

2 y 150

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

B I O L O G I A

"ISOFORMAS MOLECULARES DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO DE POLLO (cGH)."

TESIS QUE PARA OBTENER

EL TITULO

DE BIOLOGO

PRESENTA:

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ.

MEXICO, D.F.

OCTUBRE DE 1989

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	i
INDICE GENERAL	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y METODOS.	
A. Reactivos	24
B. Material Biológico.	
1. Extractos hipofisarios	24
2. Hormona de crecimiento pura de pollo	25
C. Sistemas Análiticos.	
1. Electroforesis discontinua no desnaturalizante en geles de poliacrilamida (ND-PAGE).....	26
2. Electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	27
3. Isoelectroenfoque horizontal (IEF)	27
4. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D PAGE)	28
5. Inmunoelctrotransferencia (IET)	29
D. Sistemas Preparativos.	
1. Aislamiento de variantes de carga por ND-PAGE.	30
2. Aislamiento de variantes de carga por IEF preparativo.	31
E. Determinación de proteínas	33
RESULTADOS	34
DISCUSION	52

CONCLUSIONES	69
APENDICE A.	
PREPARACION DE GELES.	
A. Geles para ND-PAGE	71
B. Geles para SDS-PAGE	73
C. Geles para IEF	75
D. Geles para 2D PAGE	79
APENDICE B.	
METODOS DE TINCION.	
A. Tinción con azul de Coomassie R-250	82
B. Tinción con plata (Bio Rad)	83
C. Tinción con negro amido	85
APENDICE C.	
PREPARACION DEL "SANDWICH" PARA ELECTROTRANSFERENCIA	86
APENDICE D.	
DETERMINACION DE PROTEINAS	88
BIBLIOGRAFIA	90

ABREVIATURAS

CGH	Hormona de crecimiento de pollo.
RIA	Radioinmunoensayo.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático.
IET	Inmunolectrotransferencia.
GH	Hormona de crecimiento.
ND-PAGE	Electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida.
Rf	Movilidad relativa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
PM (MW)	Peso molecular.
FSH	Hormona Estimulante del Folículo.
LH	Hormona Luteotrófica (Luteinizante).
TSH	Hormona Estimulante de la Tiroides (Tirotropina).
ACTH	Corticotropina.
MSH	Hormona Estimulante de los Melanocitos.
PRL	Prolactina.
ADN	Acido desoxirribonucleico.
hGH	Hormona de crecimiento humana.
bGH	Hormona de crecimiento bovina.
IGF	Factor de crecimiento insulinoide
ARNm	Acido ribonucleico mensajero.
hPL	Lactógeno placentario humano.
GH-N	Gen normal de la hormona de crecimiento.
GH-V	Gen variable de la hormona de crecimiento.
ra	Residuos de aminoácidos.

rGH	Hormona de crecimiento de rata.
oGH	Hormona de crecimiento ovina.
GHRH	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
NHPP	Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis.
pI	Punto isoeléctrico.
IEF	Isoelectroenfoque.
IgG	Inmunoglobulina G.
TEMED	N, N, N',N'-tetrametiletilendiamina.
PMSE	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
KIU	Unidades Inhibidoras de Kalikreina.
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano.
DEAE	Dietilaminoetil.
2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida.
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
TPBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos con Tween-20.
VxH	Unidades voltios x horas.
oPRL	Prolactina de pollo.
rPRL	Prolactina de rata.
AMPc	Monofosfato cíclico de Adenosina.
ATP	Trifosfato de Adenosina.

RESUMEN

La hormona de crecimiento (GH) constituye una hormona polipeptídica de origen adenohipofisario, que ejerce varias acciones en el organismo, tanto metabólicas como celulares. Asociado a esta compleja funcionalidad, se ha demostrado la presencia de formas variantes de la hormona, tanto de carga (sustitución de residuos de aminoácidos, desamidación, acetilación, fosforilación, etc), como de masa (agregados y fragmentos de la forma principal). Durante la década pasada, varios laboratorios realizaron amplias investigaciones tratando de asociar ciertas regiones de la estructura primaria con acciones fisiológicas entre las diferentes especies de mamíferos. Estos estudios aportaron gran cantidad de información, aunque mucha veces contradictoria. Sin embargo, aún así es muy limitado el conocimiento teórico que intenta explicar la relación entre las funciones y la estructura de la hormona.

Además de esto, la mayoría de los estudios relativos a esta hormona, se han llevado a cabo en mamíferos, por lo que el panorama estructural y funcional de la GH en otras especies de vertebrados es muy escaso.

La hormona de crecimiento de pollo (cGH), aunque se había supuesto su existencia, no fue purificada sino hasta mediados de la década pasada. El contar con cGH pura permitió llevar a cabo varios estudios fisiológicos, sin embargo los estudios estructurales tuvieron que esperar la instrumentación de técnicas más potentes para la resolución y determinación de la cGH mediante sistemas homólogos y específicos (por ejemplo, RIA, ELISA, IET) en comparación a otras proteínas, e incluso otras GH. En nuestro laboratorio, durante la caracterización parcial de la cGH purificada por el método que estandarizamos, se encontraron pruebas que sugerían un polimorfismo estructural de la hormona pura. Asimismo, con ayuda de un método de purificación alternativo, se obtuvieron datos que apoyan la existencia de una forma glucosilada de la cGH. Además, se encontró una proporción importante de fósforo probablemente esterificado a la cGH, ya que en ningún paso del proceso de purificación se empleó fosfato; lo cual sugiere la probable modificación por fosforilación de la hormona.

Como un intento de contar con un índice sobre la heterogeneidad molecular de la cGH, el presente estudio se encaminó a caracterizar por varios sistemas electroforéticos, acoplados con IET, la variación de masa y carga de la cGH. Esto se hizo en extractos hipofisarios frescos y en preparaciones puras de la hormona, para demostrar que la variación observada no es resultado de artificios del método de purificación empleado.

En este estudio pudieron detectarse variantes de masa: de 115, 110, 95, 70, 42 y 22 Kd, en condiciones no reductoras; y de 43, 26, 22 y 16 Kd, en condiciones reductoras. La variación de carga, dependiendo de la técnica de detección, proporcionó dos índices de heterogeneidad: por ND PAGE, se detectaron isoformas con Rf de 0,23, 0,30 y 0,35, y que al analizarse por SDS PAGE, observaron las tres un P_I semejante al monómero principal (22 Kd, en condiciones no reductoras, y 26 Kd, en condiciones reductoras). Por IEF pudieron detectarse al menos 6 formas inmunoreactivas en un intervalo de pH entre 6 y 8. La gran variación de carga de la hormona pura así como de la encontrada en extractos hipofisarios, se comprobó con el análisis bidimensional. Conjuntamente, en el trabajo se inició la instrumentación de sistemas de purificación de variantes de la cGH, para continuar los estudios estructurales y fisiológicos en las isoformas aisladas.

INTRODUCCION

La interacción entre los sistemas fisiológicos de un organismo constituye una dinámica esencial para la vida que se expresa a cada instante, y es encauzada por estímulos medioambientales particulares. Esta coordinación, actualmente, se asocia a las acciones intercelulares de los sistemas inmune y neuroendocrino (1).

La idea de una comunicación intercelular mediada por mensajeros químicos es bastante reciente. Consideremos el hecho de que hasta el siglo pasado se señalaba con un sello vitalicista a la explicación de fenómenos metabólicos del organismo. No es hasta mediados del siglo pasado con los trabajos de Claude Bernard, Brown-Sequard, y muchos otros (2 - 4) que se abre un nuevo panorama que reconoce un medio interno, con una estabilidad dinámica - conocida como homeostasis -, y a las influencias "humorales" entre los diferentes órganos internos de un individuo, incluso muy alejados físicamente entre sí. Esta nueva disciplina, que nace casi con el presente siglo, seguiría todavía un largo camino para alcanzar la panorámica que ahora conocemos (3 - 6).

Dentro del esquema neuroendocrino general, la glándula hipofisiaria juega un papel clave en la interregulación metabólica, pues constituye una vía de comunicación de gran magnitud entre el sistema nervioso central y el resto del organismo. Paradójicamente, su importancia fisiológica sólo fue reconocida hasta principios de este siglo (4). Actualmente es

bien conocido que la hipófisis libera mensajeros proteínicos de varios tipos (6). por ejemplo: de la neurohipófisis, vasopresina y ocitocina; y de la adenohipófisis, hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), corticotropina (ACTH), hormona estimulante de los melanocitos (MSH), prolactina (PRL), y somatotropina u hormona de crecimiento (GH). Estas hormonas presentan una gran variedad de efectos fisiológicos; así por ejemplo, a la prolactina se le han reconocido unas 85 acciones fisiológicas distintas; la corticotropina, además de sus acciones adrenales, también exhibe efectos lipolíticos y esteroidogénicos, mientras que las gonadotrofinas (FSH y LH), participan en una gran cantidad de fenómenos relacionados con la función gonadal (6,7).

La hormona de crecimiento presenta también un patrón de gran complejidad funcional, ya que influye en muchas actividades celulares, por ejemplo: a) metabolismo de los ácidos nucleicos: ante la adición de 1 ug/ml de hGH, se incrementa de 30-40 % el contenido de ADN en los islotes pancreáticos de rata en cultivo (8); b) metabolismo de proteínas: ante la adición de bGH, se estimula el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas en el músculo del diafragma de ratas jóvenes (9); c) metabolismo de lípidos: ante la adición de cGH, se observa la liberación de glicerol y de ácidos grasos en explantes de tejido adiposo de pollos adultos (10), al adicionar hGH de origen recombinante a un cultivo de hepatocitos de rata, se inhibe la actividad de la enzima málica hepática (45 % en comparación a la actividad normal), así como de otras enzimas lipogénicas (11);

d) metabolismo de carbohidratos: ante un tratamiento agudo de GH, se producen efectos semejantes a los que provoca la insulina en animales diabéticos, y con un tratamiento crónico de la hormona, se inducen efectos anti-insulinoides ó diabetogénicos (12 - 14); e) efectos somáticos: tras recibir un tratamiento crónico de la hormona, se induce la ganancia de peso corporal en ratas hipofisectomizadas (12,14,15); después de recibir una dosis diaria de la hormona pura por 4 días, se observa un ensanchamiento del cartilago epifisial de la tibia anterior de ratas hipofisectomizadas (12,14 - 16); unión de la hormona marcada a preparaciones de membrana de hepatocitos, miocitos y linfocitos IM-9 (12,18,19); f) estimulación de enzimas: 24 horas después de la inyección de hGH (4 ug/g) se estimula la actividad de la creatin cinasa en varios órganos de la rata (20), 4 h después de la adición de GH a ratas hiposectomizadas se observa la estimulación de la actividad de la ornitina descarboxilasa hepática (12, 14, 16); g) en la respiración celular: en ratas hipofisectomizadas a las cuales se les administrò bGH, se observa la estimulación del nivel de respiración de mitocondrias aisladas, cambios inducidos en la composición de ácidos grasos e incremento en la síntesis de componentes de la cadena respiratoria (21,22); h) síntesis y liberación de somatomedinas o factores de crecimiento insulinoide (IGF): pocas horas después de la inyección de GH a ratas hipofisectomizadas (23) o ratones [lit/lit], deficientes en GH, se observa la expresión (ARNm IFG-1) y liberación de IFG (24); i) efectos en la diferenciación celular: tras añadir GH al medio de cultivo de preadipocitos Ob1771, se estimula la adquisición de marcadores fenotípicos e

incremento en la acumulación de ARNm's específicos de tejido adiposo (25), así como en la diferenciación a condrocitos de precondrocitos en cultivo (26); j) la lactancia: unión de hGH a preparaciones de membrana de glándula mamaria de ratas o membranas de hepatocitos de conejas preñadas, así como inducción de la enzima N-acetil lactosamina sintetasa en cultivo de células de glándula mamaria de ratón (12,14,15).

Este patrón funcional de la GH tan complejo, e incluso a veces aparentemente contradictorio, ha intentado explicarse por medio de varias hipótesis:

1. Heterogeneidad estructural de los receptores específicos, o distintos mecanismos de transducción en cada órgano blanco. Aunque recientemente, se ha reconocido microheterogeneidad estructural de los sitios de unión de la GH, por mapeo con anticuerpos monoclonales (26,27); fisiológicamente sólo se han reconocido como probables 3 tipos de receptores: a) receptores somatotrópicos, que median efectos somáticos (12,17,18,27,29-32); b) receptores lactogénicos, relacionados con la secreción láctea (12,15,27,31,32); y c) receptores diferentes a los dos anteriores, y que principalmente se asocian con efectos sobre el tejido adiposo (17,32 - 34). Asimismo, es relativamente poco lo que se conoce sobre los mecanismos de acción de GH en los órganos blanco (15,32,35).

2. Coexistencia de varios "dominios bioactivos" dentro de la estructura misma de la hormona, comprometidos con efectos fisiológicos particulares. Esta hipótesis tiene una gran cantidad

de datos que la apoyan (para mayor información ver referencia 15). En la búsqueda de un "centro activo" común para todas las GH de mamíferos hasta ese tiempo conocidas, se efectuaron proteólisis limitadas de la hormona con varios tipos de proteasas, síntesis química de regiones de la hormona, así como recombinaciones de fragmentos de la hormona incluso de especies y hormonas distintas (por ejemplo con hPL, hormona estructuralmente muy relacionada con la hGH), y se probaron en varios tipos de bioensayos. Algunos reportes ejemplifican este importante trabajo: la proteólisis con plasmina o fibrinolisisina aumentó la actividad que tenía la hormona completa (12,15,36,37), mientras que los fragmentos del extremo carboxilo de la proteína tenían efectos hiperglucémicos importantes que la hormona entera no presentaba (38). Además el producto de la proteólisis parcial de bGH con tripsina es activa en humanos, siendo que ninguna GH completa de otros mamíferos presenta efecto sobre los primates (12,14,15).

En términos muy básicos, podemos establecer una cierta relación entre algunas regiones de la estructura primaria de la hormona y algunas de sus actividades fisiológicas, como se puede apreciar en la Tabla 1.

Sin embargo, este fenómeno parece ser mucho más complejo que una simple asociación de funciones a regiones de la estructura primaria (14,15,37). Nicoll et al (39), en un excelente estudio de las relaciones de estructura-función de varios tipos de GH y PRL, por homologías entre estructuras primarias, estructuras secundarias teóricas y patrones de

TABLA 1. RELACION ENTRE ESTRUCTURA PRIMARIA Y FUNCION.

<u>Actividad</u>	<u>Región de la hormona</u>
Somatogénica	Región entre los residuos 95 a 140 de la estructura primaria. Importantes funciones también la muestran formas de dos cadenas con una delección del fragmento 135 a 146 (14,15,39,40,41,43,45,46).
Lactogénica	Aparentemente, entre los residuos 1 a 134, pueden existir asociaciones con receptores lactogénicos, sin embargo los pocos datos son muchas veces contradictorios (15,39,40,42,43).
Metabolismo de lípidos	Los pocos estudios estructurales en este sentido, parecen relacionar la región entre los residuos 30 a 90 con esta actividad (15,39,44,45).
Metabolismo general	Parece asociarse la región entre 90 y 130 a las actividades de metabolismo general (oxidación de glucosa, incorporación de aminoácidos, etc). La región entre 1 y 60 también induce actividades de este tipo (15,37,46,47,48).
Hiper glucemia (Diabetogénesis)	Podría relacionarse a la región entre los residuos 45 y 77 a 180. Las formas de dos cadenas careciendo de la región 135 a 140, son también activas (15,37,38,45,47).
Actividades insulinoideas	Está muy relacionada a la región entre los residuos 32 y 46, así como en la región amino terminal (1 a 15 r.a.) (15,37).

hidrofobicidad, demostraron que hay regiones de la GH semejantes entre si en los tres aspectos, diferentes de los patrones estructurales de hLP o PRL, y que además parecen tener un caracter hidrofílico. Debido a estas características, esas regiones pueden estar en continua interacción entre si (en forma de un sitio de unión al receptor o para alterar la propia estructura de regiones de la hormona) y con los receptores específicos. Estas regiones están principalmente localizadas en las regiones 32 a 50, 55 a 65, 105 a 115 y 130 a 155. A pesar de esto, para llegar a tener un esquema completo y menos contradictorio, se necesita de una cantidad importante de estudios sobre la estructura terciaria de la hormona, así como de la interacción con el receptor.

3. Existencia de la GH como una familia de isoformas moleculares estructuralmente relacionadas y de origen común, que pueden ejercer efectos particulares; y que en su conjunto producen la bioactividad total de la hormona sobre los órganos blanco (12,14,15,37,49) La idea de la heterogeneidad estructural en años recientes, ha sido apoyada por una cantidad importante de publicaciones (6,12,14,15,37,39,49,50,51), pero describiremos esta hipótesis con mayor detalle un poco más adelante.

4. La hipótesis más aceptada actualmente es una combinación entre las tres hipótesis anteriores, que relaciona los conceptos de la existencia de formas variantes de la hormona, que pueden originarse por fenómenos genómicos, de procesamiento diferencial del transcrito primario, de proteólisis limitada y específica de la hormona (prohormona) o modificaciones

postraduccionales a la estructura íntegra; la presencia de regiones discretas de la hormona con bioactividades particulares, que ante modificaciones de la molécula pueden interaccionar con los receptores y expresar ciertos efectos fisiológicos; y la existencia de heterogeneidad estructural y funcional de los sitios de unión (12,14,15,39,49).

La idea de polimorfismo molecular, y particularmente en relación a las hormonas adenohipofisiarias, no es nueva. Desde los años de 1950, aunque se emplearan métodos cada vez más poderosos para purificar las hormonas, siempre se observaba un grado de heterogeneidad en sistemas analíticos de gran resolución (52). Este polimorfismo se intentó explicar haciendo referencia a eventos proteolíticos en la glándula, y que seguían a la muerte del animal, o al empleo de métodos de purificación severos para las proteínas. Con el paso del tiempo, aunque se mejoraron las condiciones de purificación, aún la preparación hormonal más pura mantenía un cierto grado de heterogeneidad. Sólo hasta entonces se tomó en cuenta la idea de que el polimorfismo podría ser intrínseco de la proteína, y no solo un artificio.

Ahora es totalmente válido pensar en isoformas de las hormonas adenohipofisiarias. Las causas identificadas de esta heterogeneidad son diversas: las gonadotrofinas (FSH y LH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) varían tanto en el grado como en el tipo de glucosilación, y en menor proporción en diferencias de su estructura primaria (53,54). En las hormonas ACTH y MSH se han encontrado variaciones en el procesamiento (de escisión y empalme) del transcrito primario, variaciones

TABLA 2. HETEROGENEIDAD DE ORIGEN GENOMICO DE LA GH.

GEN	EXPRESION	PRODUCTOS PROTEINICOS	ESPECIES	CARACTERISTICAS
GH-N (Normal)	Hipófisis	1. 22 Kd (a)	Todas (b)	Forma principal.
		2. Variación alélica(c)	bGH,hGH	Intercambio de Val 127 por Leu.
		3. Proceso "ambiguo" (c)	bGH	2 residuos N-terminales (Ala y Phe).
		4. 20 Kd (a,d)	hGH,rGH bGH,oGH	Delección de la región 32 a 46.
		5. 17.5 Kd (e)	hGH	Delección de la región 32 a 72. (f)
GH-V (Variable)	Placenta	1. SV-hGH (g)	hGH	Diferencia de de 13 residuos en comparación a la forma de 22 Kd (h).

