren, J.A. (1962). Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. *Endocrinology* 71: 209-220.
- Jost, A. (1979). Fetal hormones and fetal growth. In "Contributions to Gynecologic and Obstetric Investigation" (Keller, P.,ed.). pp. 1-20. Skarger Press, Basel.
- Kajita, Y., Sakai, M., Kobayashi, M. & Kawauchi, H. (1992). Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. *Fish & Shellfish Immunol.* 2: 155-157.
- Kaneko, T. & Hirano, T. (1993). Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *J. Exp. Biol.* 184: 31-45.
- Katakami, H., Arimura, A. & Frohman, L.A. (1986). Growth hormone-releasing factor stimulates hypothalamic somatostatin release: an inhibitory feedback effect on GH secretion. *Endocrinology* 118: 1872-1877.
- Kaushik, S.J. & Médale, F. (1994). Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. *Aquaculture* 124: 81-97.

- Kawauchi, H. & Yasuda, A. (1989). Evolutionary aspects of growth hormones from non-mammalian species. In "Advances in Growth Hormone and Growth Factor Research" (Muller, E., Cocchi, D. & Locatelli, V., eds.). pp. 51-68. Springer Verlag, Berlin.
- Kelley, K.M., Siharath, K. & Bern, H. A. (1992). Identification of insulin-like growth factor-binding proteins in the circulation of four teleost fish species. *J. Exp. Zool.* 263: 220-224.
- Kelly, P.A., Alic, S., Rozakis, M., Goujon, L., Nagano, M., Pellegrini, I., Gould, D, Djiane, J., Edery, M, Finidori, J. & Postel-Vinay, M.C. (1993). The growth hormone/prolactin receptor family. *Rec. Progr. Horm. Res.* 48: 123-165.
- Kelly, P.A., Leblanc, G. & Djiane, J. (1979). Estimation of total prolactin binding sites after *in vitro* desaturation. *Endocrinology* 104: 1631-1638.
- Kerrigan, J.R. & Rogol, A. (1992). The impact of gonadal steroid hormone action on growth hormone secretion during childhood and adolescence. *Endocrine Rev.* 13: 281-298.
- Kiefer, M.C., Schmid, C., Waldvogel, M., Schlapfer, I., Futo, E., Masiarz, F.R., Green, K., Barr, P.J. & Zapf, J. (1992). Characterization of recombinant human insulin-like growth factor binding proteins 4, 5, and 6 produced in yeast. *J. Biol. Chem.* 267: 12692-12699.

Bibliografia

- Kiess, W. & Butenandt, W. (1985). Specific growth hormone receptors on human peripheral mononuclear cells: Reexpression, identification, and characterization. *J. Clin. Endoc. Metab.* 60: 740-746.
- Kim, K., Kayes, T.B. & Amundson, C.H. (1991). Purified diet development and re-evaluation of the dietary protein requirement of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 96: 57-67.
- Kim, J.D., Nanto-Salonen, K., Szczepankiewicz, J.R., Rosenfeld, R.G. & Glasscock, G.F. (1993). Evidence for pituitary regulation of somatic growth, insulin-like growth factors-I and -II, and their binding proteins in the fetal rat. *Pediatr. Res.* 33: 144-151.
- Kishida, M. & Hirano, T. (1988). Development of a radioimmunoassay for eel growth hormone. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1321-1327.
- Klaoudatos, S. & Apostopoulos, J. (1986). Food intake, growth maintenance and food conversion efficiency in the gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture* 51: 217-224.
- Knobil, E. (1961). The pituitary growth hormone: some physiological considerations. In "Growth in living systems" (Zarrow, M.X., ed.). pp. 353-381. Basic Books. New York.

- Kobuke, L., Specker, J.L. & Bern, H.A. (1987). Thyroxine content in eggs and larvae of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. J. Exp. Zool. 242: 89-94.
- Komourdjian, M.P., Fenwick, J.C. & Saunders, R.L. (1989). Endocrine-mediated photostimulation of growth in Atlantic salmon. Can. J. Zool. 67: 1505-1509.
- Komourdjian, M.P. & Idler, D.R. (1978). Hepatic mediation of hormonal and nutritional factors influencing the *in vitro* sulfur uptake by rainbow trout bone. Gen. Comp. Endocrinol. 36: 33-39.
- Komourdjian, M.P. & Idler, D.R. (1979). Chum salmon pituitary fractions: somatotropic activity and cytoimmunofluorescence studies. Gen. Comp. Endocrinol. 37: 343-349.
- Komourdjian, M.P., Saunders, R.L. & Fenwick, J.C. (1976). Evidence for the role of growth hormone as a part of a *light-pituitary axis* in growth and smoltification of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Zool. 54: 544-551.
- Kooijman, R., Willems, M., De Haas, C.J.C., Rijkers, G.T., Schuurmans, A.L.G., Van Buul-Offers, S.C., Heijnen, C.J. & Zegers, B.J.M. (1992). Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. Endocrinology 131: 2244-2250.
- Koolman, J. (1994). Control of ecdysone biosynthesis in insects. In abstracts of "17th Conference of European Comparative Endocrinologists". nº 105. Córdoba.

