

Expressão do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) no músculo peitoral e semimembranoso em duas populações do ganso migratório *Branta leucopsis* Bechstein (Anseriformes, Anatidae) em diferentes fases de desenvolvimento

Rita de Cássia da S. e Sá¹
Gérman A. B. Mahecha²
Alicia El Haj³
Pat J. Butler³

INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I (IGF-I) EXPRESSION IN THE PECTORALIS AND SEMIMEMBRANOSUS MUSCLE IN TWO POPULATIONS OF THE MIGRATING BIRD *Branta leucopsis* BECHSTEIN (ANSERIFORMES, ANATIDAE) DURING DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT

ABSTRACT: Many species of migrating birds travel great distances to reproduce. The process of preparation for migration of young birds involves the development of a muscular-skeletal system capable of sustaining

Apoio Financeiro: CNPq e Rotary International Foundation

¹ Departamento de Biologia, Centro de Biologia da Reprodução Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, e-mail: ufritasa@eletrica.ufjf.br

² Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

³ School of Biological Sciences, University of Birmingham, Birmingham, England.

prolonged flights and the alterations underwent by muscle fibres which are under control of factors such as nervous and hormonal stimuli. Considering that insulin-like growth factor I (IGF-I) acts as a mediator of the growth hormone effects, essential for muscular development, in this paper, the IGF-I expression is investigated in the pectoralis and semimembranosus muscles of two populations (wild and captive) of the migratory bird *Branta leucopsis*. The primary polyclonal antibody anti-IGF-I was used for immunocytochemical recognition of epitopes present in muscle fibres in different stages of development. Variations in the pattern of immunoreactivity distribution among the phases of development and between the muscles have been shown. Differences regarding the antibody reactivity between wild and captive populations have not been noted.

Key words: *Branta leucopsis*, insulin-like growth factor I (IGF-I), migratory bird, pectoralis and semimembranosus muscle

INTRODUÇÃO

Muitas espécies de aves migratórias, embora ainda jovens, desenvolvem musculatura capaz de sustentar vôos prolongados. Por exemplo, o ganso "Barnacle" (*Branta leucopsis* Bechstein) (Anseriformes, Anatidae) é uma ave migratória que percorre grandes distâncias durante seu período reprodutivo. No verão, este ganso voa em torno de 2500 km, indo de Solway Firth (Escócia) até o arquipélago de Svalbard (Ártico europeu), onde se reproduz (OWEN & BLACK, 1989). Sendo uma espécie nidífuga, aproximadamente 24 horas após a eclosão, os filhotes deixam seus ninhos e passam as doze semanas seguintes preparando-se para a migração.

O processo de preparação para a migração compreende o desenvolvimento de um sistema músculo-esquelético apropriado, capaz de responder às exigências biomecânicas requeridas para a manutenção de exercício físico prolongado, decorrente do vôo migratório. Tal capacitação envolve alterações das fibras musculares num curto espaço de tempo, compreendendo adap-

tações dos componentes envolvidos no processo de contração muscular e na sua regulação. Vários são os fatores que regulam o desenvolvimento e crescimento muscular e entre eles, destaca-se a atuação dos hormônios da tireóide e do crescimento e os fatores de crescimento, como os principais agentes promotores do crescimento do tecido muscular (FLORINI, 1987).

Os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) pertencem a um grupo de peptídeos estruturalmente relacionados com diversas propriedades biológicas em vários tipos celulares. Nos mioblastos, os IGFs são capazes de estimular a proliferação e a diferenciação, a absorção de amino ácidos e glicose e de inibir a proteólise (TOLLEFSEN *et al.*, 1989a, b; RALPHS *et al.*, 1990; McFARLAND *et al.*, 1992, MOLONEY *et al.*, 1998). Atualmente, dois tipos de IGFs (IGF-I e IGF-II) foram identificados em várias espécies de animais, onde o IGF-I e IGF-II são caracterizados como polipeptídeos estruturalmente semelhantes, mas regulados por fatores específicos (DE VROEDE *et al.*, 1984; TOLLEFSEN *et al.*, 1989a). Inicialmente, pensava-se que o IGF-I atuava no estímulo do crescimento pós-natal, enquanto o IGF-II atuaria como um fator de crescimento fetal. Entretanto, estudos em mamíferos mostraram a presença de mRNA e receptores de IGF-I em vários tecidos fetais durante o meio e final da gestação (SERRANO *et al.*, 1990). IGF-I também foi encontrado na gema de ovos não fertilizados e receptores do IGF-I foram encontrados em embriões de galinha (DE PABLO *et al.*, 1990; SERRANO *et al.*, 1990).