- a. Peso molecular de la forma humana (hGH), varía entre las especies.
- b. Presente en todas las especies estudiadas.
- c. Resultados comentados por Paladini y col, 1983 (15).
- d. Entre otros reportes (12,15,37,49,71).
- e. Lecomte y col, 1987 (67).
- f. Variante del transcrito primario, donde falta la región correspondiente al tercer exón. Análisis teórico del producto proteínico.
- g. Cooke y col, 1988 (64); Lewis, 1984 (49).
- h. Transcripción in vitro.

alélicas, formas glucosiladas y moléculas estructuralmente semejantes pero de origen no hipofisiario (6,51). Para la PRL se han identificado variaciones de carga molecular (acetilación, fosforilación, sustituciones de residuos de aminoácidos y desamidaciones) (6,49,55,56). Variantes glucosiladas (57,58), y recientemente, fragmentos proteolíticos de la hormona con bioactividad y sitios de unión particulares (60).

En el caso particular de la GH, se han identificado al menos tres niveles de variación molecular; mientras los dos primeros involucran variación a nivel de ácidos nucleicos (ver Tabla 2), el tercero se refiere a procesos ocurridos al producto proteínico (ver Tabla 3):

1) Genómico. Se ha descrito en la hipófisis la secuencia genómica (gen "normal", GH-N), a partir del cual se transcribe el ARNm del producto proteínico mayoritaria de la GH, de un PM de 22 Kd. Sin embargo, se ha informado de otro gen para algunas especies de mamíferos (gen variable, GH-V), que presenta algunas modificaciones en su secuencia de nucleótidos (12,15,61 - 64). Cuando el ARNm correspondiente a este gen humano se traduce en un sistema in vitro (12,15,64), se obtiene una proteína diferente en 13 residuos de aminoácidos, y un pI más básico. Esta proteína es bioactiva - en un 50 % en comparación a la forma principal - en un ensayo somatogénico, pero totalmente activa en un ensayo lactogénico (39). Recientemente, se ha demostrado la hibridación de ARNm de placenta a un segmento de nucleótidos específico del gen variable, lo que sugiere que se expresa en la

TABLA 3. HETEROGENEIDAD ESTRUCTURAL DE GH.

PROTEINA	SISTEMA DE IDENTIFICACION	FUENTE	BIOACTIVIDAD	INHEREN ACTIVIDAD	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	REFERENCIAS
A. VARIANTES DE MASA.						
22 Kd (a1)	Exclusión Molecular QDS PAGE HPLC	Hipófisis Plasma	0.9 - 1.4 (a7)	1.0	Forma monomérica principal	12,15,16,36-38 61-65, 62-9), 96, 97
>100 Kd (b1)	Exclusión Molecular	Hipófisis Plasma	—	+ (b2)	Agregado no covalente (b3)	12,15,37,45
80 Kd (c1)	Exclusión Molecular	Plasma	1. ET(c2)= 100-200	0.01	Agregado no covalente (b3)	12,15,37
45 Kd (d1)	Exclusión Molecular SDS PAGE HPLC	Hipófisis Plasma	Hipótesis: 1. EL(d3)= 0.5 2. EBF(d4)= 0.1 Plasma: 1. RRA(d5)= 0.26	0.3 1	Agregado diférico (d6)	12,15,37,40, 60-71,81, 95-97
24 Kd (e1)	SDS PAGE	Hipófisis	1. ET(e2)= 0-0.1 2. EL(e3)= 1.0	1	Corte proteolítico entre los residuos 139 - 140.	12,37,49
20 Kd (f1)	SDS PAGE HPLC	Hipófisis Plasma	1. ET(f2)= 1 2. EBF(f4)= 1 3. EDS(f1)= 1 4. AI(f3)= 0.0(f7) 5. RRA(f5)= 0.03-0.3	0.3	Delección de los residuos 32 - 46. Procesamiento alternativo del Rm.	12,15,37,49, 65
Glicosi- lada (g1)	SDS PAGE (g2)	Hipófisis	+ (g3)	+ (g4)	Adición de grupos de carbohidrato a la estructura primaria.	73,76,77
17.5 Kd (h1)	Clonación y secuenciación. Mapa BI de Rm natural (h2)	Hipófisis	—	—	Delección de los residuos 32 - 72. Procesamiento alternativo del Rm.	47
16 Kd (i1)	SDS PAGE 2D PAGE (i2)	Hipófisis	—	—	Fragmento carboxilo terminal, producto de proteólisis limitada (i3).	73,74

PROTEINA	SISTEMA DE IDENTIFICACION	FUENTE	BIOACTIVIDAD	IMPURAS ACTIVADAS	CARACTERISTICAS BIQUIMICA	REFERENCIAS
B. VARIANTES DE CARGA						
4 formas desnaturalizadas	AGE (11)	Hipótesis	Todas: 1. ESI(2) = + 2. EL(4) = + 2 principales: 1. ESI(2) = 21	--	4 formas teñibles con nigrosina, 2 formas con pobre tinción con nigrosina.	12
B C D F	PAGE (11)	Hipótesis, no detectado en el plasma	1. EL(4) = 1 2. ET(2) B = 1 C, D y E = 3 3. ESI(2) B = 1 C, D y E = 3 4. ESI(2) B = 1 C y D = 3 E = 2	1.0	Estructura no conocida. Proteólisis limitada con plasmina, C, D y E formas más ácidas	12,15
α_1 α_2 α_3 β	PAGE (11)	Hipótesis, no detectado en el plasma	1.. ET(2) α_1 = 2 α_2 = 1.7 α_3 = 3 β = 1.1 2. EL(4) α_1 = 2 α_2 = 5.5 α_3 = 10 β = 4.5	1.0	1. α_1 no estudiada. 2. α_2 forma de 2 cadenas pólimeras de residuos 135 - 140. 3. α_3 forma de 2 cadenas pólimeras de residuos 136 - 146. 4. β no estudiada.	12,15,37,49
2 formas desnaturalizadas	PAGE (11)	Hipótesis	--	--	1. Conversión de Asn ₁₆₅ - Asp 2. Conversión de Glu ₁₆₅ - Glu	12,15,37,49
2 formas "lentas"	PAGE con urea (11)	Hipótesis	1. ET(2) = + ambas formas 2. EL(4) = + formas menos básicas > activ. que 22 Kd	--	Posible cambio conformacional, con urea se "desenmascaran" regiones básicas	37,49
Forma catódica	IEF (pH 4 - 6)	Hipótesis	--	--	Migración más básica que la 22 Kd (ol)	37
Forma anódica	IEF (pH 4 - 6)	Hipótesis	--	--	Migración más ácida que la 22 Kd (ol)	37
Acetilada	PAGE	Hipótesis	1. ET(2) = 1 2. EL(4) = 1	1	Variante con estructura N-acetil	12,15
Forma fosforilada	BDS PAGE y radioimmunoanálisis (11). Contenido de fosfato en la muestra.	Hipótesis	--	+ 1q21	Adición de grupos de fosfato en la estructura primaria. Fosforilación de residuos de Tyr(3).	78 - 81

CONTINUACION DE LA TABLA 3.

- a1 Correspondiente al PM del monómero principal de la GH humana.
- a2 Varía con el tipo de ensayo en que se prueba.
- b1 Todos los estudios estructurales se han efectuado en hGH y bGH.
- b2 Reconocimiento durante IET con el anticuerpo específico.
- b3 Susceptibles a tratamiento con urea, guanidina o 2-mercaptoetanol.
- c1 Designación de la variante humana.
- c2 Ensayo de la tibia de rata.
- d1 Designación de la forma dimérica de la hGH.
- d2 Mayor proporción de esta forma en el plasma (30 %) que en la hipófisis.
- d3 Ensayo lactogénico.
- d4 Ensayo de la ganancia de peso corporal.
- d5 Ensayo de radio-receptor.
- d6 60 % se disgrega con urea o 2-mercaptoetanol, 40 % es resistente.
- f1 Ensayo generativo de somatomedinas.
- f2 Actividad insulinoide.
- f3 No ocasiona hipoglucemia, descenso en los niveles de ácidos grasos libres en el plasma o estimulación de la toma de glucosa por el tejido adiposo.
- g1 Forma sólo descrita en humanos, ratas y pollos.
- g2 Fracción retenida por Concanavalina A y por anticuerpo anti-GH específico.
- g3 Sólo se ha reportado que muestra una bioactividad comparable con la forma no glucosilada.
- g4 Reconocida por anticuerpo anti-GH específico. No se han reportado mayores datos sobre la inmunoadividad.
- h1 Sólo descrita en humanos.
- h2 Reconocimiento de RNAm para esta forma en adenomas hipofisarios.
- i1 Reconocida en rata. En el presente trabajo de tesis se demuestra la existencia de una forma del mismo PM.
- i2 Extractos de cultivos de células hipofisarias.
- i3 Observable sólo bajo condiciones reductoras. Su expresión en el medio de cultivo es regulada por GHRH y SRIF.
- j1 Análisis de una preparación pura de hGH del Inst. Nacional de la Salud (NIH).
- j2 Ensayo somatotrópico.
- l1 Análisis de extractos salinos de hipófisis humana.
- n1 Análisis de hGH pura, donde se habían separado otras variantes de carga. Sólo aparece ante la presencia de urea.
- o1 Diferencias estructurales mínimas, apreciables sólo en IEF.
- q1 Análisis de extractos y medios de cultivos primarios de células hipofisarias.
- q2 Inmunoadividad observada sólo por reconocimiento de esta isoforma por anticuerpo anti-GH específico.
- q3 Estimulación por EGF, en células hipofisarias.

placenta en forma natural (64). También, se ha encontrado variación del extremo amino en bGH (Ala y Phe), y se ha demostrado que esta diferencia puede relacionarse a la existencia de distintos alelos en la población (15).

2) Procesamiento diferencial del transcrito primario. Se han podido identificar dos formas variantes naturales en algunos mamíferos, que resultan de un proceso de escisión y empalme diferencial o "ambiguo" del transcrito primario de la hormona: isoforma de 20 Kd (PM de la variante de hGH), casi idéntica a la forma monomérica de hGH (22 Kd), a excepción de la falta del segmento comprendido entre los residuos 32 al 46 de la proteína (12,15,37,49,65). Esta variante es casi totalmente activa en ensayos somatogénicos, pero es inactiva en ensayos que miden la actividad insulinoide de la hormona, la relación entre la pérdida de la actividad y la carencia de ésta región en particular ha sido recientemente demostrada en ensayos insulinoideos en ratas diabéticas (66). Así también, debido a que esta isoforma presenta poca afinidad por los receptores específicos de la GH, se ha supuesto la existencia de sitios de unión específicos para la variante de 20 Kd (12,15). Otra variante, recientemente descrita, corresponde a una forma de 17.5 Kd, que carece de los residuos de aminoácidos correspondientes al tercer exón del gen de hGH (32 a 72 ra) (67), y cuya expresión del ARNm se ha demostrado in vivo.

3) Procesamiento postraduccional. Las variantes proteínicas identificadas como resultado de este proceso se pueden agrupar en dos tipos (ver Tabla 3): a) isoformas de masa,

y b) de carga. Además de la forma monomérica principal (22 Kd), se han identificado variantes de alto PM (> 60 Kd), tanto en hipófisis como en plasma, conocidas como formas "grandes" ("big hGH" o "big big" para formas mayores de 100 Kd). Estas formas no se observan en presencia de urea, guanidina o mercaptoetanol, por lo que se piensa que constituyen agregados no covalentes de la forma monomérica (12,15,37,49,68,69); asimismo, una forma de 80 Kd de hGH, encontrada en el plasma, ha mostrado una gran bioactividad somatotrópica y poca inmunoreactividad, lo que estaría de acuerdo con el descubrimiento de que en el plasma existe mayor cantidad relativa de GH bioactiva que inmunoactiva (12,37). Se han identificado también asociaciones diméricas (45 Kd, para la especie humana), que como las formas anteriormente mencionadas, pueden originarse por interacciones ya sea no covalentes o bien covalentes entre los monómeros, pues se ha informado que una proporción de esta isoforma es resistente al tratamiento con agentes reductores (12,15,37,49,69 - 71). Otra forma variante de hGH (24 Kd) parece ser resultado de un corte proteolítico entre los residuos 139 y 140, que deriva en una estructura menos compacta y con un radio de Stokes aparentemente mayor (12,15,37). Además de estas formas, también se han descrito fragmentos originados por proteólisis de GH, que son bioactivos e inmunorreactivos (12,15,37,40-49,72). Recientemente, se describió la presencia in vivo de fragmentos de rGH, cuya aparición es regulada por la somatostatina (factor inhibidor de la liberación de GH) así como por el GHRH (hormona liberadora de GH) (73,74).

En la hipófisis de mamíferos también se ha encontrado la forma precursora de la GH "madura", que aún conserva el péptido señal (2 Kd); por lo que su PM aparente es de 24 Kd. para la forma humana. No se debe confundir con la variante con un corte peptidico entre los residuos 139 y 140 (12,15).

Una isoforma recientemente descrita en ratones, humanos y en pollos, corresponde a una proteína que presenta grupos de carbohidrato unidos a la estructura primaria, lo cual ocasiona que presente un radio de Stokes mayor, y un PM aparente mayor (25 a 28 Kd, dependiendo de la especie). Son inmunológicamente semejantes a la forma principal, y aparentemente bioactivas (75 - 77), aunque todavía faltan muchos más estudios para establecer que función desempeñan.

Un número igualmente importante de variantes muestran diferencias de carga molecular. Así, se han reportado formas acetiladas, bloqueadas en el amino terminal y desamidadas, que han sido poco estudiadas (12,15,37,49). Otras isoformas de carga resultan de proteólisis limitada, con enzimas como tripsina, quimotripsina, plasmina, trombina, subtilisina, fibrinolisisina, así como con fracciones lisosomales de riñón (sitio primario de concentración de la GH in vivo) (12,15,37,40-49,72). Asimismo, se han descrito formas cuyo origen no se conoce, pero se hacen presentes en análisis electroforéticos aún en preparaciones muy puras de la hormona (donde se habían separado todas las variantes anteriores) (37,49). Recientemente, también se ha descrito la presencia de fosfato inorgánico en preparaciones puras de la hormona (78); la fosforilación de grupos de tirosina de hGH,

estimulada por el factor de crecimiento epidérmico (EGF)(79); así como la presencia de isoformas de rGH en glándulas hipofisiarias en cultivo, que captaron el fosfato inorgánico marcado radiactivamente, agregado al medio (80). Datos muy recientes de nuestro laboratorio, parecen demostrar que la secreción de la(s) forma(s) fosforilada(s), es estimulada por la adición de GHRH (importante secretagogo de la liberación de GH) al medio de cultivo (81).

A pesar de que se ha identificado un amplio panorama de variación molecular de GH, la gran mayoría de estos estudios se han basado en las hormonas obtenidas de mamíferos. La posibilidad de contar con gran cantidad de material biológico para extraer las hormonas, e incluso su existencia en agencias públicas y privadas (como es el caso de la GH bovina, ovina, porcina y de rata); ha permitido ampliar los estudios en estas especies. A su vez, en el caso de la hGH, la existencia de bancos estatales de recolección de hipófisis humanas en Estados Unidos (NHPP), permitió contar con cantidades suficientes de hGH pura para su análisis estructural. Contrariamente, el conocimiento sobre la heterogeneidad molecular y funcional de la hormona de crecimiento en otros grupos de vertebrados es muy escasa. Aun más, recientemente se ha descrito la existencia de un material semejante a la GH en el abulón, un invertebrado. En este terreno es todavía más grande la falta de conocimiento sobre las características estructurales y funcionales de la hormona. Aunque actualmente se ha dado mayor importancia a los estudios

TABLA 4. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LA cGH.

CARACTERISTICAS	GH(1974)a	GH(1977-84)b	GH(1984-88)c	GH(1989)d
Rf	0.30	0.30	0.20	0.23, 0.30 0.35
PM (SDS PAGE)	23,3 Kd	23,3 Kd 27 Kd(e)	26 Kd 23.5 Kd(f)	26.3 Kd
pI	---	7.5	7.6	6.2, 6.7, 7.1, 7.2, 7.4, 7.5
SECUENCIA AMINO TERMINAL	FPAM	TFPAM	TFPAM	TFPAM
PUENTES DISULFURO	2	---	2	---
FOSFORO ESTERIFICADO	---	---	---	1:3 mol/mol (g)
GLUCOSILACION	---	---	---	SI (h)

Nota. Signo de abreviaturas usadas para aminoácidos (IUPAC-IUB commission on Biochemical Nomenclature, 1968): T=Thr, F=Phe, P=Pro, A=Ala, M=Met.

a. Farmer y col, 1974 (87).

b. Harvey y Scanes, 1977 (88).

c. Leung y col, 1984 (90).

d. Aramburo y col, 1989 (16); Carranza, 1988 (97).

e. Lai y col, 1984 (89).

f. Houston y Goddard, 1988 (96).

g. Aramburo y col. 1989 (16).

h. Berghman y col. (77); Navarrete y col. (112).

(Tomado de Perera, G. 1989 (94), con modificaciones).

comparativos (82 - 86), son aún muy pocos los estudios sobre la relación de estructura-función para la GH de especies no mamíferas.

La hormona de crecimiento de pollo o cGH fué purificada inicialmente hacia mediados de la década pasada, casi paralelamente con GHs de guajolotes, patos, pichones y avestruces (87). Aunque los estudios estructurales son escasos, se ha logrado determinar algunas de las características fisicoquímicas de la cGH (ver Tabla 4), así como su composición y secuencia de aminoácidos (88 - 91). Se le ha calculado un PM de 22.25 Kd a partir de la estructura primaria, siendo la treonina el grupo amino terminal (16,90,91). Solamente se ha identificado un gen que expresa el transcrito primario (91), y tiene un alto grado de homología con otras GHs (> 80%, exceptuando a la hGH) (39).

Los estudios fisiológicos han acaparado parte importante de su interés. En ellos se ha comprobado que la cGH se secreta de células en cultivo (92); así también, se ha demostrado la similitud funcional con la GH de mamíferos: bioactividad en el crecimiento corporal, la dependencia de cGH para conservar y aumentar el peso corporal y el crecimiento; presencia importante de cGH en etapas de crecimiento después de la eclosión, a diferencia de los niveles bajos de hormona en el estado adulto (51,93); y en el metabolismo general: incremento de ácidos grasos en la circulación, como una fuente de energía; descenso en la lipogénesis y reducción en la utilización de glucosa (10,51). En nuestro laboratorio (16,95,97), se ha comprobado que la cGH pura, es capaz de estimular el crecimiento del cartilago epifisial de

la tibia de ratas hipofisectomizadas a las que se les administró subcutáneamente entre 60 y 240 μg totales de cGH; y también estimula la actividad de la ortinina descarboxilasa hepática en ratas hipofisectomizadas, 4 horas después de que se les inyectó intraperitonealmente cGH (1 a 5 mg/kg de peso corporal); asimismo, es capaz de estimular la incorporación de sulfato radiactivo en el cartilago costal de una cepa de ratones enanos; en estos ensayos heterólogos, el carácter especie-específico de la acción de cGH sobre los órganos blanco ocasiona probablemente una menor potencia en su bioactividad, en comparación a las GHs de mamíferos. En ensayos homólogos, sobre explantes de tejido adiposo abdominal de pollos jóvenes, en donde se miden los efectos de la hormona sobre el metabolismo de los lípidos, tales como la estimulación de la lipólisis (liberación de glicerol a partir de triglicéridos); o bien su efecto antilipolítico (inhibición de la lipólisis inducida por glucagón) se comprobó una bioactividad mayor de la cGH con respecto a la GH de mamíferos.