Bibliografia

- Lachaise, F., Le Roux, A., Hubert, M. & Lafont R. (1993). The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). *J. Crust. Biol.* 13 (2): 198-234.
- Lagueux, M., Lwoff, L., Meister, M., Goltzené, F. & Hoffmann, J.A. (1990). cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur. J. Biochem.* 187: 249-254.
- Lea, R.W. & Harvey, S. (1990). Feedback effects of growth hormone on anterior pituitary function in chickens. *J. Endocrinol.* 125: 409-415.
- Leatherland, J.F. & Nuti, R.N. (1981). Effects of bovine growth hormone on plasma free fatty acid concentrations and liver, muscle and carcass lipid content in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Fish Biol.* 19: 487-498.
- Le Bail, P.-Y., Boulard, G., Barrenton, B. & Zygmunt, M. (1989). Purification of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) GH for receptor study. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 243-251.
- Le Bail, P.-Y., Mourot B., Zohar Y. & Pérez-Sánchez, J. (1993a). Application of a sensitive radioimmunoassay for the measurement of growth hormone in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and other sparid fish. *Can. J. Zool.* 71: 1500-1505.

- Le Bail, P.-Y., Pérez-Sánchez, J., Yao, J. & Maisse, G. (1993b). Effect of GH treatment on salmonid growth: study of the variability of response. In "Coastal and Estuarine Studies. Aquaculture: Fundamental and Applied Research". (Lahlou, B. & Vitiello, P., eds.). pp. 173-197. American Geophysical Union.
- Le Bail, P.-Y., Sumpter, J.P., Carragher, J.F., Mourot, B., Niu, P.D. & Weil, C. (1991). Development and validation of a highly sensitive radioimmunoassay for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) growth hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 81: 73-85.
- Le Gac, F., Ollitrault, M., Loir, M. & Le Bail, P.-Y. (1992). Evidence for binding and action of growth hormone (GH) in trout testis. Biol. Reprod. 46: 949-957.
- Leidy, J.W., Romano, T.M. & Millar, W.J. (1993). Development and sex-related changes of the growth hormone axis in lean and obese zucker rats. Neuroendocrinol. 57: 213-223.
- Leung, T.C., Ng, T.B. & Woo, N.Y.S. (1991). Metabolic effects of bovine growth hormone in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. Comp. Biochem. Physiol. 99A: 633-636.
- Leung, D.W., Spencer, S.A., Cachianes, G., Hammonds, R.G., Collins, C., Henzel, W.J., Barnard, R., Waters, M.J. & Wood, W.I. (1987). Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. Nature. 330: 537-543.

- Leung, F.C., Style, N.Y., Rosenblum, C.I., Lilburn, M.S. & Marsh, J.A. (1987a). Diminished hepatic growth hormone receptor binding in sex-linked dwarf broiler and leghorn chicken. *Proc. Soc. Biol. Med.* 184: 234-238.
- Leung, F.C., Styles, W.J., Rosenblum, C.I., Loche, S., Cappa, M, Borelli, P., Faedda, A, Crinò, A., Cella, S.G., Corda, R., Müller, E.E. & Pintor, C. (1987b). Reduced growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in children with simple obesity: evidence for somatomedin-C mediated inhibition. *J. Endocrinol.* 27: 145-153.
- Li, C.H. (1969). Comparative chemistry of pituitary lactogenic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* 2: 1-9.
- Li, C.H. & Dixon, J.S. (1971). Human pituitary growth hormone XXXII. The primary structure of the hormone: revision. *Arch. Biochem. Biophys.* 146: 233-236.
- Li, C.H., Evans, H.M. & Simpson, M.E. (1945). Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. *J. Biol. Chem.* 159:353-356.
- Lin, X.-W., Lin, H.-R. & Peter, R.E. (1993). The regulatory effects of thyrotropin-releasing hormone on growth hormone secretion from the pituitary of common carp *in vitro*. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 71-76.

- Lindahl, A., Isgaard, J., Carlsson, L. & Isaksson, O.G.P. (1987). Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages. *Endocrinology* 121: 1061-1069.
- Lindhal, K.L., Sara, V.R., Fridberg, G. & Nishimiya, T. (1985). The presence of somatomedin in the Baltic salmon, *Salmo salar*, with special reference to smoltification. *Aquaculture* 45: 177-183.
- Ling, N., Esch, F., Bohlen, P., Brazeau, P., Wehrenberg, W.B. & Guillemin, R. (1984). Isolation, primary structure and synthesis of human hypothalamic somatocrinin: growth hormone-releasing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4302-4306.
- Lobie, P.E., Wood, T.J.J., Chen, C.M., Waters, M.J. & Norstedt, G. (1994a). Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 31735-31746.
- Lobie, P.E., Wood, T.J.J., Sliva, D., Billestrup, N., Waters, M.J., Enberg, B. & Norstedt, G. (1994b). The cellular mechanism of growth hormone signal transduction. *Acta Paediatr. Suppl.* 406: 39-46.
- Lumpkin, M.D., Samson, W.K. & McCann, S.M. (1985). Effects of intraventricular growth hormone-releasing factor on growth hormone release: further evidence for ultrashort loop feedback. *Endocrinology* 116: 2070-2074.

