

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

F. M

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

Campus Juriquilla

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE
LA VARIANTE GLICOSILADA DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

Biomedicas

P R E S E N T A

275532

LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

Querétaro, Qro. 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

CAMPUS UNAM-UAQ JURIQUILLA APDO. POSTAL 1-1141 QUERETARO, QRO. 76001

TELS.: (525) 623-40-16 Y 17, FAX: 623-40-17

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Los miembros del Comité de Tesis certificamos que la tesis elaborada por Laura Cristina Berumen Segura intitulada Caracterización bioquímica y funcional de la variante glicosilada de la hormona del crecimiento y presentada como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente Dr. Alejandro Alagón Cano

Secretario Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera L.

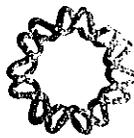
Vocal Dr. Carlos Arámburo de la Hoz (tutor)

Suplente Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Suplente Dra. Maricela Luna Muñoz

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda
Coordinadora de Posgrado



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Cuernavaca, Mor. a 31 de Enero del 2000

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar
UNAM
PRESENTE

Estimado Ing. Silva:

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Caracterización bioquímica y funcional de la variante glicosilada de la hormona de crecimiento" de la alumna Laura Cristina Berumen Segura inscrita en la Maestría de Neurobiología y aspirante al grado de Maestra en Neurobiología, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y es aceptable para ser presentada en el examen de grado. Por tanto, emito mi voto aprobatorio al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr. Alejandro Alagón Cano
Sinodal



RESUMEN

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE LA VARIANTE GLICOSILADA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La Hormona de Crecimiento (GH) es una familia de variantes moleculares, cuya existencia puede deberse al producto de diferentes genes, a un procesamiento alternativo del ARNm o a modificaciones postraduccionales como agregación, fosforilación, desamidación, proteólisis y glicosilación. Con esta heterogeneidad puede explicarse, al menos parcialmente, la gran diversidad funcional de la hormona. La variante glicosilada de la GH se ha descrito en algunas especies de vertebrados, por ejemplo, en el cerdo su proporción en plasma y en hipófisis varía durante el embarazo y el desarrollo fetal; además, su tasa de depuración es menor que la de la forma no glicosilada. En este trabajo se purificó la GH glicosilada de pollo (G-cGH), con un método alternativo que no recurre a la precipitación con sulfato de amonio, a partir de hipófisis de pollos de engorda mediante cromatografía de inmunoafinidad (sefariosa 4B acoplada a anticuerpo monoclonal contra cGH) y por una columna de sefariosa acoplada a Concanavalina A. Al analizarse con SDS-PAGE y *Western Blot (WB)*, se identificaron dos bandas inmunorreactivas mayoritarias con pesos moleculares de 26 y 30 KDa en condiciones reductoras (R), y de 23 y 27KDa, en condiciones no reductoras (NR). Las bandas de 26 y 23KDa correspondieron al monómero de cGH, mientras que las de 30 y 27 KDa, a la G-cGH evidenciándose por *WB/tinción* para glicoproteínas (oxidación de azúcares-biotinización). El tipo de glicosilación se determinó con las siguientes enzimas: PNGasaF, NANasa II, O-glicosidasas_{PS}, Endoglicosidasá F y H. La G-cGH fue susceptible a la acción de la PNGasaF, dado que su peso molecular varió de 30 a 26 Kda (R), pero no presentó cambios ante la acción de la NANasa, la O-glicosidasa ni la Endoglicosidasa F ni H. Estos resultados sugieren que la G-cGH presenta un enlace N-glicosídico, lo que coincide con la presencia de una secuencia consenso para N-glicosilación en su estructura primaria, ubicada en la posición 188-190. La glicosilación de hormonas proteínicas se traduce en cambios en su vida media, así como modificación en su unión al receptor. Para la unión a receptores hepáticos, la constante de afinidad de la G-cGH es de 0.07 nM y la capacidad o Bmax es de 4.77 fmol/mg, mientras que para la hormona recombinante (r-cGH) son de 0.015nM y 3.5 fmol/mg, respectivamente.

Este trabajo se realizó en el laboratorio Bioquímica de Hormonas del Doctor Carlos Arámburo de la Hoz, en el Centro de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro.

El proyecto se llevó a cabo con el apoyo y recursos de los donativos de PAPIIT-UNAM IN 206196 y CONACYT 3455PN, beca para estudios de maestría de CONACYT 118220 y complemento de beca por parte de la DGEP-UNAM 98855058; así como con el apoyo con material biológico de Pilgrim's Pride de México, S.A. de C.V.

AGRADECIMIENTOS

A Dios N.S., principio y fin de mi existencia, quien ha sido la luz de mi camino y a quien le debo todo lo que soy.

A mis padres, Amelia y Luis Felipe por todo el apoyo que me han brindado sin condición alguna, y quienes siempre depositaron su confianza en mí para poder terminar esta etapa de mi vida con éxito. A ellos les dedico esta obra desde lo más profundo de mi corazón sin poder contar con palabras para expresar todo mi agradecimiento.

A mis hermanos Luis Felipe y José Francisco por su comprensión y ánimo vertidos en mí para poder seguir adelante.

A Luis Oscar, por todo el cariño y amor que me ha brindado durante este tiempo, quien me enseñó a ver la belleza de todo lo que nos rodea, por todos esos momentos felices que me ha dado, por su sinceridad e incondicional apoyo, sus consejos y fortaleza, por darme fuerzas para no desfallecer ante las situaciones adversas que en la vida se presentan.

A mis abuelos por haber hecho de mis padres un ejemplo de fortaleza y ganas de vivir. Por todos sus consejos y cariño, por su amor y experiencia.

A mi familia y a mis amigos, por todas sus muestras de cariño y afecto, a ustedes dirijo mi trabajo.

A nuestra Universidad, la UNAM, a la que debo mi formación y planteamiento de horizontes.

Al Doctor Carlos Arámburo de la Hoz, por su apoyo y asesoría, por permitir desarrollar mis estudios bajo su dirección, y sobre todo por la comprensión y confianza que depositó en mí para terminar este trabajo.

A Maricela, por su comprensión y apoyo incondicional, a ella le ofrezco todo el esfuerzo que he realizado para llegar al cumplimiento de esta meta.

A los Doctores Mauricio Díaz Muñoz y Edgar P. Heimer, por sus valiosos consejos y observaciones.

A Martha, Hilda, Gerardo, Javier y Pilar por la atención y detalles que tuvieron conmigo. Gracias.

A mis maestros, a quienes con su esfuerzo, dedicación y compromiso fortifican día con día las bases de la educación en nuestro país, gracias por compartir conmigo sus experiencias y conocimientos.

Al Dr. Luc Berghman, a Pilgrim's Pride de México, S.A. de C.V., por proporcionarnos material necesario para la realización del proyecto.

Dedico un agradecimiento especial por el soporte técnico y académico que me brindaron las diferentes unidades de apoyo del Centro de Neurobiología: a la Lic. Pilar Galarza, Biblioteca; al MVZ Martín García, Bioterio; al Dr. Fernando Barrios, Lic. Ma. de Lourdes Lara e Ing. Rafael Favila, Unidad de Imagen; al M.en C. Alberto Lara e Ing. Antonio Altamirano, Unidad de Cómputo; a Arturo García, Dibujo y Fotografía; así como a los miembros del comité que revisaron este trabajo: Dr. Alejandro Alagón, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Dr. Mauricio Díaz, Dra. Maricela Luna y Dr. Carlos Arámburo. En el trabajo de laboratorio, por su participación a la Dra. Maricela Luna, M.en C Martha Carranza y T.A. Gerardo Courtois.

A todos los que de una u otra forma contribuyeron para la realización de esta obra, a ellos les ofrezco los frutos de mi trabajo.

INDICE

RESUMEN	
AGRADECIMIENTOS	
INTRODUCCIÓN	... 1
Hipófisis	... 2
Hormona de crecimiento	... 7
Efectos de la hormona de crecimiento	... 8
Estructura de la molécula	... 11
Heterogeneidad molecular	... 14
Variantes moleculares en la GH de pollo	... 17
Síntesis de la hormona de crecimiento	
Transcripción del gen de la hormona de crecimiento	... 22
Traducción, almacenamiento y secreción de la hormona de crecimiento	... 25
Regulación de la síntesis y secreción de la hormona de crecimiento	... 26
Metabolismo de la hormona de crecimiento	... 28
Glicosilación	... 29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (JUSTIFICACIÓN)	... 34
HIPÓTESIS	... 35
OBJETIVOS	... 36
MATERIALES Y MÉTODOS	... 37
Material biológico	
Reactivos	
Métodos	
Purificación del anticuerpo monoclonal contra cGH	... 37
Purificación de la cGH total	... 38
Purificación de la hormona de crecimiento de pollo glicosilada	... 39
Análisis electroforético	... 40
Digestión enzimática	... 41
Tratamiento de cGH con O-Glicosidasa, Neuraminidasa II y Péptido N-glicosidasa F (cocktail enzimático)	... 41

Tratamiento de cGH y G-cGH con Péptido N-glicosidasa F	... 41
Tratamiento de cGH y G-cGH con O-Glicosidasa, Neuraminidasa II o Endoglicosidasa F	... 42
Tratamiento de G-cGH con endoglicosidasa H	... 42
Tratamiento de G-cGH con carboxipeptidasa B	... 42
Tratamiento de G-cGH con carboxipeptidasa Y	... 43
Tratamiento de G-cGH con trombina	... 43
RESULTADOS	... 44
DISCUSIÓN	... 66
CONCLUSIONES	... 77
REFERENCIAS	... 78
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	... 91
LISTA DE ABREVIATURAS	... 94
ANEXOS	
Anexo I Purificación de Anticuerpos monoclonales anti-cGH (MAb α cGH) por Cromatografía de afinidad en Proteína A-Sefarosa	... 98
Anexo II Purificación de cGH. Cromatografía de Inmunofinidad. (MAb α cGH Acoplado a Sefarosa 4B Activada con BrCN)	... 100
Anexo III Cromatografía en Concanavalina A-Sefarosa	... 103
Anexo IV Electroforesis. SDS-PAGE	... 105
Anexo V Electrotransferencia de proteínas (Western Blot)	... 108
Anexo VI (A) Quimioluminiscencia	... 109
Anexo VI (B) Inmunotinción con anticuerpo policlonal	... 111
Anexo VI (C) Tinción con Concanavalina A conjugada con HRP	... 113
Anexo VI (D) Inmunotinción con oxidación/estreptavidina-biotina, AP	... 114
Anexo VII Cuantificación de proteínas. Ensayo de proteína <i>Bio-Rad</i>	... 117

INTRODUCCIÓN

La vida, desde la más pequeña célula hasta los complejos organismos multicelulares, consiste de sistemas fisicoquímicos complejos y abiertos que tienden a mantenerse en un estado estacionario y alejados del equilibrio termodinámico mediante el intercambio de energía y materia que establecen con su medio ambiente (*Valverde, 1993*), en donde queda implícito el manejo de información para mantener estos estados “organizados”. En todos los organismos multicelulares, el crecimiento, diferenciación y metabolismo de multitud de células en los distintos tejidos y órganos están coordinados por una elaborada red de comunicaciones intercelulares. Entre pequeños grupos de células, la comunicación se establece a menudo por contactos directos célula-célula, como por ejemplo en las sinapsis eléctricas o en los grupos celulares que tienen uniones comunicantes (en hendidura, *gap junctions*), así como la señalización por contacto por medio de moléculas unidas a la membrana plasmática. Pero las células también tienen que comunicarse a través de distancias mayores que aquéllas que pueden facilitar las cadenas de contactos intercelulares. En estos casos hay productos celulares que actúan como mensajeros. Estas sustancias específicas son sintetizadas y liberadas por las células que envían el mensaje y entonces se desplazan hacia otras células, entre las cuales solamente inducen una respuesta específica en aquellas células blanco que poseen receptores para las moléculas mensajeras. Las células utilizan para comunicarse entre ellas una enorme variedad de sustancias químicas y mecanismos de señalización; ejemplo de ello son las sinapsis químicas (*Alberts, 1994; Darnell, 1993*).

En un organismo complejo se hace uso de todos los tipos de comunicación mencionados, para poder coordinar las funciones en su conjunto y destaca la participación del sistema endocrino en donde una hormona, sustancia química secretada en los líquidos corporales internos por una célula o grupo de células denominado glándula, ejerce un efecto de control fisiológico sobre otras células del organismo (*Guyton, 1996*).

HIPÓFISIS

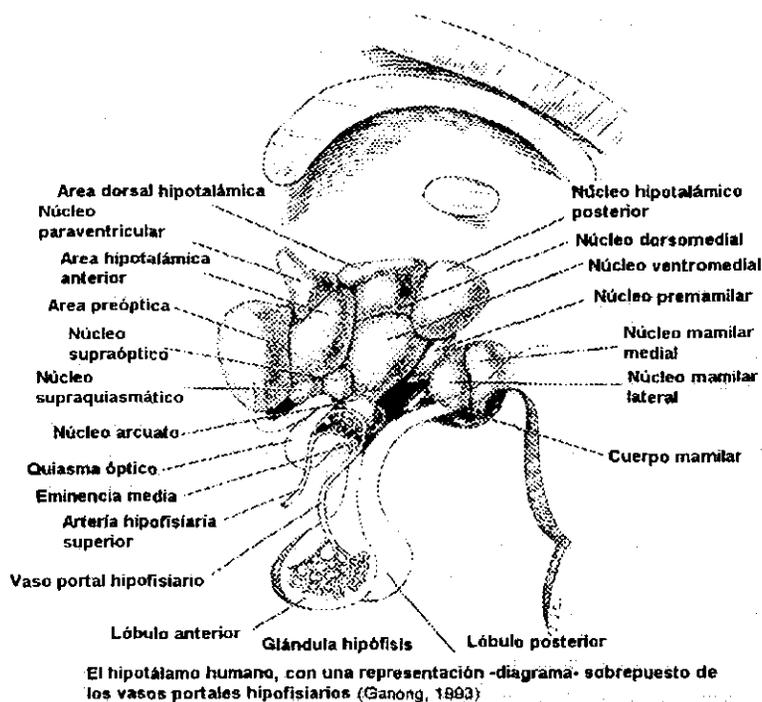
La hipófisis, también denominada glándula pituitaria, es una de las glándulas endocrinas cuya producción hormonal se ha estudiado ampliamente y su importancia se refleja incluso al haberse conocido como la “glándula maestra”. El papel funcional de la glándula hipófisis fue reconocido por primera vez a través de las manifestaciones clínicas generadas por hipersecreción de la hormona de crecimiento (GH; por sus siglas en inglés *Growth hormone*). Se atribuye a Pierre Marie (1886) el comienzo de la fisiología de la hipófisis al describir el engrandecimiento de la glándula en la acromegalia y fue Oscar Minkowski quien en 1887 refirió la asociación del cuadro clínico de acromegalia con un tumor de la glándula. El nombre de pituitaria proviene del latín “pituita”, que significa “flema”, pues se pensaba que servía para proveer de humedad a las fosas. Sin embargo, la relación causa-efecto fue establecida hasta el año de 1900 por Hutchinson quien dijo “... en el cuerpo de la pituitaria parece que tenemos una especie de centro regulador del crecimiento para todo el cuerpo, cuya alteración en etapas iniciales de la vida producirá el fenómeno de gigantismo y más tarde acromegalia” (Baulieu, 1990). Para 1921 Evans y Long lograron inducir crecimiento en ratas mediante la inyección de extractos hipofisarios; simultáneamente se reconocieron por primera vez efectos gonadotrópicos. La hipofisectomía como modelo experimental fue introducida por Aschner en 1909, aunque no fue sino hasta 1927 que Smith demostró sus consecuencias en mamíferos. Smith observó que las ratas hipofisectomizadas no podían crecer, además de exhibir atrofia de las gónadas, tiroides y suprarrenales y que estos efectos se hacían reversibles mediante la colocación de implantes hipofisarios. Ésto había sido anticipado 10 años antes por Allen (1917) quien efectuó estudios paralelos en renacuajos (larvas de rana) hipofisectomizados describiendo varias funciones de la hipófisis que involucraban las descritas por Smith (Thorner et al, 1998).

La hipófisis es una glándula pequeña - alrededor de 1 cm de diámetro y de 0.5 a 1 gramo de peso en el humano hasta 0.005g en ranas - situada en la silla turca, cavidad ósea en la base del cráneo, y conectada con el hipotálamo por el tallo hipofisario. Desde el punto

de vista anatómico, la hipófisis se puede dividir en dos porciones distintas: hipófisis anterior, también denominada adenohipófisis, e hipófisis posterior, también conocida como neurohipófisis. La adenohipófisis se puede dividir en tres regiones o *pars*: *pars distalis* (anterior), *pars tuberalis* y una zona pequeña y relativamente avascular denominada *pars intermedia*, que casi no existe en el ser humano y no existe en aves aunque es mucho más grande y funcional otros vertebrados. En cuanto a la neurohipófisis, se pueden identificar dos regiones: la eminencia media y la *pars nervosa*, además del tallo infundibular (tallo neural) (Cuyton, 1996; Norris, 1980).

Desde el punto de vista embriológico, las dos porciones de la hipófisis tienen

origenes diferentes: la hipófisis anterior en la bolsa de Rathke, invaginación embrionaria del epitelio faríngeo, y la hipófisis posterior en una excrecencia del hipotálamo -infundíbulo-. El origen de la hipófisis anterior en el epitelio faríngeo explica la naturaleza epiteliforme de sus células, mientras que el origen de la hipófisis posterior a partir de un



tejido nervioso explica la presencia de gran número de células de tipo glial -pituicitos- en esta glándula.

La hipófisis anterior secreta hormona de crecimiento, hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante de la tiroides, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante y prolactina, principalmente, mientras que la hipófisis posterior secreta oxitocina y

vasopresina. Asimismo, la hipófisis sintetiza también hormona β -lipotrópica y hormona estimulante de los melanocitos, entre otras sustancias y neurotransmisores. Las hormonas de la hipófisis anterior desempeñan papeles fundamentales en el control de funciones metabólicas en todo el organismo. Las dos hormonas secretadas por la hipófisis posterior desempeñan otros papeles: 1) *Hormona antidiurética* -también denominada vasopresina- controla la tasa de excreción de agua por la orina y de este modo ayuda a controlar la concentración de agua en los líquidos corporales; además tiene efectos en la contracción del músculo liso vascular, estimula la síntesis de prostaglandinas y la glicogenólisis hepática. 2) *Oxitocina* promueve la eyección de leche desde las glándulas mamarias hasta el pezón durante la succión, y ayuda al parto del recién nacido al término de la gestación. Las hormonas de la hipófisis posterior son nonapéptidos, y pueden encontrarse algunas variantes en diferentes especies de vertebrados; por ejemplo, si el aminoácido 8 es arginina, la vasopresina se conoce como arginina vasopresina (AVP), pero si es lisina, toma el nombre de lisina vasopresina (LVP). La LVP se puede encontrar en cerdos e hipopótamos, por ejemplo (Norris, 1980).

Hormonas adenohipofisarias (Modificado de Norris, 1980, Tyrell et al, 1994)

Nombre	Abreviatura	Sinónimos	Fuente celular	Órgano blanco* ¹	Función* ¹
Somatomamotropinas (evolucionaron de un gen ancestral común)					
Prolactina	PRL	Mamotropina	Lactotropo	Glándula mamaria	Estimula la síntesis de leche
Hormona de crecimiento	GH	Somatotropina Hormona somatotrópica	Somatotropo	Músculo	Estimula la incorporación de aminoácidos en proteínas
ACTH y péptidos relacionados (todas derivan de un precursor común: la pro-opiomelanocortina POMC, de peso molecular 28,500) * ²					
Corticotropina (1 a 39)	ACTH	Hormona adrenocorticotropa Adrenocorticotropina	Corticotropo	Corteza adrenal (suprarrenal)	Estimula la síntesis y secreción de corticosteroides
Péptido tipo corticotropina del lóbulo intermedio (18 a 39)	CLIP				

β -Lipotropina (42 a 134)	β LPH	- -	Corticotropo ζ ?	Tejido adiposo ζ ?	Estimula la hidrólisis de grasa a ác. grasos libres y glicerol
γ -Lipotropina (42 a 101)	γ LPH				
Melanotropina α -MSH: (1 a 33)	MSH	Intermedina, Hormona estimulante (α , β , γ) de melanocitos o melanóforos	Pars intermedia	Melanocito	Estimula la síntesis del pigmento melanina
β -MSH: (84 a 101)					
γ -MSH: (-55 a -44)					
Endorfinas α -endorfina: (61 a 76)		Morfina endógena			Analgesia ζ ?
β -endorfina: (61 a 91)					Contienen la secuencia del péptido metencefalina (61 a 65)
Glicoproteínas: todas tienen 2 subunidades: la subunidad alfa es común para las tres, mientras que la beta es específica para cada una					
Tirotropina	TSH	Hormona estimulante de la tiroides	Tirotropo	Glándula tiroides	Estimula la síntesis de hormonas tiroideas
Hormona foliculo estimulante	FSH	Folitropina	Gonadotropo	Gónada	Estimula el desarrollo folicular en hembras y la espermatogénesis en machos; estrógeno en hembras
Hormona luteinizante	LH	Hormona estimulante de las células intersticiales Lutropina	Gonadotropo	Gónada	Estimula la síntesis de andrógenos y progesterona en hembras y la secreción de andrógenos en machos

*¹ se cita sólo un órgano blanco o una función

*² la numeración refiere las posiciones de aminoácidos en la secuencia, tomando como base la secuencia de ACTH (se presentan posiciones con valor negativo para γ -MSH; el péptido señal y fragmento aminoterminal comienza en -131)

El reconocimiento anatómico hecho a principios de 1940 de que el aporte vascular de la hipófisis anterior se hacía con sangre que ya había circulado por capilares de la

eminencia media del hipotálamo, hizo intuir la existencia de un control neurohumoral. Ahora se sabe que el hipotálamo controla la secreción de hormonas hipofisarias mediante la liberación de neurohormonas que pasan por un circuito portal denominado hipotálamo-adenohipofisario. El eje hipotálamo-hipófisis consiste de (1) neuronas neurosecretoras que forman el núcleo neurosecretor de la región hipotalámica del cerebro, (2) la hipófisis o glándula pituitaria y (3) de glándulas y otros blancos a los que controlan directamente. Representa el enlace neuroendocrino entre el sistema nervioso y el tradicional sistema endocrino (Norris, 1980). Las neurohormonas del hipotálamo regulan la secreción de la hipófisis, al igual que las hormonas hipofisarias regulan la secreción de sus glándulas blanco. Por su parte, las propias hormonas de las glándulas blanco (periféricas) regulan la secreción hipotalámica e hipofisaria; este sistema de regulación se denomina retroalimentación. El tipo de regulación que se establece entre hipotálamo e hipófisis se llama retroalimentación de asa corta, mientras que la autorregulación de la secreción hipotalámica por su mismo producto se conoce como retroalimentación de asa ultracorta. Una de las principales diferencias en los distintos ejes es si la acción de las hormonas periféricas se realiza fundamentalmente a nivel hipotalámico o hipofisario (Aguilar, 1992).

Por otro lado, durante los años cincuenta y sesenta, el desarrollo de técnicas para análisis y purificación de proteínas ayudó a mejorar la calidad de los preparados hormonales empleados en investigaciones biológicas. Así, fue posible percatarse que la actividad de la hormona de crecimiento era específica para cada especie, culminando con el primer *tratamiento exitoso de un niño con deficiencia en la secreción de hormona de crecimiento con extracto hipofisario humano* por Raben en 1958.

Aparte de la hormona de crecimiento, la mayor parte de las hormonas importantes de la adenohipófisis ejercen sus efectos principales mediante la estimulación de glándulas blanco tales como la glándula tiroides, la corteza suprarrenal, los ovarios, los testículos y las glándulas mamarias. Si bien en un principio se consideraba que las funciones de cada una de las hormonas hipofisarias se relacionaban única e íntimamente con las funciones de sus respectivas glándulas blanco, ahora se tienen en consideración funciones propias y

diferenciales de estas hormonas; por su parte, la hormona de crecimiento ejerce sus efectos sobre todos o casi todos los tejidos del organismo.

HORMONA DE CRECIMIENTO

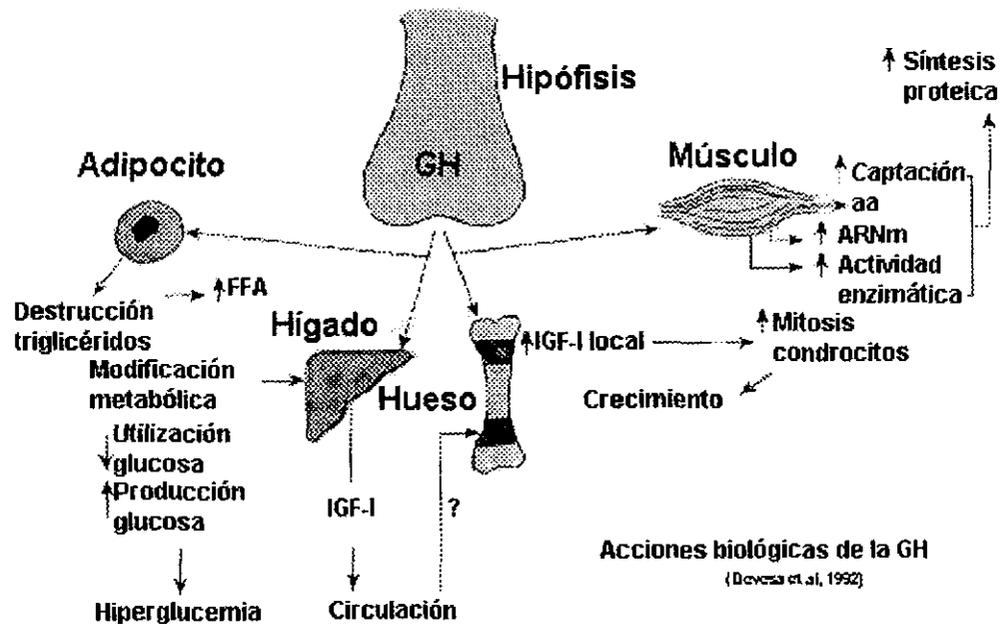
El crecimiento puede describirse convenientemente como: el proceso mediante el cual aumenta de tamaño el cuerpo como resultado de la adición organizada de tejidos nuevos, el aumento del volumen celular así como del número de células. La hormona de crecimiento (GH) es un polipéptido y representa la cantidad poco común de 5 a 10 % del peso seco de la hipófisis. Fue llamada así como resultado de las notables distorsiones del patrón postnatal de crecimiento que es causado por la secreción anormal de la hormona. La deficiencia de GH se asocia con el enanismo y la secreción excesiva de ésta con el gigantismo y acromegalia. La GH en sí no es responsable de todos los efectos relativos al crecimiento, aunque no hay duda de que es necesaria para el crecimiento general del cuerpo después del periodo postnatal inmediato (el crecimiento fetal y neonatal temprano son relativamente independientes de GH), pero muchos otros aspectos del crecimiento, incluyendo el crecimiento regenerativo y la cicatrización de las heridas, el crecimiento del cabello y algunos de los cambios en la configuración del cuerpo que ocurren en la pubertad, no requieren de GH (*Hardy, 1984*).

Es sorprendente observar que el nivel plasmático de GH sólo está relacionado con la velocidad del desarrollo en el periodo neonatal. Después, no se vuelve a encontrar relación con crecimiento o épocas de crecimiento, respondiendo en cambio muy fácilmente a cambios metabólicos o de actividad, en especial la hipoglucemia. Por ejemplo, en la mañana en ayunas, un grupo de sujetos normales en una prueba ordinaria de tolerancia a la insulina (0.1 unidad de insulina zinc cristalina por Kg. de peso corporal, administrada por vía intravenosa en 5 a 10 ml de solución salina al 0.85%, en la cual se observa una disminución promedio de glucosa sanguínea a 34% del valor del reposo aproximadamente), mostraron un aumento medio de la GH plasmática desde menos de 1.0 ng/ml en el tiempo cero, hasta 45.2 ng/ml al

cabo de una hora (límites de 25 a 70 ng/ml). Se observó que los esteroides corticosuprarrenales disminuían importantemente esta respuesta ; por ejemplo, en quienes recibían dosis equivalentes a más de 60 mg de cortisona por día, el aumento medio de GH en plasma sólo fue hasta 6.7 ng/ml (límites 1.5 a 13 ng/ml). Los pacientes con hipopituitarismo mostraron falta completa o disminución importante de la respuesta de GH frente a hipoglucemia (Frantz y Rabkin, 1964). Las células glucorreceptoras que inician la respuesta de GH a la hipoglucemia se encuentran en el hipotálamo. Sin embargo, el ejercicio también produce un aumento de la secreción de GH, lo mismo que el ayuno. Un esfuerzo físico tan ligero como el levantarse de la cama aumenta la secreción de hormona de crecimiento. Los niveles normales de GH van de menos de 1 a 5 ng/ml aproximadamente. En la acromegalia, se encuentran cifras entre 50 y 200 ng/ml, que ya no disminuyen por administración de glucosa (Friesen y Astwood, 1965).

EFFECTOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

Puesto que la vida media de la hormona de crecimiento en el humano no pasa de 23



minutos, se supone que debe ejercer algunos de sus efectos cuando menos, en particular el crecimiento, a expensas de factores intermedios. Se han identificado varios de estos factores,

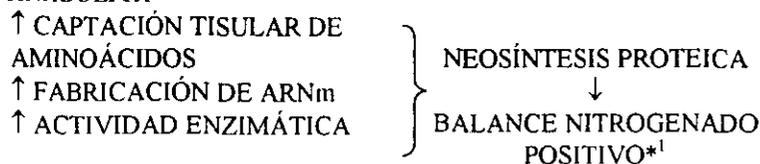
cuya presencia en el plasma depende de la existencia de GH. En 1957 Solomon y Daughaday, estudiando las actividades de la GH, observaron que *in vitro*, la hormona no era capaz de estimular el crecimiento del cartilago, lo que sí ocurría cuando al cultivo se añadía plasma de animal normal. Postularon la existencia de un factor plasmático responsable, diferente pero dependiente de GH, ya que no se encontraba en el plasma de animales hipofisectomizados pero reaparecía cuando éstos eran tratados con GH exógena. La acción básica de este factor sería la de estimular la incorporación de sulfatos a los proteoglicanos del cartilago, por lo que fue denominado "factor de sulfatación". Como además interviene en otras actividades metabólicas, se conoció más tarde como somatomedina, término con el que se expresaba su actividad de mediador del crecimiento somático. En la actualidad se sabe que las somatomedinas son en realidad formas peptídicas estructural y funcionalmente similares a la insulina, por lo que se propuso el término de "factor de crecimiento insulinoide" (IGF *Insulin like Growth Factor*: IGF-I o somatomedina C, e IGF-II o somatomedina A) (Devesa et al, 1992).

