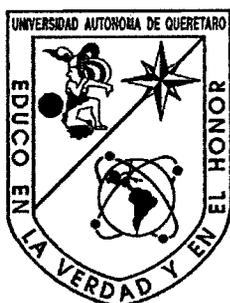


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO



**DISTRIBUCIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN EL
TESTÍCULO DE POLLO**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

BERNARDO DOMÍNGUEZ SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

**Dra. Maricela Luna Muñoz
Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos**

**CENTRO UNIVERSITARIO
QUERETARO. QRO. - MEXICO
2004**

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H 30281 :

No. Título _____

Clas T5

573.44

D 671d

Esta tesis fue realizada en el laboratorio "Bioquímica de Hormonas" del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Querétaro, del 2001 al 2003. La tesis se llevó a cabo con ayuda de becas otorgadas por CONACYT 41218Q y por PAPIIT IN 226002, así como por la donación de pollos por parte de Pilgrim's Pride de México.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maricela Luna Muñoz, por su amistad, apoyo y paciencia

*Por sus aportaciones y valiosos comentarios
a los miembros del jurado:*

**Dra. Maricela Luna Muñoz
Dr. Carlos Arámburo de la Hoz
Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
M. en C. Laura Cristina Berumen Segura
M. en C. Martha Carranza Salas**

*Por ser parte de mi vida y por su apoyo
incondicional, a:*
Biol. Yessica Rico Mancebo del Castillo

*Por su ayuda en el desarrollo
de esta tesis, a:*

Maricela	Yessica
Laura	Hilda
Martha	Gerardo
Carlos	Salvador
Adriana	Maricelita

Por el apoyo económico, a:
**CONACYT
PAPIIT**

Por la donación de animales, a:
Pilgrim's Pride de México

*Por aligerarme la vida y darme ánimos durante el desarrollo de esta
tesis, a mi familia y amigos:*

Mi Mamá	Mi Papá	Agustín	Luz
Armando	Yessica	Esperanza	Mónica
Carlos Sosa	Joel	Marco	Juan Malda
Robert	Francisco	Héctor	Mario L.
Omar	Cedric	Alfonso	Maricela
Salvador	Maricelita	Gerardo	Hilda
Laura	Martha	Adriana	Lourdes
Pavel	Clara	Carlos	Felipe

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	5
 Hormona de crecimiento (GH)	5
Efectos de la GH	6
Estructura	9
Variantes moleculares	12
Mecanismo de acción de la GH	19
Síntesis y secreción de la GH	21
GH extrahipofisiaria	24
GH y aparato reproductor de macho	26
Reproducción de las aves	26
Acciones testiculares de la GH	29
Justificación	32
Hipótesis	32
Objetivos	33
Diseño Experimental	34
Materiales y métodos	
Material biológico	35
Dispersión y cultivo primario de células de testículo	35
Inmunocitoquímica	37
Inmunohistoquímica	38
Efecto de GHRH en cultivos primarios de células testiculares	39
Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	40
Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	40
Inmunoelectrotransferencia (Western-Blot)	41
Resultados	43
Discusión	59
Conclusiones	66
Bibliografía	67
Anexos	
Anexo 1 Cuantificación de proteínas	79
Anexo 2 Electroforesis	81
Anexo 3 Inmunoelectrotransferencia (Western-Blot)	86
Anexo 4 Quimioluminiscencia	88
Anexo 5 Cultivo celular	91
Anexo 6 Tratamiento con secretagogo (GHRH)	92
Anexo 7 Inmunocitoquímica	93
Anexo 8 Preparación de extractos de células testiculares	93

RESUMEN

La hormona de Crecimiento (GH) y su ARNm han sido detectados en tejidos extrahipofisarios (sistema nervioso central, sistema inmunológico y aparato reproductor) en diversas especies de vertebrados. En el aparato reproductor de pollos machos, estudios previos han mostrado que la GH y su mensajero se expresan diferencialmente a lo largo de la ontogenia. Por otra parte, se ha determinado que esta proteína muestra una heterogeneidad molecular en el testículo al igual que en la hipófisis. Además, se sabe que la GH interviene en procesos de diferenciación, desarrollo y maduración del testículo, sin embargo aún no se sabe en que estirpe celular de este tejido se expresa esta proteína por lo tanto en este trabajo se estudió mediante inmunocitoquímica la presencia de la GH en testículos de pollos de diferentes edades. En cultivos primarios de células testiculares se determinó la presencia de GH y sus variantes moleculares utilizando inmunocitoquímica y SDS-PAGE-Western-Blot respectivamente. Se utilizaron testículos de pollos de 9, 15 y 25 semanas de edad. Para determinar la presencia de la cGH se utilizaron dos anticuerpos policlonales. Los resultados mostraron que las células inmunopositivas fueron principalmente las germinales (espermatoцитos secundarios y espermátides), intersticiales (Leydig) y musculares (mioídes) en testículos de 15 y 25 semanas con ambos antisueros. Los datos del cultivo primario mostraron que las células inmunopositivas fueron las mismas a las observadas en el tejido completo. Se detectaron variantes moleculares de peso molecular de 17, 26, 32, 35, 40, 45 y 52 kDa en el testículo y en las células en cultivo, sin embargo, se observaron diferencias en la proporción relativa analizada mediante densitometría. En el caso de las células en cultivo, estas mostraron una mayor proporción en las formas de alto peso molecular a diferencia del testículo en donde la variante más abundante fue un fragmento de 17 kDa. Esto podría señalar que el procesamiento proteolítico de la GH para generar este fragmento en el testículo podría estar regulado por una influencia parácrina asociada a la citoestructura del tejido.

INTRODUCCIÓN

Los organismos multicelulares son sistemas organizados en los que los grupos de células constituidos como órganos o tejidos se han especializado en determinadas funciones. La base de dicha especialización es que esas células presentan una intercomunicación eficiente, misma que se ve afectada por los cambios en su medio ambiente. Dicha comunicación se da por dos vías principalmente, la eléctrica y la química. En la comunicación química se encuentra tradicionalmente la vía endocrina, en la que de manera general la célula blanco se encuentra a una distancia considerable, y el mensajero llamado hormona viaja a través del sistema circulatorio para llegar a su sitio de acción. Mientras que en la comunicación eléctrica el mensajero es un impulso de naturaleza eléctrica, el cual es conducido a través del sistema nervioso.

En varias especies de animales, los sistemas endocrino y nervioso trabajan juntos, regulando el entorno interno del organismo, manteniéndolo en un estado de homeostasis. Tanto el sistema endocrino como el nervioso actúan mediante la liberación de mensajeros químicos que permiten que las células que se encuentran en las diferentes partes del organismo coordinen sus actividades, uno de los principales mensajeros químicos es la hormona de crecimiento (GH), la cual exhibe una amplia gama de funciones entre las que destacan el crecimiento y desarrollo del organismo, entre muchas otras. (Debuse, 1998; Goffin y col., 1996; Tresguerres, 1992).

HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

La GH es una hormona de naturaleza polipeptídica, que pertenece a una familia de hormonas que se producen principalmente en la glándula hipófisis de todos los vertebrados estudiados hasta el momento y por la placenta de los mamíferos, aunque recientemente se ha encontrado que una proteína semejante a la GH se sintetiza en otros tejidos extrahipofisarios (Harvey y col., 1995), incluso en

algunos que se consideraban órganos blanco. La GH pertenece a una familia de proteínas que están relacionadas estructuralmente y que presentan gran diversidad de funciones. La familia está constituida por la GH, la prolactina (PRL), el lactógeno placentario (PL) en roedores y ungulados o somatotropina coriónica humana (CS) en primates, la somatolactina (SL), la proliferina (PLF), las proteínas relacionadas (bovino) o parecidas (rata) a la prolactina (PRL), las proteínas vinculadas con la proliferina y las relacionadas con la GH (Rand-Weaver y col., 1993).

Además de los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de los organismos, la GH interviene también en el metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y minerales. Además exhibe actividad sobre la proliferación y diferenciación celular, estos efectos pueden ser directos sobre las células blanco o mediados por otros mensajeros regulados por esta hormona como en el caso del factor de crecimiento insulinoide tipo I o IGF-I (Harvey y col., 1995).

La biosíntesis de esta hormona está regulada por factores que ejercen un control tanto estimulador como inhibitorio y están relacionados con estados fisiológicos como la edad, el sexo y la etapa reproductora, entre otros. Los estudios referentes a su síntesis, secreción y funciones han sido llevados a cabo en algunas especies de mamíferos, sin embargo, es necesario llevar a cabo investigaciones de dicha hormona en varios grupos de organismos. En el caso de las aves, y más específicamente el pollo, esta especie representa un modelo experimental en el que se pueden analizar procesos fisiológicos a corto plazo, tales como el crecimiento y el desarrollo. Aunado a lo anterior, el pollo posee un alto valor comercial por ser una fuente de proteína animal utilizada en el consumo humano.

EFFECTOS DE LA GH

La diversidad funcional de la hormona de crecimiento es muy amplia y puede ser explicada en parte por la heterogeneidad molecular que esta presenta. Así, se han descrito efectos metabólicos directos que facilitan el crecimiento muscular y la

conservación de la glucosa, y efectos sobre el crecimiento esquelético que son parcialmente directos y parcialmente mediados por el factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I). Entre los primeros efectos se incluyen: la estimulación de la lipólisis, captura y transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas, inhibición de la lipólisis estimulada por adrenalina o por glucagon, inhibición de la lipogénesis inducida por la insulina, inducción de la resistencia periférica a la insulina (efecto diabético) y participación en la regulación de la absorción tubular de algunos iones. Además, estimula el crecimiento lineal del esqueleto participando en la diferenciación de los precondrocitos, y promueve la diferenciación de preadipocitos, mioblastos y posiblemente de gran variedad de tejidos, incluyendo la placa cartilaginosa de la epífisis (Arámburo y col.,1993) . En la tabla 1 se enlistan los efectos que se le han atribuido a esta hormona.

Tabla 1. Funciones conocidas de la hormona de crecimiento

Efectos	Referencias
Crecimiento corporal directo e indirecto	Scanes C.G 1995 (a)
Liberación de IGF-I	Scanes C.G 1995 (a)
Mitogénesis en osteoblastos	Scanes C.G 1986
Adipogénesis (diferenciación)	Scanes C.G 1995 (b)
Angiogénesis	Gould, J. 1995
Diabético	Scanes C.G 1995 (c)
Mantenimiento de la población celular en tejido linfático	Scanes C.G 1995 (d)
Estimulación del transporte de glucosa	Scanes C.G 1995(c)
Lipólisis	Arámburo, C. 1989 (a)
Antilipolítico inducido por glucagon	Arámburo, C. 1989 (a)
Antilipogénico	Scanes C.G 1995 (b)

Transporte de aminoácidos y síntesis de proteínas en músculo.	Scanes C.G 1995 (e) Lombardi, G. 1997
Modulación en la función reproductiva y maduración sexual	Scanes C.G 1995 (f)
Osmorregulación	Scanes C.G 1995 (g)
Estimulador en la liberación de insulina	Scanes C.G 1995 (h)
Influencia en la tasa de producción de T3 circulante (inhibición de la actividad de la 5-D-III hepática en pollos)	Scanes C.G 1995 (h) Darras, V. M. 1993 Arámburo, C. 2001
Efecto neuroendocrino (autorregulación a través del hipotálamo)	Harvey, S. 1995 (a)
Neuromodulador y proliferación de neuronas y células gliales	Harvey, S. 1995 (b)

Actualmente se sabe bien que la GH está involucrada de manera integral en el mantenimiento, control y modulación del sistema inmunológico de mamíferos (Scanes,1995).

Deficiencias en la secreción de GH, ya sea por causas genéticas (enanismo), fisiológicas (envejecimiento) y experimentales (hipofisectomía), han sido asociadas en mayor o menor manera con deficiencias en la función inmunológica (Hull y Harvey,1997b). Las acciones que se le han atribuido a la GH pueden ser realizadas por ella misma o también a través del IGF-I, que ha sido propuesto como el principal mediador en varios órganos blanco (Rechler y Nissley, 1990 ; Baxter y col., 1991)

ESTRUCTURA

La GH se sintetiza como una prehormona constituida por 225 residuos de aminoácidos, mientras que la forma madura se compone de una cadena de aproximadamente 191 aminoácidos (dependiendo de la especie); su estructura primaria presenta dos asas, una grande central y una pequeña próxima al extremo carboxilo terminal, las dos están formadas por puentes disulfuro localizados en los residuos 57-165 y 182-189 (Figura 1). La forma que se presenta en mayor cantidad en la mayoría de las especies tiene un peso molecular de entre 21 y 22 kiloDaltones (kDa). Su estructura tridimensional obtenida por cristalografía de rayos X de las GH porcina y la humana, (Goffin y col., 1996), está constituida en 50% por α -hélices distribuidas en 4 α -hélices antiparalelas que se ubican en los segmentos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183, cada una tiene diferente carácter hidrofóbico, la número 4 es la más hidrofóbica de todas (Abdel-Meguid y col., 1987; Scanes, 1995). Estos segmentos contienen 4 dominios (A_{GH} , B_{GH} , C_{GH} y D_{GH}) altamente conservados en la escala filogenética, siendo el segmento 164-187 el más conservado. Los cuatro dominios se han identificado en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha y corresponden a las posiciones 13-33, 54-94, 113-132 y 157-187, y se encuentran separados por dominios variables o deleciones. Los dominios A_{GH} , B_{GH} y C_{GH} corresponden a α -hélices con un arreglo hacia el exterior de la molécula de GH, mientras que el dominio D_{GH} se encuentra localizado en el interior de la molécula. Este arreglo se ha observado en todas las GHs estudiadas hasta ahora (Chen y col., 1995 ; Scanes, 1995).

En el caso de las aves, se conoce la estructura primaria de la proteína y del ARNm que la codifica específicamente en el pollo, pavo y pato; estas son casi homólogas con una diferencia de solo 3 aminoácidos sustituidos y una deleción en la secuencia en el caso de la del pato comparada con la de pollo (Chen y col., 1988; Hull y col., 1997a).

En el pollo la GH representa aproximadamente el 10% de la proteína hipofisaria total (Sturkie, 1986), la prehormona presenta 216 aminoácidos y la hormona

madura se constituye de 191 aminoácidos. Los puentes disulfuro están formados por cisteínas localizadas en las posiciones 53-164 y 181-189. El peso molecular aproximado de la forma mayoritaria es de 22kDa y su punto isoeléctrico (pI) oscila entre 6 y 8 (Arámburo y col.,1993; Hull y col.,1997a) .

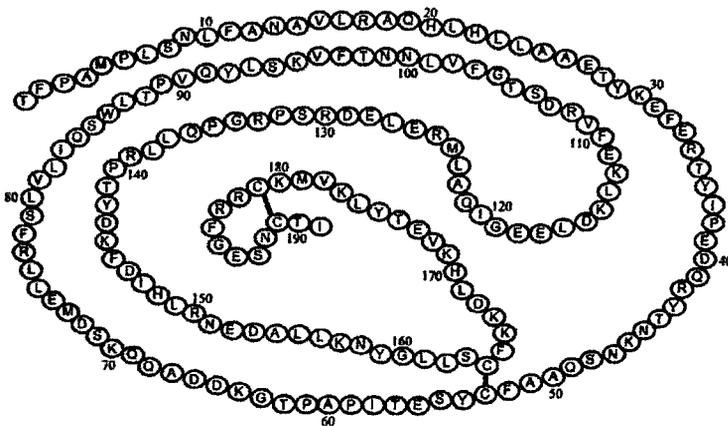


Figura 1. Estructura Primaria de la cGH

La GH presenta dos sitios de unión a su receptor. El sitio 1 está constituido por la región que va del centro hacia el extremo carboxilo de la hélice 4, los residuos 54-74 de un asa y parte de la hélice 1. El sitio 2 se une a un sitio con menor afinidad e incluye la parte del extremo amino terminal de la hélice 1, la hélice 3 y los residuos 12, 16 y 19 (ver Fig. 2) (Cunningham y col., 1991). La dimerización del receptor es aparentemente indispensable para iniciar la actividad de la transducción de la señal intracelular, y este mecanismo de unión sucede cuando la GH se une tanto a los receptores somatogénicos como a los lactogénicos (Goffin y col.,1996).

Hay evidencia sobre la importancia de la hélice 3 en la actividad biológica de la GH. El segmento anfifílico entre los residuos 109-126 contienen una glicina (Gly) en la posición 119, que está conservada en todos los vertebrados y es

determinante en algunos de los efectos estudiados de la GH como: secreción del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) hepático, el efecto tipo insulina y la lipólisis (Scanes,1995; Chen y col., 1995).

Además, en estudios con ratones transgénicos en los que se expresa una mutante de la GH bovina con las sustituciones de aminoácidos Glu-117 por leucina, Gly-119 por arginina y alanina-122 por aspartato, muestran una disminución en el crecimiento y las concentraciones de IGF-I circulante, lo que sugiere que este análogo de la GH actúa como un antagonista de la hormona (Scanes, 1995), (Kopchick y col., 1999).

Al parecer la participación de la Gly-119 consiste en mantener una hendidura entre la hélice 1 y 3 después de la interacción con la primera molécula de receptor y permitir así la interacción con la segunda molécula de receptor (Goffin y col.,1996).

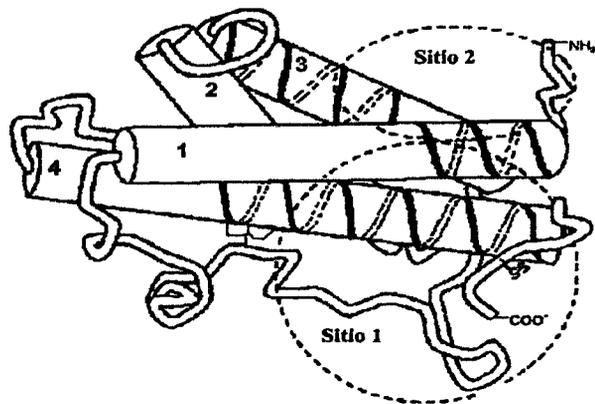


Figura 2. Sitios de unión al receptor de la GH

VARIANTES MOLECULARES

La GH está constituida por una familia de proteínas homólogas pero no idénticas entre sí (Arámburo y col.,1993; Houston y Goddard, 1988). Este patrón de

variación estructural ha sido descrito en mamíferos (Hart y col., 1984; Lewis, 1984), aves (Arámburo y col., 1989a,1989b; Berghman y col., 1987; Houston y Goddard, 1988), reptiles (Yasuda y col., 1989), anfibios (Martens y col., 1989) y peces (Kawauchi y col.,1986), y se ha postulado que puede contribuir a la diversidad funcional de la hormona.

Existen varios experimentos que señalan su importancia funcional. Se han descrito algunos de los mecanismos por los cuales se sintetizan ciertas variantes y se ha observado que estas son secretadas en diferentes proporciones dependiendo del estado fisiológico del animal. Además existen algunos datos sobre su actividad biológica y se conocen ejemplos de especificidad de funciones o de la diferente potencia de sus efectos (Scanes, 1995), (Arámburo y col., 2001).

Se ha determinado que la fuente de la heterogeneidad molecular de la GH puede estar relacionada con:

Multiplicidad génica: Durante mucho tiempo se pensó que solamente existía un gen que codificaba para la GH en todos los vertebrados. Sin embargo, a la fecha se han identificado dos genes en los humanos que codifican para dos GH muy similares. Al primero se le denomina normal (hGH-N) y se expresa en la hipófisis; al segundo se le llama variable o hGH-V y se expresa en el sincitiotrofoblasto de la placenta y en el testículo (Frankenne y col., 1987; Liebhaber y col., 1989; Untergasser y col., 1998). La proteína resultante de la expresión del hGH-V difiere de la hGH-N por 13 aminoácidos y presentan un 92% de homología. Está constituida por 191 aminoácidos, su peso molecular es de aproximadamente 22kDa, es más básico que la proteína codificada por hGH-N, se encuentra glicosilada y tiene un sitio único de glicosilación tipo N, se une a los receptores de PRL y a los de GH y se ha observado que es biológicamente activa (Hennen y col.,1988; Ray y col., 1989; Baumann y col., 1991). También en la hipófisis de humanos se ha encontrado un péptido glicosilado de 12 kDa relacionado con la

GH y por su secuencia se piensa que es producto de un gen diferente al de la hGH-N y la hGH-V (Díaz y col., 1993).

En algunos peces óseos (esturión, salmón y anguila) (Kawauchi y col., 1986, Yasuda y col., 1992; Yamaguchi y col., 1987) y anfibios (rana) (Martens y col., 1989) se han identificado dos genes que codifican para la GH y son expresados en la hipófisis. La estructura primaria de los productos de ambos genes es muy similar a la GH de otros vertebrados y se conocen como GH-I y GH-II. En los esturiones, ambas contienen 190 residuos de aminoácidos, dos puentes disulfuro en los residuos 52-163 y 180-188, difieren entre sí por 3 aminoácidos y al comparar la secuencia con otros vertebrados presentan mayor homología con los tetrápodos (63-76%) que con los teleósteos (salmón y anguilas entre otros) (42-63%) (Yasuda y col., 1992).

Sin embargo, en aves, específicamente en el pollo, solamente se ha determinado un gen que codifica para la GH (Tanaka y col., 1992).