- Luo, D. & McKeown, B.A. (1991). The effect of thyroid hormone and glucocorticoids on carp growth hormone-releasing factor (GRF)-induced growth hormone (GH) release in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 99A: 621-624.
- Luo, D., McKeown, B.A., Rivier, J. & Vale, W. (1990). *In vitro* responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatotrophs to carp growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80: 288-298.
- Maes, M., Underwood, L.E. & Ketelslegers, J.M. (1983). Plasma somatomedin-C in fasted and refed rats: close relationship with changes in liver somatogenic but not lactogenic binding sites. *J. Endocrinol.* 97: 243-252.
- Maiter, D., Underwood, L.E., Maes, M. & Ketelslegers, J.M. (1988). Acute down-regulation of the somatogenic receptors in rat liver by a single injection of growth hormone. *Endocrinology* 122: 1291-1296.
- Marchant, T.A., Dulka, J.G., Peter, R.E. (1989). Relationship between serum growth hormone levels and the brain and pituitary content of immunoreactive somatostatin in the goldfish, *Carassius auratus*. L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 458-468.
- Marchant, T.A., Fraser, R.A., Andrews, P.C. & Peter, R.E. (1987). The influence of mammalian and teleost somatostatins on the secretion of growth hormone from goldfish (*Carassius auratus*) pituitary fragments *in vitro*. *Regul. Pept.* 17: 41-52.

- Marchant, T.A. & Peter, R.E. (1986). Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Exp. Zool.* 237: 231-239.
- Marelli, O.E.A., Lattuada, O., Leroy, E.M.J., Reina, G. & Franco, P. (1992). *In vitro* activity of rhGH on human T-lymphocyte proliferative responses. *Prog. Neuroendocrinimmunol.* 5: 215-220.
- Martal, J. (1972). Détermination radioimmunologique des hormones de croissance ovine et bovine: étude des conditions d'iodation et obtention d'une hormone somatotrope radiodée sans prolactine contaminante. *Comptes Rendus à l'Académie des Sciences de Paris* 274: 2893-2896.
- Martin-du Pan, R. & Gómez, F. (1981). Régulation neuropharmacologique des hormones hypophysaires. Rôle de l'acétylcholine, du GABA, de l'histamine et des endorphines. *Ann. Endocrin. (Paris)*. 42: 79-112.
- Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Rodríguez, R.B., Pérez-Sánchez, J. & Valdivia, M.M. (1994). Cloning, expression, and characterization of a recombinant gilthead sea bream growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96: 179-188.
- Massagué, J. (1990). Transforming growth factor- α . A model for membrane-anchored growth factors. *J. Biol. Chem.* 265: 21393-21396.

Bibliografia

- Mathews, L.S., Hammer, R.E., Brinster, R.L. & Palmiter, R.D. (1988). Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. *Endocrinology* 123: 433-437.
- Mazess, R.B. (1982). On aging bone loss. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 165: 239-252.
- McCann, S.M. (1981). Monoaminergic and peptidergic control of anterior pituitary secretion. In "Neurosecretion, Molecules, Cells, Systems" (Farner, D.S. & Lederis, K., eds.). pp. 139-151. Plenum Press, New York.
- McCormick, S.D., Tsai, P.I., Kelley, K.M., Nishioka, R.S. & Bern, H.A. (1992). Hormonal control of sulfate uptake by branchial cartilage of coho salmon: role of IGF-I. *J. Exp. Zool.* 262: 166-171.
- McMillan, D.N. & Houlihan, D. (1992). Protein synthesis in trout liver is stimulated by both feeding and fasting. *Fish Physiol. Biochem.* 10: 23-34.
- Mendelshon, L.G. (1988). Minireview: growth hormone receptors. *Life Sciences* 43: 1-5.
- Merchav, S., Tatarsky, I. & Hochberg, Z. (1988a). Enhancement of erythropoiesis *in vitro*, by human growth hormone is mediated by insulin-like growth factor I. *British J. Haematol.* 70: 267-271.

- Merchav, S., Tatarsky, I. & Hochberg, Z. (1988b). Enhancement of human granulopoiesis *in vitro* by biosynthetic insulin-like growth factor-I/somatomedin C and human growth hormone. *J. Clin. Investigation.* 81: 791-797..
- Merimee, T.J. Zapf, J. & Froesch, E.R. (1981). Dwarfism in the pygmy: an isolated deficiency of insulin-like growth factor I. *New England Journal of Medicine* 305: 965-968.
- Michel, D., Lefevre, G. & Labrie, F. (1984). Dexamethasone is a potent stimulator of growth hormone-releasing factor induced cyclic AMP accumulation in the adenohypophysis. *Life Science* 35: 597-602.
- Miyajima, A., Hara, T. & Kitamura, T. (1992). Common subunits of cytokine receptors and the functional redundancy of cytokines. *Trends of Biochem. Sci.* 17: 378-382.
- Molitch, M.E. (1992). Clinical manifestations of acromegaly. *Clin. Endocrinol. Metab.* 21: 597-614.
- Möller, C., Hansson, A., Enberg, B., Lobie, P.E. & Norstedt, G. (1992). Growth hormone induction of tyrosine phosphorylation and activation of mitogen activated protein kinases in cells transfected with rat GH receptor cDNA. *J. Biol. Chem.* 267: 23403-23408.