En el metabolismo proteínico, la GH aumenta la retención de nitrógeno (se observa disminución del nitrógeno ureico de la orina y balance positivo de nitrógeno), acelera la entrada de ácidos aminados a las células (disminución en su concentración sanguínea), la síntesis de ARN mensajero y ribosómico, y en forma general la producción de proteínas. La hormona de crecimiento aumenta la lipólisis, eleva los ácidos grasos libres del plasma (FFA), e inhibe la formación de grasas. En el metabolismo de carbohidratos, la GH es antagonista de la insulina, disminuyendo la entrada de glucosa a las células y bloqueando la acción de la insulina respecto a esta función. Se ha propuesto que la insulina y la hormona de crecimiento podrían ser los dos principales factores responsables de la homeostasis metabólica en los ciclos diarios de ayuno y alimentación. La hiperglucemia durante la fase de absorción que sigue a una comida eleva la secreción de insulina y suprime la de GH. Se produce así una disminución de FFA plasmáticos, con síntesis activa de grasas. Viene luego una etapa intermedia durante la cual, al cesar la absorción de glucosa, la GH plasmática empieza a aumentar, existiendo sin embargo todavía bastante insulina. Como tanto la insulina como la GH aceleran la entrada de aminoácidos a las células, actúan de manera sinérgica en esta

etapa intermedia, aumentando la síntesis de proteína. Finalmente, en el ayuno ulterior, la secreción de hormona de crecimiento aumenta, disminuyendo la glucosa y la insulina disponibles. El aumento de GH significa lipólisis, y permite ahorrar glucosa, siendo así menos necesaria la gluconeogénesis a partir de proteínas (Friesen y Astwood, 1965; Devesa et al. 1992).

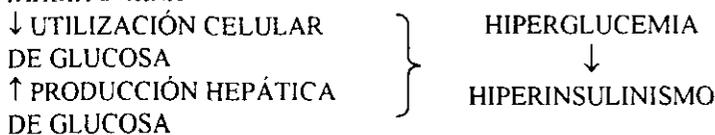
ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

ANABÓLICA



Estimulación del crecimiento animal	Evans & Long, 1922
Aumento en la incorporación de sulfato (³⁵ S) en sulfatos de condroitina de cartilago (vía IGF-I)	Solomon y Daughaday, 1957
Ensanchamiento de la placa de cartílago epifisiario de la tibia -rata	Greenspan et al, 1949
Síntesis de ARN (hígado)	Jefferson & Korner, 1967
Estimulación de la captura de aminoácidos por tejido muscular <i>in vitro</i>	Kostyo JL, 1968
Síntesis de proteínas plasmáticas	Griffin & Miller, 1974
Promueve la diferenciación de líneas celulares derivadas de mesénquima	Green et al, 1985 Ohlsson et al, 1992
Incremento en la formación de colonias eritroides en médula ósea <i>in vitro</i> en presencia de eritropoyetina	Steenfos & Jansson, 1992
Mantenimiento de la población del tejido linfático con linfocitos	Snow et al, 1981
Estimulación de la liberación de IGF-I hepática	McConaghey & Sledge, 1970; Green et al, 1985 Holley and Wass, 1989

DIABETÓGENA*²



Aumento en los niveles de glucosa (efecto diabético)	Cotes et al, 1949
Inhibición de captura basal y estimulada por insulina, de 2-desoxi[³ H]glucosa y 3-O-metil-D-glucosa por adipocitos 3T3-F442A por administración crónica de GH	Silverman et al, 1989 Tar et al, 1990

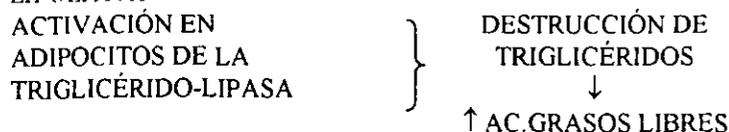
EFECTOS TIPO INSULINA*²

Efecto inicial transitorio tipo insulina (humanos)	MacGorman et al, 1981
Estimulación de la captura de glucosa por tejido adiposo de pollo y aumento en la síntesis de lípidos	Rudas & Scanes, 1983 Green et al, 1985

ADIPOGÉNICA*²

Estimulación de la diferenciación de preadipocitos 3T3	Morikawa et al, 1982
--	----------------------

LIPOLÍTICA*²



Incremento en la circulación de ácidos grasos libres (efecto lipolítico <i>in vivo</i>)	Yeh and Moog, 1975
Estimulación de la lipólisis <i>in vitro</i> en tejido adiposo	Fain et al, 1965
Efecto antilipogénico (antiinsulínico)	Walton et al, 1986

ANTI-LIPOLÍTICA*2

Inhibición de la lipólisis <i>in vitro</i> inducida por agentes lipolíticos en extractos de tejido adiposo	Goodman, 1970 Arámburo et al, 1989a
--	--

REGULACIÓN HIDROMINERAL

Incremento en la tasa de filtración glomerular y flujo de plasma renal	White et al, 1949
Incremento en la actividad de la ATPasa renal, inhibible por ouabaina	Shimomura et al, 1982
Participa en la osmorregulación durante la transición (migración) de salmónidos de agua dulce a agua salada	Madssen, 1990
Incrementa la reabsorción de fosfatos (vía IGF-I) y de bicarbonatos, así como la excreción de iones amonio	Corvilain & Abramow, 1964; Welbourne & Cronin, 1991

*1 Los parámetros de medición de crecimiento que se emplean pueden ser: ganancia en peso (con la desventaja potencial de considerar hepatomegalia u obesidad como crecimiento); índices de crecimiento esquelético, como altura (humanos, caballos), longitud de cola (ratas, ratones), grosor de la placa de cartílago epifisiario en huesos largos (tibia); y también retención de nitrógeno -representando crecimiento de músculo (Harvey, Scanes and Daughaday, 1995).

*2 Se encuentran diferentes respuestas de los adipocitos por exposición a GH: efectos agudos (exposición menor a 4 h, con ED₅₀ de 50-100 ng/ml) y efectos crónicos (más de 4 h de exposición, con ED₅₀ de 1-5 ng/ml). Los efectos tipo insulina son agudos, mientras que el lipolítico, diabetogénico y adipogénico son de tipo crónico. (Juárez-Aguilar et al. 1999)

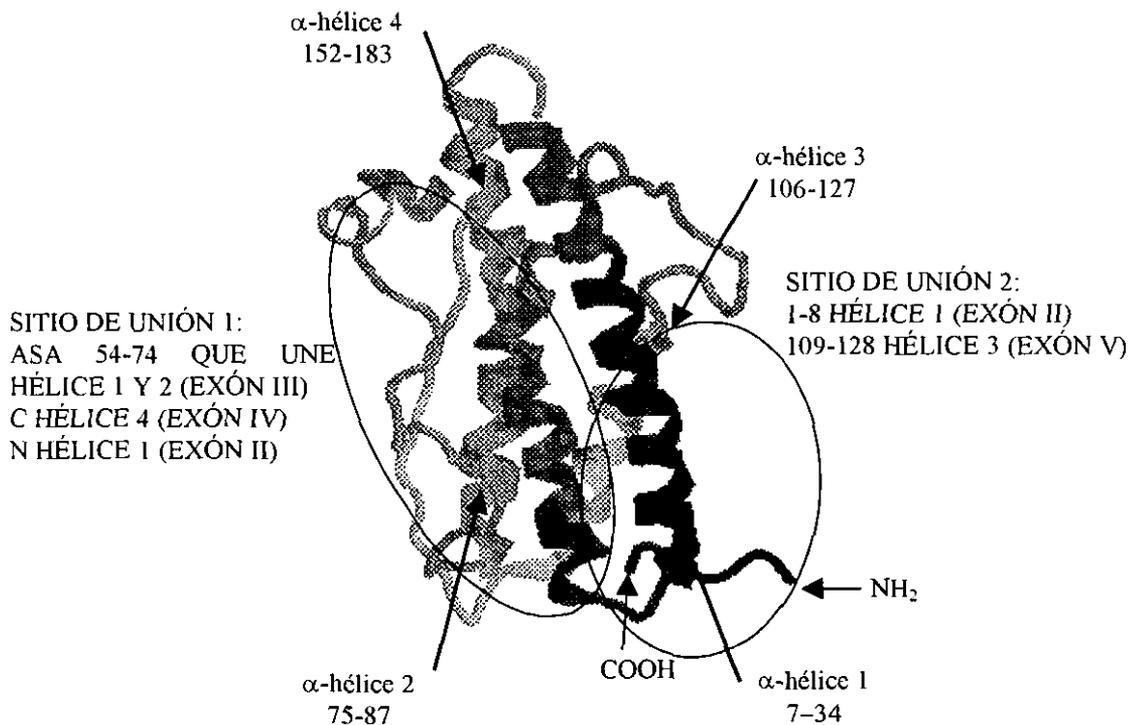
ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA

La hormona de crecimiento, junto con la prolactina, el lactógeno placentario, la somatolactina y la proliferina, representan una familia de proteínas, con base en similitudes estructurales pero con funciones diversas (Lewis et al 1980; Seeburg, 1985).

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína hipofisiaria con 191 aminoácidos y alrededor de 22,000 daltones de peso molecular, descrita en todos los grupos de vertebrados. La GH es heterogénea tanto estructural como funcionalmente. Existen cuatro residuos de cisteína presentes en todas las GHs de especies evolutivamente tan disímiles como el humano y el tiburón, con los que se forman puentes disulfuro (posiciones 53-164 y

181-189) generando dos asas en la molécula, una grande y una más pequeña (Scanes and Campbell, 1995).

Gracias a los estudios de cristalografía de rayos X de alta resolución realizado con la GH porcina (Abdel-Meguid et al, 1987) y de los cristales de la GH humana unida al dominio extracelular del receptor de hormona de crecimiento (De Vos et al, 1992), ha sido posible conocer la estructura secundaria y terciaria tanto de la hormona como de su receptor, de donde se han deducido las siguientes características: se trata de una proteína formada por cuatro α -hélices antiparalelas que se extienden en los segmentos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183, en donde cada hélice presenta diferente carácter anfifílico, siendo la hélice 4 mayoritariamente hidrofóbica; además, la estructura primaria de las GHs de vertebrados conocidas, dentro de estas regiones α -hélice, exhibe considerable homología. Se tienen también dos formaciones

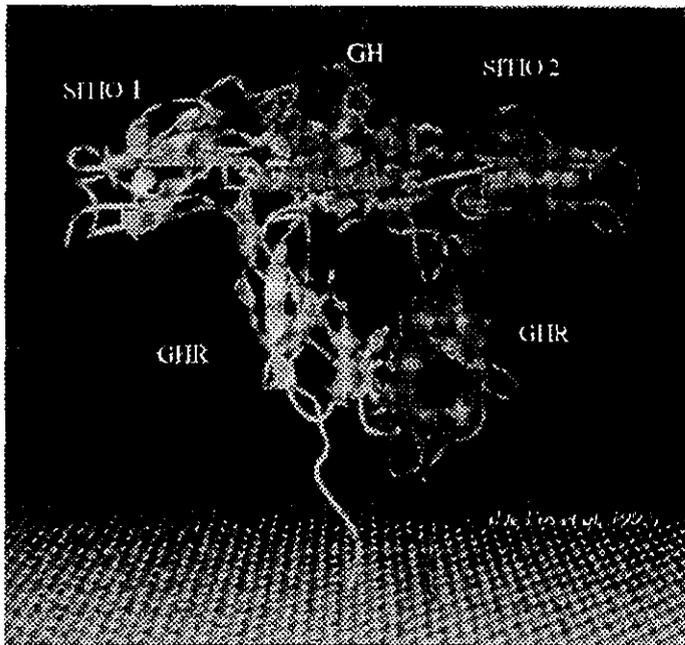


HORMONA DE CRECIMIENTO

de α -hélices pequeñas en las regiones 53-58 (~1.5 giro) y 89-96 (~2 giros), con lo que la conformación de la GH es aproximadamente 50% α -hélice.

Los dominios que interactúan con el receptor se han identificado mediante mutagénesis dirigida (Cunningham *et al.*, 1990) y el grado de afinidad de cada mutante se ha evaluado por ensayos de radioreceptor por unión de la hormona (marcada radioactivamente) a su receptor. Mediante estos estudios y otros en donde se analizan los efectos de anticuerpos monoclonales sobre epítopes específicos en la molécula de GH se identificaron algunos requerimientos estructurales para la unión al receptor. Hay de hecho dos sitios distintos en los que se puede unir el receptor de GH (GHR) a la molécula de la hormona. El sitio 1 incluye la hélice 4 desde su región central a carboxiterminal, y los residuos del asa (54-74), que forman enlaces de hidrógeno y puentes salinos entre K41, (L45), Q46, P61, (R64), R167, K168, D171, (K172), T175, (F176), R178 y el GHR. El segundo sitio incluye la hélice 3 y la hélice 1, con puentes entre los residuos N12, R16, R19 y el GHR (Scanes & Campbell, 1995; Juárez *et al.*, 1999).

De esta manera, la GH y su receptor forman un heterotrímero ("sandwich"), con



uniones (puentes de hidrógeno y salinos específicos) entre las dos moléculas de receptor (De Vos *et al.*, 1992).

La hélice tres por su parte participa además como pivote en la acción de la GH (Scanes and Campbell, 1995). Se piensa que una molécula de GHR se une primero al sitio 1 de la GH y

subsecuentemente otra molécula de GHR ocupa el sitio 2 (Fich *et al.*, 1992). La evidencia que aportan los estudios

cristalográficos y de unión a

receptor sobre la interacción de la GH con sus receptores no refleja necesariamente la actividad biológica de la molécula. Estudios de actividad adipogénica de moléculas quiméricas de hGH/hPL sugieren que efectivamente existen dos sitios de unión en la molécula, en donde el segundo sitio se compone de dos subdominios estructurales. Para

mantener una actividad adipogénica es necesario contar con el sitio 1 y alguno de los dos subdominios del sitio 2. La molécula puede ser biológicamente activa a pesar de mostrar reducida la dimerización de receptores en experimentos *in vitro* (Juárez et al, 1999).

HETEROGENEIDAD MOLECULAR

Con anterioridad se veía con escepticismo la posibilidad de la heterogeneidad molecular nativa de la hormona de crecimiento, por considerar que se debía a artificios experimentales. Sin embargo, con técnicas más sofisticadas y el uso de poderosos inhibidores de proteasas se confirma la presencia de múltiples formas, por lo que ahora se acepta ampliamente que esta hormona proteínica está compuesta por una familia de moléculas que tiene diferentes fuentes de procedencia, ya sea por la existencia de más de un gen para la GH, como por el procesamiento alternativo de su ARN mensajero (mARN) o las modificaciones postraduccionales que pueda sufrir la proteína, tales como fosforilación, glicosilación, proteólisis, desamidación, acilación y agregación. Incluso se pueden considerar las formas generadas después de la secreción, como la formación de complejos con proteínas unidoras en el plasma (GH-BP por sus siglas en inglés *Growth Hormone Binding Protein*), o la metabolización en diferentes tejidos. Estas variantes -isohormonas para el caso de las que sean producto de genes diferentes- se han identificado tanto en extractos hipofisarios como en plasma y preparaciones puras de la hormona (Lewis, 1984; Aramburo et al, 1989a; Baumann, 1991; Scanes and Campbell, 1995).

Se han descrito isohormonas derivadas de duplicación génica para la GH humana (*hGH-N/hGH-V*) (Seeburg, 1985; Chawla et al 1983; Paladini et al 1983; Ratti and Tolman, 1986; Frankenne et al 1987; Cooke et al 1988) y para la GH de trucha (*rtGH-I rtGH-II*) (Agellon et al 1988). Las GHs humanas derivadas de los dos genes difieren en 13 residuos aminoácidos y su síntesis tiene diferentes sitios de origen: el gen *hGH-N* se expresa principalmente en la hipófisis mientras que el gen *hGH-V* se expresa en la placenta; la proteína del gen *hGH-V* es la forma predominante de GH en circulación en mujeres en el tercer trimestre de embarazo (Frankenne et al, 1987; Frankenne et al, 1988). No hay evidencia de dos genes de GH en otras especies, excepto en salmónidos, en

donde pueden representar diferencia en genes o microheterogeneidad en diferentes poblaciones de estos peces (Agellon, et al 1988). Se tiene evidencia de microheterogeneidad en bovinos: en la bGH, el aminoácido 127 puede ser valina o leucina; hipófisis individuales pueden producir 100% de bGH Val127, 100% Leu127 o 50% de cada una. De esta manera parece haber polimorfismo alélico de GH en ganado (Seavey et al, 1971).

El ARNm de GH también puede sufrir procesamiento alternativo dando origen a proteínas diferentes: éste es el caso con el transcrito del gen *hGH-N*, las proteínas resultantes son respectivamente hGH de 22 kDa con 191 residuos aminoácidos y hGH de 20 kDa con una delección de 15 residuos aminoácidos (residuos 32 a 46) (Lewis et al, 1978), representando de 5 a 10% de la hGH monomérica en la hipófisis. Puede haber procesamiento alternativo del ARNm de rGH que resulte en la delección del exón 3 o corte en dicho exón dando lugar a moléculas que no tienen los aminoácidos 32 a 71 y 42 a 46 respectivamente (Parks, 1989; Howland, 1987). En el caso del transcrito bovino puede retenerse el intrón D debido a un factor *trans* de 35 kDa que se une a secuencias *cis* localizadas en el exón 5 (Sun et al, 1993); también se ha observado la retención del intrón D en una proporción de transcritos de *hGH-V* y *hCS-A* (Macleod et al, 1992).

La GH, al igual que muchas otras proteínas, se sintetiza primeramente en el somatotropo como un precursor que contiene un péptido señal; este péptido se remueve proteolíticamente y durante esta transformación es posible que se presente heterogeneidad N-terminal, como se ha observado en algunas especies. Por ejemplo, el extremo N-terminal de la GH bovina u ovina tiene ya sea fenilalanina (Phe) o una alanina (Ala) extra. Esto es resultado del procesamiento diferencial del precursor pro-GH (Li et al, 1953).

Después de la síntesis, la GH puede sufrir modificaciones postraduccionales que lleven a diferentes variantes de la molécula. Se han descrito variantes para la GH derivadas de agregación de la forma principal de la GH, para formar dímeros y otros oligómeros, trímeros, tetrámeros y hasta pentámeros (Chawla et al, 1983; Stolar and Baumann, 1986). Estas formas parecen representar aproximadamente 40% de la GH inmunorreactiva que se secreta al

plasma en humanos, estimado con la premisa de que las formas oligoméricas tienen la misma inmunorreactividad inherente. La forma dimérica parece tener dos monómeros de 22 KDa ligados ya sea no covalentemente o por puentes disulfuro (Bawmann, 1991). Sin embargo, al menos algo de la GH dimérica (de pollo) permanece incluso después del tratamiento con dodecilsulfato de sodio (SDS) y con 2-mercaptoetanol (que romperían enlaces no covalentes y puentes disulfuro) (Arámburo et al, 1989b). No se conoce la naturaleza de estos dímeros ligados covalentemente.

Se han caracterizado dos formas desamidadas de GH en la hipófisis humana (Asp-152 hGH y Glu-137 hGH), que también se encuentran en circulación. También se ha demostrado la forma desamidadada para la GH bovina (Lewis et al, 1979; Secchi et al, 1986).

También se han observado distintas formas de GH cortada y fragmentos de la misma. En la hGH parece ocurrir un corte enzimático en la región de aminoácidos entre los residuos 133 a 146 y los residuos 43 y 44. El corte entre los residuos 133 y 146 (sitios susceptibles a corte por enzimas tipo tripsina: Arg 134, Lys140 y Lys145 en hGH) abriría el asa grande de la molécula dando origen a un tamaño molecular aparentemente mayor (24 kDa); después de la reducción de los puentes disulfuro se originarían dos fragmentos, de 14 y 8 kDa, respectivamente. Se ha reportado tal corte proteolítico en tejido hipofisiario con enzimas exógenas y con plasmalema de tejidos blanco de la GH. Hay considerable controversia sobre si el corte proteolítico del asa grande ocurre *in situ* o representa un artificio experimental. Por su parte las hipófisis humanas contienen un fragmento de GH, hGH₁₋₄₃, bien caracterizado aunque su contraparte no se ha identificado aún (Singh et al, 1983).

Existe también evidencia de formas fosforiladas, que se han encontrado en preparaciones de rata, oveja y pollo (Jetting et al, 1986; Liberti et al, 1985; Liberti et al, 1986; Arámburo et al, 1989a). Además, la GH humana puede fosforilarse por una tirosina cinasa y la de pollo por proteína cinasa A o C (Baldwin et al, 1983; Arámburo et al, 1990b; Arámburo et al, 1992).

El grupo amino terminal de una pequeña proporción de hGH se encuentra acetilado. Ésto no parece tener influencia sobre su actividad biológica pero la acetilación sí afecta el punto isoeléctrico y, por ende, el patrón electroforético. A la forma acetilada se le conoce como GH "rápida" (Baumann, 1991).

Se han caracterizado o identificado formas glicosiladas de la GH (G-GH) en el humano (Sinha and Lewis, 1986), cerdo (Sinha et al, 1990a), ratón (Sinha and Jacobsen, 1987), rata (Bollengier et al, 1989) y pollo (Berghman et al, 1987). Aunque hasta ahora no hay evidencia clara de que la G-GH tenga acciones diferentes a las de la no glicosilada, en el cerdo se han visto diferencias en la proporción que tiene en plasma y en hipófisis durante el embarazo y desarrollo fetal (Sinha et al, 1990a; Sinha et al, 1990b). Se han estudiado algunas actividades de G-GH; en particular la GH humana variante (hGH-V) que se encuentra N-glicosilada, se une a receptores de prolactina y GH (Baumann, 1991; Ray et al, 1989), es mitogénica (Nickel et al, 1990) y estimula el aumento de peso en ratas hipofisectomizadas (MacLeod et al, 1991). La G-GH de pollo (G-cGH) pura estimula 5'-monodesyodación de T4 en el embrión de pollo (Berghman et al, 1989).

VARIANTES MOLECULARES EN LA GH DE POLLO

La existencia de la hormona de crecimiento de pollo fue evidenciada por Nicoll y Licht en 1971. Farmer, Papkoff y Hayashida (1974) encontraron heterogeneidad de la GH de pollo (cGH) en sistemas electroforéticos a diferentes pH (4.5 y 8.3), lo cual explicaron por una posible desamidación de la GH. Harvey y Scanes purificaron cGH después de una extracción de glicoproteínas, mediante homogeneización del residuo remanente, alcalinización, precipitación salina y cromatografía de intercambio iónico, con un rendimiento de 0.4 mg/g de tejido hipofisario (peso húmedo), un Rf de 0.31, peso molecular de 23,300 Da y por isoelectroenfoque resolvieron tres componentes cuyos puntos isoeléctricos fueron: 7.5, 6.5, 5.8; atribuyeron la heterogeneidad encontrada a la desamidación parcial de la hormona, a la unión no específica a los anfolitos o a la presencia de monómeros con diferentes residuos amino-terminales.

Investigaciones realizadas por nuestro grupo han mostrado que las variantes de la hormona de crecimiento de pollo existen (Arámburo et al. 1989a; Arámburo et al. 1989b) y hemos constatado que puede ser un sistema muy útil tanto como un modelo para la investigación general sobre la GH, como por la importancia pecuaria de la especie. De acuerdo con los métodos de análisis utilizados para estudiar la heterogeneidad molecular de la GH se pueden observar variantes de carga y variantes de masa. En estudios electroforéticos las variantes de carga eléctrica aparecen cuando se lleva a cabo isoelectroenfoque o electroforesis nativa no desnaturizante. La cGH monomérica (22 kDa) consiste al menos de tres variantes de carga por electroforesis no desnaturizante en geles de poliacrilamida, con movilidades relativas de 0.23, 0.3 y 0.35 (Arámburo et al. 1989a; Arámburo et al. 1990a). Los estudios sobre la diversidad funcional de la cGH muestran que, al menos dos variantes de carga (Rf=0.23 y 0.3) presentan diferente bioactividad en el metabolismo de lípidos, siendo la 0.23 esencialmente lipolítica mientras que la 0.3 manifiesta una actividad antilipolítica (Arámburo et al. 1990a; Arámburo et al. 1989b). Ambas variantes, sin embargo, presentan una actividad somatotrópica equivalente (Scanes et al. 1990). Cuando se analizó la cGH por isoelectroenfoque, mostró ocho componentes inmunorreactivos con puntos isoelectrónicos de 5.9, 6.8, 7.11, 7.3, 7.5, 7.9, 8.05 y 8.18 (Arámburo et al. 1990a), datos que correlacionaron bien con los hallazgos de Houston y Goddard (1988), quienes identificaron entre ocho y diez variantes de carga de la cGH en extractos hipofisarios, algunas de las cuales parecían estar reguladas durante el desarrollo de estos animales.

Los análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes utilizando dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) seguido por Western blot e inmunotinción, muestran las diferentes variantes de masa, evidenciando que para la cGH, bajo condiciones no reductoras el monómero de 22 kDa es la forma más abundante en la hipófisis. Hemos demostrado que, tanto en la hipófisis como en el plasma (Arámburo. 1990a), están presentes formas de mayor peso molecular que corresponden probablemente a oligómeros unidos mediante enlaces disulfuro que dan lugar a dímeros (44 kDa), trímeros (66 kDa), tetrámeros (88 kDa), etc. Cuando se analizaron bajo condiciones reductoras -en presencia de 5% de β -mercaptoetanol-, la mayor parte de las bandas de alto peso molecular

desaparecieron, incrementándose la concentración de la forma monomérica de la hormona, aunque también prevaleció una cantidad significativa de la forma dimérica, aparentemente resistente a la reducción (Arámburo et al. 1990a). También hemos mostrado evidencias sobre la existencia de un monómero procesado proteolíticamente, cuyos fragmentos aparecen bajo condiciones reductoras, particularmente, con inmunorreactividad muy intensa, un fragmento de aproximadamente 15 kDa (Arámburo et al. 1990a).

También se ha descrito la presencia de una variante glicosilada de la cGH (Berghman et al. 1987; Arámburo et al. 1991). Asimismo, hemos encontrado evidencias sobre la existencia de una cGH fosforilada (Arámburo et al. 1989a; Arámburo et al. 1992). Trabajos realizados por nuestro grupo en cultivos primarios de células hipofisarias de pollo mostraron que éstas son capaces de incorporar ³²P-fosfato en cGH inmunorreactiva, aparentemente en la forma de un dímero de cGH (Arámburo et al. 1990b). La fosforilación de la GH es un proceso específico, saturable e inhibible y lo mismo ocurre con la PRL de aves y otros mamíferos (Arámburo et al. 1992).

La heterogeneidad molecular de la cGH se ha encontrado en la glándula, en el plasma y en cultivos hipofisarios (Arámburo et al. 1990a; Manuel et al. 1992). Este hallazgo indica que las variantes estructurales de la hormona son secretadas a la circulación. Resulta de particular interés determinar si su liberación por la glándula se ve afectada de la misma manera por los secretagogos de GH conocidos en el pollo. Resultados preliminares nos han permitido demostrar que, al menos en lo que respecta a las variantes de masa de la cGH, se observan diferencias en el patrón de secreción de las variantes en respuesta a la estimulación con TRH o a la inhibición mediada por anestesia con pentobarbital y/o uretano, y que estos cambios se reflejan tanto en la hipófisis como en la circulación (Pascacio M et al. 1996). Asimismo, hemos demostrado que las variantes responden de manera diferencial a la estimulación con el secretagogo hipotalámico GHRH (hormona liberadora de la GH), en particular la variante de 26 kDa y la variante 22 kDa (Martínez-Coria et al. 1999). Por otra parte, hemos demostrado que la proporción relativa de las variantes moleculares de la cGH cambia con el desarrollo ontogénico, existiendo una proporción importante del fragmento de 15 kDa principalmente en la etapa embrionaria mientras que las formas de alto peso molecular se encuentran en mayor proporción en los estadios de mayor edad (Arámburo et al. 2000).

La investigación sobre las actividades biológicas de las variantes de la GH del pollo ha revelado evidencias interesantes de que las variantes no poseen bioactividades idénticas. Como se mencionó anteriormente, en estudios realizados con dos de las variantes de carga del monómero hemos demostrado que ambas tienen actividad somatotrópica (promotora del crecimiento) en ratones enanos (*Scanes et al. 1990*), pero que esas variantes de cGH difieren en sus efectos sobre el tejido adiposo del pollo, una siendo preferentemente lipolítica, mientras que la otra muestra efectos antilipolíticos (*Arámburo et al., 1989b; Arámburo et al. 1990a*). Los estudios realizados empleando tejido adiposo de pollo *in vitro* han dado una sólida evidencia de que los efectos lipolítico y antilipolítico (semejante a insulina) de la GH tienen diferentes requerimientos estructurales. Una comparación de las potencias lipolítica y del efecto insulinoide de una serie de preparaciones de GH (provenientes de diferentes especies) muestra que la respuesta lipolítica tiene un requerimiento estructural más estricto que el efecto antilipolítico (semejante a insulina). Así, las preparaciones de GH de los vertebrados inferiores (reptiles, anfibios y peces) tienen muy baja, si alguna, actividad lipolítica. Por el contrario, todas esas hormonas tienen una potencia elevada de actividad insulinoide (antilipolítica) (*Scanes et al. 1993*). Por otra parte, hemos descrito una nueva actividad angiogénica para la GH, al demostrar que esta hormona estimula la proliferación de capilares en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, al parecer sin mediar el efecto de IGF-I (*Gould et al. 1995*). Asimismo, hemos descrito que el fragmento de 15 kDa es capaz de inhibir la actividad de la desyodasa 5D de hormonas tiroideas en cultivos de hepatocitos embrionarios de pollo (*Coria et al., 1997*) y también posee una potente actividad lipolítica sobre explantes de tejido adiposo de pollo (*Carranza et al. 1999*).