Procesamiento diferencial del ARN mensajero: Se han identificado diferentes RNA mensajeros (ARNm) producto del gen de GH tanto en roedores como en humanos. El gen de la hGH-N produce tres ARNm y las proteínas resultantes son las hGH de 22 kDa con 191 residuos de aminoácidos; una de 20 kDa, que presenta una delección en el exón 3 de 45 nucleótidos y de 15 aminoácidos correspondientes al segmento 32-46 de la secuencia y representa del 5 al 10 % del monómero sintetizado en la hipófisis; y finalmente una variante de 17.5 kDa (Lewis y col., 1978, 1992, 2000; Masuda y col., 1988; Palmetshofer y col., 1995). La forma de 20 kDa también se ha identificado en roedores y una variante de 17.5 kDa en la hipófisis (Sinha y Gilligan, 1984; Lecomte y col., 1987).

Se presentan además otras formas moleculares de la GH, las cuales son identificadas como producto de la hGH-V: un ARNm con 800pb que produce una proteína de 22 kDa, otro de 1250pb que mantiene el intrón D (hGH-V2), aunque no

se ha identificado la proteína, podría codificar para una proteína de 230 aminoácidos, y otro más reconocido en el testículo que mantiene también parte del intrón D y codifica para una posible proteína de 25kDa con 219 aminoácidos, la cual pierde el sitio de glicosilación presente en la hGH-V en los residuos Asn₁₄₀ y adquiere otro en la posición 148, a esta forma molecular se le conoce como GH-Vdelta4 (Ray y col.,1989; Untergasser y col., 1998).

Modificaciones Postraduccionales: Las modificaciones postraduccionales de la GH que se han identificado incluyen: la agregación u oligomerización, desamidación, proteólisis con o sin reducción, glicosilación, fosforilación y acetilación. Hasta ahora todas las formas moleculares de la GH que se han descrito en aves parecen derivar de modificaciones postraduccionales y existen evidencias suficientes de que existe una serie de variantes de masa tanto en la adenohipófisis (Arámburo et al.,1990; Houston y Goddard, 1988) como en el plasma (Montiel y col., 1992).

En la glándula de todas las especies estudiadas, el análisis mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras revela que predomina la forma monomérica de la hormona (22 kDa) (Arámburo y col.,1990; Baumann y col., 1991). Sin embargo, las formas dimericas y otros oligómeros pueden representar el 40% de la GH secretada al plasma en humanos. La degradación de los dímeros de las formas 22 kDa y 20 kDa es más lenta (5 y 2 veces menor) que la de sus respectivos monómeros. Por esta razón es comprensible que la proporción de oligómeros sea mucho más elevada en el plasma que en la hipófisis (Baumann y col., 1986). Se piensa que los dímeros de GH identificados en mamíferos y aves se unen por puentes disulfuro intercatenarios o por uniones no covalentes; sin embargo, aunque no se conoce la naturaleza de la unión, se ha observado en pollos y humanos la presencia de dímeros posiblemente unidos covalentemente (Arámburo C y Scanes CG datos no publicados). Cuando la electroforesis se hace en condiciones reductoras desaparece la mayor parte de las formas de alto peso molecular, se incrementa la

proporción del monómero y permanece una pequeña cantidad de dímero resistente a la reducción.

Además, se han encontrado variantes de masa que probablemente sean producto de un proceso proteolítico: una forma de 25kDa observada en condiciones no reductoras y un fragmento de 15 kDa observada en condiciones reductoras en pollo (Arámburo y col.,1993). La presencia de la variante de 25 kDa que posiblemente sea producto de un procesamiento proteolítico sugiere una forma cortada de dos cadenas. Esta forma, al analizarse en condiciones reductoras desaparece e incrementa la proporción del fragmento de 15 kDa. Por estudios *in vitro*, se ha sugerido que enzimas del tipo de la trombina y/o colagenasa podrían estar involucradas en la generación de la cGH cortada *in vivo* (Arámburo y col., 1991; 1993, 2001).

La GH glicosilada se ha identificado en la hipófisis y en el plasma de varias especies de mamíferos, en algunos peces óseos, en el tiburón y en el pollo (Sinha y col., 1987; Berghman y col., 1987; Arámburo y col., 1991; Montiel y col., 1992). Esta forma glicosilada en humanos, representa aproximadamente el 1% de la hGH-N total (Scanes, 1995). Sin embargo existen evidencias –en humanos y ratas- de que la tasa de glicosilación de la GH hipofisaria cambia en algunas situaciones fisiológicas relacionadas con la etapa reproductiva y el desarrollo fetal (Sinha y col., 1987; 1990a, 1990b). Por otra parte, la hGH-V presenta un sitio de glicosilación potencial tipo N codificado por el exón 5 en la región comprendida entre los residuos Asn₁₄₀-Gln₁₄₁-Thr₁₄₂ de su secuencia. La expresión de esta proteína se ha demostrado en experimentos utilizando fibroblastos de ratón C127 transfectados con el gen de la hGH-V en los que se observó que se expresan dos proteínas glicosiladas (24 y 26 kDa) además de la forma monomérica de 22 kDa (Ray y col., 1989).

Otra forma encontrada en la hipófisis de humanos es la variante de 12 kDa que también contiene en su secuencia un sitio consenso N de unión a carbohidratos (

Díaz y col., 1993). Aunque son escasos los reportes sobre la forma glicosilada de la GH de vertebrados no mamíferos, estos sitios de glicosilación potencial se pueden observar en la región Asn₁₈₈-Cys₁₈₉-Thr₁₉₀ en la mayoría de las secuencias de las GHs de aves, reptiles, anfibios y peces estudiadas, así como en la región Asn₄₆-Lys₄₇-Thr₄₈ en el caso del tiburón. Sin embargo, se ha identificado una forma glicosilada de 24 kDa de la hGH-N que no contiene ese sitio consenso, por lo que cabe la posibilidad que en los mamíferos una parte de la GH hipofisaria se encuentre asociada a carbohidratos a través de uniones de tipo O (Haro y col., 1996).

En el pollo se identificó una forma glicosilada de la GH (G-cGH) que tiene un peso molecular aparente de 29kDa en condiciones reductoras, cuando esta forma molecular se analizó con diferentes criterios electroforéticos se mostró que presenta heterogeneidad molecular, encontrándose seis variantes glicosiladas con puntos isoeléctricos (PI) de 6.52, 6.7 y 7.17 en las tres formas predominantes y todas ellas con un PM de 29 kDa. Esta forma se ha medido en el plasma y muestra variaciones de acuerdo con la etapa reproductiva (Arámburo y col., 1991).

Adicionalmente, cuando se analizó la GH de pollo (cGH) por electroforesis no desnaturizante, se identificaron tres variantes de carga (0.23, 0.3 y 0.35) (Arámburo y col., 1989a). Cuando se incrementa la resolución utilizando isoelectroenfoque y Western-blot es posible identificar de ocho a diez variantes de carga (Arámburo y col., 1990; Houston, 1988), algunas de las cuales parecen estar reguladas durante el desarrollo de estos animales (Arámburo y col., 2000; Houston y Goddard, 1988).

Otra modificación postraducciona que contribuye a la heterogeneidad de carga en una proteína es la fosforilación, la cual le confiere características más ácidas a la molécula (Arámburo y col., 1993). Existen evidencias sobre la existencia de formas fosforiladas de la GH en humanos, ratas, ovinos y pollos. Se ha observado que la GH humana puede ser fosforilada por tirosina cinasas en los residuos Tyr₂₈ ó 35 y

Tyr₄₂ (Baldwin y col.,1983) . En el pollo una proporción significativa de la hormona parece estar fosforilada (Arámburo y col., 1989a), y las células de la hipófisis del pollo en cultivo primario pueden incorporar fosfato radioactivo a la banda inmunorreactiva a cGH cuya liberación es estimulada por la hormona liberadora de GH (GHRH) (Arámburo y col., 1990b). Además, estudios *in vitro* muestran que la hormona también puede ser fosforilada por las cinasas de proteínas A y C (Arámburo y col., 1990). En el salmón la incubación de la hormona con fosfatasa alcalina resulta en un cambio de carga, lo que sugiere la presencia de GH fosforilada (Skibeli y col.,1990).

Aunque se propone que la variante de 20 kDa presenta menor afinidad por el sitio 1 de unión al receptor que el monómero de 22kDa (Wada y col., 1998), la afinidad por el sitio 2 es mayor por lo que se considera que son igualmente efectivas en estudios realizados por proteínas de unión (Uchida y col., 1999) . Esto es consistente con el hallazgo de afinidades equivalentes para ambas formas moleculares de la GH utilizando células de ovario de hámster (CHO) transfectadas con el receptor para la hGH (Wada y col., 1998) o incluso una mayor potencia para la variante de 20 kDa en experimentos *in vitro* con células Ba/F3-hGHR en las que se midió la expresión del ARNm del IGF-I (Yoshizato y col., 2000).

En cuanto a sus efectos somatogénicos existen algunas contradicciones. En estudios en ratas hipofisectomizadas parece ser menos activa que la forma de 22 kDa (Kostyo y col., 1987); sin embargo en ratas con enanismo espontáneo y normales tratadas con ambas formas moleculares no se observan diferencias significativas en la ganancia de peso (Ishikawa y col., 2000). Además en un estudio *in vitro* utilizando células tumorales de glándula mamaria (T-47D) se observó que la variante de 20 kDa y la de 22 kDa demostraron efectos contrarios sobre la proliferación celular y síntesis de DNA (Fujikawa y col., 1998). Reportes sobre los efectos metabólicos de la GH de 20 kDa muestran que presenta efectos diabéticos, tipo insulina y lipolíticos en ratones *in vitro*, utilizando la línea celular de adipocitos 3T3-1-hGHR, en la que se observó que la estimulación es mayor

que con la GH de 22 kDa y que es un efecto dependiente de la expresión de genes posiblemente a través de la activación de la vía de las proteínas STAT (Asada y col., 2000).

Se ha identificado que algunos fragmentos de la GH humana que contienen el extremo amino terminal poseen efecto hipoglucemiante, incrementando el efecto de la insulina, a diferencia del fragmento 172-191 de GH humana, que tiene un efecto hiperglucemiante y antilipogénico (Scanes, 1995).

La hGH-V es secretada a la circulación durante la gestación. En bioensayos sobre ganancia de peso en ratas hipofisectomizadas se ha observado que presenta la misma actividad que la hGH-N (McLeod y col., 1991), y se sugiere que pueden unirse con la misma afinidad a los receptores somatotrópicos porque las diferencias entre sus secuencias no afectan a los sitios de unión, por lo tanto la interacción se lleva a cabo utilizando el mismo mecanismo molecular (Goffin y col., 1996). Esta variante también se une a receptores de PRL y en algunos bioensayos se ha determinado su actividad mitogénica en células Nb2. Sin embargo, sus efectos metabólicos parecen ser equivalentes de acuerdo con estudios *in vitro* sobre la oxidación de glucosa y la lipólisis en tejido adiposo de rata (Nickel y col., 1990; Mc Leod y col., 1991; Goodman y col., 1991). Se piensa que es la responsable en parte de los efectos anabólicos y somatotrópicos en la unidad feto-placentaria y en el anabolismo materno de la segunda mitad de la gestación de la mujer (Hennen y Frankenne, 1987).

En el pollo, al menos dos variantes de carga ($R_f = 0.23$ y 0.3) presentan diferente bioactividad en el metabolismo de lípidos: la 0.23 es esencialmente lipolítica mientras que la 0.3, manifiesta una actividad antilipolítica (Arámburo y col., 1989a; 1993); sin embargo, ambas presentan actividad somatotrópica equivalente (Arámburo y col., 1993). También se ha identificado una variante de masa de 15 kDa, que corresponde a la porción amino-terminal de la secuencia. Este fragmento ha mostrado actividad biológica en un ensayo de angiogénesis en células

endoteliales de cerebro bovino, y también es capaz de inhibir la actividad de la desyodasa tipo III en hepatocitos de embriones de pollo (Arámburo y col., 2001).

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA GH

El receptor de la hormona de crecimiento (GHR) pertenece a la superfamilia de receptores hematopoyetina/citocinas, en la que se encuentran también los receptores a PRL, citocinas, interferón e interleucinas entre otros. Se caracteriza por contener un dominio extracelular, un dominio membranal y uno intracelular (Harvey y col., 1995; Carter Su y col., 1996). Los GHR muestran heterogeneidad molecular que también puede contribuir con la diversidad funcional de la GH. El GHR presenta modificaciones postraduccionales tejido-específicas como la glicosilación y ubiquitinación. Además, por edición alternativa se producen transcritos y proteínas de diferentes tamaños. Mediante estudios con anticuerpos monoclonales se han identificado subtipos de GHR en algunos tejidos como el hígado y el tejido adiposo, y comparando la unión de estos receptores en dichos órganos con las formas 22 y 20 kDa de GH humana, se encontraron diferencias en su capacidad de unión (Harvey y col., 1995).

La GH se une secuencialmente a dos moléculas de su receptor, causando la dimerización del mismo además de cambios estructurales importantes (Goffin y col., 1996). Estos cambios generan la unión del GHR y una tirosina cinasa de la familia Janus (JAK2), promoviendo la fosforilación de ambos por la misma JAK2. Esto produce la asociación y activación de una cascada de proteínas, en la que participan las proteínas SHC, Grb2, posiblemente Sos, Ras, Raf y posteriormente las proteínas cinasas asociadas a microtúbulos, activadoras de la mitosis o reguladas por una señal extracelular (cinasas MAP/ERK) (Scanes, 1995; Carter Su y col., 1996).

La GH también induce la expresión de genes que codifican factores de transcripción involucrados en la proliferación celular como por ejemplo c-myc. La regulación de eventos metabólicos por GH refleja la expresión de genes

específicos para cada tipo celular. En los adipocitos la GH participa en la expresión de enzimas lipogénicas y lipoproteínas a través de C-fos. Asimismo, interfiere en la expresión de algunos de los transportadores de glucosa (GLUT1) (Tai y col., 1990; Carter Su y col., 1996) y, en el hígado, en la manifestación del gen que codifica para IGF-I (Carter Su y col., 1996).

Se sugiere que a través de una vía directa y dependiente del tipo celular, en la que participa JAK2, la GH activa proteínas de la familia Stat, que son transductoras y activadoras de la transcripción. Estas se unen a otras proteínas formando homodímeros y heterodímeros que se translocan al núcleo y se unen con el DNA, activando la transcripción de genes blanco (Carter Su y col., 1996).

Una tercera vía de transducción de GH interviene en el efecto tipo insulina, es decir, en el aumento del transporte de glucosa por reclutamiento de GLUT 1 y 4 en la membrana. En esta vía la GH y la insulina comparten moléculas señal como las llamadas "sustrato principal del receptor de insulina" (IRS). En respuesta a GH se fosforilan IRS-1 e IRS-2, y se piensa que esto se lleva a cabo a través de JAK2. En consecuencia, se activa la cascada de fosfatidilinositol, que se sabe que aumenta el transporte de glucosa, la síntesis del DNA y la actividad de una enzima implicada en el ciclo celular, p70 15kDa. También se conoce que esta cinasa interviene en la síntesis de lípidos dependientes de GH y en la lipólisis inducida por noradrenalina (Carter Su y col., 1996).

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

GH, como los tipo insulina. Otro efecto de GH que requiere el efecto permisivo de PKC es la expresión de enzimas como el citocromo p450, que está involucrado en el metabolismo de esteroides en ambos sexos e influido por las diferencias sexuales en la secreción de GH (Harvey y col., 1995; Carter Su y col., 1996).

SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA GH

Los factores reguladores de la síntesis y secreción de la hormona de crecimiento, actúan a nivel del hipotálamo o de la hipófisis. Se sabe que la GH se sintetiza y almacena en los somatotropos de la adenohipófisis y sus niveles circulantes se modifican ante situaciones fisiológicas como el crecimiento y desarrollo, la privación de alimento, la exposición al frío, el ejercicio, y durante el sueño de ondas lentas (Devesa y col., 1992). Además de los somatotropos, la GH se sintetiza también en células secretoras de prolactina de humanos, ratas, ratones, murciélagos, borregos, vacas y ranas. Estos lactosomatotropos comparten características morfológicas semejantes a los somatotropos y lactotropos. En la regulación de la proliferación de estas células participan las hormonas esteroides, como la testosterona que inhibe la proliferación mientras que los estrógenos la estimulan (Boockfor y col., 1986). Otras células hipofisarias en las que se sintetiza la GH son los llamados tiosomatotropos que también sintetizan TSH, recientemente identificados en la región ventral de la adenohipófisis de pollos.

La secreción de esta hormona tiene un comportamiento pulsátil, observado en todas las especies estudiadas, y los tejidos blanco son más sensibles a la frecuencia que a la cantidad secretada en un periodo similar; un pulso de secreción de GH está controlado por la rítmica liberación alternada de la hormona liberadora de la GH (GHRH) y la somatostatina (SRIF) (Devesa y col., 1992). La secreción de GH muestra ritmos circádicos y ultradianos, sujetos a variaciones de acuerdo con el estado nutricional, la composición del cuerpo, el metabolismo, el dimorfismo sexual y la edad (Müller y col., 1999).

Adicionalmente, otros mensajeros químicos pueden modular la liberación de GH a través de la regulación del efecto de los factores hipofisiotrópicos, tales como la noradrenalina, acetilcolina, dopamina, histamina, serotonina, y algunos neuropéptidos como los péptidos opioides, la galanina y el neuropéptido Y (Devesa y col., 1992).

La GHRH se produce en neuronas localizadas en el núcleo arqueado, las cuales expresan receptores para SRIF que inhibe la síntesis de GHRH (Bertherat y col., 1995). Contrariamente, las neuronas del área periventricular del hipotálamo anterior secretan SRIF y son estimuladas por la GHRH (Águila y McCann, 1987). La SRIF inhibe su propia síntesis por un mecanismo de retroalimentación ultracorta (Águila, 1998). Esta interacción entre los péptidos parece ser la responsable de la secreción episódica de la GH. Sin embargo, estos factores hipotalámicos están sujetos a modulación por otros péptidos hipotalámicos y por una compleja red de neurotransmisores que funcionan como intermediarios entre las influencias metabólicas, endocrinas, neurales e inmunológicas, y la liberación de la GH (Harvey y col., 1995).

Otro péptido hipotalámico identificado en el núcleo arqueado, paraventricular y periventricular, es el neuropéptido Y (NYP). Este péptido también influencia los niveles de GH; neuronas con NYP presentan contacto sináptico con las neuronas de SRIF y se ha observado que inyecciones cerebroventriculares de NYP bloquean la secreción de GH. Este péptido inhibe la secreción de GH al estimular la secreción de SRIF, porque no se observa un efecto directo sobre la hipófisis (Blue-Pajot y col., 1998).

Dentro de los mecanismos periféricos más importantes en la regulación de la GH se encuentra la retroalimentación negativa de asa larga en la que participa el IGF-I. Este factor produce un incremento en el ARNm de la SRIF y la disminución del ARNm de la GHRH a nivel hipotalámico. El IGF-I también actúa directamente

sobre la hipófisis y se propone que reduce la excitosis y el procesamiento postraducciona de la GH (Müller y col., 1999).

Por otra parte, se ha demostrado que las hormonas tiroideas (HT) regulan la síntesis de la GH y que son necesarias para la expresión de este gen. Sin embargo, los estudios sobre el efecto de las HT sobre la secreción son contradictorios: algunos muestran un incremento en la secreción de GH y otros la disminución de la GH circulante (Harvey y col., 1995). Tal contradicción se puede explicar al analizar los diferentes modelos utilizados y al considerar la participación de otras hormonas en los circuitos de retroalimentación negativa que afectan a ambas hormonas. La T3 tiene un efecto inhibitorio sobre la TRH, por lo que el incremento en la concentración de T3 reduce la secreción de GH inducida por TRH (Harvey y col., 1991). A diferencia de los mamíferos, en pollos las HT inhiben la síntesis y liberación de la GH inducida por TRH y GHRH, posiblemente a través de la disminución en la sensibilidad de los somatotropos a GHRH y por la reducción de los niveles de secretagogos de GH liberados (Radecki y col., 1994).

Otras hormonas que intervienen en el control de la transcripción del gen de GH y su secreción son los glucocorticoides, los cuales tienen un efecto estimulador. En estudios *in vitro* se ha demostrado que el efecto de los glucocorticoides sobre la síntesis de GH es dependiente de HT. También afectan la expresión del gen del receptor de GHRH incrementando el ARNm, mientras se observa una disminución en los niveles de ARNm del receptor de SRIF. No obstante, una exposición prolongada a glucocorticoides produce el efecto contrario en la expresión de dichos receptores. Como se mencionó anteriormente, el patrón de secreción de GH es específico para cada sexo; se sabe que, durante la maduración, los esteroides sexuales participan modulando GHRH y SRIF en el hipotálamo y afectando la respuesta de la hipófisis a estos reguladores a través de la expresión de sus receptores (Devesa y col., 1992; Argente y Chowen, 1994; Blue-Pajot y col., 1998).

Se ha propuesto un mecanismo de regulación por GH llamado asa ultracorta, en el que se supone un efecto inhibitorio de la hormona sobre su propia secreción. También puede estar mediada por factores paracrinós extrasomatotrópicos, por ejemplo, a través de las IGF que se producen en la hipófisis en respuesta a GH, y que inhiben la liberación de la hormona y la transcripción del gen de GH, tanto en condiciones basales como inducidas por GHRH. Además, la GH sistémica disminuye su propia secreción basal o estimulada independientemente de cambios en otras hormonas o metabolitos inhibitorios, como la glucosa o los ácidos grasos libres. Se piensa que este efecto puede ocurrir por inhibición de los receptores a GHRH y TRH, por aumento de los receptores SRIF, por la combinación de ambos en las membranas somatotrópicas o por daño en la señal de transducción. La GH sistémica también regula su secreción a través de su efecto sobre los niveles de otras hormonas, como los IGF hepáticos (Harvey y col., 1995; Blue-Pajot y col., 1998).

