

27
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) HIPOFISIARIA DE POLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A

MARTHA ELIZABETH CARRANZA SALAS

MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO	1
INTRODUCCION	4
Hipófisis	5
Crecimiento	10
Hormona de Crecimiento en Mamíferos	11
Variantes de la GH en Mamíferos	14
Hormona de Crecimiento en Aves	22
Actividad Biológica de la GH en Aves	25
Regulación de la Secreción de la GH	26
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y METODOS	30
MATERIAL	30
Biológico	30
Soluciones Empleadas en la Realización de Electroforesis	30
Electroelución	33
Enfoque Isoelectrico	34
Bioensayo de la Hormona de Crecimiento de Pollo	34
METODOS.....	35
Extracción de la cGH	35
Purificación de la cGH	35
Determinación de la Cantidad de Proteína	40
Caracterización Bioquímica	41
Caracterización Biológica	46
RESULTADOS	50
Extracción	50
Purificación	50
Cromatografía Analítica	51
Cromatografía Preparatoria	51
Rendimiento	54
Caracterización Electroforética	54
Electroforesis en PAGE-TRIS	57
Electroforesis en PAGE-SDS	57

Determinación del PM de la cGH	57
Enfoque Isoeléctrico	63
Electroelución	63
Bioensayo	63
Comparación con otras GHs	68
DISCUSION	76
CONCLUSIONES	88
CARACTERISTICAS GENERALES DE AVES	90
BIBLIOGRAFIA	91
FE DE ERRATAS	102

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

- aa - aminoácido o aminoácidos.
- ACTH - Hormona adrenocorticotrópica.
- Ala - alanina.
- AMP - monofosfato de adenosina.
- AMP_c - monofosfato de adenosina cíclico.
- ARN - ácido ribonucleico.
- ARN_m - ácido ribonucleico mensajero.
- Asp - ácido aspártico.
- ATA - ácido tricloroacético.
- AUFS - unidades de absorbencia en la escala completa.
- bGH - hormona de crecimiento bovina.
- BSA - albúmina de suero bovino.
- Ca(OH)₂ - hidróxido de calcio.
- cGH - hormona de crecimiento de pollo.
- Cys - cisteína.
- d - dalton.
- DEAE-celulosa - dietil aminoetil celulosa.
- EGF - factor de crecimiento epidermal.
- FSH - hormona estimulante de los folículos.
- GH - hormona de crecimiento.
- Gln - glutamina.
- Glu - ácido glutámico.
- Gly - glicina.
- GRF - factor liberador de la hormona de crecimiento.
- H₃BO₃ - ácido bórico.
- HCl - ácido clorhídrico.

hGH - hormona de crecimiento humana.
His - histidina.
HPLC - cromatografía líquida de alta presión.
IEF - enfoque isoeléctrico.
K - potasio.
 KH_2PO_4 - fosfato ácido de potasio.
Leu - leucina.
LH - hormona luteinizante.
Met - metionina.
N - nitrógeno.
NaOH - hidróxido de sodio.
NGF - factor de crecimiento neural.
NIH - Institutos Nacionales de Salud.
OSH - hormona de crecimiento ovina.
PAGE - electroforesis en gel de poliacrilamida.
PG₂ - prostaglandinas.
Phe - fenilalanina.
pI - punto isoeléctrico.
PM - peso molecular.
PMSF - fenil metil sulfonil fluoruro.
PRL - prolactina.
rbGH - hormona de crecimiento bovina recombinante.
RIA - radioinmunoanálisis.
rGH - hormona de crecimiento de rata.
Rf - movilidad relativa.
SNC - sistema nervioso central.
SRIF - factor inhibidor de la liberación de la hormona de crecimiento.

S-S - puente disulfuro.
T₃ - triyodotironina.
T₄ - tetrayodotironina o tiroxina.
TEMED - tetrametiletilenediamina.
TRH - hormona liberadora de la tiotropina.
TRIS - Tris-(hidroximetil)-aminometano.
Trp - triptofano.
TSH - hormona estimulante de la tiroides.
UI - unidades internacionales.
Val - valina.

I N T R O D U C C I O N

Todos los sistemas vivos poseen la capacidad de integración de una amplia gama de actividades y procesos, además de estar sujetos a un cambio continuo.

La integración de las funciones corporales dependen tanto del sistema nervioso como del endócrino. Ambos sistemas emiten mensajes desde un centro de control hacia un órgano receptor y el efecto es un aumento o disminución en la actividad de este último.

En el sistema nervioso, los mensajes son impulsos eléctricos, los cuales se transmiten a través de prolongaciones neuronales, las fibras nerviosas; el impulso nervioso es conducido de una neurona a otra (la neurona se define como la unidad anatómo-funcional del sistema nervioso) por medio de la sinapsis, la cual representa la región de contacto entre neuronas o entre una neurona y una célula no nerviosa donde se transmiten acciones excitatorias o inhibitorias. En algunas la transmisión es eléctrica, como sucede cuando hay contacto directo de las membranas y donde el impulso nervioso pasa de una neurona a otra sin retardo; no obstante en la mayor parte de las sinapsis la transmisión es de carácter químico, esto es, se liberan transmisores específicos (neurotransmisores) y se desencadenan potenciales sinápticos. Es importante señalar que los mensajes en el sistema nervioso están involucrados en actividades rápidamente cambiantes (1).

Los mensajeros del sistema endócrino son sustancias químicas denominadas hormonas, las cuales son moléculas que transfieren

información desde un grupo de células hacia otro ubicado a cierta distancia del primero; para que esto se lleve a cabo es necesario que las hormonas sean vertidas al torrente sanguíneo y diseminadas hacia el órgano blanco. Estos mensajes actúan más lentamente que los impulsos nerviosos, modificando el comportamiento de sistemas metabólicos celulares. El sistema endócrino está constituido por glándulas endócrinas distribuidas en todo el organismo, siendo una de las más importantes la hipófisis, de ahí que se le ha llamado "glándula maestra". En la Fig. 1 se muestra un esquema de la anatomía de dicha glándula (2).

HIPOFISIS

Esta es una glándula endócrina que se localiza en la base del encéfalo y está protegida por la "silla turca" (depresión del hueso esfenoides); en realidad esta glándula es doble y cada porción tiene un origen embriológico distinto. La glándula está revestida por una cápsula de tejido conjuntivo que se prolonga a su interior separando la adenohipófisis (lóbulo anterior) y la neurohipófisis (lóbulo posterior). En cuanto a la vascularización, es el sistema porta hipotalámico-hipofisiario el que conecta al hipotálamo con la hipófisis; la sangre que entra pasa primero a través de una red capilar en el hipotálamo inferior, después por los vasos portales hipotalámico-hipofisiarios y por último a los senos hipofisiarios anteriores (3, 4).

La neurohipófisis está formada por la eminencia media, el tallo infundibular y el proceso infundibular. Su origen embrionario es

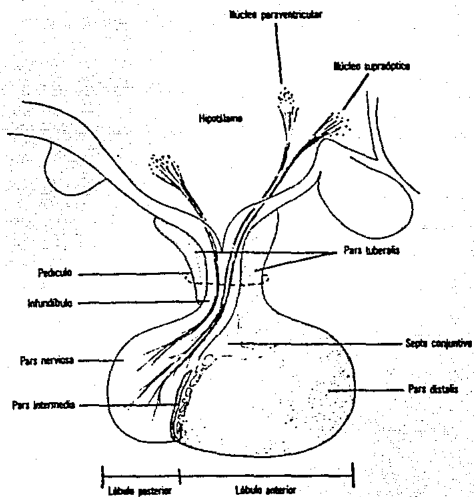


Fig. 1.- Anatomía de la hipófisis en mamíferos (De Junqueira, L.C., 1981 (2)).

nervioso, pues nace de un crecimiento hacia abajo de la pared del diencéfalo que se convierte en el suelo del tercer ventrículo, por lo que las células que la forman se parecen a la neuroglia, además de tener también numerosas fibras nerviosas. Esta porción de la hipófisis secreta dos hormonas: la vasopresina, que promueve la retención de agua y la ocitocina, que produce la contracción del músculo uterino y tiene un efecto lactogénico (3, 4, 5).

La adenohipófisis está dividida en los mamíferos en la pars distalis, la pars intermedia y la pars tuberalis; sin embargo en las aves, la pars intermedia no está presente (Fig. 2), por lo que la adenohipófisis en este grupo consta solamente de la pars distalis (la cual se divide en un lóbulo caudal y un lóbulo cefálico) y la pars tuberalis. Embriológicamente, nace de la bolsa de Rathke, es decir, se origina de una invaginación del ectodermo y del techo de la fosa bucal primitiva que crece en dirección craneal formando una cavidad (bolsa de Rathke), por consiguiente las células secretoras de la adenohipófisis son de carácter epitelial. Este lóbulo de la hipófisis está irrigado por los vasos porta-hipofisarios los cuales representan la ruta de los "factores de liberación e inhibición" hipotalámicos para el control de la adenohipófisis. Esta porción de la hipófisis se encuentra escasamente inervada.

Se sabe que la adenohipófisis secreta 7 hormonas diferentes (Tabla 1) cuya naturaleza química es proteínica o peptídica; dichas hormonas actúan no solamente sobre otras glándulas endócrinas, sino también sobre varios tejidos corporales que no son de naturaleza glandular.

En aves los estudios histológicos han arrojado evidencias acerca de la naturaleza histoquímica de las células de la adenohipófisis

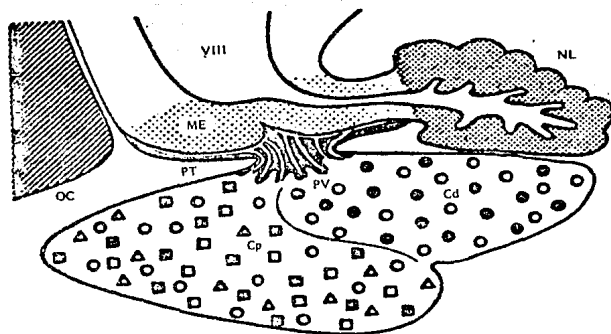


Fig. 2.- Esquema que muestra un corte sagital de la adenohipófisis de codorniz. Abreviaturas; Cd, lóbulo caudal; Cp, lóbulo cefálico; ME, eminencia media; NL, lóbulo neural; OC, quiasma óptico; PT, pars tuberalis; PV, vasos portales; VIII, tercer ventrículo. Símbolos: ● GH; ○, LH/FSH; ■, ACTH; □, PRL; △, TSH. (De Scanes, C.G., 1986 (6)).

NOMBRE	ABREVIATURAS	NATURALEZA QUIMICA	ORGANO BLANCO
Hormona Adrenocorticotrópica	ACTH	Péptido	Corteza Suprarrenal
Hormona Tirotrópica	TSH	Glucoproteína	Tiroides
Hormona de Crecimiento	GH	Proteína	Tejidos Corporales
Hormona Estimulante del Folículo	FSH	Glucoproteína	Ovario
Hormona Luteinizante	LH	Glucoproteína	Ovarios y Testículos
Prolactina	PRL	Proteína	Ovarios y Glándulas Mamarias
Beta Lipotropina	β -LPH	Péptido	Tejido Adiposo

Tabla 1.- Hormonas Adenohipofisarias (De Beck, 1977 (3) y Scanes, C.G., 1986 (6)).

(Fig. 2). Utilizando colorantes básicos y ácidos, como hematoxilina-eosina, se han observado células cromófilas y cromófobas; las cromófilas se han clasificado en basófilas y acidófilas según su afinidad a los colorantes de dicha naturaleza. A su vez, se han encontrado dos tipos de acidófilas empleando colorantes como naranja G, eritrocina, amarillo naftol y fucsina ácida: células A₁ en la región caudal, las cuales son homólogas a las del lóbulo anterior en los mamíferos y A₂ en la región cefálica, en esta región también se han encontrado basófilas. Con técnicas inmunohistoquímicas, se han evidenciado en la región caudal de la adenohipófisis células inmunoreactivas a hormona de crecimiento (GH), hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH), mientras que en la región cefálica, se ha encontrado inmunoreactividad para prolactina (PRL), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), FSH, LH y PRL (6, 7, 8).

CRECIMIENTO

El crecimiento es un fenómeno complejo que involucra el aumento de tamaño y división celular, así como la diferenciación de tejidos, desarrollo de órganos, incremento en tamaño y maduración del organismo (9). Existen diversos factores que regulan el crecimiento, como son la temperatura, sales, equilibrio de electrolitos y nutricionales, los cuales se han clasificado como extrínsecos (10, 11). Entre los factores intrínsecos se encuentran los genéticos y en los últimos años se ha establecido que además el crecimiento se encuentra bajo un estricto control hormonal en la mayoría de los vertebrados; uno de los factores hormonales más importantes es la hormona de crecimiento (GH).

Sin embargo, otras hormonas que tienen un papel importante en el crecimiento son: hormonas tiroideas $-T_3$ y T_4- , somatomedinas, insulina, glucocorticoides (corticosterona y cortisol), andrógenos, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento neural (NGF), 1,25- dihidroxicolecalciferol (12, 13).

HORMONA DE CRECIMIENTO EN MAMIFEROS

La hormona de crecimiento es una molécula proteínica secretada por la adenohipófisis. Sus propiedades biológicas han sido ampliamente estudiadas en mamíferos. Así, la existencia de un factor promotor de crecimiento lo comprobaron Long y Evans en 1921 (14, 15) y a partir de entonces se han hecho gran cantidad de estudios bioquímicos y fisiológicos de la hormona de crecimiento (GH); a través de dichos estudios se sabe que la GH presenta una notable especificidad de especie, la cual depende al parecer de las diferencias en su estructura molecular, puesto que la variación de las propiedades fisicoquímicas se reflejan en la actividad inmunológica y biológica de las diversas preparaciones (3, 16). En la Tabla 2 se pueden apreciar las diversas actividades biológicas conocidas de la GH.

Sin embargo, se conoce muy poco sobre esta hormona en las otras clases de vertebrados. A partir de los 70's se ha venido investigando más consistentemente la bioquímica y fisiología de esta molécula, así como la regulación de la hormona de crecimiento en representantes de las cinco clases de vertebrados.

El descubrimiento de la presencia de un factor promotor de crecimiento en 1921, fue el punto de partida para el estudio de la hormona de crecimiento (GH) en mamíferos. Se hicieron grandes

METABOLICOS	<ul style="list-style-type: none"> Estimulación del transporte de aminoácidos. Estimulación de la síntesis de proteínas. Estimulación de la síntesis de ADN y ARN. Estimulación de la síntesis de poliaminas. Estimulación de la lipólisis.
FISIOLOGICOS	<ul style="list-style-type: none"> Incrementa el flujo sanguíneo renal, la tasa de filtración glomerular y absorción tubular de fosfato, Incrementa la tasa metabólica basal, Estimula la formación de hueso nuevo, Estimula la eritropoyesis, Expande el espacio del fluido extracelular,
ANATOMICOS	<ul style="list-style-type: none"> Acelera el crecimiento lineal. Reduce la masa de tejido graso y aumenta la masa de diferentes tejidos: músculo, hígado, riñón, corazón, tracto gastrointestinal, páncreas, esqueleto, tejido conjuntivo.

Tabla 2.- Diferentes efectos de la hormona de crecimiento humana (hGH) (De Chawla, R.J., et al, 1983 (17)).

esfuerzos para encontrar una metodología adecuada para la extracción y purificación de la hormona. El trabajo de Li (18) confirmó la existencia de la hormona; Wilhelmi (19) obtuvo a la hGH en forma cristalina, sin embargo no fue este el estado adecuado para estudios de estructura. Las principales estrategias que se han seguido en la purificación y caracterización de la hormona de crecimiento, son filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis, métodos automatizados de análisis de aminoácidos y métodos de secuenciación de péptidos.

S. Ellis (20, 21) intentó purificar todas las hormonas adenohipofisarias de diferentes mamíferos: toro, oveja, cerdo, rata y conejo; el mayor éxito se obtuvo para la GH porcina, no obstante el rendimiento y actividad eran bajos. Wallace y Ferguson (22) cromatografiaron extractos de hipófisis de varias especies de mamíferos (borrego, toro, hombre, cerdo, ballena) en una columna de intercambio iónico, encontraron que el material parcialmente fraccionado se puede comportar de diferente manera dependiendo de su tratamiento previo, por lo que es necesaria la combinación de pasos de fraccionamiento para completar el estudio de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las hormonas adenohipofisarias.