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la forma monomérica y la variante glicosilada de la GH tienen un comportamiento paralelo, aunque difieren ligeramente en la Kd, en su unión al receptor de GH en membranas hepáticas de pollo, mientras que el fragmento de 15 kDa y las formas de alto peso molecular no son reconocidas por ese receptor (*Reyes et al. 1996*).

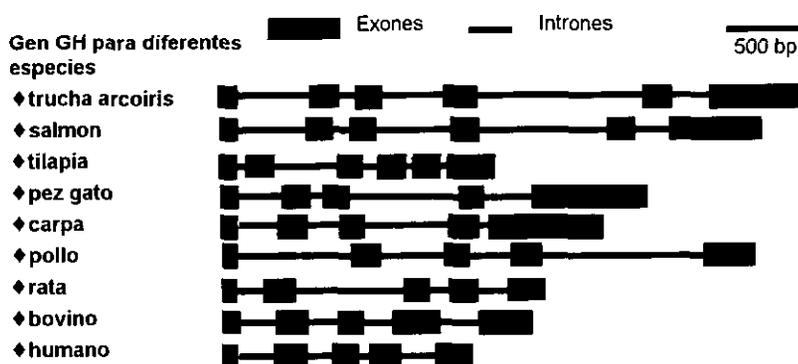
Hasta el momento, la caracterización de la heterogeneidad molecular y funcional de la cGH se ha realizado fundamentalmente en la hipófisis, tanto *in vivo* como *in vitro*, y se ha sugerido que las variantes pueden comportarse como entidades hormonales discretas, es decir con un probable papel endocrino. Recientemente, sin embargo, han empezado a aparecer reportes en la literatura que dan cuenta de la existencia de hormona de crecimiento (por RIA), o del ARNm de GH, en tejidos extrahipofisarios, en particular en el cerebro (Render et al. 1995) y en algunos tejidos del sistema inmune (Hull and Harvey. 1997). También se ha descrito que en el embrión de pollo existe una extensa distribución de inmunorreactividad semejante a GH en la mayor parte de los tejidos embrionarios, presente incluso de manera más temprana que lo que se ha reportado para la activación de la GH en hipófisis (Harvey and Hull. 1997). Asimismo, se encontró que el gen de GH se expresaba en múltiples tejidos en el embrión al igual que el gen para el receptor de GH (GHR) (Harvey and Hull. 1997; Hull et al. 1997). En algunos mamíferos, se ha descrito la presencia de GH en distintos linajes de linfocitos (Weigent et al. 1991). En nuestro laboratorio, resultados preliminares han mostrado que tanto en el embrión de pollo como en pollos de 4 y de 9 semanas de edad es posible medir por ELISA a una sustancia semejante a GH en cerebro, en tejidos del sistema inmune tales como la bursa, el bazo y el timo, así como en leucocitos, y en tejidos del sistema reproductor, tanto en machos (testículo y epidídimo) como en hembras (oviducto y folículos). Asimismo, por *western blot* se ha encontrado a una proteína inmunorreactiva de 17 kDa que pudiera ser un fragmento de la cGH en esos tejidos (Luna et al. 1999; Hull et al. 1999). Es probable que en estos tejidos la hormona de crecimiento (ya sea la forma de 22 kDa o alguna de sus variantes moleculares, en caso de estar presentes) pueda estar desempeñando un papel parácrino y/o autócrino, funcionando como un factor de acción local.

SÍNTESIS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

El gen para la GH se encuentra localizado en el cromosoma 17 en humanos, 10 en la rata, 11 en el ratón y 1 en el pollo, mientras que el de la PRL en el 6 en humanos, 17 en la rata y 13 en el ratón. No se sabe si los genes ancestrales para GH y PRL se separaron en dos cromosomas. Los genes que codifican para proteínas relacionadas, con cierto grado de homología en su secuencia de aminoácidos parecen estar confinados al mismo cromosoma. En humanos, los genes que codifican para GH y somatomotropina coriónica humana (hCS) se encuentran en un grupo de cinco genes en el brazo largo del cromosoma 17 (hGH-N, hCS-L, hCS-A, hGH-V y hCS-B), de los cuáles sólo el gen hGH-N se expresa por los somatotropos -hipófisis.

El gen hGH-N, que está contenido dentro de un fragmento de DNA de 2.6 kbp, se compone de cinco exones y cuatro intrones y las regiones no traducidas 3' y 5'



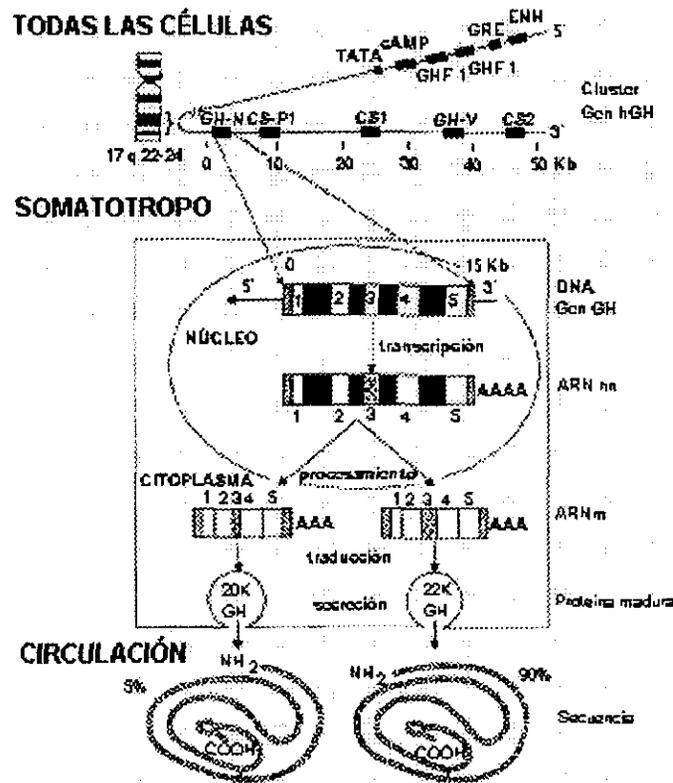
(incluyendo una región promotora de 500 bp). El exón I codifica para 3 a 9 aminoácidos del péptido señal, mientras que el exon II codifica para el resto del péptido señal y los primeros 28 a 35 aminoácidos de la hormona madura; los exones III, IV y V codifican para 36-40, 52-60 y 63-69 aminoácidos, respectivamente. Este gen es similar en estructura a otros genes de GH en mamíferos, pero es más pequeño que el de pollo (3.5 kbp) que contiene secuencias de intrones expandidas. Por su parte los genes de salmónidos tienen un exón más, en total 6 exones. En salmónidos, el exón V provee información para 49 aminoácidos y el exón VI para 20 residuos.

El gen hGH-V codifica para una proteína con homología estructural a la GH hipofisiaria pero se expresa sólo en la placenta. Los genes hCS expresan lactógenos placentarios, que tienen alta homología (85%) con la hGH. Los lactógenos placentarios en mamíferos subprimates se asemejan más a la prolactina, habiendo evolucionado posiblemente por duplicación del gen de prolactina más que por el de GH. Por consecuencia, sólo un gen de GH se encuentra presente en la mayoría de los vertebrados, aunque existe la posibilidad de que los peces vivíparos y los reptiles posean otros genes que pertenezcan a la familia de CS. En los salmónidos existe otro gen de GH adicional, no-alélico; los productos de ambos genes se expresan de manera similar en la hipófisis del salmón del Atlántico. También está presente un tercer gen -un pseudogen- en el salmón Chinook, pero reside en el cromosoma Y (sólo se encuentra en machos). En la hipófisis de teleósteos se encuentra otro gen relacionado, la somatolactina, que es distinto de GH y PRL (Harvey, 1995).

La transcripción del gen de GH se realiza por la ARN polimerasa II, que inicia la síntesis en el codón de origen en el extremo 5' después de haberse situado en la región promotora -caja TATA, localizada en la posición -100. Las secuencias de poliadenilación (AATAAA) en el extremo 3' terminan la transcripción del gen. La transcripción de los genes de GH se regula por secuencias potenciadoras y silenciadoras tipo *cis*, que interactúan con reguladores transcripcionales tipo *trans*. Las regiones promotoras de los genes de GH de la rata y el humano llegan hasta 500 bp 5' al inicio de la transcripción del gen y muestran secuencias semejantes, aunque la regulación transcripcional está principalmente regida por secuencias hacia -320 en donde se une un péptido activador de la transcripción de la GH (AP-2). La región proximal del promotor además de contener a la caja TATA, presenta diferentes sitios de unión para factores de transcripción órgano-específicos. La región promotora del gen de GH del pollo no tiene toda la homología con la de los mamíferos pero contiene una secuencia corta (24bp) que es altamente homóloga en los sitios de unión proximal en el caso del gen de GH de rata para el factor de transcripción de la hormona de crecimiento (GHF-1) y el factor de transcripción específico de la hipófisis (Pit-1) (Menon et al, 1995). La velocidad de transcripción de los genes de GH está regulada por los factores de

transcripción (proteínas reguladoras) que actúan localmente a través de la interacción con las secuencias o elementos potenciadores y silenciadores del DNA (Harvey, 1995).

El producto primario de la transcripción del gen de GH de mamífero es un ARN de aproximadamente 1300 nucleótidos de longitud, en donde el extremo 3' está poliadenilado y el extremo 5' está protegido por la adición de 7-metilguanosina trifosfato. Los intrones son



Representación esquemática del gen de hGH y la biosíntesis de GH (Harvey, 1995)

removidos minutos después, iniciando con el intron 1, y los exones son empalmados para producir el ARN mensajero maduro (ARNm), el cual tiene una vida media de 40 a 60 minutos. Los precursores de ARN permanecen en el núcleo, en donde ocurre el empalme. La liberación del ARNm maduro dentro del citoplasma es un proceso de dos pasos que involucra la liberación a partir de la matriz nuclear por un mecanismo dependiente de ATP y translocación a través del complejo poro nuclear, por un mecanismo que requiere hidrólisis de ATP (Harvey, 1995).

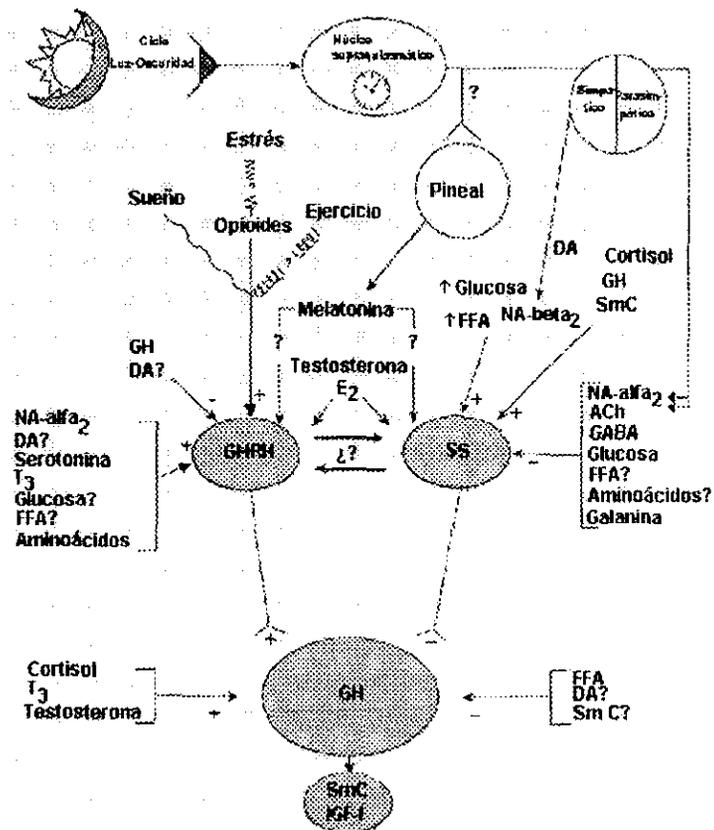
TRADUCCIÓN, ALMACENAMIENTO Y SECRECIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La traducción se inicia en el citoplasma mediante la interacción del complejo ribosomal 40S con el extremo 5' del ARNm de la GH en el codón de inicio AUG seguido por la unión de la subunidad 60S. La asociación con ribosomas libres estimula la síntesis de GH con el acoplamiento de aminoácidos de acuerdo a la secuencia de nucleótidos del ARNm de GH. Se sintetiza primero una prohormona de aproximadamente 225 aminoácidos que después se procesa para dar origen a la proteína de secreción, al escindir aminoácidos del extremo amino terminal correspondientes al péptido señal, secuencia que dirige al complejo ribosoma-ARNm para adherirse al retículo endoplásmico (RE) y facilita la translocación de la proteína en el espacio intracisternal del RE para su procesamiento y almacenamiento. Es por ello que las cisternas se vuelven más prominentes en somatotropos activos en síntesis y el número de polisomas libres y unidos a membrana se incrementa. Los 20 a 30 aminoácidos del péptido señal se escinden por procesamiento proteolítico en el RE, en donde también la proteína puede sufrir modificaciones postraduccionales, incluyendo la formación de puentes disulfuro. El procesamiento de la hormona puede continuar en su paso por el complejo de Golgi, al cual se transloca por un proceso dependiente de energía. La estimulación de la función del Golgi se acompaña por su agrandamiento y ocupación de una gran área del somatotropo y la producción de numerosos cuerpos multivesiculares que se agregan en la región del Golgi. Además del procesamiento, también se lleva a cabo la selección y empaquetamiento de moléculas de GH en las vesículas de secreción; el transporte de GH a estas vesículas se puede facilitar por proteínas de unión localizadas en el complejo. Se puede procesar aún más la hormona dentro de los compartimentos de almacén de los somatotropos. Aunque gránulos recientemente sintetizados u hormona citoplásmica puede liberarse sin almacenamiento previo, la mayoría de la GH sintetizada se guarda en los gránulos de secreción de la célula. Estas vesículas se almacenan en el citoplasma o yuxtapuestas a la membrana celular previo a la liberación o destrucción crinofágica. La cantidad de GH almacenada dentro de los somatotropos parece participar en la regulación

de la expresión del gen de GH, que está inversamente relacionado al grado de granulación del somatotrofo. Más aún, la reducción en el almacén de GH hipofisiaria es una señal para la expresión del gen de GH cuando la liberación de GH se estimula por la hormona liberadora de GH (GHRH), aunque la GHRH es capaz de incrementar la transcripción del gen independientemente de la liberación de GH. La acumulación de organelos multivesiculares en el Golgi y su transformación en cuerpos lamelares o vesículas líticas que contienen membranas de Golgi también asegura que no ocurra la sobreproducción de GH por exceso de actividad del Golgi después de la estimulación por secretagogos. La cantidad de GH sintetizada en los somatotropos es del 10 al 20% de toda la proteína celular bajo condiciones basales, aunque esta proporción se incrementa por los secretagogos de GH. En contraste, la GH representa menos del 1% de la proteína sintetizada en células tumorales de hipófisis de rata (Harvey, 1995).

REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La hormona de crecimiento se secreta con un patrón ultradiano de liberación espontánea, con episodios de brusca liberación que, en humanos, aparecen entre 4 y 8 veces en cada período de 24 horas. Existe, por tanto, un ritmo secretor endógeno cuya máxima amplitud se alcanza en la primera fase del sueño de ondas lentas. Este patrón de secreción rítmico resulta de las interacciones entre dos



Regulación de la secreción de GH (+ estimula, - inhibe) (Olivares et al. 1992)

neuropéptidos, la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) y la somatostatina. Hay evidencia que ampara la hipótesis de que a su vez estos dos factores hipofisiotrópicos se liberan de manera episódica en la circulación portal, influenciando directamente a los somatotropos hipofisarios.

La somatostatina y GHRH son los factores primordiales que controlan la liberación de GH; no obstante otras señales centrales y periféricas modulan esta secreción alterando la actividad de las neuronas que contienen GHRH o somatostatina, o influenciando sus acciones en la hipófisis. Estos elementos secundarios incluyen hormonas secretadas por órganos endocrinos blanco de la hipófisis, aminas biogénicas y diversos péptidos hipotalámicos. De esta manera las influencias hipotalámicas están fuertemente reguladas por un sistema integrado de factores neurales, metabólicos y hormonales. La propia GH juega un importante papel regulador de su propia secreción. El mecanismo sería del tipo de retroalimentación negativa de asa corta, mediante una combinación de incremento de síntesis y liberación de SS y disminución de liberación de GHRH. La retroalimentación a nivel periférico está mediada por diferentes hormonas y metabolitos activados por estímulo de la GH, por ejemplo IGF-I e IGF-II. Estas somatomedinas, sintetizadas principalmente en el hígado por estímulo directo de GH, participan en la regulación negativa de asa larga durante la secreción de GH. En cambio, las hormonas tiroideas incrementan la transcripción y con ello los niveles de ARNm de GH (*Force and Spindler, 1994*) a través de los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TREs) distribuidos a lo largo del gen de GH, aunque su efecto es diferencial de acuerdo a su ubicación, siendo estimulantes de la transcripción si se localizan hacia el extremo 3', mientras que son represores hacia el extremo 5' (*Reiprich et al, 1995; Devesa et al, 1992*). La hormona liberadora de tirotropina no sólo estimula la secreción de TSH hipofisaria sino también la liberación de GH en todos los grupos de vertebrados. La actividad liberadora de TRH en humanos se considera generalmente como una respuesta paradójica asociada con las condiciones patológicas de disfunción de GH. En estas condiciones, los receptores de TRH pueden expresarse anormalmente en los somatotropos y reflejar la inducción de células somatolactotrópicas. También se ha sugerido un defecto en el control hipotalámico inhibitorio de la secreción de GH para ser responsable de respuestas anómalas de GH a

TRH. Además de estimular directamente la liberación de GH, el TRH puede regular esta actividad incrementando los niveles séricos de GHRH. Sin embargo, mientras el TRH estimula la actividad liberadora de GH del hipotálamo aviar, parece estimular el control inhibitorio hipotalámico en mamíferos y las inyecciones i.c.v. de TRH inhiben la liberación de GH. Aunque la respuesta somatotrópica se ha considerado paradójica, el TRH es un regulador fisiológico de la secreción de GH en aves y posiblemente en mamíferos. Esta posibilidad tiene apoyo en la supresión de secreción de GH en ratas inmunizadas contra TRH (Harvey, 1995). Los glucocorticoides por su parte interactúan sinérgicamente con las hormonas tiroideas y el ácido retinoico en la producción de GH en los somatotropos de humano y rata (Salles et al, 1994). Esta sinergia refleja los requerimientos de elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) próximos al promotor para la transcripción inducida por T₃. Estos elementos juegan un papel estimulante de forma aguda a nivel hipofisario - estimulan la secreción de GH y potencian la expresión de su gen y del que codifica el receptor para GHRH - mientras que crónicamente presentan un efecto inhibitor, probablemente mediado por un incremento de SS (Devesa et al, 1992).

METABOLISMO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La secreción y acción de la GH se regulan en parte por mecanismos de depuración tanto en los sitios blanco como en los de síntesis, distribución y degradación. Las concentraciones circulantes de GH por lo tanto reflejan las tasas dinámicas de su síntesis, secreción y depuración metabólica y los productos de procesamiento proteolítico. La remoción de GH de la circulación sistémica es mayoritariamente debida a su metabolismo irreversible en tejidos y la excreción renal de los productos. La heterogeneidad de la GH circulante y la hipofisaria en parte refleja este procesamiento, que puede ser un prerrequisito para algunas de sus actividades en el plasma (Harvey, 1995).

La GH puede degradarse dentro de la hipófisis, de manera intracelular por proteasas lisosomales con actividad tipo plasmina, trombina, tripsina y quimotripsina. La actividad de estas enzimas se relaciona con la tasa de síntesis de GH; también puede ser regulada por

factores como la somatostatina que incrementa la degradación intracelular de GH. Aunque la GH es estable en el plasma, la degradación proteolítica extrahipofisiaria se lleva a cabo principalmente en el hígado y el riñón. Es posible que las células de Kupffer en el hígado degraden la GH hasta sus componentes aminoácidos, inclusive en una tercera parte del contenido sanguíneo. En el riñón, las células tubulares reabsorben GH de los filtrados -el tamaño molecular del monómero de GH permite su paso hacia el filtrado glomerular- y la degradan en compartimentos lisosomales, para dar origen a diferentes fragmentos, por lo que poco se excreta intacto en la orina. En las células del túbulo proximal, la internalización de GH mediada por receptor desemboca en fagolisosomas para completar la degradación proteolítica de la hormona. La degradación es casi totalmente intracelular y no por proteasas de superficie; los productos catabólicos regresan a circulación (Harvey, 1995).

La degradación de GH también se lleva a cabo en los tejidos blanco. La entrada de GH en estos compartimentos ocurre en mayor parte a través de endocitosis mediada por receptor, transportada por compartimentos endocíticos sucesivos hasta la fusión de las vesículas endosomales con los lisosomas (Harvey, 1995).

La modificación de la proteína, tal como ocurre en la glicosilación, puede afectar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, tales como su plegamiento y estructura tridimensional, solubilidad y estabilidad, vida media en circulación, susceptibilidad a proteasas, actividad biológica y su modulación, reconocimiento molecular y celular, inmunogenicidad y adhesión celular (Berghman et al. 1994).

GLICOSILACIÓN

Las cadenas polipeptídicas de las glicoproteínas, como las de todas las proteínas, se sintetizan bajo control genético. Sus cadenas de carbohidratos, en contraste, se generan enzimática y covalentemente unidas al polipéptido sin la rígida guía del molde de ácidos nucleicos. Las enzimas del procesamiento generalmente no se encuentran en suficiente

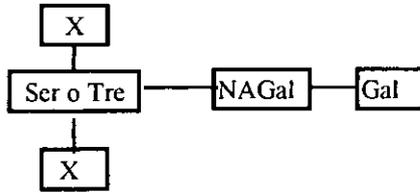
cantidad para asegurar la síntesis de productos uniformes. Por lo tanto, las glicoproteínas tienen una composición de carbohidratos variable, fenómeno conocido como microheterogeneidad, lo que dificulta su caracterización y purificación.

Casi todas las proteínas de secreción y asociadas a membranas de células eucarióticas están glicosiladas. De hecho, la glicosilación de proteínas es más abundante que otros tipos de modificación postraduccional combinados. Los oligosacáridos forman dos tipos de enlaces directos a la proteína: N-ligados y O-ligados. La naturaleza de la O- y la N-glicosilación difiere en el tipo de residuo aminoácido al que están unidas las cadenas de oligosacárido, y en el tipo de residuos de carbohidratos que conforman la cadena. Los oligosacáridos tienden a unirse a las proteínas en secuencias que forman estructuras pliegues β . Teniendo en cuenta su carácter hidrofílico, esta observación sugiere que los oligosacáridos se extienden desde la superficie de las proteínas más que participar en sus estructuras internas.

En los enlaces N-glicosídicos, la N-acetilglucosamina (NAGlu) está invariablemente unida al nitrógeno amida de una asparagina en la secuencia N-X-S o N-X-T, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina ó ácido aspártico. Los oligosacáridos de estos enlaces contienen una región central distintiva cuyos residuos de manosa periféricos pueden unirse a manosa o NAGlu; éstos a su vez pueden estar unidos a otros carbohidratos, lo que genera una gran variedad de formas oligosacáridas. La formación de estas cadenas inicia de manera *cotraduccional* a diferencia de los que tienen enlaces O-glicosídicos, que se generan una vez que la proteína se ha sintetizado.

En los enlaces O-glicosídicos el enlace más común involucra la unión de N-acetilgalactosamina (NAGal) con el grupo OH de serina o treonina, así como de otros residuos hidroxilados como 5-hidroxilisina (en la colágena, por ejemplo). Los oligosacáridos con enlaces tipo O- son generalmente cortos y contienen de uno a cuatro residuos de carbohidrato; sin embargo, algunos como el involucrado en el grupo sanguíneo ABO, pueden ser muy largos.

ENLACE O-GLICOSÍDICO

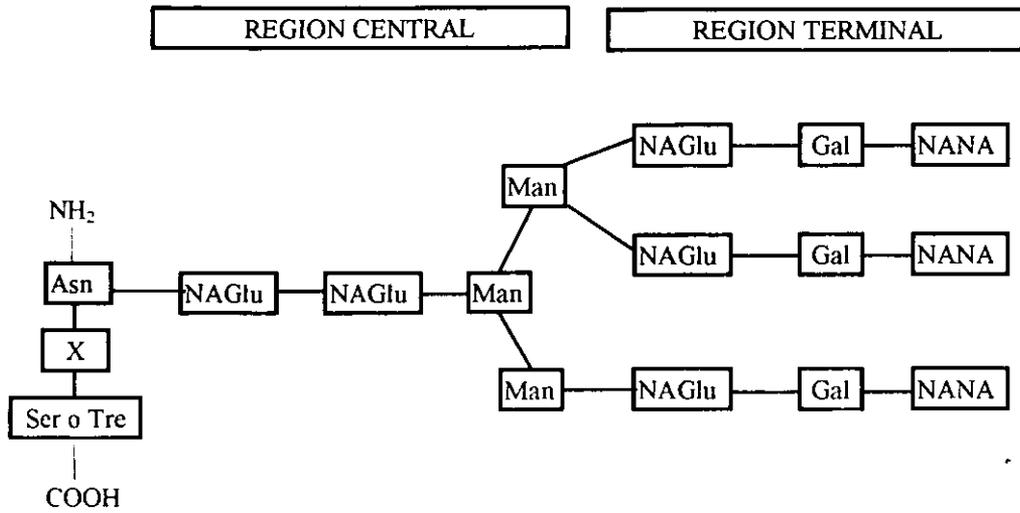


Abreviaturas: NAGal, N-acetilgalactosamina; Gal, galactosa; Ser, serina; Tre, treonina; X, cualquier aminoácido.

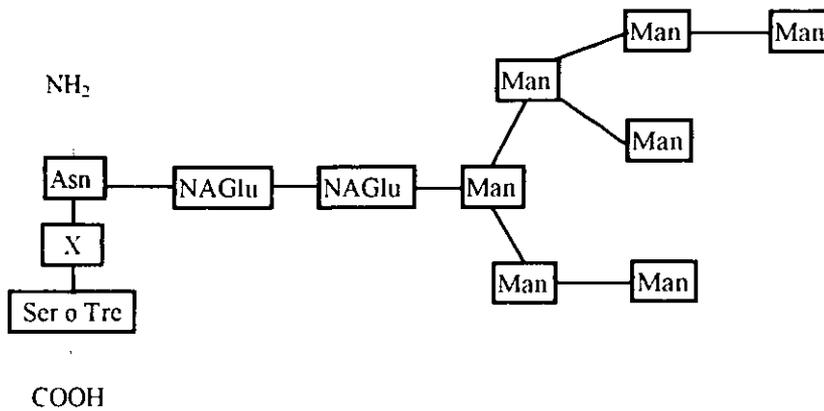
La mayoría de las proteínas citosólicas y nucleares no están glicosiladas, o si lo están, un solo residuo de N-acetilglucosamina se encuentra unido a serina o treonina. Los azúcares con enlaces tipo O- son añadidos uno a la vez en reacciones catalizadas por enzimas específicas diferentes.

La N-glicosilación ocurre en la superficie luminal de la membrana del RE en una reacción de un paso, catalizada por una enzima unida a la membrana llamada glicosil transferasa. El oligosacárido que contiene catorce residuos carbohidrato, se sintetiza y procesa por intermediación del dolicol, un lípido de membrana –polisoprenoide-, y la cadena entera preformada se transfiere a la asparagina en el polipéptido naciente casi tan pronto como el residuo del aminoácido emerge de la superficie de la membrana. Posteriormente en el retículo endoplásmico y en el Golgi se retiran algunos residuos y se añaden otros, uno a la vez, en un orden definido por una secuencia de reacciones catalizadas por enzimas diferentes. En las glicoproteínas maduras se encuentran clases diferentes de N-oligosacáridos, los complejos, los ricos en manosa y los híbridos. Esta clasificación se basa en los tipos de azúcar unidos a la región central –pentasacárido- común; los ricos en manosa tienen 5 a 9 residuos de manosa (incluyendo 3 de la región central); si los residuos de manosa de la región central tienen unidos residuos de NAcGlu, las estructuras resultantes se consideran como complejas y cada rama se conoce como antena, teniendo estructuras bi-, tri- y tetrantenarias. Si sólo uno de los residuos centrales de manosa tiene unidos residuos de NAcGlu, la estructura se conoce como híbrido (Alberts, 1994; Voet and Voet, 1995).

ENLACE N-GLICOSÍDICO



OLIGOSACÁRIDO COMPLEJO



OLIGOSACÁRIDO RICO EN MANOSA

Abreviaturas: Asn, asparagina; Man, manosa; NAGlu, N-acetilglucosamina; NANA, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico); X, cualquier aminoácido.

Es común el uso de lectinas, proteínas o glicoproteínas de plantas o vertebrados (origen no inmune) que aglutinan células y/o precipitan glicoconjugados, como reactivos para detectar la presencia de carbohidratos en las proteínas, así como para estudiar las propiedades de superficie celular. La concanavalina, por ejemplo, reconoce glicoconjugados del tipo N-oligomanosil pero no se une a estructuras tipo N ramificadas ni a los O-glicoconjugados (Stanley, 1998).