GH EXTRAHIPOFISIARIA

El descubrimiento de la presencia de la hormona de crecimiento en otros sitios diferentes a la hipófisis es algo relativamente reciente. Hay trabajos como el de Kyle y colaboradores (1981), en el cual identificaron moléculas parecidas a la GH en varios tejidos extrahipofisarios, como hígado, riñón, pulmón, músculo estriado, colon, estómago y cerebro de humanos, a partir de ensayos de paralelismo por radioinmunoensayo e inmunocitoquímica, se planteó la posibilidad de que la GH fuera sintetizada localmente y pudiera ejercer un efecto parácrino, autocrino o intracrino. En los últimos años se han identificado sitios extrahipofisarios en los cuales se sintetiza la GH, tales como: poblaciones neuronales hipotalámicas y extrahipotalámicas del sistema nervioso central (Render y col., 1995), células epiteliales de la glándula mamaria, gónadas de ambos sexos (Hull y Harvey, 2000; Luna y col., 2000), células endoteliales de vasos sanguíneos, fibroblastos, células epiteliales del timo, células del sistema inmune que incluyen a los macrófagos y linfocitos de diferentes tipos (Wu y col., 1996; Liu y col., 1997), y en algunos tejidos embrionarios en pollos desde los 3 días de desarrollo (Harvey y col., 2000).

La presencia de GH en estos tejidos se ha confirmado con la identificación del ARNm en extractos de tejido y por hibridación *in situ*. Se sugiere que la producción local de GH es regulada por mecanismos independientes a los de la GH hipofisiaria, que responden a necesidades propias del tejido que la produce y se ha observado que la GH inmunorreactiva no se modifica por efecto de la hipofisectomía en algunos extractos de tejido como el cerebro (Ramesh, 1996).

Existen evidencias de que la hormona sintetizada en tejidos como el cerebro, bazo, timo y bolsa de Fabricio en pollos es similar en tamaño y antigenicidad a la hormona hipofisiaria, así como el ARNm que presenta una alta homología y sitios de corte por las enzimas Bam HI y RsaI equivalentes al de la hipófisis (Render, 1995 a,b). Algunos autores han identificado en tejidos como el hipotálamo y sistema inmune el predominio de la forma dimérica utilizando un anticuerpo policlonal α GH (Render y col., 1995 a,b). Sin embargo, Luna y colaboradores (2000) han identificado recientemente por Western Blot que la forma molecular predominante de GH en tejidos como testículo y bolsa de Fabricio en pollos es un fragmento de 17 kDa. Para esta inmunodetección utilizaron un anticuerpo policlonal α GH lo que sugiere que la proteína de 17 kDa puede corresponder a un fragmento de la GH monomérica.

Recientemente se ha demostrado la presencia de proteínas parecidas a la GH en el testículo y tracto reproductivo masculino de pollo, y esto sugiere efectos locales de la GH en la función reproductiva (Luna y col., 2002). La inmunoreactividad de GH en el testículo está asociada con proteínas de varios tamaños. Al igual que en la hipófisis esta puede ser el resultado de modificaciones post-traduccionales de la hormona (Arámburo y col., 2000, 2001b).

Se ha demostrado inmunoreactividad a GH en el testículo de pollos de diferentes edades, esta se incrementa durante el desarrollo y esta asociada con diferentes variantes moleculares. Los cambios tisulares relacionados con la edad y la abundancia relativa de las variantes testiculares de GH, pueden estar relacionadas

con cambios en la función reproductiva, y pueden reflejar acciones locales de la hormona testicular (Luna y col., 2002).

Se sabe que la cantidad de GH en tejidos extrahipofisarios es menor en comparación con la que se encuentra en los somatotropos de la hipófisis. Así por ejemplo, la inmunorreactividad a GH en cerebro, timo y Bolsa de Fabricio en pollos representa menos del 10% de la GH existente en la hipófisis (Render y col., 1995b).

GH Y APARATO REPRODUCTOR DE MACHOS

La hormona de crecimiento es requerida para una maduración normal de los mamíferos; la deficiencia de la misma, en roedores se asocia con una disminución en la maduración sexual. En algunas especies, la GH puede acelerar la pubertad por la acción potenciada de andrógenos, debido a que esta hormona reduce la cantidad de testosterona requerida para inducir las características sexuales secundarias en hombres jóvenes. Además, se ha detectado que a través de una inmunoneutralización de la GHRH se induce una deficiencia en la maduración sexual de ratas, la que se visualiza como una reducción en: tamaño testicular, espermatogénesis y respuesta a FSH (Hull y Harvey, 2000). La terapia de GH estimula el crecimiento de vello corporal en adultos con deficiencia de GH, aún cuando los niveles de andrógenos son normales (Hull y Harvey, 2000).

REPRODUCCION DE LAS AVES

La reproducción es un proceso que puede ser organizado en distintas fases funcionales y de desarrollo. En el caso de los machos, estos incluyen la fertilización, formación del tracto reproductivo, producción de esperma, manifestación de patrones conductuales específicos de los machos y la expulsión corporal de esperma (Kirbi y Froman, 2000; Causey, 2000).

El aparato reproductor consta de 2 tractos reproductivos, cada uno de ellos consiste de un testículo, epidídimo, y un ducto deferente. Los testículos están suspendidos por un corto mesenterio del techo celómico, entre la aorta y el riñón. Este mesenterio se une a la superficie ventral del testículo y, por tanto, oculta el epidídimo de la vista ventral. Cada testículo es un agregado de túbulos seminíferos anastomosados, asociados con tejido intersticial y envueltos por una cápsula de tejido conectivo. El testículo contiene dos tipos de tejido parenquimatoso: el tejido intersticial y el epitelio seminífero. El tejido intersticial contiene sangre y vasos linfáticos, nervios, células epiteliales peritubulares y células Leydig (Kirbi y Froman, 2000; Causey, 2000; Sisson y Grossman, 1982).

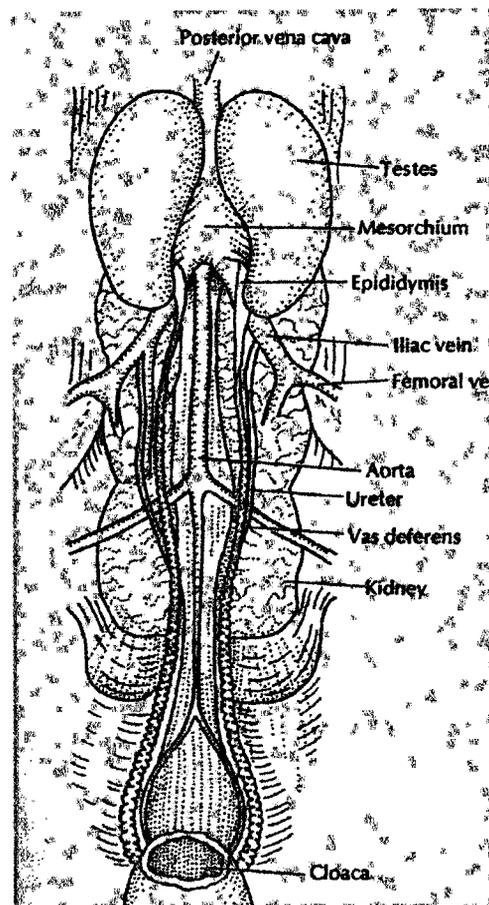


Figura 3. Diagrama de la morfología del tracto reproductivo de las aves.

Capas delgadas de células mioepiteliales, fibroblastos, y tejido conectivo forman la lámina basal de los túbulos seminíferos. El epitelio seminífero dentro de los túbulos de machos maduros sexualmente, está compartimentizado en región basal y adluminal a través de uniones estrechas (tight junctions) entre las células Sertoli adyacentes. Y este contiene células germinales en desarrollo en distintas asociaciones referidas como estados. Los estados están arreglados secuencialmente en una hélice que se extiende a lo largo de los túbulos seminíferos (Kirbi y Froman, 2000; Causey, 2000).

El tracto reproductivo de los machos adultos se deriva de dos órganos embriológicos: la gónada y su mesonefros. La gónada surge de la superficie ventromedial del mesonefros. Tres pares distintos de órganos excretores surgen subsecuentemente durante el desarrollo embrionario: el pronefros, mesonefros y metanefros. El punto crítico en la ontogenia del tracto reproductivo es la diferenciación gonadal, el embrión tiene gónadas bipotenciales representadas por el rudimento de los oviductos y por los ductos deferentes en la forma de ductos de Müller y Wolff respectivamente (Kirbi y Froman, 2000; Causey, 2000).

Halverson y Duorak (1993) propusieron que la determinación sexual en las aves que poseen la capacidad del vuelo (no ratites), depende de la proporción de cromosomas Z con autosomas. Aparentemente esta proporción determina la relación entre las aromatasas, las cuales son las responsables de convertir la testosterona a estradiol (Kirbi y Froman, 2000; Causey, 2000).

Mizuno et al (1993) reportó que el ARNm de la aromatasa aparece en los embriones de pollos hembra entre los 5 –7 días de incubación. El antígeno H-Y en pollos es sexo-específico en hembras, pudiendo no aparecer hasta el momento de la diferenciación gonadal, y puede ser inducido por estrógeno en cultivos de tejidos embrionarios gonadales masculinos. Sin embargo, la ontogenia del tracto reproductivo masculino en aves galliformes parece depender de la habilidad de los

machos genotípicos (ZZ) para sintetizar estrógenos al tiempo de la diferenciación gonadal (Kirbi y Froman, 2000; Causey, 2000).

La diferenciación gonadal en embriones de pollo se presenta aproximadamente entre los 6.5-7 días de incubación. Bioquímicamente, la diferenciación gonadal es evidente, en términos de un incremento en las concentraciones de nucleótidos cíclicos, incremento en síntesis de proteínas y el patrón de síntesis de esteroides sexuales. Esto da indicios del desarrollo necesario del eje hipófisis-gónadas, el cual parece volverse funcional a los 13.5 días de incubación en el pollo (Kirbi y Froman, 2000; Causey, 2000).

ACCIONES TESTICULARES DE LA GH

La GH juega un papel importante en la diferenciación y desarrollo testicular, ya que la carencia de la secreción de dicha hormona provoca en ratas adultas una deficiencia en la diferenciación de las células germinales (Arsenijevic y col., 1989).

El factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) se ha observado que normaliza el tamaño testicular en machos resistentes a GH (Laron y Klinger, 1998). Además, el IGF-1 maternal transmitido vía placenta o por la leche, puede ser suficiente para el desarrollo normal en la ausencia de IGF-1 producido localmente (Bartke y col., 1999).

Gametogénesis

Estudios recientes muestran una fuerte relación entre la GH y la fertilidad masculina. Por ejemplo, la movilidad espermática se ve afectada en ratones con deficiencia de la hormona, y se restaura mediante la administración de GH; también se ha determinado que el número y morfología de espermatozoides, se reduce con la deficiencia de GH, y con una administración de dicha hormona se revierte dicho efecto. También se ha observado un decremento en el número de espermatozoides maduros, pero niveles normales de espermátides en roedores

deficientes de GH, así, estos datos muestran que dicha hormona puede afectar la maduración final y no la espermatogénesis (Kuroda, 1989).

Se ha visto que la GH induce rápidamente la espermatogénesis en algunos machos infértiles, probablemente por el incremento de la diferenciación de células de Leydig y Sertoli (Shoham y col., 1992).

Las acciones gametogénicas de la GH pueden ser directas o mediadas por IGF. Sin embargo, es poco probable que el IGF-1 hepático cruce la barrera hemato-testicular. Las acciones testiculares de la GH pueden estar mediadas por el IGF-1 gonadal. Hay estudios en los que se ha visto que las concentraciones seminales de IGF-1 se correlacionan con la morfología de los espermatozoides, pero no con su motilidad o concentración, más bien, el IGF-1 en contraste con la GH inhibe la motilidad espermática (Ovesen y col., 1998; Breier y col., 1996; Breier y col., 1998; Glander y col., 1996; Miao y col., 1998).

Esteroidogenesis

La GH puede alterar la gametogénesis, afectando la síntesis de testosterona, ya que la testosterona es necesaria para la producción de esperma. La acción esteroidogénica de la hormona de crecimiento, puede ser mediada a través de IGF-1, ya que concentraciones subfisiológicas de este factor pueden inducir esteroidogénesis en folículos de rata (Handelsman y col., 1985).

Los testículos están altamente vascularizados, y muchas de las acciones testiculares de la GH exógena es probable que reflejen acciones endócrinas de la GH hipofisiaria, sin embargo, la barrera hemato-testicular, sugiere que muchas de las acciones esteroidogénicas en células de Sertoli y su papel en la gametogénesis pueden reflejar acciones de GH producida localmente (Hull y Harvey, 2000).

La posibilidad de que la GH testicular pueda actuar localmente afectando la función reproductiva directa o indirectamente, se apoya por la distribución del receptor a GH (GHR) en el tracto reproductivo masculino, la inmunoreactividad de GHR se presenta abundantemente en los ductos de Wolff y de Müller, uretra, epidídimo, vasos deferentes, vesícula seminal y gónadas en la rata (Hull y Harvey, 2000).

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que una proteína parecida a la hormona del crecimiento se encuentra en tejido testicular y tracto reproductivo masculino de pollo, y esto sugiere efectos locales de la GH en el aparato reproductor (Luna y col., 2002), por otra parte se ha determinado que presenta heterogeneidad molecular en el testículo y que cambia con respecto al desarrollo (Luna y col., 2003). Sin embargo, aún no se conoce su distribución y regulación en este tejido, por lo tanto es necesario hacer ensayos para determinar si en células testiculares cultivadas y tratadas con GHRH se presenta la hormona y mantiene su patrón de heterogeneidad.

HIPÓTESIS

Se sabe que la GH se encuentra presente en el aparato reproductor del pollo, y que esta hormona muestra un patrón de heterogeneidad molecular al igual que en la hipófisis, por lo tanto, proponemos que estas variantes moleculares son sintetizadas y liberadas diferencialmente en el testículo. Sin embargo, aún no se conoce su distribución celular, por lo que proponemos que esta hormona y sus variantes son sintetizadas y liberadas por tipos celulares específicos del testículo.

OBJETIVOS

General

- Determinar la presencia y distribución de la hormona de crecimiento en testículo de pollo.

Particulares

1. Conocer la distribución de la GH inmunorreactiva en el testículo de pollo mediante inmunohistoquímica en tejido testicular de pollo.
2. Determinar la distribución de la GH inmunorreactiva en cultivos primarios de células testiculares de pollo mediante inmunocitoquímica.
3. Determinar la presencia de variantes moleculares de GH en cultivos primarios de células testiculares y el posible efecto de la GHRH sobre estas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

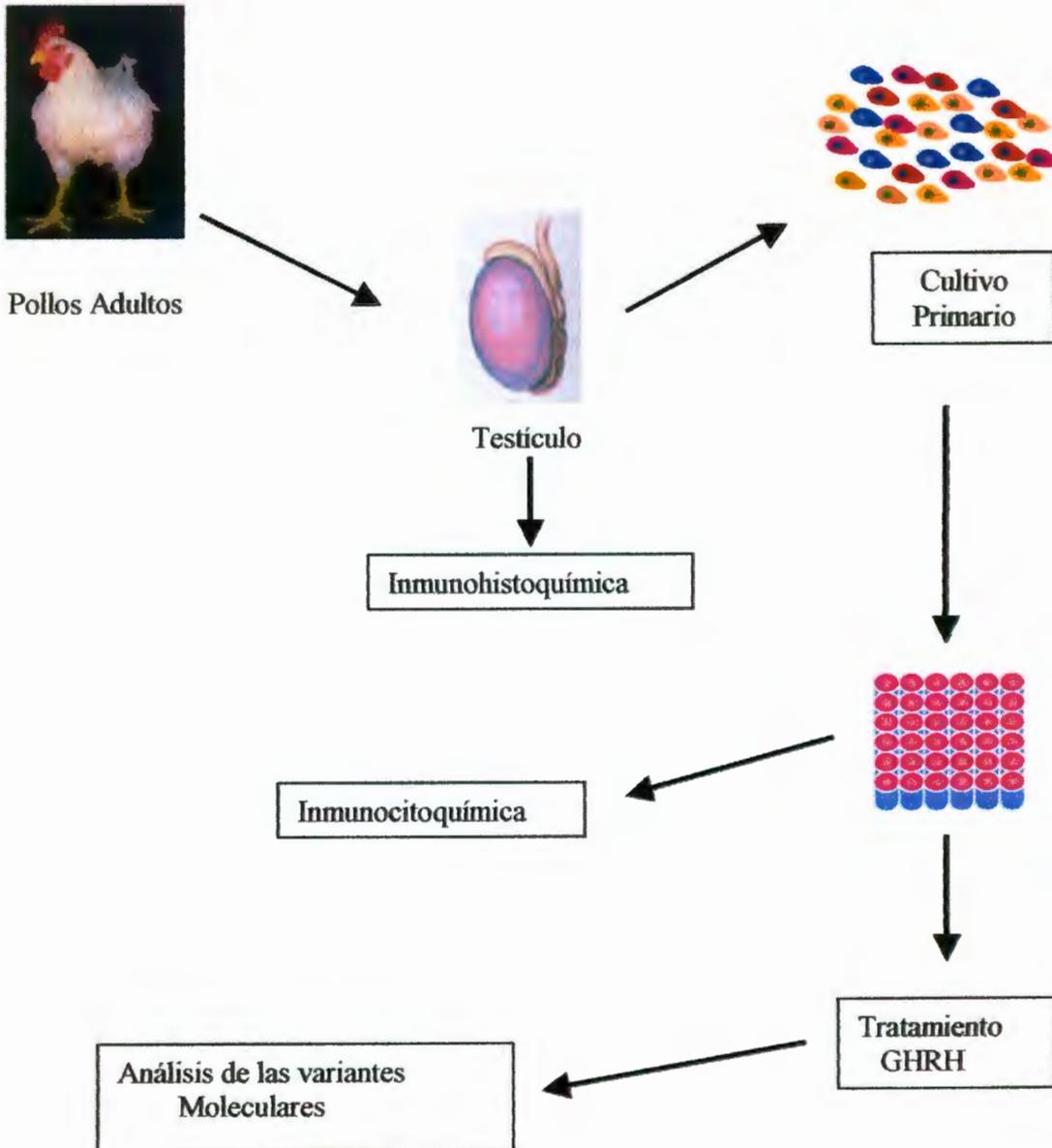


Figura 4. Diagrama de flujo de la parte experimental.

MATERIALES Y METODOS

Material Biológico

Se utilizaron testículos de pollos adultos, los organismos eran machos de engorda raza Avian, obtenidos en Querétaro de las granjas de Pilgrim's Pride de México, fueron mantenidos en un cuarto especial, hasta su fecha de sacrificio. Las edades utilizadas fueron entre 15 y 25 semanas de edad. La disección de los testículos, se llevó a cabo mediante un corte en la parte ventral para posteriormente extraer los testículos y depositarlos en un tubo Coming® de 50 ml en el que se lavaron dos veces en solución de lavado (Anexo 5), para después proceder con la técnica de dispersión, cultivo celular e inmunocitoquímica, o depositados en fijador para la técnica de inmunohistoquímica.

I. Dispersión y Cultivo Primario de Células de Testículo

a) **Dispersión:** Después de la disección, en la campana de cultivo los testículos fueron descapsulados quitando la túnica albugínea, y el tejido se cortó en fragmentos pequeños con la ayuda de bisturí y tijeras de disección. Los fragmentos de tejido fueron transferidos a un tubo cónico (15 X 75 mm) con 30 ml de solución de Colagenasa al 0.25%. Las células testiculares se dispersaron en esta solución durante una hora en baño María a 37°C, con agitación moderada. Después se lavaron una vez en la solución de lavado 2, posteriormente se incubaron durante 15 minutos con 10 ml de solución de Tripsina (0.05%) – EDTA (0.53 mM), en baño María a 37 °C con agitación moderada. Se ayudó a la dispersión mecánicamente utilizando una pipeta de 10 ml estéril. Después de la dispersión se lavaron una vez con la solución de lavado 2 (Anexo 5).

b) **Conteo Celular:** Se toman 27 μ L de solución de células dispersas y se le agregan 3 μ l de colorante Azul Tripán. Posteriormente se colocan 10 μ l de esta mezcla en cada uno de los pozos del hematocímetro (cámara Neubauer). Se cuentan las células al microscopio (Anexo 5).

c) **Cultivo Celular:** Alícuotas de 1×10^6 células / ml se sembraron en cajas de 24 pozos y 24×10^6 células / ml en cajas de 9X9 cm en medio de cultivo DMEM+F12 adicionado con antibiótico y se incubaron durante 24, 48 y 72 horas, a 37°C bajo condiciones de 5% de CO₂ y 95% de aire en una incubadora humidificada NUAIRE®.