Se ha calculado el peso molecular (PM) de la GH de diferentes mamíferos: 23,000 para el perro, 22,000 para el hombre y el bovino, 21,600 para ovinos y 41,600 para el porcino (23, 24).

Por otro lado se ha realizado un riguroso análisis de la naturaleza molecular de la GH de la hipófisis de bovinos, ovinos y hombre; en la hormona de crecimiento de bovino (bGH) se ha evidenciado una heterogeneidad en el extremo amino terminal, una forma molecular empieza con alanina (Ala) y la otra con fenilalanina (Phe). Se piensa

que esta heterogeneidad se debe al procesamiento de la molécula precursora de la GH, pero esto permanece ambiguo todavía. Otra variación de la bGH se ha encontrado en la posición 127 de la cadena, donde la leucina (Leu) es reemplazada por la valina (Val) (25). Seavey (26) sugiere que esto puede deberse a un polimorfismo alélico en la población de bovinos de los que se obtuvo la GH. La hormona de crecimiento humana se ha estudiado más ampliamente y se conocen varias de sus propiedades fisicoquímicas (Fig. 3 y Tabla 3).

VARIANTES DE LA GH EN MAMIFEROS

Se han encontrado variantes de masa y de carga, así como otras formas modificadas de la GH. Por electroforesis discontinua en geles nativos de TRIS-poliacrilamida (PAGE) y por filtración en gel se han evidenciado de 4 a 6 componentes, los cuales tienen diferente grado de bioactividad e inmunoreactividad, por lo que se piensa que la GH existe como una familia de péptidos (17). La forma nativa más abundante en la hipófisis es la que tiene un PM de 22,000 d, a la cual se ha denominado 22K y es precisamente en esta forma molecular sobre la que se han realizado la mayor parte de los estudios, y por lo tanto de la que se conocen más ampliamente sus propiedades fisicoquímicas y biológicas; así, la hormona de crecimiento humana (hGH) presenta un PM aproximado de 22,000 d, un pI de 4.9, es una sola cadena de 191 aa, con 4 residuos de Cys y 2 puentes disulfuro, no posee carbohidratos y se ha visto que presenta un 55 % de α -hélice (Tabla 3, Fig. 3). (17).

Las variantes de masa que se han identificado son de varios tipos: las que resultan de la agregación, de la modificación o de la

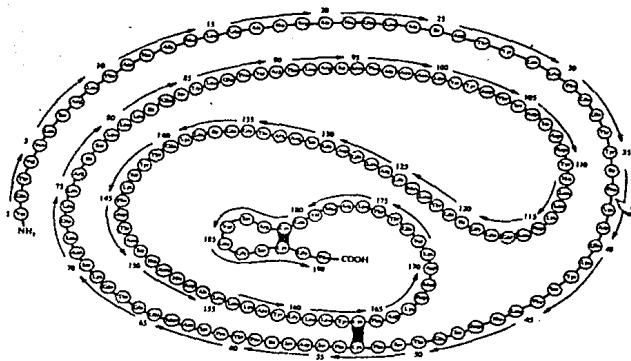


Fig. 3.- Estructura primaria de la hGH (De Li, C.H., 1972 (23)).

PM	
sedimentación	21,500
presión osmótica	22,100
estructura primaria	22,125
PI	4,9
Coefficiente de sedimentación	
S_{20pw}	2,179
$E_{0,1\%}$ 1 cm, 277 nm	0,931
Contenido de α -hélice	55%
Coefficiente de partición	1,4

Tabla 3.- Propiedades físicoquímicas de la hGH
(De Cho Hao Li, 1975 (15)).

delección de ciertos aminoácidos (aa) en la estructura de la 22K. Por medio de filtración en gel se han obtenido dos formas adenohipofisarias: 45K (45,000 d) y la "pre-hGH"; la 45K es un agregado (dímero) de la forma 22K, que presenta menor actividad en el bioensayo de la ganancia de peso corporal y en el lactogénico en comparación con la 22K, aunque tiene buena capacidad de unión con el anticuerpo dirigido contra hGH (22K) (27); la otra variante, la "pre-GH", con un PM de 24,000 d, constituye el precursor de la hormona y está formada por la 22K más el péptido señal (26 aa) unido al extremo amino terminal. En el plasma se han encontrado las variantes 45K, 70K y una mayor de 100K, las cuales se piensa que son formas agregadas; la 45K tiene idéntica capacidad de unión al anticuerpo dirigido contra la 22K; otro estudio (21) reportó una forma 80K en el plasma, la cual es extraordinariamente activa en el ensayo de la tibia de rata (el cual consiste en la determinación de la anchura de la epifisis de la tibia bajo el efecto de la GH) (100 a 200 veces más potente que la 22K) y sin embargo no es reconocida eficientemente por los anticuerpos, se piensa que este componente es producto de una modificación enzimática de la 22K.

Además de éstas, se han encontrado otras variantes de masa que no son formas agregadas, estas son la 24K y la 20K. La 24K es idéntica a la 22K, excepto que la 24K está separada entre los restos 139 y 140, sin delección de ningún aa, esta variante se mostró activa en el ensayo lactogénico pero no en el de la tibia; se piensa que ésta es producto de una modificación proteolítica posttraduccional de la 22K. La 20K difiere de la 22K en que presenta una delección de los restos 32-46 y además muestra solo la tercera parte de la actividad inmunológica con respecto a la de la 22K, y carece de algunas de las funciones

adscritas a la forma principal de la hGH; se piensa que esta variante de la hGH es producto de un procesamiento diferente del mismo transcrito primario de ARN mensajero (ARNm) que codifica para la 22K (24, 25). En el plasma se ha encontrado a la 20K pero no a la 24K (17).

Por otro lado, se han reportado también variantes de carga para la hGH. Ferguson y Wallace (28) en 1961 resolvieron cuatro componentes mayoritarios y dos minoritarios por medio de electroforesis en geles de almidón, todos estos componentes mostraron actividad lactogénica y somatotrópica. Chrambach (29), por medio de PAGE, aisló cuatro componentes a los cuales llamó B, C, D y E, los cuales poseían el mismo PM; observó que al digerir el componente B con plasmina se obtenían los componentes C, D, y E; todos mostraban el mismo comportamiento inmunológico que la GH patrón.

Lewis (30) también aisló por medio de PAGE cuatro componentes a los que denominó $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y β semejantes a los aislados por Chrambach; mostró que $\alpha 2$ y $\alpha 3$ carecían de los restos 135-140 y 135-146 respectivamente; estos componentes parecen ser formas hidrolizadas proteolíticamente en el asa grande de la hormona y por lo tanto dan origen a una estructura de dos cadenas que se mantienen unidas por sus puentes disulfuro. Estas dos formas tienen el mismo comportamiento en el radioinmunoensayo (RIA), y curiosamente las formas hidrolizadas proteolíticamente tienen una mayor bioactividad con respecto a la forma principal; la $\alpha 1$ y β no se caracterizaron. El mismo investigador encontró otro componente acetilado en el extremo amino terminal, el cual se mostró equipotente con la hGH patrón en el ensayo de la tibia de rata y en el lactogénico, así como en RIA (29). Posteriormente, se

encontraron dos formas desamidadas en los residuos 152 (Asn \rightarrow Asp) y 137 (Gln \rightarrow Glu) (30).

Con la técnica de isoelectroenfoque (IEF) también se ha encontrado heterogeneidad de carga, pues por un lado se han reportado dos componentes, I_2 y I_1 (30) y por otro, cuatro componentes con puntos isoeléctricos (pI) de 4.78, 5.4, 5.05 y 4.58 (17, 31). Estas variantes se han evidenciado en la hipófisis, pero no en el plasma.

Además se ha encontrado que en mamíferos la GH es sintetizada y secretada en forma fosforilada, lo cual parece depender de un mecanismo enzimático, en el que interviene una cinasa altamente específica; en cuanto a la relación fosforilación-biopotencia, se ha mostrado que conforme aumenta el contenido de fósforo (P) en la GH, disminuye la actividad promotora de crecimiento; esta modificación puede contribuir a la heterogeneidad de carga. Esto es otro ejemplo de la modificación posttraduccional de la GH (32).

La explicación de la heterogeneidad no ha quedado clara, sin embargo, en 1976 (33) se demostró que en la biosíntesis de la GH ocurre una modificación proteolítica postrribosomal de una molécula más grande, la "pre-GH"; en 1980 (34) se identificaron los genes para la GH (Fig. 4): el gen hGH-N que codifica para la forma 22K y el gen hGH-V que codifica para un péptido que difiere del gen "N" en 15 posiciones; al comparar con el producto del gen "N" se ha visto que el péptido hGH-V ha perdido dos aa ácidos pero ha ganado 3 aa básicos (17).

Como se mostró en la Tabla 2, la GH desempeña una gran cantidad de funciones, por lo que se han propuesto múltiples explicaciones para la multifuncionalidad de la GH. Una de ellas arguye que la GH es una proteína con varios centros activos, de tal manera que los efectos

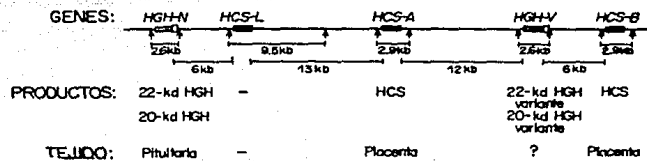


Fig. 4.- Mapa de la familia de genes de hGH. Abreviaturas: HGH, hormona de crecimiento humana; HCS, somatomotropina o lactógeno placentario (De Seeburg, P.H., 1985 (35)).

metabólicos y acciones reguladoras se localizan en regiones discretas y separadas de la molécula (dominios) (25). Otra sugiere que los diferentes efectos de la GH son producto de la activación de diferentes sitios de un solo receptor (36). Otra propone que hay un procesamiento proteolítico de la forma principal que da origen a las variantes de la GH, cada una de las cuales actúa como sustrato específico y tiene afinidades para receptores específicos (37). De acuerdo a esta hipótesis las variantes podrían poseer propiedades individuales que, cuando se combinan, expresan todas las acciones conocidas para la hormona, o bien ellas pueden proporcionar toda una gama de estructuras que podrían servir como prohormonas para producir péptidos más pequeños, cada uno de los cuales tendría una acción metabólica específica y restringida (38).

Se ha pensado que la presencia de las variantes se debe a modificaciones postranscripcionales y postraduccionales de la hormona, más que a productos derivados de genes diferentes, ya que por medio de técnicas de ingeniería genética, tanto la GH recombinante, como la nativa (bovinas) presentan un patrón electroforético y funcional casi idéntico (39, 40).

Con respecto a los eventos celulares que tienen lugar por la acción de la GH, se conoce muy poco; primeramente la GH se une a los receptores, después hay alteraciones en el metabolismo de nucleótidos cíclicos; se sabe que la GH interviene en el aumento del AMP cíclico (AMP_c) e inhibe la actividad de la adenilato ciclasa (in vivo e in vitro), sin embargo no está claro si los cambios en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos tienen relación con otros efectos de la GH, además se desconoce totalmente el papel del AMP_c en el efecto promotor de crecimiento (36).

HORMONA DE CRECIMIENTO EN AVES

La existencia de la hormona de crecimiento de pollo la comprobaron Nicoll y Licht en 1971 (41). Además ellos hicieron estudios en otros vertebrados y encontraron que aunque la GH ejercía un efecto promotor de crecimiento en cuatro clases de vertebrados (anfibios, reptiles, aves y mamíferos), ésta no es indispensable para la salamandra y observaron también que la prolactina (PRL) promueve el crecimiento en los quelonios. Aunado a esto, se sabe que la estructura y algunas actividades biológicas de la PRL, están relacionadas con las de la GH. La PRL (ovina) tiene 192 aa en una sola cadena, tiene 3 puentes disulfuro de los cuales 2 ocupan la misma posición relativa que en la GH; existen 6 regiones de la PRL (ovina) que abarcan a 146 aa, los cuales a su vez parecen corresponder estrechamente a porciones de GH, 49 de los aa en estas secuencias son idénticos con respecto a la GH y 68 parecen ser sustituciones, además ambas son proteínas globulares con un contenido de alfa hélice semejante. En lo que respecta a las actividades biológicas, la PRL coincide con la GH en las siguientes: regula funciones de glándulas secundarias, tiene efecto diabético, interviene en la síntesis de proteínas, promueve el crecimiento, provoca la retención de nitrógeno (N). Todas estas evidencias apoyan la hipótesis de que las GH y PRL se han originado de un gen ancestral común que divergió hace aproximadamente 4×10^8 años para dar lugar a linajes separados de la PRL y GH (Fig. 5) (25, 42).

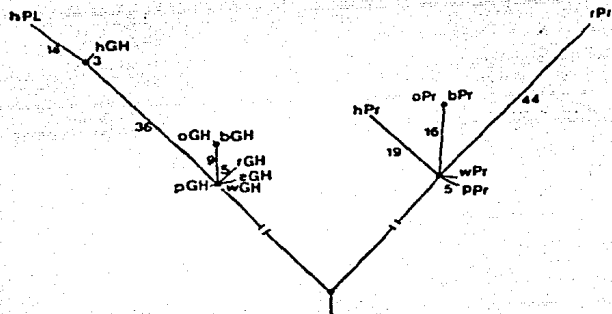


Fig. 5.- Arbol Filogenético que muestra la posible evolución de la familia GH-PRL. Abreviaturas; wGH, GH de ballena; oGH, GH ovina; rGH, GH de rata; eGH, GH equina; pGH, GH porcina; bGH, GH bovina; hGH, GH humana; pPRL, PRL porcina; bPRL, PRL bovina; oPRL, PRL ovina; rPRL, PRL de rata; wPRL, PRL de ballena; hPRL, PRL humana. (De Wallis, M.J., 1980 (43)).

Los órdenes de aves en los que se han estudiado las propiedades fisicoquímicas, biológicas e inmunológicas de la GH, son Anseriformes (pato), Columbiformes (paloma) y Galliformes (pollo y pavo).

Farmer, Papkoff y Hayashida (44) encontraron heterogeneidad de la GH de pollo (cGH) en sistemas electroforéticos a diferentes pH_0 (4.5 y 8.3), lo cual explican por una posible desamidación de la GH (esto mismo ocurre en mamíferos); la secuencia amino-terminal es muy semejante a la GH bovina. En lo que respecta al bioensayo de la tibia de rata, la GH de los tres órdenes se ha mostrado activa, aunque muestran una potencia menor que las hormonas de mamíferos en el mismo bioensayo. El rendimiento obtenido por estos investigadores fue de 0.2 mg/g de peso seco de hipófisis, una movilidad relativa (R_f) de 0.3 en PAGE, 2 puentes disulfuro y en el análisis de composición de aa, 4 restos Cys, un alto contenido de Glu y Leu y bajo contenido de His, Met y Trp.

Harvey y Scanes (45) purificaron a la cGH después de una extracción de glicoproteínas, mediante homogeneización del residuo remanente, alcalinización, precipitación salina y cromatografía de intercambio iónico; obtuvieron un rendimiento de 0.4 mg/g de hipófisis (peso húmedo), un R_f de 0.31, un PM de 23,300 d y por IEF resolvieron tres componentes cuyos pI fueron: 7.5, 6.5, 5.8; la composición de aa fue semejante a la obtenida por Farmer, Papkoff y Hayashida (44); la heterogeneidad encontrada la aducen a una desamidación parcial de la hormona, una unión no específica a los anfolitos o a la presencia de monómeros con diferentes restos amino-terminales.

No obstante la heterogeneidad encontrada por otros autores, Leung (46) encontró a la cGH en forma homogénea. Hizo estudios de purificación y caracterización parcial de la cGH siguiendo una

metodología de purificación semejante a la utilizada por Harvey y Scanes (45), pero incorpora una acidificación, una extracción con NaOH y una cromatografía en Sephacryl S-200; el rendimiento obtenido fue de 0.6 mg/g de hipófisis congeladas. La homogeneidad de la molécula la evidenció por PAGE, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) e IEF; obtuvo un PM de 26,000 d y un pI de 7.6, el análisis de aa fue semejante al obtenido por Farmer et al y Harvey y Scanes (44, 45).