Apesar das evidentes transformações observadas durante o crescimento das aves, em geral, poucos estudos abordaram os aspectos relacionados ao desenvolvimento fisiológico dos músculos locomotores em função de sua capacidade de voo e das alterações sofridas devido à prática do voo. No caso particular da espécie *B. leucopsis*, as modificações do sistema músculo-esquelético ocorrem muito rapidamente e, dado que existe uma relação entre as características biomecânicas e a influência hormonal (SCANES *et al.*, 1990; FLORINI *et al.*, 1991; GODDARD & BOSWELL, 1991, PERRONE *et al.*, 1995), este trabalho pretendeu avaliar a expressão do IGF-I, através da imunocitoquímica, nos músculos peitoral e semimembranoso de duas populações (selvagem e cativa) do ganso migratório *B. leucopsis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Músculos peitoral e semimembranoso de duas populações de *Branta leucopsis* foram utilizados: uma população cativa/não migratória, mantida na Universidade de Birmingham (Birmingham, Inglaterra), e outra, selvagem/migratória, capturada em duas áreas (Ny-Alesund e Hornsund) na costa oeste da ilha de Spitsbergen, Svalbard (região ártica da Noruega). O trabalho foi desenvolvido no Instituto de Ciências Biológicas da referida Universidade em 1993.

Os gansos foram sacrificados através de injeção letal de pentobarbital sódico ou pela inalação de halotano. Fragmentos do músculo peitoral foram retirados do quadrante crânio-medial do músculo peitoral compreendido entre sua extremidade anterior e 1.0 – 2.0 cm da carina do esterno, paralelo às fibras musculares. Os fragmentos do músculo semimembranoso foram extraídos a partir de cortes transversais de sua parte média. Foram utilizados exemplares de fases específicas de desenvolvimento: ovo, recém-nascido, 1, 3, 5, 7, 11 semanas e adulto.

Para o estudo imunocitoquímico da expressão do IGF-I foi utilizado o anticorpo primário policlonal anti-IGF-I (gentilmente cedido por Goddard, C., Poultry Research Center, Roslyn, Edimburgo, Escócia). O imunógeno original foi obtido a partir do IGF-I humano produzido em coelho e conjugado com tireoglobulina bovina. Esse anticorpo reage com o peptídeo IGF-I livre e foi demonstrado que ele reconhece o IGF-I humano, ovino, bovino, de galinha e camundongo (Goddard, C., comunicação pessoal). O anticorpo secundário utilizado para a identificação do anticorpo primário anti-IGF-I foi o anti-IgG, de coelho, marcado com FITC (Sigma).

Os cortes usados como controle receberam PBS/0.1% BSA ao invés do anticorpo primário, e foram, posteriormente, incubados com o anticorpo secundário. A fluorescência inespecífica detectada nos grupos controle foi avaliada pela baixa intensidade de reação e serviu de base para a caracterização da fluorescência específica nas fibras reativas. Foram feitas comparações da intensidade e localização de reação do grupo controle com as amostras imunofluorescente-positivas.

A interpretação dos resultados foi feita em observações diretas, no microscópio de fluorescência Zeiss e nas fotografias.

RESULTADOS

A análise imunocitoquímica revelou que o anticorpo anti-IGF-I reconheceu epitopos presentes nos músculos peitoral e semimembranoso nas populações migratória e não-migratória do ganso "Barnacle".

Imunorreacção de baixa intensidade foi identificada nas fibras do músculo peitoral de ambas as populações no início de seu desenvolvimento, compreendendo os estádios de pré-eclosão e eclosão e a primeira semana de vida (Figura 1A). Essa reacção foi mais significativa no tecido conjuntivo no estádio de eclosão e na primeira semana de vida.