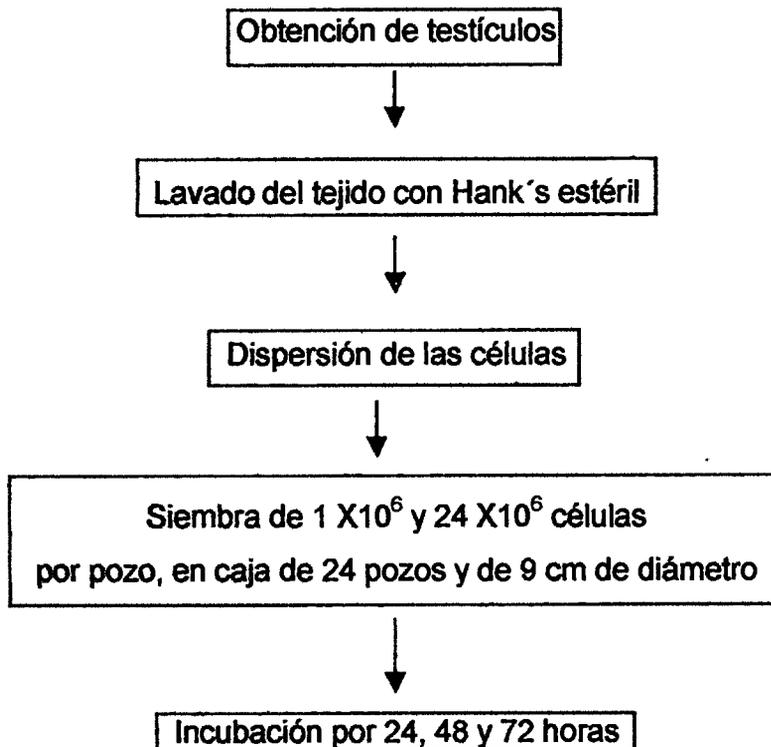


Figura 5. Diagrama de Flujo de La Dispersión y Cultivo Celular.

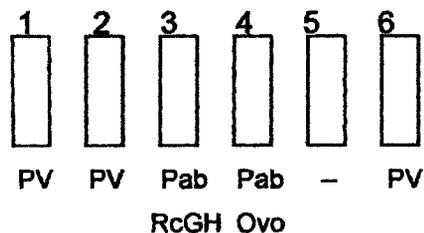
II. Inmunocitoquímica

Para llevar a cabo la Inmunocitoquímica, a las células cultivadas en cajas de 24 pozos se sometieron a la siguiente técnica:

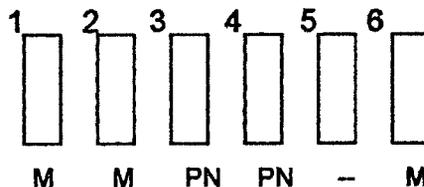
Se le absorbió el medio de cultivo a cada pozo, y se agregaron 500 µl de solución fijadora a cada uno y se incubaron durante 30 minutos, después se lavaron con 500 µl de solución de lavado 1 (ver anexo) durante 5 min (tres veces), se procedió a eliminar la peroxidasa endógena añadiéndoles 500 µl de solución inhibidora de peroxidasas (ver anexo) durante 1 hora, posteriormente se lavaron con 500 µl de solución de lavado 1 a cada pozo durante 5 min (tres veces), después se incubaron con 200 µl de solución bloqueadora durante 2 horas, se lavaron con 500 µl de solución de lavado 1 a cada pozo durante 5 min (tres veces), después se incubaron con el anticuerpo según el esquema 1 (mínimo 2h en cada uno, con un lavado de 10 min entre uno y otro). Los pozos que tenían anticuerpo-biotinilizado se incubaron 30 minutos con reactivo ABC Vectastain® (ver anexo), posteriormente se lavaron con 500 µl de solución de lavado 2 (ver anexo) durante 5 min (tres veces), finalmente se incubaron con 30 µl de solución de revelado a cada pozo durante 10 min para después observar la reacción al microscopio y tomar fotografías de cada uno de los tratamientos en 10 X y 40 X.

Primer anticuerpo

CAJA 1



CAJA 2



Segundo anticuerpo

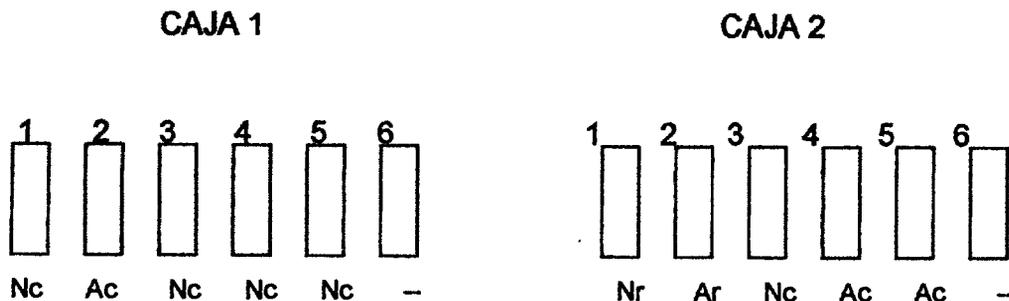


Figura 6. Se presenta la distribución de los diferentes anticuerpos utilizados en la técnica de Inmunocitoquímica, donde: (PV) = Policlonal CAP1; (Pab rcGH) = Preabsorbido con GH-recombinante; (Pab Ovo) = Preabsorbido con ovoalbúmina; (M) = Monoclonal; (PN) = Policlonal C1; (Nc) = Segundo anticuerpo contra Conejo marcado con peroxidasa; (Ac) = Segundo anticuerpo contra Conejo – biotilinizado; (Nr) = Segundo anticuerpo contra Ratón marcado con peroxidasa; (Ar) = Segundo anticuerpo contra Ratón – biotilinizado; (—) = Sin anticuerpo.

III. Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico, los testículos se fijaron con Bouin-Hollande sublimado por 48 h, se deshidrataron en etanol y se embebieron en parafina. Las secciones de tejido fueron rehidratadas con xileno, alcohol absoluto, alcohol 95%, alcohol 70%, lugol, tiosulfato y agua destilada.

Las secciones de tejido se incubaron con un anticuerpo policlonal dirigido a rcGH (dilución 1:500, durante toda la noche), y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-igG-HRP (marcado con peroxidasa de rábano) generado en cabra contra ratón para el anticuerpo monoclonal y contra conejo para el policlonal. Se revelaron con diaminobencidina y H₂O₂ (Malamed *et al*, 1997).

La especificidad de la tinción fue determinada preabsorbiendo el primer anticuerpo con exceso de rcGH (1.5 mg/ml). El primer anticuerpo fue además sustituido por suero normal de conejo u omitido, con la finalidad de tener controles negativos.

IV. Efecto de GHRH en Cultivos primarios de Células testiculares

a) Tratamiento con GHRH: Se sembraron 25×10^6 células en caja de Petri de 9 cm y se incubaron por 48h, después se procedió a adicionarles 10 ml de una solución 2nM de GHRH en medio de cultivo DMEM a cada caja de cultivo y se dejaron incubando en dos lotes, uno de 2 h y otro de 16 h, además de sus correspondientes controles.

Para el caso de los controles, el medio de cultivo se cambia por solución de DMEM-F12. Después de los tiempos de incubación, el medio de cultivo se colecta en tubos de 15 ml estériles, se etiquetan y se congelan hasta su posterior análisis. Las células se cosechan y se ponen en tubos eppendorf de 1.5 ml, se lavan una vez con solución DMEM-F12 y se procede a etiquetarlos y congelarlos para su posterior análisis.

b) Preparación de las Células: Se descongelaron las muestras de células, y posteriormente se procedió a agregarle a cada muestra 10 μ L de una solución inhibidora de proteasas (Complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) adicionada de una alícuota de $MgCl_2$ 0.2 M. Después de esto, se sonicaron las células durante 10 seg., con pulsos de 8 watt de potencia, con la finalidad de romper las membranas celulares.

El homogenado se incubó con agitación moderada durante 30 min a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min, y se extrajo el sobrenadante el cual se etiquetó y se volvió a congelar para posteriormente hacer la cuantificación de proteínas de cada una de las muestras y seguir su análisis por electroforesis y Western Blot.

V. Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford

Se preparó la curva patrón por duplicado con una proteína estándar (albúmina sérica bovina); se utilizaron 5 concentraciones de proteína (1, 5, 10, 15 y 20 μg) en un volumen de 800 μl de agua desionizada y se les adicionaron 200 μl del Reactivo de Bradford. Las diferentes concentraciones se dejan incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se lee la absorbancia a 595nm y los valores obtenidos se graficaron.

Para el caso de las muestras, estas se prepararon de la siguiente manera: 2 μl del homogeneizado se diluyó en un volumen de 798 μl de agua desionizada y se le agregaron 200 μl de reactivo de Bradford, cada muestra se preparó por duplicado. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se leyeron a 595nm y las lecturas obtenidas para cada muestra se interpolaron en la curva patrón.

Una vez que se cuantificaron las proteínas totales presentes en cada muestra se prepararon alícuotas con 50 μg de proteína total de cada muestra para proceder a analizarlos mediante electroforesis (SDS-PAGE) y western blot.

VI. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

La separación y el análisis de las proteínas presentes en los homogenados de células se llevó a cabo mediante la técnica de Electroforesis desnaturalizante siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli U, 1970).

Se prepararon geles de acrilamida al 12.5% de 1mm de espesor, de 10 carriles. Las muestras se prepararon en presencia de β -mercaptoetanol (condiciones reductoras). Se colocó en cada carril un volumen final de 30 μl de la muestra (50 μg). En cada uno de los geles se colocaron además de las muestras, dos controles internos, hormona de crecimiento de pollo recombinante (rcGH 500ng) y una muestra de homogeneizado de testículo de pollos de 9 semanas de edad (30 μg), además de poner los marcadores de peso molecular preteñidos de alto rango

(Bio-Rad[®]) (8µl de marcadores más 12µl de amortiguador de muestra). Los geles se corrieron a un voltaje constante de 100V en el gel concentrador y 150V en el gel separador hasta que el frente llegó a la parte inferior del gel (aproximadamente 1 hora).

VII. Inmuno-electrotransferencia (Western – Blot)

Después de la electroforesis los geles se dejaron equilibrar en amortiguador de transferencia (ver anexo) durante 10 minutos. Al mismo tiempo se pusieron a equilibrar en el mismo amortiguador, las membranas de nitrocelulosa (0.45µm de poro, Bio-Rad[®]) de 7.5 x 9.5 cm y el papel filtro (Whatman No. 1). La transferencia se llevó a cabo bajo una corriente constante de 200 mA, durante una hora con agitación y en frío. Después de la transferencia las membranas se lavaron en amortiguador TBS (ver anexo) durante 10 minutos. Después se bloquearon con la solución bloqueadora (TBS con leche descremada al 5%) durante 2 horas. Posteriormente las membranas se lavaron con TTBS (TBS con Tween 20[®] al 0.05%) 3 veces durante 10 min cada vez, y se dejaron incubando toda la noche con la solución del primer anticuerpo (dilución 1:10000). Al día siguiente, las membranas se lavaron con TTBS (3 veces 10 min.) y después se incubaron durante 2 h en la solución del segundo anticuerpo (marcado con peroxidasa o biotilizado). Después de la incubación se lavaron con TTBS, 4 veces durante 15 min cada vez y después con TBS 3 veces durante 15 min cada vez. Posteriormente se le adicionó el reactivo ABC, y se deja incubar durante 30 min, al terminar se lavaron las membranas con TBS 3 veces durante 10 minutos cada vez. Después de los lavados se agrega el sustrato para quimioluminiscencia (ECL-TBS 1:1).

Cada membrana se incubo con 5 ml de solución de sustrato de quimioluminiscencia durante 5 minutos. Posteriormente las membranas se introdujeron en una bolsa plástica (Ziploc). Se reveló en la oscuridad, en presencia de una placa radiográfica (Kodak Biomax) durante 30 segundos para después revelarlas.

El luminograma se sometió a un análisis densitométrico utilizando el programa IPLab Gel (Gel Analysis and Densitometry for Macintosh, Scanalytics, Inc.) para identificar el peso molecular y los porcentajes relativos del área bajo la curva de las bandas inmunorreactivas encontradas en cada muestra. Los resultados obtenidos se graficaron y se analizaron estadísticamente.

RESULTADOS

Estandarización de las Técnicas

Se llevaron a cabo curvas patrón de las siguientes técnicas:

- 1) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.
- 2) Electroforesis desnaturizante y Western Blot.

A continuación se presentan las curvas patrón obtenidas para cada una de las técnicas.

I. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA BRADFORD

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford se utilizó para determinar la cantidad de proteínas totales en cada uno de los homogenados de células testiculares. Para cada curva se utilizaron diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA): 1, 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Se realizaron 10 curvas bajo las mismas condiciones, después los resultados de cada uno de los puntos se promediaron para obtener una curva patrón de todos los ensayos y obtener los datos de coeficiente de variación interensayo y el coeficiente de correlación de la recta. Los resultados se muestran en la figura 7.

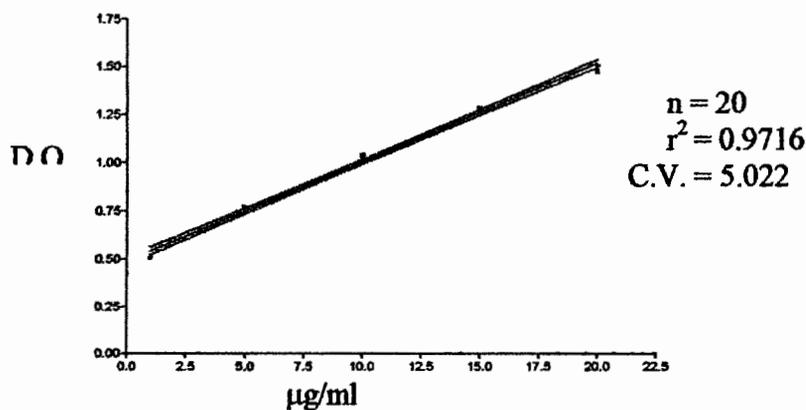


Figura 7. Curva patrón de cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.

La curva presenta una pendiente de 0.051 ± 0.0009 , además tiene un coeficiente de correlación de 0.9716, y el coeficiente de variación entre cada una de las curvas fue de 5%, lo cual nos indica que la técnica es confiable para determinar la cantidad de proteínas presentes en los extractos cada vez que se lleve a cabo.

Electroforesis desnaturalizante y Western-blot

Las técnicas de SDS-PAGE y Western-blot fueron la principal herramienta utilizada para separar las proteínas presentes en los homogenados de células testiculares, y posteriormente analizar las bandas inmunoreactivas a GH utilizando un anticuerpo policlonal específico. Después se realizó una densitometría con el programa IP Lab Gel®.

Inicialmente se corrieron varios geles de poliacrilamida al 15%, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, en los cuales se colocaron muestras de rcGH y de extracto hipofisiario, para identificar las bandas características de la cGH bajo diferentes condiciones.

Las razones por las cuales se analizaron las muestras en dos diferentes condiciones; reductoras y no reductoras son las siguientes:

- En condiciones no reductoras se puede conocer la cantidad y proporción de variantes de masa (oligómeros), formadas por diversas isoformas de la molécula presentes en las muestras. Estas formas agregadas pueden estar unidas por puentes disulfuro intercatenarios o por interacciones no covalentes débiles, del tipo de Van Der Waals o puentes de hidrógeno (como el dímero (44 kDa) y otras de mayor peso molecular).
- Posteriormente en condiciones reductoras, al adicionar β -mercaptoetanol a las muestras y reducir los puentes disulfuro, los oligómeros se separan y así se puede observar el aumento en las bandas que corresponden a las variantes moleculares que los estaban formando, por ejemplo la forma monomérica, o bien formas submonoméricas.

II. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA SDS-PAGE

Para llevar a cabo la estandarización del método de SDS-PAGE, se hicieron 5 experimentos, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, y se puso como muestra BSA a diferentes concentraciones (0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 ng), además de poner los marcadores de bajo peso molecular. Los luminogramas obtenidos, se analizaron para calcular la movilidad relativa mediante la interpolación en una curva patrón, construida con el corrimiento de marcadores de peso molecular con respecto a la movilidad relativa.

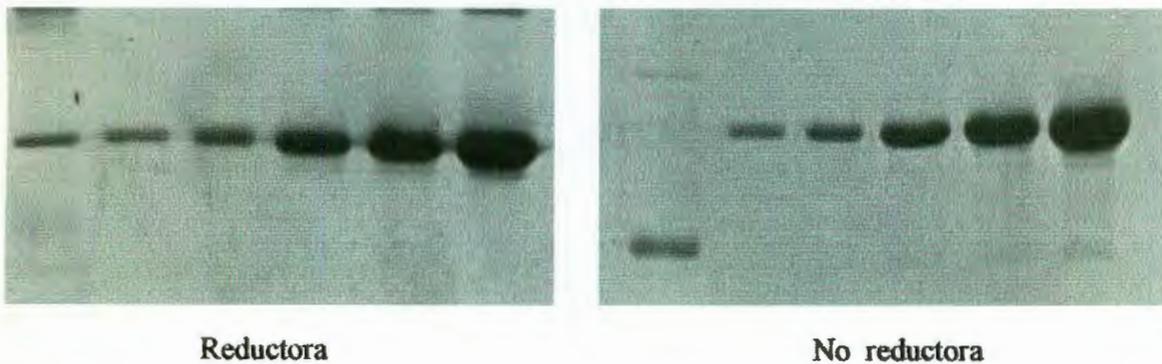


Figura 8. Se muestra un luminograma en el cual se observan las bandas características de la inmunoreactividad tanto en condiciones reductoras como no reductoras.

Se obtuvo un peso molecular experimental de aproximadamente 64 kDa, muy similar al peso molecular teórico que es de 60 kDa en condiciones reductoras. Mientras que en condiciones no reductoras, el peso molecular experimental obtenido fue de 49 kDa y el teórico fue de 49 kDa.

Las curvas de los análisis de los datos obtenidos de los geles en condiciones tanto reductoras como no reductoras, se muestran en la figura 9:

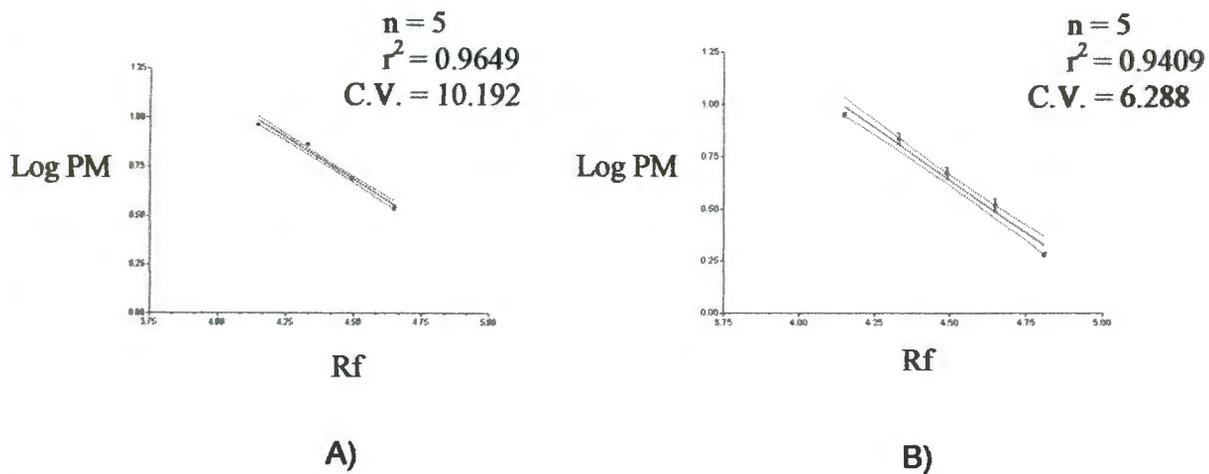


Figura 9. Curvas patrón de los análisis de los marcadores de peso molecular mediante el método SDS-PAGE en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B).

La curva de condiciones reductoras presenta una pendiente de 1.005 ± 0.04 , su coeficiente de correlación con la recta fue de 0.9649, y el de variación de 10%; por otra parte, la curva de condiciones no reductoras exhibe una pendiente de 1.006 ± 0.05 , un coeficiente de correlación con una recta fue de 0.9409, y el de variación fue de 6.2%, lo que nos indica que existe poca variación entre los datos analizados y, además que la técnica es confiable.

III. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA WESTERN BLOT

Los experimentos de estandarización de la técnica de inmunotransferencia o Western-blot se llevaron a cabo utilizando como muestras: extracto de hipófisis de pollos de 9 semanas de edad a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1 y 2 μg), diferentes concentraciones de rcGH (31.25, 62.5, 125, 250 y 500 ng), además de utilizar marcadores de peso molecular preteñidos. Los experimentos se llevaron a cabo tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Las membranas obtenidas, se analizaron mediante el programa IP Lab Gel®.

para determinar los pesos moleculares de las bandas inmunorreactivas. Los promedios de los datos obtenidos se analizaron mediante una regresión lineal, para determinar su coeficiente de correlación así como el de variación.

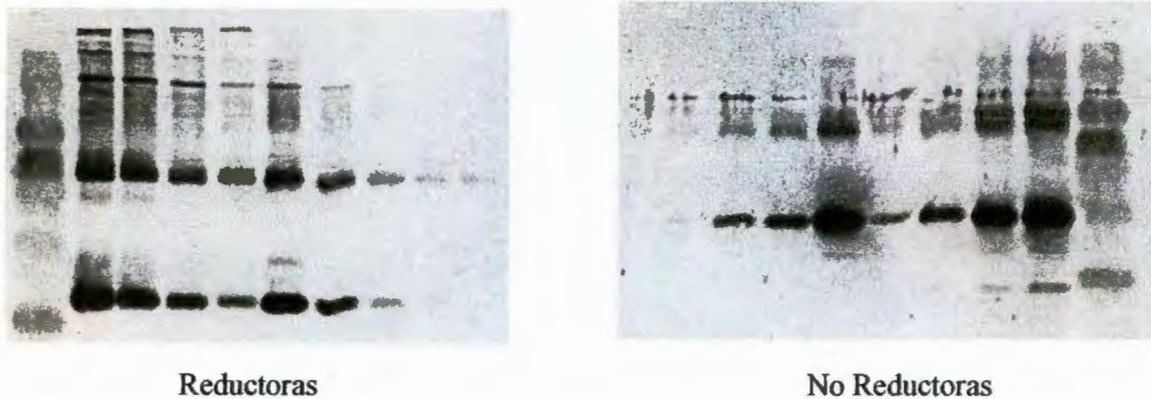


Figura 10. se muestra una imagen de la membrana en la cual se observan las bandas características de la inmunoreactividad tanto en condiciones reductoras como no reductoras.

