

4  
2ej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

Unidad Académica de los Ciclos Profesional  
y de Posgrado del C.C.H.

**"Identificación, Purificación y Caracterización Parcial de una Variante Glucosilada de la Hormona de Crecimiento de Pollo."**

T E S I S

que para obtener el Título de  
Licenciada en Investigación

Biomédica Básica

P r e s e n t a

**Sandra Navarrete Sandoval**

México, D. F.

Abril de 1990.

---

**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

Abreviaturas .....	1
Introducción .....	1
Hipófisis .....	2
Neurohipófisis .....	3
Adenohipófisis .....	3
Hormona de crecimiento .....	5
Planteamiento del problema .....	11
Objetivos .....	13
Materiales y Métodos .....	14
Material biológico .....	14
Reactivos .....	14
Anticuerpos .....	15
Extracción de proteínas hipofisiarias .....	15
Determinación de la concentración de proteínas .....	17
Purificación de glucoproteínas .....	17
Purificación de cGH glucosilada .....	18
Sistemas analíticos:	
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	19
Electroforesis en condiciones nativas (Tris-PAGE) .....	19
Isoelectroenfoque analítico (IEF) .....	19
Tinciones para geles .....	20
Electroforesis bidimensional .....	20
Electrotransferencia (ET) .....	20
Resultados .....	21
Extracción de proteínas hipofisiarias .....	21
Obtención de glucoproteínas (F3) .....	21
Purificación de cGH glucosilada .....	28
Caracterización electroforética .....	34
Discusión .....	40
Conclusiones .....	49

Apéndice 1. Determinación de la concentración de proteína .....	50
Apéndice 2. Cromatografías .....	51
Cromatografía en Con A - Sefarosa .....	51
Cromatografía de Inmunofinidad .....	52
Apéndice 3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	54
Apéndice 4. Tris-PAGE .....	56
Tris-PAGE en placa .....	56
Tris-PAGE en tubo .....	57
Apéndice 5. Isoelectroenfoque analítico (IEF) .....	59
Apéndice 6. Electroforesis en 2 dimensiones .....	61
Apéndice 7. Tinciones para geles .....	63
Apéndice 8. Electrotransferencia .....	64
Bibliografía .....	66

## ABREVIATURAS

aa	aminoácido(s)
Ac	anticuerpo(s)
ACTH	corticotropina
ADH	hormona antidiurética
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
cGH	hormona de crecimiento de pollo
CLIP	péptido similar a corticotropina
col(s)	colaboradores
Con A	Concanavalina A
Con A-HRP	Concanavalina A acoplada a peroxidasa de rábano
cPRL	prolactina de pollo
Cys	cisteína
ET	electrotransferencia
FSH	hormona estimulante del folículo
gcGH	Hormona de crecimiento de pollo glucosilada
GH	hormona de crecimiento
Gln	glutamina
Glu	ácido glutámico
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas

hGH	hormona de crecimiento humana
HEPES	ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HRP	peroxidasa de rábano
IEF	isoelectroenfoque
IET	inmuno-electrotransferencia
IGF	factor de crecimiento insulinoide
IgG	inmunoglobulina G
KIU	unidades de Kalicreína
LH	hormona luteinizante
βLPH	beta-lipotropina
γLPH	gamma-lipotropina
αMSH	alfa- hormona estimulante del melanocito
βMSH	beta- hormona estimulante del melanocito
γMSH	gamma- hormona estimulante del melanocito
oGH	GH ovina
OT	ocitocina
PAGE	electroforesis en geles de acrilamida
PBS	solución salina de fosfatos
pI	punto isoeléctrico
PM	peso molecular
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
POMC	pro-opiomelanocortina
PRL	prolactina
Rf	movilidad relativa
RIA	radioinmunoensayo
SDS	dodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en presencia de SDS

Ser	serina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiléndiamina
Thr	treonina
Tris	hidroximetilaminometano
Tris-PAGE	electroforesis en condiciones nativas
TSH	hormona estimulante de la tiroides
T 3	triyodotironina
T 4	tiroxina
VP	vasopresina

## INTRODUCCION

La comunicación es una función esencial para la supervivencia de los organismos. Las dos principales formas de comunicación orgánica son la química y la eléctrica, y la comunicación más simple se realiza de una célula a otra.

En la comunicación eléctrica, las superficies de las células forman juntas o uniones en uno o varios puntos con la ayuda de proteínas especiales, que dan lugar a las uniones estrechas o impermeables, desmosomas, etc. En el caso de las sinapsis eléctricas, sin embargo, las membranas están muy cercanas, pero sin llegar a juntarse (1).

En la comunicación química, las células comunicantes pueden estar muy lejos una de otra, y utilizan como mensajero a una molécula cuya naturaleza química puede ser muy diversa: aminoácido, péptido, derivado de colesterol, etc (1, 2). La célula emisora libera el mensajero al medio, y éste viaja hasta llegar a la célula receptora e induce su respuesta. Esta forma de comunicación es empleada por organismos unicelulares como *Dyctios-tellium discoideum*, cuando hay escasez de nutrientes, para agregarse, diferenciarse y producir esporas (1). En ocasiones, el mensajero se almacena en gránulos que liberan su contenido cuando es necesario (1, 2, 3).

El sistema nervioso utiliza una combinación de ambas formas de comunicación. Para comunicarse con otras, una neurona envía a lo largo de su axón un impulso eléctrico. Cuando el impulso llega a las terminales axónicas, provoca la liberación de varios gránulos secretorios, que llevan uno o más mensajeros químicos en su interior. Los mensajeros químicos, llamados neurotransmisores o neuromoduladores, a su vez, inducen una respuesta en la neurona adyacente. Esta respuesta es, casi siempre, la generación o inhibición de un impulso eléctrico (1, 3).

En organismos complejos, las células encargadas de producir mensajeros químicos frecuentemente se encuentran agrupadas en glándulas. Cada glándula secreta ciertos mensajeros u hormonas. Las glándulas que secretan sus productos hacia el torrente sanguíneo se llaman endócrinas; como ejemplo tenemos a la hipófisis, el páncreas y la tiroides. Las glándulas exócrinas secretan sus productos hacia afuera o hacia otro compartimiento corporal. Algunas glándulas exócrinas son el estómago y la glándula mamaria (3).

A este nivel, la comunicación no se hace obviamente de una célula a otra, sino de una población de células a otra, es decir, de tejido a tejido.



La comunicación mediada por mensajeros químicos puede tener varios niveles de complejidad, que dependen principalmente del número de mensajeros que intervienen. En la comunicación de primer orden, el producto secretado controla directamente una respuesta específica; por ejemplo, la permeabilidad y reabsorción de agua a nivel renal controlada por la ADH (hormona antidiurética). En la regulación de este tipo de comunicación, intervienen mecanismos de retroalimentación; para el ejemplo anterior, el volumen y la concentración de solutos en la sangre sería el mecanismo regulador.

En la comunicación de segundo orden, los productos secretados provocan a su vez la liberación de otra hormona por el órgano blanco. Tal es el caso de la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), que, liberada por el hipotálamo, viaja a la hipófisis e induce la secreción de las gonadotropinas LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona estimulante del folículo). En la regulación de este tipo de comunicación intervienen otras hormonas, por lo que es más compleja.

En los sistemas de comunicación de tercer orden, una hormona provoca la liberación de otra hormona que a su vez provoca la liberación de otra más. Un ejemplo de esto lo constituye el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides: el hipotálamo secreta TRH o tiroliberina, que en la hipófisis provoca la liberación de TSH o tirotrópina, que a su vez controla la producción y secreción de las hormonas tiroideas triyodotironina (T<sub>3</sub>) y tiroxina (T<sub>4</sub>). La regulación de este eje está dada por el equilibrio que establecen la TRH, que estimula a la hipófisis, y T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, que la inhiben (3).

Como se ve, los sistemas nervioso y endócrino no se ignoran entre sí, al contrario, se interrelacionan y hasta comparten mensajeros. Por ejemplo, ciertas estructuras cerebrales, como el hipotálamo, pueden secretar sus mensajeros hacia la sangre, y muchos mensajeros endócrinos, como la insulina, pueden alterar funciones neuronales (3, 4). Por eso, se cree que las células nerviosas y endócrinas tienen un origen embriológico común.

Por otro lado, el sistema inmune, así como tiene su conjunto de células especializadas, tiene un grupo de mensajeros químicos, y se ha demostrado que estos mensajeros inmunológicos pueden influenciar la liberación de hormonas y modificar las respuestas neuronales a ciertos neurotransmisores, así como algunos mensajeros neuroendócrinos alteran el comportamiento de células del sistema inmunitario. Entonces, el sistema neuroendocrino-inmunológico es el encargado de concertar y coordinar las funciones de las células de los seres vivos (5). Esto indica que la separación de este gran sistema en subsistemas es completamente arbitraria y que si bien ha permitido conocer muchas cosas, para llegar a comprenderlo, al sistema neuroendocrino-inmunológico debe tomársele como un todo.

## HIPOFISIS

Una de las glándulas endócrinas más complejas y activas es la glándula pituitaria o hipófisis. Está situada en la base del cráneo, dentro de una cavidad ósea del esfenoides llamada "silla turca". En los mamíferos, la glándula tiene 2 lóbulos, al posterior se le llama neurohipófisis y al anterior, adenohipófisis. La glándula hipófisis está conectada con el hipotálamo por el tallo hipofisiario, que es un haz de vasos y fibras que se originan en el hipotálamo y cuyas terminales forman la neurohipófisis. La adenohipófisis se origina de una evaginación del

ectodermo primitivo llamada Bolsa de Rathke, por lo que su origen embriológico es epitelial. Es por esto que a la hipófisis se le llama "glándula mixta", pues está constituida por elementos provenientes de dos estirpes celulares diferentes (2).

La hipófisis se comunica con el hipotálamo vía el sistema porta hipotalámico-hipofisiario, que consiste en un conjunto de vasos en el hipotálamo (llamados vasos portales largos) que desembocan en los capilares sinusoidales del lóbulo anterior. Es por medio de este sistema que los factores liberadores del hipotálamo llegan a la hipófisis y estimulan la síntesis y secreción de hormonas (2, 3).

### Neurohipófisis

En la neurohipófisis, constituida por terminales axónicas, se almacenan ocitocina (OT) y vasopresina (VP), también llamada hormona antidiurética (ADH). Estas hormonas son pequeños péptidos de 9 aa muy parecidos entre sí pues sólo difieren en 2 aa, por lo que se cree que se originaron por duplicación de un gen ancestral. La vasopresina ayuda a reducir la pérdida de agua por los riñones y aumenta la presión arterial. La ocitocina provoca la contracción del músculo uterino y de las células mioepiteliales de la glándula mamaria, provocando la evacuación de leche (2, 3).

### Adenohipófisis

La adenohipófisis se compone de 3 porciones: pars distalis, pars tuberalis y pars intermedia. Esta última queda entre la adenohipófisis y la neurohipófisis.

En la adenohipófisis hay varios tipos celulares, identificados por inmunohistoquímica, que se llaman de acuerdo al tipo de hormona que producen. Así, tenemos lactotropos (prolactina o PRL), somatotropos (somatotropina o GH), tirotropos (tirotrona o TSH), gonadotropos (hormona luteinizante o LH y hormona estimulante del folículo o FSH) y corticotropos (corticotropina o ACTH). En la pars intermedia se sintetizan 2 tipos de hormona estimulante del melanocito ( $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -MSH) (2).

En las aves, la pars intermedia no existe. En cambio, la pars distalis se divide en 2 lóbulos, el caudal y el cefálico. En el lóbulo caudal se encuentran mayoritariamente somatotropos, en el lóbulo cefálico hay tirotropos, lactotropos y corticotropos. Los gonadotropos se distribuyen en los dos lóbulos (6) (Fig 1).

Las hormonas sintetizadas por la adenohipófisis regulan una gran variedad de funciones. La PRL, por ejemplo, estimula la secreción de leche y modifica la conducta materna; en las aves, la PRL tiene que ver en la reproducción, la osmorregulación, en el metabolismo de carbohidratos y probablemente participe en la regulación del crecimiento y de otros procesos metabólicos (6). La ACTH estimula la secreción de las glándulas suprarrenales; la TSH provoca la liberación de hormonas tiroideas; las gonadotropinas (FSH y LH), provocan la secreción de hormonas esteroides y la diferenciación de gametos en las gónadas; la hormona de crecimiento

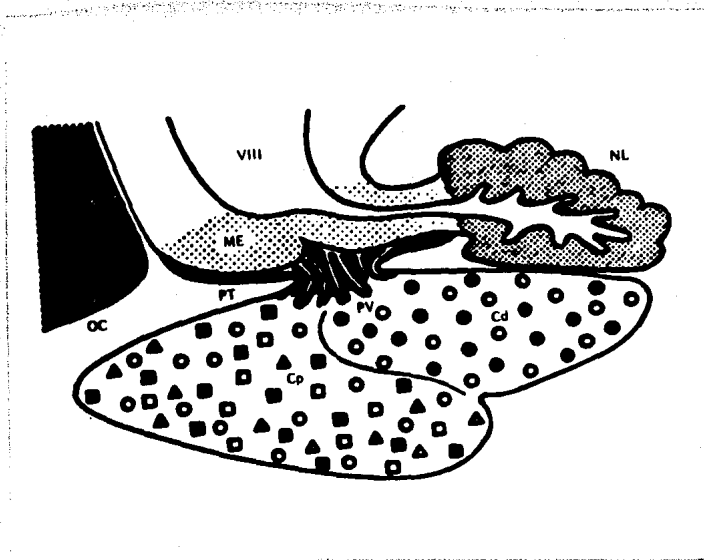


Fig. 1. Diagrama de la distribución de los distintos tipos celulares de la *pars distalis* de las aves. Abreviaturas: Cd, lóbulo caudal; Cp, lóbulo cefálico; ME, eminencia media; NL, lóbulo neural; OC, quiasma óptico PT, **pars tuberalis**; PV, vasos portales; VIII, tercer ventrículo. Símbolos: ● GH; ◌ LH/FSH; ■ ACTH; □ PRL; △ TSH. (Tomado de ref. 6)

(GH), como su nombre lo indica, ayuda al crecimiento tisular, además de participar en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (2, 6, 7).

### **Hormona de Crecimiento**

Como ya se mencionó, la GH o somatotropina se sintetiza y almacena en los somatotropos de la adenohipófisis. En las aves, constituye aproximadamente 10 % de la proteína hipofisiaria total (6). La GH es una proteína de 191 a 192 aa (aminoácidos), según la especie, y el PM (peso molecular) predicho por la secuencia de aa es de aproximadamente 22,000; por lo que a la forma más abundante de la hormona en varias especies se le llama "22 k". La GH tiene 2 puentes disulfuro, que hacen que la molécula forme dos asas, una grande y otra pequeña (7).

La GH se descubrió en 1921, cuando Long y Evans inyectaron extractos hipofisarios humanos a ratas hipofisectomizadas y observaron que éstas aumentaban de peso y tamaño. Esto demostraba la existencia de una "hormona del crecimiento" en la hipófisis (8).

Para estudiar a esta hormona se diseñaron y perfeccionaron técnicas de purificación, que generalmente incluyen el uso de varios cientos de glándulas, su homogeneización y la precipitación de proteínas a diferentes concentraciones de sales o con diversos solventes, como etanol y acetona. De esta manera, la primera GH que se obtuvo en forma pura fue la bovina, en 1945 (9). Recientemente, con la ayuda de la técnica del ADN recombinante, se ha clonado el gen de GH de varias especies en bacterias, y también así se pueden obtener grandes cantidades de la hormona pura (10).

Al comparar las GH purificadas de diferentes especies, se vió que aunque el PM predicho por la secuencia de aa era muy similar para todas ellas, en sistemas analíticos como electroforesis en SDS (SDS-PAGE) o filtración molecular, presentaban PM variables de 21 a 29 Kd (8). Estas discrepancias pueden deberse a la variabilidad de los sistemas analíticos empleados por diferentes grupos o a diferencias intrínsecas a las moléculas de GH, que se describirán más adelante.

Cuando se compararon las secuencias de aa de GH de diferentes especies, se encontró que son altamente similares entre sí. Además, la GH presenta un 85 % de similitud con el lactógeno placentario (PL, también llamado somatotropina coriónica o CS) y con la PRL (aproximadamente en un 35 %); de tal suerte que estas 3 hormonas constituyen una familia, pues se cree que evolucionaron a partir del mismo gen ancestral (8). Cada una de estas hormonas tiene un número parecido de aa (GH y PL, 191 a 192 aa; PRL 198 a 199 aa), más o menos la misma cantidad de puentes disulfuro (GH y PL, 2; PRL, 3), y los receptores para una reconocen a las otras aunque con diferente afinidad (8).

La GH participa en una gran cantidad de funciones, y no únicamente en aquella que le da nombre (ver tabla 1); y ejerce sus efectos a corto (efectos metabólicos) o a largo plazo (efectos lentos o hipertróficos). Los primeros generalmente incluyen la modificación de procesos metabólicos tales como lipólisis, incorporación de iones, aa o azúcares. El segundo tipo de efectos generalmente requiere síntesis *de novo* de ácidos nucleicos y proteínas (27, 28, 29).

-----  
 TABLA 1. Avances directos de la UN sobre temas  
 y temas aislados  
 -----

		Ref.
I. HUGADO		
	Perfusión	Síntesis de ADN (11) Síntesis de proteínas plasmáticas (12) Liberación de somatomedinas (13)
	Cultivo celular	Reproducción celular (14)
II. MÚSCULO		
	Diaphragma de rata	Transporte e incorporación de aa (15) Síntesis de ADN (16)
	Perfusión de corazón de rata	Transporte e incorporación de aa (17)
III. Tejido adiposo		
	Rata	Incorporación de aa (18) Lipólisis y antilipólisis (19)
	Pellic	Lipólisis (20)
IV. Cultivo de fibroblastos de humanos		Producción de somatomedinas (21)
V. Condrocitos de rata		Incorporación de sulfato (22) Síntesis de ADN
VI. Células hematopoiéticas en cultivo		
	Linfocitos de rata	Mitosis (23)
	Linfoblasto leucémico de humano	Incorporación de <sup>3</sup> H-timidina, <sup>3</sup> H-uridina y <sup>3</sup> H-leucina (24)
	Precursores eritrógenos humanos	Incorporación de <sup>3</sup> H-timidina (25)
VII. Hipotálamo de rata		Secreción de somatostatina (26)

-----  
 Tomado de (2), con modificaciones.

La GH puede funcionar directa o indirectamente, a través de un sistema de segundo orden, provocando la liberación de otra hormona, la somatomedina C o IGF-I (insulin-like growth factor I o factor de crecimiento insulinoide). Primero, la GH es reconocida por el hígado, y entonces éste libera IGF-I, que va a sus tejidos blanco a ejercer su acción (30, 31, 32).

Este efecto de la GH es el del crecimiento, pues se ha demostrado que durante la diferenciación de los condrocitos y los preadipocitos, la GH provoca la diferenciación de éstos, así como la liberación de IGF-I, que con su efecto mitogénico, da lugar a la expansión clonal de las células diferenciadas (33, 34); aunque otros autores reportan que la GH puede actuar directamente sobre los condrocitos, a los que induce a reproducirse (35).

Para otros de sus efectos, la GH funciona directamente, como es el caso de la lipólisis y la incorporación de glucosa por las células (27). Sin embargo, se han observado efectos antagónicos de la GH, sobre el mismo proceso metabólico, según el tiempo de incubación de la hormona sobre el tejido; es decir, se ha visto que puede aumentar la lipólisis o inhibirla. Por otra parte, puede incrementar la incorporación de glucosa (efecto insulinoide), también puede disminuirla (efecto diabetógeno) (27, 36).

Para explicar la multiplicidad de funciones y los efectos antagónicos de la GH, se han propuesto varias hipótesis:

1) Hormona "multidominio": Según esta propuesta, la GH estaría conformada por varios dominios estructurales, antigénica y funcionalmente diferentes, de tal suerte que cada uno tendría su receptor particular. De esta manera, con receptores repartidos en varios tejidos, cada uno con capacidad de reconocer un cierto dominio, se provocarían respuestas diferentes de cada tejido, lo que explicaría la multifuncionalidad de la hormona.