Recientemente, los estudios en nuestro laboratorio (16,81,95,97) y de otros dos grupos (77,96), dan una clara indicación del carácter polimórfico de la cGH. Houston y Goddard en 1988 (96), observaron al menos 9 variantes de carga, separadas por isoelectroenfoque, con inmunorreactividad semejante con un antisuero policlonal específico para cGH, en extractos hipofisiarios de pollos. Asimismo, además de la forma monomérica (23.5 Kd por un sistema de SDS-PAGE), detectaron pequeñas cantidades de oligómeros, probablemente unidos por puentes

disulfuro (40 y 80 Kd en SDS-PAGE, bajo condiciones no reductoras); sin embargo, no detectaron la presencia de formas de PM menor a la forma monomérica. Al comparar entre pollos de diferentes edades, los mismos autores, encontraron datos que sugieren que la aparición de algunas isoformas de carga, puede ser dependiente del grado de desarrollo ontogenético. Por otra parte, Berghman y sus col. (77) han descrito la existencia de una forma glucosilada de la hormona de pollo, inmunológicamente semejante al monómero principal (26 Kd), pero con un PM mayor (28 Kd), y con bioactividad aparente.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha realizado algunos estudios bioquímicos de la hormona de crecimiento de pollo, donde se sugiere la existencia de variantes moleculares en una preparación pura de la hormona (95). Por un sistema de ND-PAGE, IEF, y de SDS-PAGE; bajo condiciones no reductoras, se observó la separación de varias bandas de proteína en la preparación pura de la hormona, lo cual apoya la hipótesis del carácter polimórfico de la hormona. Así también, se determinó la presencia de fósforo esterificado en la hormona pura, en una proporción de fósforo: proteína, 1:3.5 (mol/mol); lo cual sugiere la posible existencia de variante(s) fosforilada(s) de la cGH. Por un método paralelo de extracción de glucoproteínas hipofisiarias (Fracción 80%, ver Materiales y Métodos.), se obtuvo una fracción retenida secuencialmente en una columna de Con A-Sefarosa y por una columna de inmunofinidad a la cual se había acoplado IgG anti-cGH, y cuyas características

electroforéticas fueron semejantes a la forma principal de cGH; todo lo anterior sugiere que se trata de la variante glucosilada de cGH (112). Sin embargo, a pesar de contar con varios datos sugerentes, no se había comprobado la presencia de variantes en preparaciones frescas de hipófisis, como un índice de la situación in vivo de la hormona.

Por todo lo anteriormente mencionado, podemos ver que la complejidad molecular y fisiológica de la GH, la sitúa como un modelo de mensajero proteínico ideal para realizar estudios encaminados a relacionar la estructura molecular de la hormona con su función. Sin embargo, para el caso particular de la cGH, aún es necesario efectuar una caracterización más detallada de la heterogeneidad molecular de la hormona, sobre la cual basarse para los estudios posteriores. Aunque aún se vienen iniciando estos estudios, la comprensión futura de los fenómenos que subyacen a la relación de estructura-función de la hormona, sin duda constituirá una valiosa información para entender mejor la interregulación y función de los mensajeros del sistema de comunicación intercelular.

OBJETIVOS

Con el propósito de sentar las bases de la caracterización fisicoquímica de las isoformas moleculares y dentro del estudio, que viene desarrollando nuestro laboratorio, sobre la relación estructura - función de la hormona de crecimiento de pollo (cGH), se plantearon los siguientes objetivos:

1. Demostrar el carácter polimórfico de la hormona de crecimiento de pollo por varios sistemas electroforéticos.
2. Caracterizar electroforéticamente las isoformas de masa y carga de cGH pura.
3. Caracterizar electroforéticamente las isoformas de extractos hipofisarios frescos, como un índice de la presencia in vivo de estas variantes.
4. Iniciar la instrumentación de métodos de aislamiento de variantes de carga, para su posterior caracterización.

A. Reactivos.

La aprotinina, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y el azul de bromofenol fueron obtenidos de Sigma; la resina de intercambio iónico (DE52-celulosa) fué de Whatman. La acrilamida, la N,N-metilenbisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametilen-diamina (TEMED), persulfato de amonio, riboflavina, azul brillante de Coomassie R-250 y G-250, negro amido 10B, el soporte para el isoelectroenfoque preparativo (Biolyte), el 4-cloronaftol y el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo de origen caprino, conjugado con peroxidasa de rábano, fueron obtenidos de Bio-Rad. Las anfolinas en un intervalo de 3.5 a 10 y 8.5 a 10 fueron de LKB (Pharmalyte). Los demás reactivos fueron de grado analítico, y el agua usada fue bidestilada y desionizada en un aparato Milli-Q (Millipore).

B. Material Biológico.

1. Extractos hipofisarios.— Se obtuvieron las hipófisis de pollos (Pilch) de 8 semanas de edad alimentados ad libitum, segundos después de la muerte del animal. Las glándulas se almacenaron a -70°C hasta su uso. Se homogeneizaron a 4°C en una solución de inhibidores de proteasas (PMSF 0.5 mM y aprotinina 50 KIU/ml, pH 7.2), a una concentración final de 0.3 g de tejido/ml.

Después de centrifugar a 10,000 rpm (Microfuga B, Beckman) durante 2 min, se congeló el sobrenadante hasta el momento de emplearse en los análisis electroforéticos.

2. Hormona de crecimiento pura de pollo. - La cGH pura se obtuvo por dos métodos. El primero, descrito previamente (16,97), incluye la homogeneización de hipófisis (donadas por el rastro "Procesadora de Aves de Morelos") obtenidas unos minutos después de la muerte de los animales, congeladas inmediatamente en hielo seco y almacenadas en el laboratorio a -70°C hasta su uso. La homogeneización se hizo en presencia de la solución de inhibidores de proteasas antes mencionada, seguida de una alcalinización a pH 9.0 con una solución saturada de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. El sobrenadante se precipitó secuencialmente con sulfato de amonio al 20% (Fracción A) y 50% (Fracción B) de saturación. La cGH pura (Fracción BDE-1) se obtuvo después de cromatografiar a la Fracción B en una columna de DEAE-celulosa en amortiguador de boratos a pH 8.6.

También fué empleado un método alternativo basado en reportes previos (98 y 99) para la obtención de cGH. Brevemente, el homogeneizado en presencia de inhibidores de proteasas, se alcalinizó a pH 9.5, seguido de una precipitación secuencial con sulfato de amonio a una concentración 0.15 M (3.745 % de saturación), y mediante acidificación a pH 4 con ácido metafosfórico (Fracción PpH4). El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 80% de saturación (Fracción 80%), para

obtener a las glucoproteínas hipofisiarias. La cGH pura se obtuvo por cromatografía de la fracción PpH4 en una columna de DEAE-celulosa (120 x 17.5 mm) en amortiguador de boratos (H_3BO_3 95 mM, NaOH 25 mM) pH 8.6.

C. Sistemas Analíticos.

1. Electroforesis discontinua no desnaturalizante en geles de poli(acrilamida) (ND-PAGE), basado en el método de Nicoll y col. (82). Gel resolvidor (120 x 160 x 1.5 mm): acrilamida 12.5%, bis-acrilamida 0.33%, HCl 6%, Tris 4.54% (pH 9.4), TEMED 0.029% y persulfato de amonio 0.07% ; este gel se cubrió con una solución de azul de bromofenol al 0.005% en agua. Gel concentrador (15 x 16 x 1.5 mm): acrilamida 5%, bis-acrilamida 1.25%, HCl 12%, Tris 1.49% (pH 7.2), TEMED 0.029% y riboflavina 0.001% (ver Apéndice A). Se polimerizó en presencia de luz blanca. Las muestras se mezclaron con la solución del gel concentrador, se aplicaron a los carriles, sobre el gel concentrador y se dejaron polimerizar. Amortiguador inferior: Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3, y amortiguador superior: Tris 25 mM, glicina 193 mM y 0.005% de azul de bromofenol. Se corrió a 100 V en el gel concentrador y 200 V en el gel resolvidor a temperatura ambiente. Los geles finalmente, se tiñeron con azul de Coomassie R-250, con plata (ver Apéndice B) o por inmunoelectrotransferencia (IET).

2. Electroforesis discontinua en geles de poli(acrilamida con SDS (SDS-PAGE).- Se usaron condiciones reductoras así como no reductoras de acuerdo al método de Laemmli (100). Gel resolvidor de 60 x 100 x 1 mm o 120 x 160 x 1.5 mm (ver Apéndice A). La muestra se solubilizó en un amortiguador de Tris 0.75%, SDS 0.15%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.03%; que en condiciones reductoras además llevó 2-mercaptoetanol al 5% y se calentó por 8 min en agua hirviendo. Se corrió a 100 V en el gel concentrador y 200 V en el gel resolvidor. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250, plata (ver Apéndice B) o por IET. Los patrones de peso molecular fueron de Bio-Rad (fosforilasa B, 97.4 Kd; albúmina sérica bovina, 66.2 Kd; ovoalbúmina, 42.7 Kd; anhidrasa carbónica, 31 Kd; inhibidor de tripsina de soya, 21.5 Kd; y lisozima, 14.4 Kd).

3. Isoelectroenfoque horizontal (IEF).- Se siguieron las especificaciones de los fabricantes (Bio-Rad). El gel (100 x 105 x 0.6 mm) se compuso de acrilamida 4.8%, bis-acrilamida 0.15%, glicerol 5%, anfolinas 2% (pH 8 a 10.5:pH 3.5 a 10, 1:4, v/v), riboflavina 0.0005%, TEMED 0.03% y persulfato de amonio 0.015% (ver Apéndice A). Se polimerizó al menos 1 h bajo luz blanca. El gel se montó en una cámara horizontal (Bio-Phoresis, Bio-Rad). Amortiguador catódico: etilendiamina 2M; amortiguador anódico: ácido glutámico 20mM. Con cortes de cinta adhesiva Dymo se formaron pozos en el gel durante la polimerización, los cuales permiten la aplicación de 15 µl de muestra (con 2% de anfolinas, v/v). Corrida: se aplicaron 5 W (potencia constante) y

gradualmente se aumentó la potencia hasta 12 W (aproximadamente 4,000 VxH totales), a 4°C y en una atmósfera saturada con N₂. El gradiente de pH del gel se determinó con un electrodo de superficie (Bio-Rad). Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250, con plata (ver Apéndice B) o por IET.

4. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). Se siguió básicamente el método descrito por O'Farrell (101) con algunas modificaciones (102,103,104,105). Primera dimensión (IEF): se realizó en geles cilíndricos (140 x 1.5 mm) con 3.65% de acrilamida, 0.22% de bis-acrilamida, 50% de urea, 1.75% de anfolinas (intervalo de pH 8.5 a 10 : pH 3.5 a 10, 1:4, v/v), 1.8% de Tritón X-100, 0.061% de TEMED y 0.025% de persulfato de amonio (ver Apéndice A). Amortiguador catódico (superior): 0.02 N NaOH y amortiguador anódico (inferior): ácido fosfórico 0.085%. Aunque no es necesario, se pueden preenfocar los geles a 200 V por 1 a 2 h. Las muestras se mezclaron en una solución de solubilización (urea 9M, 4% Tritón X-100, 2% 2-mercaptoetanol y 2% de anfolinas) aproximadamente 2 h antes de aplicar. Después de aplicada la muestra, la corrida se realizó en una cámara para electroforesis Protean II (Bio-Rad) y con una fuente de poder Bio-Rad Mod. 3000xi; se aplicaron 10,000 a 12,000 VxH (700 V durante 17 h) a una temperatura de 4 a 8°C.

Los geles obtenidos pueden ser almacenados a -70°C ó procesarlos de inmediato. Antes de acoplarlos a placas para correrlos en la segunda dimensión, los geles se equilibraron en

una solución amortiguadora (125 mM de Tris, 2% de SDS, 10% de glicerol, y opcionalmente para condiciones reductoras se agrega 5% de 2-mercaptoetanol) durante 10 min a 4°C. La segunda dimensión consistió en una electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida con SDS, según la técnica mencionada anteriormente (100). La detección de las proteínas se llevo a cabo por tinción con plata (ver Apéndice B) o por IET.

5. Inmunoelectrotransferencia (IET). Basada en el método original de Towbin (106). Los geles de ND-PAGE, SDS-PAGE, IEF ó 2D-PAGE inicialmente se equilibraron en un amortiguador: Tris 25 mM, glicina 192mM y 20 % de metanol por al menos 30 min, para posteriormente transferirse a papel de nitrocelulosa (0.45 µm), en una cámara de Trans Blot (Bio-Rad) y con una fuente de poder: Bio Rad Mod 250/2.5, en el mismo amortiguador. En el ensamblaje del "sandwich" se tomaron en cuenta las especificaciones del fabricante (ver Apéndice C). La transferencia se efectuó durante 30 min a 200 mA a temperatura ambiente y con agitación magnética. Para el proceso de inmunotinción, la membrana de nitrocelulosa se lavó con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 15 mM, pH 7.2 durante 5 min y posteriormente se bloqueó con una solución de gelatina al 3% en PBS durante toda la noche. Se lavó 2 veces con PBS más Tween-20 al 0.05% (TPBS), 5 min cada vez. A continuación, se incubó la membrana con una dilución 1:2,000 (v/v) del primer anticuerpo (suero anti-cGH obtenido en conejo) durante 2 a 3 h, en 1% de gelatina y TPBS. Se lavó 2 veces con TPBS y se incubó, a continuación, con una dilución 1:3,000 (v/v)

del segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo de origen caprino) acoplado a peroxidasa de rábano (1 h). Después de lavar 2 veces con TPBS y 1 vez con PBS, se revelaron las bandas inmunorreactivas durante 30 min con 4-cloronaftol al 0.05% (p/v), H₂O₂ al 0.015% (v/v) en metanol al 16.6% y PBS. Se secaron las membranas después de varios lavados con agua desionizada.

Los patrones de peso molecular usados en los sistemas de SDS-PAGE, se tiñeron con negro amido 10B al 0.1% en ácido acético al 10% y metanol al 45 % (ver Apéndice B).

D. Sistemas Preparativos.

1. Aislamiento de variantes de carga por ND-PAGE (95). En geles (80 x 5mm) cilindricos para ND-PAGE, se aplicaron de 40 a 80 µg de proteína pura por tubo; y la electroforesis se realizó en condiciones semejantes a las ya reportadas (16,95). Al finalizar la electroforesis, los geles se congelaron, excepto uno que se tiñó con "Quick Stain" (azul de Coomassie G-250 al 0.025% en 3.5% de ácido perclórico) por 5 a 10 min, el cual sirvió como referencia. Alineados los geles, con una navaja se cortaron las zonas correspondientes a las bandas que representan a variantes de carga de la cGH. Las rebanadas se electroeluyeron en una cámara ISCO, en un sistema de amortiguadores de Tris-acetatos 0.4 M pH 9.1 (cámara externa) y Tris-acetatos 0.04 M (cámara interna), a 4 a 8°C, con una potencia constante de 4 W durante 6 h, seguido por 1 min de polaridad invertida. Los eluidos se dializaron contra agua desionizada y se liofilizaron.

2. Aislamiento de variantes de carga por IEF preparativo.

La preparación del soporte, y las condiciones de corrida y detección estuvieron basadas en lo recomendado por Frey y col. (107) y los laboratorios de Bio Rad (Richmond, Ca.). Brevemente, se pesó 3.6 g del soporte inerte granulado (Bio Lyte) -para obtener un volumen total de aproximadamente 50 ml - , se equilibró en agua unas 3 h y se lavó hasta eliminar iones y sustancias cargadas, con agua desionizada, se rehidrató al volumen deseado y se almacenó hasta su uso. Se adicionó a la resina 2% de anfólinas (pH 8 a 10.5 : pH 3.5 a 10, 1:5, v/v). En un soporte limpio y delimitado en las zonas polares por papel secante previamente mojado, se agregó la resina desgasificada. Luego, se deshidrató por absorción del líquido con papeles secantes apoyados en las tiras de papel. Es importante tener un secado homogéneo. La muestra (cGH pura con 2% de anfólinas), se agregó en la parte central del soporte aún líquida con ayuda del aplicador. Se terminó de secar de la misma manera hasta tener una superficie homogénea, opaca contra la luz y firme a inclinaciones ligeras.

Sobre las tiras de papel que delimitan el gel se pusieron tiras de papel mojadas con los amortiguadores correspondientes. Amortiguador catódico: etilendiamina 2M, y amortiguador anódico: ácido glutámico 20 mM. Se colocan los electrodos, y se saturó la atmósfera de la cámara Bio-Phoresis (Bio-Rad) con N_2 . El isoelectroenfoco se corrió al aumentar

gradualmente de 5 a 14 W durante 3 h, y se dejó 5 a 6 h a 14 W (potencia constante) a una temperatura de 4°C. En total se aplicaron 24,000 VxH, en promedio. Pasado este tiempo, se sobrepusieron a la resina tiras de papel Whatman 3MM del tamaño del gel por 1 a 2 min; se tuvo cuidado de evitar las burbujas de aire. Se secaron las tiras de papel a 80 - 100°C, se lavaron 2 a 3 min en una solución de ácido tricloroacético al 10% y ácido sulfosalicílico al 5%. Posteriormente, se enjuagaron las tiras con agua y se tiñeron durante 5 min en azul de bromofenol al 0.5%, en ácido acético al 10% y etanol al 90%. Se destiñó con varios cambios de agua acidificada con ácido acético. Mientras se tenían los papeles, el gel se siguió corriendo a 200 V. De acuerdo al patrón mostrado en el papel se tomaron fracciones de resina en frascos separados y se almacenaron a -20°C.

La proteína contenida en las fracciones de resina separadas se eluyó mediante 3 lavados con 1 a 2 volúmenes de agua durante 45 min, a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 11,500 rpm por 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se concentraron a 1 ml en una liofilizadora (Lab Conco). Posteriormente con el objeto de separar a las anfolinas de la proteína purificada, se cromatografiaron las muestras en una columna de Sephadex G-15 (172 x 11 mm), equilibrada con PBS 10 mM, pH 7.2, a un flujo de 20 ml/h, a 4°C. Las fracciones se leyeron a 280 nm. Las fracciones proteínicas se dializaron contra agua y se liofilizaron.

E. Determinación de proteínas.

Se realizó en un sistema de microanálisis de acuerdo al método de Lowry y col. (108), y de Hartree (109), con algunas modificaciones (ver Apéndice D).

RESULTADOS.

Como ya se ha informado previamente (16,97), la cGH obtenida mediante el método de purificación desarrollado en el laboratorio tiene un alto grado de pureza y es completamente activa en varios bioensayos, lo cual sugiere que la técnica de aislamiento conserva la integridad biológica de la molécula. El método de purificación alternativo, que se usó también en este trabajo, tuvo como finalidad principal rescatar la variante glucosilada de la cGH, a partir de la fracción de glucoproteínas hipofisarias (Fracción 80%), pero de igual manera constituyó una fuente anexa de hormona (cGH) pura. La cromatografía de la fracción PpH4 (ver Materiales y Métodos) en DEAE-Celulosa, pH 8.6, permitió la elución de una proteína bajo condiciones idénticas con que eluye la cGH (Figura 1). Posteriormente, se comprobó que ambas preparaciones eran semejantes inmunológicamente (mismo grado de inmunotinción con antisuero específico), y en análisis electroforéticos (presentaron la misma variación de masa bajo condiciones reductoras (Figura 2), así como heterogeneidad de carga similar por IEF (Figura 3)). Sin embargo, el rendimiento general del método alternativo fué tan sólo del 32 % (0.94 mg/g) del obtenido por la técnica principal (2.9 mg/g) (16).