Las curvas de los análisis de los datos obtenidos de las membranas tanto en condiciones reductoras como no reductoras se muestran en la figura 11.

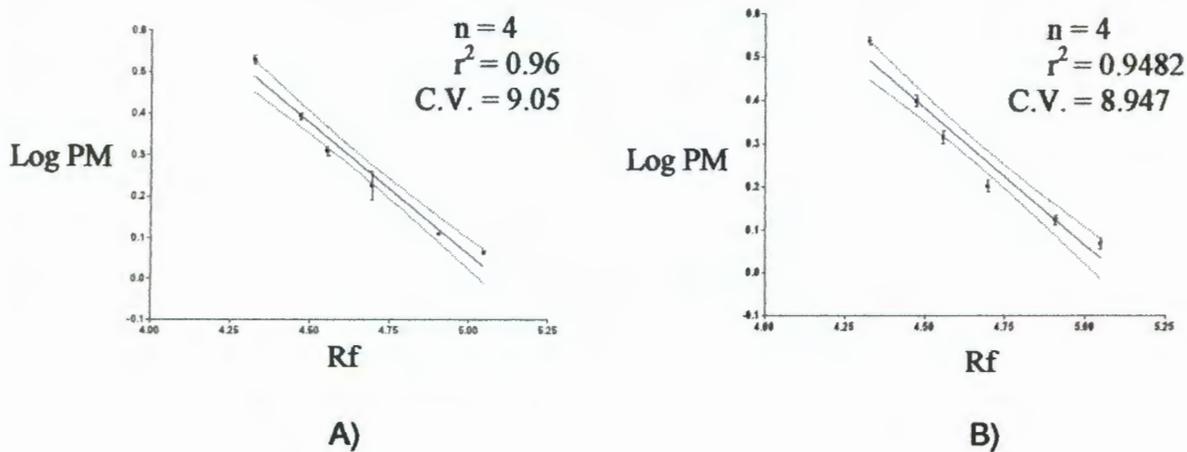


Figura 11. Curva patrón del análisis de los marcadores de peso molecular mediante el método Western-blot en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B).

La curva en condiciones reductoras presenta una pendiente de 0.6378 ± 0.0412 , además el coeficiente de correlación con la recta fue de 0.96, y el de variación de 9%; por otra parte, la curva en condiciones no reductoras tiene una pendiente de 0.636 ± 0.047 , además el coeficiente de correlación con la recta fue de 0.9482, y el de variación fue de 8.9%, lo que nos indica que existe poca variación entre los datos analizados, y nos muestra además que la técnica es confiable.

ANALISIS DE LAS VARIANTES MOLECULARES DE GH

Para determinar el patrón de heterogeneidad molecular de la GH en cultivos primarios de células testiculares, se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras. Este análisis se realizó tanto en cultivos de células en condiciones control, como en cultivos tratados con GHRH incubados con el tratamiento. Los resultados se presentan en la figura 12, en donde se muestra un luminograma representativo. Se utilizaron alícuotas de 50 μg del sobrenadante de las células previamente sonicadas de las diferentes condiciones de incubación y como control se usaron homogenados de testículo (30 μg), rcGH (500 ng) y marcadores de peso molecular preteñidos.



Figura 12. SDS-PAGE y Western-blot revelado con anticuerpo α -cGH. Los carriles muestran: rcGH, GH recombinante; Test, testículo; Control, Células control; GHRH, Células tratadas con GHRH 10^{-8} M por 2h.

Los resultados mostrados en la figura 12 señalan la presencia de un patrón de heterogeneidad molecular de la GH en las células en cultivo que es diferente al previamente observado en homogenado de testículo.

Las bandas inmunoreactivas detectadas en los extractos de células testiculares mantenidos en las diferentes condiciones experimentales son principalmente formas oligoméricas que van de los 58 a los 32 kDa, mostrándose en menor proporción el monómero (26 kDa) y sólo en algunas condiciones un fragmento de 17 kDa.

En el caso del extracto de testículo se muestra que la banda mayoritaria es un fragmento de 17 kDa, el monómero (26 kDa) y algunas formas oligoméricas.

ANÁLISIS DE LAS BANDAS INMUNOREACTIVAS

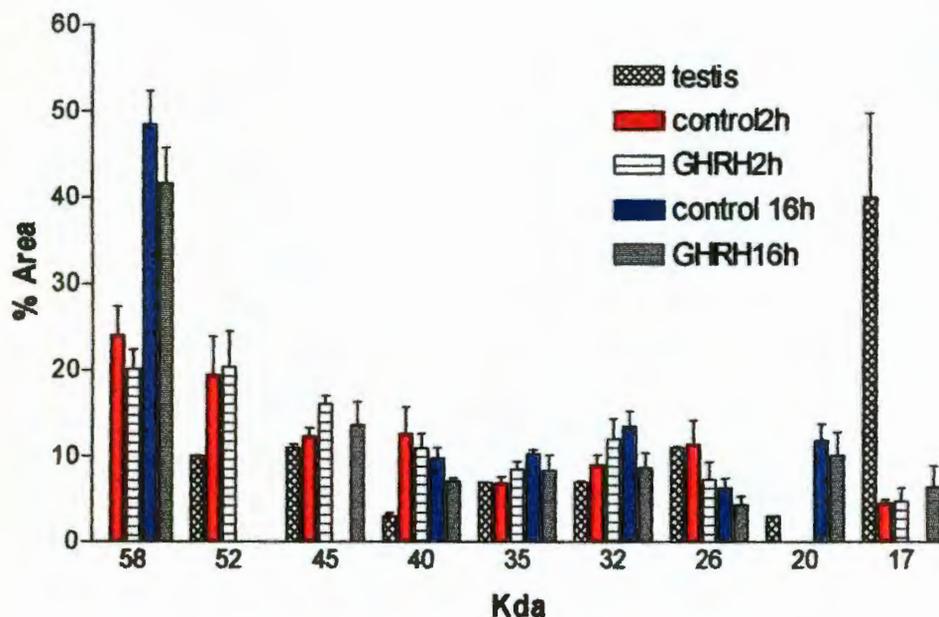


Figura 13. Se presenta la gráfica de las bandas Inmunoreactivas (58-17 kDa), con respecto al porcentaje de área. Las muestras corresponden a: testículo de pollo de 9 semanas de edad; células dispersas de testículo de pollo control (2 y 16 h); y células dispersas de testículo de pollo tratadas con GHRH 2nM (2 y 16 h).

En la figura 13 se muestran los porcentajes de área de las diferentes variantes moleculares de GH detectadas tanto en células en cultivo como en extractos de testículo.

Se pueden observar variantes desde 17 kDa hasta formas oligoméricas de 58 kDa. Las bandas más prominentes son la de 17 kDa en extracto de tejido y las formas oligoméricas de 52 y 58 kDa para las células cultivadas. Los porcentajes son mayores para la variante 58 kDa en los cultivos incubados por 16 h.

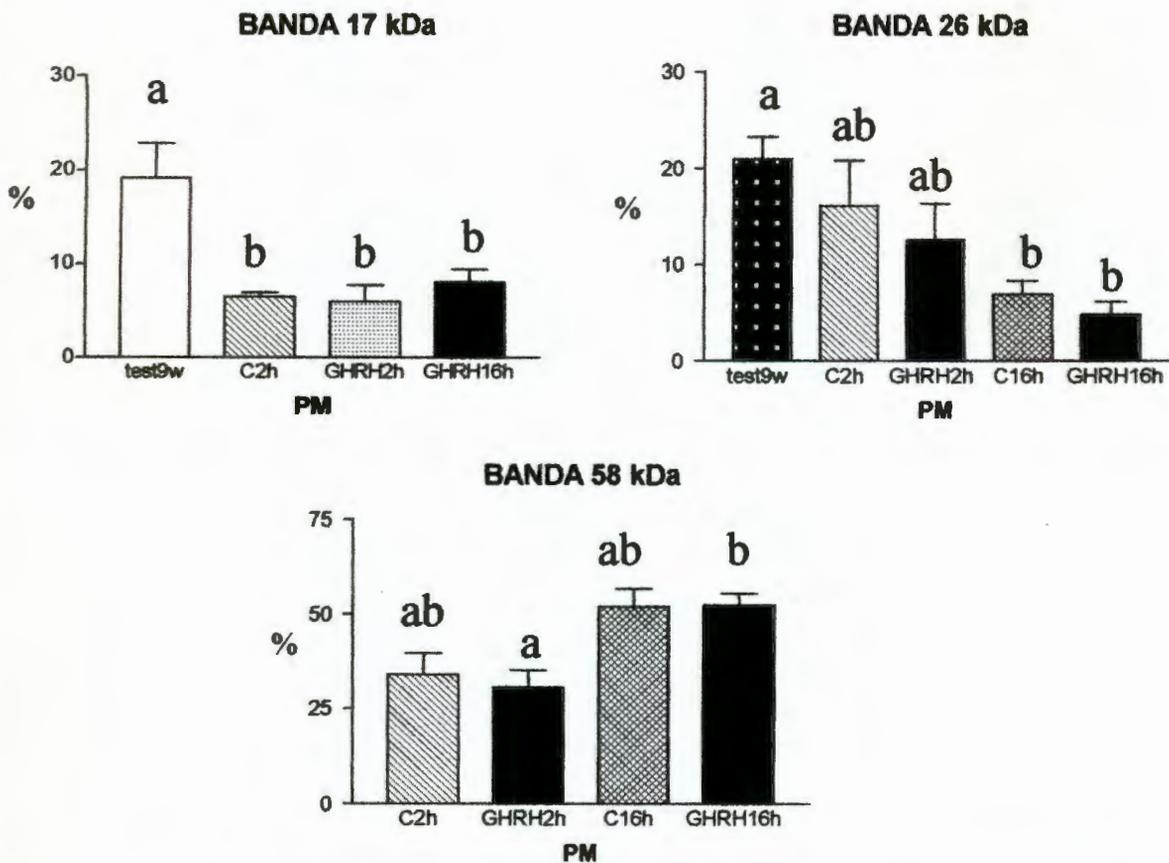


Figura 14. Se muestran las gráficas correspondientes a las bandas inmunoreactivas más prominentes (17, 26 y 58 kDa), en los diferentes tratamientos (control y GHRH), además de testículo de pollo. Se observan los cambios en el porcentaje de área (%) con respecto a cada muestra y cada barra representa el promedio \pm desviación estándar ($n = 3$). Letras diferentes significan diferencias significativas ($p < 0.01$).

En la figura 14 están representados los porcentajes independientes de un fragmento de 17 kDa, el monómero de 26 kDa y una forma oligomérica de 58 kDa para todas las condiciones de incubación.

En la figura correspondiente al fragmento de 17 kDa se muestra claramente que la banda es significativamente mayor en testículo que en las células en cultivo, con una significancia de $p < 0.01$.

Por otra parte en el caso del monómero (26 kDa) se observó una disminución de esta banda en los cultivos celulares y la disminución es mayor cuanto mayor es el

tiempo de incubación tanto en condiciones control como en presencia de GHRH incubada 16 h (disminuye de un 11%, 16.5% y 7% en testículo y en control, y estimulando con GHRH por 2h va de 13% a 5% después de su incubación por 16h).

En forma inversa, la variante de 58 kDa se incrementa con respecto al tiempo de incubación que va de 30 ± 5 % (células tratadas con GHRH a 2h de incubación) a 52 ± 5 % (células tratadas con GHRH a 16h de incubación) con una significancia de $p < 0.01$, y en el extracto de testículo no se observa esta variante.

La banda de 29 kDa que podría ser la variante glicosilada sólo se observó en el homogenado de testículo.

Las variantes 32 y 35 kDa se incrementan en células en cultivo independientemente de las condiciones de incubación; sin embargo la banda inmunoreactiva de 40 kDa se incrementa de un 3% en testículo a 21 y 16% en células en cultivo a 2h de incubación (control y GHRH respectivamente).

El dímero (45 kDa) se incrementa de un 11% a 18 y 22% en las células control y GHRH incubadas durante 2h.

La banda de 52 kDa sólo se incrementa de un 10% en testículo a 29 y 28% en las células control y GHRH incubadas durante 2h.

Adicionalmente, la variante de 58 kDa no se observó en testículo mientras que en células cultivadas aparece a las 2h de incubación tanto en el control como en presencia de GHRH y se incrementó significativamente después de 16h bajo las 2 diferentes condiciones de incubación.

En general los datos muestran que las formas submonoméricas disminuyen en las células en cultivo, mientras que las bandas oligoméricas aparecen en las células cultivadas.

Los datos anteriormente señalados se representan en la figura 11.

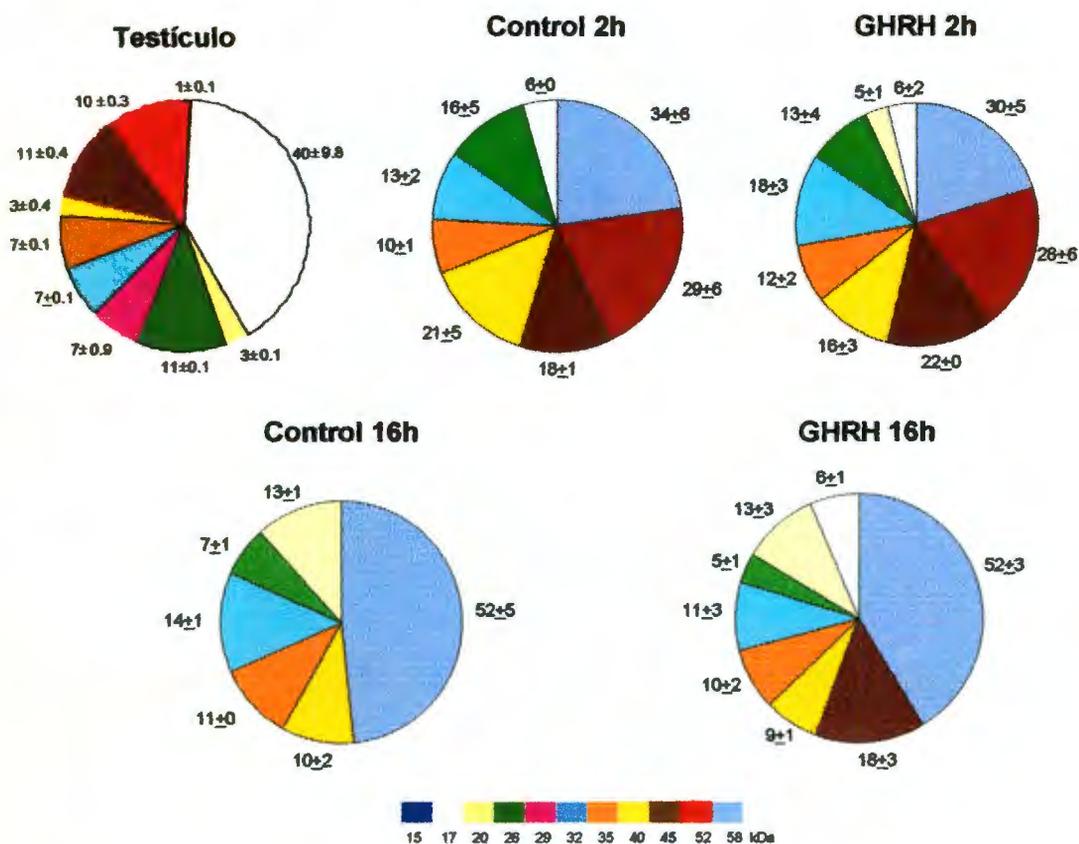


Figura 15. Proporción relativa de las variantes moleculares de la GH en células dispersas de testículo de pollo, analizadas por SDS-PAGE, Western Blot y densitometría. Cada valor representa la media ± el error estándar.

CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE TESTÍCULO DE POLLO

Se realizaron los cultivos primarios y se les agregó GHRH para determinar si este secretagogo participa en la síntesis y secreción de la GH. Para lo cual se incubó en presencia de 2 nM GHRH y sin secretagogo como control durante 2h y 16 h. Después se procedió a cosechar las células y posteriormente se agregaron 100 μ l de una solución de inhibidores de proteasas (mini-Complete®) disuelto en agua desionizada a un pH de 9.0, y se sonicaron para romper las células (ver anexo). Se centrifugó el homogeneizado y el sobrenadante se colectó y se congeló para ser analizado por SDS-PAGE y Western-blot.

Para cuantificar las proteínas totales en cada muestra, se utilizó el método de Bradford previamente descrito, se usaron alícuotas de 2 μ L de cada muestra, los valores obtenidos con la curva estándar fueron de 5.3 μ g/ml de proteína. Se usaron 50 μ g de proteína total de cada muestra para poder determinar el patrón de variantes de la GH.

INMUNOCITOQUIMICA

Se utilizaron dos anticuerpos policlonales (CAP1 y C1) y un anticuerpo monoclonal contra GH para determinar la inmunoreactividad positiva. En cultivos primarios de células testiculares incubadas en microplacas de 24 pozos utilizando 20 X10⁶ células por pozo, se determinó la presencia de células inmunoreactivas a los anticuerpos previamente señalados.

Para el primer anticuerpo (CAP1 ó C1), el tiempo de incubación fue de aproximadamente 16 h, mientras que el segundo anticuerpo (marcado con peroxidasa) se incubó a temperatura ambiente. Para revelar se utilizó una solución de diaminobencidina y peróxido de hidrógeno, incubada durante 10 a 15 min, a temperatura ambiente y agitación moderada. Posteriormente se lavaron las muestras y se procedieron a toma las fotografías de cada pozo con ayuda del microscopio de luz invertido.

Los resultados mostraron una señal específica en algunos tipos celulares específicos y se observó con los tres diferentes anticuerpos.

En la figura 16 se muestran los controles negativos tanto en ausencia del primer anticuerpo como en presencia del primer anticuerpo preabsorbido con rcGH, estos datos nos muestran que la señal inmunoreactiva se desaparece en estas condiciones señalando la especificidad de la reacción.

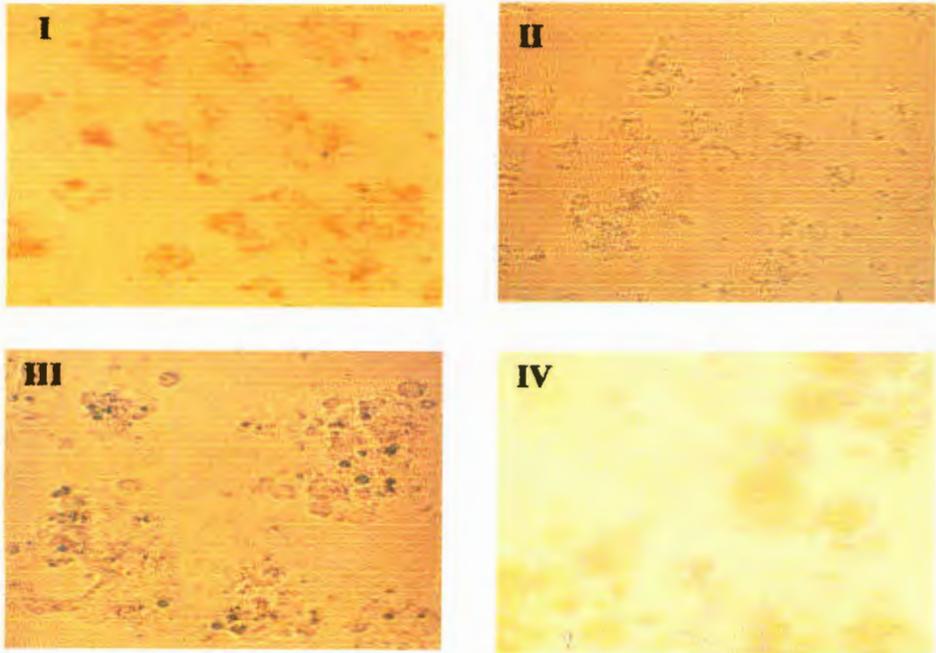


Figura 16. Se presentan las micrografías de los experimentos: I y II) controles negativos de anticuerpos policlonales (10X); III) control negativo de anticuerpo monoclonal (40X) y IV) tratado con anticuerpo preabsorbido con rcGH (20X).

En el caso de la figura 17, se muestra una panorámica de la reacción positiva a los 3 diferentes anticuerpos probando y corroborando la presencia de células inmunopositivas.