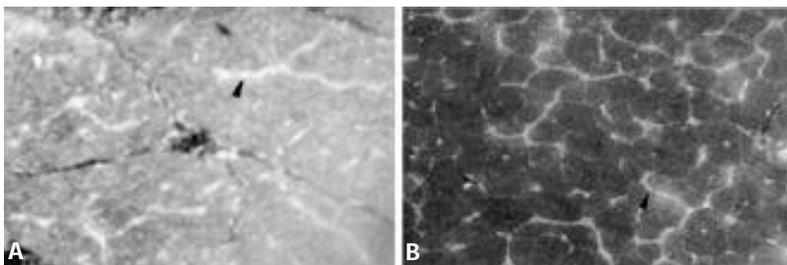


Figura 1 - Microscopia de imunofluorescência de secções transversais dos músculos peitoral e semimembranoso do ganso "Barnacle" selvagem, incubadas com o anticorpo anti-IGF-I. **(A)** Estádio de 1 semana de desenvolvimento pós-natal do músculo peitoral, com reacção de baixa intensidade nas fibras e significativa reacção no tecido conjuntivo (cabeça de seta (833.3X)). **(B)** Estádio de 1 semana de desenvolvimento pós-natal do músculo semimembranoso (815.2X), com reacção positiva contornando as fibras.

Na terceira e quinta semanas (Figura 2A), reatividade crescente foi sendo observada, e por volta da sétima semana (Figura 2B) até a fase adulta (Figura 3A), a imunorreacção foi claramente detectada contornando as fibras e os fascículos musculares.

Expressão do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) no músculo peitoral e semimembranoso em duas populações do ganso migratório *Branta leucopsis* Bechstein (Anseriformes, Anatidae) em diferentes fases de desenvolvimento