El tratamiento con endoglicosidasas revela el tipo general de oligosacáridos presentes y la contribución del oligosacárido al peso molecular aparente. Las enzimas péptido-N⁴-(N-Acetil-β-glucosaminil) asparagina amidasa (N-glicanasa) y péptido N-glicosidasa F rompen el enlace β-aspartilglicosilamina del N-glicoconjugado, liberando al oligosacárido y al péptido; estas enzimas cortan cualquier tipo de N-glicoconjugado excepto si el oligosacárido está unido a una asparagina amino- o carboxiterminal. La reacción anterior difiere de las catalizadas por las endo-β-N-acetilglucosaminidasas, tales como endoglicosidasas D, H y F, ya que éstas cortan un enlace glicosídico dentro de la estructura central del oligosacárido; estas enzimas no cortan las uniones presentes en estructuras híbridas bisectadas ni complejas tri- o tetrantenarias. La enzima O-glicosidasa rompe la unión entre Ser/Thr y el disacárido Gal β(1-3) NAcGal, a menos que contenga residuos terminales de ácido siálico. La neuraminidasa (sialidasa, nombre genérico) hidroliza específicamente la unión de residuos terminales de ácido N-acetil-neuramínico con otros residuos de azúcar, ya sea en oligosacáridos o glicoconjugados tipo N- u O-; diferentes neuraminidasas hidrolizan a diferentes velocidades enlaces α(2-3), α(2-6) y α(2-8) (Rosenberg, 1996). Con la ayuda de estas enzimas en acción conjunta o individual se estudia el tipo general de oligosacárido unido a la G-cGH.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha mostrado que en la mayoría de los vertebrados estudiados, la GH y PRL exhiben una heterogeneidad estructural y funcional. Una fuente de esta variabilidad estructural es debida a modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, fosforilación, desamidación y proteólisis, entre otras. La variante glicosilada de la GH ha sido descrita en numerosas especies, incluyendo: humano, cerdo, rata, ratón y pollo. En aves, Berghman y col. fueron los primeros en reportar una variante glicosilada de la GH; posteriormente Arámburo y col. purificaron esta variante por una cromatografía de afinidad y determinaron una banda con un peso molecular aproximado de 29 kDa (por electroforesis en condiciones reductoras). Mediante una cromatografía bidimensional se encontró que esta banda presentó al menos tres importantes variantes de carga con puntos isoeléctricos de 6.5, 6.7 y 7.2 (considerando que puede existir microheterogeneidad dentro de la misma denominación, el término "la" variante glicosilada pretende referir la existencia de diferentes entidades). Se determinó que la G-GH representa menos del 1% del total de GH hipofisaria. Hasta ahora no hay evidencia clara de que la GH glicosilada ejerza alguna actividad biológica diferente a las ejercidas por las formas no glicosiladas; sin embargo, existen reportes que muestran que la proporción de estas variantes en plasma y en hipófisis varía durante el embarazo y el desarrollo fetal. Aún así, hay evidencia en el caso de prolactina, de que la glicosilación puede influenciar algunas de sus actividades biológicas. Dos variantes glicosiladas de la prolactina humana han sido estudiadas, encontrándose una con actividad completa en el ensayo de bursa de pichón y otra con un 24% de potencia de la preparación de referencia (Lewis et al. 1989). Existe por ello la necesidad de caracterizar con mayor detalle a la G-cGH a fin de contar con mayor información de su estructura que permita el posterior análisis funcional de la molécula.

HIPÓTESIS

La hipótesis central de esta línea de investigación puede enunciarse de la siguiente manera:

“La diversidad funcional de la hormona de crecimiento puede ser explicada, al menos parcialmente, por su heterogeneidad molecular. Las distintas variantes de la hormona de crecimiento pueden tener diferentes actividades biológicas y, por ende, pueden catalogarse como entidades hormonales discretas. Si las variantes tienen distintas actividades, entonces la síntesis y/o la secreción de cada una puede estar regulada de manera diferencial”.

La hipótesis particular para el proyecto es la siguiente:

“La glicosilación de la hormona de crecimiento es un posible mecanismo para modular su actividad biológica, por lo que esta modificación postraducciona l de la hormona incide directamente en su bioactividad”.

OBJETIVOS

Caracterización bioquímica y funcional de la variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo

1. Purificación de la hormona de crecimiento de pollo (cGH) a partir de hipófisis de pollos de engorda. Purificación de la variante glicosilada de la cGH a partir de la preparación total de hormona, mediante cromatografía de afinidad con Concanavalina A-sefarosa
2. Caracterización bioquímica de la variante glicosilada de la cGH (G-cGH)
 - 2.1 Caracterización del tipo de residuos de carbohidrato presentes en la variante glicosilada de la cGH, mediante el uso de endoglicosidasas específicas, SDS-PAGE y Western blot. Se determinará si se trata de un enlace O-glicosídico y/o N-glicosídico
 - 2.2 Determinación del sitio de glicosilación en la estructura primaria de la cGH mediante el análisis de péptidos obtenidos por proteólisis limitada de la hormona.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron hipófisis de pollos de engorda (*Gallus gallus*) de 7-8 semanas de edad, recién sacrificados en la procesadora de Pilgrim's Pride de México, S.A. de C.V., Los Cues, Querétaro. La hipófisis se obtuvo seccionando el cráneo del pollo con un corte coronal a nivel de los oídos para dejar expuesta la glándula, la cual se recolectó con pinzas de disección No. 5 y se colocó inmediatamente en un frasco sobre hielo seco, para su posterior almacenamiento a -70°C .

REACTIVOS

La proteína A sefarosa y la sefarosa 4B activada por BrCN se adquirieron de Pharmacia. Los reactivos para electroforesis y *Western Blot* se obtuvieron de Bio-Rad. Las enzimas glicosidasas: PNGasaF, O-glicosidasa y NANasa fueron de Glyko; Endoglicosidasa H y Endoglicosidasa F de Sigma; NANasa II de Boehringer. Las proteasas se obtuvieron de Sigma. El anticuerpo monoclonal anti-cGH fue amablemente donado por el Dr. Luc Berghman (Texas A&M University, Department of Poultry Science).

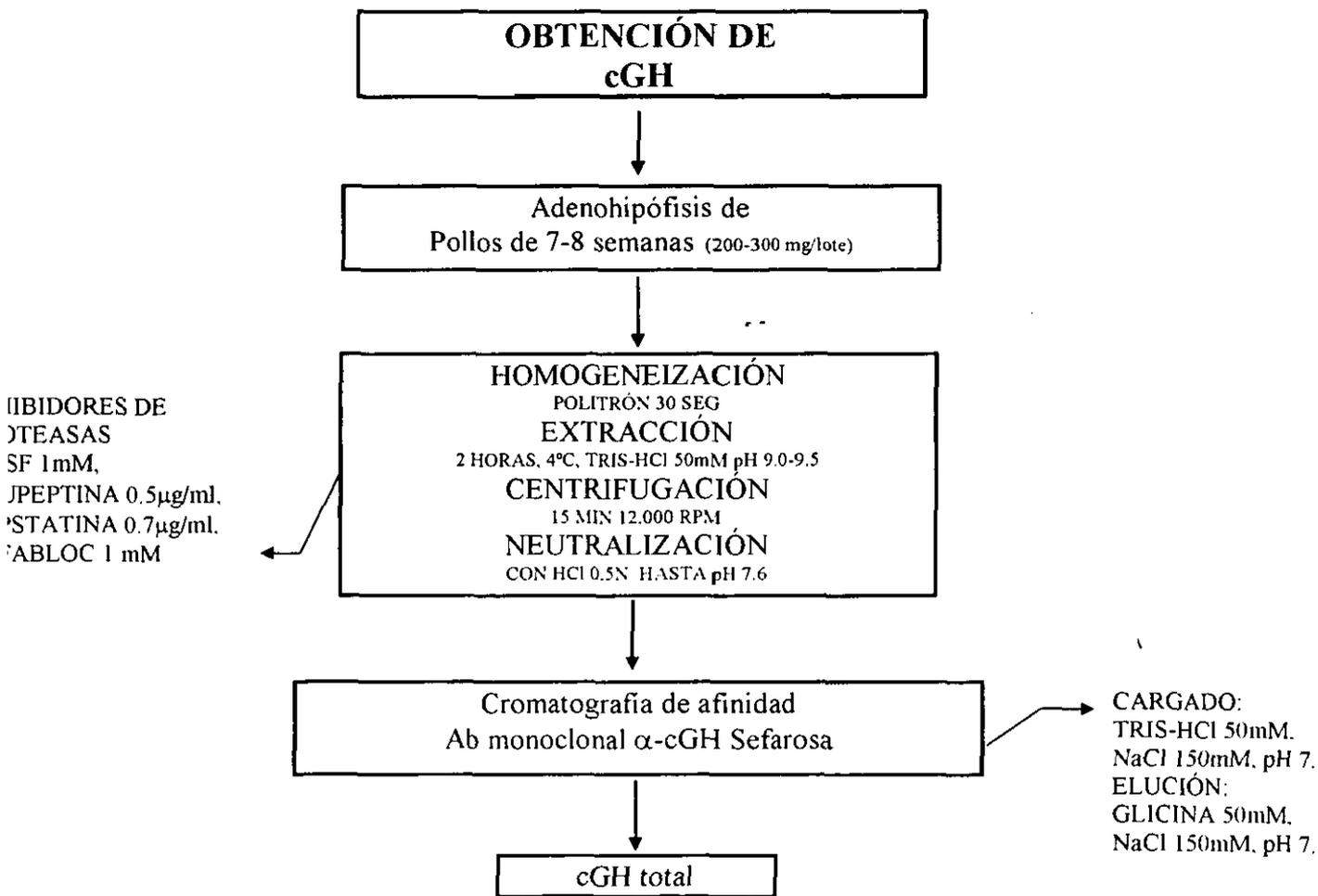
MÉTODOS

Purificación del anticuerpo monoclonal contra cGH (Anexo I). Para preparar el inmoadsorbente que utilizamos en la purificación de cGH se requirió purificar previamente el anticuerpo monoclonal contra la hormona. La purificación se realizó a partir de líquido de ascitis de ratones inoculados con hibridomas que expresan el anticuerpo monoclonal lote IH7 (designación de origen por Dr. Luc Berghman). El líquido de ascitis se separó por cromatografía con una columna de afinidad (3 ml Proteína A sefarosa, en columna Econo-Pac de Bio-Rad 1.5x12 cm) equilibrada con Glicina 1.5 M, NaCl 3 M, pH 8.9. Se recolectaron fracciones de 10 ml, guardando la primer fracción (fracción no

adsorbida) para un segundo pase por la columna. El lavado se realizó hasta obtener una absorbencia de cero a una longitud de onda de 280 nm (aproximadamente 10-25 volúmenes del lecho de la resina). La columna se eluyó posteriormente con aproximadamente 3-6 volúmenes de amortiguador de citratos 50 mM pH 3.0, en fracciones de 2 ml (estas fracciones se neutralizaron con 0.5 ml del amortiguador de glicina pH 8.9). Se midió la absorción a 280 nm de cada fracción y se juntaron las de mayor densidad óptica. El recolectado se dializó en amortiguador de acoplamiento (fosfatos 50 mM, NaCl 0.5 M pH 7-7.6) para eliminar las aminos Tris y Glicina.

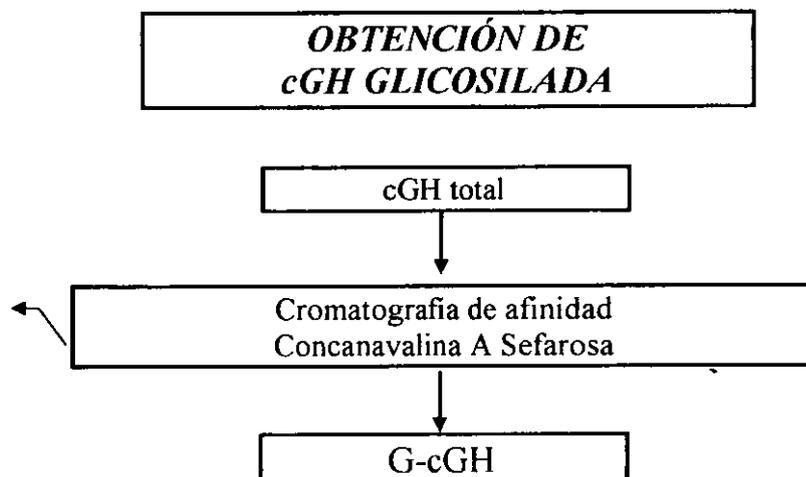
Se acopló el anticuerpo a sefarosa 4B activada con BrCN (*Anexo II*), aproximadamente 20 mg de IgG en 1 gramo de la resina, de la siguiente manera: se preparó la sefarosa hinchando y lavándola con HCl 1 mM; después se equilibró con amortiguador de acoplamiento. Se añadió el líquido de ascitis diluido 5 X en el amortiguador y se agitó la columna durante 3 horas. Se recogió la fracción no acoplada y se calculó la eficiencia del proceso comparando la densidad óptica a 280 nm de la solución de anticuerpos antes y después del acoplamiento. Se bloquearon los sitios que no reaccionaron con Glicina 1.5M, NaCl 3M pH 8.0, agitando la columna durante toda la noche. Se lavó la columna con el amortiguador de cargado para la purificación de cGH (Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6).

Purificación de la cGH total (*Anexo II*). La hormona de crecimiento de pollo se purificó siguiendo el método descrito por *Montiel et al., 1992*. Las glándulas hipofisarias de pollo, obtenidas directamente de pollos recién sacrificados en el rastro, se homogeneizaron en una solución amortiguadora con inhibidores de proteasas. El extracto se sometió a una cromatografía de inmunoafinidad (anticuerpos monoclonales acoplados a 3 ml sefarosa 4B, en una columna Poly-Prep de Bio-Rad, cónica de 0.8x4 cm con capacidad de 2 ml para lecho y 10 ml eluyente) en una columna equilibrada con Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6, que luego se eluyó con Glicina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6 con objeto de obtener la cGH total. Las fracciones eluidas se monitorearon a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU; las fracciones pico (de mayor absorbencia) se colectaron, dializaron y concentraron mediante ultracentrifugación con cartuchos concentradores centriprep-10 (*Amicon*).



Purificación de la hormona de crecimiento de pollo glicosilada (Anexo III). La variante glicosilada de cGH se purificó siguiendo el método de *Arámburo et al., 1991* y *Montiel et al., 1992*. Después de dializar y liofilizar, el extracto de cGH total se separó por cromatografía en una columna de Concanavalina A-sefarosa equilibrada con Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, MnCl₂ 1mM, CaCl₂ 1mM, pH 7.0, y la G-cGH retenida se eluyó con α D-metilmanósido 10mM en el amortiguador de equilibrio.

CARGADO:
AMORTIGUADOR DE
EQUILIBRIO:
TRIS-HCl 20mM, NaCl
150mM, MnCl₂ 1mM,
CaCl₂ 1mM, pH 7.0
ELUCIÓN:
 α -D-METILMANÓSIDO
10mM EN AMORT. EQ.



Análisis electroforético. A lo largo de todo el proyecto se caracterizaron electroforéticamente a las variantes moleculares de la cGH, con objeto de poder identificarlas. Las bandas correspondientes a las variantes de la hormona se revelaron mediante inmunotinción con un anticuerpo específico después de electrotransferencia a membranas de PVDF o nitrocelulosa. (Arámbyro et al. 1989a).

SDS-PAGE. El peso molecular aparente de las muestras se analizó mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, empleando el sistema de Laemmli (1970). La concentración de acrilamida fue del 12% o 15% en el gel separador y de 4% en el gel concentrador. Las muestras se corrieron bajo condiciones reductoras (en presencia de 5% 2-mercaptoetanol) y no reductoras.

ANÁLISIS POR "WESTERN BLOT". Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se electrotransfirieron como se comenta a continuación. Para la transferencia los geles se equilibraron en un amortiguador con 25mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol, pH 8.3 y las bandas de hormona se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF a 200 mA por 60min, para ser posteriormente inmunodetectadas con anticuerpo policlonal α -cGH y un segundo anticuerpo de cabra contra conejo -anticuerpos de conejo- conjugado con enzima (peroxidasa de rábano GAR-HRP o fosfatasa alcalina GAR-AP). El revelado se obtuvo por la reacción enzimática de la enzima con diaminobencidina y peróxido de

hidrógeno (GAR-HRP) o por quimioluminiscencia con sustrato Bio-Rad (GAR-HRP y GAR-AP) (Arámburo et al, 1989a; Arámburo et al. 1990a).

Para la detección de azúcares, se utilizó un protocolo en el cual el grupo hidroxilo adyacente de la glicoproteína es oxidado a aldehído con metaperyodato de sodio y marcado con un conjugado de biotina-hidrazina. El glicoconjugado marcado con la biotina se detectó por un ensayo enzimático usando estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina, obteniendo coloración con NBT y BCIP. Alternativamente se realizó la detección de glicoproteínas con Concanavalina A conjugada con peroxidasa de rábano (ConA-HRP); el revelado es semejante al de la inmunotinción con GAR-HRP.

Digestión enzimática

La variante glicosilada de cGH se analizó electroforéticamente antes y después de tratarla con péptido N-glicosidasa F, endoglicosidasa F y/o endoglicosidasa H, con objeto de localizar el sitio de glicosilación y determinar la presencia de oligosacáridos con enlace N-glicosídico. La remoción de los oligosacáridos liberados por la PNGasaF se pudo monitorear por el cambio de peso molecular por electroforesis en gel y también por la ausencia de reacción a carbohidratos. Si se presentara una reacción positiva tras el tratamiento con PNGasaF se deduce que existen aún carbohidratos no N-ligados (como los de enlace O-glicosídico o via fosfatidilinositol). El análisis se complementó con el tratamiento con O-endoglicosidasa y Neuraminidasa. (Friedman and Higgins, 1995)

TRATAMIENTO DE cGH CON O-GLICOSIDASA, NEURAMINIDASA II Y PÉPTIDO N-GLICOSIDASA F (COCKTAIL ENZIMÁTICO).

Se diluyeron aproximadamente 5 µg de la hormona en amortiguador de fosfatos pH 6.0 hasta un volumen de 16 µl. Se añadieron 20 mU de NANasa y 2 mU de O-Glicosidasa. Se incubó la mezcla durante 1 hora a 37°C. Se llevó el pH a 7.0 con amortiguador de ajuste y se desnaturalizó la proteína con SDS 0.1%, 2-mercaptoetanol 50 mM y calentamiento a 100°C (o baño maría a ebullición) por 5 minutos. Se enfrió y neutralizó el SDS con Nonidet P-40 0.75%. Se añadieron 5 mU de PNGasa F (volumen total de reacción 47 µl) y se dejó incubar durante 3 horas a 37°C. Se colocaron aproximadamente 250 ng de proteína

digerida en electroforesis para WB con anticuerpo y 4.5 µg para detección de glicoproteínas.

TRATAMIENTO DE cGH y G-cGH PÉPTIDO N-GLICOSIDASA F

Se diluyeron aproximadamente 5 µg de cGH o 500 ng de G-cGH en amortiguador de fosfatos pH 7.0. Se desnaturalizó la proteína con SDS 0.1%, 2-mercaptoetanol 50 mM y calentamiento a 100°C (o baño maría a ebullición) por 5 minutos. Se enfrió y neutralizó el SDS con Nonidet P-40 0.75%. Se añadieron 5 mU de PNGasa F (volumen total de reacción 20 µl) y se dejó incubar durante 14-16 horas a 37°C. Para electroforesis y WB se colocaron: aprox. 200 ng de hormona digerida para detección con anticuerpo; 200 ng de G-cGH digerida o 4.5 µg de cGH digerida para detección de glicoproteínas.

TRATAMIENTO DE cGH y G-cGH CON O-GLICOSIDASA, NEURAMINIDASA II o ENDOGLICOSIDASA F

Se diluyeron aproximadamente 5 µg de cGH o 500 ng de G-cGH en amortiguador de fosfatos pH 6.0. Se añadieron 20 mU de NANasa, 2 mU de O-Glicosidasa u 8 mU de Endo-F, en su caso. Se incubó la mezcla durante 14-16 horas a 37°C (volumen de reacción 20 µl). Para electroforesis y WB se colocaron: aprox. 200 ng de hormona digerida para detección con anticuerpo; 200 ng de G-cGH digerida o 4.5 µg de cGH digerida para detección de glicoproteínas.

TRATAMIENTO DE G-cGH CON ENDOGLICOSIDASA H

Se diluyeron aproximadamente 500 ng de la hormona en amortiguador de acetato de sodio pH 5.5. Se añadieron 5 mU de Endo-H (volumen total de reacción 20 µl). Se incubó la mezcla durante 14-16 horas a 37°C. Se colocó aproximadamente la mitad del volumen de reacción en WB para detección con anticuerpo y la otra mitad para detección de glicoproteínas.

La hormona de crecimiento "total" y la variante glicosilada fueron digeridas con proteasas de especificidad estricta, tales como trombina, carboxipeptidasa B y carboxipeptidasa Y (Allen, 1981). Las diferentes mezclas de péptidos resultantes se analizaron por SDS-PAGE en

donde se compararon los patrones de corte obtenidos con cada una de las enzimas utilizadas.

TRATAMIENTO DE G-cGH CON CARBOXIPEPTIDASA B

Se diluyeron aproximadamente 500 ng de la hormona en amortiguador de fosfatos, urea 0.6 M pH 7.6. Se añadieron 1.35 U de Carboxipeptidasa B-DFP. Se incubó la mezcla durante 14-16 horas a temperatura ambiente. Volumen de reacción 20 μ l. Se colocó la mitad del volumen de reacción en WB para detección con anticuerpo y la otra mitad para detección de glicoproteínas.

TRATAMIENTO DE G-cGH CON CARBOXIPEPTIDASA Y

Se diluyeron aproximadamente 500 ng de la hormona en amortiguador de citratos, urea 0.5 M pH 6.25. La digestión se llevó a cabo bajo diferentes conjuntos de condiciones de incubación. En el primero se añadieron 2 U de Carboxipeptidasa Y (volumen total de reacción 20 μ l) y se incubó la mezcla durante 4 horas a temperatura ambiente. En el segundo se añadieron 20 mU de Carboxipeptidasa Y (volumen total de reacción 20 μ l) y se incubó la mezcla durante 15, 30 o 60 minutos a 37°C.

Posteriormente se colocó la mitad del volumen de reacción en WB para detección con anticuerpo y la otra mitad para detección de glicoproteínas.

TRATAMIENTO DE G-cGH CON TROMBINA

Se diluyeron aproximadamente 500 ng de la hormona en amortiguador bicarbonato pH 8.3. Se añadió 1 U de Trombina (volumen total de reacción 20 μ l). Se llevaron a cabo diferentes condiciones de incubación para la digestión. En el primer caso se incubó la mezcla durante 4 horas a 37°C. En el segundo, se incubó la mezcla durante 12 horas a 37°C.

Posteriormente se colocó la mitad del volumen de reacción en WB para detección con anticuerpo y la otra mitad para detección de glicoproteínas.

RESULTADOS

Se diseñaron dos rutas para la purificación de la variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo, basadas en protocolos anteriormente reportados (Montiel et al, 1992).

El primer paso en ambos procesos fue la obtención de un extracto hipofisiario, mediante la homogeneización de lotes de aproximadamente 200-300 miligramos de tejido (20-30 glándulas de pollos de 7-8 semanas de edad, obtenidas directamente de pollos recién sacrificados en la procesadora de pollos de *Pilgrim's Pride de México, S.A. de C.V.* y almacenadas hasta su uso a -70°C). Una vez obtenido el extracto (*anexo II*) se realizaron cromatografías de afinidad.

En la primera ruta diseñada se utilizó una cromatografía de inmunoafinidad con una columna de sefarosa a la que se acopló anticuerpo monoclonal (*anexo I*), para obtener la hormona de crecimiento total (conteniendo "todas" las variantes, inclusive la fracción glicosilada) y después pasar la cGH total por una columna de Concanavalina A-sefarosa para recuperar la fracción glicosilada (G-cGH) (*anexo III*).

En la segunda ruta, el procedimiento fue obtener primero la fracción glicosilada de proteínas hipofisarias, para después purificar la variante glicosilada de la hormona de crecimiento (orden invertido de cromatografías).

PRIMERA RUTA EXPERIMENTAL

La purificación en "un solo paso" de hormona de crecimiento, además de la obtención necesaria del extracto para liberar a las proteínas de sus compartimentos, requiere de la preparación previa de la columna de afinidad. Se cuenta en el laboratorio con líquido

de ascitis de ratones inoculados con hibridomas para producir anticuerpo monoclonal contra cGH. El primer paso para la purificación de la hormona fue la preparación de la columna de anticuerpo; en total se prepararon tres columnas.

La purificación inicial del anticuerpo se realizó por medio de una cromatografía del líquido de ascitis en una columna de proteína A-sefarosa, para después acoplar el anticuerpo puro a una matriz de sefarosa activada con bromuro de cianógeno. Tres ml de líquido de ascitis contienen 26.72 ± 1.86 mg de proteína (determinación por absorbencia a 280 nm). La eficiencia de acoplamiento fue de 97.76, 93.58 y 95.73 % para cada columna, respectivamente (dividiendo la cantidad de proteína no acoplada entre el total que se montó en la columna por cien). A continuación se muestra la gráfica típica de la purificación del anticuerpo.

Purificación de MAB- α cGH

Columna de Proteína A-Sefarosa

(Liofilizado ascitis)

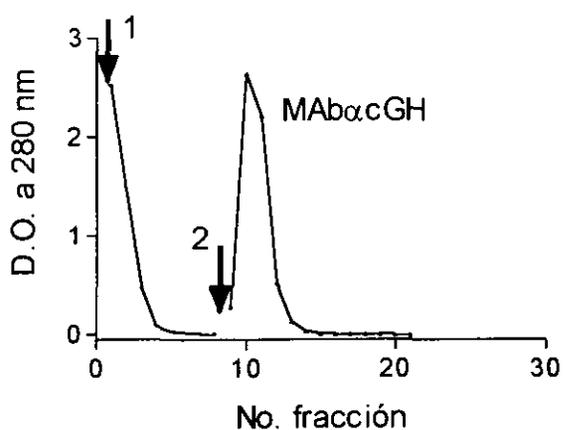


FIGURA 1

Patrón de densidad óptica de la cromatografía de líquido de ascitis en una columna de proteína A-sefarosa. 1. Cargado con amortiguador pH 8.9 (Glicina 1.5 M, NaCl 3M); 2. Elución con amortiguador pH 3.0 (Citratos 50 mM).

Una vez preparada la columna de sefarosa con anticuerpo monoclonal se procedió a separar por cromatografía el extracto hipofisiario. Para el extracto se utilizaron hipófisis con peso individual de aproximadamente 9.0 ± 1.0 mg.

La figura 2 corresponde a una gráfica que muestra el patrón de densidad óptica de una cromatografía típica del extracto hipofisiario pasado por la columna de anticuerpo anti-cGH. El pico de mayor área corresponde a proteínas hipofisarias, presumiblemente las demás hormonas como prolactina, hormona luteinizante, hormona foliculo estimulante, hormona estimulante de la tiroides, etc., así como proteínas constitutivas del tejido y sustancias que absorben a longitudes de onda de 280 nm. El segundo pico representa la hormona de crecimiento.

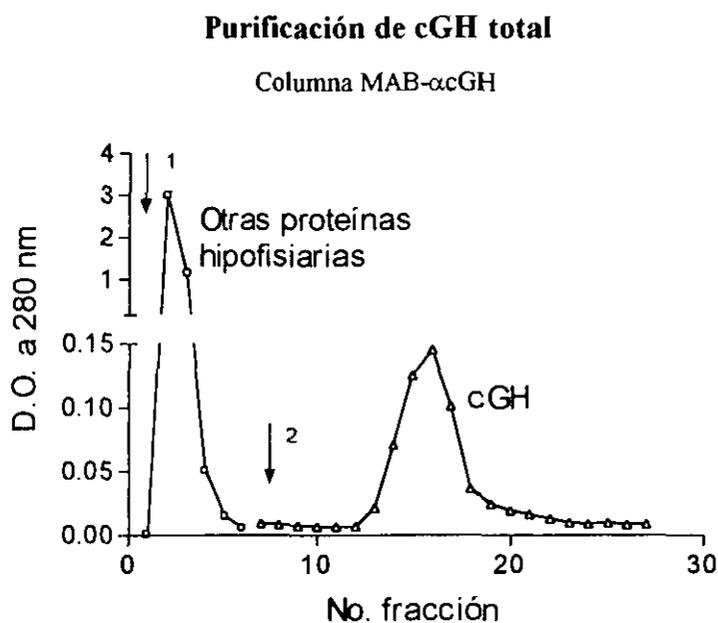


FIGURA 2

Patrón de densidad óptica de la cromatografía del extracto hipofisiario en una columna de sefarosa 4B acoplada a anticuerpo contra cGH. 1. Cargado (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) 2. Elución (Glicina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 3.0).

La tabla 1 muestra datos correspondientes a la purificación de cGH en un paso, con la cromatografía de afinidad con anticuerpo monoclonal.

Tabla 1

PRIMERA RUTA EXPERIMENTAL

Lote hipófisis	Peso hipófisis (mg)	Proteína extracto (mg)	LOTE	total GH proteína (mg)	mg GH γ /LOTE	% RIn GH/extracto	mg GH/ g hipófisis
1	354	-	I	0.25080	0.25973	-	0.7337
			IA	0.00893			
2	230	-	II	0.14840	0.19858	-	0.8334
			IIA	0.05018			
3	285	9.702	III	0.32100	0.39796	4.10	1.3964
			IIIA	0.07696			
4	296	11.052	IV	0.37180	0.38380	3.47	1.2966
			IVA	0.01200			
5	320	13.404	V	0.60900	0.61936	4.62	1.9355
			VA	0.01036			
SUMA	1485				1.85943		
					PROMEDIO \pm D.E.		1.25 \pm 0.47

En las siguientes figuras se observa el patrón electroforético de las fracciones obtenidas, con distintos métodos de tinción y revelado para resaltar cada banda de interés.

El resultado de esta purificación se analizó con electroforesis en gel de poliacrilamida y una tinción proteínas en general. En la figura 3 se presenta la digitalización de un gel teñido con azul de Coomassie. Nótese la gran cantidad de proteínas que contiene el extracto hipofisiario, mientras que la preparación pura de la hormona presenta una banda mayoritaria que pesa aproximadamente 26 kDa bajo condiciones reductoras. Se perciben también otras bandas de menor intensidad con pesos aproximados de 15, 29 y 50 kDa.