Por otro lado, Lai (47) estimó un PM de la cGH de 27,000 d, además que encontró homología entre la cGH y la bGH al comparar la secuencia amino-terminal.

La ontogenia de la cGH se ha estudiado por medio de técnicas inmunológicas (RIA) e inmunohistoquímicas. Por RIA se ha detectado a la cGH en plasma de embriones de pollo de 17 días de edad (6 ng/ml) (48), sin embargo, la concentración de la hormona aumenta en el plasma conforme aumenta la edad. Con técnicas inmunohistoquímicas, se han encontrado células inmunoreactivas en embriones de pollo de 12 días de edad en el segmento caudal de la hipófisis; la cantidad de la hormona aumenta en periodos embrionarios tardíos (7). Esto indica que la producción de GH ocurre en un periodo temprano del desarrollo embrionario. Sin embargo, en pollos adultos la cantidad de GH decrece (7, 48).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE GH EN AVES

Además de su efecto somatotrópico, la GH también está involucrada en otros aspectos metabólicos de las aves. Estimula la lipólisis in vitro en explantes de adipocitos de pollo, pavo y paloma

hipofisectomizados; también interviene en la lipogénesis, pues inhibe la síntesis de ácidos grasos estimulada por insulina. El efecto de la GH en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos se caracteriza por un incremento de ácidos grasos libres en la circulación, los cuales quedan disponibles como fuente de energía y por otro lado por el decremento de la lipogénesis y utilización de la glucosa. Estos efectos de la GH se pueden relacionar con el incremento de concentración de GH en el plasma de aves que han sido privadas de alimento. La actividad lipolítica de la GH de pollo ha quedado demostrada al medir la actividad lipolítica de la GH biosintética, lo cual descarta que dicha actividad fuera el resultado de contaminantes (6, 49, 50) como había sido propuesto por algunos autores.

REGULACION DE LA SECRECION DE LA GH

En lo que respecta a la regulación de la secreción de GH, se conocen tres hormonas hipotalámicas involucradas en dicho proceso: hormona liberadora de la tirotrópina (TRH), somatostatina (SRIF) y somatocrina (GRF) (51).

Ahora bien, estudios recientes han proporcionado evidencias de que además de estas hormonas, existen otros factores involucrados en la regulación de la GH. La secreción basal de GH en mamíferos parece ser dependiente del calcio, AMP_c y prostaglandinas (PG₂). Ahora bien, se ha evidenciado en los vertebrados que la secreción de GH tiene un comportamiento episódico, lo cual parece ser altamente específico de cada especie; es posible que el hipotálamo requiera la secreción pulsátil de la GH en vertebrados (51).

La secreción de la GH parece estar controlada por factores liberadores e inhibidores originados en el hipotálamo, los cuales a su vez parecen estar controlados por monoaminas y neurotransmisores del sistema nervioso central (SNC); es más, los neurotransmisores pueden tener un efecto directo sobre los somatotropos. Se han encontrado péptidos semejantes a GRF y SRIF en la mayoría de los vertebrados. La secreción de la GH no solo depende de la cantidad de factores liberadores o inhibidores, sino también de la sensibilidad de los somatotropos (5). En el pollo doméstico, la TRH estimula la secreción de GH tanto in vivo como in vitro.

Por otro lado, no se sabe con exactitud si el GRF está presente en las aves, sin embargo el GRF humano incrementa la concentración de GH en el plasma en aves, lo cual parece indicar la existencia de GRF en aves. Se ha demostrado la presencia de somatostatina en aves, ésta inhibe tanto la secreción basal como la estimulada por TRH o GRF, además se ha encontrado también en poiquiloterms e incluso en tunicados, lo que parece indicar que el SRIF puede regular la secreción de GH en los vertebrados en general (51).

Como se mencionó anteriormente, los neurotransmisores están involucrados en el control de la secreción de la GH: la epinefrina o norepinefrina disminuyen la concentración de GH en el plasma del pollo doméstico, el mismo efecto se ha reportado para la serotonina (52).

Otros factores que influyen en la secreción de la GH de mamíferos son las prostaglandinas, las hormonas tiroideas y algunos péptidos como el polipéptido intestinal vasoactivo, la colecistocinina, sustancia P, bombesina, angiotensina II, motilina, y gonadotropina. Estos mismos péptidos influyen también en la secreción de la GH de pollo, pero en el resto de los vertebrados la información es muy

escasa. La desnutrición es otro factor que influye en la secreción de la GH (53). Se ha evidenciado también que las hormonas tiroideas T_3 y T_4 (in vivo) tienen un efecto negativo en la concentración de GH (54).

OBJETIVOS

- 1) Desarrollar una metodología de purificación eficiente para la obtención de la hormona de crecimiento de pollo (cGH).
- 2) Realizar la caracterización bioquímica de la hormona de crecimiento de pollo (cGH).
- 3) Comparar a la hormona de crecimiento de pollo (cGH) con hormonas de crecimiento de algunas especies de mamíferos.

MATERIAL Y METODOS

I MATERIAL

a) Biológico

Las hipófisis se obtuvieron en el rastro "Procesadora de Aves de Morelos", ubicado en Cuernavaca, Mor. Las glándulas se disectaron de cabezas de pollos recién sacrificados (destinados para rosticería) y se congelaron inmediatamente con hielo seco, mientras se transportaban al laboratorio donde se almacenaron a -70° C en un ultracongelador Forma Scientific.

b) Reactivos

Los reactivos fueron de grado analítico y el agua empleada fue bidestilada y desionizada en un aparato Milli-Q (Millipore).

1) Soluciones Empleadas en la Realización de Electroforesis

1.1) Electroforesis Discontinua en Geles Nativos de TRIS-Poliacrilamida al 7.5 % pH 8.3 (55)

Solución A. - 30.0 g acrilamida
0.80 g metilen-bis-acrilamida

Estos reactivos se disolvieron y aforaron a un volumen de 100 ml con agua.

Solución B. - 18.15 g TRIS
0.23 ml TEMED

24.0 ml HCl 1 N

El TRIS se disolvió en 50 ml de agua, después se añadió el TEMED y se ajustó el pH a 8.9 con HCl 1N, finalmente se aforó a 100 ml con agua.

Solución C.- Persulfato de Amonio 0.14 %.

Solución D.- 5.0 g acrilamida
1.25 g metilen-bis-acrilamida

Esto se disolvió y aforó con agua a 100 ml.

Solución E.- 2.85 g TRIS
0.250 ml TEMED
12.8 ml H_3PO_4 1 M

El TRIS se disolvió en 50 ml de agua, se agregó el TEMED y se ajustó el pH a 6.9 con H_3PO_4 1 M.

Solución F.- Glicerina al 10%.

Solución Siliconizante.- Se utilizó una solución comercial Photo-Flo Kodak, la cual se preparó a una dilución de 1:20.

Amortiguador de la Muestra.- Primero se mezclaron 2.0 ml de la solución E y 6.0 ml de glicerol al 10%. De esta solución se tomaron 2.0 ml a los cuales se añadieron 20 μ l de azul de bromofenol al 1.0%.

Amortiguador de Corrida, pH 8.3.- Se preparó una solución concentrada 10X con TRIS 0.0495 M y Gly 0.384 M. Para la corrida de la electroforesis se utilizó una dilución 1:10.

Tinción.- La tinción de los geles en el sistema nativo con TRIS-Poliacrilamida se llevó a cabo con azul brillante de Coomassie R-250 o negro amido 10B. El azul brillante de Coomassie R-250 se preparó al

0.02% disuelto en isopropanol al 25% y ácido acético al 10%. El negro amido 10B se preparó al 0.5% disuelto en ácido acético al 7.5%. Los geles se destiñeron con ácido acético al 7.0%.

1.2) Electroforesis Discontinua con SDS-Poliacrilamida pH 8.6 (56).

Solución A.- 50.0 g acrilamida
1.32 g metilen-bis-acrilamida
Esto se llevó a un volumen final de 165 ml con agua.

Solución B.- 18.17 g TRIS
4.0 ml SDS al 10%
Ambos componentes se disolvieron en 80 ml de agua. después se ajustó el pH a 8.8 con HCl concentrado y por último se aforó a 100 ml con agua.

Solución C.- 6.06 g TRIS
4.0 ml SDS al 10%
Estos reactivos se mezclaron y disolvieron en 80 ml de agua. después se ajustó el pH a 6.8 con HCl concentrado y por último se aforó a 100 ml con agua.

- Persulfato de Amonio al 10%.
- β -mercaptoetanol al 10%.
- Azar al 1.0%.

Amortiguador de Corrida pH 8.6.- Esta solución se preparó con TRIS 0.0251 M . Gly 0.192 M y SDS al 0.10%. El pH se ajustó con NaOH 10 N.

Tinción.- Se realizó con azul brillante de Coomassie R-250, el cual se preparó al 0.02% disuelto en ácido acético al 10% e isopropanol al 25%. Los geles se destiñeron con una solución que contenía ácido acético al 10% e isopropanol al 10%.

Esta electroforesis se realizó en condiciones reductoras y no reductoras, por lo que el amortiguador de la muestra se preparó, según el caso, de la siguiente manera:

Condiciones Reductoras.- Se mezclaron 1.25 ml de la solución C con 100 μ l de SDS al 10%, 1.0 ml de glicerol y 0.4 ml de azul de bromofenol al 0.05% y 1.0 ml de β -mercaptoetanol al 10%. Esto se llevó a un volumen final de 10 ml con agua. Las muestras se llevaron a un volumen de 20 μ l con este amortiguador y se calentaron en baño maría a 92°C durante 5 a 10 min.

Condiciones no Reductoras.- Se mezclaron 1.25 ml de la solución C con 100 μ l de SDS al 10%, 1.0 ml de glicerol y 0.4 ml de azul de bromofenol al 0.05%; esto se llevó a un volumen de 10 ml con agua. Las muestras se llevaron a un volumen de 20 μ l con este amortiguador, pero en este caso no se añadió β -mercaptoetanol ni se calentaron las muestras.

2) Electroelución

2.1) Colorante "Quick Stain" preparado de la siguiente manera:

- Azul brillante de Coomassie 0.04%.
- Acido perclórico al 5%.

Se agitó durante 1 hr. a temperatura ambiente y se filtró en papel Whatman No.1.

3) Enfoque Isoeléctrico

- Gel acuoso de 0.05 X 26 X 12.5 cm. el cual se preparó de la siguiente manera:

Acrilamida al 28 %. Bis al 0.5 %	3.8 ml
TEMED al 0.8 %	2.1 ml
Aqua	10.1 ml
Riboflavina al 0.002 %	2.1 ml
Anfolinas (3 - 9)	0.77 ml
Persulfato de Amonio al 10 %	0.02 ml
- Amortiguadores de Corrida	
Amortiguador del Anodo: H_3PO_4	0.05 %
Amortiguador del Cátodo: etilendiamina	5 %

4) Bioensayo para la Hormona de Crecimiento de Pollo. Se utilizaron las siguientes hormonas:

a) Hormona de Crecimiento Bovina (BGH).- Esta se obtuvo del NIH. lote GH-B18, potencia biológica 1.91 UI/mg de proteína.

b) Hormona de Crecimiento de Pollo (V-BDE-1).- Esta se obtuvo de la quinta extracción realizada en el laboratorio a partir de hipófisis de pollo. después de haberse caracterizado y demostrado su pureza.

II METODOS

a) Extracción de la cGH.

Se partió de lotes de 3.0 g (peso húmedo total) de hipófisis congeladas. La extracción se realizó en frío (4°C) y de cada etapa se tomaron alícuotas para su posterior análisis.

a.1) Homogeneización.

La homogeneización se llevó a cabo en una solución acuosa que contenía inhibidores de proteasas (PMSF (Fenil metil sulfonyl fluoruro) 0.05 mM, aprotinina 50 KIU/ml, pH 7.2) y utilizando un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem; se emplearon 5.0 ml/g de hipófisis y se homogeneizó con 10 golpes. Se utilizó 1.0 ml de la solución para lavar el homogeneizador. Al homogenado se le llamó "Extracto Total".

a.2) Alcalinización

Después de homogeneizar, el extracto se llevó a pH 9 con una solución saturada de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), esto se hizo en agitación constante durante 15 min. y se obtuvo el llamado "Extracto Alcalino". Seguidamente se centrifugó a 10.000 X g a 4°C durante 20 min., para lo cual se utilizó un rotor de ángulo fijo SS-34 y una centrifuga refrigerada Sorvall RCS-8.

La cGH se obtiene en el sobrenadante.

b) Purificación de la cGH.

b.1) Precipitación Salina

Esta se realizó utilizando una solución saturada de sulfato de amonio (57). El sobrenadante del extracto alcalino (20.2 ml) se precipitó primeramente al 20% de saturación, para lo cual se añadieron 4.25 ml de la solución saturada de sulfato de amonio, esto se hizo lentamente, con agitación constante; después se dejó agitando durante 15 min. y se centrifugó a 10,000 X g a 4°C durante 30 min. utilizando el mismo rotor y centrifuga mencionados anteriormente; al precipitado obtenido se le denominó "Fracción A" y se resuspendió en agua. Al sobrenadante se le sometió a una precipitación salina al 50.0% de saturación, añadiéndose 12.0 ml de la solución saturada de sulfato de amonio, en la forma que se describió arriba; seguidamente se centrifugó a 10,000 X g a 4°C durante 30 min.; al precipitado se le llamó "Fracción B" y se resuspendió en agua. El sobrenadante constituyó la "Fracción C".

b.2) Diálisis y Liofilización

Posteriormente las fracciones A, B y C se sometieron a una diálisis exhaustiva contra agua, cambiando las aguas de diálisis a intervalos de 2 ó 3 horas durante aproximadamente 38 horas; se emplearon bolsas para diálisis Spectrapor No. 1 (límite de exclusión de 6000-8000 d). Después de la diálisis se procedió a liofilizar en una liofilizadora LabConco en frascos previamente tarados.

b.3) Cromatografía

La fracción B liofilizada se corrió en una columna de intercambio iónico de DEAE-celulosa, según el método de Wallace y Ferguson (22) y Harvey y Scanes (45), con modificaciones. Primero se cromatografió en condiciones analíticas y después en condiciones preparativas.

La resina (DE-32) se precicló en HCl 0.5 N y NaOH 0.5 N: después se descalcificó colocándola primero en el componente ácido del amortiguador (H_2BO_3 0.095 M), posteriormente se adicionó el componente básico del amortiguador (NaOH 0.025 M) para obtener el pH deseado. Enseguida, se equilibró la resina con amortiguador de borato de sodio (NaOH 0.025 M, H_2BO_3 0.095, pH 8.6). Luego se empacó la columna a presión a un flujo de 45 ml/h. La columna quedó preparada para correr la muestra.

b.3.1) Cromatografía Analítica

En la realización de ésta se empleó un espectrofotómetro Gilford Instrument 250, un colector de fracciones LKB 2070 ULTRORAC II, una bomba peristáltica Pharmacia P-3 y un formador de gradiente Cristalab.

Esta cromatografía se llevó a cabo con el material obtenido a partir de una extracción de 144 hipófisis. La fracción B liofilizada (30 mg) se disolvió en 0.5 ml de amortiguador de borato de sodio pH 8.6 y se aplicó a la columna bajo las siguientes condiciones:

Flujo	:	25	ml/h
Volumen de la muestra	:	0.5	ml
Volumen de cada fracción	:	1.0	ml
Dimensiones de la Columna	:	13.0 X	0.8 cm
Longitud de onda	:	280	nm
Temperatura	:	22-24	°C

La proteína que no se adsorbió a la columna se eluyó con amortiguador de borato de sodio pH 8.6 (0.025 M NaOH, 0.095 M H_2BO_3). Posteriormente se aplicó un gradiente lineal de pH y fuerza iónica con 40.0 ml de fosfato de sodio y potasio pH 7.2 (0.05 M NaOH, KH_2PO_4).

0.095 M) y 40.0 ml de borato de sodio, siendo el volumen total del gradiente de 80.0 ml. Finalmente se utilizó un amortiguador de alta fuerza iónica (acetato de amonio, 0.01 M, 1 M NaCl, pH 4).

El perfil de la cromatografía se determinó por absorbencia a 280 nm.