Se ha descrito previamente que la cGH en realidad corresponde a una familia de proteínas, semejantes entre sí pero

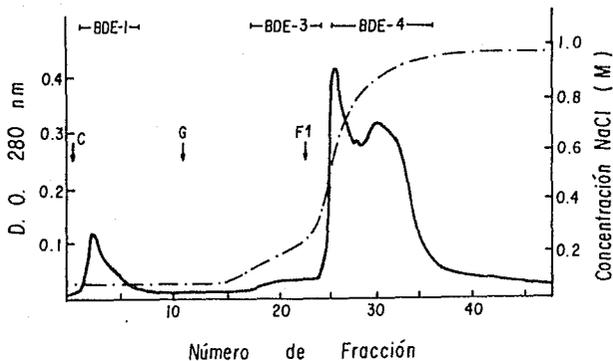


Fig.1 Cromatografía preparativa de la fracción PpH1, en DEAE-celulosa. Condiciones: flujo, 20 ml/h; vol. de muestra, 2 ml; vol. de fracción, 1 ml; dimensiones de la columna, 12.5 x 1.75 cm. Abreviaturas: C., cargado; G., gradiente; A.F.I., alta fuerza iónica; BDE-1, fracción de cGH pura, BDE-3, eluido con un gradiente lineal de NaCl; y BDE-4, eluido con alta fuerza iónica.

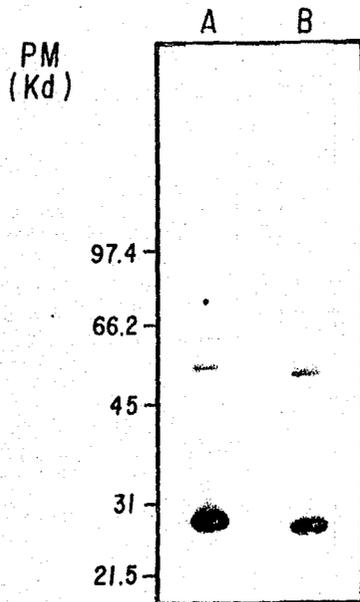


Fig.2 Analisis de las preparaciones de cGH purificadas por un sistema SDS-PAGE, bajo condiciones reductoras, seguido de IET en papel de nitrocelulosa. Carril A: preparacion de cGH pura obtenida por el metodo principal; carril B: preparacion de cGH pura obtenida por el metodo alternativo.

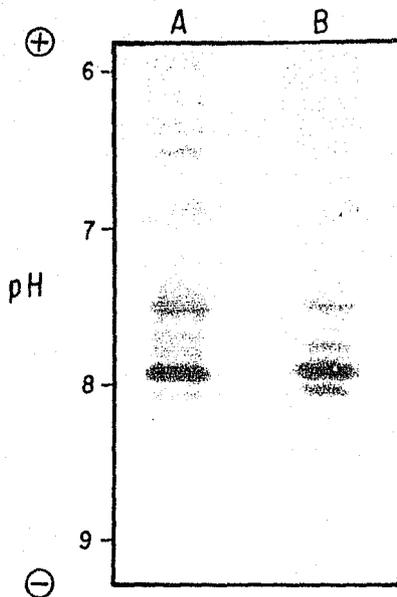


Fig.3 Analisis de las preparaciones de cGH purificadas por un sistema de IEF, seguido de IET. Carril A: preparacion de cGH pura obtenida por el metodo principal; Carril B: preparacion de cGH pura obtenida por el metodo alternativo.

no idénticas, y que presenta un complejo patrón de heterogeneidad estructural y funcional (16, 97). La mayor parte de esa evidencia se obtuvo con la forma purificada de la hormona y con el empleo de métodos de detección poco sensibles. Como se mencionó anteriormente, un objetivo del presente estudio fué comprobar la existencia de la heterogeneidad estructural de la cGH tanto en extractos hipofisarios frescos como en la muestra purificada, con la intención de observar si la presencia de variantes moleculares es una característica real de la hormona, ó bien si esta es secundaria al método de purificación. Además en este trabajo se utilizaron un buen número de sistemas analíticos y varios sistemas de detección, que incluyen la inmunotinción subsiguiente a la transferencia de las proteínas a nitrocelulosa, el cual es un método altamente específico y sensible.

La figura 4 muestra los resultados de una transferencia de proteínas a nitrocelulosa, de muestras separadas en un sistema ND-PAGE. El carril 1 representa la cGH purificada (Fracción BDE-1), y el carril 2 a un extracto hipofisario de pollo. En estas condiciones, ambos carriles presentaron 2 bandas definidas, correspondientes a un Rf de 0.23 y 0.30, siendo la primera la más abundante. Este patrón coincide con lo publicado previamente como resultado del análisis de geles cilíndricos nativos de poliacrilamida, donde se observan que estas bandas representan variantes de carga de la hormona. Sin embargo, la variante con Rf= 0.35, descrita anteriormente, (16) no fué claramente visible en estas condiciones. Esto puede ser debido al hecho de que esta



Fig.4 Analisis de las variantes de cGH por ND-PAGE e IET. Carril 1: Extracto hipofisiario fresco; Carril 2: cGH pura (frac. BDE-1).

variante normalmente se encuentra en mucha menor proporción con respecto a las otras dos formas, y la cantidad total de proteína aplicada al gel fue insuficiente.

La figura 5 ilustra los resultados obtenidos del estudio de los extractos hipofisarios en SDS-PAGE, bajo condiciones no reductoras. Como se puede observar, con este método es posible detectar a las variantes de masa de la hormona. La forma monomérica (22.4 Kd) claramente representa la especie más abundante de ambas muestras (carriles 2 y 3). Además, en el carril correspondiente al extracto hipofisario (carril 2), se observaron formas inmunorreactivas de mayor PM, correspondientes aproximadamente a 42, 70, 95, 110 y 115 Kd. Estas formas sugieren la existencia de oligómeros de la hormona, y representan distintos grados de agregación. La banda de 42 Kd, a su vez, también se observó claramente en la preparación de cGH pura (carril 3). En los últimos carriles (4 y 5) se observan los resultados de muestras paralelas reveladas mediante la tinción con plata, donde puede observarse una sola banda en la fracción purificada de la hormona, así como la abundante variedad de proteínas presentes en el extracto hipofisario.

Los resultados obtenidos en el análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras mostraron que una porción importante de las especies de alto PM, observadas con el análisis anterior, desaparecieron y, simultáneamente aumentó la forma monomérica (Figura 6). Asimismo se observó que el PM aparente del monómero,

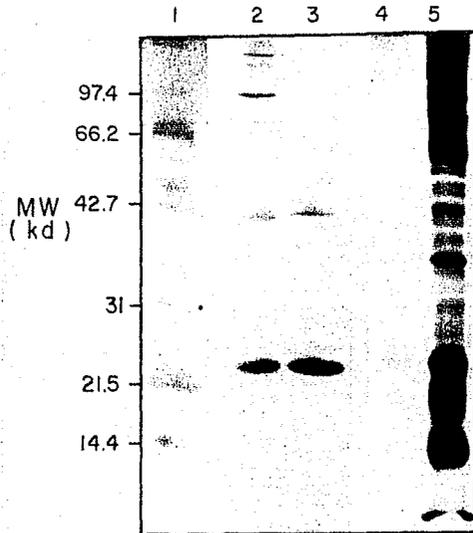


Fig.5 Analisis de las variantes de masa de cGH por SDS PAGE bajo condiciones no reductoras. Carril 1, Marcadores de peso molecular; carril 2 y 3: detección por IET; carril 4 y 5: tinción con plata; carril 2 y 5: extracto hipofisario fresco; carril 3 y 4: cGH pura (frac. BDE-1).

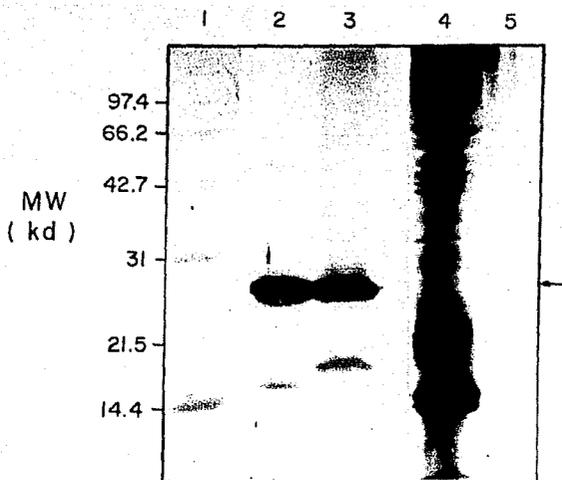


Fig.6 Analisis de las variantes de masa de cGH por SDS PAGE bajo condiciones reductoras. Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2 y 3: deteccion por IET; carril 4 y 5: tincion con plata; carril 2 y 5: cGH pura (frac. BDE-1); carril 3 y 4: extracto hipofisario fresco.

bajo estas condiciones, fué de 26 Kd, semejante a lo ya informado anteriormente (16, 90, 91). Sin embargo, aún así se observó inmunoreactividad en otras formas moleculares. En el carril 2, la preparación de cGH pura mostró una forma posiblemente dimérica de 52 Kd de PM, y aparentemente resistente a la reducción en presencia de 5% de 2-mercaptoetanol; de manera adicional se observó un componente minoritario de PM aparente de 22 Kd, que podría sugerir algún paralelismo con la variante de 20 Kd que se ha observado principalmente con las GHs de mamíferos. Por último, se detectó muy claramente un fragmento de 16 Kd que también fué inmunorreactivo, el cual podría haberse originado por un procesamiento proteolítico de la forma principal. En el carril 3, paralelamente a lo encontrado en la preparación purificada de la hormona, el extracto hipofisiario fresco mostró un patrón electroforético semejante, con la única diferencia clara de que el fragmento menor presentó un PM aparente de 17 Kd.

La figura 7 presenta el patrón obtenido después de la transferencia de las proteínas cuando la preparación de cGH pura y el extracto hipofisiario fresco fueron analizados por isoelectroenfoque en geles delgados (intervalo de pH de 3.5 a 10). En el extracto hipofisiario, se observaron claramente al menos 8 isoformas inmunorreactivas, con pI de 5.9, 6.8, 7.11, 7.3, 7.5, 7.9, 8.05, y 8.18. Alternativamente, en la preparación purificada se observaron sólo 6 de estas variantes, faltan la forma más ácida, y la de pI de 7.3. Este análisis indicó que si bien el método de purificación es capaz de recuperar la mayor

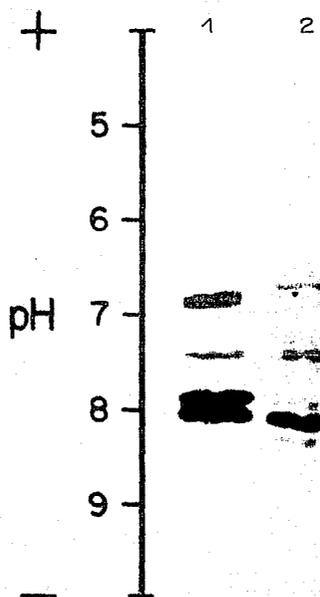


Fig.7 Analisis de las variantes de carga de cGH por isoelectroenfoque e IET. Carril 1: cGH pura (frac.BDE-1); Carril 2: extracto hipofisario fresco.

parte de las variantes de carga detectadas con esta técnica, y de hecho las formas más abundantes presentes en la hipófisis, también es cierto que la recuperación no es completa.

El análisis bidimensional de la preparación pura así como de los extractos frescos, seguidos de la transferencia proteínica a membranas de nitrocelulosa, en condiciones tanto reductoras como no reductoras (Figura 6), nos permite constatar algunas características previamente descritas. El cuadro A muestra el análisis de la preparación de cGH bajo condiciones no reductoras, donde se observan formas con variaciones en la carga pero con el mismo peso molecular (22 Kd). Dos formas, no claramente vistas en la fotografía pero presentes en la membrana de nitrocelulosa mostraron pI de 7.3 y 7.5 con un PM aparente de 46 Kd. El cuadro C constituye el análisis de un extracto fresco bajo condiciones similares, donde además del patrón ya mencionado, se observaron formas de 27.5 Kd y de 47 Kd, con un pI cercano a 7.5. Los cuadros B y D corresponden al análisis electroforético de ambas muestras pero en condiciones reductoras. En este caso la variación de carga fué muy semejante al de los casos anteriores, donde se observaron formas de pI entre 6.5 y 8.2, pero con el mismo PM. Las formas de menor PM así como la posible forma dimérica resistente a la reducción, no se apreciaron con claridad debido probablemente a la pequeña cantidad de proteína total aplicada al gel.

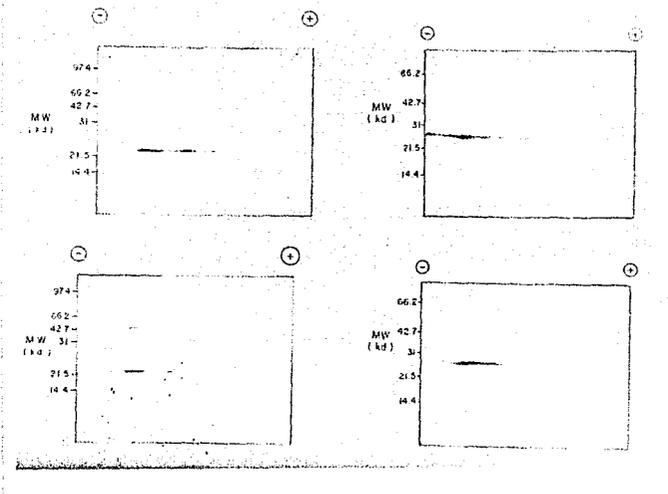


Fig.8 Analisis de las variantes de cGH por electroforesis bidimensional e IET. A y C: condiciones no reductoras; B y D: condiciones reductoras; A y B: cGH pura; C y D: extracto hipofisario fresco.

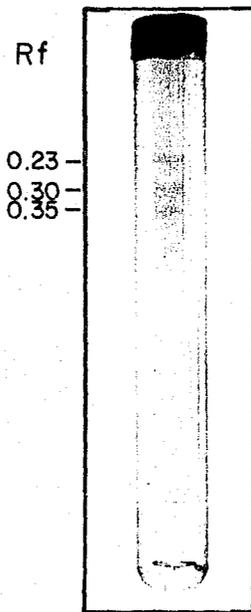


Fig.9 Analisis de la fraccion total pura en un sistema de ND PAGE semipreparativo. El gel se tiñe con "Quick Stain", y se almaceno en acido acetico al 7 %. En estas condiciones se puede observar claramente la separacion de 3 variantes de carga, con $R_f = 0.23$, 0.30 y 0.35 , respectivamente desde el catodo (parte superior).

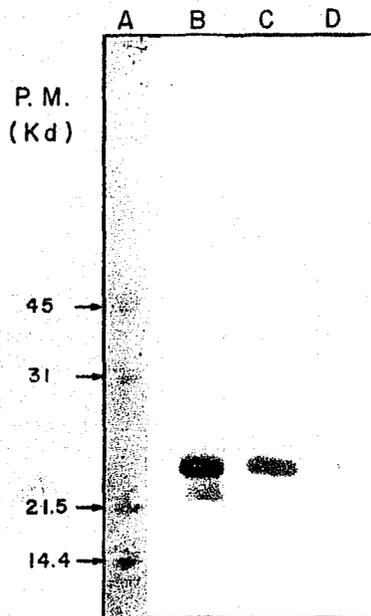


Fig.10 Analisis de las variantes de carga de cGH, obtenidas por electroelucion de un sistema de ND PAGE, por SDS PAGE bajo condiciones reductoras e IET. Carril A: estandares de peso molecular; carril B: variante 0.23; carril C: variante 0.30; carril D: variante 0.35.

En la figura 9 se observa el análisis en un sistema ND-PAGE de cGH pura. En estas condiciones y con estas concentraciones proteínicas (40 a 80 µg), se observó la presencia de las 3 variantes de cargas antes descritas (16, 97). A partir de geles semipreparativos paralelos, que no se tiñeron, se cortaron las zonas correspondientes a las bandas y se electroeluyeron por separado. Aunque el porcentaje de recuperación de proteína total tras la electroelución fué bajo (44%), permitió obtener suficiente material, de cada una de las variantes, para demostrar que tienen el mismo PM (26 Kd) y semejante detección inmunologica en un sistema de SDS-PAGE, bajo condiciones reductoras y posterior IET (Figura 10). La presencia de otra banda en el carril 2 (23 Kd) parece corresponder a una forma resistente a una reducción con 2% de 2-mercaptoetanol, pues en condiciones mas drásticas de reducción practicamente desaparece. Este resultado apoya la sugerencia de que al menos tres de las formas de la cGH, reconocidas como tal por el mismo anticuerpo, son variantes de carga y no de masa, puesto que muestran PM semejante.

Un método alternativo para el aislamiento de las isoformas de cGH, la constituye el isoelectroenfoco preparativo en un soporte granulado. Aunque su empleo esta aún en una fase de desarrollo, los resultados iniciales lo apuntan como una herramienta poderosa para una separación fina de las formas variantes de la hormona. En pruebas con hemoglobina (en un intervalo de pH de 3.5 a 10), fué posible separar al menos 4

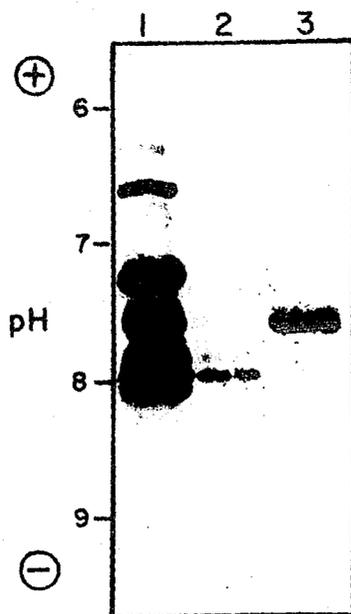


Fig.11 Analisis de dos variantes de carga de cGH, aisladas por isoelectroenfoque preparativo, por isoelectroenfoque e IET. Carril 1: cGH pura total; carril 2: variante con pI 7.95; carril 3: variante con pI 7.5.

variantes de carga, y la recuperación de proteína total fué mayor del 85 %; además, simultaneamente por este medio se puede separar una mayor cantidad de proteína en un sólo experimento (2 a 10 mg). En la figura 11, se muestra el patrón en un sistema de IEF, y posteriormente detectado por IET, tanto de la preparación completa de cGH como de dos formas aisladas por medio del IEF preparativo, con pI aproximados de 7.5 y 7.95, y que concuerdan perfectamente con los resultados anteriores.

DISCUSION

El estudio de la relación de estructura-función, sin duda permitirá tener un conocimiento mas preciso de las características que debe poseer una molécula, tanto para asociarse a un determinado sistema receptor, como en un caso más general, para poder inducir ciertas acciones sobre sus órganos blanco. Como una forma de introducirse a este estudio, nuestro laboratorio busca investigar las relaciones de estructura-función de la hormona de crecimiento, hormona característicamente heterogénea, tanto funcional como estructuralmente (ver introducción). Dentro de este objetivo general, y aunado al hecho de que en experimentos anteriores se habia identificado un carácter polimórfico de la cGH pura (16, 97), el presente trabajo estuvo encaminado a caracterizar por índices electroforéticos las variantes moleculares de cGH y comprobar su existencia en extractos hipofisarios frescos de pollos. Finalmente, como un inicio de estudios posteriores, se buscó la instrumentación de métodos de aislamiento de las variantes de la hormona.

Antes de referirnos a los resultados obtenidos, es necesario hacer algunas consideraciones con respecto a las características del material biológico, así como del antisuero empleado para la identificación de las isoformas.

Las glándulas hipofisarias empleadas en la purificación de la cGH fueron obtenidas directamente en el rastro. Inmediatamente después del sacrificio de los animales las cabezas

se depositaron en hielo, y rápidamente se procedió a disectar las glándulas, de manera que el material siempre se mantuvo en frío, a 4°C (15 a 30 min) y el procedimiento de disección fué muy rápido (aproximadamente 30 seg). En el momento de obtener la glándula, ésta se congelaba inmediatamente en hielo seco. Las glándulas se transportaron al laboratorio congeladas y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Para evitar posibles acciones proteolíticas en los extractos, la homogeneización de las glándulas se hizo en presencia de una solución de inhibidores de proteasas. Asimismo, para tratar de evitar daños a las proteínas y la generación de artificios durante la purificación, todos los pasos del método se llevaron a cabo a 4°C, y sin condiciones extremas de pH o fuerza iónica.