Bibliografia

- Morel, G., Chavassieux, P., Barenton, B., Dubois, P.M., Meunier, P.J. & Boivin, G. (1993). Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Research* 273: 279-286.
- Morel, A., Gluschankof, P., Gomez, S., Fafeur, V. & Cohen, P. (1984). Characterization of a somatostatin-28 containing the (Tyr-7, Gly-10) derivative of somatostatin-14: A terminal active product of prosomatostatin II processing in anglerfish pancreatic islet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7003-7006.
- Mori, I., Sakamoto, T. & Hirano, T. (1992). Growth hormone (GH)-dependent hepatic GH receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Effects of hypophysectomy and GH injection. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 385-391.
- Morikawa, M., Nixon, T. & Green, H. (1982). Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 29:783-789.
- Müller, E.E. (1987). Neural control of somatotrophic function. *Physiol. Rev.* 67: 962-1053.
- Müller, E.E., Cella, S.G., De Gennaro Colonna, V., Parenti, M., Cocchi, D. & Locatelli, V. (1993). Aspects of the neuroendocrine control of growth hormone secretion in ageing mammals. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 46: 99-114.

- Murphy, W.J., Durum, S.K., Anver, M.R. & Longo, D.L. (1992). Immunological and hematological effects of neuroendocrine hormones. Studies on DW/J dwarf mice. *J. Immunol.* 148: 3799-3805.
- Nagamatsu, S., Chan, S.J., Falkmer, S. & Steiner, D.F. (1991). Evolution of the insulin gene super family. Sequence of a preproinsulin-like growth factor cDNA from the Atlantic hagfish. *J. Biol. Chem.* 226: 2397-2402.
- Ng, T.B., Leung, T.C., Cheng, C.H.K. & Woo, Y.S. (1992). Growth hormone binding in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86: 111-118.
- Ng, T.B., Leung, T.C. & Woo, Y.S. (1991). Insulin-like growth factor I-like immunoreactivity in serum and tissues of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Biochem. Internat.* 24: 359-368.
- Niall, H.D. (1971). A revised primary structure for human growth hormone. *Nature New Biol.* 230: 90-91.
- Niall, H.D., Hogan, M.L., Saver, R., Rosenblum, I.Y. & Greenwood, F.C. (1971). Sequences of pituitary gland and placental lactogenic and growth hormones: Evolution from a primordial peptide by gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 866-869.

Bibliografía

- Nicoll, C.S., Tarpey, J.F., Mayer, G.L. & Russel, S.M. (1986). Similarities and differences among prolactins and growth hormones and their receptors. *Am. Zool.* 26: 965-983.
- Nissley, S.P. & Rechler, M.M. (1985). Insulin-like growth factors: Biosynthesis, receptors and carrier proteins. In "Hormonal Proteins and Peptides" (Li, C. H., ed.). pp. 127-203. London and New York: Academic Press.
- Niu, P.D. & Le Bail, P.-Y. (1993). Presence of insulin-like growth factor binding protein (IGF-BP) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum. *J. Exp. Zool.* 265: 627-636.
- Niu, P.D., Pérez-Sánchez, J. & Le Bail, P.-Y. (1993). Development of a protein binding assay for teleost IGF: relationship between GH and IGF in the serum of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 11: 381-391.
- Nixon, T. & Green, H. (1984). Contribution of growth hormone to the adipogenic activity of serum. *Endocrinology* 114: 527-532.
- Norton, S.A., Zavy, M.Y., Maxwell, C.V., Buchanan, D.S. & Breazile J.E. (1989). Insulin, growth hormone, glucose, and fatty acids in gilts selected for rapid vs. slow growth rate. *Am. J. Physiol.* 257: E554-E560.

- Nozaki, M., Miyata, K., Oota, Y., Gorbman, A. & Plisetskaya, E. (1988). Different cellular distributions of two somatostatins in brain and pancreas of salmonids, and their associations with insulin- and glucagon-secreting cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 69: 267-280.
- O'Connor, P.K., Reich, B. & Sheridan, M.A. (1993). Growth hormone stimulates hepatic lipid mobilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Comp. Physiol. B* 163: 427-431.
- Ohlsson, C., Nilsson, A., Isaksson, O.G.P. & Lindahl, A. (1992). 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.
- Okumoto, N., Ikuta, K., Aida, K., Hanyu, I. & Hirano, T. (1989). Effects of photoperiod on smolting and hormonal secretion in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Aquaculture* 82: 51-62.
- Olivereau, M. & Rand-Weaver, M. (1994). Immunocytochemical study of the somatolactin cells in the pituitary of Pacific salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *O. keta* at some stages of the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93: 28-35.