Se reunieron las fracciones correspondientes a cada pico y estas se dializaron contra agua, haciéndose cambios a intervalos de 2 ó 3 horas durante aproximadamente 38 horas y posteriormente se liofilizaron en el equipo mencionado anteriormente.

b.3.2) Cromatografía Preparativa

Esta se llevó a cabo con el material obtenido a partir de lotes de 300 hipótesis. La fracción B liofilizada se resuspendió en amortiguador de borato de sodio pH 8.6 (31 mg/ml) y se corrió la cromatografía bajo las siguientes condiciones:

Flujo	:	24.0 ml/h
Volumen de la muestra	:	2.9 ml
Volumen de cada fracción	:	4.0 ml
Dimensiones de la columna	:	32.5 X 0.5 cm
Velocidad del papel	:	0.5 mm/min
Sensibilidad del absorciómetro	:	0.5 AUFS
Longitud de onda	:	280 nm
Temperatura	:	4.0 °C

La proteína que no se adsorbió a la columna se eluyó con amortiguador de equilibramiento (de cargado); la que se adsorbió se

eluyó con amortiguador de alta fuerza iónica (mismo que en la cromatografía analítica).

Durante este procedimiento se utilizó el siguiente equipo LKB: absorciómetro con lámpara de UV 2138 UVICORD, conductímetro 2195, bomba peristáltica 2132, colector de fracciones 2070 ULTRORAC II y un registrador 2210 de dos canales. Además el contenido de proteína se determinó por absorción a 280 nm en un espectrofotómetro Gilford Instrument.

Las fracciones eluidas se dializaron exhaustivamente contra agua, haciéndose cambios de aguas de diálisis cada 2 ó 3 hrs. durante aproximadamente 38 hrs.. después se procedió a liofilizar.

b.4) Electroelución

Este procedimiento consistió en la separación de las bandas que mostró la fracción BDE-1 eluida de DEAE-celulosa, correspondiente a la hormona de crecimiento de pollo. Esto se llevó a cabo mediante un sistema electroforético discontinuo en TRIS-poliacrilamida al 7.5%, pH 8.3 (geles de 10.5 X 0.5 cm).

Se corrieron 230 μ g de la fracción BDE-1 repartidos en 3 lotes: dos de 100 μ g cada uno y el otro de 30 μ g; la electroforesis se corrió a corriente constante, a 1.5 mA por gel (en el gel concentrador) y 3.0 mA por gel (en el gel separador). Después de la corrida, el gel que contenía los 30 μ g de la fracción BDE-1, se tiñó con el método de tinción rápida ("Quick Stain") y sirvió como patrón; para desteñirlo se utilizó ácido acético al 10%. Los geles que contenían 100 μ g se congelaron con hielo seco y se guardaron en el congelador, mientras se teñía el gel patrón.

Una vez que se hicieron conspicuas las bandas en el gel patrón (5 min.), se procedió inmediatamente a medir la migración de las mismas; con este punto de referencia se cortaron las rebanadas correspondientes a cada banda en los geles que contenían 100 µg de la muestra. Las dos rebanadas correspondientes a la misma banda, se cortaron a su vez en cuatro partes y se metieron en bolsas para diálisis Spectrapor No. 1, añadiendo amortiguador de TRIS-Gly pH 8.3, diluido 1:5 (v/v).

Cada bolsa se colocó en una cámara para electroelución, la cual contenía el mismo amortiguador. En estas condiciones, se dejó corriendo a 100 V (voltaje constante), durante toda la noche a 4°C; el corrimiento duró aproximadamente 14 horas y al finalizar este tiempo se invirtió la polaridad de los electrodos durante 3 min.

Después se dializó el eluido de cada banda contra agua, haciéndose cambios cada 2 ó 3 hrs. y finalmente se concentró en un evaporador centrífugo al vacío SAVANT. En estas condiciones se almacenaron las muestras en el congelador para su análisis electroforético posterior.

c) Determinación de la Cantidad de Proteína.

Esto se llevó a cabo de acuerdo al método de Lowry (58), modificado por Hartree (59). Se determinó la cantidad de proteína en cada etapa de la purificación de la hormona de crecimiento de pollo.

Curva Patrón

De una solución patrón de albúmina de suero bovino (BSA al 0.22%), se tomaron cantidades conocidas de proteína, a saber: 20.0 µg,

40.0 µg. 60.0 µg. 80.0 µg y 100.0 µg. Posteriormente se procedió de la siguiente manera:

- Las muestras de proteína se diluyeron en 1.0 ml con agua.
- Se añadieron 0.9 ml de la solución A (tetrato de sodio y potasio 0.007 M. carbonato de sodio 0.9435 M. NaOH 0.5 N).
- Se incubó a 50°C durante 10 min.
- Se dejó enfriar a temperatura ambiente (21-25°C).
- Se agregó 0.1 ml de la solución B (tartrato de sodio y potasio 0.071 M. sulfato de cobre 0.04 M. NaOH 0.1 N).
- Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min.
- Se adicionaron 3.0 ml de la solución C (reactivo de Folin Ciocalteu 0.159 N) y se mezcló rápidamente en el vortex durante 10 seg.
- Se incubó a 50°C durante 10 min. y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 650 nm.

d) Caracterización Bioquímica.

d.1) Electroforesis Discontinua en Geles Nativos de TRIS-Poliacrilamida al 7.5%. pH 8.3.

Esta electroforesis se realizó según el método de Ornstein (55). Se utilizaron geles cilíndricos de 6.0 X 0.5 cm.

Los tubos previamente limpios se siliconizaron durante 15 min. y luego se secaron con aire. Los tubos se taparon en un extremo con parafilm y se marcaron.

Preparación de los Geles

Gel Resolvedor.- Se mezclaron 4.0 ml de la solución A con 4.0 ml de la solución B y se desgasificó en un matraz kitazato durante 10 min.. después se agregaron 8.0 ml de la solución C e inmediatamente se aplicó a los tubos. después se añadió un poco de agua sobre el gel para evitar la formación de menisco y se dejó polimerizando durante 45 min.

Gel Concentrador.- Se mezclaron 2.0 ml de la solución D con 1.0 ml de la E. se dejó desgasificando en un matraz kitazato durante 10 min. y luego se añadió 1.0 ml de la solución C. se aplicó rápidamente a los tubos; también se agregó un poco de agua en el tope de los geles y se dejó polimerizando durante 45 min.

Una vez polimerizados, los geles se colocaron en la cámara para electroforesis y se llenaron los recipientes con amortiguador de corrida.

Las muestras se resuspendieron en 50 μ l de amortiguador de la muestra y se aplicaron a los geles con una micropipeta Gilson de 200 μ l. Aparte de la cGH purificada en el laboratorio, se corrieron GH de diferentes especies de mamíferos a saber: hormona de crecimiento bovina recombinante (rbGH), bGH (NIH-GH-B-18), hormona de crecimiento ovina (oGH, NIADDK), hormona de crecimiento porcina (pGH, USDA-pGH-B-1) y hormona de crecimiento humana (hGH, proporcionada por la Dra. Salas, lote 21).

Las electroforesis se corrieron a corriente constante: 1.5 mA por gel (gel concentrador) y 3.0 mA por gel (gel resolvedor). Al finalizar la corrida, se midió la longitud del gel y del frente del colorante. En el caso de la tinción con negro amido 10B, los geles

permanecieron en el colorante 1 h. y cuando se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250, los geles permanecieron 3 hrs. ó toda la noche. En el caso de los geles teñidos con negro amido 10B, la decoloración se realizó electroforéticamente con ácido acético al 7.0% a 100 V durante 2 hrs. aproximadamente. Los geles teñidos con azul brillante de Coomassie R-250, se destiñeron por difusión haciendo varios cambios de ácido acético al 7.0%. En ambos casos, los geles se colocaron finalmente en ácido acético al 7.0% donde permanecieron hasta analizarlos.

d.2) Electroforesis Discontinua en Geles de SDS-poliacrilamida.

pH 8.6.

Esta se realizó en placa (9.2 cm X 8.8 cm), según el método de Laemmli (56).

Preparación de los Geles

El gel resolvidor se preparó al 12.5% y al 15% basándose en la siguiente tabla:

	12.5%	15%
Solución B	1.5 ml	1.5 ml
Solución A	2.5 ml	3.0 ml
Aqua	2.0 ml	1.5 ml
TEMED	5.0 ul	5.0 ul
Persulfato de amonio	20.0 ul	20.0 ul

El gel concentrador se preparó de la siguiente manera:

Solución C	0.63	ml
Solución A	0.33	ml
Agua	1.54	ml
TEMED	2.5	µl
Persulfato de amonio	12.5	µl

Se mezclaron la solución A con agua, TEMED y la solución C. se desoasificó y por último se adicionó el persulfato de amonio; después se vació a la placa. En la preparación del gel resolvidor, la solución de persulfato de amonio también fue la última en adicionarse antes de aplicar el gel a la placa.

Las muestras que se corrieron fueron las mismas que se indican en el sistema de PAGE. se llevaron a 20 µl con amortiguador de la muestra y se aplicaron con una jeringa Hamilton 89510 (25.0 µl); se corrió a voltaje constante: 50 V en el gel concentrador y 100 V en el gel resolvidor.

Después de la corrida se midió la longitud del gel y del frente del colorante y se sumergió el gel en el colorante donde permaneció 3 hrs. ó toda la noche. La decoloración se realizó con isopropanol/ácido acético por difusión. Después del análisis del gel, éste se sometió a secado para su conservación permanente.

Las electroforesis con SDS se realizaron en condiciones reductoras y no reductoras. La diferencia entre ambas fue la presencia o ausencia de β-mercaptoetanol respectivamente en el amortiguador de la muestra.

Condiciones Reductoras.- Las muestras se resuspendieron en amortiguador de la muestra que contenía β-mercaptoetanol y se

incubaron a temperatura de ebullición (92°C) durante 5 min., después se aplicaron.

Condiciones no Reductoras.- Las muestras se resuspendieron en amortiguador de la muestra. el cual no contenía β -mercaptoetanol e inmediatamente después se aplicaron al gel; en este caso no se calentó.

d.3) Enfoque Isoeléctrico

Este se realizó según las especificaciones de Pharmacia. con modificaciones.

El gel se dejó polimerizando durante 60 min., después se precorrió durante 2 h. a 250 V (voltaie constante) (500 voltios*hora). Posteriormente se aplicaron las muestras (cGH. oGH. bGH. hGH. rGH. pGH y marcadores de pI) en un volumen de 20 μ l y en cantidades de 12 a 15 μ g; seguidamente se corrió durante 14 h. a 810 V (voltaie constante) (11.340 voltios*hora).

Después de la corrida, se cortaron rebanadas de gel de 1' X 1 cm. en dirección ánodo a cátodo. cada una de las cuales se colocaron en 2 ml de agua y así se dejaron durante aproximadamente 1 h.; después se agitó en el vortex y se midió el pH del eluido con el fin de conocer el gradiente de pH. El gel se fijó con ácido tricloroacético (ATA) y ácido sulfosalicilico al 3.46 %, luego se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.02 % e isopropanol al 10 %; la decoloración se llevó a cabo en una solución de isopropanol al 10 % y ácido acético al 10 %. Se emplearon los siguientes marcadores de pI (Sigma):

Marcador	pI
Amilglucosidasa	3.55
Inhibidor de Tripsina	4.55
β -lactoqlobulina	5.13
Anhidrasa Carbónica B bovina	5.65
Anhidrasa Carbónica B Humana	6.57
Mioqlobina	6.76
	7.16
Deshidrogenasa láctica	8.30
	8.40
	8.55
Tripsinógeno	9.30

e) Caracterización biológica

e.1) Bioensayo de actividad somatotrópica. Se midió el efecto de la cSH sobre el ensanchamiento del cartilago epifisial de la tibia en ratas hipofisectomizadas, de acuerdo al método de Greenspan (60).

e.1.1) Hipofisectomía

La hipofisectomía se llevó a cabo de acuerdo a la técnica parafaríngea (61) modificada por Alvarez Buylia. Se emplearon ratas de la cepa Wistar (machos) con una edad que oscilaba entre 26 a 28 días. Antes de la cirugía se les administró hidrocortisona (5.0 mg) y 50.000 UI de antibiótico (penprocilina). Las ratas se anestesiaron con anestésal (2.5 mg/100.0 g de peso corporal).

Una vez recuperados los animales, se colocaron en aserrín estéril, se mantuvieron a una temperatura de 25°C con un ciclo de luz-

oscuridad de 12 X 12 y se les proporcionó suero glucosado al 5% y alimento purina "ad libitum" además se les administró hidrocortisona y antibiótico durante 3 días después de la cirugía.

e.1.2) Bioensayo

Para el bioensayo se utilizaron ratas hipofisectomizadas que habían pasado por un período de observación postoperatorio de 12 a 14 días, en el cual tenían que cumplir los siguientes requisitos: no sobrepasar los 10.0 g de peso corporal y no presentar síntomas de enfermedad.

Se realizó un bioensayo completo con 7 grupos de 4 animales cada uno. El grupo control solo se trató con solución de albúmina de suero bovino al 0.1% en solución salina (NaCl 0.9%). A 3 grupos se aplicó como estándar a la hormona de crecimiento bovina (bGH) resuspendida en BSA al 0.1% en solución salina, aplicándose las siguientes dosis: 60.0 μ g, 120.0 μ g y 240.0 μ g totales durante el ensayo. A los otros 3 grupos se les aplicó hormona de crecimiento de pollo (V BDE-1) en las mismas dosis que la bovina. El tratamiento duró 4 días aplicándose una inyección diaria: la vía de aplicación fue subcutánea; la hormona se administró en un volumen de 0.5 ml. Terminado el tratamiento, se sacrificó a los animales con éter y se obtuvieron las tibias.

e.1.3) Tinción con Nitrato de Plata

Esta técnica se hizo de acuerdo a la metodología de Harvey (45), con modificaciones.

Después de disectar las tibias, se limpiaron del músculo y tejido conjuntivo y se procedió como sigue:

- Lavado con agua durante 30 min.

- Se sumergieron en acetona durante 60 min.
- Lavado con agua durante 30 min.
- Tinción con nitrato de plata al 2%, en esta solución. las tibias permanecieron 20 min.
- 2 lavados con agua.
- Las tibias se colocaron en el negatoscopio durante 20 min. hasta que el hueso se tiñó.
- Se sumergieron en tiosulfato de sodio al 10% durante 10 min.
- Se colocaron en etanol al 80% toda la noche.
- Finalmente se midió la anchura del cartilago epifisial con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Reichert) calibrado con un micrómetro.

e.1.4) Análisis Estadístico

Se utilizó un programa manual diseñado en la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Centro Médico Nacional del IMSS. por Alatorre, F.S. (1976). Se utilizaron análisis para bioensayos balanceados 3+3.

La potencia biológica de la hormona con el 95% de límites de confianza. se obtiene con el análisis de varianza de los contrastes para la fuente de variación. tratamientos. preparaciones. regresión. paralelismo. error experimental. curvatura y curvatura opuesta.

Dado que la característica del bioensayo es su gran variabilidad. la optimización del mismo. se obtiene con los criterios de validez y confiabilidad. los cuales son: "lambda". que es un índice de precisión del ensayo y se obtiene del cociente de la desviación estándar entre la pendiente de la línea de respuesta al logaritmo de la dosis: "q"

que es un índice de significancia de la pendiente. Si " λ " es menor de 0.27 y " q " menor de 1. se puede obtener la potencia del problema con un límite de confianza del 95%. Estos parámetros solo se obtienen con el bioensayo completo (62).

RESULTADOS

I Extracción

Para la extracción de la hormona de crecimiento de pollo, se partió de hipófisis de pollo doméstico, Gallus gallus. Cada hipófisis pesó 9.0 ± 1.0 mg.

En una extracción típica de 300 glándulas (aproximadamente 3.0 g peso húmedo), el volumen del "Extracto Total" fue de 19.8 ml y tuvo un pH de 7.07. Posteriormente este extracto se alcalinizó a pH 9.0; el volumen del "Extracto Alcalino" fue de 20.2 ml.