La cGH pura, obtenida en el laboratorio, fué evaluada (16) electroforéticamente e incluso se determinó la secuencia de los primeros 14 residuos de aminoácidos del extremo amino, sin observar diferencia con respecto a la secuencia reportada de la cGH (39,90,91), lo cual confirmó que la proteína obtenida era realmente cGH. Igualmente, se comprobó su actividad en varios bioensayos, donde la potencia biológica de la hormona fué mayor que la informada por otros autores (90).

Para los extractos hipofisarios frescos se emplearon hipófisis extraídas a los pocos segundos después de la muerte del animal y se congelaron a -70°C hasta su uso. Igual que en la purificación, para estar seguros de la inexistencia de acciones proteolíticas, las glándulas se homogeneizaron en la solución de inhibidores de proteasas.

Como ya se mencionó, la cGH pura que empleamos en el presente trabajo fué obtenida por dos métodos de purificación. Sin embargo, como se comprobó, ambas preparaciones hormonales mostraron las mismas características electroforéticas (patrones en sistemas de SDS-PAGE e IEF), e inmunológicas (semejante respuesta en el sistema de IET), lo cual nos permite suponer que estuvimos trabajando con la misma preparación hormonal; por lo que en lo subsecuente nos referiremos a la cGH pura indistintamente de la técnica de purificación. Sin embargo, como se mencionó en la sección de Resultados, el método alternativo empleado fué poco eficiente en la proporción de hormona recuperada por peso fresco de hipófisis (0.94 mg/g), en comparación a la obtenida por el método principal (2.9 mg/g) (16). Esta notable diferencia, puede ser explicada por la diferencia de las condiciones que se emplearon en cada caso, por ejemplo, mientras en el método principal, de la fracción que se precipitó con sulfato de amonio a 50 % de saturación (fracción B) se obtuvo la cGH pura (BDE-1); la fuente de hormona pura, por el método alternativo, fué una fracción precipitada con sulfato de amonio al 3.75% de saturación y acidificada a pH 4 con ácido metafosfórico (ver Materiales y Métodos). Consideremos también, que el objetivo del método alternativo era la separación óptima de las glucoproteínas hipofisiarias, y la fracción de donde se obtiene la cGH pura constituye un producto colateral.

El antisuero policlonal anti-cGH se obtuvo de conejos Nueva Zelanda inoculados con la hormona pura. Aunque en este trabajo no se muestran los resultados, en experimentos realizados

en el laboratorio, se comprobó la especificidad de este anticuerpo por análisis radioinmunométricos (RIA), inmunoenzimáticos (ELISA) y sistemas electroforéticos de SDS-PAGE e inmunolectrotransferencia (IET). Se comparó la inmunorreactividad cruzada con la GH de diferentes mamíferos (humana, bovina, ovina, porcina y de rata), de prolactina ovina y de una fracción de la purificación aparentemente enriquecida en prolactina de pollo (cPRL), y de la cual la cGH se había separado; en los ensayos de RIA (110) y ELISA se encontró un cruce menor al 0.5% con el antisuero a las concentraciones suficientes para unir el 50 % de la cGH. También por IET se comparó con GHs de mamíferos (humana, bovina, ovina, porcina y de rata) y de la fracción enriquecida de cPRL, el carácter específico del antisuero. Con las GH de mamíferos se observó una pequeña inmunorreactividad cruzada, sin embargo, la inmunorreactividad cruzada obtenida para la cGH fué mayor. Al contrario, la fracción con cPRL no fué identificada por el antisuero (datos no mostrados). Recientemente, además hemos demostrado que el anticuerpo no reconoce a la cPRL pura (donada por A. Farlow, Pituitary Hormones and Antisera Center, UCLA, USA) en IET. A diferencia de las condiciones en que se realizan los RIAs y ELISAs, puede ser que en las condiciones de desnaturalización y/o de como las que se presentan en el ELISA o durante la asociación a la membrana de nitrocelulosa, las proteínas muestren un carácter estructural más semejante entre ellas, lo cual explicaría el pequeño cruce de estas hormonas con el antisuero en el método de IET.

Como ya se había mencionado, aunque existe un cierto conocimiento del panorama estructural de la GH para especies de mamíferos, el único intento a la fecha de caracterizar la heterogeneidad molecular de la cGH, además del realizado en nuestro laboratorio, ha sido el estudio de Houston y Goddard (96), y al cual nos referiremos, en consecuencia, en repetidas ocasiones.

En general, las GHs contienen un número semejante de residuos de aminoácidos, por lo que tienen PM semejantes (21 Kd a 24 Kd). A pesar de esto, existe alguna controversia con respecto al PM obtenido por SDS-PAGE para la cGH, pues hay grupos que informan que la forma principal de cGH en condiciones reductoras tiene un PM aparente de entre 23 y 24 Kd, y en condiciones no reductoras de entre 20 y 21 Kd (87, 96). Nosotros, al igual que otros grupos (89 - 91), hemos encontrado que en las presentes condiciones: sistemas de amortiguadores, patrones utilizados para calcular el PM (Bio Rad), etc, la forma monomérica de la holoproteína en las preparaciones de cGH pura, así como la cGH de origen recombinante (datos no mostrados), y la encontrada en extractos hipofisiarios, en condiciones reductoras tiene un PM aparente de 26 Kd, y en condiciones no reductoras de 22 Kd. Esto último está de acuerdo al PM calculado de la secuencia de residuos de aminoácidos de la hormona (22.25 Kd). Aparentemente una posible explicación a esta variación de resultados es el empleo de diferentes condiciones durante la electroforesis entre los grupos de investigación. Otra fenómeno importante de estos estudios es el cambio de PM aparente entre las condiciones

reductoras y no reductoras, como algunos grupos de investigación también han informado (12,15,37,70,96). Esto puede deberse al rompimiento de los puentes disulfuro intracatenarios por efecto de la reducción con 2-mercaptoetanol, que le confieren una conformación terciaria más extendida y con un mayor radio de Stokes.

Dentro de las variantes de masa identificadas para GH de mamífero, está un grupo de alto PM conocido como formas "Big"; y aunque en pollo no pudieron ser detectadas antes formas mayores de 80 Kd (96), nosotros encontramos que en condiciones no reductoras en un sistema de SDS-PAGE, la glándula hipofisiaria presenta formas inmunorreactivas de 70, 95, 110 y 115 Kd aproximadamente. Estas isoformas no pudieron observarse en la muestra pura de la hormona, aunque la cantidad de proteína era semejante al extracto hipofisiario. Ahora bien, en condiciones reductoras (5% de 2-mercaptoetanol) éstas mismas formas no se pudieron detectar por inmunotinción. Como lo sugieren algunos autores (37,49,70,96), el carácter lábil a la reducción de éstas variantes indica que constituyen agregados del monómero principal, probablemente por asociaciones no covalentes o del tipo de puentes disulfuro.

La forma dimérica de GH, aunque se ha informado que presenta una menor inmunorreactividad y bioactividad que el monómero (ver Tabla 3), su presencia tanto en el plasma como en la hipófisis ha sido demostrada en varias especies de mamíferos (12,15,37,68,70,71). A diferencia del otro estudio con cGH (96), tanto en la preparación de hormona pura como en extractos frescos

de hipófisis, se encontraron formas de 43 a 44 Kd, en condiciones no reductoras, y 52 Kd, en condiciones reductoras. Contrariamente a otras formas agregadas de la forma monomérica, aún en condiciones reductoras se observa la asociación dimérica, aunque en menor proporción. La presencia de agregados de GH unidos covalentemente por algún medio diferente a los puentes disulfuro, ya también fué informada para hormonas de mamífero (15,37,70). Debido a resultados de experimentos recientes, retomaremos la discusión de la misma variante más adelante en la discusión.

A diferencia de lo encontrado por Houston y Goddard (96), en condiciones reductoras pudimos observar la presencia de dos formas de PM menor a la forma monomérica: 22 Kd y 16 a 17 Kd. En publicaciones previas sobre la estructura de GH de mamíferos (ver Introducción y Tabla 3), también se habían identificado formas menores como resultado de un procesamiento diferencial del transcrito primario, así como por efecto de procesamientos proteolíticos limitados que modifican las características funcionales (12,15,37,49,72 - 74). Es pretencioso intentar asociar una causa a la presencia de estas formas, sin embargo, el hecho de que sólo en condiciones reductoras (disociación de cistinas) se presentan éstas formas hace pensar que podrían tratarse de cortes proteolíticos limitados de la molécula, y que sólo se mantiene plegada la molécula por efecto de los puentes disulfuro. Es digno de hacerse notar que esta modificación tiene lugar además en los extractos frescos, lo cual nos sugiere que no se tratan de daños a la molécula por efecto del método de purificación. Por otro lado, aún no tenemos alguna explicación

de la diferencia entre los PM de los fragmentos identificados en la preparación pura y en el extracto hipofisiario. En dos informes recientes se demuestra la existencia de fragmentos de rGH y rPRL producidos in vivo; en el primero, se demuestra que la síntesis es regulada por los mismos factores que afectan la secreción de GH (73); y en el segundo, se demuestra que los fragmentos tienen bioactividad particular, así como una asociación a sitios de unión diferentes a los de la rPRL monomérica (60). Esto último sugiere que las entidades moleculares, antes consideradas estables, pueden también ser prohormonas, o intermediarios para otros varios tipos de mensajeros celulares (12,15,18,72).

La variación en la carga de cGH, ya antes evidenciada (96); en nuestro caso puede dividirse en dos clases, que dependen del tipo de sistema electroforético empleado. En un sistema de ND-PAGE, seguido por IET, se identificaron claramente dos variantes con Rf de 0.23 y 0.30. Bajo estas condiciones no se observó otra isoforma ya descrita por nuestro grupo (16, 97), con Rf de 0.35. Esto pudo ser debido a que en este sistema electroforético no se emplearon cantidades proteínicas tan grandes como en los geles cilíndricos (ver Resultados). Por otra parte, por isoelectroenfoque en un gradiente de pH de 4 a 9, pudieron identificarse al menos 8 variantes, las más importantes fueron las de pIs de 6.8, 7.5, 7.9 y 8.05. La fracción purificada presentó un patrón electroforético semejante al extracto hipofisiario, a excepción de la falta de dos isoformas de pIs de 5.9 y 7.3 en comparación al patrón obtenido con el extracto

hipofisiario; ésto además demostró que el método de purificación empleado, permite la recuperación de la mayor parte de las variantes moleculares de la cGH. Es notable la similitud de lo encontrado en estudios previos con cGH (76), donde se detectaron 7 isoformas en un intervalo de pI de 6 a 8, además en ese estudio se demostró que la presencia de varias de ellas era dependiente de la edad del animal. Esos datos apoyan la idea de que realmente se tratan de isoformas fisiológicamente presentes en los animales.

En nuestro estudio bidimensional, que no había sido hecho antes para la cGH, se comprobó el carácter heterogéneo de la hormona. Sólo en condiciones no reductoras se encontró la forma dimérica de la hormona, no así formas de PM mayores. Es probable que la ausencia de dichas formas bajo este tipo de análisis se explique por el hecho de que las muestras fueron tratadas con altas concentraciones de urea, tanto en el amortiguador de muestra como en la primera dimensión, y es muy conocido que este compuesto tiende a favorecer la disociación de los agregados de proteína. Por otra parte, debe resaltarse el hecho de que los resultados obtenidos por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras fueron hechos en ausencia de urea. En el análisis bidimensional en condiciones reductoras tampoco se identificaron los fragmentos antes descritos. Estas formas, cuya presencia se encuentra en una proporción menor, quizá no se observaron aquí debido a la menor cantidad de proteína total aplicada a los geles. En estos experimentos fué clara la variación de cargas de las isoformas de la hormona, y también que su PM es semejante. Esto mismo fué

demostrado, al aislar las variantes del sistema de ND-PAGE, y comparar su migración en un sistema de SDS-PAGE, donde presentaron también el mismo PM que la forma monomérica.

Como un principio del estudio y caracterización de las variantes aisladas, se inició la instrumentación de dos sistemas de purificación de las variantes. Aunque se ha avanzado, y se tienen algunos resultados interesantes con variantes aisladas de geles de ND-PAGE (ver más adelante), el sistema de IEF preparativo ha demostrado tener un mayor poder de resolución como se muestra en la Figura 11, donde se observa la separación de 2 variantes de carga ($pI = 7.5$ y 7.95) de un patrón heterogéneo e inmunorreactivo, obtenido por IEF, de la hormona total; así como una recuperación mayor de proteína total ($> 85\%$ en comparación con un 44% en un sistema de ND-PAGE). Aunado a esto, el IEF preparativo permite separar cantidades importantes de proteína (en estas condiciones, de 2 a 10 mg) en un solo proceso, lo cual es mucho más práctico que realizar varios experimentos para obtener una cantidad suficiente de las variantes. Por todo esto, el perfeccionamiento de esta última técnica de aislamiento de variantes de la cGH, sin duda, permitirá un rápido progreso en la caracterización bioquímica y biológica de las isoformas aisladas.

En forma paralela a este trabajo, se ha iniciado un estudio de caracterización biológica de las variantes de cGH, en nuestro laboratorio se aislaron las variantes de carga de la hormona mediante un sistema de ND-PAGE, y se probaron en dos ensayos homólogos: el ensayo lipolítico y el ensayo

antilipolítico, ambos sobre explantes de tejido adiposo abdominal de pollos (Pilch) jóvenes (95). En el primer ensayo se observó que la variante 0.23 estimulaba de una manera dependiente de la dosis la lipólisis (una concentración de 1 µg de proteína duplicaba el valor de glicerol liberado en comparación al control), efecto ya reportado para la cGH total (10,16), así como para GHs de mamíferos (12,15); mientras tanto, la variante 0.30 no sólo no estimuló la lipólisis en este ensayo sino que provocó una disminución en la proporción de glicerol liberado (aproximadamente 25 % menos que el valor del control). En un ensayo donde se determinó la inhibición del efecto lipolítico en tejido adiposo inducido por glucagon (antilipólisis), la variante 0.23 no inhibió la acción del glucagon (efecto semejante al ocasionado por la cGH total), sino al contrario, aumentó en una pequeña proporción el nivel de glicerol (12 % a una concentración de 100 ng) en comparación a la estimulación sola del glucagon (1 ng); en cambio, la variante 0.30 mostró una clara inhibición del efecto lipolítico del glucagon, a concentraciones de 10 y 100 ng de proteína. Este estudio es de gran importancia, pues apoya la idea de que las variaciones estructurales de la hormona pueden asociarse con efectos fisiológicos particulares. Es decir, que la heterogeneidad funcional de la GH podría explicarse en función de su complejidad molecular.

Otra variación estructural de la cGH (ver Introducción), identificada primero para mamíferos (75, 76), y recientemente para la cGH (77, 112), y que puede explicar un poco de la variación estructural y funcional de la hormona, es la existencia

de una forma glucosilada de la cGH. Aunque datos más particulares de esta variante no se muestran en este trabajo, nuestro grupo, de manera independiente, también ha evidenciado su presencia (112), y actualmente se están llevando a cabo una serie de estudios más finos para la caracterización de esta variante.

En otra serie de estudios, nuestro grupo de investigación ha postulado que la fosforilación puede también contribuir en parte a la heterogeneidad de carga encontrada en la cGH (16). En estudios realizados en rPRL (56), se evidenció que tres variantes de carga encontradas en un sistema bidimensional debían su migración diferente a la presencia de fosfato esterificado y a su grado de fosforilación. También, en GH se demostró la existencia de isoformas fosforiladas (78 a 80). Encausado por antecedentes de este tipo, se determinó en un ensayo in vitro, que en la cGH pura existía una relación 1:3 de moléculas de fosfato por molécula de hormona, aproximadamente. El fosfato determinado debió haber estado esterificado a la hormona pues en ningún paso de la purificación se empleó fosfato (16). En estudios preliminares recientes, hemos demostrado que la cGH pura y la cGH de origen recombinante (donada por Scanes, Rutgers University, N.J. USA), son capaces de ser fosforiladas en un ensayo in vitro, por la subunidad catalítica de la proteína cinasa A (dependiente de AMPc) en presencia de ATP radioactivo. En cambio, la cGH glucosilada (proporcionada por Berghman, Universidad Católica de Louvain, Belgica), no mostró incorporación radiactiva aún analizada electroforéticamente después de su inmunoprecipitación por anticuerpo anti-cGH (81).

Conjuntamente con estos últimos estudios (81), se encontró que en un cultivo de células hipofisiarias de pollo, y ante la influencia de un secretagogo como el GHRH, era capaz de fosforilarse una molécula inmunológicamente identificada como cGH tanto en el medio de cultivo como en los extractos celulares, pero cuyo PM correspondía con la forma dimérica antes descrita. Cuando se contó la radiactividad de los extractos celulares y de los medios de cultivo, tras el período de incubación, se encontró que la mayor cantidad de marca radiactiva se detectaba en el medio de cultivo. Aunque se necesita más evidencia, esto puede sugerir una forma de regulación muy fina en la secreción de la GH, donde ciertas variaciones estructurales de la hormona pueden influir en la elección del material que va a ser secretado.

La variación estructural de las hormonas hipofisiarias, ha sido objeto de una gran atención, y no es para menos, pues su estudio y comprensión ofrece la explicación de un gran número de mecanismos de comunicación hormonal, de los cuales aún poco se sabe. En el mismo sentido, el estudio estructural y funcional de la GH de otras especies, constituye una forma de introducirse al estudio de las variaciones interespecie e incluso, de trascendencia evolutiva. Es claro pensar que esto constituye una labor titánica, y aún requerirá bastante tiempo para que pueda contarse con elementos teóricos firmes. Sin embargo, los trabajos recientes encaminados hacia el estudio de la heterogeneidad estructural y fisiológica de las hormonas, permiten vislumbrar un panorama enormemente vasto y complejo.

La existencia de variantes estructurales de la GH, y en nuestro caso particular de la cGH, como se menciona en la introducción, parece ofrecer una explicación, sino total, si de gran relevancia al fenómeno de multifuncionalidad, pues como hemos podido también demostrar en el caso de la cGH, la hormona de crecimiento in vivo puede existir no como una sola entidad molecular, sino como una familia de estructuras proteínicas homólogas pero no idénticas, que fisiológicamente, y según sus características estructurales particulares podrían asociarse a determinadas moléculas receptoras en un órgano blanco, y estimular una acción, o modular acciones influenciadas por otros mensajeros, diferentes incluso a las acciones provocadas por otras moléculas de esta familia. Ahora, si consideráramos que la proteólisis limitada in vivo puede tener un papel muy activo en la diversificación estructural y funcional de la hormona, permitiría, además pensar en la forma monomérica principal de la GH como una prohormona; y que desde la hipófisis o a su llegada a un determinado órgano blanco, derivaría en la expresión de ciertas fragmentos específicas. Ejemplos de este tipo de modificación hormonal en sus órganos blanco puede ser referido a estudios recientes en la rPRL (60), donde por resultado de proteólisis limitada da origen, al menos, a una variante biológica e inmunológicamente diferente a la forma principal de la hormona.