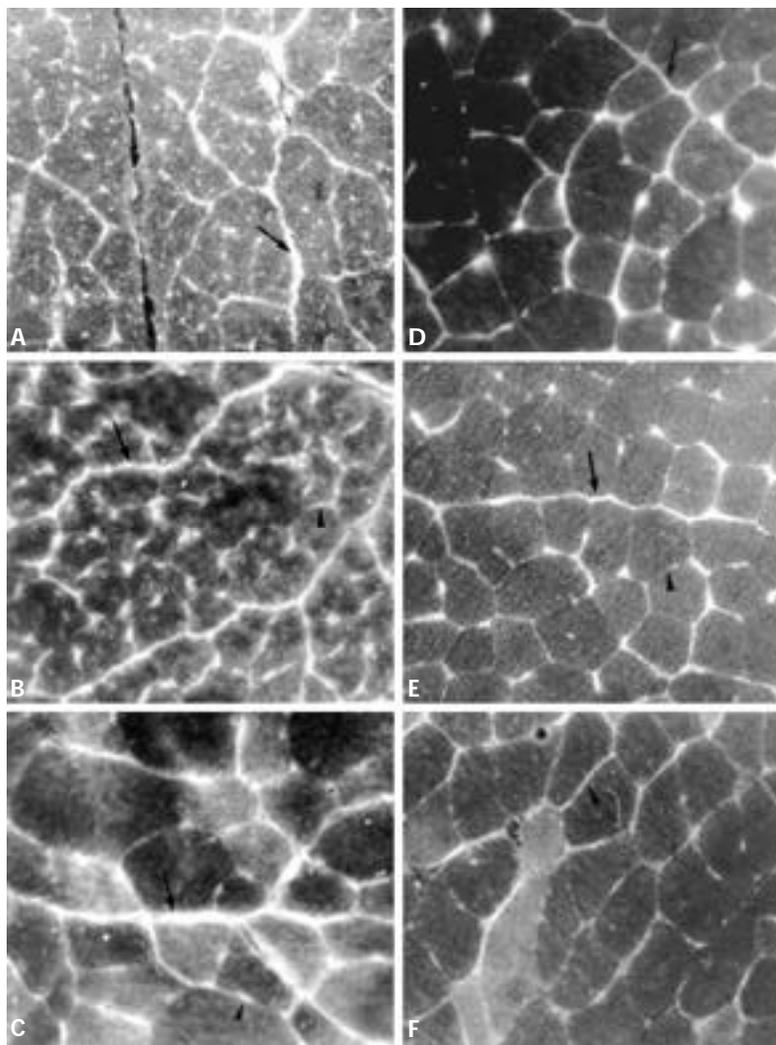


Figura 2 - Microscopia de imunofluorescência de secções transversais dos músculos peitoral e semimembranoso do ganso "Barnacle" mantido em cativeiro, incubadas com o anticorpo anti-IGF-I. **(A)** Estádio de 5 semanas (854.8X), **(B)** 7 semanas (815.8X) e **(C)** 11 semanas (833.3X) de desenvolvimento pós-natal do músculo peitoral. **(D)** Estádio de 5 semanas (847.2X), **(E)** 7 semanas (817.3X) e **(F)** 11 semanas (844.8X) de desenvolvimento pós-natal do músculo semimembranoso. O músculo semimembranoso melhor evidencia reatividade contornando as fibras (cabeça de seta) e fascículos musculares (seta) nos estádios de 5 e 7 semanas em relação ao músculo peitoral. No estádio de 11 semanas, observa-se que os dois músculos apresentam o mesmo arranjo de reatividade.

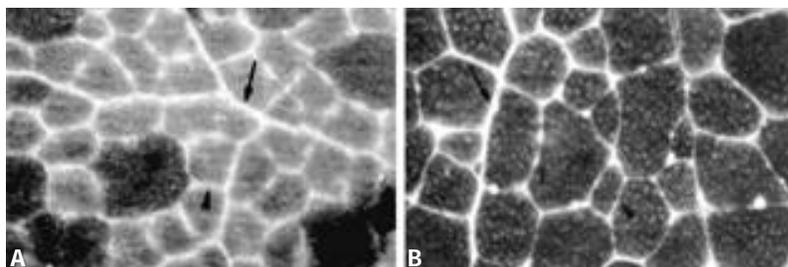


Figura 3 - Microscopia de imunofluorescência de secções transversais dos músculos peitoral e semimembranoso do ganso "Barnacle" selvagem, incubadas com o anticorpo anti-IGF-I. **(A)** Estádio adulto do músculo peitoral (852.9X) e **(B)** semimembranoso (841.7X), mostrando reatividade contornando as fibras (cabeça de seta) e fascículos musculares (seta).

No músculo semimembranoso, as amostras dos estádios de pré-eclosão e eclosão também mostraram baixos níveis de imunorreatividade nas fibras e maior reação no contorno dessas fibras. Durante a primeira semana de vida (Figura 1B), a reação positiva limitou-se ao contorno das fibras musculares, enquanto no músculo peitoral esse arranjo só foi detectado a partir da terceira semana. As amostras do músculo semimembranoso da terceira e quinta semanas (Figura 2D) de desenvolvimento mostraram maior reatividade ao anticorpo, que, no entanto, diminuiu a partir da sétima (Figura 2E) até a décima primeira semana (Figura 2F). Nos adultos, as amostras voltaram a revelar forte reação ao anticorpo contornando as fibras e os fascículos musculares. Foi também observado reconhecimento puntiforme nas fibras, evidenciado principalmente nos exemplares adultos (Figura 3B).

Comparando os músculos peitoral e semimembranoso da população cativa nas quinta (Figura 2A, D) e sétima semanas (Figura 2B, E) de desenvolvimento pós-natal, distinguiu-se reatividade bem evidenciada em volta das fibras e dos fascículos musculares do semimembranoso, mostrando a forma poligonal característica das fibras adultas e, provavelmente, indicando o desenvolvimento precoce desse músculo. Na décima primeira semana de vida pós-natal (Figura 2C, F) esse arranjo é também detectado no músculo peitoral, pois nessa época as fibras de ambos os músculos aparentemente já atingiram o mesmo nível de desenvolvimento. Observação semelhante foi feita nos músculos do ganso selvagem.