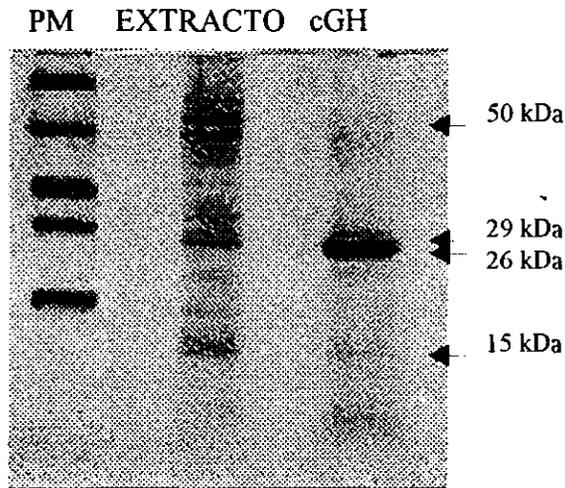


FIGURA 3

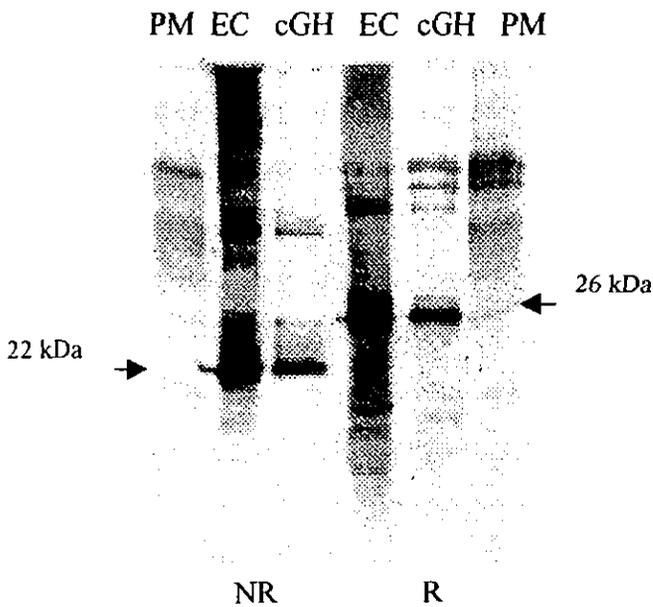
Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. En el primer carril (PM) se encuentran los marcadores de peso molecular; en el siguiente (EXTRACTO) se colocaron 10 μ g (proteína) de extracto hipofisiario; en el último carril (cGH) se colocaron 5 μ g de hormona de crecimiento purificada.

Para corroborar la presencia de proteínas inmunorreactivas (reconocidas por anticuerpo policlonal contra la cGH) en cada paso de la secuencia de purificación se realizaron diversos *Western blots*. La figura 4 presenta la digitalización de un *Western blot* en donde se pueden apreciar las proteínas (agrupadas en bandas por carril) que son inmunorreactivas. Se observa que la banda mayoritaria de hormona de crecimiento –una de estas proteínas inmunorreactivas– se desplaza hasta la posición de un peso molecular de 22 kDa en condiciones no reductoras, mientras que la banda se desplaza a 26 kDa, en condiciones reductoras. En el extracto –condiciones no reductoras– se observan varias bandas de mayor peso molecular que pueden corresponder a oligómeros de la molécula

sencilla de cGH. Esto se corrobora con la observación de la desaparición de las bandas de mayor peso molecular bajo condiciones reductoras; sin embargo, permanece un probable dímero no reducible con β -mercaptoetanol. Cabe mencionar que bajo condiciones reductoras aparecen otras bandas no específicas de cGH, considerando que aparecen también en el carril de los marcadores de peso molecular.

FIGURA 4

Western blot teñido con anticuerpo policlonal anti-cGH (Ab α cGH) y anticuerpo de cabra contra Ig's conejo conjugado con peroxidasa de rábano (GAR-HRP, segundo anticuerpo), revelado con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y diaminobencidina (DAB). PM: marcadores de peso molecular; EC: extracto hipofisiario crudo; cGH: hormona de crecimiento de pollo purificada; NR: condiciones no reductoras, R: condiciones reductoras.



Para corroborar la presencia de glicoproteínas en las preparaciones mencionadas se utilizó el reconocimiento con la lectina Concanavalina A. La figura 5 presenta la digitalización de un *Western blot* en donde se pueden apreciar las proteínas que son inmunorreactivas al anticuerpo policlonal contra cGH, así como glicoproteínas que son reconocidas por dicha lectina. La coincidencia de ambas marcas, o reconocimiento, nos lleva a la conclusión de la presencia de hormona de crecimiento glicosilada. Se observa que la

banda mayoritaria de hormona de crecimiento se desplaza hasta la posición de un peso molecular aproximado de 22 kDa en condiciones no reductoras, mientras que existe una banda de menor intensidad hacia los 25 a 26 kDa la cual es reconocida por la Concanavalina A, presumiblemente la variante glicosilada de la hormona de crecimiento.

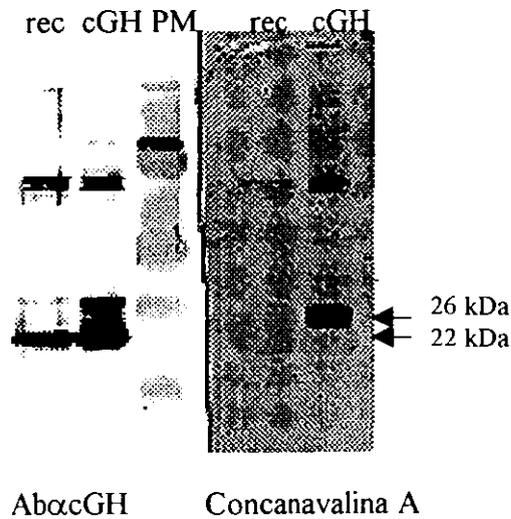


FIGURA 5

Western blot teñido con anticuerpo Ab α cGH y con Concanavalina A conjugada con peroxidasa. cGH: hormona de crecimiento de pollo pura; rec: hormona de crecimiento de pollo recombinante; PM: marcadores de peso molecular.

Una vez obtenida la cGH total se realizó la cromatografía de Concanavalina A-sefarosa para recuperar la variante glicosilada.

El patrón de densidad óptica de las fracciones obtenidas en la cromatografía de Concanavalina A-sefarosa se muestra en la figura 6. El primer pico consiste en hormona de crecimiento no retenida y por lo tanto no glicosilada. Después de eluir con metilmanósido se obtiene la variante glicosilada, correspondiendo al pico identificado con G-cGH en la figura. La proporción obtenida de variante glicosilada fue menor al 1% del total de hormona de

crecimiento. Esta preparación de hormona parcialmente purificada se denominará en lo sucesivo hormona pura (G-cGH pura) y a la preparación total de hormona, cGH pura.

Purificación de G-cGH

Columna de ConA-sefarosa

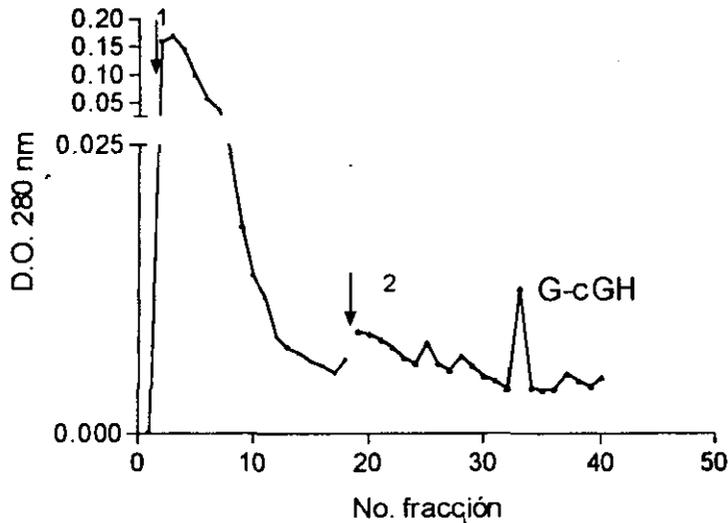


FIGURA 6

Patrón de elución para cromatografía de cGH total, en columna de Concanavalina A-sefarosa. 1. Cargado (Tris HCl pH 7.0) 2. Adición de α -D-metilmanósido 10 mM (elución)

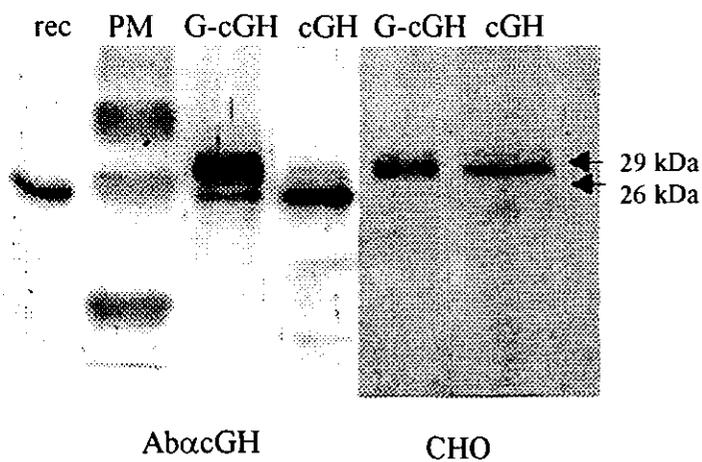
A continuación se presenta una tabla con los datos de recuperación de la hormona.

Tabla 2

		% DE RECUPERACIÓN
mg DE GH NATIVA QUE ENTRÓ A LA COLUMNA DE CONCANAVALINA A-SEFAROSA	1.670	
mg DE GH NATIVA S/FRACCIÓN GLICOSILADA (FRACCIÓN NO RETENIDA)	0.415	24.83
mg GH GLICOSILADA (FRACCIÓN RETENIDA)	0.001	0.06

Como se puede observar en la Tabla, se separó por cromatografía una fracción de la cGH pura utilizando el resto para análisis electroforéticos. La baja recuperación de hormona, tanto de la fracción “no retenida”, como de la fracción glicosilada, puede deberse a la dilución, dado que no se concentraron todas las fracciones recolectadas; sin embargo, también hay que considerar un pegado más fuerte de las proteínas con la resina.

FIGURA 7



Western blot teñido con anticuerpo ($Ab\alpha cGH$) y por oxidación de carbohidratos (CHO). rec: cGH recombinante; PM: marcadores de peso molecular; G-cGH: variante glicosilada pura; cGH: hormona de crecimiento de pollo pura.

La Concanavalina A tiene un reconocimiento específico de ciertas estructuras de oligosacáridos, de manera que se optó por utilizar un método más general de reconocimiento de glicoconjugados. Se utilizó el método de oxidación de carbohidratos y marcado con biotina. Con este protocolo de detección de carbohidratos se marcan todos los tipos de glicoproteínas. En la figura 7 se muestra el *Western blot* con la variante glicosilada pura en comparación con la cGH total. En la sección teñida con anticuerpo ($Ab\alpha cGH$), para ambas preparaciones se pueden observar dos bandas (29 y 26 kDa, condiciones reductoras) correspondientes a la glicosilada y al monómero, pero es notable la diferencia en proporción de cada una de ellas. El patrón de hormona recombinante se colocó para comparar la banda de 26 kDa, ya que siendo de origen procariota no contiene variante glicosilada. En la sección teñida con anticuerpo se colocaron aproximadamente 200 ng de proteína de cada fracción, mientras que en la de carbohidratos se colocaron 200 ng de G-cGH y 5 μ g de cGH total.

SEGUNDA RUTA EXPERIMENTAL

Con el objeto de comparar el rendimiento en la obtención de la hormona purificada se montó la segunda ruta experimental, que consistió en las mismas columnas de afinidad, pero en una secuencia invertida. Al pasar el extracto hipofisiario por la columna de Concanavalina A-sefarosa se obtuvieron las glicoproteínas (entre las que pudieran figurar LH, FSH, TSH y G-cGH entre otras); el material eluido de esta columna se separó por cromatografía con la columna del anticuerpo monoclonal, para recuperar la variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo. Como paso complementario, se separó por cromatografía la fracción no adsorbida la columna de Concanavalina A-sefarosa, que entre otras proteínas contenía la cGH no glicosilada; este paso se completó para recuperar la hormona de interés general para el laboratorio.

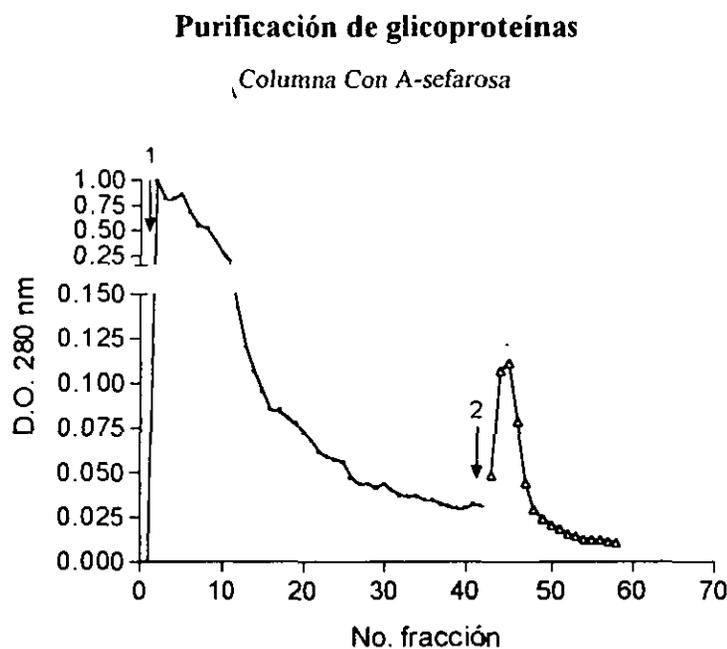


FIGURA 8

Patrón de elución típico para cromatografía de glicoproteínas, en columna de Concanavalina A-sefarosa. 1. Cargado (Tris HCl pH 7.0) 2. Elución (α -D-metilmanósido 10 mM).

La figura 8 presenta una gráfica con el patrón de densidad óptica para la cromatografía de Concanavalina A-sefariosa del extracto hipofisiario, obteniendo en la fracción retenida, como ya se mencionó anteriormente, todas las glicoproteínas incluyendo la G-cGH.

Por su parte en la figura 9 encontramos la gráfica para la cromatografía de anticuerpo monoclonal de la fracción glicoproteica del extracto hipofisiario. Con esta cromatografía se separó la G-cGH de las demás glicoproteínas.

Purificación de G-cGH

Columna MAB- α cGH

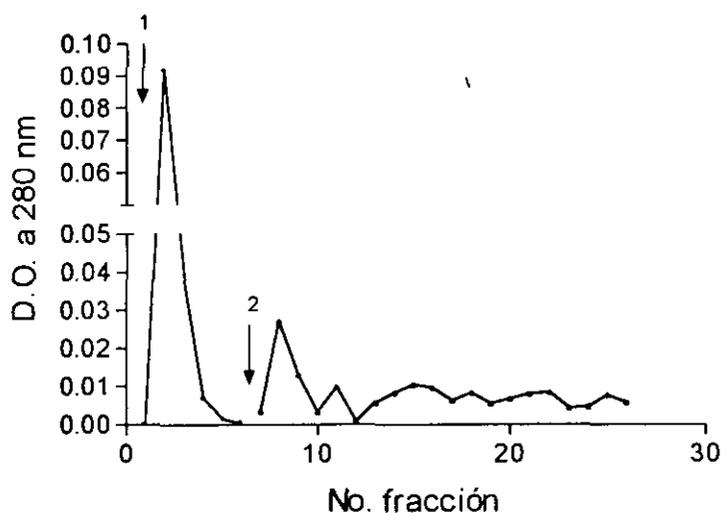


FIGURA 9

Patrón de elución de cromatografía de glicoproteínas en una columna de sefariosa 4B acoplada a anticuerpo contra cGH. 1. Cargado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) 2. Elución (Glicina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 3.0).

En la tabla 3 se resumen los datos de purificación para esta segunda ruta experimental.

Tabla 3

SEGUNDA RUTA EXPERIMENTAL

Lote hipófisis	Peso hipófisis (mg)	Proteína extracto (mg)	LOTE	total GH proteína (mg)	mg GH
6	200	4.06	2A	}0.745	
7	195	7.506	2B		
SUMA (sólo entraron en la columna de anticuerpo los lotes 6 y 7)	395				0.745
G-cGH					0.004
8	200	5.671	2C	0.300	

Con los datos presentados se concluyó que la primer secuencia de purificación era más eficiente para los parámetros utilizados, de manera que se prepararon dos columnas más (MAB α cGH-sefarosa), con lo que se purificó cGH total (todas las variantes reconocidas por el anticuerpo), para después purificar G-cGH a partir de esta preparación. En la tabla 4 se presentan datos de preparación de las tres columnas utilizadas, al igual que de la purificación correspondiente de cGH total.

Tabla 4

Columna	Anticuerpo (mg) / g sefarosa	Eficiencia de acoplamiento	Peso hipófisis (mg)	Extracto proteína (mg)	GH proteína (mg)	
					/col	/g hipóf
1	33.2	97.76	1485	-	1.86	1.252
2	55.3	93.58	1051	65.82	1.38	1.313
3	15.2	95.73	1008	53.09	1.52	1.507
Recuperación mg GH / g hipófisis (promedio \pm desv.est.)				1.36 \pm 0.13		

Una vez purificada la variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo se procedió a la caracterización del tipo de enlace glicosídico del oligosacárido unido a la proteína. Para determinar el tipo de glicosilación se sometió a la cGH total y a la G-cGH pura a la acción de las siguientes enzimas desglicosilantes: péptido N-glicosidasa F (PNGasaF), neuraminidasa II (NANasa II), O-glicosidasa_{PS}, endoglicosidasa H (Endo-H) y endoglicosidasa F (Endo-F). Cabe mencionar que para todos los experimentos, se colocó una mayor cantidad de patrón sin digerir (de G-cGH pura sin tratamiento enzimático) por lo que la banda generalmente se ve más teñida. La G-cGH fue susceptible a la acción de la PNGasaF como lo muestra el *Western blot* en la figura 10. Nótese el efecto de desglicosilación (no hay reacción positiva para carbohidratos en el carril 8*) para la G-cGH digerida con PNGasaF, así como el desplazamiento de la banda inmunorreactiva de 29 kDa hacia el correspondiente de 26 kDa (carril 4*).

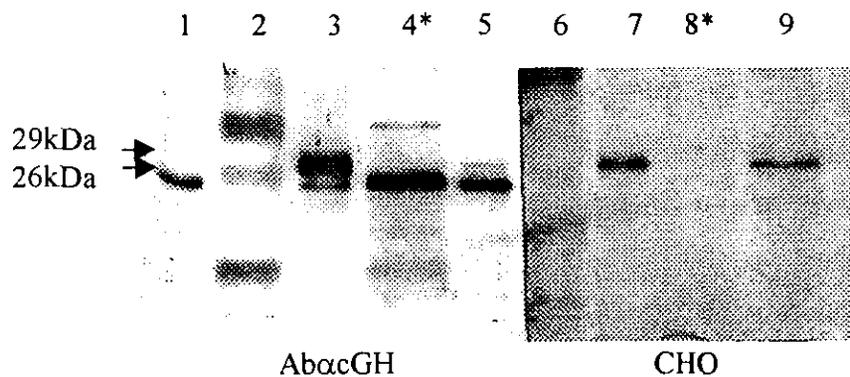


FIGURA 10

Western blot de la G-cGH incubada en presencia de Péptido N Glicosidasa F (PNGasaF). La membrana se tiñó con anticuerpo para cGH y por oxidación de carbohidratos. El carril 1 contiene cGH recombinante; en el 2 y 6 se muestran los marcadores de peso molecular; 3 y 7, G-cGH sin hidrolizar; 4 y 8, G-cGH incubada con PNGasa F; 5 y 9, cGH total -nativa-.

de N-oligosacárido, pero el acceso al que tenga lugar es muy importante, por lo que se recomienda una digestión previa con NANasa y O-glicosidasa para remover residuos que puedan dificultar esta operación. Una vez observada la digestión se procedió a verificar la remoción de los residuos por la PNGasa F sin tratamiento previo, lo cual se observa en la figura 12.

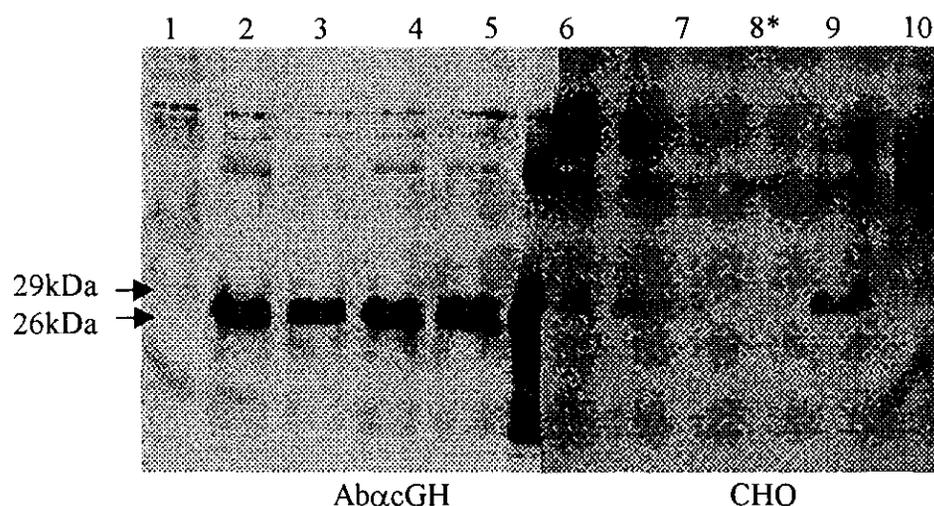


FIGURA 12

Western blot de la cGH total incubada en presencia de PNGasaF, Endo-F y O-glicosidasa. La membrana se tiñó con anticuerpo y por oxidación con carbohidratos. Los carriles 1 y 10 muestran los marcadores de peso molecular; 2 y 6, cGH incubada con O-Glicosidasa; 3 y 7, con Endo-F; 4 y 8, con PNGasa F; 5 y 9 cGH sin hidrolizar. Nótese el efecto de desglicosilación (no hay reacción positiva para carbohidratos) en el carril 8, con la acción de la PNGasaF*.

El tratamiento de la G-cGH pura con las enzimas mencionadas no revela mayor información, como se puede observar en la figura 13. El barrido observado está presente tanto en la hormona sin hidrolizar como en la digerida por las enzimas.

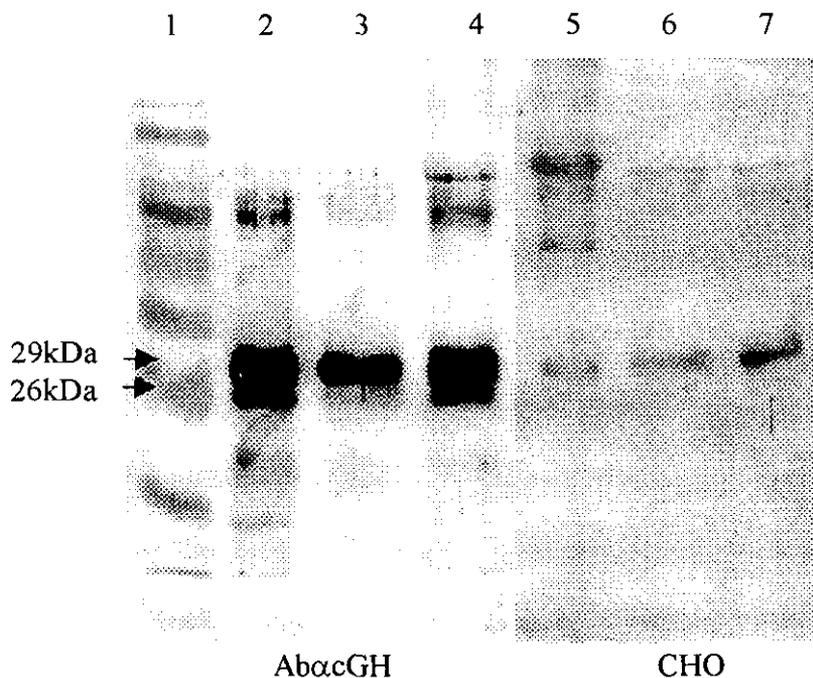


FIGURA 13

Western blot teñido con anticuerpo y oxidación de carbohidratos. El carril 1 contiene los marcadores de peso molecular; los carriles 2 y 7 muestran la cGH glicosilada (G-cGH) sin hidrolizar; 3 y 6, G-cGH digerida con Neuraminidasa-II; 4 y 5, G-cGH digerida con Endoglicosidasa H.

Por otra parte, para determinar el sitio probable de glicosilación en la estructura primaria de la cGH se llevó a cabo un proceso de proteólisis limitada con la ayuda de exopeptidasas (carboxipeptidasa B y carboxipeptidasa Y) que remueven determinados residuos de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la cadena polipeptídica, y con

la endopeptidasa Trombina, cuyo sitio de corte más probable parece situarse alrededor del residuo 134 de la molécula de GH. En la figura 14 se muestra un *Western blot* de la G-cGH incubada en presencia de Carboxipeptidasa B, en la que no se observa cambio alguno en la movilidad de la banda de G-cGH; ésto puede deberse a su limitado espectro de actividad que conlleve al corte del último residuo (I191), sin que este cambio implique una modificación substancial en la movilidad de la banda. Las condiciones de reacción para la carboxipeptidasa B fueron no reductoras, por la desnaturalización que podría ejercer el β -mercaptoetanol sobre la enzima misma, por lo que además de la especificidad de la enzima, el puente disulfuro (C181-C189) puede impedir el corte sucesivo de los siguientes aminoácidos.

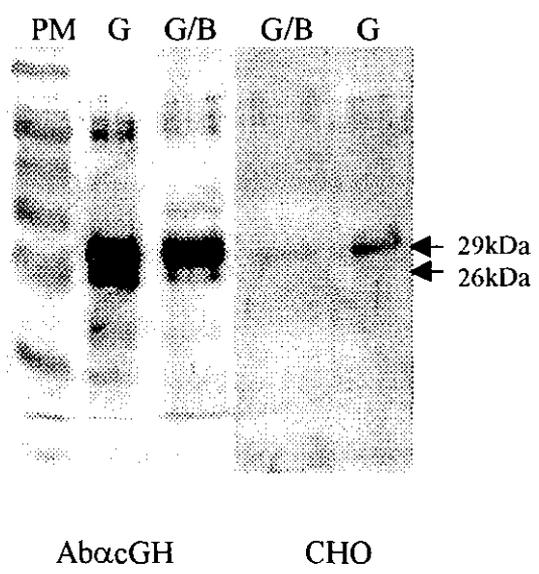


FIGURA 14

Western blot teñido con anticuerpo y por oxidación de carbohidratos. PM: marcadores de peso molecular; G: cGH glicosilada (G-cGH) sin hidrolizar; G/B: G-cGH digerida con Carboxipeptidasa B.

Para considerar un espectro de corte más amplio, se utilizó la carboxipeptidasa Y, con el fin de eliminar al menos los últimos 4 aminoácidos de la molécula completa de GH (N188, C189, T190, I191); si la hipótesis de N-glicosilación en el residuo 188, que es parte de una secuencia consenso para este tipo de glicosilación fuese correcta, entonces la remoción de estos residuos resultaría en la desglicosilación de la molécula de forma comparable con el patrón electroforético de PNGasa F, ya que la remoción de sólo algunos aminoácidos no tendría un efecto notable en el peso determinado por SDS-PAGE.

De igual forma se digirió la G-cGH con trombina, esperando encontrar un péptido glicosilado correspondiente a la región carboxilo terminal (con un peso molecular hipotético de 10-15 kDa). A continuación se presentan los *Western blots* de estas digestiones.

En la figura 15 se observa evidencia de la digestión con trombina (durante 4 horas) y con carboxipeptidasa Y (durante 4 horas a 25°C). En el caso de la carboxipeptidasa Y, debido a que se utilizó un exceso de la enzima (lo que se puede comprobar por la banda muy ancha de glicoproteína en 60kDa), se observa la desaparición de la banda inmunorreactiva casi en su totalidad; esto puede deberse a que la preparación de la enzima puede contener una pequeña contaminación con otro tipo de proteasas, pero que al ser utilizada en exceso nos da oportunidad de otra actividad proteolítica.

La digestión con trombina generó varios fragmentos (20, 15 y 9 kDa) como se puede observar en la membrana teñida con anticuerpo (G/T), pero la proporción de cada uno es mínima para poder detectar el oligosacárido por medio de oxidación de carbohidratos; de manera que se procedió a incubar la hormona durante más tiempo para conseguir la mayor cantidad de dichos fragmentos, ya que la banda de 26 kDa no disminuyó en forma importante. Cabe mencionar que las condiciones iniciales se estandarizaron para cGH recombinante, y debe considerarse el efecto protector que pueda tener el oligosacárido en la molécula de G-cGH.

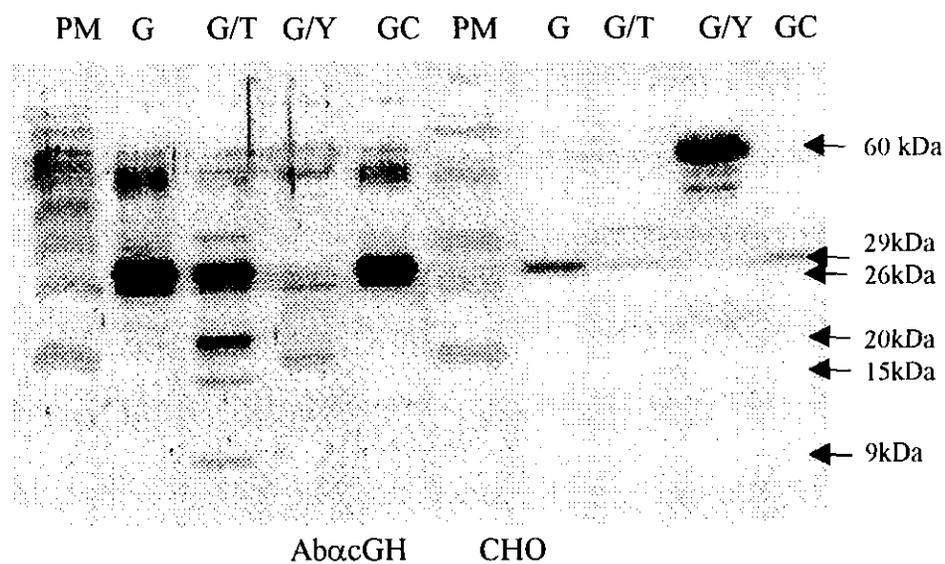


FIGURA 15

Western blot teñido con anticuerpo y por oxidación de carbohidratos. PM: marcadores de peso molecular; G: la cGH glicosilada (G-cGH) pura; G/T: G-cGH digerida con Trombina; G/Y: G-cGH digerida con Carboxipeptidasa Y; GC: cGH glicosilada (G-cGH) incubada sin enzimas.