2) Hormona "modificada": Esta hipótesis propone que la hormona, al modificar su estructura, puede dar lugar a nuevas funciones. Estas modificaciones serían tales como multimerización, procesamiento proteolítico parcial, o adición de algún grupo químico, como fosfato, acetilo, carbohidrato, etc. Así, la GH no sería un sólo tipo de proteína, sino una familia completa de moléculas, que se originarían a partir de un precursor común, las cuales serían responsables de los diversos efectos de la GH.

3) Una combinación de las anteriores, que sería más probable.

Las hipótesis 2 y 3 se encuentran muy apoyadas por la evidencia obtenida hasta ahora. Incluso desde los años de 1950 y 60 se reconoció que la GH "pura" obtenida de mamíferos se resolvía en varios componentes en sistemas de electroforesis en almidón, Tris-PAGE o cromatografía. A éstos componentes se les llamó variantes o isohormonas (7, 8).

Inmediatamente, algunos grupos se dedicaron a caracterizar química y biológicamente a estas variantes. Se instrumentaron varios bioensayos para determinar la actividad hormonal, tales como el lactogénico, el de la ganancia de peso y la estimulación del cartílago de la tibia de ratas hipofisectomizadas (7,8).

Desde 1961, en geles de almidón se resolvieron 6 variantes, 4 mayoritarias y 2 minoritarias de la GH humana (hGH), las cuales presentaban actividad tanto somatotrópica como lactogénica (37). Sin embargo, en 1962 se corroboró que sólo los componentes mayoritarios tenían actividad somatotrópica (38).

Posteriormente, se aislaron 4 variantes de carga que presentaban el mismo PM. Tres de estas variantes, llamadas C, D y E, provenían de la digestión con plasmina de la variante B. Las variantes D y E, más ácidas, tuvieron mayor actividad en los bioensayos lactogénico y de la tibia (39).

Lewis y col (40), aislaron después por PAGE a cuatro variantes de la hGH nombradas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\beta$ ; cuyo comportamiento electroforético era similar a B, C, D y E, respectivamente. Al estudiar las variantes  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , se descubrió que eran el resultado de un procesamiento proteolítico limitado; a  $\alpha_2$  le faltaban los aa 135 a 140 y a  $\alpha_3$  los de 135 a 146. Esta región se localiza en el asa "grande" de la molécula. Todas las variantes fueron igualmente reconocidas por un RIA específico.

Después, se aisló una variante acetilada en el NH<sub>2</sub> terminal, que presenta actividad biológica e inmunológica. También, se encontraron formas desamidadas en el aa 152 (Asn---Asp) y 137 (Gln---Glu) (7,41).

En cuanto a la hormona de crecimiento de pollo (cGH), existe evidencia de que ésta también presenta variantes moleculares de carga. En sistemas de electroforesis no desnaturizante, se han detectado al menos 3 variantes, que muestran Rf de 0.23, 0.30 y 0.35; sin embargo, estas variantes presentan el mismo PM en SDS- PAGE: 26.3 kd (42, 43, 44). Además, se sabe que alrededor de la tercera parte de la cGH está fosforilada, hecho que podría contribuir a la heterogeneidad de carga (44).

Desde el punto de vista funcional, se ha demostrado que al menos las variantes 0.23 y 0.3 tienen distinta actividad sobre explantes de tejido adiposo de pollo: la variante 0.23 es lipolítica (incrementa la concentración de glicerol liberado al medio), mientras que la 0.3 tiene un efecto antilipolítico (inhibe la lipólisis inducida por glucagon) (20, 45, 46).

Por isoelectroenfoque, se identificaron hasta 10 variantes de cGH en homogeneizados frescos de hipófisis (45, 47), así como en preparaciones puras de la hormona (43, 45). Los pI de estas variantes iban desde 6.0 hasta 8.45, y aumentaban o disminuían los niveles de algunas de ellas según la edad de los pollos. (43, 45, 47).

La presencia de estas variantes se explica por las modificaciones postraduccionales de la GH 22 K. Sin embargo, existe otro tipo de variantes, no de carga, sino de masa, que pueden generarse de varias maneras:

1. Agregación de monómeros
2. Procesamiento proteolítico limitado
3. Diversidad genómica
4. Procesamiento diferencial del ARNm
5. Glucosilación

## 1. Agregación de monómeros

Con respecto a este caso, se ha demostrado que la GH puede existir como dímeros (45 k), tetrámeros (80 k) e incluso polímeros más grandes (100 k). En algunos bioensayos, estos oligómeros son más activos que la GH monomérica, por ejemplo el tetrámero de 80 k es de 100 a 200 veces más activo que la GH 22 k en el bioensayo de la tibia. Estos agregados se encuentran circulantes (7, 48, 49).

Una variante, llamada 24 k, tiene un corte proteolítico en la posición 139, en el asa grande. Esto provoca que se aumente el radio de Stokes de la molécula, y tenga un PM aparente mayor en geles de SDS-PAGE. (7).

En aves, también se ha visto la existencia de oligómeros, que pueden disociarse con mercaptoetanol en las condiciones reductoras de SDS-PAGE, aunque aparentemente también se encuentra un dímero resistente a la reducción, tanto en aves (45), como en otras especies (50, 51).

## 2. Procesamiento proteolítico limitado

El segundo mecanismo, el de la escisión de un segmento de aa, es empleado en casos bien conocidos para generar diferentes hormonas a partir de un mismo precursor, mediante cortes diferenciales. Tal es el caso de la POMC (pro-opiomelanocortina), que tiene incluidas en su estructura las secuencias de mensajeros más pequeños como la BLPH, ACTH y YMSH. A su vez, dentro de la BLPH están la  $\beta$ -endorfina, YLPH y BMSH; y dentro de la ACTH, se encuentran  $\alpha$ MSH y CLIP (2, 3).

También, se sabe que la PRL sufre un corte proteolítico en la hipófisis y en sus tejidos blanco (como la glándula mamaria) y genera un péptido de 16 kd que es biológicamente activo en los bioensayos de PRL y que es reconocido también por los receptores hepáticos, y aparentemente tiene funciones propias, no compartidas con la PRL (52).

En cuanto a la GH, se ha encontrado un producto que carece de un segmento en el extremo COOH, llamado P16 (PM 16 kd). Aparentemente, este P16 es más ácido que la GH 22 k, y el corte proteolítico se hace entre los residuos 152 y 156 (53).

Otros autores han probado que los péptidos sintéticos correspondientes también al extremo carboxi-terminal de la GH (residuos 172 en adelante) tienen acciones hiperglicémicas (54).

Por otro lado, se ha visto que los segmentos correspondientes al extremo amino-terminal de la GH pueden regular el metabolismo de los carbohidratos. El segmento 1 a 43 de la hGH es un potenciador del efecto de la insulina, pues incrementa la incorporación de glucosa estimulada por la insulina (55). Otros autores (56, 57) reportan que los aa 32 a 46 de la hGH y 32 a 45 de la rGH son suficientes para disminuir la secreción de glucosa por el hígado y aumentar el efecto de la insulina al facilitar la incorporación de glucosa en tejidos periféricos. Estos datos apoyan la hipótesis de la existencia de regiones o "dominios" que tienen alguna actividad biológica per se.



Así pues, la escisión de segmentos de la GH biológicamente activos parece jugar un papel importante en la multifuncionalidad de esta hormona.

### 3. Diversidad genómica

En los humanos, existen 2 genes para la hGH, el hGH-N ( normal) y el hGH-V (variable). Ambos genes, que se encuentran en la misma región del cromosoma 17; tienen 5 exones (denominados con números romanos del I al V) y 4 intrones (del A al D). El que se expresa en la hipófisis y da lugar a la GH 22 k y sus variantes, es el hGH-N (7,8,10). Sin embargo, algunos autores reportan que el gen hGH-V, que antes se creía un pseudogen, se expresa en la placenta, y ésta proteína aparece en el suero materno más o menos a la mitad del embarazo, y continúan aumentando los niveles hasta el parto (58).

También, se descubrió que tanto hGH como hPGH (producto del gen hGH-V) se unen a los mismos receptores hepáticos, aunque presentan algunos aa diferentes en la región 32 - 46 y hPGH es una proteína más básica (58).

Un estudio posterior (59), demostró que de hecho existen 2 especies de ARNm transcrito de hGH-V. Estas especies podrían dar lugar a variantes de hPGH.

### 4. Procesamiento diferencial del ARNm

La variante que se genera por este mecanismo es la llamada 20 k. Esta isohormona carece de los aa 32 a 46 correspondientes a la secuencia del monómero 22 k, y forma del 5 al 10 % del contenido de GH de las glándulas y tiene tendencia a dimerizarse (7, 10, 60).

Se cree que esta variante de GH se genera cuando en el transcrito primario, el segundo intrón se escinde unos residuos más de lo usual, llevándose consigo los nucleótidos del tercer exón que codifican para los aa 32 - 46, dejando un tercer exón truncado (10).

Esta variante presenta una actividad similar a la de 22 k en los ensayos somato y lactogénicos (7, 8). Se comporta comparablemente a la 22 k en el RRA (ensayo de radio-receptor) en linfocitos IM-9, pero presenta una unión menor en tejido adiposo, hígado y glándula mamaria (61 a 64).

La 20 k se ha encontrado en la circulación y aparentemente tiene una vida media más larga que la 22 k (65). También, se ha visto que carece de las propiedades insulinoideas de la 22 k, lo cual no es tan raro si se considera que los residuos 32 a 46 son responsables de esa actividad, y la 20 k no los tiene (10, 55).

Lecomte y cols (66), con estudios en una biblioteca genómica de ADNc de hipófisis, encontraron y clonaron 3 ADNc que codifican para la 22 k, la 20 k y una nueva especie de 17.5 k. Esta nueva variante carecería de 40 aa codificados por el tercer exón, y se generaría también por procesamiento diferencial en el extremo 3' del segundo intrón; pero no se ha encontrado todavía una variante de GH con estas características (66).

## 5. Glucosilación

La división clásica de las hormonas adenohipofisarias separa a éstas en holoproteínicas (GH, PRL) y las glucoproteínicas (TSH, FSH y LH). Por eso, la GH se consideró por mucho tiempo como una holoproteína. Sin embargo, desde 1984 se reportó la existencia de una fracción de PRL ovina que estaba glucosilada (67). Después, se demostró que tanto la PRL humana como la porcina también presentaban una cierta proporción de moléculas con carbohidratos (68, 69). Además, la forma glucosilada presentó menor actividad que la forma holoproteínica en varios bioensayos (69, 70). Después, se comprobó que también el PL bovino podía estar glucosilado (71).

El primer reporte concerniente a la existencia de una variante glucosilada de la hormona de crecimiento humana, fue hecho en 1986 (72), y al año siguiente (73), se descubrieron variantes glucosiladas de GH de rata y ratón, y se encontró que los niveles fisiológicos de estas variantes también se podían afectar por el cambio de ciertas condiciones como el sexo, la lactancia, la ovariectomía y por factores hormonales como progesterona y estradiol.

En las aves, el primer reporte de una variante glucosilada de la GH fue hecho por Berghman y col en el pollo (74). La existencia de esta variante fue establecida por inmunohistoquímica. Esta proteína presentó un PM mayor que el de la GH "normal", pero no fue caracterizada finamente.

Como se ve, la detección de este tipo de isohormonas fue muy importante, pues además de incrementar el número de miembros de la familia de la GH, conduce a reconsiderar la clasificación antigua de las hormonas hipofisarias.

### Planteamiento del problema

La historia de la neuroendocrinología, al igual que la del resto de las ciencias, nos muestra cómo, en pocos años, los conceptos y las ideas, por muy dogmáticos que sean, tienen que adaptarse a los nuevos descubrimientos.

Por ejemplo, inicialmente se concebía a la GH (de hecho a todas las hormonas) como una sola especie proteínica. Cuando se describió la heterogeneidad molecular de preparaciones puras de la GH, muchos investigadores atribuyeron este hecho a la hidrólisis de la hormona durante el proceso de purificación, y no fue sino hasta la detección *in vivo* de estas variantes cuando su existencia fue completamente aceptada.

Enseguida, algunos grupos de investigación se abocaron a estudiar las diferencias estructurales de las variantes, así como su actividad biológica, y de esta manera se logró correlacionar ciertas estructuras con determinadas funciones, como se dijo anteriormente.

También se logró determinar que las variantes o iso-hormonas diferían entre sí en alguna modificación postraduccional, tal como desamidación, fosforilación, etc (40, 41); pero no se consideraba que la glucosilación pudiera darse en la GH ni en las otras hormonas de su familia (PRL y PL).

Tiempo después, sin embargo, se detectó una fracción de PRL glucosilada (67), y esto condujo a buscar una fracción glucosilada de GH, que, efectivamente, se encontró (72, 73, 74).

Al tiempo del reporte de estos estudios, en nuestro laboratorio ya se venía purificando y caracterizando a la GH de pollo desde hace tiempo, y se contaba con los recursos necesarios para estudiar la heterogeneidad y la actividad de la cGH. Además, ya estaba prácticamente montado un protocolo para obtener una fracción glucoproteínica de la hipófisis del pollo.

Por todo esto, nos propusimos determinar la presencia de cGH en dicha fracción glucoproteínica, así como desarrollar un método de purificación de la variante glucosilada de cGH y someterla a diversos análisis electroforéticos para comparar su comportamiento con el de la cGH "normal", pues cabía la posibilidad de que esta variante tuviera, en sí misma, heterogeneidad estructural.

## OBJETIVOS

En vista de que el interés principal del laboratorio es la cGH, y de que evidencias recientes indican la presencia de carbohidratos en hormonas de la familia de la GH, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un protocolo sencillo y eficiente para la obtención de una fracción glucoproteínica de la adenohipófisis del pollo.
2. Demostrar la presencia de una variante glucosilada de la cGH en una fracción glucoproteínica mediante sistemas electroforéticos e inmunológicos.
3. Desarrollar una técnica de purificación de la variante glucosilada de cGH (gcGH).
4. Caracterizar bioquímicamente a la variante purificada.

## MATERIALES Y METODOS

### Material biológico

Se utilizaron hipófisis de pollos Pilch (7 a 8 semanas de edad) alimentados *ad libitum*. Se decapitaron los pollos y las cabezas se almacenaron en hielo frappé mientras se obtenían las hipófisis mediante un corte sagital del cráneo y extirpándolas con pinzas. Las glándulas así obtenidas se almacenaron inmediatamente en hielo seco y después a  $-70^{\circ}$  C en un congelador REVCO hasta su utilización.

### Reactivos

El agua empleada para la preparación de diversas soluciones y amortiguadores fue desionizada en un aparato MilliQ (Millipore).

El anticuerpo (IgG de cabra anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa), la resina de Affigel-10, la gelatina y en general todos los reactivos para electroforesis y electrotransferencia se obtuvieron de Bio-Rad (Estados Unidos).

La resina de Concanavalina A - Sefarosa, la Concanavalina A acoplada a peroxidasa (Con A - HRP) y la albúmina se obtuvieron de Sigma (E. U.).

La Sefarosa 4B activada con CNBr se obtuvo de Pharmacia (Suecia).

Se utilizaron anfolinas de Bio-Rad o Pharmacia indistintamente.

Todos los reactivos restantes fueron de grado analítico.

## - Anticuerpos

Los anticuerpos anti-cGH utilizados se obtuvieron por inmunización de conejos Nueva Zelanda en los ganglios poplíteos, con una preparación pura de la hormona de crecimiento de pollo (42, 44), según el esquema de inmunización reportado previamente (75). Estos anticuerpos (Ac) resultaron ser altamente específicos, pues su inmunorreactividad cruzada con hormonas de crecimiento de varias especies, así como con otras hormonas es prácticamente nula (75).

El suero se almacenó en alícuotas que fueron congeladas hasta su utilización.

## Extracción de proteínas hipofisarias

Se diseñó un protocolo de extracción basado en trabajos anteriores (76, 77). Todos los pasos se realizaron a 4°C. De cada paso se tomó una alícuota (100 l) para determinar la concentración de proteína y analizar el grado de purificación por electroforesis. Un esquema de este protocolo se muestra en la figura 2.

### a) Homogeneización

Dos lotes de aproximadamente 150 glándulas (en total 300) se pesaron y homogeneizaron en una solución acuosa de inhibidores de proteasas: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 0.5 mM y aproti nina 50 KIU (unidades de kalicefina) por ml pH 7.2; (se añadieron 2.5 ml de solución por gramo de tejido). Se dieron 12 golpes con un homogeneizador Potter - Elvehjem. Ambos homogeneizados se juntaron y se ajustó el volumen para obtener una concentración de 3 g de tejido / 10 ml de solución.

### b) Alcalinización

El homogeneizado se llevó a pH 9.5 con una solución concentrada de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y se dejó en agitación 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 11,500 rpm (10,000 x g) por 30 minutos en una centrífuga Sorvall RC5-B con rotor de ángulo fijo SS34. El precipitado (conteniendo tejido no roto, material insoluble) se dejó y el sobrenadante alcalino se siguió procesando.

### c) Primera precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El sobrenadante alcalino se llevó a 0.15 M (3.745 %) de saturación con sulfato de amonio, añadiendo gota a gota y con agitación constante el volumen apropiado de una solución de sulfato de amonio al 100 %. Luego se ajustó el pH a 4.0 con  $(\text{HPO}_3)_n$  0.2 M, se dejó en agitación por 15 minutos y nuevamente se centrifugó a

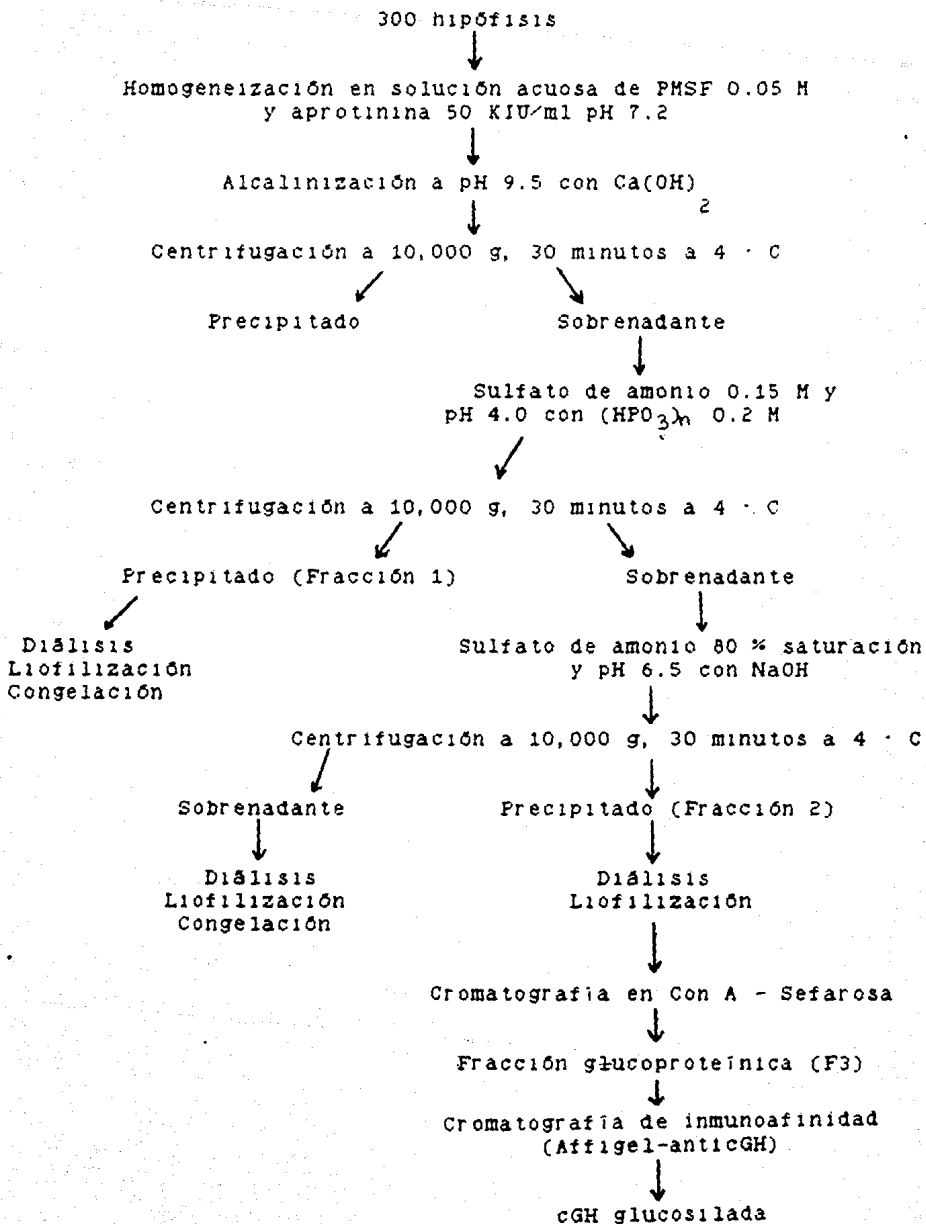


Fig. 2. Protocolo de extracción.