DISCUSSÃO

Expressão do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) no músculo peitoral e semimembranoso em duas populações do ganso migratório *Branta leucopsis* Bechstein (Anseriformes, Anatidae) em diferentes fases de desenvolvimento

Nas aves migratórias, os hormônios têm sido apontados como elementos fundamentais para a constituição e resistência ósseo-muscular, por causa de sua presença ativa no metabolismo bioquímico, em resposta ao crescimento acelerado das espécies que estão se preparando para a migração (GOLDSPINK, 1980). Dentre esses hormônios, está o hormônio do crescimento, cujos efeitos só se manifestam através da secreção secundária dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF) (BALLARD *et al.*, 1986).

Apesar das evidências existentes sobre a expressão do IGF, o seu real papel na regulação do desenvolvimento, principalmente em relação às espécies que passam por rápido período de crescimento num curto espaço de tempo, não foi ainda esclarecido.

Neste trabalho, a análise das fotomicrografias revelou reatividade uniforme do anticorpo anti-IGF-I nos músculos peitoral e semimembranoso, embora ela mostre-se mais acentuada no músculo semimembranoso, durante os estádios de desenvolvimento pré-eclosão e neonatal das populações cativa e selvagem. Tal reatividade indica desenvolvimento precoce do músculo semimembranoso, apesar dos estádios de pré-eclosão e eclosão, de ambas as populações, terem mostrado imunorreatividade mais fraca em relação à primeira semana do desenvolvimento pós-natal. Indícios dessa maturação precoce talvez possa ser explicada pelo comportamento nidífugo do ganso "Barnacle" jovem que, 24 horas após o nascimento, abandona o ninho em busca de alimentos (CRAMP & SIMMONS, 1977; OLGIVIE, 1978). Outro fator também relacionado, seria o início da termorregulação, que, nas aves jovens, é feita principalmente a partir da tremulação dos músculos da perna (O'CONNOR, 1984).

A partir da primeira semana, crescente expressão do IGF-I pôde ser observada no músculo semimembranoso, até que, por volta da sétima semana, a reatividade aparentemente passou a se manifestar com menor intensidade. Investigações detalhadas realizadas em outras espécies de aves mostraram a expressão do IGF-I em diferentes fases do desenvolvimento. Por exemplo,

KIKUCHI *et al.* (1991) localizaram o mRNA do IGF-I em embriões de galinha de seis dias e sua forma circulante, nos embriões de nove dias. Sua presença nos músculos da coxa foi detectada a partir do décimo-sétimo dia do desenvolvimento embrionário, atingindo sua expressão máxima no sétimo dia de vida pós-natal, quando então começou a diminuir.

No músculo peitoral das populações migratória e não migratória do ganso "Barnacle", imunorreatividade mais fraca foi também observada nos estádios de pré-eclosão e eclosão, estendendo-se até a primeira semana de desenvolvimento pós-natal. A partir da terceira semana, houve aumento progressivo da reatividade até que na quinta semana, o músculo peitoral, já diferenciado e com seu arranjo poligonal característico, mostrou claramente a reação do IGF-I contornando a fibra muscular. As semanas subseqüentes mantiveram o mesmo padrão de reação e mostraram forte ligação do anticorpo com os epitopos presentes ao redor ou talvez na membrana da célula muscular. Essas observações sugerem intensa participação do IGF-I no desenvolvimento do músculo peitoral, já que, por volta do final da décima-segunda semana, ele tem que estar apto a sustentar vôos prolongados, para realizar a migração.

Além da expressão crescente do IGF-I, outra característica observada foi a reação do anticorpo contornando as fibras ou os feixes de fibras do músculo peitoral e semimembranoso. Questiona-se se essa imunorreatividade está ocorrendo devido ao reconhecimento de epitopos presentes na matriz extracelular ou se o anticorpo estaria ligando-se a epitopos presentes na membrana da célula muscular, a partir da combinação do IGF-I com receptores do tipo-I, ou ainda, se estaria ocorrendo reação inespecífica do anticorpo com elementos da matriz extracelular.