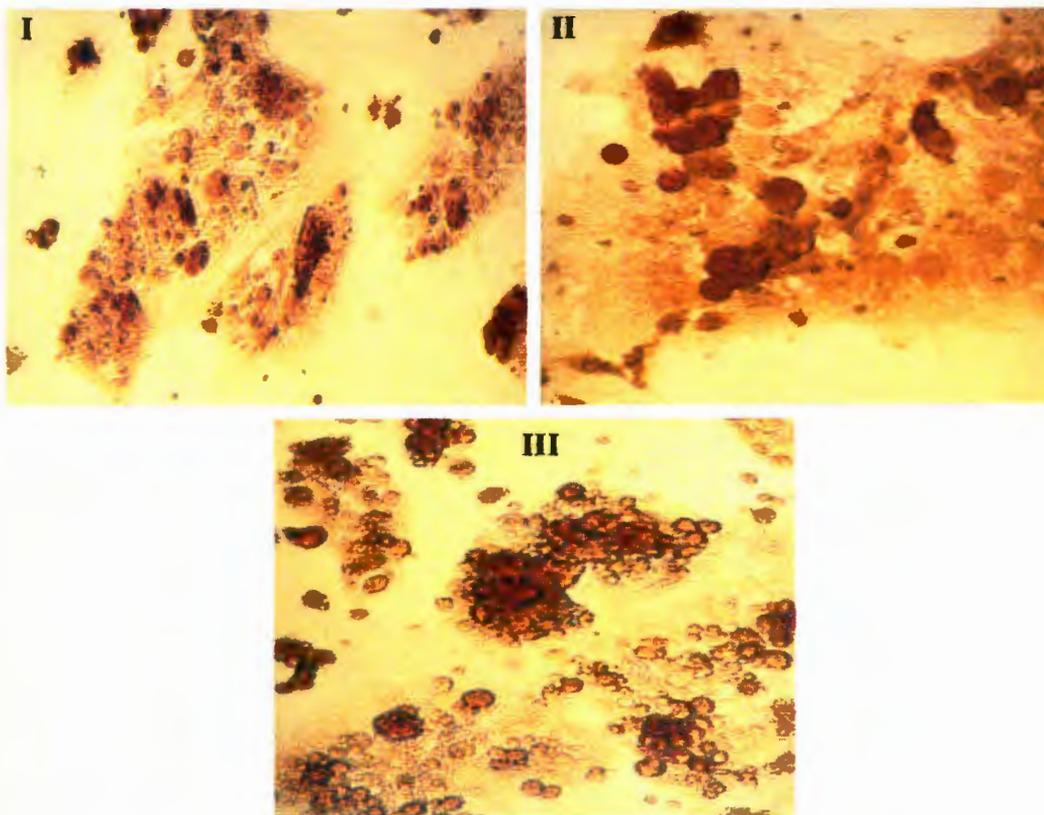


Figura 17. Se presentan las micrografías de los experimentos: I y II) tratados con anticuerpos policlonales 1:3000 y 1:1000 respectivamente (20X) y, III) con anticuerpo monoclonal 1:1500 (20X).

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se utilizaron pares de anticuerpos para valorar la reacción a la presencia de GH, los anticuerpos que se utilizaron son los mencionados en el protocolo.

Para el primer anticuerpo, el tiempo de incubación fue de aproximadamente 16 h, mientras que el segundo anticuerpo se dejó 2 h incubando a temperatura ambiente. Para revelar se utilizó una solución de diaminobencidina, poniéndola en contacto con los cortes de tejido entre 10 y 15 min, a temperatura ambiente y agitación moderada. Posteriormente se lavaron las muestras y se procedió a tomar las fotografías de cada una de ellas con ayuda del microscopio óptico, en

aumentos de 10, 40 y 100X. Las fotografías, se analizaron y se eligieron las más representativas. Los resultados se muestran en la figura 18:

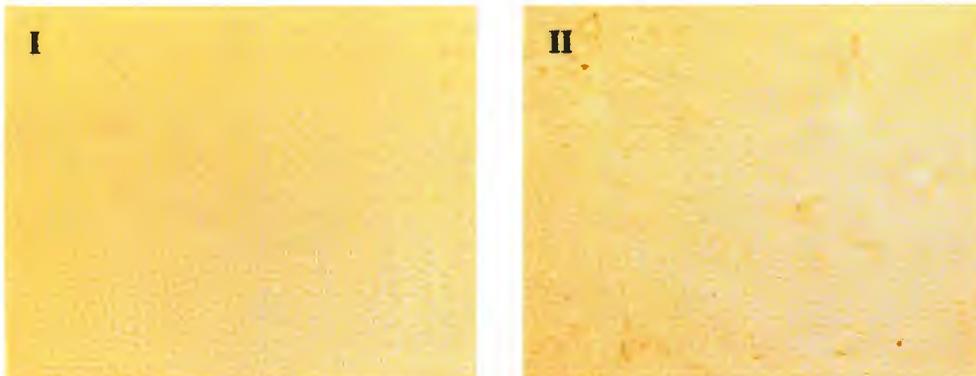


Figura 18. Se presentan las micrografías de la inmunohistoquímica en cortes de testículo: I) control negativo; II) anticuerpo preabsorbido con rcGH, en aumentos de 20X.

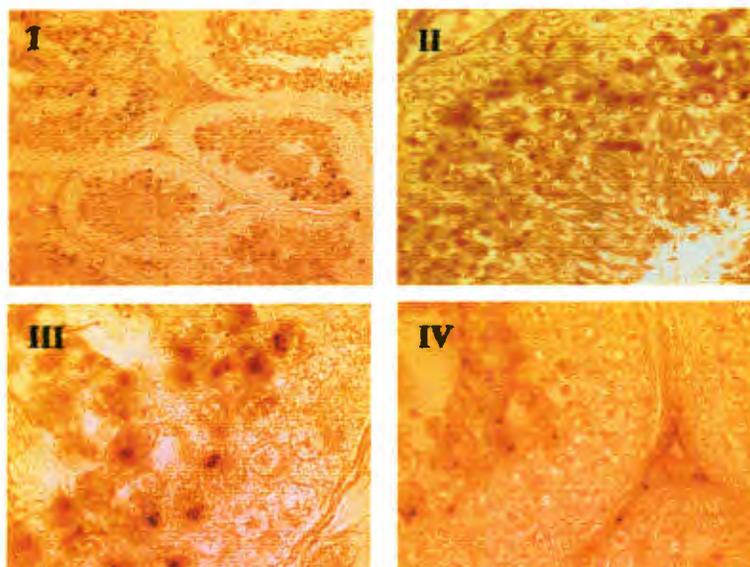


Figura 19. Se presentan los marcajes positivos con Ac α -cGH; I) vista panorámica de un corte histológico en donde se observan las diferencias en reacción a la presencia de cGH (20X); II) aumento de 40X para mejor resolución del tejido inmunoreactivo; III) aumento 100X en donde se observan células inmunoreactivas posiblemente pertenecientes al tipo germinales, pudiendo ser espermatocitos secundarios y espermatídes, y IV) aumento 100X en donde se observan células inmunoreactivas pertenecientes posiblemente a células intersticiales y mioides.

La inmunocitoquímica de testículo adulto demostró una distribución amplia de la inmunoreactividad en los túbulos seminíferos. Esta GH-inmunoreactiva estuvo presente en todos los túbulos pero no en el compartimento basal de las células de Sertoli, ni tampoco en espermatogonias, sin embargo, se observó una abundante presencia de esta proteína en espermatocitos primarios y secundarios y en espermátides en la parte luminal de los túbulos. Los espermatozoides no fueron teñidos (Figura 19 I, II y III) pero sí en células intersticiales (Leydig) y algunas musculares (mioides) (figura 19 IV).

La especificidad de la tinción fue corroborada utilizando como controles cortes teñidos sin el primer anticuerpo (figura 18 I) o con el primer anticuerpo preabsorbido con un exceso de rcGH (figura 18 II).

En ambos casos no se observó ninguna inmunoreactividad positiva en ninguna de las diferentes áreas de los túbulos seminíferos.

DISCUSIÓN

1) Estandarización de las técnicas

En cuanto a la estandarización de las técnicas, esto se realizó con el objetivo de conocer las técnicas y familiarizarse con ellas, y posteriormente, para determinar cual era el nivel de reproducibilidad.

Los resultados con respecto a la técnica de cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford, mostró que las 10 repeticiones llevadas a cabo con diferentes concentraciones de una proteína estándar (BSA), exhibió una pendiente de 0.05 ± 0.0009 , un coeficiente de correlación de 0.97, y un coeficiente de variación del 5%, por lo cual se comprobó que la técnica es confiable, y que se puede utilizar con un margen de error interensayo muy bajo.

Con respecto a la estandarización de la técnica de electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) tanto en condiciones reductoras como no reductoras, se utilizaron como muestra diferentes concentraciones de proteína estándar (BSA), y se obtuvo un peso molecular promedio experimental de 64 ± 2 kDa, mientras que el valor teórico fue de 60 kDa, para los experimentos en condiciones reductoras. Mientras que para los experimentos en condiciones no reductoras se obtuvo un valor experimental promedio de 49 ± 1 kDa y un valor teórico promedio de 49 ± 2 kDa; con los valores anteriores, se puede constatar que el método permite obtener un valor muy cercano al esperado o teórico. En cuanto a la curva patrón elaborada a partir de 5 repeticiones y utilizando los valores obtenidos de los pesos moleculares registrados en condiciones reductoras se obtuvo una pendiente de 1 ± 0.04 , un coeficiente de correlación de 0.96, y de variación de 10 %; para las condiciones no reductoras, la curva exhibió una pendiente de 1 ± 0.05 , un coeficiente de correlación de 0.94, y coeficiente de variación de 6 %. Con base en los datos anteriores podemos decir que la técnica de electroforesis desnaturalizante, es confiable en cuanto a confiabilidad y

reproducibilidad con un bajo error interensayo, y que representa una herramienta importante para la caracterización de proteínas.

Para la estandarización de la técnica de inmunotransferencia (Western-Blot), tanto en condiciones reductoras como no reductoras, utilizando como muestra diferentes concentraciones de extracto de hipófisis de pollos de 9 semanas de edad, y diferentes concentraciones de hormona de crecimiento recombinante (rcGH), teniendo como control los pesos moleculares. La curva patrón elaborada a partir de los pesos moleculares de las bandas inmunoreactivas obtenidas en condiciones reductoras, presentó una pendiente de 0.6378 ± 0.0412 , un coeficiente de correlación de 0.96, y coeficiente de variación de 9 %; para las condiciones no reductoras, la curva exhibió una pendiente 0.636 ± 0.047 , además de un coeficiente de correlación de 0.9482, y un coeficiente de variación de 8.9 %. Con los datos anteriores se llegó a la conclusión de que la técnica de inmunotransferencia, es reproducible y confiable además de tener un bajo error interensayo, y que al igual que la técnica de electroforesis representa una herramienta importante para la identificación y caracterización de proteínas.

2) Análisis de las variantes moleculares de cGH por Western-Blot y densitometría

Se determinó si la heterogeneidad molecular de la GH previamente demostrada en extractos de testículo, se mantenía al dispersar a las células y cultivarlas "in vitro" durante 48 hr., en un medio enriquecido. Los datos obtenidos al analizar los homogeneizados de células de testículo de pollo, por Western-Blot y densitometría, mostraron un patrón de bandas inmunoreactivas a cGH similar al ya observado en tejido testicular completo por Luna y Col. (2004), sin embargo, se presentó un cambio en la proporción de estas bandas con respecto a las horas de incubación con el secretagogo (Figuras 13 y 15).

Las muestras se analizaron en condiciones reductoras, con la finalidad de ver cuales de las variantes no resisten la reducción de los puentes disulfuro, y así poder observar las variantes de bajo peso molecular.

Las variantes moleculares caracterizadas en células de testículo de pollo, se presentan a continuación, y se comparan con las encontradas anteriormente en hipófisis, así como también se comparan con las detectadas en las células testiculares (Arámburo y Col., 2000; Luna y Col., 2004).

Tabla 2. Variantes moleculares de cGH detectadas en hipófisis, tejido testicular y células testiculares de pollo en condiciones reductoras.

Hipófisis	Tejido testicular	Células testiculares
---	---	58 kDa
52 kDa	52 kDa	52 kDa
45 kDa	45 kDa	45 kDa
40 kDa	40 kDa	40 kDa
---	35 kDa	35 kDa
32 kDa	32 kDa	32 kDa
29 kDa	29 kDa	---
26 kDa	26 kDa	26 kDa
---	23 kDa	20 kDa
	17 kDa	17 kDa
15 kDa	14 kDa	---

En cuanto a los resultados ya reportados por Luna y Col., 2004, para el caso de la heterogeneidad molecular encontrada en tejido testicular completo, se corroboró que se presentan bandas inmunoreactivas a cGH de diferentes pesos moleculares, y estas van desde los 52 hasta los 17 kDa, siendo la variante de 17

kDa la que representa la mayor proporción relativa que fue de 40 %, mientras que la variante que presentó la menor proporción relativa (1 %) fue la de 14 kDa, seguida por la variante de 23 kDa que exhibió un 3 % al igual que la variante de 40 kDa. En el caso de las variantes 29, 32 y 35 kDa estas presentaron una proporción relativa similar (7 %), una proporción relativa de 10 % se presentó para el caso de la variante de 52 kDa, y las variantes 26 y 45 kDa, presentaron la misma proporción (11 %) (Figura 15). A pesar de que el patrón de variantes de GH presente en el testículo es similar al encontrado en las células en cultivo, los valores de la proporción relativa son diferentes. En el caso del fragmento de 17 kDa este exhibió un 40% en testículo y este bajo hasta un 6 % en las células en cultivo en condiciones control.

Por otra parte, en testículo completo no fue detectada la variante de alto peso molecular de 58 kDa y esta se observó en células en cultivo tanto en condiciones control como estimulada con GHRH (2nM) a los diferentes tiempos de estimulación (2 y 16 hr.). De hecho a las 16 hr. de incubación la proporción llegó a un porcentaje de 52% tanto en condiciones control como en presencia de GHRH (Figura 15).

Se piensa que esta heterogeneidad al igual que la detectada en la GH hipofisaria es el resultado de modificaciones post-traduccionales de la proteína (Arámburo et al, 2000, 2001b).

En los homogeneizados de células testiculares se presentaron diferencias en las proporciones relativas de las variantes moleculares encontradas en condiciones experimentales incubadas en presencia de GHRH durante 2 y 16 h. En estas condiciones de incubación se observó que las variantes de alto peso molecular son las más representativas. En el caso de la variante 58 kDa, en las células incubadas en condiciones control representa aproximadamente el 20 %, en tanto que en las células tratadas con el secretagogo se incrementó la proporción de esta variante aproximadamente al doble (45%). Cabe mencionar

que la variante de 52 kDa que en las células control representa una de las más dominantes, en las células tratadas con secretagogo desaparece. También se observó que la variante de 17 kDa representa una proporción baja (aproximadamente 5 %) y en las células incubadas con secretagogo durante 2 h, no se presenta dicha variante. Las demás variantes moleculares (26, 32, 35 y 40 kDa) se encuentran relativamente constantes tanto en las células control como en las tratadas con la GHRH.

Los resultados anteriores proporcionaron elementos para la caracterización parcial de una proteína semejante a la cGH que es expresada en tejidos extrahipofisarios, en este caso en homogeneizados de células de testículo de pollo. Además de que se corroboró que la cGH presente en cultivos primarios de células testiculares exhibe un patrón de heterogeneidad molecular igual al encontrado en la glándula hipofisaria (Luna y Col., 2004). En este estudio se determinó la presencia de la cGH en cultivos primarios de células de testículo, y además encontramos que también a ese nivel se exhibe un patrón de heterogeneidad molecular.

Al comparar el patrón de bandas inmunoreactivas a GH vimos que coincide en ambas muestras, encontrándose similitudes en las variantes moleculares encontradas, pero al analizar las proporciones relativas de cada variante entre las muestras, sí encontramos importantes diferencias, lo que nos hace pensar en diferentes procesos postraduccionales a que es sometida la proteína, ya que la mayoría de las formas moleculares de GH en aves parecen derivar de modificaciones postraduccionales (Arámburo, 1990; Houston, 1988; Montiel, 1992). Cuando se compara el tejido testicular con los cultivos primarios de células testiculares, se ve que en el primero las variantes de bajo peso molecular son las dominantes, mientras que en los cultivos primarios son las de alto peso molecular (Figura 15). Estos resultados permiten proponer que tal diferencia se pueda deber a que en el tejido las células tienen una comunicación más eficiente, además de que puede haber factores necesarios para que se produzca la variante

submonomérica por procesamiento proteolítico (fragmento 17 kDa), tales como las enzimas del tipo trombina y/o caterpsina que ya han sido detectadas en estudios "in vitro" (Arámburo, 1991; 1993; 2001), mientras que al dispersar las células y someterlas a cultivos primarios, la comunicación intercelular se pierde o bien se vuelve menos eficiente y se pueden perder los factores enzimáticos necesarios, lo cual está provocando que las variantes oligoméricas sean las predominantes.

Los resultados obtenidos mediante la inmunocitoquímica, en la cual se utilizaron dos diferentes anticuerpos contra GH para detectar la presencia de células con inmunoreactividad positiva fueron que efectivamente se presentó una reacción inmuno-positiva en algunos tipos celulares, y que esto se corroboró al utilizar controles negativos tratados con anticuerpo preabsorbido con rcGH. Por otro lado, no se pudo determinar con precisión el tipo celular que teñía inmunopositivamente en las células dispersas, para poder determinar la localización de la cGH se realizó un análisis de inmunohistoquímica y en cortes incubados en presencia de anticuerpos específicos contra GH determinaron la distribución de GH en diferentes tipos celulares. Se detectó una inmunoreactividad positiva en células intersticiales (Leydig), células germinales (espermátides y espermatoцитos primarios y secundarios), y células epiteliales (mioides) (Figura 19). Cabe mencionar que para poder asegurar qué tipos celulares son los que presentan la reacción a la GH sería necesario primeramente tener los cultivos marcados molecularmente para identificar las diferentes poblaciones celulares aisladas o bien las diferentes subpoblaciones en forma muy específica.

Al detectar la cGH presente tanto en el tejido testicular como en los cultivos primarios del mismo tejido, proponemos que la hormona de crecimiento y sus variantes moleculares están jugando un papel importante en la diferenciación y desarrollo de las células germinales. Así como lo han detectado en algunos ensayos y en los que han visto que la falta de la hormona de crecimiento decrementa su efecto modulador en la diferenciación de las células germinales (Arsenijevic et al, 1989). Asimismo, también se ha determinado que esta hormona

hipofisaria regula la esteroidogénesis, gametogénesis y diferenciación gonadal (Zachmann, 1992). Por lo anterior, podemos suponer, que al detectar a la hormona de crecimiento se deba a que está siendo sintetizada localmente, y no sería de origen hipofisario.

Por otra parte, el hecho de que las variantes moleculares de GH se encuentren en estos cultivos primarios podrían plantear la posibilidad de que la hormona tenga una función parácrina y/o autócrina.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este proyecto obtuvimos las siguientes conclusiones:

- Estos datos claramente demostraron la presencia de una proteína parecida a la cGH tanto en el testículo de pollo, como en cultivos primarios del mismo tejido.
- En cuanto a los resultados electroforéticos y densitométricos se encontró una diversidad de variantes moleculares de la cGH, en condiciones Reductoras que van desde los 17 hasta los 58 kDa en células testiculares cultivadas.
- Se presentó similitud en cuanto a la presencia de una heterogeneidad molecular encontrada en células testiculares con respecto a la encontrada en hipófisis.
- Se observó una reducción en la proporción relativa de la variante de 17kDa en cultivos primarios de testículo con respecto al tejido completo.
- Mediante las técnicas inmunocitoquímicas, se observó que solo algunos tipos celulares fueron positivos a la presencia de GH: células germinales (espermatoцитos secundarios y espermátides), células intersticiales (Leydig) y musculares (mioides), lo que indica una distribución diferencial de dicha hormona.
- Todos estos datos permiten señalar que la hormona de crecimiento sintetizada a nivel local en las células testiculares pudiera tener un efecto autócrino y/o parácrino en el desarrollo testicular.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdel-Meguid SS, Shieh HS, Smith W. W., Dayringer HE, Violand BN & Bente LA. 1987. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 6434-6437.
2. Águila MC & McCann SM. 1987. Evidence that growth hormone-releasing factor stimulates somatostatin release in vitro via beta-endorphin. *Endocrinology* 120, 341-344.
3. Águila MC. 1998. Somatostatin decreases somatostatin messenger ribonucleic acid levels in the rat periventricular nucleus. *Peptides* 19, 1573-1579.
4. Arámburo C, Carranza M, Sánchez R, & Perera G. 1989. Partial Biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *General and Comparative Endocrinology.* 76: 330-339.
5. Arámburo C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S, & Sánchez R. 1990. Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): different bioactivities of cGH charge variants. *General and Comparative Endocrinology.* 80: 59-67.
6. Arámburo C, Navarrete S, Montiel JL, Sánchez R, & Berghman LR. 1991. Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): Evidence of G-cGH isoforms. *General Comparative Endocrinology.* 84: 135-146.
7. Arámburo C, Montiel JL, Sánchez R, Perera G, Navarrete S, Carranza M, García-Moreno J & Fenton B. 1993. La hormona del crecimiento de pollo: una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional. *Memorias del Congreso Conmemorativo de Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM*, pp. 483-499.
8. Arámburo C, Luna M, Carranza M, Reyes M, Martínez-Coria H, & Scannes CG. 2000. Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken. *Proceedings of the Society for Experimental Biology.* 223: 67-74.