11,500 rpm por 30 minutos. El precipitado se resuspendió en un volumen pequeño de solución salina alcalina (NaCl 0.15 M, pH 10) y constituye la Fracción 1 (F1).

#### d) Segunda precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El sobrenadante obtenido en el paso anterior se llevó al 80% de saturación con sulfato de amonio, la cantidad necesaria de sulfato de amonio al 100 % se agregó gota a gota y con agitación constante. El pH se ajustó a 6.5 con NaOH 1 N, se dejó en agitación por 15 minutos y se centrifugó. El precipitado se resuspendió en el menor volumen posible de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 M y se calentó a 55 - 60 ° C durante 2 minutos. A esta fracción se le llama F2.

#### e) Diálisis y liofilización

El sobrenadante obtenido en el paso anterior, así como las fracciones F1 y F2 se transfirieron a bolsitas hechas con membrana de diálisis Spectrapore # 3 (límite de exclusión 3,500 daltones) y se dializaron exhaustivamente vs agua desionizada durante aproximadamente 40 horas, haciendo varios cambios del agua. Después, las fracciones se concentraron a sequedad en una liofilizadora Labconco.

#### Determinación de la concentración de proteínas

Se siguió el método de Lowry y col. modificado por Hartree (78, 79), para la determinación de la concentración de proteínas en cada etapa de la purificación. La técnica se explica ampliamente en el apéndice 1.

#### Purificación de glucoproteínas

Para obtener glucoproteínas a partir de la Fracción 2, se cromatógrafió a esta última por afinidad en una resina de Concanavalina A - Sefarosa (Sigma). Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C. Detalles de la preparación de amortiguadores y montaje de la columna se dan en el apéndice 2.



Brevemente, a 7 ml de resina se les hicieron 4 lavados con amortiguador de equilibrio (Tris - HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM pH 7.0) para eliminar el amortiguador preservativo.

La muestra (F2, aproximadamente 50 mg) se disolvió en el amortiguador de equilibrio y se aplicó en un volumen pequeño (no mayor de 3 ml). Se dejó interactuar con la resina de 15 a 20 minutos y se eluyó primero con el amortiguador de equilibrio y luego con  $\alpha$ -D-metilglucósido y/o  $\alpha$ -D-metilmanósido 10 mM y 100 mM disueltos en el mismo amortiguador.

Para realizar esta cromatografía se ocupó el siguiente equipo: un conductímetro LKB-2195, un absorbímetro LKB-2138, un graficador LKB-2210, un colector de fracciones LKB-2070 y una bomba peristáltica Pharmacia P-3.

El flujo de la columna se ajustó a 0.4 ml/minuto, se colectaron fracciones de 2 ml y la velocidad del papel fue de 0.5 mm/minuto.

Las fracciones correspondientes a cada pico obtenido se juntaron y se dializaron y liofilizaron como se describió. La fracción retenida (glucoproteínica) es la llamada Fracción 3 (F3).

### **Purificación de cGH glucosilada**

La F3 se sometió a una cromatografía de inmunoafinidad (se pasó por una resina con anticuerpo anticGH acoplado), con el objeto de obtener una preparación enriquecida de la cGH glucosilada, tal como se describe a continuación:

Se obtuvo IgG anticGH al pasar suero inmune de conejo por una columna de Proteína A - Sefarosa (detalles de las técnicas se describen en el apéndice 2).

Después, 25 mg de IgG se pusieron en contacto con 5 ml de Affigel 10 (Bio - Rad, activada con N-hidroxisuccinimida). Se dejó reaccionar 4 horas a 4 °C con agitación en un aparato Milligen 504. La reacción se detuvo con etanolamina 1 M pH 8.0 (0.1 ml por ml de resina); se dejó en agitación 1 hora. Después, se lavó la resina con 10 volúmenes de Hepes 0.1 M pH 7.5 y 5 volúmenes de: Tris 0.1 M pH 7.5 (amortiguador de equilibrio), Tris 0.1 M pH 7.5 con NaCl 0.5 M y ácido acético 0.1 M (amortiguadores de elución). La columna se almacenó con azida de sodio al 0.2 % en el amortiguador de equilibrio.

La F3 se resuspendió en un volumen pequeño del amortiguador de equilibrio, se aplicó a la columna y se dejó interactuar con ella por 20 minutos. Después se eluyó con el volumen necesario del amortiguador de equilibrio; posteriormente se hicieron lavados secuenciales con Tris 0.1 M + NaCl 0.5 M y con ácido acético 0.1 M. Se colectaron fracciones de 1 ml y se emplearon el equipo y las condiciones arriba mencionados. También, el contenido de los tubos correspondientes a cada pico se juntó, dializó y liofilizó como ya se ha dicho.

## Sistemas Analíticos

### - Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS - PAGE)

El equipo utilizado fue de Bio-Rad (cámara Protean-II, cámara Mini-Protean y fuente de poder 200/500).

La técnica que se siguió se basó en el método de Laemmli (80), en geles al 12.5 % de acrilamida. La preparación de las diversas soluciones y el ensamblaje de los geles se detalla en el apéndice 3.

Se aplicaron no más de 40 g de proteína por carril, disueltos en amortiguador de la muestra, el cual tiene 2-mercaptoetanol al 5 %, para romper los puentes disulfuro.

Se utilizó un amortiguador de corrida con Tris 0.025 M, glicina 0.19 M y SDS 0.1 %, pH 8.6. Se aplicó un voltaje de 100 V para el gel concentrador y 200 V para el gel resolvidor (geles grandes). Cuando el frente del colorante hubo llegado aproximadamente 0.5 cm arriba de la orilla del gel, se detuvo la corrida, se sacó el gel y se tiñó o se puso en presencia de solución de transferencia.

### - Electroforesis en condiciones nativas (Tris-PAGE)

Se siguió la técnica de Nicoll (81), que se describe con detalle en el apéndice 4.

Este sistema electroforético permite la separación de proteínas sin desnaturalizarlas, principalmente con base en su carga eléctrica neta. Esta técnica se realizó en geles cilíndricos y en placa. Los geles cilíndricos se tiñeron con Negro Amido 10-B; los geles hechos en placa se electrotransfirieron y revelaron como se describe más adelante.

### - Isoelectroenfoque analítico (IEF).

Se tomó como referencia el protocolo recomendado por Bio-Rad para la preparación y corrida de geles de IEF (ver apéndice 5).

Equipo: Cámara Bio-Phoresis para IEF horizontal (Bio-Rad), con los aditamentos necesarios y una fuente de poder de alto voltaje (Bio-Rad 3000 Xi).

Se prepararon geles planos al 4 % de acrilamida, de 0.6 x 100 x 125 mm. Las muestras estaban libres de sales, disueltas en no más de 10  $\mu$ l de agua (a veces se añadía 0.5  $\mu$ l de anfolinas para facilitar la solubilización), y se aplicaron en unos pocitos hechos en el gel. La corrida se efectúa a 5 W (potencia constante). Luego, se incrementa gradualmente la potencia hasta llegar a 12 W y un total de aproximadamente 4000 Voltios por hora. La temperatura se mantuvo a 4 ° C.

Cuando se terminó la corrida, se retiró el gel, se apoyó sobre hielo frappé y se midió el gradiente de pH con un electrodo de superficie. Después, se electrotransfirió como se describe adelante.

#### - Tinciones para geles.

Los geles de SDS-PAGE se tñieron con Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0.02 % en isopropanol al 25 % y ácido acético al 10 % al menos durante 3 horas. Para destefir, se usó ácido acético al 7 %.

Los geles de SDS-PAGE que requerían una técnica más sensible (para detectar hasta 100 ng) y los geles de IEF se tñieron con el método de plata, después de la transferencia. Se utilizaron los reactivos y la técnica descrita por Bio-Rad, cuyos pasos se detallan en el apéndice 6.

#### - Electroforesis bidimensional

El protocolo que se siguió se basó en las referencias 82, 83, 84 y 85; y se describe paso por paso en el apéndice 7.

La "primera dimensión" consiste en la separación de las proteínas por IEF en tubos delgados. La "segunda dimensión" consiste en acomodar los geles cilíndricos encima del gel concentrador (sin pozos) de una SDS-PAGE normal. De esta manera, las proteínas se separaron por carga y por tamaño. La detección de las bandas se hizo por un método inmunoenzimático después de la electrotransferencia.

#### - Electrotransferencia (ET).

Esta técnica se empleó con el propósito de detectar pequeñas cantidades de hormona de manera sensible y específica.

Esta técnica consiste en transferir las proteínas separadas en un gel a un papel de nitrocelulosa, y después revelar las bandas con anticuerpos (Ac) o algún otro agente, según la técnica de Towbin y cols (86).

#### Equipo:

Cámara de electrotransferencia Trans-Blot con "cassettes" de transferencia (Bio-Rad) y fuente de poder 250/2.5 (Bio-Rad). Papel filtro absorbente, membrana de nitrocelulosa (NC) de 0.45 m de poro (Bio-Rad) y guantes.

Una vez terminada la electroforesis (SDS-PAGE, Tris-PAGE o IEF), se enjuaga el gel con agua y se deja equilibrando en la solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 %) de 30 a 45 minutos. Se prepara el "sandwich" de transferencia (el procedimiento se detalla en el apéndice 8).

La transferencia se efectúa a 200 mA por 30 minutos. Al terminar la corrida, se saca la membrana de NC del sandwich y se lava 2 veces con PBS 1x pH 7.6, 5 minutos cada vez. Después, se deja en solución bloqueante toda la noche a temperatura ambiente. Si se tñió con Ac, se usó gelatina al 3 %. Si se tñió con Con A - HRP, se usó albúmina bovina (BSA, fracción V) al 3 %.

Se lavó la membrana para quitar la solución bloqueante, y se añadió Con A - HRP ( $4 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ), por 3 a 4 horas; o 1<sup>er</sup> Ac (1:2000) por 2 horas, y luego 2 Ac (IgG de cabra - HRP, diluido 1:3000) por 1 hora. Se reveló con 4-cloronaftol (0.5 %) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.15 %), que producen bandas color púrpura.

## RESULTADOS

### Extracción de proteínas adenohipofisarias

El esquema de extracción empleado permite la obtención de 2 fracciones proteínicas principales: F1 y F2 (ver material y métodos). En la F1 precipitan PRL y la mayor parte de la GH. En la F2 precipitan la mayoría de las glucoproteínas (76, 77).

Generalmente, se hicieron extracciones por lotes de aproximadamente 300 glándulas cada uno y se tomaron alícuotas de cada etapa de purificación para determinarles la concentración de proteína, así como para analizarlas por SDS-PAGE y observar el grado de purificación obtenido.

En la tabla 2 se muestran los rendimientos de 3 extracciones independientes. Obsérvese que las variaciones en concentración de proteína de las distintas fracciones pueden deberse, al menos en parte, a la cantidad de tejido del que se partió.

Los patrones electroforéticos de las proteínas en las varias etapas de extracción se muestran en la figura 3. Como se puede ver, algunas proteínas se quedan en cierta fracción y no aparecen en las fracciones subsiguientes. La banda correspondiente a cGH se señala con una flecha. Nótese que, como se había reportado (76, 77), la GH se encuentra en mayor cantidad en la F1. Sin embargo, en el carril de F2 se ve una banda que migra igual que la cGH (que presenta un PM de 26 kd), y también se ve una banda de 29 kd, que podría corresponder a gcGH, como se verá más adelante.

### Obtención de glucoproteínas (F3)

Se deseaba purificar a las glucoproteínas presentes en la F2. Para eso, se escogió una resina de Concavalina A - Sefarosa por su alta afinidad, capacidad y facilidad de manejo.

Tabla 2 . COMPARACION EN mg DE PROTEINA DE LOS  
 RENDIMIENTOS DE 3 EXTRACCIONES INDEPENDIENTES

Fracciones	Extr. 1	Extr. 2	Extr. 3
Tejido inicial (g)	2.96	3.02	2.37
Extracto total	174.87	182.88	166.45
Ppdo. alcalino	77.7	59.67	68.67
Sndte. alcalino	98.33	137.99	99.31
Ppdo. pH 4 (F1)	29.75	50.24	33.7
Sndte. pH 4	35.19	56.11	28.33
Ppdo. 80 % (F2)	25.84	37.12	14.43
Sndte. 80 %	nd	nd	nd

Ppdo., precipitado; sndte., sobrenadante; nd, no detectable.

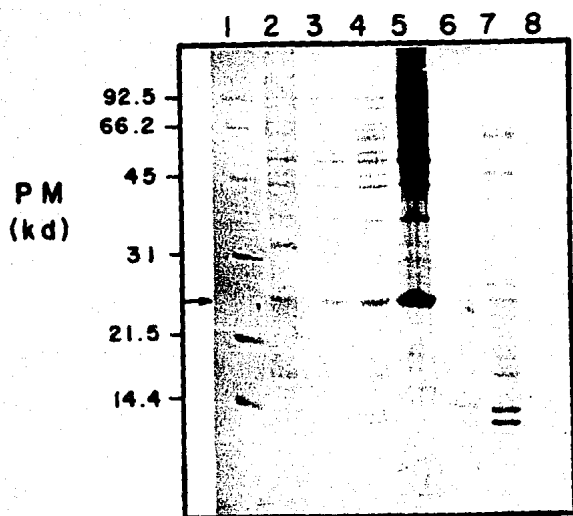


Fig. 3. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la extracción. Carriles: 1) estándares de PM, 2) Extracto total, 3) Precipitado del extracto alcalino, 4) Sobrenadante del extracto alcalino, 5) Precipitado pH 4 (Fracción 1), 6) Sobrenadante de la Fracción 1, 7) Precipitado 80 % (Fracción 2), 8) Sobrenadante de la Fracción 2. El gel se tiñó con Azul de Coomassie. La flecha señala a la banda que corresponde a CGH.

Para determinar las condiciones propicias de elución, se montó una columna de Con A - Sefarosa de 5 ml de volumen. Luego, se aplicaron 47.87 mg (peso seco) de F2. Se lavó con el amortiguador de equilibrio para eluir las proteínas no retenidas, y luego se eluyó secuencialmente con 3 soluciones distintas de azúcares, para ver cuál era la más eficiente como eluyente, ya que estos azúcares compiten con las glucoproteínas por los sitios de unión de la Concanavalina A).

Primero se probó -D-metilglucósido 0.5 M. El pico eluido con este carbohidrato salió arrastrado y pequeño. Enseguida se aplicó  $\alpha$ -D-metilmanósido 10 mM y se obtuvo un pico más compacto y más alto. Por último, se aplicó  $\alpha$ -D-metilmanósido 100 mM, y se obtuvo otro pequeño pico (Fig. 4).

La fracción no retenida y las retenidas se analizaron por separado en Tris-PAGE en tubo y en SDS-PAGE. Como se ve en la figura 5, las proteínas presentes en las fracciones eluidas con los 3 diferentes eluyentes aparentemente son iguales.

Así pues, en vista de que las proteínas eluidas con las 3 distintas soluciones de azúcares son las mismas, y de que la solución de  $\alpha$ -D-metilmanósido 10 mM era capaz de despegar la mayor parte de las glucoproteínas, se decidió usar esta solución para la elución de las glucoproteínas; en caso de que el pico saliera un poco arrastrado, se aplicaría  $\alpha$ -D-metilmanósido 0.1 M.

Por otro lado, se determinaron las movilidades relativas (Rf) de las glucoproteínas presentes en la F3, y estos Rfs se compararon con los Rf reportados para las hormonas hipofisarias de otras especies de aves (77). Así, se encontró que la banda con un Rf de 0.13 podría corresponder a LH, la de Rf 0.26 correspondería a TSH; la de Rf 0.52 a FSH y la de Rf 0.75 podría corresponder a PRL. En la F3 también se observaron las bandas correspondientes a la cGH, aunque más tenues (ver fig. 5-B).

Una vez conocidas las condiciones cromatográficas apropiadas, las fracciones F2 de 3 extracciones independientes se juntaron y se dividieron en 2 partes para cromatografiarlas en una resina de Concanavalina A - Sefarosa. Las proteínas retenidas (eluidas con  $\alpha$ -D-metilmanósido) constituyeron la Fracción 3 (F3, fracción glucoproteínica). Esta cromatografía se realizó varias veces, en la figura 6 se muestra un cromatograma típico. Las cantidades aplicadas a la columna y las obtenidas son:

1ª Cromatografía	Fr. no retenida	Fr. retenida
F2 (ppdo 80 %)	Eluido Tris	F3 (el. manós.)
22.38 mg	20.66 mg	1.93 mg
2ª Cromatografía		
F2 (ppdo 80 %)	Eluido Tris	F3 (el. manós.)
33.3 mg	31.28 mg	2.03 mg

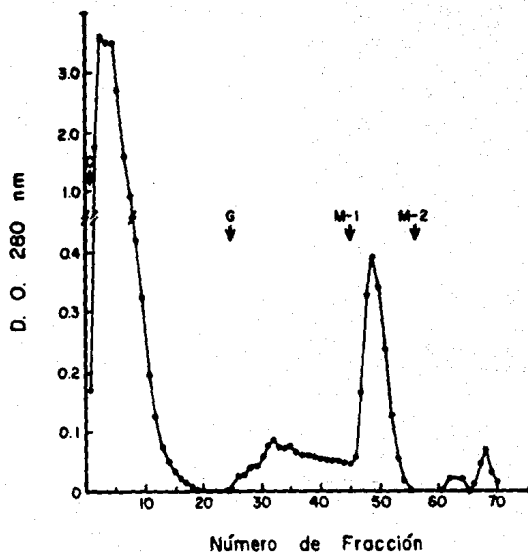


Fig. 4. Patrón cromatográfico obtenido de la columna de Con A - Sefarosa de prueba. D.O., densidad óptica; C. cargado; G, adición de glucósido 0.5 M; M-1, manósido 10 mM ; M-2, manósido 0.1 M.



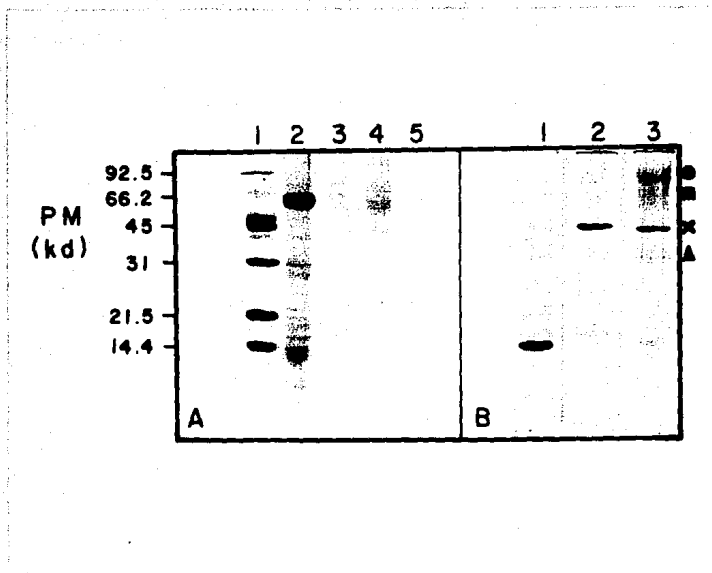


Fig. 5. SDS-PAGE (A) y Tris-PAGE (B) de las fracciones obtenidas en la cromatografía de prueba en Con A - Sefarosa. Carriles (A): 1, Estándares de PM; 2, cargado; 3, Fracción eluida con glucósido; 4, Eluido con manósido 10 mM; 5, Eluido con manósido 0.1 M. (B): 1, cargado; 2, Eluido con glucósido; 3, Eluido con manósido 10 mM. ● LH; ■ TSH; X , GH  
▲ , FSH.