Dados obtidos a partir de estudos realizados em aves mostraram a ampla distribuição e variação relativa de ligação do IGF-I com tecidos de galinha (BASSAS *et al.*, 1985; RALPHS *et al.*, 1990) e peru (McFARLAND *et al.*, 1992) em diversas fases de desenvolvimento. Em galinha, os receptores que reconhecem IGF-I foram detectados em membranas celulares no cérebro, coração, músculo esquelético e fígado em embriões a partir de 2, 3, 3.5 e 8 dias de desenvolvimento, respectivamente. Em perus, foi detectada a ligação do IGF-I com receptores em membranas ce-

lulares no músculo peitoral nos períodos pós-natal e adulto. De acordo com os autores citados, as alterações observadas na ligação IGF-I-receptor durante o desenvolvimento são devidas às alterações no número de receptores presentes na membrana e não na afinidade existente entre eles.

Resultados semelhantes foram obtidos por BEGUINOT *et al.* (1985), ao estudarem a relação receptores versus ligação com IGF-I, IGF-II e insulina em culturas celulares do músculo esquelético da linhagem L6 de camundongo. Durante o processo de diferenciação da linhagem L6, verificou-se que houve queda na ligação do IGF com os receptores, também devido à diminuição no número de receptores e não por alterações na afinidade do receptor.

Considerando a imunorreação detectada nos músculos peitoral e semimembranoso, a especificidade do anticorpo anti-IGF-I foi testada a partir de experimentos que mostraram a ausência de imunorreatividade nas amostras incubadas com esse anticorpo combinado ao IGF-I recombinante humano. Além disso, nas amostras controle, foi detectado apenas fraca reação inespecífica do tecido. Esses dados nos levam a crer que a imunorreatividade detectada nas amostras incubadas com o anticorpo anti-IGF-I não se deve à simples reação inespecífica desse anticorpo com o tecido conjuntivo.

Através da técnica de imunocitoquímica, não foi possível identificar características relacionadas à reatividade ao anticorpo anti-IGF-I que distinguíssem as populações migratória e não-migratória do ganso "Barnacle". Foi possível demonstrar que o anti-IGF-I liga-se especificamente às amostras dos músculos peitoral e semimembranoso de ambas as populações. Foi também mostrado que existem padrões distintos de distribuição da imunorreatividade entre as fases de pré-eclosão, neonatal, jovem e adulta e entre os músculos peitoral e semimembranoso.

Em conclusão, pelo uso da técnica de imunocitoquímica, não foi possível evidenciar alterações que diferenciasssem o desenvolvimento dos músculos peitoral e semimembranoso de gansos "Barnacle" selvagens e mantidos em cativeiro. Pode-se, portanto, inferir que as aves dessa espécie, mesmo mantida em cativeiro, apresentam-se, pelos parâmetros analisados, potencialmente aptas à migração.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e à Fundação Rotária Internacional pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Rita de
Cássia da
S. e Sá/
Gérmán A.B.
Mahecha/
Alicia El Haj/
Pat J. Butler

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSAS, L.; F. DE PABLO; M.A. LESNIAK & J. ROTH. 1985. Ontogeny of receptors for insulin-like peptides in chick embryo tissues: early dominance of insulin-like growth factor over insulin receptors in brain. **Endocrinology** **117**(6): 2321-2329.
- BALLARD, F.J.; L.C. READ; G.L. FRANCIS; C.J. BAGLEY & J.C. WALLACE. 1986. Binding properties and biological potencies of insulin-like growth factors in L6 myoblasts. **Biochem. Jour.** **233**: 223-230.
- BEGUINOT, F.; C.R. KAHN; A.C. MOSES & R.J. SMITH. 1985. Distinct biologically active receptors for insulin, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor II in cultered muscle cells. **Jour. Biol. Chem.** **260**(29): 15892-15898.
- CRAMP, S. & K.E.L. SIMMONS. 1977. Ostrich to ducks, p. 430-435. *In*: S. CRAMP & K.E.L. SIMMONS. (eds.). **Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. The birds of the Western Palearctic.** Oxford, Oxford University Press, I + 722p.
- FLORINI, J.R. 1987. Hormonal control of muscle growth. **Muscle & Nerve** **7**: 577-598.
- FLORINI, J.R.; D.Z. EWTON & K.A. MAGRI. 1991. Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. **Annu. Rev. Physiol.** **53**: 201-216.
- GODDARD, C. & J.M. BOSWELL. 1991. Molecular biology and the growth of poultry. **Crit. Rev. Poultry Biol.** **3**: 325-340.
- GOLDSPINK, G. 1980. Growth of muscle, p. 19-35. *In*: D.F. GOLDSPINK (ed.). **Development and specialization of skeletal muscle.** Cambridge, Cambridge University Press, 155p.