9. Arámburo C, Carranza M, Reyes M, Luna M, Martínez-Coria H, Berumen L, & Scannes CG. 2001. Characterization of a bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone. *Endocrine*. 15: 231-2240.
10. Argente J & Chowen JA. 1994. Neuroendocrinology of growth hormone secretion. *Growth, Genetics and hormones*, 10, 1-5.
11. Arsenijevic Y., Wehrenberg W. ., Conz A., Eskol A., Sizonenko P. C., and Aubert M. L. 1989. *Endocrinology* 124, 3050-3059.
12. Asada N, Takahashi Y, Wada M, Naito N, Uchida H, Ikeda M, Honjo M. 2000. GH induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes stably expressing hGHR: analysis on signaling pathway and activity of 20K hGH *Molecular and cellular endocrinology* 162 : 121-129.
13. Baldwin G S, Grego B, Hearn M T, Knesel J A, Morgan F J, Simpson R J. 1983. Phosphorylation of human growth hormone by the epidermal growth factor-stimulated tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 5276-5280.
14. Bartke A., Chandrashekar V., Turyn D., et al. 1999. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 222, 113-123.
15. Baumann G, Stolar M W, Buchanan T A. 1986. The metabolic clearance, distribution, and degradation of dimeric and monomeric growth hormone (GH): implications for the pattern of circulating GH forms, *Endocrinology* 119: 1497-1501.
16. Baumann G., Davila N., Shaw M. A., Ray J., Liebhaber S. A., & Cooke N. E. 1991. Binding of human growth hormone (GH)- variant (placental GH) to GH-binding proteins in human plasma. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 1175-1179.
17. Baxter J B, Blalock J E, Weigent D A. 1991. Characterization of immunoreactive insuline-like growth factor-I from leukocytes and its regulation by growth hormone, *Endocrinology* 129: 1727-1734.
18. Berger P, Untergasser G, Hermann M, Hittmair A, Madersbacher S, & Dimhofer S. 1999. The testis-specific expression pattern of the growth hormone/placental lactogen (GH/PL) gene cluster changes with malignancy. *Human Pathology*, 30: 1201, 1206.

19. Berghman LR, Lens P, Decuypere E, Kühn ER, Vandensande F. 1987. Glycosylated chicken growth hormone. *General and comparative endocrinology* 68:408-414.
20. Bertherat J, Blue-Pajot MT & Epelbaum J. 1995. Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur. J. Endocrinol.* 132, 12-24.
21. Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Gourdjji D, Hammond C, Kordon C. 1998. Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cell. Mol. Neurobiol.* Feb; 18(1), 101-23 2001.
22. Boguszewski CL, Svensson P-A, Jansson T, Clark R, Carlsson LMS, & Carlsson B. 1998. Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83: 2878-2885.
23. Boockfor F R, Hoeffler J O, Frawley L S. 1986. Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. *The American journal of physiology* 250: E 103-105.
24. Breier B. H., Vickers M. H., Gravance C. G., and Casey P. J. 1996. *Endocrinology*. 137, 4061-4064.
25. Breier B. H., Vickers M. H., Gravance C. G., and Casey P. J. 1998. *Endocrine J.* 45 (Suppl.), S56-S60.
26. Carter Su C, Schwartz J, Smith L S. 1996. Molecular mechanism of growth hormone action. *Annual review of physiology* 58: 180-207.
27. Causey, G. 2000. *Avian Physiology*. Academic Press. Fifth edition. U.S.A.
28. Chen HT, Pan FK & Chang WC. 1988. Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Biochem. Biophys. Acta.* 949, 247-251.
29. Chen WY, Chen NY, Yun J, Wight DC, Wang XZ, Wagner TE & Kopchick JJ. 1995. Amino acid residues in the third alpha-helix of growth hormone involved in growth promoting activity. *Mol. Endocrinol.* 9, 292-302.
30. Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KP, Wells JA. 1991. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by single hormone molecule, *Science* 254: 821-825.

31. Darras V M, Rudas P, Visser T J, Hall T R, Huybrechts L M, Vanderpooten A, Berghman L R, Decupere E, Kühn E R. 1993. Endogenous growth hormone controls high plasma levels of 3,3',5-triiodothyronine (T3) in growing chickens by decreasing the T3-degrading type III deiodinase activity. *Dom. Anim. Endocr.* (10) 1: 55-65.
32. Debusse, M. 1998. Lo esencial en sistema endocrino y aparato reproductor. Editorial Harcourt Brace. Primera reimpresión. Madrid, España.
33. Devesa J, Lima L & Tresguerres JAF. 1992. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* 3, 175-183.
34. Diaz MJ, Dominguez F, Haro LS, Ling N, Devesa J. 1993. A 12-kilodalton N-glycosylated growth hormone-related peptide is present in human pituitary extracts. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* (77) 1:134-138.
35. Frankenne F., Rentier-Delrue F., Scippo M. L., Martial J & Hennen G. 1987. Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 64, 635-7.
36. Fujikawa T, Kaneko H, Hibasami H, Sakaguchi K, Alam KS, Tanaka M, Nakashima K. 1998. Inverse effects of 20K and 22K human growth hormone on the growth of T-47D human breast cancer cells in culture and in nude mice. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 719-724.
37. Glander H. J., Kratzsch J., Weisbrich C., and Birkenmeier. G. 1996. *Hum. Reprod.* 11, 2454-2460.
38. Goffin V, Shiverick KT, Kelly P & Martial JA. 1996. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals. *Endocr. Rev.* 4, 335-409.
39. Goodman H M, Tai L R, Ray J, Cooke N E, Liebhaber S A. 1991. Human growth hormone variants produces insuline-like and lipolytic responses in rat adipose tissue. *Endocrinology* 129: 1779-1783.
40. Gould J, Arámburo C, Capdevielle M, Scanes C G. 1995. Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane : a novel action of GH. *Life Sciences* (56) 8 : 587-594.

41. Handelsman D. J., Spaliviero J. A., Scott C. D., and Baxter R. C. 1985. *Acta Endocrinol.* 109. 543-549.
42. Haro L S, Lewis U J, Garcia M, Bustamante J, Martinez A O, Ling N C. 1996. Glycosilated human growth hormone (hGH): a novel 24 kDa hGH-N variant. *Biochemical and biophysical research communications* 228: 549-556.
43. Hart I C, Blake L A, Chadwick P M E, Payne G A, Simmonds A D. 1984. The heterogeneity of bovine Growth hormone. *The Biochemical journal* 218:573-581.
44. Harvey S, Decuypere E, Darras VM & Berghman L. 1991. Differential effects of T4 and T3 on TRH- and GRF- induced GH secretion in the domestic fowl. *Reprod. Nutr. Dev.* 31, 451-460.
45. Harvey S, Johnson CDM, & Sanders EJ. 1995. Extrapituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *Journal of Endocrinology.* 166: 489-502.
46. Harvey S, Azumaya Y, Hull KL. 2000. Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence?. *Can J Physiol Pharmacol.* Dec; 78(12), 1013-1028.
47. Hennen G, Frankenne F. 1987. Influence of placental proteins hormones on maternal physiology. *Annales d'endocrinologie (Paris)* 48:278-288.
48. Hennen G, Frankenne F, Scipo M L, Igout A, Closset J, Pirens G, Gomez F. 1988. Placental growth hormone. Significance relative to growth hormone and lactogen hormone. *Reproduction, nutrition, development* 28:1699-1706.
49. Houston B, Goddard C. 1988. Molecular Isoforms of growth hormone in the chicken pituitary Gland, *Journal of Endocrinology* 116:35-41.
50. Hu L, Lytras A, Bock ME, Yuen CK, Dodd JG, & Cattini PA. 1999. Detection of placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin-L RNA expression in normal and diabetic pregnancy by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 157: 131-142.

51. Hull K L, W C J Janssens, Harvey S. 1997 (a). Growth hormone: local actions in sites of synthesis, *Perspectives in Avian Endocrinology*, Journal of Endocrinology Ltd. Bristol. Ed. S. Harvey & R. Jephches: 375-386.
52. Hull K L, Harvey S. 1997 (b). Growth hormone: an immune regulator in vertebrates *Proceedings of the XIIIth International Congress of comparative Endocrinology*, Yokohama, Japón Monduzzi Editore (Italia) 893-898.
53. Hull KL & Harvey S. 2000. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Rev. Reprod.* 5, 175-82.
54. Ishikawa M, Tachibana T, Kamioka T, Horikawa R, Katsumata N. 2000. Comparison of the somatogenic action of 20kDa and 22kDa human growth hormone in spontaneous dwarf rats. *Growth hormone & IGF research* 10:199-206.
55. Kawauchi H, Maruyama S, Yasuda A Yamaguchi K, Shirabata K, Kubota J, Hirano T. 1986. Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Archives of biochemistry and biophysics* 244: 542-552
56. Kirbi y Froman. 2000. en Causey G. *Avian Physiology*. Academic Press. Fifth edition. U.S.A.
57. Kostyo JL, Skottner A, Brostedt P, Roos P, Cameron C M, Forsman A, Fryklund L, Adamafio NA, Skoog B. 1987. Biological characterization of purified native 20kDa human growth hormone. *Biochimica et biophysica acta* 925: 314-324.
58. Kuroda K. 1989. *Nippon, Hinyokika, Gakkai, Zasshi.* 80, 3-10.
59. Laron Z., and Klinger B. 1998. *Eer. J. Endocrinol.* 138, 176-180.
60. Lecomte CM, Renard A, Martial JA. 1987. A new natural hGH variant—17.5 kd—produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. *Nucleic Acids Research* (15) 16 :6331- 6348.
61. Lewis U J, Dunn J T, Bonewald L F, Seavey B K, Vanderlaan W P. 1978. A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *The Journal of biological chemistry* 253: 2679-2687
62. Lewis U J. 1984. Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Annual review of physiology* 46: 33-42.

63. Lewis U J. 1992. Growth hormone: what its it what does it do? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 3: 117-121.
64. Lewis U J, Sinha Y N, Lewis G P. 2000. Structure and properties of members of the hGH family: a review. *Endocrine J.* 47 S 1-8.
65. Liebhaber S A, Urbanek M, Ray J, Tuan R S, Cooke E N. 1989. Characterization and histologic localization of human growth hormone variant gene expression in the placenta. *The Journal of clinical investigation* 83: 1985-1991.
66. Liu J, Zheng D, Deng J, Xiao S, Liu S, Shi Y. 1997. Immunoreactive growth hormone in human peripheral T lymphocytes: encoding sequence of cDNA identical to that of the pituitary human growth hormone. *Chin Med J (Engl)* 1997 May;110(5):362-5.
67. Lombardi G, Colao A, Ferone D, Marzullo P, Orio F, Longobardi S, Merola B. 1997. Effect of the growth hormone on cardiac function. *Hormone Research* 48 suppl 4: 38-42.
68. Luna M., Martínez-Coria H., Carranza M., Huerta L., Harvey S., and Arámburo C. 2000. Abstract 33 20th Conference of European Comparative Endocrinologists. Centre Marine Science, Univ. of Algarve sept. Faro, Portugal.
69. Malamed S, Gibney J A, Cain L D, Perez M F, Scanes C G. 1993. Immunocytochemical studies of chicken somatotrophs and somatotroph granules before and after hatching. *Cell and tissue research.* 272: 369-364.
70. Malamed S., Deaver D., Perez F., Radecki S., Gibney J & Scanes C. G. 1997. Quantitative studies of chicken somatotrophs during growth and development by morphometry, immunocytochemistry, and flow cytometry. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 25-34.
71. Martens G J, Groenen P J, Braks AA, Baussemakers M J. 1989. Expression of two growth hormone genes in the *Xenopus* pituitary gland. *Nucleic Acids Research* 17: 3974.
72. Masuda N, Watahiki M, Tanaka M, Yamayawa M, Shimizu K, Nagai J, Nakashima K. 1988. Molecular cloning of cDNA encoding 20 kDa variant

- human growth hormone and the alternative splicing mechanism *Biochimica et biophysica acta* 949: 125-131.
73. McLeod J N, Worsley I, Ray J, Friesen H G, Liebhaber S A, Cooke E N. 1991. Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology* 128: 1298-1302.
 74. Miao R., Lin T. K., Bongso T. A., Zhou X., Cohen P., and Lee K. O. 1998. *Clin. Endocrinol.* 49, 235-239.
 75. Montiel J L, Berghman L R, Arámburo C. 1992. Identification of Growth hormone molecular variants in chicken serum. *General and comparative endocrinology* 88: 298-306.
 76. Müller EE, Locatelli V & Cocchi D. 1999. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol. Rev.* 79, 511-607.
 77. Nguyen AP, Chandorkar A, and Gupta C. 1996. The role of growth hormone in fetal mouse reproductive tract differentiation. *Endocrinology*, 148: 189-192.
 78. Nickel B E, Kardami E, Cattini PA. 1990. The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells. *Endocrinology* 126: 971-976.
 79. Ovesen P., Jorgensen J. O., Ingerslev J., Orskov H., and Christiansen J. S. 1998. *Ugeskr. Laeger.* 160, 176-180.
 80. Palmetshofer A, Zechner D, Luger TA, Barta A. 1995. Splicing variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblast. *Molecular and cellular endocrinology* 113: 225-234.
 81. Radecki SV, Deaver DR & Scanes CG. 1994. Triiodothyronine reduce growth hormone secretion and pituitary growth hormone mRNA in the chicken, in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205, 340-346.
 82. Ramachandran Ramesh, John A. Proudman and Wayne J. Kuenzel. 1996. Changes in pituitary somatotroph and lactotroph distribution in laying and incubating turkey hens. *General and comparative endocrinology.* 104, 67-75.
 83. Rand-Weaver, M., Kawauchi, H. & Ono, M. 1993. Evolution of structure of the growth hormone and prolactin family. En: *The endocrinology of growth / and metabolism in vertebrates* (MP Screibman, CG Scanes, PK Pang, Eds.), San Diego, Academic Press, Inc., pp. 13-35.

84. Ray J, Jones B K, Liebhaber S A, Cooke N E. 1989. Glycosilated human growth hormone variant. *Endocrinology* 125: 566-568.
85. Rechler M M, Nissley S P. 1990. Insulin like growth factors, en: *Peptide Growth factors and their receptors*, Sporn MB and Roberts AB editores, Heidelberg, Springer-Verlag 263-367.
86. Render C L, Hull K L, Harvey S. 1995 (a). Neural expression of the pituitary GH gene. *Journal of Endocrinology* 147: 413-422.
87. Render CL, Hull KL, & Harvey S. 1995 b. Expression of the growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine*. 3: 729-735.
88. Review. Growth Hormone. Roles in male reproduction. Kerry L. Hull and Steve Harvey. *Endocrine*, Vol. 13, No. 3. December, 2000.
89. Scanes CG, Daughaday W H. 1995 (a). Growth hormone action: "Growth" en : Harvey S, Scanes CG, Daughaday W H, *Growth Hormone* 1a Ed. Boca Ratón CRC Press
90. Scanes CG. 1995 (b). Growth hormone action: "lipid metabolism" en : Harvey S, Scanes CG, Daughaday W H, *Growth Hormone* 1a Ed. Boca Ratón CRC Press
91. Scanes CG. 1995 (c). Growth hormone action: "carbohydrate metabolism" en : Harvey S, Scanes CG, Daughaday W H, *Growth Hormone* 1a Ed. Boca Ratón CRC Press
92. Scanes CG, 1995. (d). Growth hormone action: "Immune function " en : Harvey S, Scanes CG, Daughaday W H, *Growth Hormone* 1a Ed. Boca Ratón CRC Press: 407-413
93. Scanes CG, Harvey S. 1995 (e). Growth hormone action: "protein metabolism" en : Harvey S, Scanes CG, Daughaday W H, *Growth Hormone* 1a Ed. Boca Ratón CRC Press
94. Scanes CG. 1995 (f). Growth hormone action: "Reproductive function" en: Harvey S, Scanes CG, Daughaday W H, *Growth Hormone* 1a Ed. Boca Ratón CRC Press

95. Scanes CG. 1995 (g). Growth hormone action: "osmorregulation" en : Harvey S, Scanes CG, Daughaday W H, Growth Hormone 1a Ed. Boca Ratón CRC Press
96. Scanes CG. 1995 (h). Growth hormone action: "endocrine function" en : Harvey S, Scanes CG, Daughaday W H, Growth Hormone 1a Ed. Boca Ratón CRC Press
97. Scanes CG, Duyka D R, Lauterio T J, Bouen S J, Huybrechts L M, Bacon W L, King D B. 1986. Effect of chicken growth hormone, triiodothyronine and hypophysectomy in growing domestic fowl. *Growth* (50) 1: 12-31.
98. Schwärzler P, Untergasser G, Hermann M, Dimhofer S, Abendstein B, Madersbacher S, & Berger P. 1997. Selective growth hormone/placental lactogen gene transcription and hormone production in pre- and postmenopausal human ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82: 3337-3341.
99. Shoham Z., Conway G. S., Ostergaard H., Lahlou N., Bouchard P., and Jacobs H. S. 1992. *Fertil. Steril.* 57, 1044-1051.
100. Sinha YN, Gilligan TA. 1984. A "20K" form of growth hormone in the murine pituitary gland. *Proc Soc Exp Biol Med* (177) 3 :465-474
101. Sinha YN, Jacobsen BP. 1987. Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations. *Biochemical and biophysical research communications.* (145) 3: 1368-1375.
102. Sinha YN, Klemcke HG, Maurer RR, Jacobsen BP. 1990. Changes in the glycosylated and nonglycosylated forms of prolactin and growth hormone in lean and obese pigs during pregnancy. *Endocrinology* (127) 1:410-418
103. Sinha YN, Ott K, Vanderlaan WP. 1987. Detection of multiple PRL- and GH-like proteins in human pituitary by Western blot analysis. *Am J Med Sci.* (294) 1:15-25.
104. Sisson S., y Grossman J. D. 1982. Anatomía de los animales domésticos. Masson, S. A. Quinta edición. España.

105. Skibeli V, Anderson O, Gautvik KM. 1990. Purification and characterization of Atlantic salmon growth hormone and evidence for charge heterogeneity. *General and comparative endocrinology* 80: 333-344.
106. Sturkie PD. 1986. *Avian Physiology*. 4^a. ed. USA, Springer-Verlag.
107. Tanaka M, Hosokawa Y, Watahiki M, and Nakashima K. 1992. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene* 112:235-239.
108. Tai PK, Liao JF, Chen E H, Dietz J, Schwartz J, Carter-Su C. 1990. Differential regulation of two glucose transporters by chronic growth hormone treatment of cultured 3T3-F442A adipose cells. *The Journal of biological chemistry* 265: 21828-21834.
109. Tresguerres, J.A.F. 1992. *Fisiología humana*. Editorial Mc.Graw-Hill-Interamericana de España. Madrid.
110. Uchida H, Banba S, Wada M, Matsumoto K, Ikeda M, Naito N, Tanaka E, Honjo M. 1999. Analysis of binding properties between 20 kDa human growth hormone (hGH) and hGH receptor (hGHR): the binding affinity for hGHR extracellular domain and mode of receptor dimerization. *Journal of molecular endocrinology*. 3:347-53
111. Untergasser G, Kranewitter W, Schwarzler P, & Berger P. 1997. Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 130: 53-60.
112. Untergasser G, Hermann M, Rumpold H, & Berger P. 1998. Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis. *European Journal of Endocrinology*, 139: 424-427.
113. Wada M, Uchida H, Ikeda M, Tsunekawa B, Naito N, Banba S, Tanaka E, Hashimoto Y, Honjo M. 1998. The 20-kilodalton (kDa) human growth hormone (hGH) differs from the 22-kDa hGH in the complex formation with cell surface hGH receptor and hGH-binding protein circulating in human plasma. *Molecular endocrinology* 12: 146-156.

114. Wang JJ. 1989. Immunocytochemical demonstration of the binding of growth-related polypeptide hormones on chick embryonic tissues. *Histochemistry*. 93: 133-141.
115. Wu H, Devi R, Malarkey WB. 1996. Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system a clinical Research center study . *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81: 1278-1282.
116. Yamaguchi K, Yasuda A, Kishida M, Hirano T, Sano H, Kawauchi H. 1987. Primary structure of ell (*Anguilla japonica*) growth hormone. *General and comparative endocrinology* 66: 447-453.
117. Yasuda A, Yamaguchi K, Papkoff H, Hirata T, Kawauchi H. 1989. The complete amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle (*Chelonia Mydas*) *General and comparative endocrinology* 73: 242-251.
118. Yasuda A, Yamaguchi K, Noso T, Papkoff H, Polenov A L, Nicoll C S, Kawauchi H. 1992. The complete amino acid sequence of growth hormone from sturgeon (*Acipenser guldenstadti*) growth hormone. *Biochimica et biophysica acta* 1120: 297-304.
119. Yoshizato H, Tanaka M, Fujikawa T, Higashimoto Y, Shimizu A, Nakashima K. 2000. 20 kDa human growth hormone (20K hGH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene expression at lower concentrations than 22K hGH in hGH receptor-expressing Ba/F3 cells. *Endocr. J* 47 Suppl:S37-40.

ANEXOS

Anexo 1.

Cuantificación de Proteínas

El ensayo de cuantificación de Proteínas basado en el método de Bradford (1976), es un procedimiento simple y exacto utilizado para determinar la concentración de proteínas en solución en una muestra dada.

Involucra la adición de un colorante ácido (Azul de Comassie® G-250) a una solución de proteína, y después se mide la absorbancia a 595 nm, y se compara contra una curva patrón realizada con un estándar de proteína (generalmente albúmina sérica bovina), se obtiene entonces una medida relativa de la cantidad de proteínas en la muestra problema.

El colorante Azul de Comassie, se une principalmente a residuos aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina (Compton 1985).

Procedimiento

Microensayo

- Preparar de 3 a 5 diluciones de una proteína estándar que sea representativa de la solución de proteína que va a ser examinada. El rango lineal del ensayo para la albúmina sérica bovina (BSA) es de 1.2-10 µg/ml. Mientras que para el IgG el rango lineal es de 1.2-25 µg/ml.