Bibliografía

- O'Malley, B.O. (1989). Did eucaryotic steroid receptors evolve from intracrine gene regulators? *Endocrinology* 125: 1119-1120.
- Ono, M., Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Sakata, S., Yasunaga, T. & Kawauchi, H. (1990). cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4330-4334.
- Oyama, H., Martin, Y., Sussman, K., Weir G.C. & Permut, A. (1981). The biological activity of catfish pancreatic somatostatin. *Regul. Pept.* 1: 387-396.
- Palmiter, R.D., Norstedt, G., Gelinás, R.E., Hammer, R.E. & Brinster, R.L. (1983). Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 222: 809-814.
- Parker, D.B., Coe, I.R., Dixon, G.H. & Sherwood, N.M. (1993). *Eur. J. Biochem.* 215: 439-442.
- Párrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E. M. & Gutiérrez, J. (1994). Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am. J. Physiol.* 266: R1944-R1950.
- Pell, J.M. & Bates, P.C. (1990). The nutritional regulation of growth hormone action. *Nutr. Res. Rev.* 3: 163-192.

- Pendón, C., Martínez-Barberá, J.P. & Valdivia, M.M. (1994). Cloning of a somatolactin-encoding cDNA from sole (*Solea senegalensis*). *Gene* 147: 227-230.
- Pérez-Sánchez, J., Smal, J. & Le Bail, P.-Y. (1991). Location and characterization of growth hormone binding sites in the central nervous system of a teleost fish (*Oncorhynchus mykiss*). *Growth Regulation* 1: 145-152.
- Pérez-Sánchez, J., Weil, C. & Le Bail, P.-Y. (1992). Effects of human insulin-like growth factor-I on release of growth hormone by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells. *J. Exp. Zool.* 262: 287-290.
- Peter, R.E. & Marchant, T.A. (1995). The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture* 125: 299-321.
- Peter, R.E., Nahorniak, C.S. Vale, W.W. & Rivier, J.E. (1984). Human pancreatic growth hormone-releasing factor (hpGRF) stimulates growth hormone release in goldfish. *J. Exp. Zool.* 231: 161-163.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., Carragher, J.F. & Le Bail, P.-Y. (1991). Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 86-93.

Bibliografia

- Planas, J.V., Swanson, P., Rand-Weaver, M. & Dickhoff, W.W. (1992). Somatolactin stimulates *in vitro* gonadal steroidogenesis in coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Gen. Comp. Endocr. 87: 1-5.
- Plisetskaya, E.M., Pollock, H.G., Rouse, J.B., Hamilton, J.W., Kimmel, J.R., Andrews, P.C. & Gorbman, A. (1986). Characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) islet somatostatins. Gen. Comp. Endocrinol. 63: 252-263.
- Postel-Vinay, M.C., Cohen-Taguni, E. & Charrier, J. (1982). Growth hormone receptors in rat liver membranes: Effects of fasting and refeeding, and correlation with plasma somatomedin activity. Mol. Cell. Endocrinol. 28: 657-669.
- Power, D.M. & Canario, A.V.M. (1992). Immunocytochemistry of somatotrophs, gonadotrophs, prolactin and adrenocorticotropin cells in larval sea bream (*Sparus auratus*) pituitaries. Cell Tissue Res. 269: 341-346.
- Prunet, P., Boeuf, G., Bolton, J.P. & Young, G. (1989). Smoltification and seawater adaptation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): plasma prolactin, growth hormone, and thyroid hormones. Gen. Comp. Endocrinol. 74: 335-364.
- Rand-Weaver, M., Baker, B.I. & Kawauchi, H. (1991a). Cellular localization of somatolactin in the *pars intermedia* of some teleost fishes. Cell Tiss. Res. 263: 207-215.

- Rand-Weaver, M., Kawauchi, H. & Ono, M. (1993a). Evolution of the structure of the growth hormone and prolactin family. In "The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates" (Schreibman, M.P., Scanes, C.G. & Pang, P.K.T., eds.). pp. 13-42. Academic Press, New York.
- Rand-Weaver, M., Noso, T., Muramoto, K. & Kawauchi, H. (1991b). Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Biochemistry* 30: 1509-1515.
- Rand-Weaver, M., Pottinger, T.C. & Sumpter J.P. (1993b). Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. *J. Endocrinol.* 138: 509-516.
- Rand-Weaver, M & Swanson, P. (1993). Plasma somatolactin levels in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification and sexual maturation. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 175-182.
- Rao, K. (1965). Isolation and partial characterization of the moult-inhibiting hormone of the crustacean eyestalk. *Experientia* 21: 593-594.
- Reddy, P.K., Brown, C.L., Leatherland, J.F. & Lam, T.J. (1992). Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*): II. Changes in the hormones and 5'-monodeiodinase activity during development. *Fish Physiol. Biochem.* 9: 487- 496.