II Purificación

En la precipitación salina con sulfato de amonio, las fracciones "A y "B" se resuspendieron en el menor volumen posible de agua, siendo: 1.7 ml para la "A" y 5.6 ml para la "B"; el remanente, es decir, el sobrenadante de la fracción "B", constituyó la fracción "C" cuyo volumen fue de 29.5 ml. Posteriormente las tres fracciones se dializaron contra agua; después de la liofilización, las fracciones se almacenaron a -20° C y en oscuridad. Los polvos liofilizados se pesaron:

Fracción A 13.73 mg

Fracción B 90.24 mg

Fracción C 146.8 mg

Cromatografía analítica

En la realización de esta se partió de un extracto proveniente de 144 hipófisis. El perfil cromatográfico se muestra en la figura 6. Como se observa, con el amortiguador de cargado (borato de sodio), se eluyeron las fracciones BDE-1 y BDE-2; durante el gradiente se eluyó la fracción BDE-3; finalmente, con la aplicación del amortiguador de alta fuerza iónica, se eluyó la fracción BDE-4.

La fracción de interés para los fines de este trabajo fue la BDE-1, pues su comportamiento cromatográfico, así como su movilidad relativa (Rf) en electroforesis, coinciden con los datos reportados en la literatura para la cGH (45).

Cromatografía Preparativa

En la cromatografía preparativa, se partió de la fracción "B", proveniente a su vez de una extracción de 300 hipófisis (3.0 g peso húmedo aproximado). Se empleó amortiguador de equilibramiento (borato de sodio pH 8.6) y amortiguador de alta fuerza iónica. En este caso no se aplicó el gradiente, pues como se aprecia en la cromatografía analítica, la fracción de interés se eluye con el amortiguador de equilibramiento, además de que con el gradiente no se resuelven picos de importancia.

En el cromatograma (Fig. 7) se puede observar que la fracción BDE-1 se eluyó con amortiguador de borato de sodio pH 8.6 y con el de

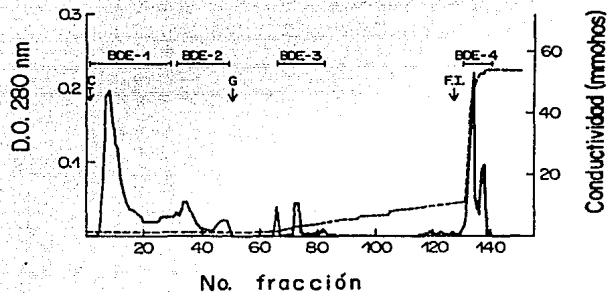


Fig. 6.- Cromatografía analítica de la fracción B, en DEAE-celulosa. Condiciones: flujo, 25 ml/h; vol. muestra, 0,5 ml; vol. fracción, 1 ml; dimensiones de la columna, 13 X 0,8 cm. Abreviaturas: C, amortiguador de cargado; G, gradiente; F.I., alta fuerza iónica.

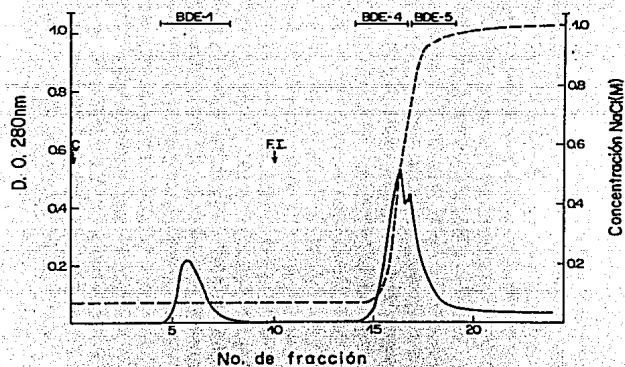


Fig. 7.- Cromatografía preparativa de la fracción B, en DEAE-celulosa. Condiciones: flujo, 24 ml/h; vol. muestra, 2.4 ml; vol. fracción, 4 ml; dimensiones de la columna, 32.5 X 0.5 cm; Abreviaturas: C, cargado; F.I., alta fuerza iónica.

alta fuerza iónica se eluyeron las fracciones BDE-4 y BDE-5. Es evidente que las fracciones eluidas se resolvieron en forma muy homogénea.

Las fracciones obtenidas en esta cromatografía se dializaron contra agua, y luego se liofilizaron y se almacenaron a -20°C . El peso del polvo liofilizado fue de 18.1 mg para la fracción BDE-1.

Después de lavar la columna con el amortiguador de alta fuerza iónica, se reequilibró con amortiguador de borato de sodio pH 8.6, hasta que el eluido de la columna tuvo el mismo pH y conductividad que el amortiguador de equilibramiento. En el caso de cuando se realizaban extracciones a partir de lotes mayores de 300 hipófisis, la fracción "B" se cromatografiaba en 2 ó 3 corridas.

Rendimiento

Para conocer el rendimiento obtenido de la hormona de crecimiento de pollo, se determinó la cantidad de proteína en cada etapa de la purificación, así como en la fracción BDE-1.

Se tomaron alicuotas de cada fracción y se procedió como se indica en la sección de métodos (pp.40), estos resultados se muestran en la Fig. 8 y en la Tabla 4.

El rendimiento de la hormona de crecimiento de pollo fue de 1.12 mg/g de peso húmedo de hipófisis, aunque en otras extracciones se ha obtenido un rendimiento de 2.9 mg/g de tejido (peso húmedo).

Caracterización Electroforética.

1) Electroforesis Discontinua en Geles Nativos de TRIS-poliacrilamida, al 7.5%, pH 8.3.

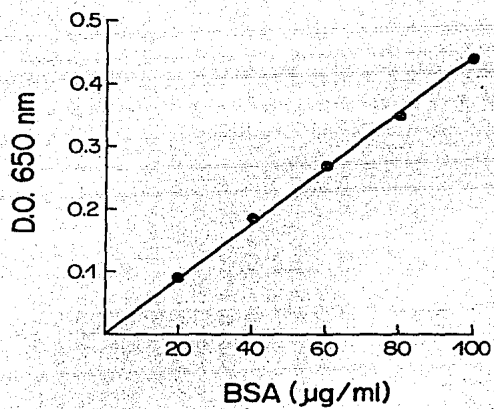


Fig. 8.- Curva patrón para cuantificar la cantidad de proteína, según Hartree (1972 (60)).

MUESTRA	mg
Extracto Alcalino	262.6
Snte. Ext. Alcalino	144.5
Fracción A	7.65
Fracción B	51.0
Fracción C	40.56
Fracción BDE-1	3.35

Tabla 4.- Rendimiento de proteína en diferentes etapas de la purificación de la cGH, según el método de Hartree (51, 52).

Para conocer el grado de purificación de la hormona de crecimiento de pollo, se corrieron alícuotas de cada etapa de purificación, así como de la fracción BDE-1; en cada caso la cantidad de proteína aplicada fue de 30 a 60 μ g. En la Fig. 9 se aprecia el patrón electroforético de las fracciones correspondientes a cada etapa de la purificación.

La fracción BDE-1 presentó un patrón electroforético con 3 bandas conspicuas, cuyas movilidades relativas (Rf) fueron 0.23, 0.31 y 0.35 (Fig.10).

2) Electroforesis Discontinua con Geles de SDS-poliacrilamida.

En este caso también, tanto las fracciones de cada etapa de purificación, como la muestra purificada, se corrieron en geles al 12.5% o al 15%, pH 8.6. En las figuras 11 y 12 se puede observar la reducción de bandas a medida que se avanza en la purificación, así como también se nota un enriquecimiento de la hormona pura con respecto al extracto total.

Determinación de PM de la cGH.

El PM de la fracción BDE-1 se calculó por comparación de su movilidad relativa (Rf) con respecto a la de proteínas de PM conocido (ver Material y Métodos, pp 43) (Fig. 13). En el carril correspondiente a la fracción BDE-1, se aprecian 2 bandas principales cuyos pesos moleculares aparentes son 26,300 y 51,200 d, los cuales podrían corresponder al monómero y al dímero de la hormona de crecimiento de pollo respectivamente (Figs. 12 y 13).

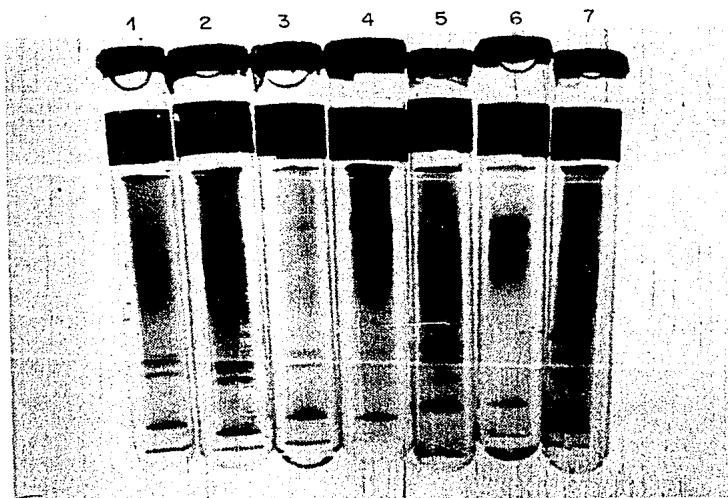


Fig. 9.- Electroforesis Discontinua en PAGE-TRIS, al 7.5%, pH 8.3, de cada etapa de purificación. 1) Extracto total; 2) Sobrenadante del extracto alcalino; 3) Fracción A; 4) Fracción B; 5) Sobrenadante de la fracción 3; 6) Fracción BDE-1; 7) Fracción C.

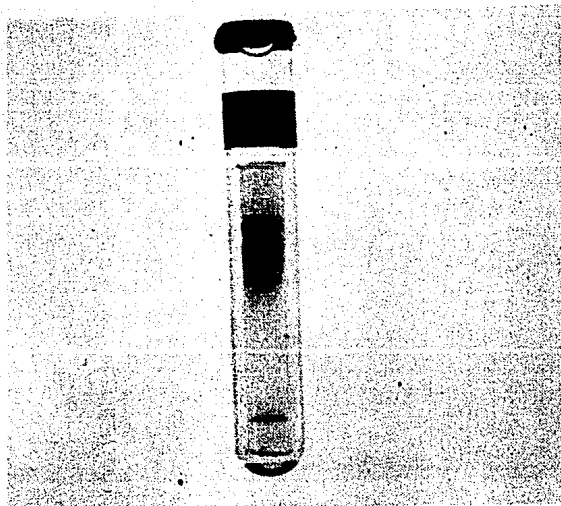


Fig. 10.- Electroforesis discontinua en PAGE-TRIS, al 7.5%, pH 8.3, de la fracción BDE-1 (cGH).

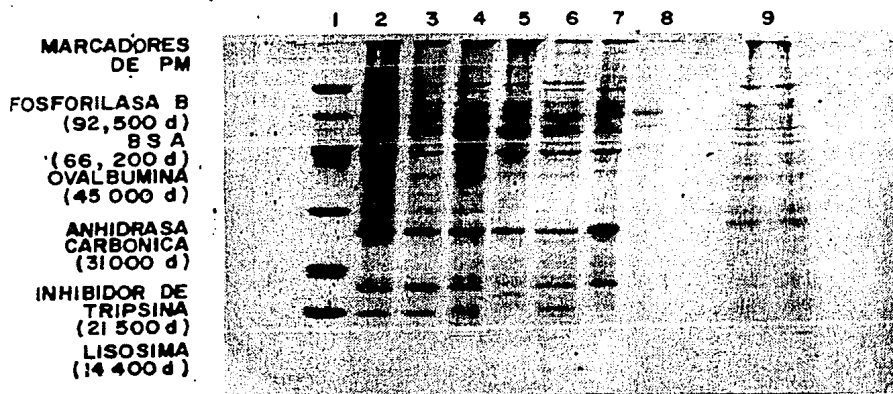


Fig. 11.- Electroforesis Discontinua en SDS-PAGE, al 12.5%, pH 8.6, que muestra el patrón electroforético de cada etapa de purificación, excepto la fracción BDE-1. 1) Marcadores de PM; 2) Extracto total; 3) Extracto alcalino; 4) Sobrenadante del extracto alcalino; 5) Fracción A; 6) Sobrenadante de la fracción A; 7) Fracción B; 8) Fracción B dializada; 9) Fracción C.

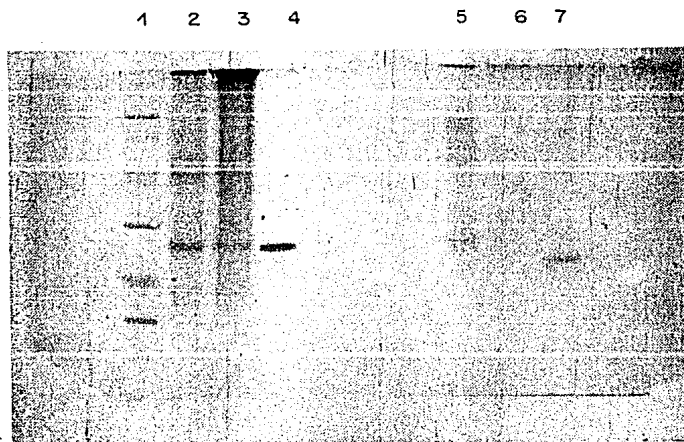


Fig. 12.- Electroforesis discontinua en SDS-PAGE, al 15%, pH 8.6. 1) Marcadores de PM; 2) Fracción B; 3) Sobrenadante de la fracción B; 4) Fracción BDE-1; 5) Fracción BDE-4; 6) Fracción BDE-5 ; 7) hGH.

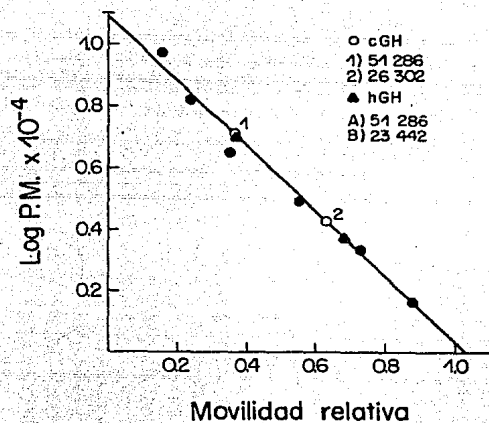


Fig. 13.- Curva patrón para calcular el PM, SDS-PAGE, al 15% pH 8,6. Se muestra el PM de la hormona de crecimiento de pollo (cGH) y de la hormona de crecimiento humana (hGH).

Enfoque Isoeléctrico

En la Fig. 14 se puede apreciar el patrón obtenido en el isoelectroenfoque utilizando anfólitos de rango amplio (3 - 9), para la fracción BDE-1. Por interpolación en la curva obtenida con los marcadores de punto isoelectrico se observó que la CGH mostró un patrón de 2 bandas mayoritarias con pIs de 7.2 y 7.4, y 4 bandas minoritarias con pIs de 6.2, 6.7, 7.1 y 7.5 (Fig. 15).

Electroelución

Como se mencionó en la sección de material y métodos (pp), se separaron los componentes de la fracción BDE-1 obtenida en DEAE-celulosa, mediante una electroforesis en geles nativos de TRIS-poliacrilamida, 7.5%, pH 8.3 y seguida de una electroelución (Fig. 16).

Posteriormente se analizó el patrón electroforético de cada uno de los componentes electroeluidos, para lo cual se realizó una electroforesis discontinua con geles de SDS-poliacrilamida al 15%, pH 8.6, además de correr también a la fracción BDE-1 completa.

El resultado de esta electroforesis se muestra en la Fig.17. Se puede apreciar que los componentes se purificaron homogéneamente mediante la electroelución y que presentan el mismo PM aparente que la fracción BDE-1 completa, 26,300.

En este trabajo no se muestra el rendimiento de cada banda, dado que la cantidad con que se disponía era muy pequeña y ésta se utilizó para el análisis electroforético.

Bioensayo

Los resultados del bioensayo mostraron lo siguiente:

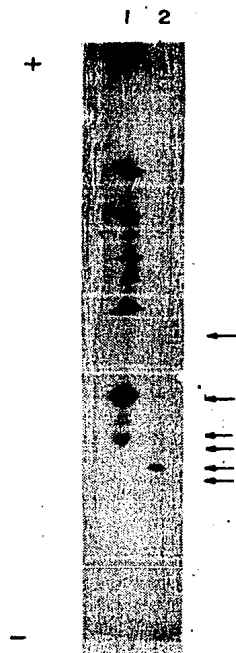


Fig. 14.- Enfoque Isoeléctrico en donde se observa el patrón de migración de la cGH desde el ánodo hacia el cátodo. Gel de poliacrilamida con anfolinas de rango amplio (3-9); pre-corrída, 500 voltios X hora; corrida, 11,340 voltios X hora.
 1) Marcadores de pI; 2) cGH.