En la figura 16 se observa evidencia de la digestión con carboxipeptidasa Y (durante 15 minutos a 37°C) y con trombina (tiempo de incubación: toda la noche, 37°C). Se observa que con la trombina la digestión fue más completa (queda menor cantidad de G-cGH no digerida), pero no se alcanzan a apreciar los fragmentos reconocidos claramente en el *WB* anterior, ni es tan clara la presencia del glicopéptido. Sin embargo, con observación más detallada se observan los fragmentos de 20, 15 y 9 kDa –bandas inmunorreactivas al anticuerpo vs cGH– y un glicopéptido correspondiente al fragmento de 20 kDa. En la digestión de G-cGH con trombina, el fragmento más evidente es el de 20 kDa, mientras que cabe mencionar que la digestión de la hormona recombinante genera un fragmento de 15 kDa además del de 8 (9) kDa. La banda de 37 kDa que se observa en el carril 8, también está presente en los controles de enzima sola (trombina).

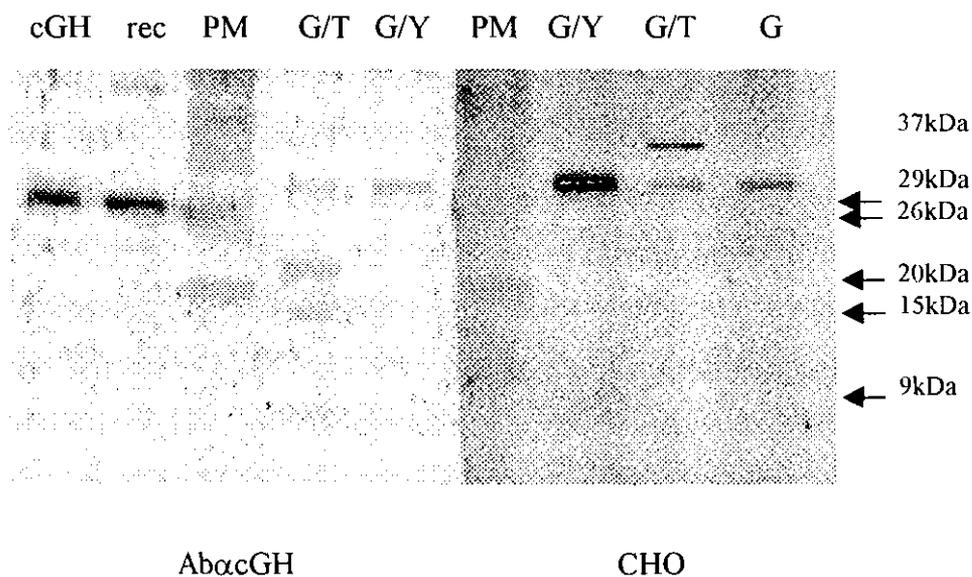


FIGURA 16

Western blot teñido con anticuerpo y por oxidación de carbohidratos. cGH: hormona de crecimiento de pollo total; rec, cGH recombinante; PM, los marcadores de peso molecular; G, la cGH glicosilada (G-cGH) pura; G/T, G-cGH digerida con Trombina; G/Y, G-cGH digerida con Carboxipeptidasa Y.

Se realizaron ensayos de digestión con carboxipeptidasa Y a diferentes tiempos de incubación (15', 30', 60') sin encontrarse diferencia evidente por el método de SDS-PAGE en las condiciones utilizadas. La digestión con trombina no se llevó por más tiempo debido a la inherente posibilidad de actividad de enzimas contaminantes, y considerando que el tiempo estandarizado para la hormona recombinante es de 4 horas al no encontrar mayor rendimiento en el corte con mayor tiempo de incubación.

Anteriormente, en el laboratorio se montó un ensayo homólogo de radiorreceptores (RRA) para cGH en membranas de hígados de pollos adultos (Reyes et al. 1996). El ensayo se llevó a cabo con membranas obtenidas por ultracentrifugación (47,800 xg), resuspendidas en amortiguador para obtener un homogeneizado con una concentración de proteína de 20-30 mg/ml. Como trazador se utilizó cGH recombinante (rcGH) marcada con 1 mCi de Na^{125}I (47.45 \pm 10 μg de proteína) por el método de Yodogen. Mediante este ensayo se observó que la cGH de 22 kDa (monómero no glicosilado) y la G-cGH fueron reconocidas de manera semejante por el receptor, aunque la G-cGH tiene una menor afinidad por los receptores hepáticos del pollo en comparación con la cGH recombinante, siendo la constante de afinidad de 0.07 y 0.015 nM y la capacidad o Bmax de 4.77 y 3.5 fmol/mg, respectivamente. A continuación se presenta una gráfica que ilustra la semejanza en el desplazamiento de la variante glicosilada con respecto al patrón de recombinante.

Ensayo de radio receptor para Hormona de Crecimiento

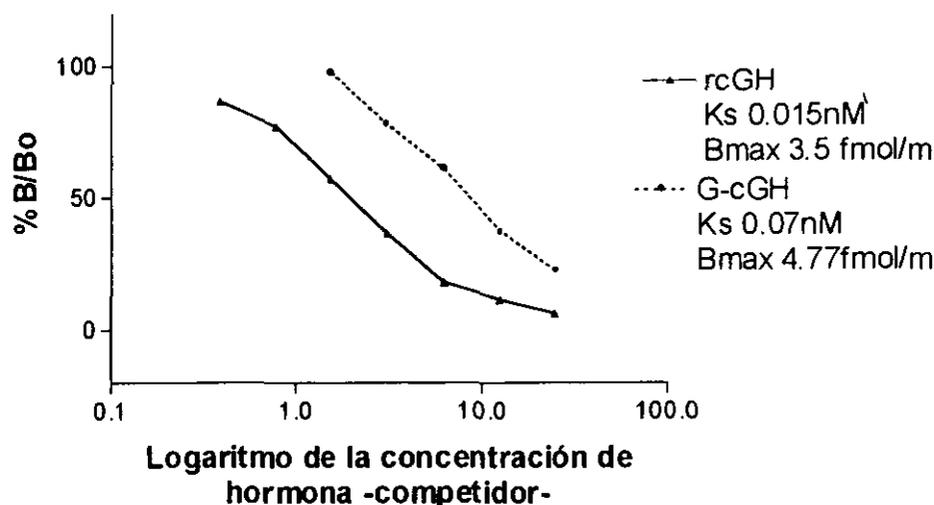


FIGURA 17

Curva de desplazamiento de la variante glicosilada G-cGH y de la hormona de crecimiento recombinante -monómero-. B es la ^{125}I -rcGH (cpm) unida a los receptores membranales en presencia de diferentes concentraciones de hormona competidora (0.39-100 ng/ml) y Bo es la hormona marcada (cpm) unida en ausencia de ligando competidor.

No obstante que exista una diferencia en los valores de constante de afinidad para ambas preparaciones, la diferencia no es significativa, por lo que en conclusión sólo podemos afirmar que ambas preparaciones son reconocidas por el receptor.

Los ensayos de unión del ligando al receptor permiten determinar la cantidad de receptores presentes por mg de proteína membranal, así como la afinidad que presenta dicho receptor por el ligando. Con este fin se pueden desarrollar ensayos con ligandos competidores, en los que se obtienen curvas de desplazamiento por unión competitiva al utilizar una concentración fija de ligando radioactivo que va siendo desplazada por concentraciones crecientes de ligando no radioactivo usado como competidor. Las constantes cinéticas de afinidad (K_s) se obtuvieron con las curvas de desplazamiento de la hormona marcada con las diferentes concentraciones de ligando, ajustando los resultados a la ecuación de Michaelis-Menten con la ayuda del programa para computadora Origin 3.0.

DISCUSIÓN

La existencia de la heterogeneidad molecular, tanto en la hormona de crecimiento, como en otras hormonas proteínicas, está ampliamente reconocida. Las primeras clasificaciones de las hormonas hipofisarias consideraban un grupo de proteínas (LH, FSH, TSH) como las únicas hormonas polipeptídicas que se encontraban glicosiladas, mientras que GH y PRL no lo estaban. Desde que se identificaron las variantes glicosiladas de estas hormonas se ha acrecentado el interés por su caracterización. El estudio de las variantes glicosiladas de la GH se dirigió en un principio hacia la de humano, rata y otros mamíferos, pero la necesidad de tener representatividad a lo largo de las diversas especies y de manera más práctica, a lo largo de clases de vertebrados, no dejó atrás el estudio en aves.

La identificación por Berghman y col (1987) de la variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo dió pauta a seguir con su caracterización, ya que existe en su estructura primaria una secuencia consenso para N-glicosilación (N188C189T190), a diferencia de la GH de otros vertebrados (-mamíferos-) que carecen de esta secuencia (por ejemplo: hGH-N: S188C189G190; pGH: S188C189A190); cabe recordar que la GH de humano puede provenir del gen normal o del variante, existiendo secuencia consenso sólo en la variante (hGH-V: N140Q141S142) y correlacionándose con una mayor proporción de GH glicosilada en su producto. Es posible que la presencia de la secuencia consenso en la región del carboxilo terminal tenga alguna importancia representada filogenéticamente porque se encuentra sólo en aves (excepto el pavo), en peces y anfibios, pero no se encuentra en mamíferos. A continuación se muestra una tabla con la secuencia de GH de algunas especies, en donde se puede comparar la posición del consenso para N-glicosilación.

En el presente proyecto, la purificación la G-cGH en “dos pasos” nos generó un rendimiento muy pobre. El primer paso de purificación por cromatografía de afinidad con anticuerpo monoclonal resultó muy exitoso, obteniendo un rendimiento promedio de 1.36 mg por g de adenohipófisis. El anticuerpo monoclonal utilizado reconoce epítopes comunes de algunas de las variantes de GH, ya que la purificación por cromatografía recupera una gran cantidad de ellas, inclusive la glicosilada, a diferencia del método anteriormente utilizado, con precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Mediante el método de precipitación se separa en un principio la fracción de glicoproteínas y la cGH pura consistía en su mayor parte del monómero no glicosilado, sus oligómeros y fragmentos, pero no contenía la fracción glicosilada (Arámburo, 1989a; Arámburo, 1991). Por otra parte se utilizó una cromatografía de afinidad con Concanavalina A. La Concanavalina A es una lectina derivada de la planta *Canavalia ensiformis*. En general, las lectinas son proteínas que unen varios tipos de oligosacáridos; se forman por una o más subunidades en un multímero, usualmente tetrámeros. La Con A puede existir como un dímero a pH menor de 5.6, como tetrámero entre pH de 5.6 y 7.0 y agregados en pH más arriba de 7.0; en presencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} es capaz de unir eficientemente α -D-Man, α -D-Glc, y α -D-NAcGlc. La Con A ha sido ampliamente utilizada por su fácil manejo y alta afinidad (Sutton, 1989). En este segundo paso, la cromatografía de afinidad con lectina, se obtuvieron resultados no tan favorables; una de las limitantes fue la cantidad inicial de carga de la columna, que en cantidad de proteína representa un estándar apropiado pero la glicoproteína contenida en dicha carga fue muy pequeña en comparación con la matriz utilizada. De esta manera, no se obtuvo gran cantidad de G-cGH, parte de la cual pudo retenerse en la matriz de manera inespecífica, o por dilución, no detectarse.

Una vez tenida la preparación purificada de la hormona se observó su patrón electroforético. Por SDS-PAGE y *Western blot* se encontró un peso molecular de 26 kDa en condiciones no reductoras y 29 kDa en presencia de β -mercaptoetanol, a diferencia del monómero no glicosilado, el cual tiene un peso molecular de 22 kDa y 26 kDa, en condiciones no reductoras y reductoras, respectivamente. La diferencia de 3,000 Da no

necesariamente se debe específicamente al tamaño (masa) del oligosacárido unido, ya que se tienen reportes de que los carbohidratos tienen un comportamiento diferente al de las proteínas en electroforesis bajo estas condiciones (Segrest and Jackson, 1972). En SDS-PAGE se espera que el detergente (dodecilsulfato de sodio -SDS) se asocie uniformemente a la proteína y le proporcione una carga negativa homogénea por unidad de superficie, de forma que el desplazamiento a lo largo del gel de poliacrilamida se deba principalmente al tamaño de la molécula; sin embargo, la unión del SDS con los carbohidratos no es tan uniforme como en las proteínas, de manera que la carga adquirida es menor y éstos presentan un mayor peso molecular aparente.

Los *western blots* de la preparación purificada de la G-cGH presentan aún dos bandas principalmente: la del monómero no glicosilado y la de la G-cGH propiamente dicha. La banda del monómero no glicosilado es reconocida por el anticuerpo policlonal, pero no por la Concanavalina A ni se tiñe por medio de oxidación de carbohidratos, biotina-estreptavidina-AP. En cambio la banda de G-cGH se tiñe por las tres técnicas de revelado. La presencia de la banda de menor peso molecular puede deberse a la co-purificación de esta molécula, por su previa formación dimérica con la G-cGH, o por la desglicosilación de la G-cGH, aunque la desglicosilación de las N-glicoproteínas no es tan fácil de llevarse a cabo de manera espontánea.

La técnica para revelado con anticuerpo es sumamente sensible, debido principalmente a la amplificación que se da por el segundo anticuerpo que es el que lleva la marca, y posiblemente a la propia afinidad del anticuerpo. En cambio, la sensibilidad de las técnicas utilizadas para detectar las glicoproteínas fue menor, de manera que la cantidad de hormona necesaria para el protocolo fue de por lo menos un orden de magnitud mayor en comparación con la técnica con anticuerpo. En un principio se utilizó la Concanavalina A marcada con peroxidasa de rábano para detectar las glicoproteínas, pero dado que la lectina tiene especificidad por ciertos oligosacáridos, se tomó la decisión de utilizar un método de más amplio espectro, para la detección de cualquier glicoproteína. Por ello se empleó también el método de oxidación de carbohidratos para acoplar biotina, reconocida después

por estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, y el desarrollo de color por la reacción enzimática con BCIP y NBT.

Por medio de los ensayos con enzimas desglucosilantes, encontramos que la G-cGH está N-glicosilada, lo que en un principio se presumía debido a la secuencia consenso que se necesita para dicha glicosilación. De hecho, el tipo de glicosilación de la cGH es el que nos permitió su purificación, ya que el reconocimiento de la Concanavalina A (Con A) por esta molécula se favorece gracias a la presencia de estos residuos.

Sin embargo bajo el tratamiento con proteasas nos encontramos con resultados desconcertantes. La secuencia consenso tan referida anteriormente se encuentra en la región carboxilo terminal: los últimos cuatro aminoácidos de la cGH son : N188 C189 T190 I191. Se consideró que la eliminación de estos aminoácidos por carboxipeptidasas nos proporcionaría información sobre la posición del oligosacárido; de igual manera se obtendría información con el patrón de corte con trombina. La trombina tiene un probable sitio de corte alrededor del aminoácido 133, estandarizado con hormona recombinante teniendo como resultado dos fragmentos reconocibles: uno de 15 kDa de la región amino terminal y uno de 8-9 kDa de la región carboxilo terminal. La presencia del oligosacárido en alguno de estos fragmentos modificaría su peso molecular aparente, hipotéticamente el de 8 kDa (fragmento carboxilo-terminal, que lleva la secuencia consenso) podría variar hasta 11-12 o posiblemente 15 kDa, teniendo en cuenta la diferente movilidad de los glicopéptidos en SDS-PAGE (esta diferencia es más marcada si la proporción del oligosacárido sobrepasa el 30% del peso molecular).

El tratamiento con carboxipeptidasas no modificó aparentemente el peso molecular de la G-cGH, excepto en el caso de colocar un exceso de carboxipeptidasa Y con un tiempo de incubación de cuatro horas; en este último caso no se detectaron bandas inmunorreactivas, posiblemente porque la enzima cortó varios aminoácidos (no sólo los últimos) y además las proteasas contaminantes pudieron fraccionar aún más la proteína

dando cabida a la carboxipeptidasa Y para seguir cortando en cada fragmento. Estos fragmentos, aunque existentes, pudieron entonces no ser reconocidos por el anticuerpo.

La falta de actividad de la carboxipeptidasa B no fue sorprendente debido al hecho de que su especificidad de corte es muy limitada: sólo puede cortar aminoácidos básicos - carboxilo terminal- como arginina y lisina, aunque se ha reportado que es posible el corte de aminoácidos neutros como isoleucina. Con esta enzima se esperaba el corte de isoleucina y posiblemente treonina, aunque la cisteína presentaba un reto más por el puente disulfuro que forma con el aminoácido 181. No obstante, se esperaba que con la carboxipeptidasa Y sí se lograra el corte, ya que puede cortar todos los aminoácidos (inclusive prolina, aunque lentamente la glicina). Con el exceso de enzima se obtuvo un resultado muy drástico, pero en los siguientes experimentos no se pudo establecer el tiempo adecuado para llegar al corte de los cuatro residuos, si es que a 15, 30 y 60' se cortaba sólo hasta la cisteína. En otras proteínas se estandarizó el tiempo de corte de la enzima, y con 15' es posible un corte hasta de 8 aminoácidos para la concentración de sustrato y enzima utilizados. Definitivamente la conformación de la proteína, así como la presencia del carbohidrato (si en verdad se encuentra en esa posición), pueden ser limitantes de la velocidad de reacción enzimática, en comparación con lo ya establecido. Pero existe también la posibilidad de que la enzima realmente esté removiendo los últimos residuos, que en proporción no modificarían el peso molecular aparente bajo este tipo de ensayo, pero el oligosacárido se mantuviera en la molécula si se encuentra unido a otro residuo de asparagina que no sea el esperado.

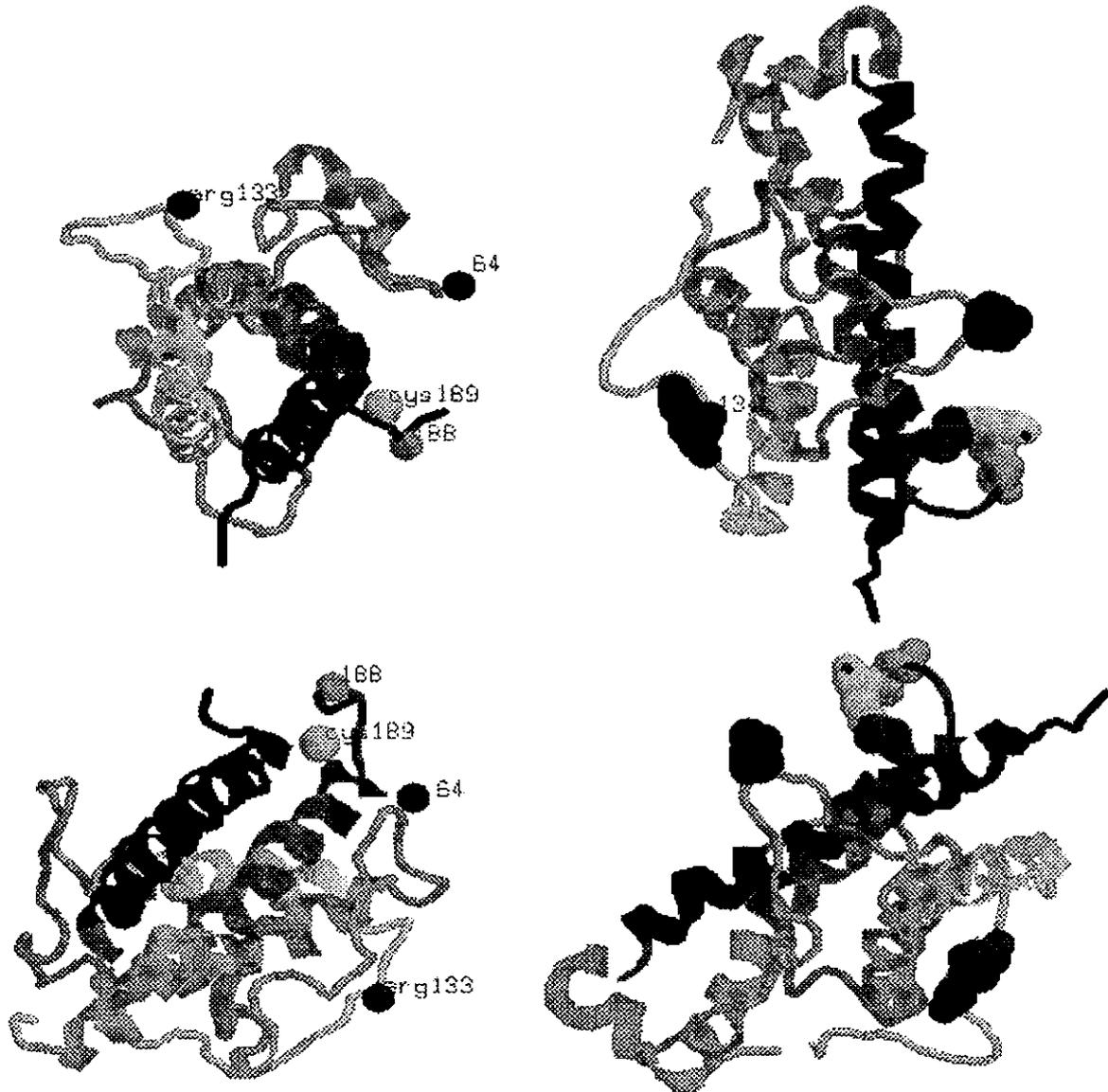
Por su parte, bajo el tratamiento con trombina se pudo observar un fragmento de 20 kDa que parecía estar glicosilado, así como los de 15 y 9 sin glicosilar. Una explicación podría ser que la baja sensibilidad del método no nos permitiera apreciar si el de 15 o el de 9 se encontraba glicosilado también, pero dado que el de 20 así parece estar, entonces nos encontramos en una disyuntiva. Un fragmento de 20 kDa puede conformarse como algún oligómero nuevo (no es muy probable, puesto que son condiciones reductoras y desnaturizantes, además de que la presencia del carbohidrato limita las opciones de fragmentos) o ser alguno de los fragmentos reconocidos en el tratamiento de hormona

recombinante más la correspondiente masa del oligosacárido. El fragmento que más apunta a corresponder con dicha banda es el de 15 kDa, ya que el de 9 todavía es muy ligero para llegar a un peso de tal magnitud. Sin embargo el fragmento de 15 kDa corresponde a la región amino terminal, lo cual es sorprendente, puesto que la hipótesis apuntaba que la glicosilación estaría en el extremo contrario. Por ello vale la pena considerar otro sitio de glicosilación.

Los hallazgos de Bédécarrats et al (1999) los motivan a proponer una secuencia alterna con N-X-C (además de N-X-T/S, ya conocida) para la N-glicosilación, ya que observan que la prolactina de pavo glicosilada presenta este tipo de glicosilación, pero no contiene secuencia consenso en su estructura primaria. Esto mismo lo propusieron Corcoran y Proudman en 1991. En la cGH existen nueve residuos de asparagina, pero sólo el 188 coincide con una secuencia de tal tipo (N-X-T/S/C), además de que la conformación de la molécula y los sitios de unión reconocidos (al menos en el caso de hGH), permitirían la colocación del oligosacárido sin modificar drásticamente el reconocimiento por el receptor. No obstante, dado que la secuencia consenso existe en la proteína, podemos insistir en esta posición como la más probable para el sitio de glicosilación.

La posición de esta secuencia con la asparagina hacia el final de la molécula y con una cisteína que forma parte de un puente disulfuro puede explicar también la baja proporción de variante glicosilada. Gavel y von Heijne (1990) realizaron un estudio estadístico de una extensa colección de "sitios" N-X-T/S que podían estar glicosilados o no. En sus resultados encuentran que los sitios no glicosilados tendían a estar más frecuentemente hacia el carboxilo terminal de la proteína y que la presencia de prolina en la posición X o Y del consenso (N-X-T/S-Y) reducía fuertemente la presencia de N-glicosilación. Por su parte, Christlet y colaboradores (1999) también realizan un análisis de frecuencia de la localización tridimensional de sitios consenso, y encuentran que 65% de residuos de asparagina (como parte de la secuencia consenso) se encuentran en la superficie de la molécula; parece ser más factible la glicosilación, si el sitio se encuentra localizado en un asa de la molécula o como parte de formación β -plegada. Tal es el caso de la cGH: la

secuencia queda fuera de las formaciones α -helicoidales. A continuación se presentan esquemas de la molécula con los sitios mencionados.



ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA GH DESDE VARIAS PERSPECTIVAS
aminoácidos (secuencia de cGH): lisina 64, arginina 133, asparagina 188, cisteína 189
sitio probable de N-glicosilación: asparagina 188 (S187N188C189T190I191)
sitio probable de corte por trombina en cGH recombinante: arginina 133
(R130S131P132R133G134P135)

Regresando al tema de las clasificaciones, nos encontramos aquí con el dilema de los tipos de glicosilación y la secuencia consenso requerida para la N-glicosilación. Algunos autores pueden considerar de forma tan estricta la necesidad de dicha secuencia como para diferir la conclusión de sus hallazgos hacia otras opciones (como la existencia de nuevos genes), sin dar flexibilidad al supuesto inicial. Díaz y colaboradores (1993) encuentran en hGH una variante -fragmento- N-glicosilada en muy baja proporción, y tomando como base que el gen normal no contiene secuencia consenso y que es el único gen que se expresa por la hipófisis, proponen la posible existencia de otro gen para GH o proteína relacionada; cabe mencionar que también proponen que la hGH puede proceder de lotes con hipófisis acromegálicas, ya que en ellas se puede expresar también el gen variante de hGH (que sí tiene la secuencia de glicosilación).

En nuestro supuesto inicial, la hipótesis apuntaba hacia N-glicosilación en el residuo 188 pero, a falta de corroborar y ahondar en nuestros resultados, el supuesto podría ser falso. Otra explicación razonable es la protección que podría estar ejerciendo el carbohidrato sobre la actividad con proteasas, específicamente la trombina. Considerar que sólo existe un sitio de corte, o al menos un sitio más probable de corte, no excluye la posibilidad de la existencia de un sitio alternativo, y ello generar un fragmento más grande. Dado que con las herramientas utilizadas para el análisis de los resultados no se tienen evidencias claras del sitio de glicosilación, es necesario realizar más experimentos que nos puedan apuntar hacia la conclusión correcta.

En estudios de radioreceptor se encontró que la G-cGH tiene una menor afinidad por los receptores hepáticos del pollo en comparación con la cGH recombinante, siendo la constante de afinidad de 0.07 y 0.015 nM y la capacidad o Bmax de 4.77 y 3.5 fmol/mg, respectivamente (Reyes et al, 1996). Estos resultados apoyan la hipótesis de una modificación estructural que tiene cierta influencia sobre su unión a receptores, aunque ello no necesariamente involucra una bioactividad menor de la G-cGH. Hattori y colaboradores (1998) analizan la actividad biológica de moléculas variantes de lactógeno placentario en el ensayo de proliferación de células de Nb2, así como su unión al receptor de prolactina y

estimulación de la fosforilación de JAK-2 en estas mismas células. Encuentran que la habilidad de unión al receptor y activación de JAK-2 parece ser independiente de la N-glicosilación, ya que sus resultados muestran que la potencia relativa de actividad biológica es mayor si la molécula está glicosilada como tipo nativo en comparación con la molécula que sólo tiene un sitio glicosilado en lugar de dos o en comparación con la no glicosilada; sin embargo su unión al receptor y activación de JAK-2 no presentan diferencias significativas entre los tipos mutantes y el tipo nativo.

El creciente interés sobre la influencia que pueda tener la glicosilación sobre la actividad de la G-cGH nos presenta varios retos para lograr su caracterización. Uno de los principales obstáculos que se necesitan librar es la obtención de suficiente cantidad de proteína para el análisis estructural y funcional que oriente sobre la razón de su existencia. La purificación de mayor cantidad de la variante es uno de los objetivos que se pretende alcanzar en la continuación de este proyecto. Otro reto a vencer es el estudio de la estructura del oligosacárido con herramientas más sensibles como lo es la espectrometría de masas en coordinación con los procesos enzimáticos que ya hemos estado trabajando, así como el análisis de los tipos de carbohidrato presentes en la molécula. Para discernir si la G-cGH tiene alguna función en específico se puede iniciar el estudio desde un punto de vista fisiológico considerando la variación de su concentración en diferentes estados del animal. La localización subcelular de la proteína nos proporcionará invaluable información para complementar el estudio de esta variante. Por último, uno de los retos que se ha buscado resolver desde el hallazgo de la G-cGH es la producción de un anticuerpo altamente específico sobre esta variante, que facilitaría sobremanera el estudio profundo de esta glicoproteína. Los retos que ahora se presentan, nos motivan a continuar este proyecto para contribuir con información acerca del mundo que nos rodea.

CONCLUSIONES

El método de purificación con el que se obtuvieron mejores resultados consistió en utilizar cromatografía de inmunoafinidad seguida por cromatografía con Concanavalina A-sefarosa, con lo que se purificó la variante glicosilada de la hormona de crecimiento obteniendo un rendimiento menor al 1% de la hormona de crecimiento total.

El anticuerpo monoclonal contra cGH utilizado reconoce un epítipo que es común a diversas variantes de la hormona, incluyendo la glicosilada, facilitando su purificación con la cromatografía de inmunoafinidad.