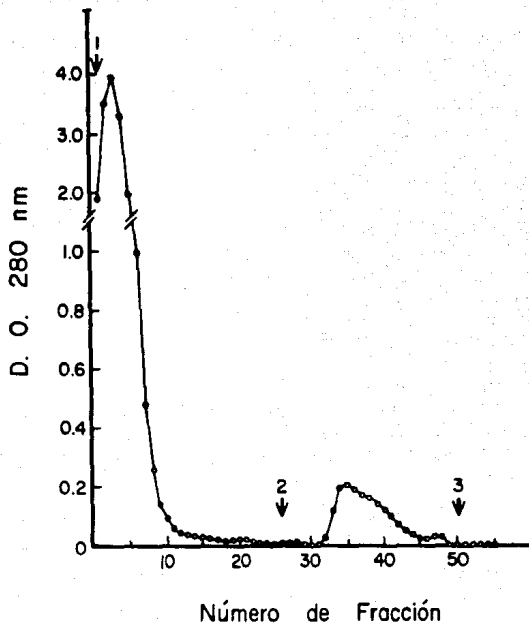


Fig. 6. Patrón de absorbencia a 280 nm obtenido al cromatografiar la F2 en una columna de Con A - Separosa. 1, cargado; 2, adición de manósido 10 mM; 3, manósido 0.1 M

Se decidió juntar las fracciones no retenidas (Eluidos con Tris) de las 2 cromatografías y re-cromatografíarlas, para comprobar que se había obtenido la mayor cantidad posible de las glucoproteínas presentes en la F2 original. Como se ve en el cromatograma (Fig. 7), prácticamente no se obtuvo F3, lo que indica que en las 2 cromatografías anteriores se purificaron la gran mayoría de las glucoproteínas.

Las fracciones así obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE y ET y teñidas primero con anticuerpo, para detectar sólo las bandas correspondientes a cGH. Los resultados se muestran en la figura 8. Se aprecia que en la F2 hay parte de la cGH "normal" (26.3 kd), y que al cromatografiar la F2 y obtener las glucoproteínas (fracción F3), se observa que la cGH 26.3 kd se queda prácticamente toda en la fracción no retenida, mientras que el Ac reconoce a una proteína de mayor PM en la fracción retenida. Cuando se teñió tanto con Ac como con Con A-HRP (Fig. 9), se vio que la cGH (26 k) no es reconocida por la Con A; en cambio, la cGH de 29 kd (glucosilada) es reconocida tanto por el Ac como por la Con A.

Además, en el carril correspondiente a la F3, teñido con Con A-HRP, se ve una mancha intensa en la región correspondiente a aproximadamente 17 kd. Es probable que esta mancha represente las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las hormonas TSH, FSH y LH, pues es bien sabido que su peso molecular cae en ese intervalo y que están profusamente glucosiladas.

Por otro lado, el carril correspondiente a la fracción no retenida no se tñe con Con A-HRP, lo que indica que se recuperaron prácticamente todas las glucoproteínas con la cromatografía en Con A - Sefarosa.

### **Purificación de cGH glucosilada**

Posteriormente, con el objeto de facilitar la caracterización de la gcGH, se trató de purificar a la cGH glucosilada a partir de F3. Esta fracción se pasó por una columna de inmunoafinidad (Affigel 10 - IgG anti cGH). Este tipo de resina tiene grupos de N-hidroxisuccinimida que reaccionan con los grupos  $\text{NH}_2$  libres de las proteínas (en este caso IgG), y forman un enlace covalente.

Para la preparación de la primera columna, se utilizaron 10 mg de IgG por ml de resina. Sin embargo, el acoplamiento fue pobre (alrededor del 50 %) y se tuvieron problemas en la recuperación de la cGH glucosilada durante la cromatografía de la F3, pues los rendimientos fueron muy bajos. Entonces, se decidió sintetizar otra columna de inmunoafinidad, en la que se incrementó la cantidad de IgG a 25 mg/ml de resina y los tiempos de incubación. Así, el acoplamiento aumentó en cierto grado (aproximadamente 72 %), pero el enlace formado entre la resina y la IgG era aparentemente lábil, pues al cromatografiar la F3 y eluirla con Tris-NaCl 0.5 M y ácido acético 0.1 M, salía también IgG, como se vio por SDS-PAGE y en el cromatograma (Fig. 10). Y los rendimientos de gcGH fueron muy bajos de nuevo (10 a 15  $\mu\text{g}$ ).

A pesar de las bajas cantidades de proteína obtenida, se pudieron analizar los productos eluidos mediante SDS-PAGE y ET, y los patrones de bandas se muestran en la figura 11. Las bandas de alto PM corresponden a IgG, la de 29 kd corresponde a gcGH y la de 26 kd a cGH.

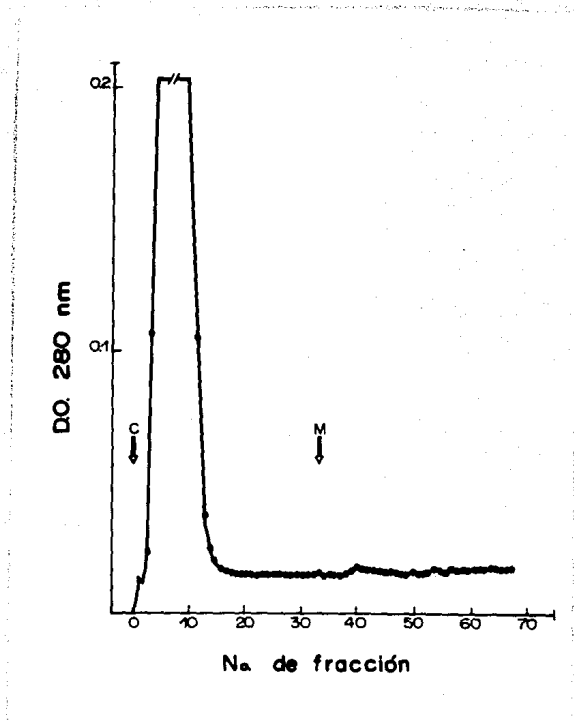


Fig. 7. Patrón de absorbencia a 280 nm de los cargados (Frs. no retenidas) de 2 cromatografías anteriores en Con A - Setarosa. C, cargado; M, manósido 10 mM.

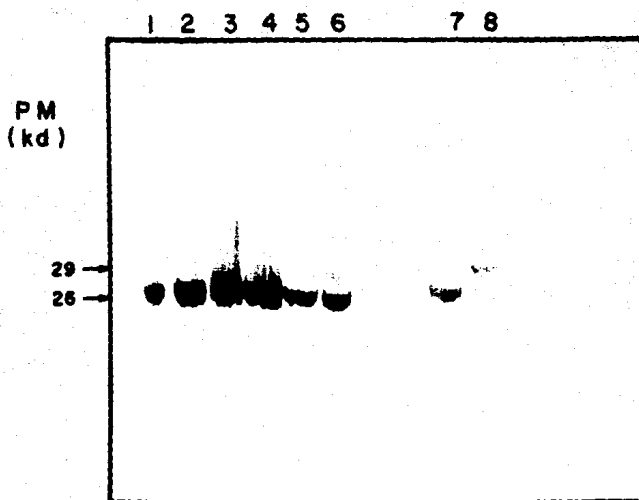


Fig. 8. Análisis por SDS-PAGE seguido de IET de las fracciones de la purificación y de la columna de Con A - Sefarosa. Se reveló con antisuero diluido 1:2000. Carriles: 1, Extracto total; 2, Precipitado del extracto alcalino; 3, Sobrenadante extracto alcalino; 4, Fracción 1; 5, Sobrenadante de la Fracción 1; 6, Fracción 2; 7, Fracción no retenida (Con A-Sefarosa); 8, Fracción retenida (F3).

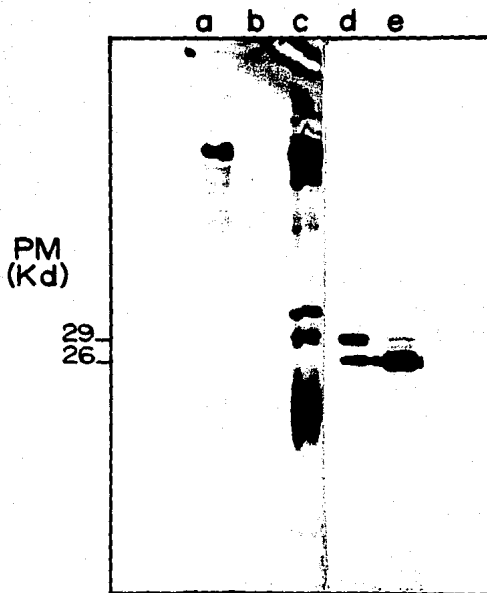


Fig. 9. SDS-PAGE y ET de las fracciones de la purificación, revelado con Con A - HRP y antisuero. Carriles: a, F2; b, Fracción no retenida en Con A - Sefarosa; c, Fracción retenida (F3); d, F3 ; e, Fracción no retenida. Los carriles a, b y c fueron teñidos con Con A; d y e fueron teñidos con Ac.

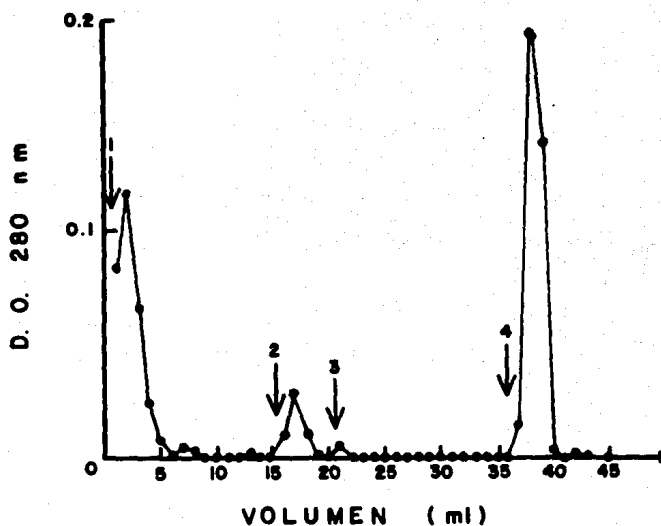


Fig. 10. Patrón de D.O. a 280 nm de la cromatografía de F3 en una columna de Attigel 10-IgG « CGH. 1, cargado; 2, adición de Tris 0.1 M + NaCl 0.5 M; 3, ácido acético 0.1 M; 4, Tris 0.1 M.

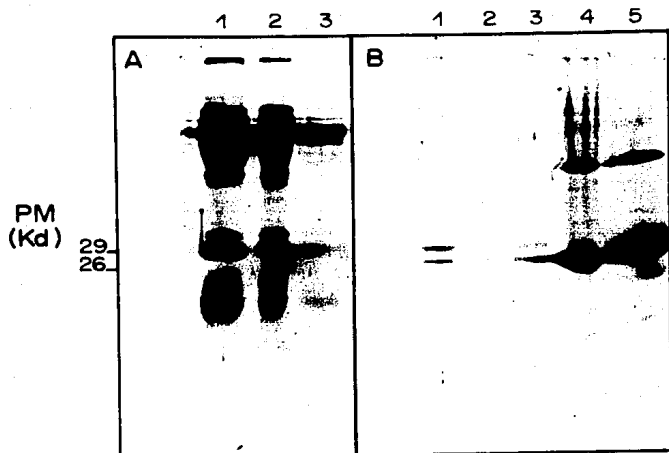


Fig. 11. SDS-PAGE y ET de las fracciones obtenidas de la columna de inmunoafinidad. Revelado con Con A-HRP (A) y antisuero (B). Carriles en (A): 1, Fracción no retenida; 2, Fracción eluida con Tris + NaCl; 3, Fracción eluida con ácido acético 0.1 M. (B): 1, Fracción eluida con ácido acético; 2, Fracción eluida con Tris + NaCl; 3, Fracción no retenida; 4, Fracción aplicada (F3); 5, cGH 26 k.



Después, se sintetizó otra columna de Inmunofinidad usando otra resina, Sefarosa 4B activada con CNBr, y se acopló a la IgG según las instrucciones del fabricante (Pharmacia) y se utilizó una concentración de 5 mg de IgG por ml de resina. De esta manera, se obtuvo un 91 % de eficiencia en el acoplamiento, y se retenían aproximadamente 260 g de cGH en 3 ml de resina.

### Caracterización electroforética

El Dr. Luc Berghman, de la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica, donó generosamente 500 g de gcGH pura. Esta probó ser idéntica a la nuestra, pues corrida en SDS-PAGE, electrotransferida y teñida con Con A-HRP se ve como una sola banda de 29 kd; con Ac aparece la banda de 26.3 kd y un dímero resistente a la reducción (Fig. 12). En dicha figura las bandas se ven más juntas porque se usó una mini-cámara de electroforesis. Esta gcGH fue utilizada para la Tris-PAGE, el IEF y la electroforesis bidimensional.

Hacer estudios de caracterización de la cGH glucosilada se antojaba muy interesante, pues bien se podía encontrar que la gcGH era de un solo tipo, o que, como su contraparte holoproteínica, presentara heterogeneidad estructural.

Los resultados anteriores de nuestro laboratorio (42 a 45), demostraban que la cGH, cuando se corría en electroforesis no desnaturalizante (Tris-PAGE), se separaba en 3 componentes, con diferente Rf pero con mismo PM. Para determinar la heterogeneidad de la gcGH en este sistema, en el que las proteínas se separan principalmente con base en su carga, se sometió a esta muestra a Tris-PAGE y ET y se comparó con la cGH "normal".

Los patrones obtenidos se pueden ver en la figura 13. Al tefir con Con A - HRP, se observaron 3 bandas principales, con RF de 0.17, 0.22 y 0.26, y bandas minoritarias con Rfs de 0.31, 0.35 y 0.102. La tinción con Ac sobre el mismo papel de NC intensificó todas las bandas. En cuanto a la cGH, presentó un patrón muy similar al de la gcGH, pero movido hacia arriba, pues las bandas migraron menos, dando Rfs de 0.042, 0.085, 0.135, 0.187, 0.233 y 0.28. La cGH pura no se tife con Con A - HRP, sólo con Ac.

La heterogeneidad de carga de la cGH también se había demostrado con el IEF analítico, en un gradiente de pH de 4 a 9 (45), en el que se habían identificado al menos 8 bandas. La gcGH, corrida en este sistema, y después de nuevo la IET, presentó un patrón idéntico al de la cGH cuando se tificó con Ac, excepto porque la cGH presenta una banda con pI de 8.2, (Fig. 14). Las bandas presentaron pI de 5.15, 5.22, 6.07, 6.31, 6.52, 6.7, 7.17, 7.45 y 8.135. Con la tinción con Con A, se vieron las bandas de 7.17, 6.52 y 6.7, y también, pero muy levemente, las bandas con pI de 8.135, 6.31 y 6.07. Así pues, sólo algunas de las bandas teñidas con el Ac están glucosiladas.

Como una manera más de determinar la heterogeneidad de carga de la gcGH, se decidió someterla a un análisis electroforético bidimensional. La primera dimensión consistió en IEF en gel cilíndrico, y la segunda dimensión fue una SDS-PAGE. Para identificar las bandas, se hizo la IET, y se reveló nuevamente tanto con Con A - HRP como con Ac. Se comparó el patrón de bandas de la gcGH con el de la cGH, que también fue electrotransferida y teñida con Ac (pues no se tife con Con A - HRP). Como se ve en la figura 15, la gcGH

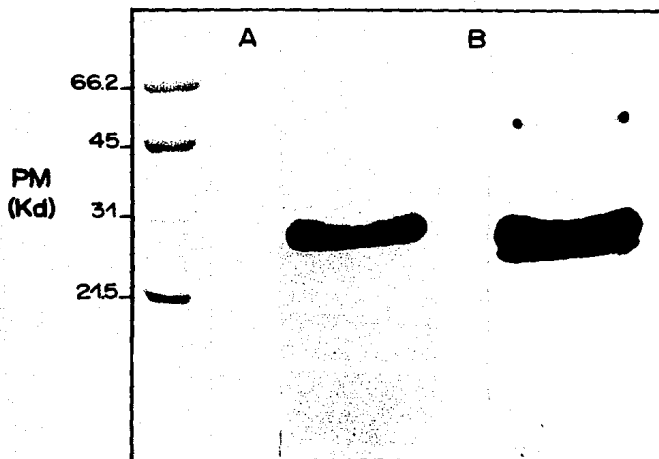


Fig. 11. SDS-PAGE y ET de la gosh. Se realizó una doble tinción: primero se tiñó con Con A - HRP (A), y se fotografió. Luego se tiñó el mismo papel de nitrocelulosa con antisuero (B).

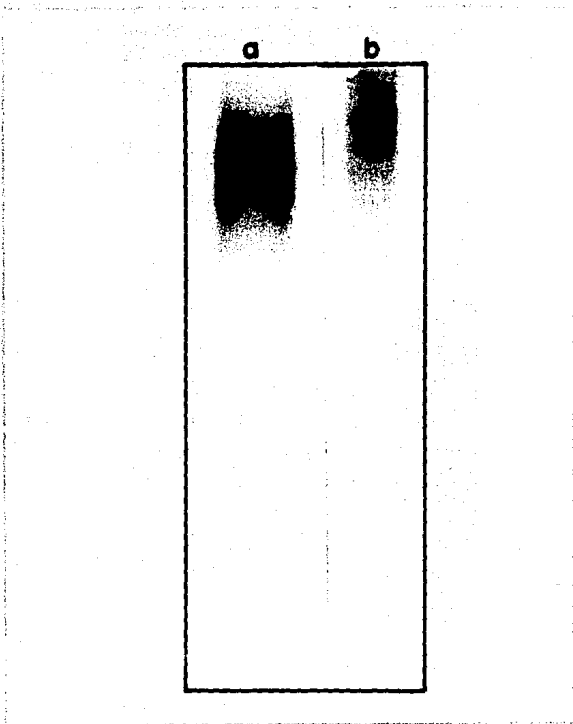


Fig. 13. Tris-PAGE en placa y ET de gcGH (a) y cGH (b). Se hizo doble tinción (primero se reveló con Con A - HRP y luego con Ac, sobre el mismo papel). Las movilidades relativas de las bandas se dan en el texto.

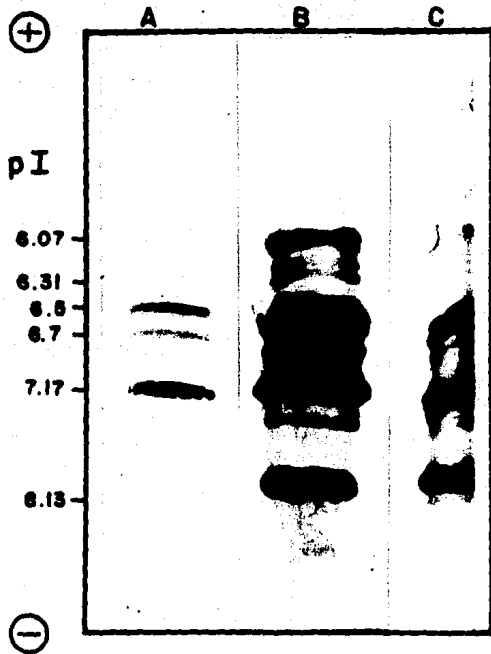


Fig. 14. IEF analítico de gcGH y cGH. Se transfirió y se reveló con Con A (a) o Ac (b, c). En (a) y (b) se muestra a la gcGH, en (c) se muestra a la cGH. Los pI señalados corresponden a las bandas reconocidas por Con A.