Además, éstos estudios permiten vislumbrar un nivel de regulación molecular de enorme complejidad pero indiscutiblemente

de gran finura, ya sea a nivel de los somatotropos (células que sintetizan y liberan a la GH) en la hipófisis o en los diferentes órganos blanco. La enorme complejidad en la regulación de la secreción de la GH en la hipófisis (15, 49, 111), sería coherente con un manejo muy preciso de una amplia gama de estructuras moleculares homólogas. La regulación intracelular podría influir en la producción preferente de algunos tipos de variaciones, de acuerdo al estado fisiológico del animal, o en la liberación sólo de aquellas formas necesarias para algunas funciones en particular. La otra región fisiológica de variación molecular de la GH la constituirían los propios órganos blanco, donde, como se ha sugerido (12,15,18,49); la variación molecular de la GH plasmática, podría originarse por procesos de degradación limitada (o modificación) intracelular, tras el fenómeno de endocitosis del complejo receptor-molécula de GH, que ha sido demostrado en varios sistemas celulares (17,18,32,34). Se ha comprobado que mientras una pequeña porción de la hormona endocitada sale íntegra de la célula, la mayor parte sufre un proceso de degradación (17, 18); sin embargo, aún no se ha realizado una caracterización estructural, inmunológica y biológica de los fragmentos resultantes de esta degradación, que indudablemente sería de un gran interés.

Con antecedentes en los informes de la GH de mamíferos y de los escasos antecedentes estructurales de la GH de pollo, así como de otras especies diferentes a los mamíferos; los resultados obtenidos en el laboratorio, demuestran la existencia de una

naturaleza estructural compleja de la cGH pura que puede relacionarse a su heterogeneidad fisiológica. En un sentido más particular, el presente estudio sienta las bases de algunas características estructurales de la heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento hipofisiaria de pollo en varios sistemas electroforéticos, tanto en una preparación de cGH pura como in vivo. Así también, se inició la instrumentación de métodos necesarios para analizar más finamente a esta hormona tan compleja. Todo esto nos ha permitido formarnos un panorama más concreto del fenómeno de la variación molecular de mensajeros hormonales, como la GH.

A partir de estos antecedentes y con cantidades suficientes de las isoformas de cGH aisladas, se puede plantear una gran cantidad de interesantes e importantes estudios a realizar, como la caracterización estructural e inmunológica de las isoformas de carga aisladas, la comprobación de sus bioactividades en diferentes ensayos biológicos (tanto homólogos como heterólogos), la búsqueda de posibles variaciones en la estructura primaria de las variantes (mapeo peptídico con varias tipos de proteasas, composición de aminoácidos, determinación de la porción amino terminal), y consecuentemente, la determinación de las causas probables de la existencia de variantes, como la fosforilación: comprobar que la fosforilación in vivo es reproducible, intentar identificar la proteína cinasa que modifica in vivo a la cGH; cómo la fosforilación puede ejercer un efecto en la bioactividad y en la secreción de cGH.

hipofisiaria, y responder a señales hormonales (como de GHRH, somatostatina, TRH). Los estudios de radioreceptor permitirían contar con otro parámetro de comprobación del carácter estructural y funcional de las diferentes variantes, al investigar su interacción con receptores específicos. Estos estudios y varios más, sin duda, permitirán recabar mas información acerca de este complejo campo, e incluso posibilitarán empezar a contestarnos algunas interrogantes acerca de las relaciones de estructura - función de la GH.

CONCLUSIONES

Para resumir los datos presentados en este trabajo, a modo de conclusión podemos decir que:

1. En un análisis electroforético de la hormona de crecimiento pura, así como en extractos frescos de hipófisis de pollo, es posible identificar variantes de masa y carga, estructuralmente muy relacionadas a la forma principal.

2. Se identificó en condiciones no reductoras, que la forma principal monomérica tiene un PM de 22 Kd, y en condiciones reductoras, migra como una forma de 26 Kd.

3. Además, se identificaron formas variantes de PM. Bajo condiciones no reductoras se observaron formas agregadas de alto PM (43, 95, 110 y 115 Kd), que ante las condiciones reductoras no se hicieron aparentes. Sin embargo, una proporción de la variante posiblemente dimérica, aún se observó ante las condiciones reductoras empleadas en el presente estudio (52 Kd), lo cual sugiere que en la estabilización de su estructura intervienen enlaces covalentes diferentes a los puentes disulfuro.

4. Sólo bajo condiciones reductoras fueron aparentes las formas de menor PM que la entidad monomérica (22 y 16 Kd). Que sólo hayan aparecido bajo estas condiciones sugiere que se trata de fragmentos producto de cortes proteolíticos limitados en su estructura primaria. Si tienen importancia fisiológica o no, es algo que requiere estudio.

5. Por un sistema de ND PAGE fueron aparentes tres formas con diferencias de carga (Rfs de 0.23, 0.30 y 0.35), pero que aisladas presentan el mismo FM en SDS PAGE, bajo condiciones reductoras (26 Kd).

6. Por análisis en isoelectroenfoque pudieron identificarse al menos 8 variantes de carga (pI de 5.9 a 8.2), inmunorreactivas al antisuero específico; 6 de las cuales también se observan en la preparación de cGH pura. Esto se constató por el análisis bidimensional, que presentó gran heterogeneidad de carga de la hormona de crecimiento en un intervalo de pH entre 5 y 8, pero con el mismo FM.

7. Se cuenta con resultados iniciales, del desarrollo del sistema de isoelectroenfoque preparativo, que permitirá aislar una importante proporción de las isoformas de carga separadas por IEF, lo cual, a su vez, permitirá realizar estudios de caracterización bioquímica y biológica de las variantes por separado.

PREPARACION DE GELES

I. GELES PARA ND-PAGE.

1) Reactivos.

Solución A1. Se disuelven 24 ml de HCl 1 N, 18.15 g de Tris y 115 μ l de TEMED en 60 ml de agua desionizada. La solución se ajusta a pH 9.4 con NaOH 1 N. Finalmente se lleva a un volumen de 100 ml con agua.

Solución A2. Se disuelven 50 g de acrilamida y 1.2 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua desionizada. Posteriormente, la solución se pasa por filtros de 0.45 μ m (Millipore).

Solución A3. Se disuelven 140 mg de persulfato de amonio en 100 ml de agua desionizada.

Solución B1. Se solubilizan 48 ml de HCl 1 N, 6 g de Tris y 460 μ l de TEMED en 40 ml de agua desionizada. Se ajusta el pH a 7.2 con NaOH 1 N, y se lleva a un volumen de 100 ml con agua.

Solución B2. Se disuelven 10 g de acrilamida y 2.5 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua desionizada. Posteriormente, se pasa la solución por filtros de 0.45 μ m (Millipore).

Solución B3. Se disuelven 120 μ g de riboflavina en 3 ml de agua desionizada, se protege de la luz. Se prepara fresca cada vez.

2) Método.

a) Independientemente del volumen de gel deseado, las proporciones de las soluciones requeridas son las siguientes:

<u>Gel resolvidor</u>			<u>Gel concentrador</u>		
Solución A1	1 parte	(9 ml)*	Solución B1	1 parte	(1 ml)
Solución A2	1 parte	(9 ml)	Solución B2	2 partes	(2 ml)
Solución A3	2 partes	(18 ml)	Solución B3	1 parte	(1 ml)

* Los volúmenes corresponden a las cantidades necesarias para hacer un gel resolvidor de 120 x 162 x 1.5 mm y un gel concentrador de 15 x 162 x 1.5 mm.

b) Para preparar la solución de monómeros del gel resolvector, se mezclan las soluciones A1 y A2, se desgasifica la mezcla con vacío y agitación. Se añade la solución A3 justo antes de verter al molde.

c) Se cubre con cuidado con una capa de agua desionizada, justo después de terminar de verter la mezcla de monómeros. Esto último permite contar con una superficie del gel regular y homogénea. Se deja polimerizar durante 30 min aproximadamente.

d) Se mezclan las soluciones B1 y B2, y se desgasifican. Se quita el agua de encima del gel resolvector. Entonces, se agrega la solución B3, en la proporción correspondiente, y se vierte esta solución sobre el gel resolvector. Al colocar el peine, se cuida de que no queden burbujas de aire atrapadas para formar los carriles. Irradiar con luz blanca el gel durante aproximadamente 20 a 30 min.

e) Una vez que la polimerización se haya llevado a cabo, disolver la muestra en la solución de monómeros para el gel concentrador sobrante (que durante todo el tiempo se protegió de la luz). Colocar las muestras en los correspondientes carriles e irradiar el gel con luz blanca por 10 a 15 min. Finalmente acoplar el gel a la cámara de electroforesis e iniciar la electroforesis con el sistema de amortiguadores antes indicados (ver Materiales y Métodos).

3) Observaciones.

1. Este sistema técnicamente no es muy complejo, y aunque requiere de cierta experiencia, es bastante útil cuando se intentan separar componentes por diferencias de carga y masa.

II. GELES PARA SDS-PAGE.

1) Reactivos.

Solución A. Se disuelven 30 g de acrilamida y 0.8 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua desionizada. Se pasa la solución por filtros de 0.45 μ m (Millipore).

Solución B. Se disuelven 18.17 g de Tris y 400 mg de SDS en 80 ml de agua desionizada. Se ajusta a pH 8.8 con HCl 1 N. Finalmente se lleva a un volumen de 100 ml con agua.

Solución C. Se disuelven 6.06 g de Tris y 400 mg de SDS en 80 ml de agua desionizada. Se ajusta el pH a 6.8 con HCl 1N. Finalmente se lleva aun volumen de 100 ml con agua.

Solución D. (persulfato de amonio al 10 %). Se disuelven 100 mg de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada. La solución se prepara fresca cada vez.

2) Método.

a) Para obtener geles de aproximadamente 60 x 100 x 1 mm (para otros volúmenes sólo hay que variar la cantidad de las soluciones conservando la misma proporción entre ellas), a diferentes concentraciones de poli-acrilamida, se emplean las siguientes cantidades:

	4%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%
Sol. A	0.8ml	1.5ml	1.95ml	2.5ml (14.58ml)*	3ml	4.05ml
Sol. B	1.25ml	1.5ml	1.5ml	1.5ml (8.75ml)	1.5ml	1.5ml
Agua	3.7ml	3 ml	2.3ml	2 ml (11.66ml)	1.5ml	0.45ml
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l (29 μ l)	5 μ l	5 μ l
Sol. D	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l (117 μ l)	20 μ l	20 μ l

* Los volúmenes entre paréntesis corresponden a un gel resolvidor de 120 x 162 x 1.5 mm (Protean II, Bio Rad).

b) Antes de agregar los catalizadores (TEMED y la solución de persulfato), se desgasifica (10 a 15 min) la mezcla de monómeros. Después de añadir los catalizadores se vierte en el molde correspondiente. Luego, se añade una capa de agua con cuidado sobre la solución de monómeros. Se deja polimerizar durante 30 min aproximadamente.

c) Para el gel concentrador o espaciador (4% de acrilamida), se emplean las siguientes cantidades:

	Gel 10 x 100 x 1 mm	Gel 15 x 162 x 1.5 mm
Sol. A	0.66 ml	0.92 ml
Sol. C	1.26 ml	1.76 ml
Agua	3.08 ml	4.31 ml
TEMED	5 μ l	7 μ l
Persulf.	25 μ l	35 μ l

d) Se prepara la solución de monómeros del gel concentrador, de manera semejante a la del gel resolvidor, sólo tomando en cuenta las cantidades de las soluciones antes especificadas. Se vierte la solución en el molde. Se tiene cuidado de que no queden burbujas de aire atrapadas, al colocar el peine. Una vez polimerizado el gel, se colocan las muestras en los carriles, se acopla a la cámara de electroforesis y se inicia la corrida.

3) Observaciones.

1. Esta técnica, es muy usada y es completamente reproducible, siempre y cuando se mantengan las mismas condiciones tanto en el preparado de los geles como durante la electroforesis. Además, constituye una herramienta de gran precisión y resolución.

III. GELES PARA IEF.

1) Reactivos.

Solución de acrilamida. Se disuelven 24.25 g de acrilamida y 0.75 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua desionizada. Se pasa la solución por filtros (Millipore) de 0.45 μm antes de emplearse.

Solución de glicerol (25%, p/v). Se pesan 2.5 g de glicerol y se lleva a un volumen de 10 ml con agua desionizada.

Solución de anfolinas. Se prepara una solución de anfolinas de pHs 8 a 10.5 : 3.5 a 10, en una relación 1:4 (v/v). Para 1.5 ml se mezclaron 300 μl de anfolinas de pH 8 a 10.5 y 1.2 ml de anfolinas de pH 3.5 a 10.

Solución de persulfato (10%, p/v). Se disuelven 100 mg de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada.

Solución de riboflavina 5'fosfato (0.1%, p/v). Para 1 ml de solución, se disuelve 1 mg de riboflavina en 1 ml de agua desionizada. La solución debe protegerse de la luz. se hace fresca de preferencia cada vez.

2) Equipo.

Cámara Bio-Phoresis para IEF (Bio Rad).
Molde para geles horizontales delgados (Bio Rad).
Placa de vidrio (100 x 125 x 2 mm).
Lámpara de luz blanca.
Cortes de cinta Dymo (2 de 110 x 8 x 0.2 mm,
y 6 de 10 x 8 x 0.2 mm).

3) Método.

a) Se ponen los cortes largos de Dymo en los carriles laterales del molde, se sujetan con cinta adhesiva transparente. Los cortes pequeños de Dymo se adhieren al fondo del molde; cuando el gel esté polimerizado, éstos cortes formaran pequeños pozos donde se aplicará la muestra.

b) Montada sobre la cinta de Dymo, se coloca la placa de vidrio.

c) Se prepara la solución de monómeros:

<u>Solución.</u>	<u>Volumen.</u>
Agua	8.25 ml
Sol. acrilamida	3 ml
Sol. glicerol	3 ml
Sol. anfolinas	0.75 ml

d) Se desgasifica la solución al menos por 5 min con agitación magnética y en vacío.

e) Se preparan las soluciones de catalizadores: 22.5 μ l de la solución de persulfato y 75 μ l de la solución de riboflavina.

f) Se mezclan las soluciones de catalizadores con la solución de monómeros desgasificada, se agregan 4.5 μ l de TEMED y se agita ligeramente. Se pipetea la solución entre la placa de vidrio y el fondo del molde:

1. Se sostiene la pipeta en un ángulo de 45°, y se limpia la punta de burbujas de aire.
2. Se deja fluir la solución para formar primero un frente a lo ancho de la placa.
3. Cuando está formado el frente de líquido, lentamente se añade el resto de la solución hasta llenar el espacio.
4. Si una burbuja es atrapada, se mueve la placa de vidrio hacia los lados o con ayuda de una aguja se remueve la burbuja.

g) Encima del molde se pone la lámpara de luz blanca, se irradia la placa por aproximadamente 1 h.

h) Se separa el gel del molde: con una espátula, por una de las esquinas se ejerce una pequeña palanca. Cuando el aire aparece debajo del gel, suavemente separar el gel del molde. Se voltea el gel, y sobre el mismo molde se irradia al gel con luz blanca otros 15 min, para eliminar el monómero no polimerizado de la superficie.

i) Se remueven las esquinas del gel (cortes diagonales), así como cualquier porción que alcance el borde de la placa de vidrio.

j) Se coloca el gel (sostenido por la placa de vidrio) sobre la plataforma de cerámica fría (4 a 8°C) mojada con una solución diluida de glicerol al 5 %, se procura eliminar las burbujas que aparezcan entre la placa de vidrio y la plataforma de cerámica.

k) Se mojan 2 tiras de papel secante, de una longitud un poco menor a la del gel, cada una con su respectivo amortiguador (ver Materiales y Métodos); se secan ligeramente y se colocan en contacto con los bordes polares del gel. Se comprueba que los electrodos hagan buen contacto con estos papeles.

l) Se aplican las muestras con una jeringa Hamilton de 10 μ l a cada uno de los pozos del gel.

m) Se colocan los electrodos, se satura la cámara con N_2 , se cierra ésta y se inicia la electroforesis.

4) Observaciones.

1. El presente protocolo está enfocado al empleo del equipo para IEF horizontal de Bio Rad (Biophoresis). Permite emplear geles de un grosor entre 0.2 y 0.6 mm, lo cual permite una transferencia mejor del calor, y consecuentemente, es posible aplicar mayores voltajes (hasta 2000 V), permitiendo una mayor resolución en comparación con otros sistemas de IEF.

2. Para asegurar que la polimerización sea casi completa se agregan dos catalizadores. Sin embargo, es importante emplear las cantidades exactas pues menores cantidades comprometerían una buena polimerización; de igual manera, mayor cantidad de los catalizadores puede inhibir la reacción de polimerización. Las presentes cantidades permiten hacer un gel de 100 x 105 x 0.6 mm.

3. Es importante desgasificar la solución de monómeros al menos por 10 min, para evitar la formación de burbujas durante la polimerización.

4. Los cortes de Dymo sobre los carriles del molde se emplean sólo cuando se quiera hacer geles de 0.6 mm, que son más prácticos para manejarlos que geles muy delgados.

5. La posición de los cortes de Dymo para la formación de los pozos de aplicación, depende de las necesidades individuales, debido a que este sistema constituye un análisis en equilibrio (las proteínas al alcanzar, dentro de un gradiente de pH, su correspondiente pI van a dejar de migrar) debería ser por tanto indistinto el sitio de aplicación. Es recomendable, sin embargo,

formar los pozos distanciados al menos 1 cm de los electrodos; así tambien es preferible colocar los pozos en un sitio distinto donde esperamos migre la(s) proteína(s). Para comprobar que las proteínas han alcanzado su pI, se puede aplicar la muestra en diferentes posiciones en el gel, en la misma electroforesis; se esperara, entonces, una idéntica migración de la(s) proteína(s) en el gel.

6. Aunque no se presentan efectos adversos patentes cuando se almacenan este tipo de geles (cubiertos con una capa de Parafilm y encerrados en una bolsa, a 4°C). Es preferible emplear los geles el mismo día, debido a que están muy expuestos a una atmósfera con CO₂ (lo cual deriva en la inclusión de ácido carbónico en el gel), esto resulta en un descenso en el gradiente de pH en valores alcalinos. Igualmente, antes de iniciar e incluso durante la corrida (2 ó 3 veces) es recomendable saturar la cámara de BioPhoresis con N₂, para evitar una importante interacción entre el CO₂ atmosférico y el gel.

1) Reactivos.

Solución de Acrilamida. Se disuelven 30 g de acrilamida (30%) y 1.8 g de bis-acrilamida (1.8 %) en 100 ml de agua desionizada. Se pasa la solución por filtros (Millipore) de 0.45 μ m.

Solución de anfolinas. Para 0.5 ml se mezclan 100 μ l de anfolinas pH 8 a 10.5 y 400 μ l de anfolinas pH 3.5 a 10.

Solución de persulfato. Se disuelve 100 mg de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada. Se prepara fresco cada ocasión.