Bibliografia

- Reddy, P.K. & Lam, T.J. (1992). Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*): I. Effects of the hormones and an antithyroid drug on yolk absorption, growth and development. *Fish Physiol. Biochem.* 9: 473-485.
- Reid, J. (1970). Congenital absence of the pituitary gland. *J. Pediatr.* 56: 658-666.
- Richman, R.A., Weiss, J.P., Hochberg, Z. & Florini, J.R. (1981). Regulation of growth hormone release: evidence against negative feedback in rat pituitary cells. *Endocrinology* 108: 2287-2292.
- Ricker, W.E. (1979). Growth rates and models. In "Fish Physiology" (Hoar, W.S., Randall, D.J. & Brett, J.R., eds.). Vol. VIII, pp. 677-743. Academic Press, N.Y.
- Ricketts, W.G., Birchenall-Sparks, M.C., Hardwick, J.P. & Richardson, A. (1985). Effect of age and dietary restriction on protein synthesis by isolated kidney cells. *J. Cell. Physiol.* 125: 492-498.
- Ricordel, M.J., Smal, J. & P.-Y. Le Bail (1995). Application of a recombinant cichlid growth hormone radioimmunoassay to measure native GH in tilapia (*Oreochromis niloticus*) bred at different temperatures. *Aquat. Living Resour.* 8: 153-160.

Riedel, M., Brabant, K., Rieger, K. & Von Zur Mühlen, A. (1994). Growth hormone therapy in adults: rationales, results, and perspectives. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102: 273-283.

Rimoin, D.L., Merimee, T.J. & McKusick, V.A. (1966). Growth hormone deficiency in man: an isolated, recessively inherited defect. *Science* 152: 1635-1637

Rivier, J., Spiess, J., Thorner, M. O., Vale, W. (1982). Characterization of a growth hormone-releasing factor from human pancreatic islet tumour. *Nature* 300: 276-278.

Rodgers, B.D., Helms, L.M. & Grau, E.G. (1992). Effects of fasting, medium glucose, and amino acid concentrations on prolactin and growth hormone release, *in vitro*, from the pituitary of the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86: 344-351.

Root, J.L., Duckett, G.E., Sweetland, M., Stzelecki, J.A. & Root, A.W. (1985). Hypothyroidism blunts the growth hormone (GH) releasing effects of human pancreatic GH releasing factor in the adult male rat "in vivo" and "in vitro". *Endocrinology* 116: 1703-1707.

Rosen, C.J. (1994). Growth hormone, insulin-like growth factors, and the senescent skeleton: Ponce de Leon's Fountain revisited? *J. Cell. Biochem.* 56: 348-356.



Bibliografia

- Rosenthal, S.M., Silverman, B.L. & Wehrenberg, W.B. (1991). Exogenous growth hormone inhibits bovine but not murine pituitary growth hormone secretion *in vitro*: Evidence for a direct feedback of growth hormone on the pituitary. *Neuroendocrinology* 53: 597-600.
- Ross, P.D., Davis, J.W., Vogel, J.M. & Wasnich, R.D. (1990). A critical review of bone mass and the risk of fractures in osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* 46: 149-161.
- Ross, R.J.M. & Buchanan, Ch. R. (1990). Growth hormone secretion: its regulation and the influence of nutritional factors. *Nutr. Res. Rev.* 3: 143-162.
- Ross, R.J.M. & Chew, S.L. (1995). Acquired growth hormone resistance. *European J. Endocrinol.* 132: 655-660.
- Sakai, M., Kobayashi, M. & Kawauchi, H. (1995). Enhancement of chemiluminiscent responses of phagocytic cells from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by injection of growth hormone. *Fish & Shellfish Immunol.* 5: 375-379.
- Salmon, W.D. & Daughaday, W.H. (1957). A hormonally controlled factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J. Lab. Clin. Med.* 49: 825-836.
- Sara, V.R. & Hall, K. (1990). Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Revs.* 70: 591-614.

Sassolas, G. (1994). Potential therapeutic applications of growth hormone in adults. *Horm. Res.* 42: 72-78.

Scanes, C.G., Dunnington, E.A., Buono, F.C., Donoghue, D.J. & Siegel, P.B. (1989). Plasma concentrations of insulin-like growth factors (IGF-I) I and IGF-II in dwarf and normal chickens of high and low weight selected lines. *Growth Dev. Aging* 53: 151-157.

Scanes, C.G., Lauterio, T.J. & Buonomo, F.C. (1983). Annual development and diurnal cycles of pituitary hormone secretion. In "Avian Endocrinology: Environmental and Ecological Perspectives (Mikami, S., Homma, K & Wada, M., eds.). pp. 307-326. Japan Scientific Press.