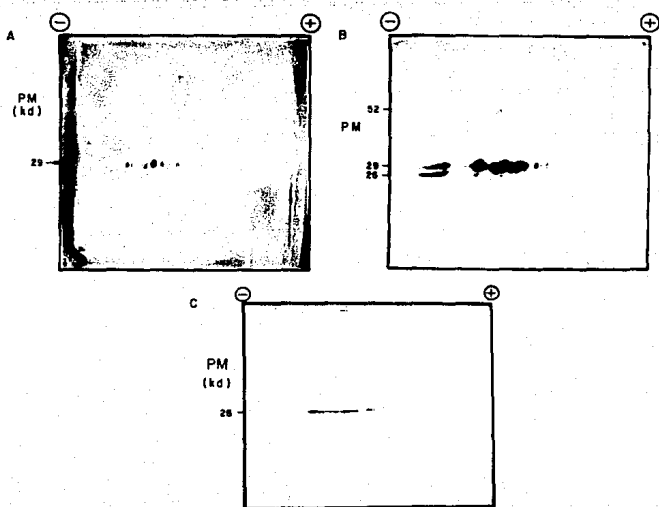


Fig. 15. Electrotresis bidimensional y ET de cGH y gcGH. A) gcGH teñida con Con A - HRP. B) gcGH teñida con Ac. C) cGH teñida con Ac.

conservó su PM mayor (29 kd), y se vieron 3 bandas mayoritarias y 5 minoritarias al tefir con Con A-HRP. La tinción con el Ac reveló dichas bandas y aparecieron otras muy leves, a ambos extremos, arriba (dímero, 52 kd) y abajo (cGH 26.3 kd). La cGH también presentó un patrón heterogéneo (aproximadamente 9 bandas), y aparentemente sus componentes migraron más hacia el ánodo (+). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros sistemas analíticos que demuestran que tanto la cGH como la gcGH presentan varias isoformas.

*The Questioner, who sits so sly,  
Shall never know how to Reply,  
He who replies to words of Doubt  
Doth put the Light of Knowledge out.*

William Blake, "Auguries of Innocence"

## DISCUSION

Cuando las hormonas hipofisiarias se descubrieron y se nombraron de acuerdo con su función, poca gente siquiera se imaginaba que una hormona fuera en realidad varias.

La heterogeneidad estructural de las hormonas, cuando fue finalmente reconocida, ha abierto un amplio panorama en la investigación del reconocimiento y las funciones de las mismas.

La GH y sus variantes han sido extensivamente estudiadas en el hombre, como es lógico, pues desde hace mucho tiempo se buscó su aplicación en casos de enanismo o crecimiento lento. En otros mamíferos como rata, vaca, cabra o cerdo también se han hecho amplios estudios (7, 10, 87).

Los otros grupos de vertebrados no habían recibido tanta atención como hasta hace pocos años. Sin embargo, los estudios de la estructura y la función de la GH en organismos como aves, reptiles, anfibios y peces es muy importante comparativa y evolutivamente.

Por eso, en nuestro laboratorio se ha venido estudiando a la GH de pollo. Se han montado técnicas eficientes para su purificación, así como para el análisis de sus propiedades químicas y biológicas.

Nuestro grupo ha logrado demostrar que la GH de pollo, como las GH de otras especies, presenta diversas isoformas (o variantes) que difieren en su carga o su tamaño (42 a 46). Las diferencias de carga de las variantes

se explican casi siempre por modificaciones postraduccionales, como procesamiento proteolítico limitado, desamidación, fosforilación, etc. Nosotros hemos detectado la presencia de fosfato en la fracción pura de cGH en una proporción de 1 mol de fosfato por 3 moles de proteína (44), lo que querría decir que alrededor de la tercera parte de las moléculas que componen la cGH están fosforiladas, y además la cGH puede fosforilarse *in vitro* por las protein-quinasas A y C (88). La fosforilación, sin embargo, sólo puede explicar parcialmente porqué hay tantas variantes de cGH.

Una modificación postraducciona que no le estaba "permitido" tener a la GH es la glucosilación, pues la GH se clasificó, junto con la PRL y el PL, dentro de las hormonas holoproteínicas. Sin embargo, recientemente se descubrió que las 3 hormonas de esta familia pueden presentar carbohidratos, (67 a 74), y la GH de pollo no es la excepción, pues Berghman y col (74), al hacer estudios de inmunohistoquímica con Ac monoclonales dirigidos contra extractos glucoproteínicos hipofisarios de pollo, se toparon con que una población celular que correspondía morfológicamente a los somatotropos se teñía positivamente, lo cual era muy sugerente de que se produjera una GH glucosilada.

Cuando se publicaron dichos resultados, en nuestro laboratorio ya se tenía montado un método para purificar glucoproteínas de la hipófisis del pollo. Debido a esto, y a que nuestro interés principal es la GH, decidimos tratar de identificar, en nuestra fracción glucoproteínica, a una variante glucosilada de la GH de pollo; así como diseñar un método para su purificación y caracterizarla electroforéticamente.

El protocolo de purificación desarrollado se diseñó con base en otros estudios reportados anteriormente (76, 77, 89). Al seguir este protocolo, se obtienen 2 fracciones proteínicas principales, F1 y F2. F1 se obtuvo precipitada a 0.15 M de sulfato de amonio y pH 4.0. F2 se obtuvo a 80 % de saturación de sulfato de amonio. Se sabía que en F1 precipitaban GH y PRL, mientras que en F2 precipitaban otras holoproteínas y las glucoproteínas (76, 77). La F2 se siguió procesando, sometiéndola a una cromatografía en Concanavalina A - Sefarosa, lo que permitió obtener una fracción glucoproteínica, denominada F3.

Las F1, F2 y F3 se almacenaban congeladas hasta su utilización. Una de las ventajas de este protocolo es que permite obtener cGH "normal", cGH glucosilada y a las otras hormonas adenohipofisarias: de la F1 se pueden purificar GH y PRL, y de F3 se pueden purificar cGH glucosilada y las otras hormonas. De hecho, se utilizó la F1 para purificar cGH (43). Se obtuvieron rendimientos algo más bajos que con el protocolo clásico de purificación de cGH (42), pero con este protocolo clásico la variante glucosilada de la cGH se pierde; no se encuentra en la fracción de cGH.

Como se dijo antes, para la obtención de la F3 se empleó una resina de Concanavalina A - Sefarosa. La Concanavalina A es una lectina derivada de la planta *Canavalia ensiformis* que tiene 4 sitios de unión y que en presencia de bajas concentraciones de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  es capaz de unir eficientemente varios tipos de oligosacáridos. La Con A ha sido ampliamente utilizada por su fácil manejo y alta afinidad (90).

Como necesitábamos disponer de un método sensible y específico de detección de GH, decidimos utilizar la electrotransferencia (ET). Para revelar las membranas, usamos suero de conejo inmune vs cGH, que demostró ser altamente específico, pues su reactividad cruzada con GHs de otras especies fue muy baja (75). También



se usó Con A conjugada a peroxidasa de rábano (HRP), con el fin de detectar selectivamente a las glucoproteínas. Esta también probó ser una herramienta muy útil y específica.

Así pues, en la F3 se demostró la presencia de cGH glucosilada, que se tife tanto con Con A - HRP como con anticuerpos y aparece como una banda aproximadamente 0.5 cm arriba de la banda correspondiente a la cGH "normal" (26 k); lo que corresponde a un PM aproximado de 28.6 a 29 k. Además, la cGH 26 K no se retiene en la columna de Con A - Sefarosa, pues aparece en el carril correspondiente a la fracción no retenida (Fig. 8, carril7), mientras que la gcGH sólo aparece en el carril de la F3. Es importante señalar que:

1. La cGH 26 k es fácilmente reconocida por el antisero pero no por la Con A - HRP. En cambio, la gcGH 29 k es fácilmente reconocida tanto por el antisero como por la Con A - HRP.

2. En algunas electrotransferencias, se observó una banda muy tenue de 26 kd en el carril correspondiente a la gcGH 29 k. Esto podría deberse al "arrastre". Se sabe que la GH puede formar dímeros con facilidad (7), y de hecho en algunos de nuestros experimentos se observa (Figs. 9, 11, 12 y 15). Si un dímero está conformado por un monómero glucosilado y otro no glucosilado de cGH, y si las condiciones cromatográficas no son lo suficientemente fuertes como para separarlos, entonces es de esperarse que, si parte de la GH que se pega a la Con A - Sefarosa estaba formada por dímeros de esta clase, aparezca una bandita de 26 kd en la F3, que sólo se detecta con antisero, en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras.

3. En algunos experimentos, sólo se observaba una banda correspondiente a la gcGH. Sin embargo, en otros la gcGH apareció como un doblete, reconocido por el antisero y por la Con A - HRP. Tal vez, la gcGH puede existir con 2 tipos diferentes de cadena de carbohidratos; o ese doblete representa diferentes grados de procesamiento de una misma cadena (pues no hay que olvidar que durante la glucosilación de las proteínas, la cadena de azúcares va sufriendo modificaciones).

Al principio, tuvimos la duda de que el Ac reaccionara en forma cruzada con la PRL, pues se sabe que en otras especies, la PRL tiene un PM mayor que la GH. Sin embargo, cuando se pudo probar nuestro Ac contra la cPRL (donada por A. Parlow, UCLA, USA), en un ensayo de IET, se comprobó que no existe tal inmunorreactividad cruzada, pues no se tiñó la cPRL. Además, después se supo que en el pollo, la PRL y la GH tienen el mismo PM aparente en SDS-PAGE.

Para poder estudiar más finamente a la cGH glucosilada, se intentó obtenerla en forma pura al cromatografiar F3 en una columna de inmunoafinidad, que se preparó al conjugar IgG a una resina de Affigel-10. Desgraciadamente, no se obtuvieron muy buenos resultados pues las columnas que se sintetizaron no funcionaron como se esperaba (ver resultados, página 45). Una explicación factible es que los Ac utilizados son de muy alta afinidad, y por eso es muy difícil eluir a la gcGH de la columna. Además, se sabe que para las columnas de Inmunoafinidad, es preferible usar Ac de mediana o baja afinidad, que sean selectivos pero no demasiado afines y permitan eluir al ligando fácilmente y en condiciones no tan drásticas.

Aún así, la poca gcGH que se obtuvo pudo analizarse por SDS- PAGE y ET. Se observó que la gcGH se reconocía por Con A - HRP y por Ac, en tanto que la cGH sólo es reconocida por el Ac y no por la Con A. Berghman y col (74), dedujeron que las 2 proteínas (29 y 26.3 kd) presentes en la fracción de gcGH estaban

glucosiladas. Nuestros resultados muestran que no, que sólo la banda de 29 kd está glucosilada. Lo que sucedió es que dichos autores sólo utilizaron Ac para revelar sus membranas.

Sin embargo, la F3 hubiera podido servir para este tipo de análisis, siempre y cuando se hiciera ET y se tiñera específicamente con Ac y con Con A - HRP.

Con anticuerpos monoclonales de mediana afinidad acoplados a Sefarosa 4B, el Dr. Berghman logró obtener una fracción de gcGH, muy enriquecida, aunque con rastros de cGH "normal", de la que nos donó una parte para continuar con el análisis.

Así pues, se utilizó esta gcGH para caracterizarla bajo los siguientes sistemas analíticos: Tris - PAGE, IEF y electroforesis bidimensional.

En la Tris-PAGE, fue sorprendente que tanto la gcGH como la cGH presentaron varias bandas (cinco). Ambos patrones de bandas fueron muy similares, aunque las bandas de la gcGH muestran una migración mayor hacia el ánodo, lo que podría indicar que estas proteínas tienen una carga negativa ligeramente mayor que las que componen la cGH. La cGH no se tiñe con Con A - HRP.

Con el fin de conocer el número de variantes de carga de la gcGH, ésta se corrió en el IEF, para comparar su comportamiento con el de la cGH. La tinción con Ac reveló un gran número de bandas (más de 9) en la gcGH, que corresponden perfectamente con las de la cGH, excepto por que la cGH tiene una banda de pI 8.2 que no se encuentra en la fracción de gcGH. De nuevo, se observó que ninguna de las bandas de la cGH se tiñe con Con A - HRP; en cambio, 3 de las bandas de la gcGH se tiñeron importantemente con Con A (pI 7.17, 6.7 y 6.52), y 3 se tiñeron levemente (pI 8.135, 6.31 y 6.07) (Fig. 14). Que unas bandas se tiñan más fuertemente con Con A - HRP puede deberse simplemente a que se encuentran en mayor cantidad o a que difieren cierto grado en la composición de sus cadenas de azúcares, por lo que la Con A las reconoce con diferente afinidad, pues, como se dijo antes, la Con A tiene predilección por cierto tipo de cadenas de carbohidratos (90).

Aún así, ¿porqué hay diversas variantes glucosiladas? Pueden proponerse varias explicaciones:

1. Las variantes representan a la GH en distintos grados de maduración.
2. Cada variante tiene una cadena de carbohidratos con residuos diferentes, que le confieren ciertas características funcionales.
3. Cada variante tiene la misma cadena de carbohidratos, pero tienen diferencias en la cadena peptídica (fosforilación, pequeño corte proteolítico, etc.)
4. Una combinación de las anteriores.

El hecho de que el patrón de bandas de cGH y gcGH sea prácticamente igual a pesar de que la cGH no sea reconocida por la Con A, quizá pueda explicarse si se recuerda que tanto en F3 como en la fracción inmunopurificada de gcGH sigue habiendo cGH (ver Fig. 11). Esto podría deberse al "arrastre" de cGH por la

gcGH explicado arriba; o que durante el manejo y el procesamiento, la gcGH sufrió desglucosilaciones específicas o inespecíficas, que dejaron a la proteína sola.

Para comprobar que todas las isoformas de gcGH vistas en el IEF tuvieran el mismo PM, se realizó una electroforesis bidimensional. En esta técnica, las proteínas son separadas primero por carga (mediante IEF) y luego por tamaño (mediante SDS-PAGE). Así, se demostró una vez más que la gcGH presenta varias isoformas de carga, en este caso, 8 fueron reconocidas por Con A, que tienen el mismo PM (29 kd), y aparentemente corren un poco más hacia el ánodo que las isoformas de la cGH, que presentan un PM de 26.3 kd. Con Ac, se detectaron unas pequeñas bandas correspondientes al dímero y a la cGH, además de las bandas glucosiladas.

Así, los resultados obtenidos muestran que la glucosilación de la cGH altera el PM aparente de la misma, pues lo aumenta de 2 a 3 kd. También, parece ser que la glucosilación incrementa levemente la carga negativa neta de algunas de las isoformas de la cGH.

Se sabe que la glucosilación de un precursor proteínico como la POMC (pro-opiomelanocortina) puede ser importante para prevenir su degradación intracelular, así como también puede servir de señal para el procesamiento por proteólisis limitada. Aparentemente la glucosilación no es necesaria para el empaquetamiento y/o la exocitosis, al menos de la POMC (91, 92).

Para otras proteínas, se ha visto que la glucosilación aumenta su vida media plasmática, y puede intervenir en la activación y en el reconocimiento de los receptores tisulares (92).

Hay dos tipos de enlaces mediante los cuales los carbohidratos pueden unirse enzimáticamente a las cadenas peptídicas, el enlace N-glucosídico y el O-glucosídico.

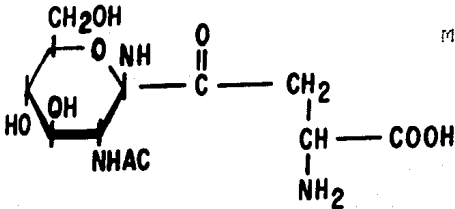
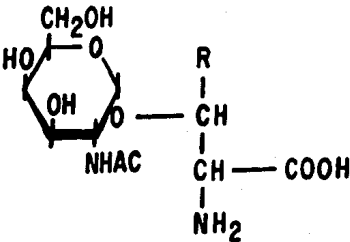
El enlace N-glucosídico se lleva a cabo entre el grupo  $\text{NH}_2$  libre de un residuo de Asn y el carbón anomérico de la N-acetilglucosamina. El enlace O-glucosídico se realiza entre el grupo OH libre de Ser o Thr y la N-acetilgalactosamina (tabla 3). El enlace más común es el primero, pues se ha encontrado en plantas, animales y hasta en microorganismos. El enlace O-glucosídico, en cambio, sólo se ha encontrado en animales (93).

A la N-acetilglucosamina se le añaden otros azúcares (principalmente manosa) para ir formando las cadenas, que una vez terminadas, pueden ser de tres tipos (94): de alta manosa, híbridas y complejas, como se esquematizan en la tabla 4.

Las cadenas complejas, a su vez, pueden tener 2 ramificaciones (antenas), 3 antenas o más. La Con A no se une a cadenas complejas de 3 antenas, se une mejor a las de 2, como se muestra en la tabla 5. Los carbohidratos que se unen a la Con A en orden de afinidad son:  $\alpha$ -D-metilmanósido, D-manosa, D-fructosa, D-glucosa.

Para que se dé el enlace N-glucosídico, se requiere que en la proteína exista la secuencia consenso Asn-Xxx-Thr/Ser, en donde Xxx puede ser cualquier aa excepto Pro o OH-Pro. En la GH de pollo, los aa 188 a 190 tienen la secuencia Asn-Cys-Thr (95), por lo que podría darse este tipo de glucosilación. Además, la

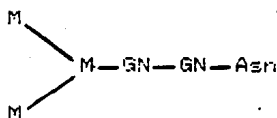
TABLA 3. ENLACES GLUCOSIDICOS

Enlace	Localización
N-glucosídico (GlcNAc - Asn)	Animales Plantas Microorganismos
	
O-glucosídico (GalNAc - Ser/Thr)	Animales
	

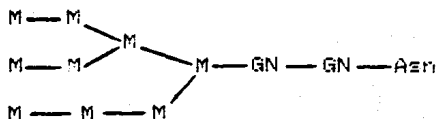
GlcNAc: N-acetilglucosamina  
 GalNAc: N-acetilgalactosamina  
 Tomado de Sharon & Lis (93).

TABLA 4 . ESTRUCTURAS DE N-GLUCOSIDOS.

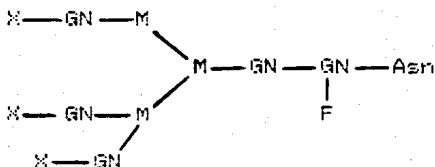
I.



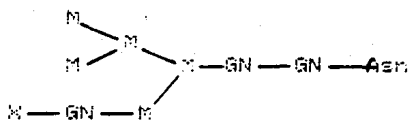
II.



III.



IV.



I. Secuencia básica común.

II. Oligosacárido con "alta manosa"

III. Oligosacárido "complejo"

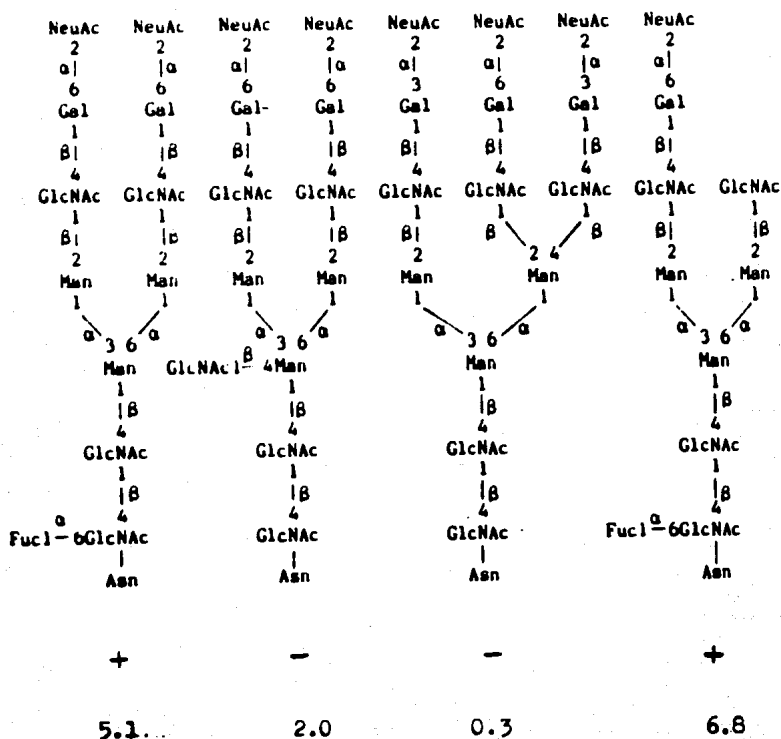
IV. Oligosacárido "híbrido"

Asn, asparagina; F, fucosa; GN, N-acetilglucosamina; M, manosa;

X, oligosacárido variable.