2) Protocolo.

a) La electroforesis de 1a. dimensión (IEF) se realiza en tubos de vidrio (5 x 180 mm, diámetro interno de 1.5 mm) siliconizados con una solución de Photo-Flo (Kodak): agua, 1:20 (v/v). Se secan los tubos, y, por un extremo se sellan con Parafilm y se suspenden verticalmente con ligas en una gradilla.

b) Se prepara la solución de monómeros: Para aproximadamente 12 geles (130 x 5 mm), 4.49 g de urea se disuelven en 3.3 ml de agua desionizada (requiere mucho tiempo de agitación, o también, se puede calentar muy ligeramente con agua tibia). A esta solución se agrega 0.41 ml de la solución de anfolinas, 1.1 ml de la solución de acrilamida y 0.16 ml de tritón X-100. Pasar la solución por filtros (Millipore) de 0.45 μ m. Se desgasifica la solución por al menos 10 min.

c) Justo antes de verter la solución de monómeros a los tubos, se agregan 5.5 μ l de TEMED y 25 μ l de la solución de persulfato.

d) Con una jeringa de aguja muy larga (al menos 14 cm) se vierte la solución de monómeros desde el fondo del tubo y se añade solución, y conforme el nivel de solución en el tubo aumenta hasta alcanzar la altura del gel deseado, se retira la aguja del interior del tubo (debe ser un proceso continuo pero relativamente rápido). Esto se repite para los demás tubos.

e) Con una jeringa Hamilton, con cuidado, se aplica una capa de agua desionizada sobre la solución de monómero dentro del tubo. Se deja polimerizar por 30 min aproximadamente.

f) Los geles pueden precorrerse (con sistema de amortiguadores indicados en Materiales y Métodos.), para eliminar

productos secundarios de la reacción de polimerización; aunque en general, en los geles sin haber sido precurridos no se observan diferencias notables en comparación a los así tratados.

g) En una cámara de electroforesis Protean II (Bio Rad) se acoplan los tubos. Se quita con cuidado el Parafilm del extremo inferior. Se quita también el agua que cubre los geles, y se aplica la muestra solubilizada más 2% de anfolinas (pH 3.5 a 10), se rellena el resto del tubo con el amortiguador superior. Se añaden cantidades correspondientes de los amortiguadores superior e inferior. Y se inicia la electroforesis.

h) Cuando se emplean muestras celulares, o soluciones proteicas que tiendan a precipitarse a este pH o agregarse, es conveniente solubilizarlos al menos 2 h antes con las siguientes soluciones:

1. Solución para solubilizar proteínas.

Urea 9 M	5.4 g/10 ml
Tritón X-100 al 4 %	0.4 ml/10 ml
2-mercaptoetanol al 2 %	0.2 ml/10 ml
Mezcla de anfolinas al 2 %	0.2 ml/10 ml

(del intervalo que se desee)

Se filtra en 0.45 μ m y se almacena a 4°C.

2. Solución de lisis para extractos celulares.

Urea 9.5 M	5.7 g/10 ml
Nonidet P-40 (ó Tritón x-100) al 2 %	0.2 ml/10 ml
Mezcla de anfolinas al 2 %	0.2 ml/10 ml
2-mercaptoetanol al 2 %	0.5 ml/10 ml

Se filtra en 0.45 μ m y se almacena congelada en alícuotas.

i) Terminada la corrida los geles pueden almacenarse (-70°C), o equilibrarse y acoplarse inmediatamente a geles para SDS-PAGE (2a. dimensión).

j) Para equilibrarlo, el gel se coloca sobre una espátula acanalada, se baña con la solución de transferencia por 10 min a 4°C. Se descarta la solución y el gel se coloca sobre un trozo de Parafilm.

k) En geles prácticamente idénticos a los empleados para el sistema de SDS-PAGE, a excepción sólo del empleo de un peine con una gran carril central (14 cm), y uno pequeño lateral, se coloca el gel equilibrado. El uso de una placa de vidrio interna con bisel, permite una más fácil adición del gel delgado. El gel, con ayuda de una espátula, se resbala entre los dos vidrios del molde del gel de la 2a. dimensión. Se coloca encima del gel concentrador, dentro del carril principal, se evita introducir burbujas de aire. Se adiciona el amortiguador superior hasta llenar el espacio entre los vidrios.

1) Este sistema se acopla a la cámara Protean II (Bio Rad), y se inicia la electroforesis según las condiciones indicadas para SDS-PAGE.

3) Observaciones.

1. Debido a las características de estos geles, cobran gran importancia la presencia de burbujas; es por eso, que es prioritario desgasificar por bastante tiempo. Igualmente, el modo de aplicación de la solución del monómero debe ser lo más cuidadoso posible.

2. Hay que tener presente, cuando se está aplicando la solución de monómeros, que la polimerización es relativamente rápida (aproximadamente 10 min) por lo que cada aplicación tiene que ser, además de cuidadosa, rápida.

3. Para la electroforesis, se eligen los geles que no presente burbujas, y se acoplan a la cámara de Protean II; es por eso que en general, es recomendable preparar algunos geles de más.

4. Una vez terminado el isoelectroenfoco (1a. dimensión), los geles son desalojados, de los tubos de vidrio, al añadir agua entre el gel y el vidrio lentamente (con una aguja larga y delgada). Esta labor requiere práctica. También es posible sacar los geles si se aplica presión en alguno de los extremos del gel, por ejemplo con aire, aunque esto requiere precaución.

5. Con el equipo aquí empleado sólo es posible realizar la 2a dimensión de 2 geles de manera simultánea.

APENDICE B
METODOS DE TINCION

I. TINCION CON AZUL DE COOMASSIE R-250.

1) Reactivos.

Solución para teñir. Azul brillante de Coomassie R-250 0.02 %, 25 % de isopropanol y 10 % de ácido acético. Para 100 ml de solución: 20 mg de azul de Coomassie se disuelven en 25 ml de isopropanol puro, se lleva a 80 ml con agua desionizada; se agregan 10 ml de ácido acético puro, y finalmente, se ajusta a 100 ml con agua. La solución se agita al menos por 15 min antes de emplearla.

Solución para desteñir. Solución de isopropanol al 10 % y ácido acético al 10 %. Para 100 ml de solución: 10 ml de isopropanol puro se lleva a un volumen de 80 ml con agua desionizada, se añade 10 ml de ácido acético, y se termina de ajustar a 100 ml con agua.

2) Método.

En un recipiente preferentemente transparente, se coloca el gel. Se cubre con la solución para teñir. Se deja en la solución para teñir toda la noche. Una vez teñido el gel, se lava varias veces con la solución de isopropanol:ácido acético, hasta el grado de destinción deseado. Finalmente el gel se almacena en agua.

3) Observaciones.

1. Constituye un método de detección de proteínas muy fácil y altamente reproducible, aunque no es extremadamente sensible (1 a 2 µg de proteína).

2. La velocidad de tinción se puede incrementar mediante agitación rotatoria (2 a 3 hrs son suficientes), o además calentando (70 a 100°C el gel en la solución para teñir, con el recipiente tapado (30 a 60 min).

3. Igualmente, para disminuir el tiempo necesario de destinción (o número de lavados), el gel puede agitarse rotatoriamente y/o calentarse en la solución para desteñir.

II. TINCION CON PLATA (BIO RAD).

1) Reactivos.

Solución fijadora 1. Metanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) en agua desionizada. Para 100 ml: 40 ml de metanol puro se llevan a 80 ml con agua, se añaden 10 ml de ácido acético, y se ajusta a 100 ml con agua.

Solución fijadora 2. Etanol al 10 % (v/v) y ácido acético al 5 % (v/v) en agua desionizada. Para 100 ml: 10 ml de etanol se llevan a 80 ml con agua, se añaden 10 ml de ácido acético, y se ajusta a 100 ml con agua.

Solución oxidante. Se diluye 10 veces la solución oxidante concentrada (dicromato de potasio y ácido nítrico) con agua desionizada (preferentemente menor de 1 μ mho de conductividad). Para 100 ml: 10 ml de solución concentrada se diluye hasta 100 ml con agua. Se prepara fresca cada vez.

Solución de plata. Se diluye 10 veces la solución de plata concentrada (nitrato de plata) con agua desionizada (menor de 1 μ mho de conductividad). Para 100 ml: 10 ml de la solución concentrada se diluye a 100 ml con agua.

Solución para revelar. Se disuelven 32 g de polvo (carbonato de sodio y paraformaldehído) por litro de agua desionizada. Para 100 ml: se pesa 3.2 g de polvo y se disuelven en 100 ml de agua. Se puede almacenar la solución por un mes a temperatura ambiente.

Solución de ácido acético. Acido acético al 5 % en agua desionizada. Para 100 ml: a 80 ml de agua se agregan 5 ml de ácido acético puro y se ajusta a 100 ml con agua.

2) Método.

Según el grosor del gel, se lava en las diferentes soluciones de acuerdo al siguiente protocolo:

Reactivos	Duración		
	< 0.5 mm	0.5 mm a 1 mm	> 1 mm
1. Fijador 1.	30 min	30 min	60 min
2. Fijador 2.	15	15	30
3. Fijador 2.	15	15	30
4. Sol. oxidante.	3	5	10
5. Agua desionizada	-	5	10
6. Agua desionizada	-	5	10
7. Agua desionizada	-	-	10
8. Sol. plata	15	20	30
9. Agua desionizada	-	1	2
10. Sol. para revelar	Aproximadamente 30 seg o cuando se aprecie un precipitado pardo.		
11. Sol. para revelar	5 min	5 min	5 min
12. Sol. para revelar	-	5	5
13. Sol. ac. acético	5	5	5
14. Almacenar en agua.			

3) Observaciones.

1. La presente técnica corresponde al método de empleo rutinario del estuche de tinción con nitrato de plata de Bio Rad. Constituye una técnica muy sensible (detecta hasta decenas de nanogramos), muy práctica y bastante reproducible, con un poco de experiencia y con los reactivos en condiciones óptimas (almacenado a 4°C el equipo dura hasta 1 año funcional).

2. Es importante realizar todos los pasos del protocolo a temperatura ambiente y con agitación constante. Igualmente, es necesario manipular el gel con guantes.

3. Los tiempos de fijación corresponden a los tiempos mínimos, por lo que pueden modificarse según las conveniencias. Cuando un gel se va a teñir otro día, es preferible almacenarlo en la solución fijadora 1. Para geles con sustancias que interfieran con la tinción (anfólinas, glicerol, 2-mercaptoetanol, etc), es recomendable lavar por el doble de tiempo en la solución fijadora 1 e incluso renovar al menos una vez la solución.

4. El revelado depende principalmente de la concentración de proteínas, por lo que hay variación en los tiempos arriba indicados de revelado; es por eso, que se recomienda seguir el transcurso del revelado sobre una fuente de luz (negatoscopio), y detener la reacción (se descarta la solución para revelar y se añade la solución de ácido acético) al alcanzar el grado de tinción deseado.

5. En caso de sobretinción, se puede agregar Rapid Fixer (Kodak) al 30 % en agua, para disminuir el color del fondo, y cuando se alcanza el nivel de tinción deseado se lava abundantemente con agua el gel.

III. TINCION CON NEGRO AMIDO.

1) Reactivos.

Solución de negro amido. 0.1 % de negro amido, 10 % de ácido acético y 45 % de metanol. Para 100 ml: 100 mg de negro amido se solubilizan en 45 ml de metanol puro, se diluye con agua desionizada a un volumen de 80 ml, se agrega 10 ml de ácido acético, y finalmente se lleva a 100 ml con agua.

Solución para desteñir. 90 % de metanol y 2 % de ácido acético. Para 100 ml: a 90 ml de metanol puro se añaden 2 ml de ácido acético puro y se lleva a 100 ml con agua desionizada.

2) Método.

a) Una vez terminada la electrotransferencia a papel de nitrocelulosa, la porción que se desea teñir con negro amido (principalmente marcadores de PM) se coloca en un recipiente adecuado al tamaño del papel.

b) Se agrega la solución de negro amido, y se baña la nitrocelulosa durante 3 a 5 min, en agitación rotatoria continua.

c) Pasado este tiempo, se cambia la solución de negro amido por la solución para desteñir. Se realizan varios lavados rápidos y con agitación rotatoria con la solución para desteñir, hasta conseguir la tinción deseada.

d) Se almacena el papel en agua o puede secarse entre dos papeles filtro.

3) Observaciones.

1. Constituye una técnica rápida, simple y con buen grado de sensibilidad (semejante a la tinción con Coomassie). Además resulta adecuada para la tinción de proteínas fijas a soportes, como la nitrocelulosa.

2. Se debe tener cuidado en no sobrepasar el tiempo de tinción, pues posteriormente resulta difícil desteñir completamente el fondo.

3. El tiempo total de destinción debe ser corto (menos de 15 min), ya que a tiempos mayores, se inicia la degradación del papel de nitrocelulosa.

1) Equipo.

Cámara de Transferencia (Trans Blot, Bio Rad)
Cassette
Dos hojas de fibra o esponja
Papel de nitrocelulosa (0.45 μ m)
Papeles filtro grueso o delgados (según corresponda)
Palangana grande
Tubo de ensayo
Amortiguador de transferencia (ver Materiales y Métodos)
Fuente de poder Modelo 250/2.5 (Bio Rad)

2) Método.

a) Una vez terminada la electroforesis, el gel se enjuaga con agua y se deja incubando con la solución de transferencia por al menos 30 min.

b) El cassette se abre y la hoja de plástico que quedará del lado catódico (polo negativo) se coloca en el fondo de la palangana con solución de transferencia. La hoja que quedará del lado anódico (polo positivo) se recarga en la pared del recipiente.

c) Sobre la hoja de plástico del cassette se coloca una fibra (Scotch Brite) empapada en solución de transferencia (la fibra se usa solamente con geles de 1.5 mm de grosor en adelante). Para geles menores de 1.5 mm de grosor se coloca una esponja (de aproximadamente 1 cm), también empapada en la solución de transferencia.

d) Sobre la fibra húmeda, se coloca una hoja de papel filtro absorbente (Bio Rad) empapado en solución de transferencia. Para geles delgados (menores de 1 mm de grosor), se usan varias (al menos 2) hojas de papel filtro delgado (tipo Whatman # 1).

e) Se coloca el gel sobre el papel absorbente, se tiene cuidado de que no queden burbujas de aire atrapadas.

f) Se satura una hoja de nitrocelulosa (cortada de acuerdo al tamaño del gel) con solución amortiguadora. Esto se hace por capilaridad para evitar que queden burbujas de aire atrapadas en la matriz del papel. Ahora, se coloca la hoja de nitrocelulosa sobre el gel, se empieza por el centro y se oprime hacia los extremos, para evitar burbujas de aire entre ellos. Con un tubo de ensayo limpio se desliza sobre la hoja de nitrocelulosa, para eliminar las posibles burbujas atrapadas.

g) Se cubre la nitrocelulosa con otra hoja de papel filtro absorbente (u hojas delgadas) empapada en solución de transferencia.

h) Se coloca otra hoja de fibra (o esponja), empapada.

i) Se cierra el cassette doblando la hoja de plástico que quedara en el lado anódico.

j) Se coloca el "sandwich" en la cámara de electrotransferencia, se tiene cuidado de que quede en la orientación adecuada (gel: polo negativo; nitrocelulosa: polo positivo). Se agrega la solución de transferencia a la cámara, teniendo cuidado que cubra los electrodos o al menos 2 cm por encima del gel. Se coloca un agitador magnético en el fondo de la cámara, y se mantiene una agitación suave y constante.

k) Se tapa la cámara, se conecta a la fuente de poder, y se inicia la electrotransferencia.

3) Observaciones.

1. Es necesario que al menos al manejar el gel y la hoja de nitrocelulosa, se empleen guantes. Igualmente, hay que tener cuidado en el manejo de la nitrocelulosa pues es frágil.

2. Para geles delgados (menores de 1 mm de grosor) empleados principalmente en IEF (soportados por una placa de vidrio), es recomendable efectuar lo siguiente:

- i. Terminada la electroforesis, el gel (apoyado en la placa de vidrio) se equilibra en la solución de transferencia, durante ese tiempo, con una espátula se separa el gel del vidrio (con mucho cuidado).
- ii. Pasado el tiempo de equilibración, se levanta el gel (aún apoyado en la placa de vidrio), y sobre él se coloca una hoja de papel filtro absorbente delgado (empapado en la solución de transferencia). Con cuidado se da vuelta al gel, el cual ahora quedará apoyado sobre el papel. Se separa el gel de la placa de vidrio lentamente.
- iii. Se sobreponen (el gel y el papel filtro) a una capa de papel filtro premojado en la solución de transferencia (paso d. del protocolo arriba indicado). El gel debe quedar hasta arriba.
- iv. Se cubre el gel con la hoja de nitrocelulosa y se continúa con la técnica arriba indicada.

APENDICE D

DETERMINACION DE PROTEINAS

1) Reactivos.

Solución A. Solución de albúmina sérica bovina (BSA) para hacer la curva patrón [0.5 µg/µl]. Se pesan 500 µg de BSA y se diluye a 1 ml con agua.

Solución B. Solución de NaOH 1 N. Se pesan 4 g de NaOH y se disuelve en 100 ml de agua.

Solución C. Solución de Na₂CO₃ al 2 %. Se pesan 2 g de Na₂CO₃ y se disuelven en 100 ml de agua. Se almacena a temperatura ambiente.

Solución D. Tartrato de sodio y potasio al 2%. Se pesan 2 g de tartrato de sodio y potasio y se disuelve en 100 ml de agua. Se almacena a 4°C.

Solución E. CuSO₄ al 1 %. Se pesa 1 g de CuSO₄ y se disuelve en 100 ml de agua. Se almacena a 4°C.

Solución F. Se mezclan 9.8 ml de la solución C, 0.1 ml de la solución D y 0.1 ml de la solución E. Se prepara fresca cada vez.

Solución G. Reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 en agua desionizada.

2) Método.

a) Se colocan las muestras (5 a 30 µg) en tubos de vidrio (13 x 100 mm), en un volumen no mayor de 100 µl.

b) Se llevan todas las muestras a un volumen de 100 µl con agua.

c) Se prepara la curva patrón de acuerdo a la tabla, al menos por duplicado.

CURVA PATRON

tubo	BSA [µg]	Agua (µl)	Sol. A (µl)	Sol. B (µl)	Sol. F (µl)	Sol. G (µl)
A	0	100	0	100	900	100
B	5	90	10	100	900	100
C	10	80	20	100	900	100
D	20	60	40	100	900	100
E	30	40	60	100	900	100

- d) Se agregan 100 μ l de la solución B a cada tubo y se agita.
- e) Se incuba a temperatura ambiente, durante 10 min.
- f) Se agregan 900 μ l de la solución F a cada tubo, y se agita rápidamente.
- g) Se agregan 100 μ l de la solución G, y se agita inmediatamente.
- h) Se incuba durante 30 min a temperatura ambiente.
- i) Se lee en celdillas de plástico o vidrio, a 750 nm (filtro rojo).
- h) Cuando la cantidad de proteína es mayor de 30 μ g, se lee a 660 nm (para evitar perder la linealidad de la curva).
- j) La curva patrón resulta al restar el valor del blanco (sin proteína) al valor promedio obtenido para cada concentración. Por mínimos cuadrados es posible ajustarlo a una línea recta.
- k) La concentración de proteína de las muestras se obtiene interpolando, en la curva patrón, los resultados obtenidos para las muestras.

3) Observaciones.

1. Este método está basado en la técnica de microanálisis de Lowry (108), así como en las modificaciones hechas por Hartree (107). Esta técnica teóricamente se basa en la reacción del cobre en condiciones alcalinas con la proteína (tirosina y aminoácidos aromáticos principalmente). La proteína tratada con cobre, entonces reduce al reactivo fosfotúngstico-fosfomolibdico y se genera el color azul. El nivel de coloración es directamente proporcional a la concentración de proteína.

2. Esta técnica resulta extremadamente sencilla y reproducible; y tiene una buena linealidad entre 2.5 y 30 μ g de proteína, es por eso que se aconseja ajustar las muestras a concentraciones cercanas a este intervalo.

3. Es muy importante agitar inmediatamente después de añadir a la muestra la solución G para permitir que la reducción del reactivo fosfotúngstico-fosfomolibdico sea con la mayor cantidad posible de proteína tratada con cobre.