Scanes, C.G., Rabbi, J. & Buonomo, F.C. (1982). Brain amines and the regulation of anterior pituitary secretion in the domestic fowl. In "Aspects of Avian Endocrinology: Practical and Theoretical Applications" (Scanes, C.G., Ottinger, M.A., Kenny, A.D., Balthazart, J., Cronshaw, J. & Chester-Jones, I., eds.). pp. 13-31. Grad. Studies Texas Tech. Univ., Lubbock.

Schulteiss, H. (1979). Maintenance of growth- and thyroid-stimulating properties of ectopic pituitaries in the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 38: 75-82.

Bibliografia

Schwartz, M.W., Figlewicz, D.P., Baskin, D.G., Woods, S.C. & Porte, D. (1992). Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr. Rev.* 13: 387-414.

Sheridan, M.A. (1986). Effects of thyroxine, cortisol, growth hormone and prolactin on lipid metabolism of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), during smoltification. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 220-238.

Shimasaki, S. & Ling, N. (1991). Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1,-2,-3,-4,-5 y -6). *Progress in Growth Factor Research.* 3: 243-266.

Slootweg, M.C. (1993). Growth hormone and bone. *Horm. Metab. Res.* 25: 335-343.

Smit, A.B., Vreugdenhil, E., Ebberink, R.H.M., Geraerts, W.P.M., Klootwijk, J. & Joosse, J. (1988). Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature* 331: 535-538.

Smith, P.E. (1954). Continuation of pregnancy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following hypophysectomy. *Endocrinology* 55: 655-664.

Sonntag, W.E., Forman, L.J., Miki, N. & Meites J. (1982). Growth hormone secretion and neuroendocrine regulation. In "Handbook of Endocrinology" (Gass, G.H. & Kaplan, F.M.). pp. 35-59. CRC Press, Boca Raton.

- Soumoff, C. & O'Connor, J.D. (1982). Repression of Y-organ secretory activity by molt inhibiting hormone in the crab *Pachygrapsus crassipes*. Gen. Comp. Endocrinol. 48: 432-439.
- Spangelo, B.L., Judd, A.M., Isakson, P.C. & MacLeod, R.M. (1989). Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release *in vitro*. Endocrinology 125: 575-577.
- Spiess, J., Rivier, J. & Vale, W. (1983). Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. Nature 303: 532-535.
- Stahnke, N. & Zeisel, H.J. (1989). Growth hormone therapy and leukemia. Europ. J. Pediatrics. 148: 591-596.
- Stefansson, S.O., Björnsson, B.Th., Hansen, T., Taranger, G.L. & Saunders, R.L. (1991). Growth, parr-smolt transformation, and changes in growth hormone of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared under different photoperiods. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 2100-2108.
- Storebakken, T., Hung, S.S.O., Calvert, C.C. & Plisetskaya, E.M. (1991). Nutrient partitioning in rainbow trout at different feeding rates. Aquaculture 96: 191-203.
- Straus, D. S. & Takemoto, C. D. (1990). Effect of fasting on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver. Mol. Endocrinol. 4: 91-100.

Bibliografia

- Strauss, R.E. & Fuiman, L.A. (1985). Quantitative comparisons of body form and allometry in larval and adult Pacific sculpins (Teleostei: Cottidae). *Can. J. Zool.* 63: 1582-1589.
- Suhr, S.T., Rahal, J.O. & Mayo, K.E. (1989). Mouse growth hormone-releasing hormone: precursor structure and expression in brain and placenta. *Mol. Endocrinol.* 3: 1693-1700.
- Sumpter, J.P. (1992). Control of growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 299-320.
- Sumpter, J.P., Le Bail, P-Y., Pickering, A.D., Pottinger, T.G. & Carragher, J.F. (1991). The effect of starvation on growth plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 94-102.
- Suzuki, R., Kishida, M. & Hirano, T. (1990). Growth hormone secretion during long term incubation of the pituitary of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.* 8: 159-165.
- Sweeting, R.M. & McKeown, B.A. (1989). Changes in plasma growth hormone and various metabolic factors during smoltification of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 82: 279-295.

- Tacon, A.G.J. & Cowey, C.B. (1985). Protein and amino acid requirements. In "Fish Energetics, New Perspectives" (Tytler, P. & Calow, P., eds.). pp. 155-183. Croom Helm, London & Sidney.
- Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Kawauchi, H. & Ono, M. (1991). Gene structure of chum salmon somatolactin: a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family. *Mol. Endocrinol.* 5: 778-786.
- Tarpey, J. F. & Nicoll, C. S. (1985). Characterization of hepatic growth hormone binding sites in two fish species, *Gillichthys mirabilis* (Teleostei) and *Acipenser transmontanus* (Chondrostei). *Gen. Comp. Endocrinol.* 60: 39-50.
- Thommes, R.C., Woods, J.E., Aramburo, C., Buonomo, F.C. & Scanes, C.G. (1992). Effects of surgical decapitation and chicken growth hormone (cGH) replacement therapy on chick embryo growth. *Growth, Development & Aging* 56: 167-178.
- Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Nahorniak, C.S. & Peter, R.E. (1992). Interaction of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinology* 56: 483-490.
- Tsevis, N., Klaoudatos, S. & Conides, A. (1992). Food conversion budget in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, fingerlings under two different feeding frequency patterns. *Aquaculture* 101: 293-304.