La G-cGH analizada por electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y *Western blot* se presenta en una banda con un peso molecular aproximado de 26 kDa y 30 kDa en condiciones no reductoras y reductoras, respectivamente, lo cual refleja la presencia del oligosacárido en la glicoproteína, en comparación con el monómero no glicosilado con peso de 22 y 26 kDa en condiciones no reductoras y reductoras, respectivamente.

La G-cGH es susceptible a la actividad de la PNGasa F, por lo que el tipo de enlace del oligosacárido presente en la G-cGH es N-glicosídico. La O-glicosidasa, que es específica para digerir los enlaces O-glicosídicos más comunes, no dio actividad registrable con los métodos utilizados, por lo que se descarta la existencia de este tipo de enlaces. Las enzimas NANasa, Endo-H y Endo-F tienen escasa o nula actividad sobre la G-cGH, con lo que se presume que el N-oligosacárido es de tipo complejo y/o de difícil acceso para su digestión.

La G-cGH es reconocida por los receptores membranales de hígado de pollo de manera semejante a la hormona de crecimiento de pollo recombinante.

REFERENCIAS

Abdel-Meguid SS, Shieh HS and Smith WW (1987) Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 84: 6434-6437.

Agellon LB, Davies SL, Lin CM, Chen TT and Powers DA (1988) Rainbow trout has two genes for growth hormone. *Mol. Reprod. Dev.* 1: 11-17.

Aguilar E (1992) Integración neuroendocrina. En: *FISIOLOGÍA HUMANA* 1ª ed. McGraw Hill Madrid 71: 897.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD (1994) Cell signaling. In: *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*. 3d ed Garland. New York. 15: 771-774

Allen G (1981) Sequencing of proteins and peptides. In: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* (TS Work and RH Burdon, Eds.) Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, p 30

Arámburo C, Carranza M, Sánchez R and Perera G (1989a) 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.

Arámburo C, Campbell RM and Scanes CG (1989b) Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants. *Life Sci.* 45: 2201-2207.

Arámburo C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S and Sánchez R (1990a) Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH). Different bioactivities of cGH charge variants. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80: 59-67.

Arámburo C, Donoghue D, Montiel JL, Berghman LR and Scanes CG (1990b) Phosphorylation of chicken growth hormone. *Life Sci.* 47: 945-952.

Arámburo C, Navarrete S, Montiel JL, Sánchez R and Berghman LR (1991) Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH). Evidence of G-cGH isoforms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84: 135-146.

Arámburo C, Montiel JL, Proudman JA, Berghman LR and Scanes CG (1992) Phosphorylation of prolactin and growth hormone. *J. Mol. Endocrinol.* 8: 183-191.

ESTA TESTES NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Arámburo C, Luna M, Carranza M, Reyes M, Martínez-Coria H and Scanes C (2000) Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken. *Proc.Soc.Exp.Bio.Med.* 223(1): 67-74.

Baldwin GS, Grego B, Hearn MTW, Knesel JA, Morgan FJ and Simpson RJ (1983) Phosphorylation of human growth hormone by the epidermal growth factor-stimulated tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5276-5280.

Baulieu E-E and Kelly PA (1990) Hormones: a complex communications network. In: *HORMONES: FROM MOLECULES TO DISEASE*. Hermann pub France I: 3-7

Bauman DE, Eppard PJ, DeGeeter MJ and Lanza GM (1985) Responses of high-producing dairy cows to long-term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin. *J. Dairy Sci.* 68: 1352-1362.

Baumann G (1991) Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants and binding proteins. *Endocr. Rev.* 12: 424-447.

Becker G, Bowsfier R, Mackeller W, Poor M, Teckitt P and Riggin R (1987) Chemical, physical and biological characterization of a dimeric form of biosynthetic human growth hormone. *Biotech. Appl. Biochem.* 9: 478-487.

Bédécarrats G, Guémené D, Morvan C, Crisóstomo-Pinto S, Kühnlein U and Zadworny D (1999) In vitro release of isoforms of prolactin from pituitary glands of turkey hens at different physiological stages. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 105-111.

Berghman LR, Lens P, Decuypere E, Kuhn E and Vandesande F (1987) Glycosylated chicken growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68: 408-414.

Berghman LR, Darras VM, Huybrechts LM, Decuypere E, Kuhn E and Vandesande F (1989) The glycosylated chicken growth hormone variant stimulates 5'-monodeiodination activity in the chick embryo. *Med.Sci.Res.* 17: 391-392.

Berghman LR, Buyse J, Huybrechts LM, Darras VM, Vandesande F, Kühn ER, Decuypere E and Scanes CG (1994) Disappearance rate of glycosylated and non-glycosylated chicken growth hormone : influence on biological activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 108(2): 161-169.

Bollengier F, Velkeniers B, Hooghe-Peters E, Mahler A and Vanhaelst L (1989) Multiple forms of rat prolactin and growth hormone in pituitary cell subpopulations separated using a Percoll gradient system: disulphide-bridged dimers and glycosylated variants. *J Endocrinol* 120(2): 201-206.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Carranza M, Luna M, Juárez E, Kuri W, Martínez-Coria H, Berumen LC y Arámburo C (1999) Caracterización bioquímica y biológica del fragmento de 15 kDa de la hormona de crecimiento de pollo. XIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Septiembre 26-30 1999, Zacatecas, Zac.

Chapman G, Rogers K, Brittain T, Bradshaw R, Bates O and Turner C (1982) The 20,000 MW-variant of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 256: 2395-2401.

Chawla RK, Parks JS and Rudman D (1983) Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic and clinical aspects. *Ann. Rev. Med.* 34: 519-547.

Chrumbach A, Yadley R, David B and Rodbard D (1973) Isohormones of human growth hormone. I. Characterization by electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Endocrinology* 93: 848-875.

Christlet TH, Biswas M and Veluraja K (1999) A database analysis of potential glycosylating Asn-X-Ser/Thr consensus sequences. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(Pt8): 1414-1420.

Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW and Laemmli UK (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252: 1102-1106.

Cooke N, Ray J, Emery J and Liebhaber 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.

Corcoran DH and Proudman JA (1991) Isoforms of turkey prolactin: Evidence for differences in glycosylation and tryptic peptide mapping. *Comp. Biochem. Physiol. B* 99: 563-570.

Coria MH, Carranza M, Chimal J, Fenton B, Díaz de León I., Valverde-R C, Luna M y Arámburo C. Efecto de la rcGH y rcGH de 15 kDa sobre la desyodación (5D) de tironinas en cultivo de hepatocitos de embrión de pollo. XI. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Septiembre 21-25 1997, Morelia, Mich.

Corvilain J and Abramow M (1972) Growth and renal control of plasma phosphate. *J Clin Endocrinol Metab* 34(3): 452-459.

Cotes PM, Reid I. and Young FG (1949) Diabetogenic action of pure anterior pituitary growth hormone. *Nature* 164: 209.

Cunningham BC and Wells JA (1990) Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone receptor. *Science* 247: 1461-1464.

Darnell J, Lodish H and Baltimore D (1993) *Comunicación intercelular: hormonas y receptores*. En: *BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR*. 2ª edición. Ediciones Omega. España 19: 763-821

Devesa J, Esquifino A y Tresguerres AF (1992) Hormonas adenohipofisarias. En: *FISIOLOGÍA HUMANA* 1ª ed. McGraw Hill Madrid 73: 913-927.

De-Vos AM, Ulsch M and Kossiakoff AA (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255: 306-312.

Díaz MJ, Domínguez F, Haro LS, Ling N and Devesa J (1993) A 12-Kilodalton N-Glycosylated Growth Hormone-Related Peptide Is Present in Human Pituitary Extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77(1): 134-138.

Evans HM and Long JA (1921) The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity and oestrus cycles of the rat. *Anat. Record.* 21: 62-63.

Evans HM and Long JA (1922) *Proc Natl Acad Sci USA* 8: 38.

Fain JN, Kovacev VP and Scow RO (1965) Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. *J Biol Chem.* 240(9): 3522-3529.

Farmer SW, Papkoff H and Hayashida T (1974) Purification and properties of avian growth hormones. *Endocrinology* 95(6): 1560-1565.

Force WR and Spindler SR (1994) 3,5,3'-L-triiodothyronine (thyroid hormone)-induced protein-DNA interactions in the thyroid hormone response elements and cell type-specific elements of the rat growth hormone gene revealed by in vivo dimethyl sulfate footprinting. *J Biol Chem* 269(13): 9682-9686.

Frankenne, F., Rentier-Delrue, F., Scippo, M., Martial, J. and Hennen, G. (1987) Expression of the GH-V gene in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 635-637.

Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J and Hennen G (1988) The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab* 66(6): 1171-1180.

Frantz AG and Rabkin MT (1964) Human growth hormone. Clinical measurement, response to hypoglycemia and suppression by corticosteroids. *New Eng. J. Med.* 27:1375

Friedman Y and Higgins EA (1995) A method for monitoring the glycosylation of recombinant glycoproteins from conditioned medium, using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Anal. Biochem.* 228: 221-225.

Friesen HG and Astwood EB (1967) Hormones of the anterior pituitary body. *New Eng. J. Med.* 272: 1216-1328.

Fuh G, Cunningham BC, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel DV and Wells JA (1992) Rational design of potent antagonist to the human growth receptor. *Science* 256: 1679-1680.

Ganong WF (1993) *Review of Medical Physiology* 15th Edition Appleton & Lange.

Gavel Y and von Heijne G (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* 3(5): 433-442.

Goodman HM (1970) Antilipolytic effects of growth hormone. *Metabolism* 19(10): 849-855

Gould J, Arámburo C, Capdevielle M and Scanes CG (1995) Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH. *Life Science* 56: 587-594.

Green H, Morikawa M and Nixon T (1985) A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation* 29(3): 195-198.

Greenspan FS, Li CH, Simpson ME and Evans HM (1949) Bioassay of hypophyseal growth hormone: the tibia test. *Endocrinology* 45: 455.

Griffin EE and Miller LL (1974) Effects of hypophysectomy of liver donor on net synthesis of specific plasma proteins by the isolated perfused rat liver. Modulation of synthesis of albumin, fibrinogen, alpha 1-acid glycoprotein, alpha 2-(acute phase)-globulin, and haptoglobin by insulin, cortisol, triiodothyronine, and growth hormone. *J Biol Chem* 249(16): 5062-5069.

Guyton AC y Hall JE (1996) Hormonas hipofisarias y su control por el hipotálamo. En: *TRATADO DE FISIOLÓGIA MEDICA*. 9a. ed. McGraw-Hill Interamericana México. 75: 1019.

Hart IC, Blake LA, Chadwick PME, Payne GA and Simmonds AD (1984) The heterogeneity of bovine growth hormone: extraction from the pituitary of components with different biological and immunological properties. *Biochem. J.* 218: 573-581.

Harvey S (1995) Growth Hormone Synthesis. Growth Hormone Metabolism. Growth Hormone Release: Integrative Hypothalamic Control. In: *GROWTH HORMONE.* (S Harvey, CG Scanes, WH Daughaday, Eds.), Florida, CRC Press Inc., pp 55-72, 138, 285-297.

Harvey S and Hull KL (1997) Pituitary and extrapituitary growth hormone in birds. In: *ADVANCES IN COMPARATIVE ENDOBRINOLOGY* (S. Kawashima and Kikuyama S, Eds) Tomo I. Monduzzi Editore Bologna Italy 899-905.

Hattori N, Nukada T, Oda M, Tanaka S, Ogawa T and Shiota K (1998) Evaluation of the role of N-linked oligosaccharides in rat placental lactogen action by site-directed mutagenesis *Endocr J* 45(5): 659-674.

Holly JM and Wass JA (1989) Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. *J Endocrinol* 122(3): 611-618.

Houston B and Goddard C (1988) Molecular forms of growth hormone in the chicken pituitary gland. *J. Endocrinol.* 116: 35-41.

Howland D, Farrington M, Taylor W and 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.

Hull KL and Harvey S (1997) Growth hormone: an immune regulator in vertebrates In: *ADVANCES IN COMPARATIVE ENDOBRINOLOGY* (S. Kawashima and Kikuyama S, Eds) Tomo I. Monduzzi Editore Bologna Italy 565-572

Hull KL, Jansses WCJ and Harvey S (1997) Growth hormone: local actions in sites of synthesis. In: *PERSPECTIVES IN AVIAN ENDOCRINOLOGY* (Harvey S and Etches J, Eds) *Endocrinology* LT Bristol in press.

Hull KL, Murphy M, Luna M, Arámburo C, Harvey S (1999) Growth hormone: a reproductive paracrine/autocrine? Fifth International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. August 23-28 Calgary, Alberta Canada

Isaksson OG, Eden S and Jansson JO (1985) Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 483-499.

Jefferson LS and Komer 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(3): 826-832.

Juárez E, Castro F, Guerra N, Reséndez D, Martínez H, Barrera H and Kuri W (1999) Functional domains of human growth hormone necessary for the adipogenic activity of hGH/hPL chimeric molecules. *J Cell Sci* 112(8): 3127-3135.

Kostyo JL (1968) Rapid effects of growth hormone on amino acid transport and protein synthesis. *Ann N Y Acad Sci* 148(2): 389-407

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lai PH, Duyka DR, Souza LM and Scanes CG (1984) Purification and properties of chicken growth hormone. *IRCS Med Sci* 12: 1070-1078.

Leung FC, Taylor JE, Steelman SI, Bennett CD, Rodkey JA, Long RA, Serio R, Weppelman RM and Olson G (1984) Purification and properties of chicken growth hormone and the development of a homologous radioimmunoassay. *Gen Comp Endocrinol* 56(3): 389-400.

Lewis UJ, Peterson S, Bonewald L, Seavey B and VanderLaan W (1977) A interchain disulfide dimer of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 252: 3697-3702.

Lewis UJ, Dunn JT, Bonewald LF, Seavey BK and Vanderlaan WP (1978) A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *J Biol Chem* 253(8): 2679-2687.

Lewis UJ, Singh RN, Bonewald LF, Lewis LJ and Vanderlaan WP. (1979) Human growth hormone: additional members of the complex. *Endocrinology* 104(5): 1256-1265.

Lewis UJ, Singh R, Tutwiler G, Sigel M, VanderLaan E and VanderLaan W (1980) Human growth hormone: a complex of proteins. *Rec. Progr. Horm. Res.* 36: 447-508.

Lewis UJ, Singh R, Lewis L, Seavey B and Sinha T (1984) Glycosylated human prolactin. *Endocrinology* 116: 359-363.

Lewis UJ, Singh RN and Lewis LJ (1989) Two forms of glycosylated human prolactin have different pigeon crop sac-stimulating activities. *Endocrinology* 124(3): 1558-1563.

Li VH and Ash LJ (1959) *Biol. Chem.* 203: 419.

Liberti JP, Antoni BA and Chlebowski JF (1985) Naturally-occurring pituitary growth hormone is phosphorylated. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 713-720.

Liberti JP and Joshi GS (1986) Synthesis and secretion of phosphorylated growth hormone by rat pituitary glands *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 806-812

Luna M, Martínez-Coria H, Harvey S, Carranza M y Arámburo C (1999) Identificación y caracterización de las variantes moleculares de la GH y la expresión del gen en tejidos extra hipofisarios de pollo. XLII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Septiembre 26-30 1999, Zacatecas, Zac.

Lynch MJ, Stanley SR, Mellor LD, Spare PD and Inwood M (1977) Estudios endocrinológicos. En: MÉTODOS DE LABORATORIO. 2ª ed. Nva. Editorial Interamericana. 14: 683-684.

MacGorman LR, Rizza RA and Gerich JE (1981) Physiological concentrations of growth hormone exert insulin-like and insulin antagonistic effects on both hepatic and extrahepatic tissues in man. *J Clin Endocrinol Metab* 53(3): 556-559.

MacLeod JN, Worsley I, Ray J, Friesen HG, Liebhaber SA and Cooke NE (1991) Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology* 128(3): 1298-1302.

MacLeod JN, Lee AK, Liebhaber SA and Cooke EN (1992) Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J Biol Chem* 267(20): 14219-14226.

Madsen SS (1990) The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*). *Gen Comp Endocrinol* 79(1): 1-11.

Marie P (1886) Sur deux cas d'acromégalie: hypertrophie singulière non congénitale des extrémités supérieures, inférieures et céphaliques. *Rev. Med. Paris* 6: 297-333.

Martínez-Coria H, Courtois G, López-Rosales LJ, Luna M, Carranza M, Berumen L y Arámburo C. (1999) Efecto diferencial del GHRH sobre la liberación de las isoformas de la hormona de crecimiento de pollo (cGH) *in vitro*. XLII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Septiembre 26-30 1999, Zacatecas, Zac.

McConaghey P and Sledge CB (1970) Production of "sulphation factor" by the perfused liver. *Nature* 225(239): 1249-1250 .

Menon RK, Stephan DA, Singh M, Morris SM Jr and Zou L (1995) Cloning of the promoter-regulatory region of the murine growth hormone receptor gene. Identification of a developmentally regulated enhancer element. *J Biol Chem* 270(15): 8851-8859.

Montiel JL, Berghman LR and Arámburo C (1992). Identification of growth hormone molecular variants in chicken serum. *Gen Comp Endocrinol.* 88: 298-306.

- Morikawa M, Nixon T and Green H (1982) Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 29(3): 783-789.
- Nickel BE, Kardami E and Cattini PA (1990) The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells. *Endocrinology* 126(2): 971-976.
- Nicoll CS and Licht P (1971) Evolutionary biology of prolactin and somatotrophins. II Electrophoretic comparison of tetrapod somatotrophins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 17: 490-507.
- Norris DO (1980) Organization of the Mammalian Hypothalamo-Hipophysial Axis. In: VERTEBRATE ENDOCRINOLOGY. 3d ed. Academic Press USA 4: 105-114.
- Oetting WS, Tuazon PT, Traugh JA and Walker AM (1986). Phosphorylation of prolactin. *Journal of Biological Chemistry* 261: 1649-1652.
- Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O and Lindahl A (1992) Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9826-9830.
- Paladini AC, Peña C and Retegui L (1979) The intriguing nature of the multiple actions of growth hormone *TIBS* Nov. 256-260.
- Paladini AC, Peña C and Retegui L (1983) Molecular biology of growth hormone. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 15: 25-26.
- Parks JS (1989) Molecular biology of growth hormone. *Molecular biology of growth hormone. Acta Paediatr Scand Suppl* 349: 127-135.
- Pascacio M, Martínez H, Luna M y Arámburo C (1996) Efecto agudo de TRH y uretano sobre las variantes de masa de la hormona de crecimiento (GH) en el plasma de pollo (Res 104) XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Septiembre 22-26 1996, Puebla, Pue.
- Raiti S and Tolman RA (Eds.) (1986) Human growth hormone. Plenum Medical, USA pp 199-210, pp 241-256.
- Rand-Weaver M, Kawauchi H and Ono M (1993) Evolution of structure of the growth hormone and prolactin family. In: *The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates* (MP Schreibman, CG Scanes, PK Pang, Eds), San Diego, Academic Press, Inc., pp 13-35.
- Ray J, Jones BK, Liebhaber SA and Cooke NE (1989) Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology* 125(1): 566-568.

Reagan CR, Mills JB, Kostyo JL and Wilhelmi AE (1975) Biological properties of plasmin digests of S-Carbamidomethylated human growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1684-1686.

Reiprich K, Muhlbauer E, Decuypere E and Grossmann R (1995) Characterization of growth hormone gene expression in the pituitary and plasma growth hormone concentrations during posthatch development in the chicken. J Endocrinol 145(2): 343-353.

Render CL, Hull KL and Harvey S (1995) Neural expression of the pituitary GH gene. J. Endocrinol 147: 413-422.

Reyes QM, Carranza SM y Arámburo C (1996) Caracterización cinética del receptor hepático para las variantes moleculares de la hormona de crecimiento de pollo XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Septiembre 22-26 1999, Puebla, Pue.

Rosenberg IM (1996) Modified proteins and peptides. In: PROTEIN ANALYSIS AND PURIFICATION. Boston, Birkhäuser 208-224.

Roupas P and Herrington AC (1994). Postreceptor signaling mechanisms for growth hormone. Trends Endocrinol. Metab. 5(4): 154-158.

Rudas P and Scanes CG (1983) Influences of growth hormone on glucose uptake by avian adipose tissue. Poult Sci 62(9): 1838-1845.

Salles JP, De Vries CP, Netelenbos JC and Sloopweg MC (1994) Dexamethasone increases and serum decreases growth hormone receptor binding to UMR-106.01 rat osteosarcoma cells. Endocrinology 134(3): 1455-1459.

Scanes CG, Arámburo C and Campbell RM (1990) Hormonal involvement in avian growth and development: growth hormone and insulin-like growth factor I. In: ENDOCRINOLOGY OF BIRDS -MOLECULAR TO BEHAVIORAL- (M. Wada, s. Ishii and C. G. Scanes, Eds.) Japan Scientific Societies Press - Springer - Verlag, pp 93-110.

Scanes CG, Arámburo C, Campbell RM, Kopchick and Radecki SV (1993) Chemistry and physiology of poultry growth hormone. In: AVIAN ENDOCRINOLOGY (Sharp PJ., ed.) Journal of Endocrinol Ltd, Bristol pp 261-274.

Scanes CG and Campbell RM (1995) Growth Hormone Chemistry In: GROWTH HORMONE. (S Harvey, CG Scanes, WH Daughaday, Eds.), Florida, CRC Press Inc., pp 18-19.

Seavey BK, Singh RN, Lewis UJ and Geschwind II (1971) Bovine growth hormone: evidence for two allelic forms. *Biochem Biophys Res Commun* 43(1): 189-195.

Secchi C, Biondi PA, Negri A, Borroni R and Ronchi S (1986) Detection of desamido forms of purified bovine growth hormone. *Int J Pept Protein Res* 28(3): 298-306.

Seeburg PH (1985) The human growth hormone locus: the genes and their products. In: *BIOGENETICS OF NEUROHORMONAL PEPTIDES* (R. Hakanson and J. Thorell, Eds.) Academic Press, London pp 83-92.

Segrest JP and Jacson RL (1972) Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrilamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Methods in enzymology* 283: 54-63.

Shimomura Y, Lee M, Oku J, Bray GA and Glick Z (1982) Sodium potassium dependent ATPase in hypophysectomized rats: response to growth hormone, triiodothyronine, and cortisone. *Metabolism* 31(3): 213-216.

Sigel M, Thorpe N, Kobrin M, Lewis UJ and VanderLaan W (1981) Binding characteristics of a biologically active variant of human growth hormone (20K) to GH and lactogen receptors. *Endocrinology* 108: 1600-1603.

Silverman MS, Mynarcik DC, Corin RE, Haspel HC and Sonenberg M (1989) Antagonism by growth hormone of insulin-sensitive hexose transport in 3T3-F442A adipocytes. *Endocrinology* 125(5): 2600-2604.

Singh RNP, Seavey BK, Lewis LJ and Lewis UJ (1983) Human growth hormone peptide 1-43: isolation from pituitary glands. *J. Protein Chem.* 2: 425-436.

Sinha Y and Lewis UJ (1986) A lectin-binding immunoassay indicates a possible glycosylated growth hormone in the human pituitary gland. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 140: 491-497.

Sinha Y and Jacobsen B (1987) Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 145: 1368-1375.

Sinha YN, Klemcke HG, Maurer RR and Jacobsen BP (1990a) Changes in the glycosylated and nonglycosylated forms of prolactin and growth hormone in lean and obese pigs during pregnancy. *Endocrinology* 127(1): 410-418.

Sinha YN, Klemcke HG, Maurer RR and Jacobsen BP (1990b) Ontogeny of glycosylated and nonglycosylated forms of prolactin and growth hormone in porcine pituitary during fetal life. *Proc Soc Exp Biol Med* 194(4): 293-300.

Snow EC, Feldbush TL and Oaks JA (1981) The effect of growth hormone and insulin upon MLC responses and the generation of cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 126(1): 161-164.

Solomon WD and Daughaday WH (1957) A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med* 49: 845-886.

Spector T (1978) Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal Biochem* 86(1): 142-146.

Stanley P (1998) Structures and metabolism of polysaccharides and glycoproteins. In: *BIOCHEMISTRY*. 4th edition (GL Zubay, Ed) Dubuque WCB 412-421.

Steenfos HH and Jansson JO (1992) Growth hormone stimulates granulation tissue formation and insulin-like growth factor-I gene expression in wound chambers in the rat. *J Endocrinol* 132(2): 293-298.

Stolar M and Bauman G (1986) Big growth hormone forms in human plasma: immunochemical evidence for their pituitary origin. *Metabolism* 35: 75-77.

Sun Q, Hampson RK and Rottman FM (1993) *In vitro* analysis of bovine growth hormone pre-mRNA alternative splicing. Involvement of exon sequences and trans-acting factor(s). *J Biol Chem* 268(21): 15659-15666.

Sutton C (1989) Lectin Affinity Chromatography. In: *Protein purification methods. A practical approach*. (Harris ELV, Angal S, EDS) IRL Press 5: 268-275.

Tai PK, Liao JF, Chen EH, Dietz J, Schwartz J and Carter-Su C (1990) Differential regulation of two glucose transporters by chronic growth hormone treatment of cultured 3T3-F442A adipose cells. *J Biol Chem* 265(35): 21828-21834.

Thorner MO, Vance ML, Laws ER, Horvath E and Kovacs K (1998) The anterior pituitary. In: *WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY*. 9th edition (Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR EDS) 9: 249.

Tyrell JB, Findling JW and Aron DC (1994) Hypothalamus & Pituitary. In: *BASIC & CLINICAL ENDOCRINOLOGY* 4th edition (Greenspan FS & Baxter JD EDS) Prentice Hall. 2: 66-73.

Valverde CR (1993) Comunicación neuroendocrina bases celulares y moleculares Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas 1a. ed. pp: 21-87.

Voet D and Voet JG (1995) Sugars and Polysaccharides. In: *BIOCHEMISTRY*. 2nd edition. John Wiley & Sons. 10: 271-272.

Walton PE, Etherton TD and Evoke CM (1986) Antagonism of insulin action in cultured pig adipose tissue by pituitary and recombinant porcine growth hormone: potentiation by hydrocortisone. *Endocrinology* 118(6): 2577-2581.

Weigent DA, Riley JE, Galin S, Leboeuf RD and Blalock JE (1991) Detection of GH and GHRH related mRNA in rat leukocytes by the polymerase chain reaction. *PSEBM* 198: 643-648.

Welbourne TC and Cronin MJ (1991) Growth hormone accelerates tubular acid secretion. *Am J Physiol* 260(6 Pt 2): R1036-1042.

White HL, Heinbecker P and Rolf D (1949) Enhancing effects of Growth Hormone on renal function. *Am J Physiol* 157: 47.

Yeh KY and Moog F (1975) Development of the small intestine in the hypophysectomized rat. I. Growth histology, and activity of alkaline phosphatase, maltase, and sucrase. *Dev Biol* 47(1): 156-172.

FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura:</i> El hipotálamo humano, con una representación –diagrama- sobrepuesto de los vasos portales hipofisiarios	...3
<i>Tabla:</i> Hormonas adenohipofisiarias	...4
<i>Figura:</i> Acciones biológicas de la GH	...8
<i>Tabla:</i> Acciones biológicas de la hormona de crecimiento	...10
<i>Figura:</i> Hormona de crecimiento	...12
<i>Figura:</i> Heterotrímero de GH y moléculas de receptor	...13
<i>Figura:</i> Gen GH para diferentes especies	...22
<i>Figura:</i> Representación esquemática del gen de hGH y la biosíntesis de GH	...24
<i>Figura:</i> Regulación de la secreción de GH	...26
<i>Figura:</i> Enlace O-glicosídico	...31
<i>Figura:</i> Enlace N-glicosídico	...32
<i>Figura 1:</i> Patrón de densidad óptica de la cromatografía de líquido de ascitis en una columna de proteína A-sefarosa. 1. Cargado con amortiguador pH 8.9 (Glicina 1.5 M, NaCl 3M); 2. Elución con amortiguador pH 3.0 (Citratos 50 mM).	...45
<i>Figura 2:</i> Patrón de densidad óptica de la cromatografía del extracto hipofisiario en una columna de sefarosa 4B acoplada a anticuerpo contra cGH. 1. Cargado (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) 2: Elución (Glicina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 3.0).	...46
<i>Tabla 1:</i> Primera Ruta experimental	...47
<i>Figura 3:</i> Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. En el primer carril (PM) se encuentran los marcadores de peso molecular; en el siguiente (EXTRACTO) se colocaron 10 µg (proteína) de extracto hipofisiario; en el último carril (cGH) se colocaron 5 µg de hormona de crecimiento purificada.	...48
<i>Figura 4:</i> <i>Western blot</i> teñido con anticuerpo policlonal anti-cGH (AbαcGH) y anticuerpo de cabra contra Ig's conejo conjugado con peroxidasa de rábano (GAR-HRP, segundo anticuerpo), revelado con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y diaminobencidina (DAB). PM: marcadores de peso molecular; EC: extracto hipofisiario crudo; cGH: hormona de	

crecimiento de pollo purificada; NR: condiciones no reductoras, R: condiciones reductoras.	...49
<i>Figura 5:</i> Western blot teñido con anticuerpo AbαcGH y con Concanavalina A conjugada con peroxidasa. cGH: hormona de crecimiento de pollo pura; rec: hormona de crecimiento de pollo recombinante; PM: marcadores de peso molecular	...50
<i>Figura 6:</i> Patrón de elución para cromatografía de cGH total, en columna de Concanavalina A- sefarosa. 1. Cargado (Tris HCl pH 7.0) 2. Adición de α-D- metilmanósido 10 mM (elución)	...51
<i>Tabla 2:</i> Recuperación de hormona de crecimiento	...51
<i>Figura 7:</i> Western blot teñido con anticuerpo (AbαcGH) y por oxidación de carbohidratos (CHO). rec: cGH recombinante; PM: marcadores de peso molecular; G-cGH: variante glicosilada pura; cGH: hormona de crecimiento de pollo pura.	...52
<i>Figura 8:</i> Patrón de elución típico para cromatografía de glicoproteínas, en columna de Concanavalina A-sefarosa. 1. Cargado (Tris HCl pH 7.0) 2. Elución (α-D- metilmanósido 10 mM).	...53
<i>Figura 9:</i> Patrón de elución de cromatografía de glicoproteínas en una columna de sefarosa 4B acoplada a anticuerpo contra cGH. 1. Cargado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) 2. Elución (Glicina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 3.0).	...54
<i>Tabla 3:</i> Segunda ruta experimental	...55
<i>Tabla 4:</i> Columnas de inmunoafinidad	...55
<i>Figura 10:</i> Western blot de la G-cGH incubada en presencia de Péptido N Glicosidasa F (PNGasaF). La membrana se tiñó con anticuerpo para cGH y por oxidación de carbohidratos. El carril 1 contiene cGH recombinante; en el 2 y 6 se muestran los marcadores de peso molecular; 3 y 7, G-cGH sin hidrolizar; 4 y 8, G-cGH incubada con PNGasa F; 5 y 9, cGH total -nativa-.	...56
<i>Figura 11:</i> Western blot teñido con anticuerpo y oxidación de carbohidratos. La hormona de crecimiento total se incubó en ausencia y presencia de diferentes enzimas. Los carriles 1 y 7 contienen cGH incubada con Neuraminidasa II (-NANasa) y O-Glicosidasa; 2 y 8, con Endoglicosidasa-F; 3 y 9, incubada con NANasa, O-Glicosidasa y PNGasaF; 4 y 10 contienen cGH sin enzimas. Los marcadores de peso molecular preteñidos se ubican en el carril 5.	...57

Figura 12: Western blot de la cGH total incubada en presencia de PNGasaF, Endo-F y O-glicosidasa. La membrana se tiñó con anticuerpo y por oxidación con carbohidratos. Los carriles 1 y 10 muestran los marcadores de peso molecular; 2 y 6, cGH incubada con O-Glicosidasa; 3 y 7, con Endo-F; 4 y 8, con PNGasa F; 5 y 9 cGH sin hidrolizar. Nótese el efecto de desglicosilación (no hay reacción positiva para carbohidratos) en el carril 8, con la acción de la PNGasaF*.