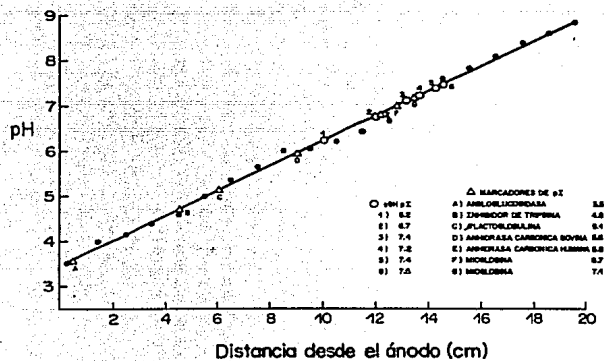


Fig. 15.- Curva patrón para calcular el pI. La curva se realizó con un gradiente de pH con anfólicas de rango amplio (3-9); se muestran los marcadores de pI interpolados, así como sus pI teóricos. Se aprecia también la cGH con sus pI correspondientes.

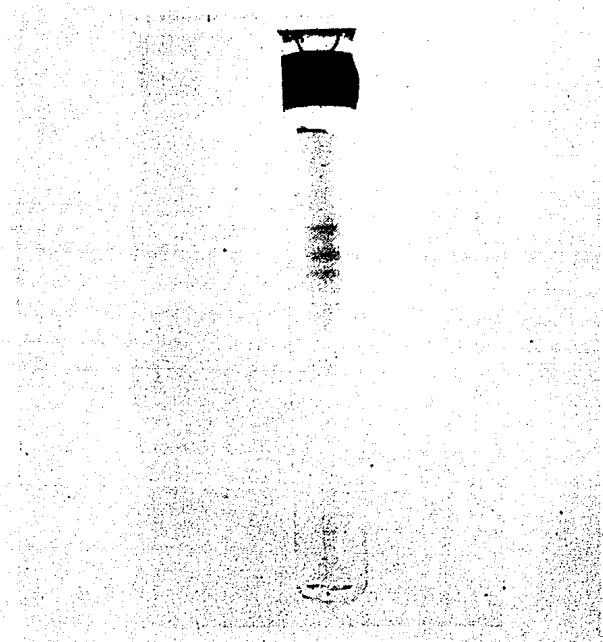


Fig. 16.- Electroforesis discontinua en PAGE-TRIS, al 7.5%, pH 8.3. de la fracción BDE-1; gel de 10.5 X 0.5 cm.

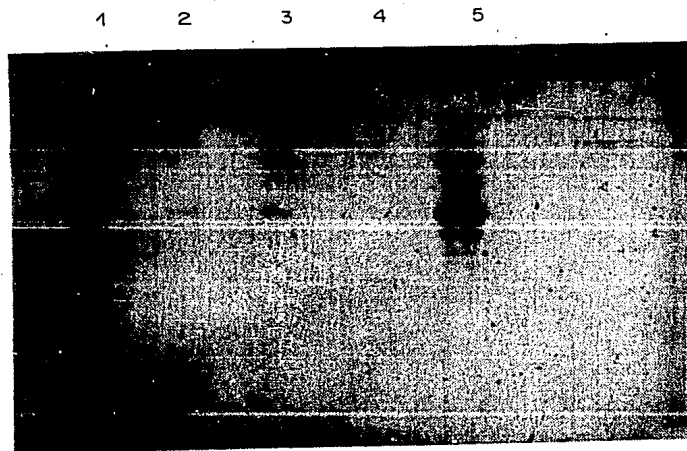


Fig. 17.- Electroforesis Discontinua en SDS-PAGE, al 15%, pH 3.5, de los eluidos de cada uno de los componentes de la fracción BDE-1. 1) Marcadores de PM; 2) componente 0.23; 3) componente 0.31; 4) componente 0.35; 5) fracción B

Para el grupo control, se obtuvo un promedio de la anchura del cartilago de la epifisis de la tibia de 125.0 μm .

Por otro lado, para el estándar (bGH) se obtuvieron los siguientes promedios: 205.0 μm para la dosis baja (60.0 μg), 310.63 μm para la dosis intermedia (120.0 μg) y 298.75 μm para la dosis alta (240.0 μg).

En el caso de la hormona de crecimiento de pollo, para la dosis baja se obtuvo un promedio de 191.87 μm ; de 241.37 μm para la dosis intermedia; y de 310.83 μm para la dosis alta. Estos resultados se muestran en la tabla 5 y en la Fig 18.

El análisis estadístico mostró que la hormona de crecimiento de pollo tiene una potencia biológica de 1.769 UI/mg de proteína, cuyos límites de confianza son 0.956 UI/mg y 3.27 UI/mg, la lambda tuvo un valor de 0.253 y el de la "g" de 0.188.

Comparación con otras GHs.

Con el objeto de comparar el comportamiento de la cGH con las hormonas de crecimiento provenientes de distintas especies de mamíferos se utilizaron distintos criterios electroforéticos:

1) Electroforesis discontinua en geles nativos de Tris-poliacrilamida al 7.5%, pH 8.3.

En lo que respecta a las movilidades relativas de las GH_n de las especies de mamíferos se obtuvo lo siguiente: la rbGH 0.403; la bGH nativa (NIH-GH-B1B) 0.200, 0.267 y 0.334; la bGH nativa de Miles 0.205, 0.263 y 0.329; la oGH 0.198, 0.265 y 0.339; la pGH 0.280, 0.357

GRUPO	DOSIS DE GH ug	MEDICION \bar{X} um
C O N T R O L		
I	0	125.6
E S T A N D A R (bGH)		
II	60	205.0
III	120	310.6
IV	240	298.7
P R O B L E M A (cGH)		
V	60	191.8
VI	120	241.3
VII	240	310.8

Tabla 5.- Bioensayo de la GH. El grupo I corresponde al control; los grupos II, III y IV corresponden al estándar (bGH); los grupos V, VI y VII corresponden a la hormona de crecimiento de pollo (cGH) purificada en el laboratorio.

Bioensayo de la tibia

NIH-GH-B18 vs. V-BDE-1-cGH

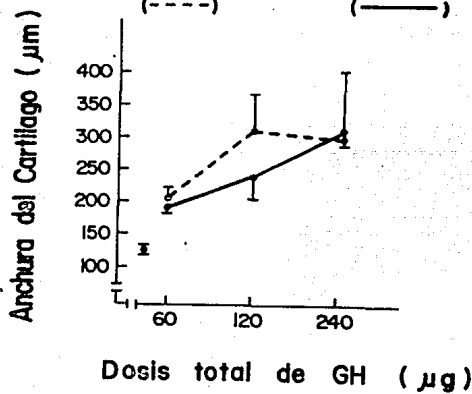


Fig. 18.- Gráfica que muestra la respuesta en el bioensayo del estándar NIH-GH-B18 y la cGH (BDE-1) a dosis progresivamente crecientes, en la epífisis de la tibia de ratas hipofisectomizadas.

y 0.408; la hGH presentó un Rf de 0.596 y 0.649 (Fig. 19). Este experimento hizo evidente que todas las preparaciones purificadas de GH de los distintos mamíferos también mostraban heterogeneidad.

2) Electroforesis discontinua en SDS-PAGE al 15%.

Al comparar el comportamiento de las diferentes hormonas bajo condiciones no reductoras, el PM de las GH_n de mamíferos, obtenidos con este método, fueron los siguientes:

rbGH 25, 200 d; bGH 22, 000 d; oGH 23, 000 d; pGH 24, 000 d; hGH 23, 442 (Fig. 12, 13, 20, 21).

3) Isoelectroenfoque

En la Fig. 22 se puede apreciar el patrón de bandas que mostraron las diferentes preparaciones de GHs. A continuación se mencionan los pI encontrados para cada una de las hormonas: La oGH de 5.8, 7.1 y 7.2; la pGH de 5.9, 6.6, 6.7, 6.9; la rGH de 6.5, 6.8, 7.9, 10.2, 10.5; la hGH de 4.9, 5.05 y 5.1; y la bGH de 6.5, 7.1, 7.22, 7.41. Resulta evidente la heterogeneidad de carga de las hormonas.

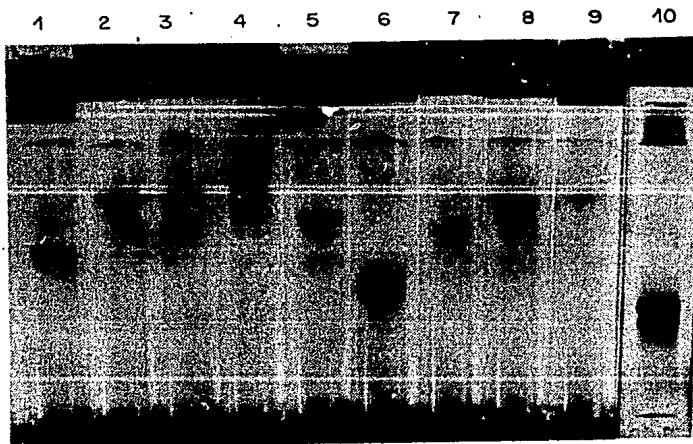


Fig. 19.- Electroforesis Discontinua en PAGE-TRIS, al 7.5%, pH 8.3, de GH de diferentes especies de mamíferos. 1) rbGH; 2) bGH (NIH); 3) bGH (Miles); 4) oGH; 5) pGH; 6) oPRL; 7) amor tiguador de la muestra; 8) cGH; 9) cGH; 10) hGH.

SDS-PAGE AL 15 % BAJO CONDICIONES
NO REDUCTORAS

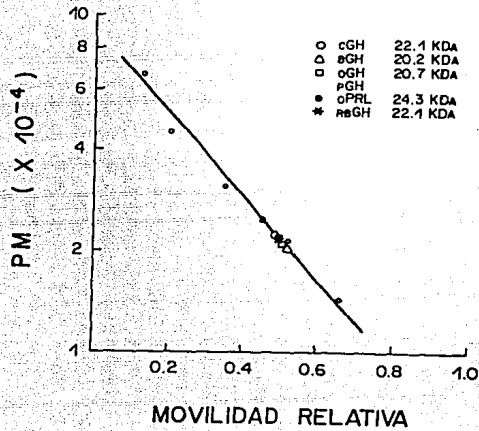


Fig. 20.- Curva patrón para calcular el PM; SDS-PAGE, al 15% pH 8.6, en condiciones no reductoras. Se muestra el PM de la GH de diferentes especies de mamíferos, así como de la cGH.

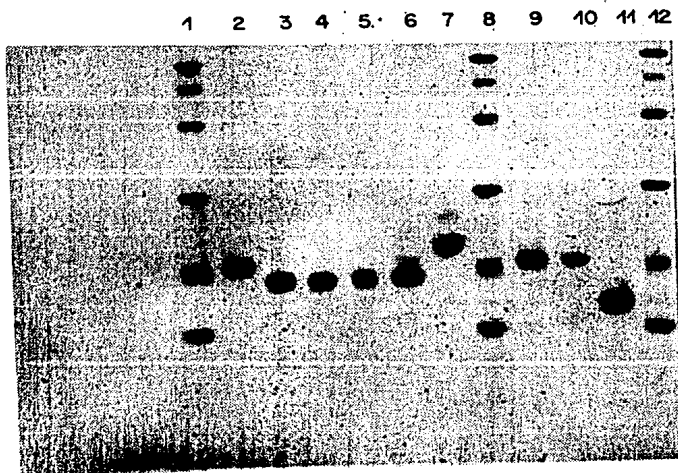


Fig. 21.- Electroforesis discontinua en SDS-PAGE, al 15., pH 2.6. en condiciones no reductoras. Se muestran GHs de diferentes especies de mamíferos. Carriles: 1, 8 y 12, marcadores de PM; 2) rbGH; 3) bGH (NIH); 4) bGH (Hiles); 5) oGH; 6) pGH; 7) oPRL; 9) cGH; 10) cGH; 11) β -lactoglobulina.

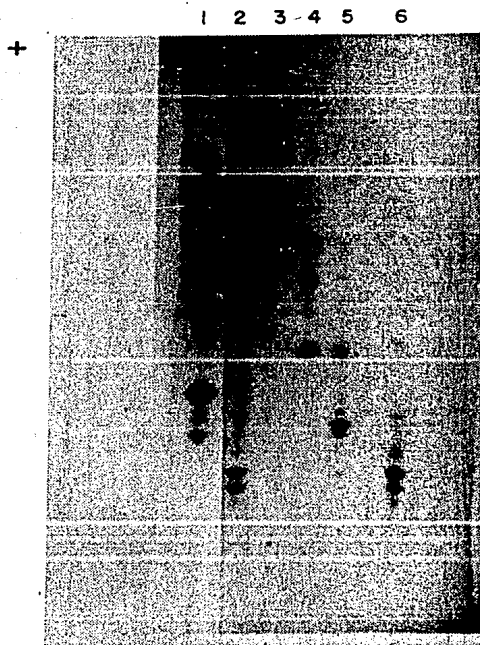


Fig. 22.- Enfoque Isoeléctrico en donde se aprecia el patrón de migración de la GH de varias especies de mamíferos. 1) Marcadores de pi; 2) oGH; 3) pGH; 4) rGH; 5) hGH; 6) bGH.

D I S C U S I O N

El conocer la relación estructura-función de las biomoléculas, en particular de las hormonas, es de fundamental importancia para comprender los mecanismos mediante los cuales se llevan a cabo ciertos procesos vitales en los organismos. Una de estas moléculas es la hormona de crecimiento. Para lograr este ambicioso objetivo es necesario, entre otros aspectos, disponer de cantidades suficientes de dicha hormona.

La GH, como se ha mencionado, tiene una gran cantidad de funciones, lo que ha llevado a pensar que esta hormona podría existir como una familia de péptidos (variantes) cada uno de los cuales pudiera ser específico para determinada función. Aunque se tienen algunos indicios de que esto puede suceder (en mamíferos), aún no se ha comprobado de manera satisfactoria la hipótesis enunciada.

Los estudios biológicos, bioquímicos y fisicoquímicos de la GH se han realizado más ampliamente en mamíferos y al respecto existe una amplia literatura. Sin embargo, no se puede decir lo mismo de las otras clases de vertebrados, en las cuales los estudios son mínimos o no se han realizado.

En este trabajo, como se mencionó en la introducción, el objetivo fue purificar y caracterizar a la hormona de crecimiento de pollo (cGH).

Se conoce la existencia de la cGH desde 1971 (41), entonces se describió un Rf para la hormona de aproximadamente 0.3. Farmer, Papkoff y Hayashida (44) la purificaron y caracterizaron parcialmente, obteniendo un rendimiento de 0.2 mg/g de tejido, un Rf de 0.3, con 2

puentes S-S y en la composición de aa, 4 restos de Cys, un alto contenido de Glu y Leu y bajo contenido de His, Met y Trp. Posteriormente, Harvey y Scanes (45) la purificaron y caracterizaron parcialmente y obtuvieron un rendimiento de 0.4 mg/g de tejido, un Rf de 0.31, un PM de 23, 300 d, un pI de 7.5 para la forma mayoritaria y de 6.5 y 5.8 para componentes minoritarios, siendo la composición de aa semejante a lo obtenido por Farmer et al. Leung y cols. (46), obtuvieron un rendimiento de 0.60 mg/g de hipófisis, un Rf de 0.2, un PM de 26, 000 d, un pI de 7.6 y el análisis en la composición de aa semejante a lo obtenido por Farmer y Harvey. En todos estos procedimientos la metodología empleada en la purificación y caracterización incluyó: homogeneizaciones, alcalinizaciones, precipitaciones salinas, cromatografías de intercambio iónico y de exclusión molecular, electroforesis y técnicas automatizadas de análisis de composición y secuenciamiento de aa.