- Colocar 800 µl de la solución estándar o muestra en tubos de vidrio limpios y secos. Normalmente se realizan duplicados o triplicados de cada muestra o dilución del estándar.

- Adicionar a cada tubo 200 µl del reactivo de Bradford y agitar bien cada tubo.

- Incubar a temperatura ambiente cada tubo por lo menos 5 minutos y como máximo una hora. La absorbencia irá incrementándose con el tiempo.
- Medir la absorbencia a 595 nm.

Preparación de la solución stock para la curva :

Solución requerida: 0.1µg/µl

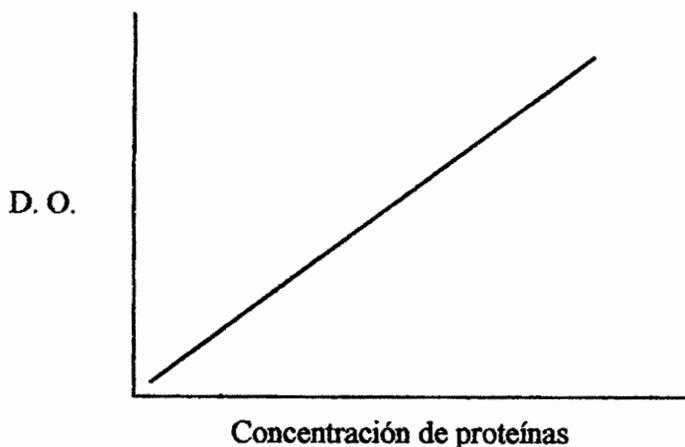
colocar 93µl de la solución patrón de BSA (1.29µg/µl) mas 1,197µl de H₂O DD.

Tubo	Concentración de BSA (µg/µl)	Volumen de la solución de BSA (µl)	H ₂ O DD (µl)	Reactivo de color (µl)
1	-	-	800	200
2	1	10	790	200
3	5	50	750	200
4	10	100	700	200
5	15	150	650	200
6	20	200	600	200

Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

Calcular la regresión lineal o realizar la curva para interpolar los valores de absorbencia de las muestras no conocidas en la curva.

Grafico:



Anexo 2.

Electroforesis

Es una técnica basada en el transporte de partículas cargadas con respecto al medio en donde se encuentran inmersas, lo anterior mediante la acción de un campo eléctrico. De manera general las partículas cargadas son iones y el medio es un líquido. Un punto importante es que se mantiene una constante dieléctrica lo suficientemente alta para mantener las partículas en forma ionizada y no agregada.

La carga neta de las moléculas depende del pH del medio, lo cual influye en la movilidad de la molécula.

La electroforesis puede operar como un proceso cinético o de equilibrio:

- a) Cinético: toma en cuenta las velocidades relativas del movimiento de los iones en un medio uniforme y un campo eléctrico constante.
- b) Equilibrio: los solutos logran posiciones características de equilibrio en un gradiente estacionario.

Además de la carga de la molécula, hay otros factores que influyen en el desplazamiento de la misma, entre ellos se encuentran la fricción, el grado de ionización, la producción de calor, entre otras.

Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Soluciones utilizadas

Solución A

30 % Acrilamida ; 0.8 % bis acrilamida

30 g de Acrilamida

0.8 g de N'N'-bis-metilen-acrilamida

para 100 ml de Agua Desionizada

Se mezclan con agitador magnético, y se filtran en papel Whatman No. 1. Esta solución se debe conservar a 4 °C cubierta con papel aluminio o en recipiente de color ámbar porque es sensible a la luz.

Nota: Manejarla con guantes ya que es un compuesto muy tóxico.

Solución B: Amortiguador para el gel Separador (inferior)

1.5 M Tris -HCl pH 8.8

18.15 g de Tris Base

Mezclar con 50 ml de Agua desionizada , agregar HCl hasta que el pH sea de 8.8 aforar a 100 ml y conservar a 4 °C.

Solución C: Amortiguador del gel concentrador (superior)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8

6 g de Tris Base

Mezclar con 50 ml de Agua desionizada , agregar HCl hasta que el pH sea de 6.8 aforar a 100 ml y conservar a 4 °C.

Solución D: SDS 10%

5 g de SDS

Aforar a 50 ml y conservar a 4°C.

Solución F: Amortiguador del Electrodo (Buffer de corrida) 5X pH 8.3

Tris base: 9 g

Glicina: 43.2 g

SDS: 3 g

Ajustar a 600 ml mezclar y guardar a 4 °C.

Solución E: Amortiguador de la muestra

Tris - HCl 0.5 M, 10 % SDS pH 6.8

4 ml de H₂O

Solución C: 1.0 ml

Solución D: 1.6 ml

Glicerol 0.8 M

Azul de Bromofenol: 0.2 ml (0.5 %)

2 β mercaptoetanol: 0.4 ml (solo para condiciones reductoras)
para condiciones no reductoras se colocan inicialmente 4.4 ml de H₂O.

PSA: Persulfato de amonio 10 %

100 mg de Persulfato de Amonio en 1 ml de H₂O

Preparar fresco.

Solución para teñir geles

Azul Brillante de Coomassie R-250: 0.1%

Metanol: 40%

Ácido Acético: 10%

Solución desteñidora

Metanol: 40%

Acido Acético: 10%

Diluir en agua desionizada.

Solución para secar geles

Etanol: 35%

Glicerol: 2%

Se diluyen en agua desionizada.

Preparación de los geles

Los vidrios deben ser lavados con las yemas de los dedos usando agua y jabón y se secan con aire. Posteriormente se limpian con una gasa impregnada con solución amoniacal al 10% o con alcohol con el objeto de quitar la grasa, esto con la finalidad de que la acrilamida polimerice bien.

Las soluciones antes de ser utilizadas se deben atemperizar, sumergiendo los recipientes en un baño de agua.

Para montar el Kit, se debe de colocar el ensamblador en la cuneta de la torre con las pestañas hacia arriba y los tornillos hacia atrás, colocar los vidrios en el ensamblador (el vidrio más pequeño va hacia el frente), empujar con la placa de plástico los separadores hasta que se encuentren en los extremos del ensamblador totalmente verticales. Con el acrílico transparente presionar el ensamblador y apretar los tornillos superiores. Verificar la alineación y apretar tornillos inferiores.

Acomodar los ensambladores en la torre. Presionar el acrílico del ensamblador sobre el hule hasta que se inserte el ensamblador en la pestaña de la torre (45° empuje hacia abajo y atrás).

Pesar el persulfato de amonio (solución preparada fresca cada vez).

Preparar la solución del gel separador según la concentración requerida (ver tabla), antes de adicionar el SDS y los catalizadores es necesario desgasificar durante 5 minutos. Una vez desgasificado añadir los catalizadores.

GEL RESOLVEDOR					GEL CONCENTRADOR 4%	
	7.5%	10%	12%	15%		
H ₂ O (ml)	4.85	4.35	3.35	2.35	H ₂ O (ml)	3.05
Solución B (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	Solución C (ml)	1.25
Solución A (ml)	2.5	3.0	4.0	5.0	Solución A (ml)	0.65
DESGASIFICAR POR 5 MINUTOS						
Solución D (μl)	100	100	100	100	Solución D (μl)	50
TEMED (μl)	5	5	5	5	TEMED (μl)	5
PSA 10%(μl)	50	50	50	50	PSA 10%(μl)	25

Llenar el espacio entre los vidrios hasta 2 cm antes del borde del vidrio más pequeño. Con una jeringa Hamilton cubrir con agua la interfase para evitar la formación de meniscos. Se deja polimerizar, aproximadamente 25 min.

Se prepara la solución del gel concentrador (4%) con las mismas indicaciones, colocar la solución sobre el gel separador ya formado (quitar el agua) casi hasta el borde. Introducir el peine del grosor y número de pozos deseado (tiene que ser del mismo grosor que lo separadores). Aplicar más solución hasta cubrir los bordes. La polimerización tarda aproximadamente otros 30 min.

Preparar las muestras a analizar en volúmenes finales adecuados al tipo de peine utilizado (el tamaño del pozo determina la cantidad de muestra que se va a colocar) Para peines de 10 pozos y un mm de grosor se trabaja con volúmenes de aproximadamente 10 μ l de muestra y se adicionan otros 20 μ l de amortiguador de muestra (que contiene glicerol para que por efecto de la densidad se evite la difusión hacia el amortiguador de corrida).

Las muestras se hierven durante 5 minutos.

Para desarrollar la técnica se siguen las siguientes indicaciones:

- Montar la cámara con los geles asegurándose de que el hule selle bien para evitar fugas.
- Retirar el gel no polimerizado, es posible lavar los pozos con agua y después secarla (puede ser con tiras de papel filtro).
- Colocar el amortiguador de corrida en el tanque y colocar la cámara en su interior. Llenar el centro de la cámara con amortiguador.
- Tapar el tanque con la tapa plástica que tiene los electrodos y conectarlos a la fuente de poder.
- Encender la fuente de poder con un voltaje constante : 100v hasta que las muestras pasen del gel concentrador al gel resolvidor (aproximadamente 20 minutos) y después a 150 V hasta el final del gel (evitar que se salga el frente).

- Desconectar la fuente y sacar la cámara; retirar los ensambladores de la base y despegar los vidrios utilizando los separadores (haciendo palanca), despegar el gel del vidrio y colocarlo en un recipiente que tiene solución para teñir geles. Si no se desea teñir el gel, puede prepararse para la transferencia.

Tinción y secado de los geles

Los geles se tiñen en la solución desteñidora durante al menos 2 horas, y después de esto, se pasa a lavarlos durante 3 veces con solución desteñidora, 15 minutos cada vez. Se prepara la solución secadora y se montan los geles entre dos hojas de celofán previamente humedecidas en la misma solución, se tensionan las hojas, se sacan las burbujas y se sujetan con broches. Se dejan secar al ambiente durante 24 horas, se procede a cortarlos de acuerdo a su tamaño y se sigue con su análisis.

Anexo 3.

Immunoelctrotransferencia (Western Blot)

Esta técnica se basa en la utilización de anticuerpos marcados, como herramientas de detección y cuantificación de alguna molécula en particular, además de identificar proteínas específicas después de que estas han sido separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida.

En este ensayo, se lleva a cabo la transferencia de la proteína hacia una matriz (nitrocelulosa o PVDF), mediante la aplicación de un campo eléctrico (*Towbin 1979*).

Para revelar la matriz, se usa un sustrato quimioluminiscente (reacción de formación de ésteres de acridina).

Soluciones utilizadas

Buffer de Transferencia: TRIS 0.025 M, Glicina 0.192M, Metanol 20%, PH 8.3

TRIS: 9.09 g

Glicina: 43.2 g

Metanol: 600 ml

Aforar a 3 litros con Agua desionizada.

Método

- Realizar una electroforesis (SDS-PAGE), después equilibrar el gel durante 15 Minutos con amortiguador de transferencia.
- Humedecer la membrana de Nitrocelulosa (0.45 μ m de poro) que va a ser utilizada como matriz en buffer de transferencia (aproximadamente el mismo tiempo que se equilibra el gel).
- Se arma el "sándwich" dentro de un recipiente o charola con suficiente amortiguador de transferencia utilizando un cassette plástico; (el lado negro del cassette se coloca abajo y el transparente arriba) utilizando guantes en todo momento, se coloca sobre el lado negro del cassette una fibra (scotch brite) bien impregnada de la solución de transferencia .
- Sobre la fibra se coloca una hoja de papel filtro igualmente impregnada con la solución de transferencia.
- Sobre el papel filtro se coloca el gel procurando que no queden burbujas entre el papel y el gel, sobre el gel se coloca la membrana de Nitrocelulosa, evitando también la formación de burbujas, luego se pone otro papel filtro prehumedecido y por último otra fibra (scotch brite) humedecida; cerrar entonces el cassette.
- Se deposita el cassette dentro de la cámara orientando los electrodos de modo que el gel quede orientado hacia el lado negativo y la membrana hacia el lado positivo (que coincidan el lado negro del cassette con el lado negro de la cámara). Agregar el buffer suficiente para cubrir los electrodos.
- Colocar dentro de la cámara un agitador magnético (para mantener en agitación durante la corrida) y un refrigerante (hielo) para evitar que se caliente el sistema.

- Tapar la cámara y conectarla a la fuente de poder. Correr a 200 mA durante una hora.
- Transcurrido el tiempo se apaga la fuente de poder se desconecta la cámara y se saca el "sándwich" con cuidado, al desmontarlo se utilizan guantes para no manchar la membrana.

Anexo 4.

Quimioluminiscencia

Soluciones Utilizadas

Amortiguador Salino de Tris (TBS) 5X: Tris 100 mM, NaCl 2.5M, pH 7.5

Tris: 12.11 g

NaCl: 146.1 g

Adicionar aproximadamente 900 ml de Agua desionizada estéril, con agitación ajustar el pH con HCl y aforar a un litro. Conservar a 4 °C.

Solución Bloqueadora: leche Descremada en TBS al 5%

Leche Descremada: 5 g

TBS: 100 ml

Pesar la leche y disolver en TBS con agitación constante.

Solución de Lavado: TTBS, pH 7.5

Tris: 20mM

NaCl: 500nM

Tween 20: 0.05%

Medir un litro de TBS 1X, y agregar 500 µl de Tween 20.

Solución de Primer Anticuerpo

Amortiguador: TTBS leche descremada al 1%

Leche descremada: 2 g

TTBS: 200ml

Pesar la leche y disolver en TTBS, agregar 20 μ l del primer anticuerpo (α -cGH) con un título adecuado (1:3000) en 60 ml. Al añadir el anticuerpo mezclar muy lentamente.

Solución de Segundo Anticuerpo anticuerpo conjugado Bio Rad

(goat anti –rabbit IgG horseradish peroxidase)

Diluir 20 μ l del anticuerpo conjugado (dilución 1:3000) en 60 ml de TTBS con leche al 1%.

Sustrato

El sustrato utilizado es ECL (ECL Western blotting detection reagents Amersham Pharmacia Biotech) y se prepara de acuerdo a las instrucciones del kit mezclando partes iguales de las dos soluciones (según instrucciones del proveedor), esta mezcla se diluye 1:1 con agua desionizada.

La reacción está basada en la oxidación del compuesto PS-3 Lumigen para generar ésteres de acridina (intermediarios de la reacción) que producen luminiscencia.

Procedimiento

Se colocan las membranas del Western-Blot en un recipiente con amortiguador TBS pH 7.5 para lavarla durante 10 minutos repetir el lavado tres veces.

Después se bloquea la membrana con 30 ml de leche descremada al 5% en TBS pH 7.5% durante 2 horas.

Se lavan las membranas con TTBS durante 10 minutos, repetir este lavado dos veces más.

Se procede a incubar con el primer anticuerpo α -cGH en TTBS con leche al 1% durante toda la noche con agitación constante (la dilución del anticuerpo es 1:10,000).

A continuación se lavan las membranas con 30 ml de TTBS durante 10 minutos, repitiéndolo en 3 ocasiones.

Se pasa a la incubación con el segundo anticuerpo α -IgG-HRP (peroxidasa) dilución 1:3000 en TTBS leche al 1% durante dos horas con agitación constante.

Posteriormente se lavan las membranas con TTBS pH 7.5 durante 15 minutos en 3 ocasiones, para después lavar con TBS pH 7.5 (para eliminar el Tween) por 15 minutos en 3 ocasiones.

Revelado

1) Quimioluminiscencia

Se preparan aproximadamente 5 ml (por cada membrana) de la mezcla del sustrato.

Se incuba durante 5 minutos con agitación moderada. Se escurren y se colocan en una bolsa de plástico sacando las burbujas.

Autoradiografía

En un cassette se coloca la bolsa con las membranas y sobre ellas un film Kodak Biomax light film (Eastman Kodak Company). Se exponen por 15 segundos o un minuto.

Se toma el film con unas pinzas y sumergirla en la solución de revelado por un minuto, lavarla con agua por un minuto, sumergirla en la solución fijadora por un minuto, finalmente se lava una vez más con agua por un minuto. Se escurren y se procede a su análisis.

Esta metodología se debe realizar en un cuarto oscuro y frío.

2) Diaminobencidina

Se colocan las membranas en un recipiente con aproximadamente 30 ml de Solución de diaminobencidina, y se dejan entre 10 y 15 min, hasta que las bandas se observen, entonces se enjuagan en agua desionizada durante 15 min, se escurren y se guardan en papel filtro hasta su posterior análisis.

Anexo 5.

Cultivo celular

Esta técnica ayuda a resolver problemas básicos de la biología celular, ya que al mantener y propagar las células fuera de su organismo de procedencia implica controlar las condiciones de su entorno, cuando la organización y la influencia de tejidos adyacentes se pierde, lo que permite conocer los requerimientos celulares mínimos. Mediante esta técnica se pueden obtener las siguientes ventajas: facilidad para obtener células en gran cantidad, la mayor parte de los cultivos solo contienen un único tipo celular, el gran número de diferentes actividades celulares que se pueden estudiar, oportunidad de estudiar la diferenciación celular, respuesta a fármacos, hormonas y otras sustancias activas, entre otras (González-Morán, 1996; Karp, 1996).

El primer paso para el cultivo es obtener las células. En el caso de que las células se obtengan a partir del propio organismo, es denominado un cultivo primario. El siguiente paso es la disociación celular, quitando el tejido con enzimas proteolíticas, a continuación se lava el tejido para liberarlo de la acción de las enzimas, y una vez disociadas se pueden cultivar directamente o someterlas a una separación según los tipos presentes y después cultivar cada uno de ellos (González-Morán, 1996; Karp, 1996).

Conteo celular

En aumento de 10 o 20X, se cuenta el número de células que se encuentran en el cuadrado formado por los 25 cuadrillos pequeños. Si el número de células es tal

que no se puede contar con claridad, se hacen diluciones de la muestra, y entonces se cuentan sólo cinco cuadrillos y se obtiene un promedio. Finalmente el número de células por mililitro se calcula con la siguiente fórmula:

$$\# \text{ CÉLULAS} = \# \text{ de células contadas} \times 25 \text{ (si es que se sacó promedio)} \times \text{factor de dilución} \times 10000.$$

Soluciones para Dispersión y Cultivo Celular

Solución de lavado 1 (adicionada con antibiótico)

1% de Estreptomicina / Penicilina en Hank's libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Solución de Colagenasa

Colagenasa tipo II 0.25% en Hank's libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Solución de lavado 2 (adicionada con antibiótico y suero fetal bovino)

1% de Estreptomicina / Penicilina y SFB 10% en Medio modificado de Dulbecco (DMEM).

Medio de cultivo adicionado con antibiótico

Streptomicina / Penicilina 1% y SFB 10% en DMEM-F12 1:1.

Anexo 6.

Tratamiento con secretagogo (GHRH)

Preparación de la Solución de tratamiento con secretagogo

1. Se pesan 13 μg de GHRH (PM = 5039.7 g/mol; 93 % de pureza, SIGMA[®]).
2. Se agregan 200 μL de NaOH 0.001 N y 800 μL de solución DMEM-F12
3. Se calcula la cantidad que se preparará:

$$\begin{aligned} 13000 \text{ ng GHRH} & \text{--- } 1000 \mu\text{L de solución} \\ (10.7 \text{ ng GHRH}) (70 \text{ ml}) & \text{--- } X \\ X & = 54.22 \mu\text{L de solución.} \end{aligned}$$

Anexo 7.

Inmunocitoquímica

Se basa en el uso de anticuerpos, los cuales al ser altamente específicos con un determinado antígeno, funcionan como sondas altamente específicas para investigar la presencia de su antígeno en un tejido particular, mediante técnicas analíticas. Dado que la reacción antígeno-anticuerpo no es visible con la microscopia estándar, los anticuerpos se deben marcar o conjugar con una sustancia que los haga visibles, de manera que no se interfiera con su especificidad de unión y puedan ser detectados (González-Morán, 1996; Karp, 1996).

Soluciones para la Inmunocitoquímica

- Solución fijadora: Paraformaldehído 4% en PBS 0.1 M.
- Solución de lavado 1: Tritón 0.5 % en PBS 0.1 M.
- Solución de lavado 2: PBS 0.1 M.
- Solución inhibidora de peroxidasas endógenas: H₂O₂ 1%, Tritón 0.5% en PBS 0.1 M.
- Solución bloqueadora: BSA 10%, Tritón 0.5% en PBS 0.1 M.
- Solución para diluir los primeros anticuerpos: BSA 1%, Tritón 0.5% en PBS 0.1 M.
- Solución para diluir los segundos anticuerpos: BSA 1% en PBS 0.1 M.
- Reactivo ABC: 70 µl de reactivo A (Vectastain), 70 µl de reactivo B en 3.5 ml de Pbs 0.1 M.
- Solución de revelado: DAB 0.003 gr, H₂O₂ 2.4 ml, en 12 ml de PBS 0.1 M.

Anexo 8.

Preparación de Extractos de células testiculares

En extractos de tejidos animales se encuentran presentes enzimas proteolíticas, las cuales actúan sobre aminoácidos específicos degradando algunas proteínas que pudieran ser de interés en un estudio en particular. Para eliminar ese efecto

en estudios celulares, es necesario tratar las muestras con una solución inhibidora de tales proteasas.

Complete mini[®] (Portease Inhibitor Cocktail Tablets, ROCHE[®]) es un cocktail inhibidor, que actúa eficazmente sobre las proteasas de serina y cisteína, además de las metaloproteasas y calpainas. Una tableta de dicho producto es suficiente para producir 10 ml de una solución inhibidora de proteasas.

La preparación de dicha solución es muy fácil y basta con agregar una pastilla de Complete mini a 10 ml de agua desionizada y agitar moderadamente hasta su disolución.