Tomado de Keesey (94).

-----  
 TABLA 5. Reconocimiento de distintas cadenas de carbohidratos por la Concanavalina A  
 -----



-----  
 Los símbolos + y - indican la unión o la ausencia de unión a Con A - agarosa, respectivamente.  
 Los números indican la constante de asociación ( $K_a \times 10^{-6} M^{-1}$ ).  
 -----

región de la cGH en que se encuentra esta secuencia tiene un índice de hidropatía negativo (96), lo que indicaría que está expuesta a la superficie, lo que la hace un buen candidato para llevar a cabo la glucosilación.

Otro dato que apoyaría la idea de que la gcGH tiene una cadena N-glucosídica es que la Con A reconoce solamente este tipo de cadenas (90), y la gcGH es reconocida por la Con A.

En los humanos, existen 2 genes para la GH, el hHG-N (o gen "normal") y el hGH-V (o gen "variante"). Sinha y Lewis (72), cuando reportaron la existencia de hGH glucosilada y buscaron la secuencia consenso en el gen hGH-N, no la encontraron, pero esta secuencia sí está en el gen hGH-V. Esto querría decir que este gen, que antes se creía un pseudogen, se expresa y da lugar a otra variante de la hGH.

Como se ve, muchos reportes destacan la importancia de la glucosilación para la vida media y el funcionamiento de las proteínas. Por eso, sería interesante determinar si las gcGH de distintas especies son liberadas al torrente sanguíneo; y, en caso de que así sea, cuáles son sus tejidos blanco y qué efectos ejercen sobre ellos. Tal vez la GH glucosilada sí sea liberada a la sangre, pues Bollengier y col (97), encontraron que somatotropos de rata en cultivo secretaban varias isoformas de la GH, entre ellas la glucosilada. También, en estudios muy preliminares de L. Berghman (98) de los efectos de gcGH y cGH, administradas exógenamente, sobre la actividad de la 5'-monodeshidrogenasa (que convierte la hormona T<sub>4</sub> en T<sub>3</sub>) de embriones de pollo, se ve que la gcGH tuvo aparentemente un efecto estimulador mayor que la cGH (98). Sin embargo, no se ha demostrado que en el pollo, la gcGH se secrete a la sangre. Esto es necesario para asegurar que los estudios hechos in vitro tengan significancia biológica.

Además, los datos que se reúnen en el presente trabajo y en otros, muestran que la clasificación antigua de las hormonas hipofisarias en exclusivamente holoproteínicas (PRL, GH, ACTH) y glucoproteínicas (FSH, LH y TSH), no se puede seguir sosteniendo.

En el presente trabajo, al estudiar el comportamiento de una nueva variante de la cGH, se demostró que ésta también se subdivide en varias isoformas, al igual que la cGH. Dichas isoformas tienen el mismo PM, pero difieren en carga, como se vio claramente en la electroforesis bidimensional.

Algunos autores han sugerido que la glucosilación de los precursores hormonales sirve, entre otras cosas, para proteger algunas regiones del ataque proteolítico y exponer otras. Una manera de probar esto sería someter a la gcGH a proteólisis y comparar los péptidos obtenidos así con los péptidos obtenidos de la proteólisis de gcGH previamente desglucosilada por medios químicos o enzimáticos. Si el patrón resulta ser diferente, entonces es probable que la glucosilación tenga el papel mencionado. La desglucosilación permitiría además demostrar que la gcGH baja su PM de 29 a 26 kd; y se podría determinar si los azúcares contribuyen de manera significativa a la carga molecular, por medio de un IEF o una electroforesis bidimensional.

También sería interesante determinar si la gcGH tiene una unión comparable a la de la cGH en los receptores de diversos tejidos, así como determinar si la actividad biológica de ambas en bioensayos como el lipolítico y antilipolítico es similar.

## CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método eficiente para el aislamiento de glucoproteínas adenohipofisarias de pollo.
2. Se comprobó la presencia de una variante glucosilada de cGH en la fracción glucoproteínica obtenida. Esta variante resultó ser inmunológicamente activa, y fue reconocida por la lectina Concanavalina A.
3. Esta gcGH presentó un PM aparente mayor (29 kd) que el de la cGH "normal" (26.3 kd), debido a la presencia de carbohidratos.
4. Se obtuvo una fracción pura de gcGH al cromatografiar la fracción glucoproteica en una columna de inmutofinidad.
5. La gcGH pura, al igual que la cGH, también presentó isoformas moleculares en varios sistemas analíticos.
6. En Tris-PAGE, el patrón de bandas de la gcGH es muy parecido al de la cGH, excepto porque aparece corrido hacia el ánodo, lo que indica que las isoformas que componen la gcGH podrían tener una carga ligeramente mayor que las de cGH.
7. El patrón de bandas de la gcGH en el IEF corresponde casi exactamente con el de la cGH. Se observaron 9 bandas, de las cuales sólo 6 se tifen con Con A.
8. En la electroforesis bidimensional, 8 bandas se tifen con Con A, y todas presentan un PM aproximadamente de 29 kd. Con Ac, se revela la existencia de pequeñas cantidades de cGH (26.3 kd) y de un dímero resistente a la reducción.
9. Se demostró ampliamente que la gcGH pura también presenta heterogeneidad estructural, y que constituye un buen modelo para el estudio de las relaciones estructura-función de las proteínas.



## APENDICE 1

### Determinación de la concentración de proteína

Se siguió el método de Lowry y cols, modificado por Hartree (78,79).

#### Soluciones:

Solución A : 0.2 g de tartrato de Na - K y 10 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  disueltos en 50 ml de NaOH 1 N, aforar a 100 ml con agua.

Solución B : 2 g de tartrato de Na - K y 1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  disueltos en 90 ml de agua y 10 ml de NaOH 1 N.

Solución C : 1 volumen del reactivo de Folin - Ciocalteu (0.15 - 0.18 N) diluido en 15 volúmenes de agua.

Estándar : BSA 110  $\mu\text{g/ml}$ . Se toman 10  $\mu\text{l}$  de una sol de BSA al 22 % y se diluyen en 20 ml de agua.

#### Procedimiento:

- La muestra de proteínas se añade por duplicado a tubos de ensayo. En el caso de la BSA, se agregan concentraciones conocidas, de 10 a 110  $\mu\text{g/ml}$  y se lleva el volumen a 1 ml con agua.

- Se agregan 900  $\mu\text{l}$  de la solución A a cada tubo

- Se colocan los tubos en un baño maría a 50 ° C por 10 minutos.

- Se dejan enfriar a temperatura ambiente

- Se agregan 100  $\mu\text{l}$  de la solución B a cada tubo y se dejan así mínimo 10 minutos.

- Se agregan 3 ml de la solución C a cada tubo, mezclando rápidamente en un agitador Vortex por un segundo.

- Se calientan los tubos a 50 ° C por 10 minutos.

- Se dejan enfriar a temperatura ambiente

- Se lee la densidad óptica (D O) de cada tubo a 650 nm en el espectrofotómetro.

- Finalmente, se grafican los datos obtenidos con el estándar (D O contra concentración), se ajusta la mejor recta y se interpolan las D O de las muestras problema.

Cromatografías

Cromatografía en Concanavalina A - Sefarosa.

La resina de Concanavalina A - Sefarosa se obtuvo de Sigma. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4 ° C.

Soluciones:

Amortiguador de equilibrio. Tris 20 mM, NaCl 0.15 M, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Para preparar 250 ml, pesar 0.6057 g de Tris, disolver en 200 ml de agua y ajustar el pH a 7.0 con HCl 3 N. Luego, añadir 2.1915 g de NaCl, 0.0495 g de MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O y 0.0278 g de CaCl<sub>2</sub>.

Solución de α-D-metilglucósido 0.5 M. Se pesan 4.855 g de α-D-metilglucósido y se disuelven en 50 ml de amortiguador de equilibrio.

Solución de α-D-metilmanósido 10 mM. Pesar 0.1942 g de α-D-metilmanósido y disolver en 100 ml de amortiguador de equilibrio.

Solución de α-D-metilmanósido 0.1 M. Se pesan 1.942 g de este azúcar y se disuelven en 10 ml del amortiguador de equilibrio.

Procedido.

A 7 ml de resina se les hicieron 4 lavados con amortiguador de equilibrio (Tris - HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM pH 7.0) para eliminar el amortiguador preservativo y después se transfirió a una jeringa plástica de 10 ml cuyo fondo había sido previamente cubierto con un "lecho" de fibra de vidrio. Se dejó sedimentar la resina y se comprobó que no se fugara pasando más amortiguador.

La muestra (F2, aproximadamente 50 mg) se disolvió en el amortiguador de equilibrio y se aplicó en un volumen pequeño (no mayor de 3 ml). Se dejó interactuar con la resina de 15 a 20 minutos y se eluyó primero con el amortiguador de equilibrio y luego con α-D-metilglucósido y/o α-D-metilmanósido 10 mM y 100 mM disueltos en el mismo amortiguador.

Para realizar esta cromatografía se ocupó el siguiente equipo: un conductímetro LKB-2195, un absorciómetro LKB-2138, un graficador LKB-2210, un colector de fracciones LKB-2070 y una bomba peristáltica Pharmacia P-3.

El flujo de la columna se ajustó a 0.4 ml/minuto, se colectaron fracciones de 2 ml y la velocidad del papel fue de 0.5

mm/minuto.

A las fracciones correspondientes a cada pico obtenido se les determinó la D.O. a 280 nm; posteriormente se juntaron, se dializaron y liofilizaron como se describió anteriormente. La fracción retenida está compuesta exclusivamente por glucoproteínas.

Para regenerar la columna se lavó con los siguientes amortiguadores:

a) Tris - HCl 0.1 M con NaCl 0.5 M pH 8.5 (10 volúmenes). Pesar 1.2114 g de Tris y 2.922 g de NaCl y aforar a 100 ml con agua.

b) Acetato de sodio 0.1 M con NaCl 0.5 M pH 4.5 (10 volúmenes) Pesar 0.287 g de acetato de sodio, 2.922 g de NaCl y disolver en 80 ml de agua. Añadir 372.5 µl de ácido acético glacial y ajustar el pH a 4.5. Aforar a 100 ml.

c) Acetato de sodio 0.1 M pH 6 con NaCl 1 M,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{MnCl}_2$  1 mM y azida de sodio al 0.1 % (10 volúmenes). En este amortiguador se almacena la columna. Pesar 0.7747 g de acetato de sodio, 0.1 g de azida de sodio, 5.844 g de NaCl, 0.0111 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0.0198 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 0.02033 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , disolver en 80 ml de agua, agregar 32 µl de acético y ajustar el pH a 6.0.

Nota: la azida de sodio debe manejarse con cuidado pues es venenosa.

### Cromatografía de inmunofinidad

Se decidió montar una cromatografía de inmunofinidad para la obtención de cGH glucosilada, tal como se describe a continuación:

Se obtuvo IgG anticGH al pasar suero inmune de conejo por una columna de Proteína A - Sefarosa 4E (ésto fue hecho con anterioridad por la Bióloga Rocío Sánchez. Se agradece su colaboración).

El protocolo fue como sigue:

1) Se pasaron por la columna 3 volúmenes de fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0.

2) Se ajustó el flujo a 30 ml/hora.

3) Se aplicaron 2 ml de suero hiperinmune de conejo (vs cGH) previamente centrifugado 3 minutos a 11,000 rpm.

4) Se dejó interactuar por 2 horas.

5) Se lavó con fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0 hasta que desapareció la coloración roja de la columna.

6) Se despegó la IgG con ácido acético 0.1 M - NaCl 0.5 M (se añade con pipeta, no con bomba peristáltica).

7) Se colectaron fracciones de 2 ml, con 100 µl de PBS 10 % en cada tubo.

8) Después de 15 tubos, se neutralizó la columna con fosfatos 0.5 M pH 8.0 (2 o 3 volúmenes).

9) Se lavó la columna con fosfatos 0.1 M pH 8.0 (4 volúmenes), se almacena la columna en este amortiguador pero con azida de sodio al 0.2 %.

10) Las fracciones con proteína (por D O a 280 nm) se juntaron, dializaron contra PBS y se liofilizaron.

#### Columna de inmunoadfinidad.

##### Soluciones:

Solución de acondicionamiento (HEPES 0.1 M pH 7.5). Tomar 1.1915 g de Hepes, disolver en 40 ml de agua, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 50 ml.

Solución de etanolamina 1 M pH 8.0. Esta sustancia debe manejarse con guantes y en la campana. Se toman 0.599 ml, se mezclan con 7 ml de agua, ajusta el pH a 8.0 y se afora a 10 ml.

Amortiguador de equilibrio. Tris 0.1 M pH 7.5. Pesar 1.2111 g de Tris, disolver en 80 ml de agua, ajustar a pH 7.5 y aforar a 100 ml.

Amortiguador de Tris 0.1 M + NaCl 0.5 M. Pesar 1.2114 g de Tris y 2.922 g de NaCl, disolver en 80 ml de agua, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 100 ml.

Acido acético 0.1 M. Tomar 0.6017 ml de ácido acético glacial y aforar a 100 ml con agua.

##### \* Montaje de la columna

Se lavaron 5 ml de resina Affigel 10 (Bio - Rad, activada con N-hidroxisuccinimida) con 1 volumen de agua desionizada fría y se transfirieron a una jeringa plástica de 10 ml con 5 ml de una solución de IgG a 20 mg/ml en HEPES 0.1 M pH 7.5. Se dejó reaccionar 4 horas a 4 °C con agitación en un aparato Milligen 504. La reacción se detuvo con etanolamina 1 M pH 8.0 (0.1 ml por ml de resina); se dejó agitando 1 hora. Después, se lavó la resina con 10 volúmenes de Hepes 0.1 M pH 7.5 y 5 volúmenes de: Tris 0.1 M pH 7.5 (amortiguador de equilibrio), Tris 0.1 M pH 7.5 con NaCl 0.5 M y ácido acético 0.1 M (amortiguadores de elución). La columna se almacena añadiendo azida de sodio al 0.2 % al amortiguador de equilibrio.

##### \* Corrida

La F3 se resuspendió en un volumen pequeño del amortiguador de equilibrio, se aplicó a la columna y se dejó interactuar con ella por 20 minutos. Después se eluyó con el volumen necesario del amortiguador de equilibrio, del Tris 0.1 M + NaCl 0.5 M y del acético 0.1 M. Se colectaron fracciones de 1 ml y se emplearon el equipo y las condiciones antes mencionadas. También, el contenido de los tubos correspondientes a cada pico se juntó, dializó y liofilizó como ya se ha dicho.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Soluciones:

Solución A : Acrilamida 30 % y metilén-bis-acrilamida 8 %. Pesar 50 g de acrilamida y 1.32 g de metilén-bis-acrilamida y disolver en 165 ml de agua.

Solución B : Tris 1.5 M, SDS 0.4 % pH 8.8. Pesar 18.17 g de Tris y disolver en 80 ml de agua, ajustar el pH a 8.8, añadir 4 ml de una solución de SDS al 10 % y aforar a 100 ml.

Solución C : Tris 0.5 M, SDS 0.4 % pH 6.8. Disolver 6.06 g de Tris en 80 ml de agua, añadir 4 ml de una solución de SDS al 10 %, ajustar el pH a 6.8 y aforar a 100 ml.

Solución D : Amortiguador de corrida. Tris 0.025 M, glicina 0.19 M y SDS 0.1 %, pH 8.6. Preparar el volumen necesario.

Solución E : 1.25 ml de solución C, 100  $\mu$ l de SDS al 10 %, 1 ml de glicina, 0.4 ml de azul de bromofenol al 0.05 %. Aforar a 10 ml con agua. Para tener condiciones reductoras, añadir 0.5 ml de 2-mercaptoetanol antes de aforar. Esto corresponde a una concentración final de 5 % de mercaptoetanol.

Solución F : Persulfato de amonio al 10 % en agua. Preparar diariamente.

Para hacer geles resolvidores al 12.5 % de acrilamida, mezclar las siguientes proporciones:

1. Geles de 10.5 x 6 cm y de 1 mm de grosor.

Gel resolvidor (inferior)	Gel concentrador (superior)
Solución B: 1.5 ml	Solución C: 0.945 ml
Solución A: 2.5 ml	0.495 ml
Agua: 2.0 ml	2.31 ml
TEMED: 5.0 $\mu$ l	3.75 $\mu$ l
Solución E: 20 $\mu$ l	18.75 $\mu$ l

Para geles de aproximadamente 16 x 12 cm. de 1.5 mm de grosor:

Gel resolvidor	Gel concentrador
Solución B: 3.75 ml	Solución C: 0.76 ml
Solución A: 14.58 ml	0.92 ml
Agua: 11.66 ml	4.31 ml
TEMED: 29.0 $\mu$ l	7.0 $\mu$ l
Solución E: 116.6 $\mu$ l	35.0 $\mu$ l

Primero se mezclan los reactivos correspondientes al gel resolvidor, excepto la solución F, en un matraz kitasato, se agitan y se aplica vacío de 5 a 10 minutos para desgasificar. Se añade la solución F y la mezcla se aplica al ensamble de vidrios. Se aplica un poco de agua encima para evitar la formación de menisco en el gel. Se deja polimerizar y se repite la operación para el gel concentrador, pero ya no es necesario aplicar el agua.

Pueden correrse hasta 40  $\mu$ g de proteína por carril (geles grandes). La proteína se disuelve en la solución E, de preferencia en proporción 1 : 4. La electroforesis se corre a 50 Voltios (gel concentrador) y a 100 V (gel resolvidor) en el caso de geles chicos, y a 100 V (gel concentrador, y 200 V (gel resolvidor) para los geles grandes.

La corrida termina cuando el frente del colorante llega aproximadamente 0.5 cm arriba de la orilla inferior del gel. Entonces se saca el gel del ensamble de vidrios y se pone a teñir como se indica en el apéndice 7 o se prepara para la electrotransferencia como se indica en el apéndice 8.

Tris-PAGE

\*Tris-PAGE en placa

1) Reactivos

Solución A1. Se disuelven 24 ml de HCl 1 N, 18.15 g de Tris y 115 µl de TEMED en 60 ml de agua desionizada. Se ajusta el pH a 9.4 y se afora a 100 ml.

Solución A2. Se disuelven 28 g de acrilamida y 0.735 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua desionizada. Se filtra con una membrana Millipore de 0.45 µm de poro.

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

Solución B1. Se disuelven 48 ml de HCl 1 N, 6 g de Tris y 460 µl de TEMED en 40 ml de agua. Se ajusta el pH a 7.2 y se afora a 100 ml.

Solución B2. Se disuelven 10 g de acrilamida y 2.5 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua. Se filtra la solución con una membrana de 0.45 µm.

Solución B3. Se disuelven 100 µg de riboflavina en 3 ml de agua y se protege de la luz.

2) Procedimiento

a) Se mezclan las siguientes proporciones de los reactivos, los volúmenes requeridos se calculan según el tamaño de gel que se quiera.