En el presente trabajo se obtuvo un rendimiento de la hormona de crecimiento de pollo de 1.12 mg/g de hipófisis, aunque en otras purificaciones hemos obtenido rendimientos de hasta de 2.9 mg/g de tejido; este rendimiento es alto si se compara con el obtenido por otros autores (Tabla 6). Este resultado se puede atribuir a las óptimas condiciones en las que se extrajo y purificó a la hormona. Por un lado, las hipófisis se obtuvieron frescas, es decir se pudieron disectar de pollos recién sacrificados, los cuales tenían aproximadamente 10 min. de muertos; las cabezas se colocaban en hielo "frappé" y de ahí se tomaban para disectar las glándulas. Inmediatamente después las hipófisis se colocaban en hielo seco; en estas condiciones se transportaban al laboratorio, donde se almacenaban a -70 °C; el obtener a las glándulas en un tiempo tan

REFERENCIA	RENDIMIENTO mg/g
Farmer, S.W., et al, 1974	0.2
Harvey, S. y Scanes, C.G., 1977	0.4
Leung, F.C., et al, 1984	0.6
Arámburo, C. y Carranza, S.M.	1.12

Tabla 6.- Rendimiento de la Hormona de crecimiento de pollo obtenido por varios autores y el obtenido en el laboratorio.

corto y congelarlas inmediatamente asegura un material biológico óptimo y evita su deterioro por autólisis, así como la degradación de las moléculas por procesos proteolíticos.

Por otra parte, todas las etapas de extracción y purificación se realizaron a 4 °C, temperatura a la cual la mayor parte de las proteínas permanecen estables. La homogeneización se llevó a cabo en presencia de inhibidores de proteasas; estos fueron el PMSF el cual actúa afectando irreversiblemente el sitio activo de las serin-proteasas, con actividad semejante a tripsina y quimotripsina; el otro fue aprotinina, la que actúa como sustrato análogo a las proteínas, de tal manera que compite por la hidrólisis. De esta manera se trató de evitar al máximo la proteólisis.

La alcalinización a pH 9 del homogenado constituyó un paso de extracción que involucra el proceso llamado precipitación isoelectrica, en el que la cGH permanece soluble, dado que su pI es menor que 9, pero se precipitan todas las otras proteínas cuyos pI sean muy alcalinos. Este comportamiento de la hormona se ha reportado también por otros autores (44, 45, 46, 47).

Durante la precipitación salina con sulfato de amonio, la cGH se obtiene en el precipitado resultante de la precipitación al 50 % de saturación, lo cual es semejante a lo obtenido por otros autores (40, 44, 45, 47). La estrategia de utilizar precipitaciones secuenciales permite eliminar inicialmente a aquellas proteínas que precipitan a bajas concentraciones de sulfato de amonio. Es evidente que este paso de purificación es rápido y al mismo tiempo proporciona un alto rendimiento, con la ventaja adicional de que prácticamente no se provoca ningún daño a la hormona.

En el proceso cromatográfico en DEAE-celulosa de la fracción B, la cGH no se retiene en la columna, sino que se eluye rápidamente en las primeras fracciones; este comportamiento de la hormona indica que al pH (8.6) al que se eluye, esta tiene una carga neta positiva y considerando que la columna utilizada es un intercambiador aniónico, es de esperarse este resultado. Por otra parte, bajo las condiciones usadas durante este paso cromatográfico el resto de las proteínas que componen a la fracción B se quedan retenidas en la columna, tal como se hizo evidente en la cromatografía analítica realizada con una alícuota de la fracción B. Estas características favorecieron el que fuera posible suprimir el gradiente de fuerza iónica y pH, de manera que en las cromatografías de tipo preparativo solamente era necesario utilizar el amortiguador de "cargado" para eluir a la cGH en forma mayoritaria, y posteriormente lavar con un amortiguador de alta fuerza iónica con un cambio drástico de pH para eluir al resto de las proteínas.

La metodología de purificación de la cGH empleada en este trabajo difiere en algunos aspectos de las utilizadas por otros autores. Farmer et al (44) siguieron un mayor número de pasos cromatográficos: primeramente cromatografiaron a la fracción que contenía a la cGH en Amberlita CG-50, después en una columna de Sulfoetil-Sephadex C-50, una de Sephadex G-100 y DEAE-celulosa; los pasos de purificación en este caso son numerosos lo que redundó en un rendimiento bajo. Harvey et al (45) utilizan una metodología muy parecida a la utilizada por nosotros; la diferencia es que ellos realizan primeramente una extracción glicoproteica con acetato de amonio (6%) y etanol (40%) a pH 5.1, posteriormente siguen una secuencia muy parecida a la de este trabajo pero no incluyen inhibidores de proteasas para homogeneizar.

La metodología empleada por Leung (46) difiere más de la nuestra, pues ellos incluyen una precipitación con sulfato de amonio 0.15M y una acidificación a pH 4 con ácido metafosfórico, después una extracción con NaOH pH 9.5 y posterior a la cromatografía en DEAE-celulosa, realizan otra en Sephacryl S-200; la manipulación de la hormona también está sujeta a un mayor número de etapas durante la purificación. Es importante señalar además, que los procedimientos de purificación deben involucrar la combinación efectiva de pasos de fraccionamiento para obtener buenos resultados en términos de altos rendimientos, mínimo daño a la proteína de interés y rapidez.

Como se puede ver, es evidente que al aumentar los pasos de purificación de la CGH, esto trae como consecuencia un bajo rendimiento. La metodología empleada por nosotros, no involucra un gran número de etapas de purificación, es rápida y sencilla, lo que permite obtener a la hormona sin dificultad y en un tiempo corto (6 días).

Por otra parte, Wallace y Ferguson (22) emplearon el mismo método de purificación para separar a la GH de diferente origen animal (hombre, borrego, toro, cerdo, ballena) y observaron que cada una de las hormonas se comporta de manera diferente. Esta diferencia depende de las propiedades fisicoquímicas de cada hormona, lo cual permite implementar métodos de purificación para cada una, de tal manera que se obtengan los mejores rendimientos de hormona activa.

Por lo que se refiere a la caracterización bioquímica de la CGH, se obtuvo lo siguiente (Tabla 7):

En el análisis electroforético de la fracción BDE-1 en el sistema nativo de PAGE, se resolvieron 3 bandas con movilidades relativas ($R_{f_{\alpha}}$) de: 0.23, 0.31, 0.35. Si se compara el patrón electroforético

REFERENCIA	PM (d)	MOVILIDAD RELATIVA (Rf)	pI
Nicoll, C.S. y Licht, P., 1971		0.31	
Farmer, S.W., et al, 1974		0.3	
Harvey, C. y Scanes, G.C., 1977	23, 300	0.31	7.5, 6.5, 5.8
Leung, F.C., et al, 1984	26, 000	0.2	7.6
Lai, P.H., et al, 1984	27, 000		
Arámburo, C. y Carranza, S.M., 1987	26, 300	0.23, 0.31, 0.35	6.2, 6.7, 7.1, 7.2*, 7.4*, 7.5

Tabla 7.- Algunas propiedades fisicoquímicas de la hormona de crecimiento de pollo obtenidas por varios autores y las obtenidas en el laboratorio.

* Estos valores corresponden a las bandas mayoritarias.

durante la extracción y purificación de la cGH, se puede evidenciar la reducción de bandas no correspondientes a la hormona, así como su enriquecimiento a medida que se avanza en los pasos de purificación. Otros autores han obtenido movilidades relativas para la hormona de: 0.3 (41), 0.31 (45), 0.2 (46) y 0.3 y 0.22 (63). Se puede apreciar que los Rf. de la cGH obtenidos en este trabajo, se acercan más a los obtenidos por Arámburo y Scanes (63), excepto la banda 0.35, lo cual se debe probablemente a un efecto de concentración de la hormona aplicada en el gel, ya que al correr la misma muestra en las mismas condiciones, pero menos concentrada, solo se aprecian las bandas correspondientes a 0.31 y 0.23.

Si se comparan las movilidades relativas de la cGH con las de especies de mamíferos (hombre, bovino, ovino y porcino), se notará que la movilidad relativa de la cGH se asemeja más a la de la oGH y bGH que a la de la hGH y pGH. El diferente comportamiento de las GH, en el sistema de PAGE-TRIS, refleja un aspecto de las propiedades fisicoquímicas de la GH de diferentes clases de vertebrados (mamíferos y aves), relacionado con la carga neta que presentan estas moléculas bajo las condiciones del sistema empleado, lo cual está dado, en último término, por la estructura molecular.

Con el objeto de determinar el PM de la cGH se examinó la fracción BDE-1 en el sistema de SDS-PAGE al 12.5%. Por un lado, bajo condiciones no reductoras, la banda que correspondería al monómero de la cGH, presenta un PM menor (23,000 d) que el que presenta en condiciones reductoras (26,300 d): esta discrepancia en el PM de la cGH, seguramente se debe a que en condiciones reductoras se rompen puentes disulfuro (S-S), lo que conlleva a que aumente el tamaño (radio de Stokes) de la molécula, presentando una movilidad relativa

menor y por lo tanto un PM aparentemente mayor, mientras que esto no sucede en condiciones no reductoras, pues el tamaño de la hormona no es afectado por agentes reductores que rompan sus puentes S-S. Por otro lado, bajo condiciones reductoras, se obtuvo un PM de 26.300 d. Se evidenció también una banda con PM de 51.280 d correspondiente probablemente al dímero. Es de llamar la atención la presencia de una forma dimérica en condiciones reductoras, si se considera que ésta es el resultado de la asociación de dos monómeros entre los cuales existe algún enlace del tipo S-S; sin embargo la forma dimérica encontrada en este trabajo podría ser el resultado de la asociación de moléculas entre las cuales existe alguna interacción diferente al enlace S-S. Al respecto, se ha encontrado en algunas especies de mamíferos (rata, perro, hombre) también una forma dimérica resistente a agentes reductores u oxidantes (27); Frohman (64) encontró que en hGH la forma dimérica solo se transforma a la forma monomérica cuando se somete a un tratamiento con guanidina 5 M. Ambas formas se han evidenciado tanto en la hipófisis como en el plasma (65). Esta forma dimérica podría ser equivalente a una de las variantes de masa (45K) que se han identificado en mamíferos (27, 64, 65).

Cuando se comparan los PM entre las GH_n de mamífero y la cGH, se puede observar que hay una semejanza entre la cGH (26.300 d) y la rbGH (25.200) y que entre la cGH y las otras GH_n existe una diferencia notable: pGH 24.000 d, oGH 23.000 d y la hGH nativa 22.000 d.

Por enfoque isoeléctrico, la cGH presentó una gran heterogeneidad, pues se obtuvieron 2 bandas mayoritarias con pI₂ de 7.2 y 7.4 y 4 bandas minoritarias con pI₂ de 6.2, 6.7, 7.1, y 7.5. Esta heterogeneidad encontrada para la cGH podría sugerir la presencia de variantes de carga, suposición apoyada por la heterogeneidad

encontrada también en el sistema nativo de PAGE: en el IEF se obtienen mayor número de bandas por el mayor grado de resolución de esta técnica. Se advierte que la cGH tiende a comportarse más como una molécula básica que como una ácida: en términos generales esto es semejante a lo obtenido por otros autores (45, 46). Esta heterogeneidad se ha demostrado también para las GH₂ de mamíferos, en donde la semejanza entre cGH, bGH y oGH es evidente con este criterio, mientras que la hGH, rGH y pGH tienen un pI más ácido que la cGH y las otras hormonas de mamífero enunciadas. De todas las hormonas comparadas, la hGH es la más ácida.

Por lo que se refiere a la electroelución, este es un método de separación de moléculas a partir de un gel de TRIS-poliacrilamida (PAGE) desarrollado en el laboratorio, mediante el cual se logró la separación de las 3 bandas de la cGH obtenidas en el sistema nativo de PAGE: esto no ha sido reportado por otros autores. En estudios posteriores a este trabajo, realizados en el laboratorio, se han ensayado diferentes tiempos de corrida y se ha visto que el óptimo es de 6 horas de electroelución, al cual se obtienen los mayores rendimientos de proteína con respecto a la inicial: tiempos mayores o menores a este redundan en un menor rendimiento. Esta técnica es significativamente importante, ya que permitirá separar a las bandas de cGH (variantes de carga) obtenidas en el sistema nativo de PAGE en un tiempo corto y así disponer de ellas para efectuar estudios de caracterización bioquímica y biológica. Al respecto, se piensa que estas bandas representan variantes de carga de la cGH, pues al correr cada una en un sistema de PAGE-SDS, las 3 bandas presentan el mismo pI. Además, en otro trabajo (63) se ha evidenciado que en un ensayo lipolítico, la banda correspondiente a 0.22 es activa, mientras que la

0.3 no lo es, pero ambas son reconocidas por el anticuerpo dirigido contra la cGH. Posiblemente la cGH sea una familia de péptidos cada uno con una determinada función. Por otro lado no sería raro encontrar variantes para la cGH, si se han encontrado variantes para GH_a de mamífero (17, 43).

Para probar la actividad de la fracción correspondiente a la cGH (BDE-1), se realizó el bioensayo de la tibia de rata, el cual demostró la actividad somatotrópica de dicha fracción (BDE-1), siendo su potencia de 1.71 UI/mg con límites de confianza de 0.956 UI/mg - 3.27 UI/mg; este método de ensayo para la hormona de crecimiento de pollo es razonablemente eficaz y confiable para "valorar" a la actividad de la hormona.

Es interesante notar que existen semejanzas y diferencias entre las GH_a de mamíferos (bGH, oGH, pGH, hGH, rGH) y de aves (cGH), 2 clases diferentes de vertebrados. Se podría pensar que aunque la GH se ha modificado a lo largo de la evolución en las diferentes clases de vertebrados, se ha tendido a conservar también en algunas regiones las cuales probablemente sean importantes para su actividad biológica (o para determinada actividad biológica). Esto estaría de acuerdo con la hipótesis acerca de la evolución de la GH (25), la que argumenta que esta molécula junto con otras (PRL y HPL) provienen de un mismo gen, el cual divergió hace aproximadamente 4×10^8 años, tiempo que corresponde a la aparición de los vertebrados según los registros fósiles.

Los datos obtenidos en este trabajo acerca de la heterogeneidad de la cGH sugieren que esta hormona presenta variantes de carga, lo cual está apoyado por estudios en un ensayo lipolítico (63) de las "variantes". Posiblemente la cGH sea más que una entidad molecular

única, una familia de péptidos cada uno de los cuales desempeñe una determinada función. Por otra parte, aunque se ha realizado ya un estudio de la actividad biológica e inmunológica de las "variantes" de la cGH, será necesario caracterizarlas bioquímicamente y utilizar otros criterios de ensayo biológico, como son el diabetógeno, el de la actividad de la ornitín descarboxilasa o el de la diferenciación de la línea celular preadipocítica 3T3.

En este trabajo se ha desarrollado una técnica de purificación altamente eficiente, la cual permite obtener a la cGH pura, en cantidades razonables y en tiempo corto; además de ser activa desde el punto de vista biológico e inmunológico.

Aunque se ha realizado ya parte de la caracterización bioquímica de la cGH, este trabajo podría continuarse con el estudio de otros aspectos de la caracterización bioquímica como son la determinación de la composición y secuenciamiento de aa.

C O N C L U S I O N E S

1) Se desarrolló una metodología de extracción y purificación eficiente para la obtención de la hormona de crecimiento de pollo, a partir de glándulas hipofisarias. Mediante ella se obtienen cantidades razonables de la hormona en un tiempo relativamente corto. Esto permitirá disponer de la hormona para continuar con la realización de los estudios de la relación estructura-función.

2) Los pasos principales de esta metodología consistieron en: a) Homogeneización en presencia de inhibidores de proteasas. b) alcalinización a pH 9.0. c) precipitaciones diferenciales con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20 y 50% de saturación. d) cromatografía en DEAE-celulosa a pH 8.6. e) electroforesis semipreparativa en PAGE al 7.5% pH 8.3. y f) electroelución.

3) El rendimiento de la fracción BDE-1 (cGH) obtenido mediante esta metodología fue de 1.12 mg/q de hipófisis (aunque en otras purificaciones se han obtenido rendimientos de hasta 2.9 mg/q de hipófisis).

4) Mediante el sistema electroforético nativo de PAGE, la cGH pura se resuelve en 3 bandas, con Rf de 0.23 0.31 y 0.35.

5) La hormona de crecimiento de pollo purificada, correspondiente a la fracción BDE-1, presenta un PM aparente de 26,300 d de acuerdo al sistema electroforético con SDS-poliacrilamida (12.5% pH 8.6) bajo

condiciones reductoras. Sin embargo bajo condiciones no reductoras se obtuvo un PM aparente de 22.000 d.