BIBLIOGRAFIA

1. Weigent, D. A. and Blalock, E. 1987. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol. Rev.* 100: 79-108.
2. Ackerknecht, E. H. 1945. El metabolismo y la respiración: de Erasistrato a Lavoisier. *Actas CIBA* 9: 230-241.
3. Ackerknecht, E. H. 1945. El metabolismo: de Liebig a la época actual. *Actas CIBA* 9: 242-252.
4. Anderson, E. and Haymaker, W. 1974. Breakthroughs in hypothalamic and pituitary research. *Prog. Brain Res.* 41:1-60.
5. Valverde-R, C., Arámburo, C. y Bayón, A. 1988. Neuroendocrinología y comunicación intercelular. Teorías y hechos sobre la vida. Vol. II Sistemas Vivos (J. Muñoz comp.). Soc. Mex. C. Fisiol.- SEP, Mexico. pp. 139-175.
6. The pituitary gland and its neuroendocrine control. Part 2. 1974. Handbook of physiology. Section 7. Endocrinology. Vol. IV (R.O. Greep, E. B. Astwood, E. Knobil and W. H. Sawyer, eds.). American Physiological Society, Washington, D. C. p. 601.
7. Combarrous, Y. 1988. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod. Nutr. Develop.* 28: 211-228.
8. Nielsen, J. H. 1982. Effects of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on insulin content and release, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. *Endocrinology* 110: 600-605.
9. Albertsson, W. K., Eden, S. and Isaksson, O. 1980. Analysis of early responses to growth hormone on amino acid transport and protein synthesis in diaphragms of young normal rats. *Endocrinology* 106: 291-297.
10. Harvey, S., Scanes, C. G. and Howe, T. 1977. Growth hormone effects in vitro metabolism of avian adipose and liver tissue. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33: 322-328.
11. Schaffer, W. T. 1985. Effects of growth hormone on lipogenic enzyme activities in cultured rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 248: E719-E725.
12. Chawla, R. K., Parks, J. S. and Rudman, D. 1983. Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Ann. Rev. Med.* 34: 519-547.

13. Etherton, J. D., Evock, C. M. and Kensinger, R. S. 1987. Native and recombinant bovine growth hormone antagonize insulin action in cultured bovine adipose tissue. *Endocrinology* 121: 699-703.
14. Paladini, A. C., Peña, C. and Retegui, L. A. 1979. The intriguing nature of the multiple actions of growth hormone. *TIBS* 4: 256-260.
15. Paladini, A. C., Peña, C. and Poskus, E. 1983. Molecular biology of growth hormone. *CRC Critical Rev. Biochem.* 15: 25-56.
16. Arámburo, C., Carranza, M., Sánchez, R. and Ferera, G. 1989. Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76.
17. Roupas, P. and Herington, A. C. 1987. Receptor-mediated endocytosis and degradative processing of growth hormone by rat adipocyte in primary culture. *Endocrinology* 120: 2158-2165.
18. Roupas, P. and Herington, A. C. 1989. Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61: 1-12.
19. Asakawa, K., Hedo, J. A., McElduff, A., Rouiller, D. G., Water, M. J. and Gordon, P. 1986. The human growth hormone receptor of cultured human lymphocytes. *Biochem. J.* 238: 379-386.
20. Golander, A., Binderman, J., Kaye, A. M., Nimrod, A. and Somjen, D. 1986. Stimulation of creatine kinase activity in rat organs by human growth hormone in vivo and in vitro. *Endocrinology* 118: 1966-1970.
21. Maddaiah, V. T. and Clejan, S. 1986. Growth hormone and liver mitochondria time course of effects on respiration and fatty acid composition in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 119: 250-252.
22. Clejan, S. and Schulz, H. 1986. Effect of growth hormone on fatty acid oxidation: growth hormone increases the activity of 2,4-dienoyl-CoA reductase in mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 820-828.
23. Hynes, M. A., Van Wyk, J. J., Brooks, P. J., D'Ercole, A. J., Jansen, M. and Lund, P. K. 1987. Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.* 1: 233-242.

24. Mathews, L. S., Norstedt, G. and Palmiter, R. D. 1986. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9343-9347.
25. Doglio, A., Dani, C., Grimaldi, P. and Ailhaud, G. 1986. Growth hormone regulation of expression of differentiation-dependent genes in preadipocyte Ob1771 cells. Biochem. J. 238: 123-129.
26. Green, H., Morikawa, M. and Nixon, T. 1985. A dual effector theory of growth hormone action. Differentiation 29: 195-198.
27. Haeuptle, M.-T., Aubert, M. L., Djiane, J. and Kiaehenbuhl, J. P. 1983. Binding sites for lactogenic and somatogenic hormones from rabbit mammary gland and liver. J. Biol. Chem. 258: 305-314.
28. Barnard, R., Bundesen, P. G., Rylatt, D.B. and Waters, M. J. 1985. Evidence from the use of monoclonal antibody probes for structural heterogeneity of the growth hormone receptor. Biochem. J. 231: 459-468.
29. Smith, W. C. and Talamantes, F. 1987. Identification and characterization of a heterogeneous population of growth hormone receptors in mouse hepatic membranes. J. Biol. Chem. 262: 2213-2219.
30. Thomas, H., Green, J., Wallis, M. and Aston, R. 1987. Heterogeneity of growth hormone receptors detected with monoclonal antibodies to human growth hormone. Biochem. J. 243: 365-372.
31. Ashkenazi, A., Vogel, T., Barash, I., Hadari, D., Levanon, A., Gorecki, M. and Gertler, A. 1987. Comparative study of in vitro and in vivo modulation of lactogenic and somatotrophic receptors by native human growth hormone and its modified analog prepared by recombinant deoxyribonucleic acid technology. Endocrinology 121: 414-419.
32. Hughes, J. P. and Friesen, H. G. 1985. The nature and regulation of the receptors for pituitary growth hormone. Ann. Rev. Physiol. 47: 469-482.
33. Gorin, E. and Goodman, H. M. 1984. Covalent binding of growth hormone to surface receptors on rat adipocytes. Endocrinology 114: 1279-1286.
34. Gorin, E. and Goodman, H. M. 1985. Turnover of growth hormone receptors in rat adipocytes. Endocrinology 116: 1796-1805.
35. Isaksson, D. G., Eden, S. and Jansson, J. O. 1985. Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. Ann. Rev. Physiol. 47: 483-499.

36. Li, C. H. and Graf, L. 1974. Human pituitary growth hormone: isolation and properties of two biologically active fragments from plasmin digests. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1197-1201.
37. Lewis, U. J., Singh, R. N. P., Tutwiler, G. F., Sigel, M. E., VanderLaan, E. F. and VanderLaan, W. F. 1980. Human growth hormone: a complex of proteins. *Rec. Prog. Horm. Res.* 36: 477-508.
38. Ng, F. M. and Bornstein, J. 1978. Hyperglycemic action of synthetic C-terminal fragments of human growth hormone. *Am. J. Physiol.* 234: E521-E526.
39. Nicoll, C. S., Mayer, G. L. and Russell, S.M. 1986. Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr. Rev.* 7: 169-203.
40. Lewis, U. J., Pence, S. J., Singh, R. N. P. and VanderLaan, W. P. 1975. Enhancement of the growth promoting activity of human growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 617-630.
41. Graf, L., Li, C. H. and Jibson, M. D. 1982. Human somatotropin. Selective removal with trypsin of residues 135-145 from the hormone molecule with no loss of biological activities. *J. Biol. Chem.* 257: 2365-2373.
42. Doneen, B. A., Bern, H. A. and Li, C. H. 1977. Biological actions of human somatotrophin and its derivatives on mouse mammary gland and teleost urinary bladder. *J. Endocr.* 73: 377-383.
43. Singh, R. N. P., Seavey, B. K., Rice, V. P., Lindsey, T. T. and Lewis, U. J. 1974. Modified forms of human growth hormone with increased biological activities. *Endocrinology* 94: 883-891.
44. Wieser, D. B., Malgieri, J. A., Ward, W. F., Painter, R. H. and Fain, J. N. 1974. Effects of bovine growth hormone preparation, fragments of growth hormone and pituitary anti-insulin peptide on lipolysis and glucose metabolism of isolated fat cells and adipose tissue. *Endocrinology* 95: 206-212.
45. Lewis, U. J., Singh, R. N. P., VanderLaan, W. F. and Tutwiler, G. F. 1977. Enhancement of the hyperglycemic activity of human growth hormone by enzymic modification. *Endocrinology* 101: 1587-1603.
46. Reagan, C. R., Mills, J. B., Kostyo, J. L. and Wilhelmi, A. E. 1975. Isolation and characterization of fragments of human growth hormone produced by digestion with plasmin. *Endocrinology* 96: 625-631.

47. Mills, J. B., Kostyo, J. L., Reagan, C. R., Wagner, S. A., Moseley, M. H. and Wilhelm, A. E. 1980. Fragments of human growth hormone produced by digestion with thrombin: chemistry and biological properties. *Endocrinology* 107: 391-399.
48. Levine, L. S., Sonenberg, M. and Yamasaki, N. 1973. Metabolic effects in children of a 37 amino acid fragment of bovine growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37: 607-615.
49. Lewis, U. J. 1984. Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Ann. Rev. Physiol.* 46: 33-42.
50. Hart, I. C., Blake, L. A., Chadwick, P. M. E., Payne, G. A. and Simmonds, A. D. 1984. The heterogeneity of bovine growth hormone. *Biochem J.* 218: 573-581.
51. Scanes, C. G. 1986. Pituitary gland. Avian Physiology. 4th edition (P. D. Sturkie ed.). Springer-Verlag, USA. pp. 383-402.
52. Ferguson, K. A. and Wallace, A. L. C. 1963. The characterization of pituitary hormones by starch gel electrophoresis. *Rec. Prog. Horm. Res.* XIX: 1-55.
53. Keutmann, H. T., Johnson, L. and Ryan, R. J. 1985. Evidence for a conformational change in deglycosylated glycoprotein hormones. *FEBS Lett.* 185: 333-338.
54. Ryan, R. J., Keutmann, H. T., Charlesworth, M. C., McCormick, D. J., Milius, R. P., Calvo, F. D. and Vutyavanich, T. 1987. Structure-function relationships of gonadotropins. *Rec. Prog. Horm. Res.* 43: 383-429.
55. Shah, G. N. and Hymer, W. C. 1989. Prolactin variants in rat adenohypophysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61: 97-107.
56. Dettling, W. S., Tuazon, P. T., Traugh, J. A. and Walker, A. M. 1986. Phosphorylation of prolactin. *J. Biol. Chem.* 261: 1649-1652.
57. Lewis, U. J., Singh, R. N. P., Lewis, L. J., Seavey, B. K. and Sinha, Y. N. 1984. Glycosylated ovine prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 385-389.
58. Lewis, U. J., Singh, R. N. P., Sinha, Y. N. and VanderLaan, W. P. 1985. Glycosylated human prolactin. *Endocrinology* 116: 359-363.
59. Markoff, E., Sigel, M. B., Lacour, N., Seavey, B. K., Friesen, H. G. and Lewis, U. J. 1988. Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* 123: 1303-1306.

60. Clapp, C., Sears, P. S., Russell, D. H., Richards, J., Levay-Young, B. K. and Nicoll, C. S. 1988. Biological and immunological characterization of cleaved and 16 K forms of rat prolactin. *Endocrinology* 122: 2892-2898.
61. Seeburg, P. H. 1982. The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* 1: 239-249.
62. Miller, W. L. and Eberhardt, N. L. 1983. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* 4: 97-130.
63. Hirt, H., Kimelman, J., Birnbaum, M. J., Chen, E. Y., Seeburg, P. H., Eberhardt, N. L. and Barta, A. 1987. The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations. *DNA* 6: 59-70.
64. Cooke, N. E., Ray, J., Emery, J. G. and Liebhaber, S. A. 1988. Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 9001-9006.
65. Howland, D. S., Farrington, M. A., Taylor, W. D. and Hymer, W. C. 1987. Alternative splicing model for the synthesis and secretion of the 20 Kd form of rat growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147: 650-657.
66. Mondon, C. E., Reaven, G. M., Ling, N., Lewis, U. J. and Frigeri, L. G. 1988. Amino-terminal peptide of growth hormone enhances insulin action in normal rats. *Endocrinology* 123: 827-833.
67. Lecomte, C. M., Renard, A. and Martial, J. A. 1987. A new natural hGH variant - 17.5 Kd - produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. *Nucleic. Acid. Res.* 15: 6331-6348.
68. Gordon, F., Hendricks, C. M. and Roth, J. 1973. Evidence for "big" and "little" components of human plasma and pituitary growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36: 173-184.
69. Stolar, M. W. and Baumann, G. 1986. Big growth hormone forms in human plasma: immunochemical evidence for their pituitary origin. *Metabolism* 35: 75-77.
70. Lewis, U. J., Peterson, S. M., Bonewald, L. F., Seavey, B. K. and VanderLaan, W. P. 1977. A interchain disulfide dimer of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 252: 3697-3702.

71. Becker, G. W., Bowsfrier, R. R., Mackellar, W. C., Poor, M. L. Tackitt, P. M. and Riggin, R. M. 1987. Chemical, physical, and biological characterization of a dimeric form of biosynthetic human growth hormone. *Biotech. Appl. Biochem.* 9: 478-487.
72. Relegui, L. A., Scaramal, L. O. and Paladini, A. C. 1987. Proteolytic modification of growth hormone by a rat kidney lysosomal protease. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 37: 521-532.
73. Yokoya, S. and Firesen, H. G. 1986. Human growth hormone (GH)-releasing factor stimulates and somatostatin inhibits the release of rat GH variants. *Endocrinology* 119: 2097-2105.
74. Davis, R. B., Morris, J. and Ivarie, R. 1987. The polypeptide P16 is a carboxy terminal cleavage product of rat growth hormone in anterior pituitary and GH₃ pituitary tumor cells. *Mol. Endocrinol.* 1: 102-108.
75. Sinha, Y. N. and Lewis, U. J. 1986. A lectin-binding immunoassay indicates a possible glycosylated growth hormone in the human pituitary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140: 491-497.
76. Sinha, Y. N. and Jacobse, B. P. 1987. Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 1368-1375.
77. Berghman, L. R., Lens, P., Decuypere, E., Kuhn, E. R. and Vandersande, F. 1987. Glycosylated chicken growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68: 408-414.
78. Liberti, J. P., Antoni, B. A. and Chlebowski, J. F. 1985. Naturally-occurring pituitary growth hormone is phosphorylated. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 713-720.
79. Baldwin, G. S., Grego, B., Hearn, M. T. W., Knesel, J. A., Morgan, F. J. and Simpson, R. J. 1983. Phosphorylation of human growth hormone by the epidermal growth factor-stimulated tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5276-5280.
80. Liberti, J. F. and Joshi, G. S. 1986. Secretion of phosphorylated growth hormone by rat pituitary glands in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 806-812.
81. Arámburo, C., Donoghue, D., Montiel, J. L., Berghman, L. R. and Scanes, C. G. Phosphorylation of chicken growth hormone. *Life Sci.* (enviado a publicación, 1989).

82. Nicoll, C. S. and Licht, R. 1971. Evolutionary biology of prolactin and somatotrophins II. Electrophoretic comparison of tetrapod somatotrophins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 17: 490-507.
83. Wagner, G. F., Fargher, R. C., Brown, J. C. and McKeown, B. A. 1985. Further characterization of growth hormone from the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 60: 27-34.
84. Kawauchi, H., Maruyama, S., Yasuda, A., Yamaguchi, K., Shirabata, K., Kubota, J. and Hirano, T. 1986. Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* 244: 542-552.
85. Yasuda, A., Yamaguchi, K., Papkoff, H., Hirata, T. and Kawauchi, H. 1989. The complete amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle (*Chelonia mydas*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 242-251.
86. Kobayashi, T., Kikuyama, S., Yasuda, A., Kawauchi, H., Yamaguchi, K. and Yokoo, Y. 1989. Purification and characterization of bullfrog growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 417-424.
87. Farmer, S. W., Papkoff, H. and Hayashida, T. 1974. Purification and properties of avian growth hormones. *Endocrinology* 95: 1560-1565.
88. Harvey, S. and Scanes, C. G. 1977. Purification and radioimmunoassay of chicken growth hormone. *J. Endocr.* 73: 321-329.
89. Lai, P. H., Duyka, D. R., Souza, L. M. and Scanes, C. G. 1984. Purification and properties of chicken growth hormone. *IRCS Med. Sci.* 12: 1077-1078.
90. Leung, F. C., Taylor, J. E., Steelman, S. L., Bennett, C. D., Rodkey, J. A., Long, R. A., Serio, R., Weppelman, P. M. and Olson, G. 1984. Purification and properties of chicken growth hormone and the development of homologous radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56: 389-400.
91. Souza, L. M., Boone, T. C., Murdock, D., Langley, K., Wyupych, J., Fenton, D., Johnson, S., Lai, P. H., Everett, R., Hsu, R. Y. and Bosselman, R. J. 1984. Application of recombinant DNA technologies to studies on chicken growth hormone. *J. Exp. Zool.* 232: 465-473.
92. Ferera, J. G. 1989. Estudios comparativos de la hormona de crecimiento de pollo (cGH). Análisis de bioactividad de la GH bajo diferentes condiciones fisiológicas. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias. UNAM Mexico, D.F. p 130.

93. Pérez, F. M., Malamed, S. and Scanes, C. G. 1989. Growth hormone release from chicken anterior pituitary cells in primary culture: TRH and hpGRF synergy, protein synthesis, cyclic adenosine 3'5'monophosphate. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 12-20.
94. Harvey, S., Davison, T. F., and Chadwick, A. 1979. Ontogeny of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl (Gallus domesticus). *Gen. Comp. Endocrinol.* 39: 270-273.
95. Arámburo, C., Montiel, J. L., Perera, G., Navarrete, S. and Sánchez, R. Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH). Different bioactivities of cGH charge variants. *Gen. Comp. Endocrinol.* (en prensa, 1987).
96. Houston, B. and Goddard, C. 1988. Molecular isoforms of growth hormone in the chicken pituitary gland. *J. Endocr.* 116: 36-41.
97. Carranza, M. E. 1987. Purificación y caracterización bioquímica de la hormona de crecimiento (GH) hipofisiaria de pollo. Tesis de licenciatura de Biología, Facultad de Ciencias. UNAM Mexico, D.F. p. 102.
98. Burke, W. H., Licht, P., Papkoff, H. and Bona-Gallo, A. 1979. Isolation and characterization of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone from pituitary gland of the turkey (Meleagris gallopavo). *Gen. Comp. Endocrinol.* 37: 508-520.
99. Papkoff, H., Licht, P., Bona-Gallo, A., Mackenzie, D. S., Oelofsen, W. and Oosthuizen, M. M. J. 1982. Biochemical and immunological characterization of pituitary hormones from the ostrich (Struthio camelus). *Gen. Comp. Endocrinol.* 48: 181-195.
100. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
101. O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
102. Dunn, M. J. and Burghes, A. H. M. 1983. High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. I. Methodological procedures. *Electrophoresis* 4: 97-116.
103. Dunbar, B. S. 1985. Protein analysis using high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Laboratory methods manual for hormone action and molecular endocrinology. (W. T. Schrader and B. W. O'Malley, eds.). 9th edition. Houston Biological Assoc., Inc. pp. 1-35.

104. Hochstrasser, D. F., Harrington, M. G., Hochstrasser, A. C., Miller, M. J. and Meril, C. R. 1988. Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173: 424-435.
105. Andrews, A. T. 1986. *Electrophoresis. Theory and biochemical and clinical applications.* 2nd. Edition. Oxford University Press. p. 452.
106. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
107. Frey, M. D. and Radola, B. J. 1982. High resolution preparative isoelectrofocusing in layer of granulated gels. *Electrophoresis* 3: 216-226.
108. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
109. Hartree, E. F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric responses. *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
110. Arámburo, C., Sánchez, R., Fenton, B., Perera, G. y Valverde-R, C. Implementación de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la determinación de hormona de crecimiento de pollo (cGH). *Veterinaria Mex.* (en prensa, 1989).
111. Hall, F. R., Harvey, S. and Scanes, C. G. 1986. Control of growth hormone secretion in the vertebrates: a comparative survey. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A: 231-253.
112. Navarrete, S., Montiel, J. L., Sánchez, R. y Arámburo C. Identificación de hormona de crecimiento de pollo (cGH) glucosilada. J-065. XVII Congreso Nacional de la Soc. Mex. de Bioquímica, A. C. 6-11 nov, 1988. Oaxaca, Oax.