<u>Gel resolvidor</u>			<u>Gel concentrador</u>		
Sol. A1	1 parte	(2 ml)*	Sol. B1	1 parte	(0.75 ml)
Sol. A2	1 parte	(2 ml)	Sol. B2	2 partes	(1.5 ml)
Sol. A3	2 partes	(4 ml)	Sol. B3	1 parte	(0.75 ml)

\* Los volúmenes que se indican corresponden a las cantidades necesarias para preparar un gel resolvidor de aproximadamente 60 x 100 x 1 mm, y un gel concentrador de 10 x 100 x 1 mm.

b) Para hacer el gel resolvidor, se mezclan las cantidades adecuadas de las soluciones A1 y A2, se desgasifica la mezcla con vacío y agitación. Se añade la solución A3 y se vierte la mezcla al molde.

c) Se cubre con agua desionizada o una mezcla de etanol:agua 3:10, para evitar la formación de meniscos. Se deja polimerizar.

d) Se mezclan las soluciones B1 y B2 y se desgasifican. Se quita el agua de encima del gel resolvidor, se le agrega la solución B3 a la mezcla y se vierte en el molde. Se coloca el peine con cuidado para evitar las burbujas y se coloca bajo luz blanca por aproximadamente 20 minutos. La mezcla sobrante se protege de la luz.

e) Las muestras, en las cantidades deseadas, se disuelven con la mezcla sobrante preparada para el gel concentrador, se aplican en los carriles y se vuelve a irradiar con luz blanca por 15 - 20 minutos.

f) Después, el gel listo se transfiere a la cámara de electroforesis y se inicia la corrida a 50 V (gel concentrador) y 100 V (gel resolvidor), de preferencia en el cuarto frío y con los siguientes amortiguadores:

Amortiguador superior: Tris (3 g/lt), glicina (14.5 g/lt) y azul de bromofenol al 0.005 %, pH 8.35.

Amortiguador inferior: Tris (3 g/lt), glicina (14.4 g/lt) pH 9.25.

\*Tris-PAGE en tubo

### Reactivos

Solución A. 30 g de acrilamida y 0.8 g de metilén-bis-acrilamida en un volumen final de 100 ml. Filtrar con membrana de 0.45  $\mu$ m.

Solución B. HCl 1 N (24 ml), Tris (18.15 g), TEMED (0.23 ml), disolver y aforar a 100 ml, pH 8.9.

Solución C. Misma que solución A3 del protocolo anterior.

Solución D. Acrilamida (5.0 g), metilén-bis-acrilamida (1.25 g) en un volumen final de 100 ml. Filtrar.

Solución E.  $H_3PO_4$  1 M (12.8 ml), Tris (2.85 g), TEMED (0.25 ml), mezclar y ajustar el pH a 6.9 con el  $H_3PO_4$  1 M. Aforar a 100 ml.

Amortiguador de la muestra. Tomar 2 ml de solución E y 6 ml de glicerol al 10 %. Se añaden 80  $\mu$ l de azul de bromofenol al 1 %.



Amortiguador de corrida 10 X . Tris (3 g), glicina (14.4 g) se disuelven en 400 ml de agua y se ajusta el pH a 6.35. Se afora a 500 ml. Para usarlo, se diluye 10 veces.

### Equipo

Tubos de vidrio de 8 x 0.5 cm (diámetro interno), silicizados 20 minutos en una solución 1:20 de Photo-Flo, sellados por abajo con Parafilm y suspendidos con ligas en una gradilla.

Cámara de electroforesis con capacidad para 8 tubos.

Fuente de poder.

### Procedimiento

a) Se toman volúmenes iguales (4 ml) de solución A y solución B, se colocan en un matraz Kitazato y se desgasifican al vacío.

b) Se agregan 8 ml de la solución C, se mezcla rápidamente y esta mezcla se vierte dentro de los tubos, cuidadosamente. Después, se añade un poco de agua, con cuidado, para evitar el menisco.

c) Se deja polimerizar aproximadamente 30 minutos.

d) Mientras, se prepara la solución para el gel concentrador, que lleva 2 ml de solución D y 1 ml de sol E. También se desgasifican.

e) Se añade 1 ml de solución C, y se agrega esta mezcla sobre el gel resolventor al que previamente se le retiró el agua, y se deja polimerizar hasta que el gel adquiere un color blanco.

f) Las muestras (aproximadamente 30 µl) se resuspenden en el amortiguador de la muestra, en un volumen final no mayor de 50 µl, y se aplican en los geles.

g) Se inicia la corrida a amperaje constante (1.5 mA por tubo), y una vez que el colorante ha llegado al gel resolventor, se cambia a 3 mA por tubo, hasta que la corrida termina.

### Tinción.

Para tñir, los geles se sacan del molde con una jeringa llena de agua y se colocan en tubos de ensaya conteniendo Negro Amido 10-B al 0.5 % en ácido acético al 7.5 %. Se dejan así toda la noche.

Para desteñir, se sacan los geles del colorante y se colocan dentro de tubos de vidrio de 10 x 0.7 cm (diámetro interno), los cuales deben tener cerrado a medias uno de sus extremos, para impedir que el gel se salga. Estos tubos se ensamblan de nuevo en la cámara, se añade ácido acético al 7 % y se aplican 100 V hasta que el exceso de colorante ha salido de todos los geles.

Los geles pueden almacenarse en tubos de ensayo con ácido acético al 7 % o con agua desionizada.

## APENDICE 5

### Isoelectroenfoque analítico (IEF)

Soluciones: **DONADO POR D. G. B. - B. C.**

Solución 1 : Acrilamida 24.25 % (p/v) y metilen -bis-acrilamida 0.75 % (p/v). Disolver las cantidades apropiadas de cada una en 100 ml de agua y filtrar con una membrana Millipore de 0.45  $\mu$ m. Guardar a 4 ° C en la oscuridad.

Solución 2 : 5'-fosfato de riboflavina al 0.1 % (p/v) en agua. Almacenar a 4 ° C en la oscuridad.

Solución 3 : Persulfato de amonio al 10 % en agua. Preparar fresco cada vez.

Solución 4 : Glicerol al 25 % (v/v)

Soluciones amortiguadoras: Para el cátodo, etiléndiamina 2 M, lisina 20 mM y arginina 20 mM. Para el ánodo, ácido glutámico 20 mM y ácido aspártico 20 mM.

También se requieren TEMED y Anfólinas (intervalo de pH deseado). Se usan directos de la botella.

#### Equipo:

Cámara Bio-Phoresis para IEF (Bio-Rad).

Molde de acrílico para geles horizontales delgados (Bio-Rad).

Placa de vidrio (100 x 125 x 2 mm).

Lámpara de luz blanca.

Tiras de cinta Dymo (2 tiras de 110 x 8 mm y 6 de 10 x 8 mm).

#### Procedimiento:

1. Poner las tiras largas de Dymo en los carriles laterales del molde, sujetarlos con cinta adhesiva transparente. Las tiras pequeñas se pegan sobre el molde. Estos cortes forman pequeños pozos en el gel, en los cuales se aplica la muestra.

2. La placa de vidrio, muy limpia, se coloca sobre las tiras largas de Dymo.

3. Se prepara la solución de monómeros (para un gel de 100 x 125 x 0.6 mm):

Solución de monómeros  
Agua: 8.5 ml  
Solución 1: 3.0 ml  
Solución 4: 3.0 ml  
Anfolitos: 0.75 ml

Solución catalizadora  
Solución 2: 75.0  $\mu$ l  
Solución 3: 22.5  $\mu$ l  
TEMED: 4.5  $\mu$ l

4. Se desgasifica la solución al menos 5 minutos, con agitación y bajo vacío.

5. Añadir la solución catalizadora a la solución de monómeros y agitar ligeramente. Con una pipeta, se aplica la mezcla entre la placa de vidrio y el molde. Primero, se eliminan las burbujas de aire de la punta de la pipeta. Entonces, se deja fluir la solución, formando un frente a lo ancho de la placa, se añade el resto de la solución lentamente. Si aparece una burbuja, debe removerse deslizando la placa hacia los lados o con ayuda de una aguja.

6. Colocar el molde bajo la lámpara de luz blanca, irradiar la solución por 1 hora.

7. Con ayuda de una espátula, levantar y voltear la placa de vidrio, e irradiarle otra vez por 15 minutos, para que se polimerice bien la cara del gel que estuvo en contacto con el acrílico.

8. Remover las esquinas del gel (con cortes diagonales) y cualquier otra parte del gel que alcance los bordes de la placa de vidrio.

9. Colocar la placa en la cámara, sobre la plataforma de cerámica, previamente enfriada ( $4^{\circ} \text{C}$ ), mojada con glicerol al 5%, procurando que no haya burbujas entre el vidrio y la cerámica.

10. Se mojan 2 tiras de papel secante, de tamaño un poco menor al del gel, cada una con alguno de los amortiguadores, se secan ligeramente y se colocan de tal manera que hagan contacto con el gel. Se ajustan los electrodos para que contacten con cada papel.

11. Se aplican las muestras a los pozos con una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l. Las muestras deben estar libres de precipitados y de sales, y de preferencia tener anfolinas al 2% o glicerol al 1%.

12. Se inicia la corrida. Primero, a 5 W (potencia constante). Luego, se incrementa gradualmente la potencia hasta llegar a 12 W y un total de aproximadamente 4000 Voltios por hora. La temperatura se mantiene a  $4^{\circ} \text{C}$  en una atmósfera saturada de nitrógeno.

13. Cuando la corrida termina, el gel se pone sobre hielo frappé y se le determina el gradiente de pH cada cm con un electrodo de superficie. Después, se electrotransfiere como se describe en el apéndice B.

Electroforesis en 2 dimensiones

1ª Dimensión (IEF)

1) Reactivos

Solución de Acrilamida. Se disuelven 30 g de acrilamida y 1.8 g de bis-acrilamida en 100 ml de agua, para tener concentraciones finales de 30 % y 1.8 % respectivamente. Se filtra con una membrana Millipore de 0.45 µm de tamaño de poro.

Solución de anfolinas. Se mezclan 100 µl de anfolinas de intervalo de pH de 8 a 10.5; 100 µl de pH 9 a 11; 150 µl de pH 6 a 8 y 350 µl de pH 3 a 10; dando un volumen final de 800 µl.

Solución de aa. Se pesan 12.5 mg tanto de arginina como de lisina y ácido aspártico y se disuelven en 3.05 ml de agua.

Solución de persulfato. Se pesa 1 mg de persulfato de amonio y se disuelve en 20 µl de agua.

Urea. 5 gramos.

Glicerol 5-40. 120 µl.

Solución D. 1 g de SDS y 0.232 g de DTT se disuelven 10 ml de agua.

Solución E. Se disuelven 0.1 g de DTT, 5.4 g de urea, 0.5 ml de anfolinas (intervalo de pH 3 a 10) en 6.5 ml de agua, y se ajusta el volumen a 10 ml si es necesario.

Procedimiento:

a) La 1ª dimensión (IEF) se lleva a cabo en tubos de vidrio delgados de 5 x 180 mm (diámetro interno 1.5 mm), siliconizados en presencia de una solución de Photo-Flo diluida 1 : 20 en agua. Se secan los tubos, se sellan por un extremo con Parafilm y se suspenden verticalmente en una gradilla con ligas. Se utilizó el equipo Protean II (Bio-Rad).

b) Se pesan 5 g de urea y se añaden a la solución de aa. Cuando se ha disuelto la urea, se agregan todos los reactivos restantes (excepto la solución de persulfato) y se agitan y desgasifican 20 a 25 minutos. Cuando está lista, se agregan 7 µl de TEMED, se filtra y se añade el persulfato.

c) Con una jeringa de aguja muy larga (14 cm), se añade la mezcla preparada a los tubos de vidrio, evitando la formación de burbujas, hasta que se llegue al nivel deseado.

d) Con una jeringa Hamilton, se añade un poco de agua sobre la mezcla aplicada, para evitar el menisco. Se deja polimerizar por 30 o más minutos. Los geles pueden almacenarse a 4 ° C toda la noche para correrse al día siguiente.

e) Los tubos se montan en el equipo de Bio-Rad, y se preparan los amortiguadores de corrida:

Amortiguador catódico: NaOH 0.02 N

Amortiguador anódico: ácido fosfórico 0.06%.

f) Los geles de IEF se precorrieron por 4 horas a 400 V con el objeto de quitar impurezas, formar el gradiente de pH y mejorar la resolución.

g) Mientras, las muestras de proteína (aproximadamente 10 - 15 µg) se incuban 1 hora con una pequeña cantidad (aproximadamente 3 µl) de solución D. Terminado este tiempo, se agregan 50 µl de solución E, y se dejan incubando otra hora más.

h) Cuando acaba la precorrida, se aplica la muestra a los tubos con una jeringa Hamilton, y en el espacio que queda se añade amortiguador catódico. Se cuida que no queden burbujas ni arriba ni abajo de los geles, y se corre primero a 700 V por 2 horas, luego a 900 V por 2 horas, y finalmente a 1000 V por 16 horas.

i) Terminada la corrida, se sacan los geles con ayuda de jeringas llenas de agua, con aguja muy fina, y se almacenan a 20 ° C hasta su utilización en la segunda dimensión, o pueden correrse inmediatamente.

## 2ª Dimensión

Esta consiste en una SDS-PAGE normal, excepto que para hacer el gel concentrador, se usa un peine con un sólo diente, para que el gel cilíndrico pueda acomodarse sobre el gel concentrador con facilidad y en el único carril que se forma, se pongan proteínas de referencia (como estándares de PM).

El gel cilíndrico se transfiere a una espátula acanalada y se equilibra por 5 minutos a 4 ° C en una solución que lleva 30 mg de SDS, 84.79 mg de Tris, 78.13 mg de BTT y 0.5 mg de azul de bromofenol, pH 6.7, en 10 ml de agua.

Después, se retira el exceso de líquido del gel de IEF, y se acomoda sobre el gel de SDS-PAGE y se realiza la corrida en las condiciones usuales.

## APENDICE 7

### Tinciones para geles

Los geles de SDS-PAGE se tñeron con Azul Brillante de Coomassie R-250 al 0.02 % en isopropanol al 25 % y ácido acético al 10 % al menos durante 3 horas. Para desteñir, se usó ácido acético al 7 %.

Los geles de SDS-PAGE que requerían una técnica más sensible (para detectar hasta 100 ng) y los geles de IEF se tñeron con plata, utilizando los reactivos y la técnica descrita por Bio-Rad:

- Solución oxidante (dicromato de potasio y ácido nítrico) 10%.
- Reactivo de plata (nitrato de plata) 10%.
- Solución reveladora ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y paraformaldehído) 32 g/lt.

Se prepara la cantidad necesaria de cada reactivo (generalmente 100 ml para geles de 15 x 12 cm), diluyendo 1:10 cada reactivo. De la solución reveladora se preparan 3 veces más. Los tiempos de incubación varían según el grosor del gel.

Reactivo	Vol. (ml)	Tiempo: geles 0.5-1 mm	1mm.
Metanol 40 % -	200	30 min	60 min
Acético 10 %			
Etanol 10 % -	200	15 min	30 min
acético 5 %			
Etanol 10 % -	200	15 min	30 min
acético 5 %			
Sol. oxidante	100	5 min	10 min
Agua	200	5 min (2 veces)	10 min (3 veces)
React. de plata	100	20 min	30 min
Agua	200	1 min	2 min
Sol. Reveladora	100	30 seg	30 seg
(revelar hasta que la solución se torne color humo)			
Sol. Reveladora	100	5 min	5 min
Sol. Reveladora	100	5 min	5 min
Acético 5 %	200	5 min	5 min
Agua	200		

## APENDICE 8

### Electrotransferencia (ET)

#### Soluciones:

**Amortiguador de transferencia:** Tris 25 mM, Glicina 192 mM y metanol al 20 %, pH 8.3 (no ajustar pH). Pesar 9.09 g de Tris, 43.2 g de glicina y disolver en 1 lt de agua, añadir 600 ml de metanol y aforar a 3 lts con agua.

**Amortiguador de fosfatos (PBS):** Fosfatos 10 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.6. Para preparar una solución stock 5M: pesar 6.9 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 43.75 g de NaCl, disolver en 800 ml de agua, ajustar el pH a 7.6 y aforar a 1 lt. Para usarlo, diluir 1:5 v/v con agua.

**Solución bloqueante:** Gelatina o BSA al 3 %. Disolver 3 g de gelatina o BSA por cada 100 ml de PBS 1M. La gelatina se usa para las inmunotinciones, la BSA se usa para las tinciones con Con A - HRP.

**Solución para lavar (T- PBS):** PBS con Tween 20 al 0.05 %.

**Nota:** Los volúmenes requeridos de las diferentes soluciones para lavar o incubar la membrana de NC dependen del tamaño de ésta. Por ejemplo, se recomienda utilizar volúmenes de 50 ml para membranas de aproximadamente 15 x 12 cm.

**Solución de 1<sup>er</sup> Anticuerpo (anti cGH):** Diluir antisuero 1:2000 v/v en T-PBS con gelatina al 1 %.

**Solución de 2<sup>o</sup> Anticuerpo:** Se usa IgG de cabra acoplada a peroxidasa (Bio-Rad), dirigida contra IgG de conejo. Se diluye 1:3000 v/v en T-PBS con gelatina al 1 %.

**Solución de Con A-HRP:** Disolver la Con A-HRP en T-PBS a una concentración final de 4 µg/ml.

**Solución Reveladora:** 4-cloronaftol 0.05 % p/v, peróxido de hidrógeno 0.015 % v/v, metanol 16.6 %, en PBS. Para 60 ml de solución: pesar 30 mg de 4-cloronaftol y disolverlo en 10 ml de metanol frío. Justo antes de usarse, añadirlo a 50 ml de PBS y agregar 30 µl de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %.

#### Equipo:

Cámara de electrotransferencia Trans-Blot con "cassettes" de transferencia (Bio-Rad) y fuente de poder 250V/2.5 (Bio-Rad).

Papel filtro absorbente grueso (para geles de más de 1 mm de grosor) o delgado (geles de manos de 1 mm de grosor).

Membrana de Nitrocelulosa (NC) de 0.45 µm de poro (Bio-Rad).

Guantes (para manejar el gel y la NC).

#### Procedimiento:

1) Una vez terminada la electroforesis (SDS-PAGE o IEF), se enjuaga el gel con agua y se deja equilibrando en la solución de transferencia de 30 a 45 minutos.

2) Se prepara el "sandwich" de transferencia:

2.a Se abre el cassette y la hoja que quedará del lado catódico se pone sobre el fondo de una palangana que contenga solución de transferencia.

2.b Sobre la hoja de plástico del cassette se coloca una fibra Scotch-Brite (geles > 1 mm) o una esponja (geles < 1 mm) empapada en solución de transferencia.

2.c Sobre la fibra húmeda, se coloca una hoja del papel filtro grueso, también húmeda. (Si se trata de geles delgados, se utiliza esponja y 2 hojas de papel filtro tipo Whatman no. 1).

2.d Se acomoda el gel sobre el papel filtro, sin dejar burbujas.

2.e Saturar una hoja de NC (cortada al tamaño del gel) y colocarla sobre el gel. Con cuidado, pasar un tubo de ensayo, como rodillo, sobre la NC, para eliminar las burbujas.

2.f Poner papel filtro, previamente humedecido, sobre la NC.

2.g Colocar otra fibra (o esponja) humedecida y cerrar el cassette.

3) Se coloca el "sandwich" en la cámara de electrotransferencia en la orientación adecuada (el gel viendo hacia el polo negativo, la nitrocelulosa hacia el polo positivo). Se agrega la solución de transferencia hasta que cubra los electrodos y se coloca la cámara sobre un agitador magnético, pues se mantiene en agitación constante durante toda la corrida.

4) Se tapa la cámara y se conecta a la fuente de poder. La transferencia se realiza a 200 mA durante 30 minutos.

5) Al terminar la corrida, se saca la membrana de NC del sandwich y se lava 2 veces con PBS 1x pH 7.6, 5 minutos cada vez. Después, se deja en solución bloqueante toda la noche a temperatura ambiente.

#### \* Tinción de las membranas

1) Después de bloquear la membrana de NC con albumina o gelatina al 3 %, se lava 2 veces con T-PBS, 5 minutos cada vez.