6) Por medio de IEF, la cGH se comporta como una molécula heterogénea, presentando los siguientes pI: 6.2, 6.7, 7.1, 7.2, 7.4, 7.5, de las cuales las bandas mayoritarias fueron 7.2 y 7.4. Este tipo de heterogeneidad se ha demostrado también en mamíferos.

7) Se han logrado aislar los 3 componentes de la fracción BDE-1 (0.23, 0.31, 0.35) observados en el sistema electroforético con TRIS-poliacrilamida, por medio de una electroelución; el PM aparente calculado para los 3 componentes es el mismo que para la fracción BDE-1.

8) El hecho de que la cGH con PM de 26.300 d. en un sistema electroforético de PAGE-TRIS (7.5%, pH 8.3) presente 3 bandas (las 3 con el mismo PM, 26.300 d) y 6 bandas en el sistema de IEF, apoya la hipótesis de la existencia de variantes de carga de la cGH.

9) La metodología de purificación desarrollada en este trabajo proporciona una cGH que es totalmente activa en el bioensayo de la tibia de rata hipofisectomizada (tiene actividad somatotrópica).

10) La movilidad electroforética relativa de la cGH es semejante a la de la bGH y oGH, pero muy diferente a la de la hGH y pGH.

11) El PM aparente de la cGH es ligeramente superior al que presenta la GH en mamíferos.

CARACTERISTICAS GENERALES DE AVES

Las aves se caracterizan por: ser organismos gnátostomados; presentan un esqueleto de hueso el cual es muy ligero, pues está adaptado para el vuelo; son bípedos y la locomoción es terrestre o aérea; presentan alas y plumas; su respiración es pulmonar además de presentar sacos aéreos; son amniotas, presentan también vitelo, corion y alantoides como membranas extraembrionarias; son homeotermos; presentan corazón tetracavitario; carecen de dientes y presentan cloaca (66, 67, 68).

Los pollos son aves terrestres omnívoras, capaces solamente de vuelos cortos y rápidos, generalmente presentan dimorfismo sexual. Estas especies tienen un éxito ecológico notable y su distribución es universal. Su clasificación es la siguiente (66, 68):

Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Gnátostomata
Clase	Aves
Subclase	Neornithes
Superorden	Neognathae
Orden	Galliformes
Género	<u>Gallus</u>
especie	<u>gallus</u>

B I B L I O G R A F I A

- 1) De Robertis, E.D.P.. De Robertis, E.M.F. (1981) Biología Celular y Molecular. El Ateneo. México pp. 565, 577, 578.
- 2) Junqueira, L.C., Carneiro, J. (1981) Histología Básica. Salvat Editores, S.A., México pp. 391-397.
- 3) Beck, W.S. (1977) Fisiología Molecular Celular y Sistemática. México pp. 629-680.
- 4) Guyton, A.C. (1983) Fisiología Humana. Interamericana México pp. 416-422.
- 5) Sturkie, P.D. (1968) Fisiología Aviar. Ed. Acribia. España pp. 425-427.
- 6) Scanes, C.G. (1986) Pituitary Gland. In Avian Physiology (Sturkie, P.D., ed.). Springe Verlaq. New York pp.384, 392-394.
- 7) Josza, R., Scanes, C.G. (1979) Functional Differentiation of Embrionic Fowl Pituitary Gland Studied by Immunohistological Approach. Gen. and Comp. Endocr. 39: 158-163.
- 8) Tixier-Vidal, A., Follet, B.K. (1973) The Adenohypophysis

- In Avian Biology Vol. III (Farner, D.S., King, J.R., Parkes, K.C., eds.). Academic Press, New York pp. 110-170.
- 9) Bridgewater, W.S. (1966) The Columbia-Viking Desk Encyclopedia. Dell Publishing Co., Inc., New York pp. 743.
 - 10) Ganong, W.F. (1978) Manual de Fisiología Médica. El Manual Moderno, México pp. 358.
 - 11) Houssay, B.A. (1976) Fisiología Humana. El Ateneo, México pp. 1294.
 - 12) Balk, S.D., Shiu, R.P., La Fleur, M.M. and Young, L.L. (1982) Epidermal Growth Factor and Insuline Cause Normal Chicken Heart Mesenchymal Cells to Proliferate Like Their Rous Sarcoma Virus-Infected Counterparts. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 1154-1157.
 - 13) Ebendal, T., Hedlung, K.O. and Norrgren, G. (1982) Nerve Growth Factor in Chick Tissues. J. Neurosci. Res. 8:153-164.
 - 14) Evans, H.M., Long, J.A. (1921) The Effect of the Anterior Lobe Administired Intraperitonreally Upon Growth, Maturity and Oestrus Cycles of the Rat. Anat. Record. 21: 62-63.

- 15) Cho Hao Li (1975) The Chemistry of Human Pituitary Growth Hormone: 1963-1973. In Hormonal Proteins and Peptides Vol. III (Cho Hao Li, ed.) Academic Press, New York pp. 10-38.
- 16) Barrington, E.J. (1977) Introducción a la u Endocrinología General y Comparada. H. Blume Ediciones, Madrid pp. 54-64.
- 17) Chawla, R.K., Parks, J.S. Ph. D., Rudman, D. (1983) Structural Variants of Human Growth Hormone: Biochemical Genetic and Clinical Aspects. Ann.Rev. Med. 34: 519-547.
- 18) Li, C.H., Evans, H.M., Simpson, M.E. (1945) Isolation and Properties of the Anterior Hypophyseal Growth Hormone. J. Biol. Chem. 159: 353-356.
- 19) Wilhelmi, A.E., Fishman, J.B., Russell, J.A. (1948) A New Preparation of Crystalline Growth Hormone. J. Biol. Chem. 176: 735-746.
- 20) Ellis, S.A. (1958) Scheme for the Separation of Pituitary Proteins. J. Biol. Chem. 233: 63-68.
- 21) Ellis, S., Vodian, M.A., Grindeland, R.D. (1978) Studies on Bioassayable Growth Hormone-like Activity of Plasma. Recent Prog. Horm. Res. 34: 213-238.

- 22) Wallace, L.C., Ferguson K.A. (1964) Chromatography on DEAE-Cellulose of Pituitary Extracts from Several Species. *J. Endocr.* 30: 387-397.
- 23) Li, C.H. (1972) Aspects of the Comparative Chemistry of Human Pituitary Growth Hormone and Chorionic Somatomammotropin. In *Growth and Growth Hormone* (Pecile, A., Muller, E.E., eds.) *Experta Medica* pp. 17-24.
- 24) Wilhelmi, A.E. (1974) Chemistry of Growth Hormone. *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology Vol. IV, The Pituitary Gland, Part 2* (Greep, R.O., Astwood, E.B., Kobil, E., Sawyer, W.H., Geiger, S.R., eds.), American Physiological Society, Washington, D.C. pp. 59-78.
- 25) Paladini, A.C., Peña, C., Poskus, E. (1983) Molecular Biology of Growth Hormone. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 15: 25-56.
- 26) Seavey, B.K., Singh, R.N.P., Lewis, U.J., Geschwind, I. I. (1971) Bovine Growth Hormone: Evidence for Two Allelic Forms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43: 189.
- 27) Lewis, U.J., Peterson, S.M., Bonewald, L.F., Seavey, B.K., VanderLaan, W.P. (1977) An Interchain Disulfide Dimer of Human Growth Hormone. *J. Biol. Chem.* 252: 3697-3702.

- 28) Ferguson, K.A., Wallace, A.L.C., (1961) Prolactin Activity of Human Growth Hormone. *Nature*. 190: 632-633
- 29) Chrambach, A., Yadley, R.A., Ben-David, M., Rodbard, D. (1973) Isohormones of Human Growth Hormone I. Characterization by Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel *Endocr.* 93: 848-857.
- 30) Lewis, U.J., Singht, R.N.P., Tutwiler, G.F., Sigel, M.B., Vanderlaan, E.F., Vanderlaan, W.P. (1980) Human Growth Hormone: A Complex of Proteins. *Recent Prog. Horm. Res.* 36: 477-508.
- 31) Hummel, B.C.W., Brown, G.M., Hwang, P., Friessen, H.G. (1975) Human and Monkey Prolactin and Growth Hormone: Separation of Polymorphic Forms by Isoelectric Focusing. *Endocr.* 97: 855-867.
- 32) Liberty, J.P., Joshi, G.S. (1986) Synthesis and Secretion of Phosphorylated Growth Hormone by Rat Pituitary Glands in vitro. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 137: 806-812.
- 33) Sussman, P.M., Tushinski, R. J., Bancroft, F. C. (1976) Pregrowth Hormone: Product of the Translation in vitro of Messenger RNA Coding Growth Hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 29-33.

- 34) Goodman, H.M., DeNoto, F., Fiddes, J.C., Hallewell, R.A., Page, G.S., Smith, S., Tischer, E. (1980) Structure and Evolution of Growth Hormone Related Genes. In Mobilization and Reassembly of Genetic Information, Miami Winter Symp. (Scott, W.A., Werner, R., Joseph, D.R., Schultz, J., eds.) New York: Academic.
- 35) Seeburg, P.H. (1985) The Human Growth Hormone Locus: The Genes and Their Products. In Biogenetics of Neurohormonal Peptides (Hakanson, R. and Thorell, J., eds.). Academic Press, New York pp. 84.
- 36) Isaksson, O. G., Edén, S., Jansson, J.O. (1985) Mode of Action of Pituitary Growth Hormone on Target Cells. Ann. Rev. Physiol. 47: 483-499.
- 37) Lewis, U.J., Singht, R.N.P., Bonewald, L.F., Seavey, B.K. (1981) Altered Proteolytic Cleavage of Human Growth Hormone as a Result of Deamidation. J. Biol. Chem. 256: 11645-11650.
- 38) Lewis, U.J. (1984) Variants of GHrowth Hormone and Prolactin and Their Postranslational Modifications. Ann. Rev. Physiol. 46: 33-42.
- 39) Hart, I.C., Chadwick, P.M.E., Boone, T.C., Langley, K.E., Rudman, C., Souza, L.M., 1984 A Comparison of the Growth Promoting, Lipolytic, Diabetogenic and

- Immunological Properties of Pituitary and Recombinant-DNA-Derived Bovine Growth Hormone (Somatotrophin).
Biochem. J. 224: 93-100.
- 40) Leung, F.C., Jones, B., Steelman, S.L., Rosenblum, C.J., Kopchick, J.J. (1986) Purification and Physicochemical Properties of a Recombinant Bovine Growth Hormone Produced by Cultured Murine Fibroblast. *Endocr.* 119: 1489-1496.
- 41) Nicoll, C.S., Licht, P. (1971) Evolutionary Biology of Prolactin and Somatotrophins II. Electrophoretic Comparison of Tetrapod Somatotrophins. *Gen. and Comp. Endocr.* 17: 490-507.
- 42) Nicoll, C.S., Mayer, G.L., Russel, S.M. (1986) Structural Features of Prolactins and Growth Hormones that can be Related to their Biological Properties. *Endocr. Rev.* 7: 169-203.
- 43) Wallis, M. (1981) The Molecular Evolution of Pituitary Growth Hormone, Prolactin and Placental Lactogen: A Protein Family Showing Variable Rates of Evolution. *J. Mol. Evol.* 17: 10
- 44) Farmer, S.W., Papkoff, H., Hayashida, T., 1974
Purification and Properties of Avian Growth Hormones. *Endocr.* 95: 1560-1565.
- 45) Harvey, S., Scanes, C.G. (1977) Purification and

- Radioimmunoassay of Chicken Growth Hormone. *Endocr.* **73**: 321-329.
- 46) Leung, F.C., Taylor, J. E., Steelman, S. L., Bennett, C. D., Rodkey, J.A., Long, R. A., Serio, R., Weppelman, R.M., Olson, G. (1984) Purification and Properties of Chicken Growth Hormone and the Development of a Homologous Radioimmunoassay. *Gen. and Comp. Endocr.* **56**: 389-400.
- 47) Lai, P.H., Duyka, D.R., Souza, L.M., Scanes, C.G. (1984) Purification and Properties of Chicken Growth Hormone. *IFCS Med. Sci.* **12**: 1070-1078.
- 48) Harvey, S., Davison, T.F., Chadwick, A. (1979) Ontogeny of Growth Hormone and Prolactin Secretion in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Gen. and Comp. Endocr.* **39**: 270-273.
- 49) Campbell, R. M., Scanes, C.G. 1985 Lipolytic Activity of Purified Pituitary and Bacterially Derived Growth Hormone on Chicken Adipose Tissue in vitro. *Proc. Soc. for Exp. Biol. and Med.* **180**: 513-517.
- 50) Harvey, S., Scanes, C.G., Howe, T. (1977) Growth Hormone Effects in vitro Metabolism of Avian Adipose and Liver Tissue. *Gen. and Comp. Endocr.* **33**: 322-328.
- 51) Hall, T.R., Harvey, S., Scanes, C.G. (1986) Control of

Growth Hormone Secretion in the Vertebrates: A Comparative Survey. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A: 231-253.

- 52) Rabin, J., Buonomo, F., Scanes, C.G. (1981) Role of Serotonin in the Regulation of Growth Hormone and Prolactin Secretion in the Domestic Fowl. *J. Endocr.* 90: 355-358.
- 53) Proudman, J.A., Opel, H. (1981) Effects of Feed or Water Restriction on Basal and TRH-Stimulated Growth Hormone Secretion in the Growing Turkey Poult. *Poultry Sci.* 60: 659-667.
- 54) Scanes, C.G., Denver, R.J., Bowen, S.J. (1986) Effects of Thyroid Hormones on Growth Hormone Secretion in Broiler Chicken. *Poultry Sci.* 65: 384-390.
- 55) Ornstein, L. (1964) Disc Electrophoresis-I Background and Theory. Gel Electrophoresis (Whipple, H.E., ed.) *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York. pp 321-349.
- 56) Laemmli, L.V.K. (1970) Cleavage of Structural Protein During the Assembly of Head of Bacteriophage T₄. *Nature* 224: 680.
- 57) Segel, I.H. (1976) Biochemical Calculations. John Wiley & Sons, Inc., New York pp. 401.

- 58) Lowry, O.H., Rosenbrouh, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- 59) Hartree, E.F., 1972 Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. *Ann. Biochem.* **48**: 422-427.
- 60) Greespan, F.S., Li, Ch. H., Simpson, M.E., Evans, H., (1949) Bioassay of Hypophyseal Growth Hormone: The Tibia Test. *Endocr.* **45**: 455.
- 61) Wilhelmi, A.E. (1973) Bioassay Methods in Investigative and Diagnostic. *Endocr.* **2A**, Amsterdam-London.
- 62) Finney, D.J. (1971) Statistical Method in Biological Assay. Ed. Charles Griffin & Ltd. pp. 11-16.
- 63) Aramburo, C. and Scanes, C.G. (1987) Heterogeneity of Chicken Growth Hormone (cGH). Identification of Lipolytic and Non-Lipolytic Variants. (enviado a publicación).
- 64) Frohman, L.A., Burkner, L., Stachura, M.E. (1972) Characterization of Growth Hormone of Different Molecular Weights in Rat, Dog and Human Pituitaries. *Endocr.* **91**: 262-269.

- 65) Gordon, P., Hendricks, C. M., Roth, J. (1973) Evidence for "Big" and "Little" Components of Human Plasma and Pituitary Growth Hormone. J. of Clin. Endocr. and Met. 36: 178-184.
- 66) Mac Farland, P.F., Cade, T.J., Husser, J.B. (1979) Vertebrate Life. Mac Millan Publishing Co., Inc. New York. pp 1, 12, 536.
- 67) Newma, H.H. (1939) The Phylum Chordata. Mac Millan Co. New York. pp. 3, 5, 10, 296.
- 68) Young, J.Z. (1971) La Vida de los Vertebrados. Omega, S.A. Barcelona. pp. 18, 35, 83, 84, 358, 420, 421.

FE DE ERRATAS

Índice: en Métodos dice Caracetrización, debe decir Caracterización.
Página 35, segundo párrafo: dice inhiibidores, debe decir inhibidores.
Página 60, en la columna de marcadores de PM: dice lisosima, debe decir lisozima.
Página 100, referencia número 60: dice Greespan, debe decir Greenspan.