Rev. bras. de
Zootécias
Juiz de Fora
V. 2 N° 2
Dez/2000
p. 7-19

- KIKUCHI, K.; F.C. BUONOMO; Y. KAJIMOTO & P. ROTWEIN. 1991. Expression of insulin-like growth factor-I during chicken development. **Endocrinology** **128**(3): 1323-1328.
- McFARLAND, D.C.; N.H. FERRIN; K.K. GILKERSON & J.E. PESALL. 1992. Tissue distribution of insulin-like growth factor receptors in the turkey. **Comp. Biochem. Physiol.** **103**: 601-607.
- MOLONEY, A.P.; D.H. BEERMANN; D. GERRARD; T.F. ROBINSON & K.D. FINNERTY. 1998. Temporal change in skeletal muscle IGF-I mRNA abundance and nitrogen metabolism responses to abomasal casein infusion in steers. **Jour. Anim. Sci.** **76**(5): 1380-1388.
- O'CONNOR, R.J. 1984. Growth and development, p. 71-94. *In*: R.J. O'CONNOR (ed.). **The growth and development of birds**. New York, John Wiley & Sons, 315p.
- OGILVIE, M.A. 1978. **Wild geese**. Berkhamsted, T & A. D. Poyser, 350p.
- OWEN, M. & J.M. BLACK. 1989. Factors affecting the survival of Barnacle geese on migrating from the breeding grounds. **Jour. An. Ecol.** **58**: 603-617.
- DE PABLO, F.; J. SERRANO; M. GIRBAU; J. ALEMANY; L. SCAVO & M.A. LESNIAK. 1990. Insulin and insulin-like growth factor action in the chick embryo: from biology to molecular endocrinology. **Jour. Exper. Zool. Suppl.** **4**: 187-191.
- PERRONE, C.E.; D. FENWICK-SMITH & H.H. VANDENBURGH. 1995. Collagen and stretch modulate autocrine secretion of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins from differentiated skeletal muscle cells. **Jour. Biol. Chem.** **270**(5): 2099-2106.
- RALPHS, J.R.; J. WYLIE & D.J. HILL. 1990. Distribution of insulin-like growth factor peptides in the developing chick embryo. **Development** **190**: 51-58.
- SCANES, C.G.; C. ARAMBURD & R.M. CAMPBELL. 1990. Hormonal involvement in avian growth and development: growth hormone and insulin-like growth factor I, p. 93-110. *In*: M. WADA; S. ISHII & C.G. SCANES (eds.). **Endocrinology of Birds: Molecular to behavioural**. Tokyo, Japan Scientific Press, 320p.
- SERRANO, J.; A.R. SHULDINER; C.T. ROBERTS; D. LEROITH

- & F. DE PABLO. 1990. The insulin-like growth factor I (IGF-I) gene is expressed in chick embryos during early organogenesis. **Endocrinology** **127**: 1547-1549.
- TOLLEFSEN, S.E.; R. LAJARA, R.H. McCUSKER; D.R. CLEMMONS & P. ROTWEIN. 1989a. Insulin-like growth factors (IGF) in muscle development. **J. Biol. Chem.** **264**: 13810-13817.
- TOLLEFSEN, S.E.; I.L. SADOW & P. ROTWEIN 1989b. Coordinate expression of insulin-like growth factor II and its receptor during muscle differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **86**: 1543-1547.
- DE VROEDE, M.A.; J.A. ROMANUS; M.L. STANDAERT; R.J. POLLET; S.P. NISSLEY & M.M. RECHLER. 1984. Interaction of insulin-like growth factors with a non fusing mouse cell line: binding, action and receptor down-regulation. **Endocrinology** **114**: 1917-1929.