Bibliografia

- Turner, C.D. & Bagnara, J.T. (1971). *General Endocrinology* (5th Edition). Saunders, Philadelphia. 659 p.
- Valsania, P. & Micossi, P. (1994). Genetic epidemiology of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Metab. Rev.* 10: 385-405.
- Vandeputte, M. (1990). Contribution a l'étude de l'endocrinologie de la croissance aux premiers stades du développement chez la truite commune. D.E.A. Biologie et Agronomie. Université de Rennes I-Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes.
- Varma, S., Sabharwal, P., Sheridan, J.F. & Malarkey, W.B. (1993). Growth hormone secretion by human peripheral blood mononuclear cells detected by an enzyme-linked immunoplaque assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 49-53.
- Vaughan, J.M., Rivier, J., Spiess, J., Peng, C., Chang, J.P., Peter, R.E. & Vale, W. (1992). Isolation and characterization of hypothalamic growth hormone-releasing factor from common carp, *Cyprinus carpio*. *Neuroendocrinology* 56: 539-549.
- Wagner, G.F. & McKeown, B.A. (1986). Development of a salmon radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 452-458.

- Wang, X., Souza, S.C., Kelder, B., Cioffi, J.A. & Kopchick, J.J. (1995). A 40-amino acid segment of the growth hormone receptor cytoplasmic domain is essential for GH- induced tyrosine-phosphorylated cytosolic proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 6261-6266.
- Ward, W.F. (1988). Enhancement by food restriction of liver protein synthesis in the aging Fisher 344 rat. *J. Gerontol. Biol. Sci* 43: B50-B53.
- Watahiki, M., Yamamoto, M., Yamakawa, M., Tanaka, M. & Nakashima, K. (1989). Conserved and unique amino acids residues in the domain of growth hormones. *J. Biol. Chem.* 264: 312-316.
- Weatherley, A.H. & Gill, H.S. (1987). Influence of hormones. In "The Biology of Fish Growth". pp. 177-206. Academic Press, London.
- Wehrenberg, W.B. & Giustina, A. (1992). Basic counterpoint: mechanisms and pathways of gonadal steroid modulation of growth hormone secretion. *Endocrine Rev.* 13: 299-308.
- Weigent, D.A., Baxter, J.B. & Blalock, J.E. (1992). The production of growth hormone and insulin-like growth factor-I by the same subpopulation of rat mononuclear leukocytes. *Brain Behav. Immun.* 6: 365-376.
- Weigent, D.A. & Blalock, J.E. (1991). The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell. Immunol.* 135: 55-65.

Bibliografia

- Wigham, T. & Batten, T.F.C. (1984). Effect of the hypothalamic peptides TRH and somatostatin on prolactin and growth hormone cell activity in the pituitary of *Poecillia latipinna* incubated *in vitro*. I. An electrophoretic study. *Gen. Comp. Endocr.* 55: 444-449.
- Wilhelmi, A.E., Fishman, J.B. & Russel, J.A. (1948). A new preparation of chrystalline growth hormone. *J. Biol. Chem.* 176: 735-741.
- Wilson, D. M. & Hintz, R. L. (1982). Inter-species comparison of somatomedin structure using immunological probes. *J. Endocrinol.* 95: 59-64.
- Yamamoto, H. & Kato, Y. (1993). Relationship between plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) levels and body mass index (BMI) in adults. *Endocr. J.* 40: 41-45.
- Yao, K., Niu, P-D., Le Gac, F. & Le Bail, P-Y. (1991). Presence of GH specific binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: characterization of the hepatic receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81: 72-82.
- Young, G., Björnsson, B.T., Prunet, P., Lin, R.J. & Bern H.A. (1989a). Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones and cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74: 346-354.

- Young, G., Prunet, P., Ogasawara, T., Hirano, T. & Bern H.A. (1989b). Growth retardation (stunting) in coho salmon: Plasma hormone levels in stunts in seawater and after transfer to fresh water. *Aquaculture*. 82: 269-278.
- Yu, B.P., Masoro, E.J., Murata, I., Bertrand, H.A. & Lynd, F.T. (1982). Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed *ad libitum* or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J. Gerontol.* 37: 130-141.
- Zapf, J., Hauri, C., Waldvogel, M. & Froesch, E. R. (1986). Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulin-like growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. *J. Clin. Invest.* 77: 1768-1775.
- Zapf, J., Morell, B., Walter, H. Laron, Z. & Froesch, E. R. (1980). Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and its carrier protein in various metabolic disorders. *Acta Endocrinol.* 95: 505-516.
- Zhu, Y. & Thomas, P. (1995). Red drum somatolactin: Development of a homologous radioimmunoassays and plasma levels after exposure to stressors or various backgrounds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99: 275-288.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Néstor Martí Pajares
la calificación de Apté Cum Laude

Valencia, a 31 de mayo de 1919

El Secretario,

El Presidente