2) Se incuba la membrana con el primer anticuerpo (2 horas) o con la solución de Con A - HRP (aproximadamente 3.5 - 4 horas) a temperatura ambiente con agitación constante.

3) Lavar la membrana con T-PBS 2 veces, 5 minutos cada vez.

4) En caso de inmunotinción, se incuba la membrana con el 2º anticuerpo por 1 hora. Pasado este tiempo, se lava la membrana de nuevo con T-PBS 2 veces, 5 minutos cada vez.

5) Se lava la membrana con PBS por 5 minutos.

6) Se agrega la solución reveladora y se deja incubando de 20 a 45 minutos, según la rapidez e intensidad con que vayan apareciendo las bandas.

7) Se detiene el revelado por lavado de la membrana con agua por 10 minutos 2 veces.

8) Para secar la membrana, se coloca entre varias hojas de papel filtro absorbente.

Nota: Los estándares de PM se tizaron con Negro Amido al 0.1 % en ácido acético al 10 % y metanol al 45% durante 5 minutos, con agitación. Se destiñó con metanol 90% - ácido acético 2 %.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. 1983. "Molecular Biology of the Cell" Garland Publishing, Inc., Nueva York. pp. 717-768.
- 2) Wilson, J.D. y Foster, D.W. (eds). 1985. "William's Textbook of Endocrinology" 7a. edición. W.B. Saunders Co., U.S.A. pp. 155-205 y 492-613.
- 3) Valverde-R, C., Arámburo, C. y Bayón, A. 1988. "Neuroendocrinología y comunicación intercelular" en Teorías y Hechos sobre la Vida, vol. II, sistemas vivos (J. Muñoz, compilador). Soc. Mex. de Ciencias Fisiológicas - SEP, México. pp. 139-175.
- 4) Krieger, D.T. 1983. "Brain peptides: what, where and why?" Science 222: 975-985.
- 5) Weigent, D.A. y Blalock, J.E. 1987. "Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors" Immunological reviews, 100: 79-108.
- 6) Scanes, C.G. 1986. "The Pituitary Gland" en Avian Physiology, 4a. edición (P.D. Sturkie, ed.) Springer-Verlag, USA. p. 383-402.
- 7) Chawla, R.K., Farks, J.S. y Rudman, D. 1983. "Structural variants of human Growth Hormone: biochemical, genetic and clinical aspects" Annual Review of Medicine 34: 519-547.
- 8) Paladini, A.C., Peña, C. y Poskus, E. 1983. "Molecular biology of Growth Hormone" CRC Crit. Rev. Biochem. 15: 25-56.
- 9) Li, C.H., Evans, H.M. y Simpson, M.E. 1945. "Isolation and properties of the anterior hypophyseal Growth Hormone" J. Biol. Chem. 159: 353-366.
- 10) Raiti, S. y Tolman, R.A (eds). 1986. "Human Growth Hormone" Plenum Medical, USA. pp. 199-210 y 241-256.
- 11) Jefferson, L., Korner, A. 1967. "A direct effect of growth hormone on the incorporation of precursors into proteins and nucleic acids of perfused rat liver" Biochem. J. 104: 826-832.
- 12) Griffin, E., Miller, L. 1974. "Effects of hypophysectomy of liver donor on net synthesis of specific plasma proteins by the isolated perfused rat liver" J. Biol. Chem. 249: 5062-5069.
- 13) McConaghey, P., Siedge, C. 1970. "Production of 'sulfation factor' by the perfused liver" Nature 225: 1249-1250.

- 14) Moon, H., Jentoft, V., Li, C. 1962. "Effect of human growth hormone on growth of cells in tissue culture" *Endocrinology* 70: 31-38.
- 15) Kostyo, J., Hotchkiss, J., Knobil, E. 1959. "Stimulation of aminoacid transport in isolated diaphragm by growth hormone added in vitro" *Science* 130: 1653-1654.
- 16) Beach, R. y Kostyo, J. 1968. "Effect of growth hormone on the DNA content of muscles of young hypophysectomized rats" *Endocrinology* 82: 882-884.
- 17) Hjalmarson, A., Isaksson, O., Ahrén, K. 1969. "Effects of Growth Hormone and insulin on aminoacid transport in perfused rat heart" *Am. J. Physiol.* 217: 1795-1802.
- 18) Goodman, H. 1968. "Multiple effects of GH on lipolysis" *Endocrinology* 83: 300-308.
- 19) Fain, J., Kovacev, V. y Scow, O. 1965. "Effect of growth hormone and dexamethasone on lypolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat" *J. Biol. Chem.* 240: 3522-3529.
- 20) Perera Marín, G. 1989. "Estudios comparativos de la hormona de crecimiento de pollo. Análisis de bioactividad de la GH bajo diferentes condiciones fisiológicas" Tesis de Maestría, Fac. de Ciencias, UNAM.
- 21) Atkison, P., Weidman, E., Bhaumick, E., y Bala, R. 1980. "Release of Somatomedin-like activity by cultured WI-38 human fibroblasts" *Endocrinology* 106: 2006-2012.
- 22) Daughaday, W.H y Reeder, C. 1966. "Synchronous activity of DNA synthesis in hypophysectomized rat cartilage by growth hormone" *J. Lab. Clin. Med.* 68: 357-368.
- 23) Whitfield, J., MacManus, J., Rixon, R. 1971. "Stimulation by growth hormone of DNA synthesis and proliferation of rat thymic lymphocytes" *Horm. Metab. Res.* 3: 28-33.
- 24) Desai, L., Lazarus, H., Li, C., y Foley, G. 1973. "Human leukemic cells: effect of human growth hormone" *Exp. Cell Res.* 81: 330-332.
- 25) Golde, D. Bersch, N. y Li, C. 1977. "Growth Hormone: species-specific stimulation of erythropoiesis in vitro" *Science* 196: 1112-1113.
- 26) Bertelowitz, M., Szabo, M, Frohman, L, Firestone, S y Chu, L. 1981. "Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary" *Science* 212: 1279-1281.
- 27) Paladini, A., Peña, C. y Retegui, L. 1979. "The intriguing

nature of the multiple actions of Growth Hormone". Trends in Biochemical Sciences (TIBS), noviembre 1979. pp. 256-260.

28) Isaksson, O., Eden, S. y Jansson, J. 1985. "Mode of action of pituitary Growth Hormone on target cells" Ann. Rev. Physiol. 47: 483-489.

29) Nielsen, J.H. 1982. "Effects of GH, PRL and PL on insulin content and release and DNA synthesis in cultured pancreatic islets" Endocrinology 110: 600-605.

30) Green, H., Morikawa, M. y Nixon, T. 1985. "A dual effector theory of growth hormone action" Differentiation 29: 195-198.

31) Mathews, L., Norstedt, G. y Palmiter, R. 1986. "Regulation of IGF-I gene expression by Growth Hormone" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9343-9347.

32) Hynes, M., Van Wyk, J., Brooks, J., D'Ercole, A., Jansen, M. y Lund, P. 1987. "Growth Hormone-dependence of Somatomedin-C/IGF-I and IGF-II messenger ribonucleic acids" Mol. Endocrinol. 1: 233-242.

33) Doglio, A., Dani, C., Grimaldi, P. y Allhaud, G. 1986. "Growth Hormone regulation of expression of differentiation-dependent genes in preadipocyte Ob1771 cells" Biochem. J. 238: 123-129.

34) Zezulak, K. y Green, H. 1986. "The generation of IGF-I-sensitive cells by growth hormone action" Science 223: 551-553.

35) Isaksson, O. y cols. 1982. "Growth Hormone stimulates long bone growth directly" Science 218: 1237-1238.

36) Lewis, U.J. 1984. "Variants of Growth Hormone and Prolactin and their postranslational modifications" Ann. Rev. Physiol. 46: 33-42.

37) Ferguson, K. y Wallace, A. 1961. "Prolactin activity of Growth Hormone" Nature 190: 632-633.

38) Barret, R., Friesen, H. y Astwood, E. 1962. "Characterization of pituitary and peptide hormones by electrophoresis in starch gel" J. Biol. Chem. 237: 432-439.

39) Chrambach, A., Yadley, R., David, B. y Rodbard, D. 1973. "Isohormones of human growth hormone I. Characterization by electrophoresis and isoelectrofocusing in polyacrilamide gel" Endocrinology 93: 848-875.

40) Lewis, U.J., Singh, R., Peterson, S. y Vanderlaan, W. 1976. "Human Growth Hormone: a family of proteins" en 'GH and related peptides' ed. por A. Pecile y E. Muller, Elsevier, New York.

41) Lewis, U., Singh, R., Tutwiler, G., Sigel, M., Vanderlaan, E.

y Vanderlaan, W. 1980. "Human Growth Hormone: a complex of proteins" Rec. Prog. Horm. Res. 36: 447-508.

42) Carranza Salas, M. 1987. "Purificación y caracterización de la hormona de crecimiento (GH) hipofisiaria de pollo" Tesis de Lic. de Biología, Fac. de Ciencias, UNAM.

43) Montiel Hernández, J.L. 1989. "Isoformas moleculares de la hormona de crecimiento de pollo (cGH)" Tesis de Lic. de Biología, Fac. de Ciencias, UNAM.

44) Arámburo, C., Carranza, M., Sánchez, R. y Perera, G. 1989. "Partial Biochemical and Biological Characterization of purified chicken Growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated" Gen. Comp. Endocrinol. 76: 330-339.

45) Arámburo, C., Montiel, J.L., Perera, G., Navarrete, S. y Sánchez, R. 1990. "Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH). Different bioactivities of cGH charge variants" Gen. Comp. Endocrinol., (en prensa).

46) Arámburo, C., Campbell, R. y Scanes, C. 1989. "Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lyophilic and non-lyophilic variants" Life Sci. 45: 2201-2207.

47) Houston, B. y Goddard, C. 1988. "Molecular forms of growth hormone in the chicken pituitary gland" J. Endocrinol. 116: 35-41.

48) Gorden, P., Hendricks, C. y Roth, J. 1973. "Evidence for big and little components of human plasma and pituitary growth hormone" J. Clin. Endocrinol. Metab. 36: 173-184.

49) Stolar, M. y Baumann, G. 1986. "Big growth hormone forms in human plasma: immunochemical evidence for their pituitary origin" Metabolism 35: 75-77.

50) Lewis, U., Peterson, S., Bonewald, L., Seavey, B. y Vanderlaan, W. 1977. "A interchain disulfide dimer of human growth hormone" J. Biol. Chem. 252: 3697-3702.

51) Becker, G., Bowsfier, R., Mackellar, W., Poor, M., Tackitt, P. y Riggan, R. 1987. "Chemical, physical and biological characterization of a dimeric form of biosynthetic human growth hormone" Biotech. Appl. Biochem. 9: 478-487.

52) Clapp, C., Sears, P., Russell, D., Richards, J., Levay-Young, E. y Nicoll, C. 1988. "Biological and immunological characterization of cleaved and 16 k forms of rat PRL". Endocrinology 122(6): 2892-2898.

53) Davis, R., Morris, J. e Ivarie, R. 1987. "The polypeptide P16 is a carboxy-terminal cleavage product of rat growth hormone in anterior pituitary and GH3 tumor cells" Mol. Endocrinol. 1: 102-

- 54) Ng, F. y Bornstein, J. 1978. "Hyperglycemic action of synthetic C-terminal fragments of human growth hormone" *Am. J. Physiol.* E521-E526.
- 55) Salem, M. 1988. "Effects of the amino-terminal portion of human growth hormone on glucose clearance and metabolism in normal, diabetic, hypophysectomized and diabetic-hypophysectomized rats" *Endocrinology* 123 (3): 1565-1576.
- 56) Stevenson, R., Stebbing, N., Rudman, C., Williams, P. y Cherrington, A. 1987. "The synthetic 32 - 46 fragment of hGH increases insulin and glucagon levels in the conscious dog" *Metabolism* 36 (4): 400-404.
- 57) Mondon, C., Reaven, G., Ling, G., Lewis, U. y Frigeri, L. 1988. "An amino-terminal peptide of growth hormone enhances insulin action in normal rats" *Endocrinology* 123 (2): 827-833.
- 58) Frankenne, F., Rentier-Delrue, F., Scippo, M., Martial, J. y Hennen, G. 1987. "Expression of the GH-V gene in human placenta" *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64 (3): 635-637.
- 59) Cooke, N., Ray, J., Emery, J. y Liehaber, S. 1988. "Two distinct species of hGH-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins" *J. Biol. Chem.* 263: 9001-9006.
- 60) Howland, D., Farrington, M., Taylor, W. y Hymer, W. 1987. "Alternative splicing model for the synthesis and secretion of the 20 kd form of rat GH" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147: 650-657.
- 61) Chapman, G., Rogers, K., Brittain, T., Bradshaw, R., Bates, O., Turner, C. 1982. "The 20,000 MW-variant of human growth hormone" *J. Biol. Chem.* 256: 2395-2401.
- 62) Smal, J., Closset, J., Hennen, G. y Meyts, P. 1987. "The receptor binding properties of human growth hormone and its 20 k variant in rat adipocytes" *J. Biol. Chem.* 262 (3): 11071-11079.
- 63) Sigel, M., Thorpe, N., Kobrin, M., Lewis, U., Vanderlaan, W. 1981. "Binding characteristics of a biologically active variant of human Growth Hormone (20 k) to GH and lactogen receptors" *Endocrinology* 108:1600-1603.
- 64) Hughes, J. and Friesen, H. 1985. "The nature and regulation of the receptors for pituitary growth hormone" *Ann. Rev. Physiol.* 47: 469-482.
- 65) Baumann, G., Stolar, M. y Buchanan, T. 1985. "Slow metabolic clearance rate of the 20,000-da variant of hGH: implications for biological activity" *Endocrinology* 117 (4): 1309-1313.

- 66) Lecomte, C., Renard, A. y Martial, J. 1987. "A new natural hGH variant -17.5 kd- produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branch point selection" *Nucleic Ac. Res.* 15: 6331-6348.
- 67) Lewis, U., Singh, R., Lewis, L., Seavey, B y Sinha, Y. 1984. "Glycosylated ovine prolactin" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 385-389.
- 68) Lewis, U., Singh, R., Sinha, Y. y Vanderlaan, W. 1985. "Glycosylated human prolactin" *Endocrinology* 116: 359-363.
- 69) Pankov, Y. y Butnew, V. 1986. "Multiple forms of pituitary PRL - a glycosylated form of porcine PRL with enhanced biological activity" *Int. J. Pept. Prot. Res.* 28: 113-123.
- 70) Markoff, C., Siegel, M., Lacour, N., Seavey, B., Friesen, H. y Lewis, U. 1988. "Glycosylation selectively alters the biological activity of PRL" *Endocrinology* 123 (3): 1303-1306.
- 71) Shimomura, K. y Bremel, R. 1988. "Characterization of bPL as a glycoprotein with N-linked and O-linked carbohydrate side chains" *Molec. Endocrinol.* 2: 845-853.
- 72) Sinha, Y. y Lewis, U. 1986. "A lectin-binding immunoassay indicates a possible glycosylated growth hormone in the human pituitary gland" *Biochem Biophys. Res. Commun.* 140 (2): 491-497.
- 73) Sinha, Y. y Jacobsen, B. 1987. "Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations" *Biochem Biophys. Res. Commun.* 145 (3): 1368-1375.
- 74) Berghman, L., Lens, P., Decuypere, E., Kuhn, E. y Vandesande, F. 1987. "Glycosylated chicken growth hormone" *Gen. Comp. Endocrinol.* 68: 408-414.
- 75) Arámburo, C., Sánchez, R., Fenton, B., Perera, G. y Valverde, C. 1989. "Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la detección de hormona de crecimiento de pollo (cGH)" *Veterinaria México* 20: 397-405.
- 76) Burke, W., Licht, P., Papkoff, H. y Bona-Gallo, A. 1979. "Isolation and characterization of LH and FSH from the pituitary gland of the turkey (Meleagris gallopavo)" *Gen. Comp. Endocrinol.* 37: 508-520.
- 77) Papkoff, H., Licht, P., Bona-Gallo, A., Mackenzie, D., Oleofsen, W y Oosthuizen, M. 1982. "Biochemical and immunological characterization of pituitary hormones from the ostrich (Struthio camelus)" *Gen. Comp. Endocrinol.* 48: 181-195.
- 78) Lowry, D., Rosenbrough, N., Farr, A. y Randall, R. 1951. "Protein measurement with the Folin-phenol reagent" *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- 79) Hartree, C. 1972. "Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response" *Analyt. Biochem.* 48: 422-427.
- 80) Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature* 227: 682-685.
- 81) Nicoll, C. y Licht, R. 1971. "Evolutionary biology of PRLs and somatotrophins. II. Electrophoretic comparison of tetrapod somatotrophins" *Gen. Comp. Endocrinol.* 17: 490-507.
- 82) O'Farrell, P. 1975. "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins" *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- 83) Dunbar, B. 1985. "Protein analysis using high-resolution 2-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis" en 'Lab. Methods manual for hormone action & molecular endocrinology' (W. Shrader y B. O'Malley, eds), 9a. edición, Houston Biol. Assoc, Inc. pp. 1-35.
- 84) Dunn, M. y Burghes, A. 1983. "High resolution 2-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis I. Methodological procedures" *Electrophoresis* 4: 97-116.
- 85) Hochstrasser, D., Harrington, M., Hochstrasser, A., Miller, M. y Merrill, C. 1988. "Methods for increasing the resolution of 2-dimensional protein electrophoresis" *Analyt. Biochem.* 173: 424-435.
- 86) Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1978. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- 87) Fursel, V., Pinkert, C., Miller, K., Bolt, D., Campbell, R., Palmiter, R., Brinster, R. y Hammer, R. 1989. "Genetic engineering of livestock" *Science* 244: 1281-1287.
- 88) Arámburo, C., Donoghue, D., Montiel, J.L., Berghman, L. y Scanes, C. 1990. "Phosphorylation of chicken growth hormone" *Life Sci.* (enviado a publicación).
- 89) Navarrete, S., Montiel, J., Sánchez, R. y Arámburo, C. "Identificación de hormona de crecimiento de pollo (cGH) glucosilada" resumen J-065. XVII Congreso Nal. de la Soc. Mex. de Bioquímica, A.C. 6-11 noviembre 1988. Oaxaca, Oax, México.
- 90) Osawa, T. y Tsuji, T. 1987. "Fractionation and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins" *Ann. Rev. Biochem.* 56: 21-42.
- 91) Loh, P. y Gainer, H. 1979. "The role of carbohydrate in the stabilization, processing and packaging of the glycosylated corticotropin-endorphin common precursor in toad pituitaries" *Endocrinology* 105 (2): 474-487.

- 92) Hopkins, C. 1975. "Synthesis and secretion of a large glycoprotein in the pars intermedia" J. Endocrinol. 65: 225-231.
- 93) Sharon, N. y Lis, H. 1982. "Glycoproteins" en 'The proteins', vol. 5 pp. 1-144 (Neurath, H. y Hill, R. eds).
- 94) Keesey, J. 1987. "Biochemica Information. A revised biochemical reference source" Boehringer-Manheim biochemicals. Indianapolis.
- 95) Souza, L., Boone, T., Murdock, D., Langley, K., Wyupych, J., Fenton, D. 1984. "Application of DNA technologies to studies on rat GH" J. Exp. Zool. 232: 465-473.
- 96) Nicoll, C., Mayer, G. y Russell, S. 1986. "Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties" Endoc. Rev. 7: 169-203.
- 97) Bollengier, F., Velkeniers, B., Hooghe, E., Mahler, A. y Vanhaelst, L. 1988. "Multiple forms of rat PRL and GH in pituitary cell subpopulations separated using a Percoll gradient system: disulfide-bridged dimers and glycosilated variants" J. Endocrinol. 120: 201-206.
- 98) Berghman, L. 1988. "Localization, isolation, and quantification of pituitary glycoprotein hormones from the chicken (Gallus domesticus) using monoclonal antibodies" Tesis doctoral, Universidad Católica de Lovaina, Bélgica.