...58

Figura 13: Western blot teñido con anticuerpo y oxidación de carbohidratos. El carril 1 contiene los marcadores de peso molecular; los carriles 2 y 7 muestran la cGH glicosilada (G-cGH) sin hidrolizar; 3 y 6, G-cGH digerida con Neuraminidasa-II; 4 y 5, G-cGH digerida con Endoglicosidasa H.

...59

Figura 14: Western blot teñido con anticuerpo y por oxidación de carbohidratos. PM: marcadores de peso molecular; G: cGH glicosilada (G-cGH) sin hidrolizar; G/B: G-cGH digerida con Carboxipeptidasa B.

...60

Figura 15: Western blot teñido con anticuerpo y por oxidación de carbohidratos. PM: marcadores de peso molecular; G: la cGH glicosilada (G-cGH) pura; G/T: G-cGH digerida con Trombina; G/Y: G-cGH digerida con Carboxipeptidasa Y; GC: cGH glicosilada (G-cGH) incubada sin enzimas.

...62¹

Figura 16: Western blot teñido con anticuerpo y por oxidación de carbohidratos. cGH: hormona de crecimiento de pollo total; rec, cGH recombinante; PM, los marcadores de peso molecular; G, la cGH glicosilada (G-cGH) pura; G/T, G-cGH digerida con Trombina; G/Y, G-cGH digerida con Carboxipeptidasa Y.

...63

Figura 17: Curva de desplazamiento de la variante glicosilada G-cGH y de la hormona de crecimiento recombinante -monómero-. B es la ¹²⁵I-rcGH (cpm) unida a los receptores membranales en presencia de diferentes concentraciones de hormona competidora (0.39-100 ng/ml) y Bo es la hormona marcada (cpm) unida en ausencia de ligando competidor.

...64

LISTA DE ABREVIATURAS

Español	Inglés	
aa	aa	aminoácido
(A)Ala	Ala	Alanina
(B)Asx	Asx	Asparagina/Aspartato
(C)Cis	Cys	Cisteína
(D)Asp	Asp	Aspartato
(E)Glu	Glu	Glutamato
(F)Fen	Phe	Fenilalanina
(G)Gli	Gly	Glicina
(H)His	His	Histidina
(I)Ile	Ile	Isoleucina
(K)Lis	Lys	Lisina
(L)Leu	Leu	Leucina
(M)Met	Met	Metionina
(N)Asn	Asn	Asparagina
(P)Pro	Pro	Prolina
(Q)Gln	Gln	Glutamina
(R)Arg	Arg	Arginina
(S)Ser	Ser	Serina
(T)Tre	Thr	Treonina
(V)Val	Val	Valina
(W)Tri	Trp	Triptofano
(X)		Cualquier aminoácido
(Y)Tir	Tyr	Tirosina
(Z)Glx	Glx	Glutamato/Glutamina
ACTH	ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	DNA	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario

AGL	FFA	Ácidos grasos libres
AMPc	cAMP	Monofosfato de adenosina 3'-5' cíclico
	AP	Fosfatasa alcalilina
ARN	RNA	Ácido ribonucleico
ARNm	mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	ATP	Trifosfato de adenosina
	BCIP	Bromo cloro indolil fosfato
Bmax	Bmax	Capacidad máxima (indica la concentración total de receptores presentes por mg de proteína membranal)
cm	cm	centímetro
Con A	Con A	Concanavalina A
	EDTA	Acido etilendiaminotetracético
	Endo	Endoglicosidasa
	FSH	Hormona estimulante del foliculo
g	g	gramo
	GAR	Anticuerpo de cabra contra conejo
Gal	Gal	Galactosa
Glc	Glu	Glucosa
	GC	Glucocorticoides
	GH	Hormona de crecimiento
	cGH	Hormona de crecimiento de pollo
	G-cGH	Hormona de crecimiento de pollo glicosilada
	bGH	Hormona de crecimiento bovina
	hGH	Hormona de crecimiento humana
	pGH	Hormona de crecimiento porcina
	rtGH	Hormona de crecimiento de trucha arcoiris
	GHR	Receptor de Hormona de crecimiento

	GHRH	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
	GH-BP	Proteínas unidoras de Hormona de crecimiento
	GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
h	h	hora
	HRP	Peroxidasa de rábano
	IEF	Isoelectroenfoque
	IGF	Factor de crecimiento tipo insulina
	kDa	Kilodaltones
	Ks	Constante de afinidad
	LH	Hormona luteinizante
M	M	Molar
Man	Man	Manosa
min	min	minuto
ml	ml	mililitro
μl	μl	microlitro
N	N	Normal
NA	NA	N-Acetil
NANasa		Neuraminidasa
	NBT	nitroazul de tetrazolio
ng	ng	nanogramo
nm	nm	nanometro
	PNGasaF	Péptido N-Glicosidasa F
	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pI	pI	Punto Isoeléctrico
	PL, CS	Lactógeno placentario, somatotropina coriónica (Marcadores de) Peso Molecular
PM		
PRL	PRL	Prolactina
	rcGH	Hormona de crecimiento recombinante
	Rf	movilidad relativa (con respecto al frente)
rpm	rpm	revoluciones por minuto

s

RIA	Radioinmuno ensayo
RRA	Ensayo de radioreceptor
s	segundo
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato de sodio
SS	Somatostatina
TBS	Solución amortiguadora de Tris
T3	Triyodotironina
T4	Tetrayodotironina
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
WB	<i>Western Blot</i>

ANEXO I

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI cGH (MAB α cGH) POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN PROTEÍNA A SEFAROSA

Soluciones

Amortiguador A

Glicina 1.5 M, NaCl 3M pH 8.9

Glicina 56.3g

NaCl 87.7g

Disolver en 400 ml de agua desionizada. Ajustar y aforar a medio litro.

Amortiguador B

Acido cítrico 50mM pH 3.5 (3)

Ac. Cítrico monohidratado 5.25g

Disolver en 400 ml de agua desionizada. Ajustar y aforar a medio litro.

Acido clorhídrico 1mM

Amortiguador de acoplamiento

50mM fosfatos, 0.5 M NaCl pH 7 - 7.6

(stock 5x)

K₂HPO₄ 43.6g

NaCl 147g

Disolver en 800 ml de agua desionizada. Ajustar con HCl y aforar a un litro.

Diluir 1:5 la solución stock para utilizar el amortiguador.

Purificar anticuerpo monoclonal contra hormona de crecimiento de pollo (MAB α cGH) proveniente de líquido de ascitis liofilizado lote IH7 (enviado por Dr. Luc Berghman p. ej.: lote 4 obtenido en abril 1990), conteniendo aproximadamente el equivalente de 3ml/frasco y resuspender con 12 ml de amortiguador A (1.5M Gly, 3M NaCl, pH 8.9, al menos con 5 volúmenes del amortiguador). Centrifugar 15 min a 2,500 rpm (Beckman TJGR) en tubos cónicos de 15 ml. Separar el sobrenadante.

Incubar 0.75 g de proteína A sefarosa (Pharmacia cat. 17-0780-01; 2 mg proteína A/ml gel) -aproximadamente 2.6 ml- con el sobrenadante del resuspendido de líquido de ascitis, en una econo-columna de BioRad y agitar "end over end" durante 30 a 70 min a temperatura ambiente.

En este caso el líquido de ascitis no debe tener precipitado, sólo debe utilizarse el sobrenadante. Vaciar el sobrenadante a la columna con una pipeta pasteur por las paredes. Vaciar primero la mitad, luego agregar la sefarosa y por último la otra mitad del líquido. Tapar la columna y agitar manualmente. Adaptar a un agitador automático (p.ej. milli gen 504 shaker).

Guardar la fracción no adsorbida. Inicialmente sobre hielo eluir la columna con amortiguador pH 8.9.

Colectar el eluato en tubos de ensayo de 10 ml y monitorear cada fracción registrando la D.O. a 280nm. Lavar con amortiguador pH 8.9 hasta que la D.O. sea cero, aproximadamente 10-25 volúmenes de la cama de resina. Una vez que el amortiguador A llega al lecho de la columna, añadir el amortiguador B.

Eluir con amortiguador B (50mM ácido cítrico pH 3.5). Colectar fracciones de 2 ml de eluato en tubos que contengan 0.5 ml de amortiguador A / tubo para neutralizar. Juntar las fracciones con mayor D.O.

Dializar en una bolsa Spectrapor no. 4 (12-14000kDa) en 300 ml de PBS (amortiguador de acoplamiento) en un vaso de precipitado de 500 ml durante toda la noche a 4°C, para eliminar las aminos glicina y TRIS. Después de dializarse deberá verse un precipitado.

Reconstituir la columna (proteína A sefarosa) lavando con amortiguador A hasta que el pH del eluido sea igual al del amortiguador.

Incubar la fracción no absorbida I (FNA-I) añadiendo las fracciones 1 y 2 del lavado de la primera columna o corrida-I a la columna de proteína A sefarosa ya reconstituída para tratar de obtener la mayor cantidad de MAb α cGH que no se hubiera obtenido la primera vez. Agitar toda la noche.

Lavar igual que en la corrida-I con amortiguador pH 8.9. Eluir con amortiguador B (50mM ácido cítrico pH 3.5). Colectar fracciones de 2 ml de eluato en tubos que contengan 0.5 ml de amortiguador A / tubo para neutralizar. Juntar las fracciones con mayor D.O.

Dializar contra PBS toda la noche con spectrapor no. 4 en 500 ml con un total de 3 cambios.

Liofilizar aproximadamente durante cinco horas.
Determinar la cantidad de proteína por mg de polvo.

Para reconstituir la muestra y tenerla en condiciones óptimas para el acoplamiento con sefarosa 4B, resuspender en agua de la siguiente manera:
3 mg IgG / ml H₂O para obtener la fuerza iónica del amortiguador de acoplamiento (centrifugar para eliminar agregados).

Capacidad del MAb

A) probabilidad de acoplamiento 1/3

B) peso molecular relación IgG /Ag =150000/20000=8

C) si se acopla bien existen 2 sitios de unión

capacidad por 1mg de MAb inmobilizado:

$$\frac{(1000\mu\text{g})(2)}{(3)(8)} \cdot \frac{2000}{24} \cdot 80\mu\text{g GH}/\mu\text{g MAb} \quad 80 \times 5\text{mg} = 400\mu\text{g/ml de gel}$$

ANEXO II

PURIFICACIÓN DE cGH CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD (MAb α cGH ACOPLADO A SEFAROSA 4B ACTIVADA CON BrCN)

Soluciones

Amortiguador (bloquear)

Glicina 1.5 M, NaCl 3M pH 8.0

Glicina 56.3g

NaCl 87.7g

Disolver en 400 ml de agua desionizada. Ajustar y aforar a medio litro.

Amortiguador A (cargar)

Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, pH 7.6

Tris 6.1g

NaCl 8.8g

Agregar 900 ml de agua desionizada estéril mezclar, ajustar el pH y aforar a un litro.

Guardar a 4°C

Amortiguador B (elución)

Glicina 50mM, NaCl 150mM pH 3.0

Glicina 1.88g

NaCl 4.41g

Disolver en 900 ml de agua desionizada. Ajustar y aforar a un litro.

Para elución en "batch" bajar un poco más el pH (2.8)

Amortiguador neutralización

Tris-HCl 3M pH 8.0

Tris 36.3g

Disolver en 90 ml de agua desionizada estéril mezclar, ajustar el pH y aforar a 100 mililitros.

Guardar a 4°C

Amortiguador extracción

Tris-HCl 50mM pH 9 - 9.5

Tris 3.05g

Disolver en 450 ml de agua desionizada estéril mezclar, ajustar el pH y aforar a 500 mililitros. Guardar a 4°C

Preparación del inmunoadsorbente

Preparar 1 g de sefarosa 4B activada con BrCN (3.5 ml de gel hinchado).

Hincharla en HCl 1mM y lavarla con 200 ml de HCl/g de sefarosa (en etapas), utilizando una manguera de vacío con trampa. El último lavado realizarlo con amortiguador de acoplamiento (fosfatos 50mM, NaCl 0.5M, pH 7-7.6).

Después de que la resina alcance el pH de 7-7.6, incubarla con 18 ml de MAb α cGH-IH7 (aproximadamente 18 mg de IgG), agitando "end over end" a temperatura ambiente durante

tres horas. Colectar el líquido en una probeta de 100 ml y leer la D.O. contra el amortiguador de acoplamiento como blanco. Calcular la eficiencia de acoplamiento.

Bloquear los sitios que no reaccionaron, con amortiguador pH 8 (1.5 M Gly, 3M NaCl, pH 8.0). Agitar toda la noche "end over end" a temperatura ambiente.

Después de bloquear, lavar la columna con amortiguador A (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, pH 7.6) hasta que el eluido alcance el pH del amortiguador. Después, lavar con amortiguador B (glicina 50mM, NaCl 150mM pH 3.0-2.8) hasta alcanzar el nuevo pH. Completar este ciclo 3 veces.

Dejar sedimentar la columna parando la agitación durante 1.5 hr aproximadamente. Abrir y recolectar el amortiguador con el que se llevó a cabo el bloqueo. Adicionar Tris-HCl, NaCl, pH 7.6 para lavar hasta obtener un pH igual en el eluido que en el amortiguador. Posteriormente continuar lavando como sigue: Agregar amortiguador B (Gly 50mM pH 3.0-2.8) hasta que el eluido tome el pH del amortiguador. Estos lavados se repiten por tres veces.

Dejar en amortiguador de cargado. El inmunoabsorbente ya está preparado en un volumen de 3.5 ml

Inhibidores de proteasas

E-64. (thiol proteasas) 100µg en 100µl (1:1 v/v) mezcla de etanol y agua, con una concentración inicial de 1 µg/ml. Añadir 1 µl de inhibidor por ml del amortiguador para homogeneizar.

Leupeptina (ser y thiol proteasas) 50µg en 100µl de agua con una concentración inicial de 0.5 µg/ml. Añadir 1 µl de inhibidor por ml del amortiguador para homogeneizar.

Pefabloc (ser proteasas) PM 239.5, 100 mM en agua (2.395 mg/100 ml H₂O) con una concentración inicial de 1 mM por cada ml de homogenado. Añadir 1 µl de inhibidor por ml del amortiguador para homogeneizar.

Pepstatina (proteasas ácidas) 70 µg en 100µl de metanol con una concentración inicial de de 0.7 µg/ml. Añadir 1 µl de inhibidor por ml del amortiguador para homogeneizar.

PMSF 100 mM, 29 mg / 1.6 ml de acetona. Con una concentración inicial de 1 mM añadir 10 µl de inhibidor por ml del amortiguador para homogeneizar.

Phosphoramidon (metalo proteasas) 500 µg en 100µl de agua con una concentración inicial de 50 µg/ml. Añadir 10 µl de inhibidor por ml del amortiguador para homogeneizar.

Obtención del extracto hipofisiario

Pesar aproximadamente 200 mg de glándulas congeladas (20-25) y agregarles 5(+2) ml de amortiguador de extracción (50mM Tris-HCl pH 9.0-9.5)

Homogeneizar las hipófisis en un politrón durante 30 segundos en posición '5'. Agregar los inhibidores de proteasas.

Completar la extracción durante dos horas a 4°C, con agitación magnética (en recipiente c/hielo).

Centrifugar 15 min a 12,000 g (10,000 rpm en microfuga)

Neutralizar el sobrenadante en el potenciómetro agregando HCl 0.5 N hasta alcanzar un pH de 7.6 (<0.5 ml)

Cromatografía

Aplicar la muestra (sobrenadante neutralizado) en la columna (1 h, 3x).

Recolectar en tubos de vacutainer, pasando este eluido dos veces más por la columna (con el objeto de que se pegue la mayor cantidad posible de hormona a la resina). Posteriormente lavar la columna con amortiguador A (aprox. 10 volúmenes del lecho) 5x7ml. Probar estos eluidos con un Bradford en punto: (2µl reactivo de bradford + 8µl muestra) sobre un parafilm (las muestras con proteína se observan azules). Guardar la fracción más concentrada (fracción no adsorbida) ya que contiene toda la hormona hipofisiaria menos la GH (juntar varias para liofilizar y guardar).

Eluir con amortiguador B. Recolectar alicuotas de 1000 µl en tubos que contengan 100 µl Tris-HCl 3m pH 8.0 para neutralizar.

Juntar las fracciones de mayor absorbencia a 280nm y dializarlas. Se pueden concentrar usando una membrana spectrapor 3 vs PEG 8000 al 20% y posteriormente con agua milliq.

Reconstituir la columna con los tres ciclos de lavado descritos anteriormente.

ANEXO III

CROMATOGRAFÍA EN CONCAVALINA A-SEFAROSA

Soluciones

Amortiguador de equilibrio

Tris 20mM-HCl, NaCl 0.15M, MnCl₂ 1mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.0

Tris 0.6057 g

Disolver en 200 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 7.0 con HCl 3 N. Luego añadir:

NaCl 2.1915 g

MnCl₂ · 4H₂O 0.0495 g

CaCl₂ 0.0278 g ó CaCl₂ · H₂O 0.0368 g

Para preparar 250 ml de solución

Solución de α-D-metil-manósido 10mM

α-D-metil-manósido 0.1942 g

Disolver en 100 ml de amortiguador de equilibrio

Protocolo

Modificación de método, *Berghman, L.T., Lens, P., Decuypere, E., Kühn, E.R. and Vandesande, F. (1987). Glycosylated chicken growth hormone. Gen.comp.endocrinol. 68:408-414.*

Realizar 4 lavados con amortiguador de equilibrio (*Tris 20mM-HCl, NaCl 0.15M, MnCl₂ 1mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.0*) a 7 ml de resina (concanavalina A-sefarosa *Sigma*), para eliminar el amortiguador preservativo y después transferir a una columna. Dejar sedimentar la resina y comprobar que no haya fugas.

Disolver la muestra en el amortiguador de equilibrio y aplicarla en un volumen pequeño (no mayor de 3 ml). Dejar interactuar con la resina, durante 15 a 20 minutos. Eluir primeramente con 5 volúmenes del amortiguador de equilibrio (hasta la línea base de absorción a 280nm) y luego con α-D-metil-manósido 10mM disuelto en el mismo amortiguador. Todos los pasos deben llevarse a cabo a 4°C

Para realizar la cromatografía se utiliza el siguiente equipo:

Conductímetro LKB-2195, absorciómetro LKB-2138, graficador LKB-2210, colector de fracciones LKB-2070 y una bomba peristáltica

Ajustar el flujo de la columna a 0.4 ml/minuto y la velocidad del papel a 0.5 mm/minuto. Colectar fracciones de 2 ml.

Juntar las fracciones pico obtenidas (por densidad óptica a 280 nm) posteriormente dializarlas y liofilizarlas. La fracción retenida se compone únicamente por glicoproteínas.

Para regenerar la columna, se lava con los siguientes amortiguadores:

A) Tris 0.1M-HCl, NaCl 0.5M, pH 8.5 (10 volúmenes)

Tris 1.2114 g

NaCl 2.922 g

Aforar a 100 ml con agua desionizada

B) Acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 4.5 (10 volúmenes)

Acetato de sodio 0.287 g

NaCl 2.922 g

Disolver en 80 ml de agua desionizada. Añadir 372.5 µl de ácido acético glacial y ajustar el pH a 4.5. Aforar a 100 ml.

C) Amortiguador para almacenar la columna

Acetato de sodio 0.1 M, NaCl 1 M, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1mM, MnCl₂ 1mM, azida de sodio al 0.1%, pH 6.0 (10 volúmenes)

Acetato de sodio 0.7747g

Azida de sodio 0.1 g

NaCl 5.844 g

CaCl₂ 0.0111g ó CaCl₂ · H₂O 0.0147 g

MnCl₂ · 4H₂O 0.0198g

MgCl₂ · 6H₂O 0.02033g

Disolver en 80 ml de agua desionizada, agregar 32 µl de ácido acético y ajustar el pH a 6.0.

Aforar a 100 ml.

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

ANEXO IV

ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Soluciones

Sln A Acrilamida (30% T, 2.67% C)

30% acrilamida; 0.8% de bis-acrilamida

30g de acrilamida

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

para 100ml de DDH₂O

Mezclar con agitador magnético, filtrar con papel Whatman No. 1 y conservar a 4°C.

Nota: muy tóxico, usar guantes.

Sln B Amortiguador para el gel inferior o separador

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

18.15 g de Tris-base

Mezclar con 50ml de DDH₂O en el agitador magnético, agregar HCl hasta que el pH sea de 8.8, ajustar a 100ml y conservar a 4°C

Sln C Amortiguador del gel superior o concentrador:

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

6g de Tris-base

Mezclar con 50ml DDH₂O en agitador magnético, agregar HCl hasta que el pH sea de 6.8, ajustar a 100ml y conservar a 4°C

Sln D SDS 10%

5g de SDS (pesar en el vaso)

Ajustar a 50ml y conservar a 4°C

Sln F Amortiguador del electrodo (de corrida) 5X pH 8.3

Tris-base 9g

glicina 43.2 g

SDS 3g

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

Sln E Amortiguador de la muestra

Tris-HCl 0.5M 10% SDS pH6.8

H₂O 4.0 ml

C 1.0 ml

D 1.6 ml

Glicerol 0.8 ml

Azul de bromofenol 0.2 ml (0.5%)

2-β mercaptoetanol 0.4(reductoras)

Para condiciones no reductoras se ponen 4.4 ml de H₂O

PSA Persulfato de amonio 10%

100 mg persulfato de amonio en 1ml de H₂O

Preparar fresco

Solución para teñir geles

Azul brillante de Coomassie R-250	0.1%
Metanol	40%
Ácido acético	10%

Preparación de los geles

Lavar los vidrios con agua y jabón con las yemas de los dedos y secar con aire.

Limpiar los vidrios con solución amoniacal al 10% o con alcohol con gasa con el objeto de quitar la grasa, ya que esta no permite polimerizar la acrilamida.

Atemperizar soluciones metiendo los frascos en un baño de agua

Colocar el ensamblador en la cuneta de la torre con las pestañas hacia arriba, tornillos hacia atrás; empujar con la placa de plástico los separadores hasta que se encuentren en los extremos del ensamblado totalmente verticales. Con el acrílico transparente presionar el ensamblado y apretar los tornillos superiores. Verificar la alineación y apretar tornillos inferiores.

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

Pesar el persulfato de amonio (la solución debe ser preparada fresca cada vez). Hidratar^a 0.0100g en 100µl aproximadamente (10%). Preparar la solución del gel separador según la concentración requerida (ver tabla), sin el SDS ni los catalizadores para desgasificar durante 5 minutos. Una vez desgasificado añadir los catalizadores.

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

Llenar el espacio de entre los vidrios hasta una altura de 2 cm. antes del extremo del vidrio pequeño. Con una jeringa Hamilton cubrir con agua la interfase para evitar la formación de meniscos (también puede utilizarse alcohol isopropílico).

Esperar a que se complete la gelificación aproximadamente unos 30 minutos.

Secar el agua introduciendo un pedazo de papel filtro.

Preparar la solución del gel concentrador (4%) con las mismas indicaciones para desgasificar. Aplicar la solución sobre el gel separador ya formado casi hasta el borde. Introducir el peine según el grosor de los separadores utilizados así como la cantidad de pozos requerida. Aplicar más solución hasta cubrir los bordes.

Electroforesis

Preparar las muestras para analizar en volúmenes totales adecuados al tipo de peine utilizado (volumen del pocito). Para peines de 15 pozos y 1 mm de grosor trabajar con volúmenes máximos de 10 μ l (se agregarán otros 10 con amortiguador de la muestra, que contiene glicerol para que por efecto de densidad se evite al máximo la difusión hacia el buffer de corrida).

Hervir las muestras 5 minutos.

Montar la cámara con los geles asegurándose de que el hule selle bien y no se presenten fugas. Quitar el gel no polimerizado con pedacitos de papel filtro. Se pueden lavar primero los pozos y después secar con el papel. Poner parte del amortiguador de corrida en el tanque y colocar la cámara en su interior. Llenar el centro de la cámara con amortiguador. Tapar el tanque con los electrodos y conectarlos a la fuente de poder. Encender la fuente de poder con un voltaje constante: 100V primeros 20 minutos hasta que el frente llega al gel separador (marca a 2 cm en el vidrio pequeño) y 150V después de 1 hora hasta el final del gel.

Desconectar la fuente y sacar la cámara; despegar los vidrios con los separadores haciendo palanca. Despegar el gel y dejarlo caer en la caja con colorante. Teñir durante 2 horas (o el tiempo necesario para que el colorante difunda por todo el gel) y desteñir con Ac. Acético / Metanol hasta que el fondo se aprecie claro. Si no se desea teñir el gel, puede prepararse para una transferencia.

ANEXO V

ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)

Soluciones

Amortiguador de transferencia

Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20% pH 8.3

Tris 9.09g

Glicina 43.2g

Disolver en un litro de agua desionizada y añadir:

Metanol 600 ml

Aforar a tres litros de agua desionizada estéril

Protocolo de transferencia

1. Realizar una electroforesis (SDS-PAGE); después de la electroforesis, equilibrar el gel en la solución de transferencia durante quince minutos. Humedecer con solución de transferencia la membrana de
 - (a) *immun-lite blotting membrane-BioRad* cortada en secciones de 7cm x 9cm para quimioluminiscencia
 - (b) nitrocelulosa 0.45µm de poro *BioRad*
 - (c) PVDF, primero en metanol, agua y luego amortiguador.
2. Preparar un paquete (sandwich) para transferencia, la placa de plástico **negra abajo** (sobre el fondo de una palangana o charola con la solución de transferencia) y la **transparente arriba**. Sobre la hoja de plástico negra del cassette colocar una **fibra** (scotch-brite) cuidando que esté bien impregnada en solución. Sobre la fibra colocar una hoja de **papel filtro** impregnado con solución. Si se trata de geles delgados (<1mm), utilizar una esponja y 2 hojas de papel filtro tipo whatman no. 1. Colocar el **gel** cuidando que no queden burbujas entre la fibra y el gel. Colocar la **membrana** ya equilibrada con la solución de transferencia. Con cuidado pasar un tubo de ensayo, como rodillo, para sacar todas las burbujas. Colocar otro **papel filtro** también previamente saturado de amortiguador de transferencia. Colocar la otra **fibra** (o esponja) y cerrar el cassette.
3. Colocar el cassette en la cámara con la cara negra orientada hacia lo negro de la cámara (es decir, teniendo cuidado de que el polo positivo dé hacia la membrana, y el gel viendo hacia el polo negativo). Agregar el amortiguador de transferencia a la altura necesaria para cubrir los electrodos o dos cm. arriba del gel.
4. Colocar un agitador magnético en la cámara y mantener en agitación continua durante toda la corrida. Coloca el congelador con agua desionizada (hielo) para evitar que se caliente el sistema.
5. Tapa la cámara y conectar a la fuente de poder para transferencia. Correr a 200mA durante una hora.
6. Después de la hora de corrida desconectar la cámara y sacar el sandwich, todo con mucho cuidado y con guantes para no manchar la membrana.

ANEXO VI

TINCIONES

(A) QUIMIOLUMINISCENCIA

Soluciones

Amortiguador salino de tris (TBS) 10x

Tris 200mM, NaCl 5M, pH 7.5

Tris 24.22g

NaCl 292.2g

Agregar 900 ml de agua desionizada estéril mezclar, ajustar el pH y aforar a un litro.
Guardar a 4°C

Solución bloqueadora

Leche descremada en TBS al 5%

Leche descremada 5g

TBS 1x 100 ml

Mezclar hasta que se disuelva.

Solución de lavado

TTBS, pH 7.5

Tris 20mM

NaCl 500mM

Tween 20 0.05%

450µl de tween 20 a 900 ml de TBS 1x

Solución del primer anticuerpo

Amortiguador (1% leche descremada en TTBS)

Leche descremada 2g

TTBS 200ml

Disolver el primer anticuerpo con un título adecuado 1:3000 20µl en 60 ml
(o 1:4000 25µl en 100 ml)

Solución del segundo anticuerpo o anticuerpo conjugado BioRad

(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase)

Diluir 20µl del anticuerpo conjugado en 60 ml de TTBS con 1% de leche descremada.
Dilución 1:3000.

Amortiguador del sustrato 1x

0.1 M dietanolamina, 1mM MgCl₂, pH 10.0

Mezclar 4 ml de amortiguador del sustrato 25x con 96 ml de agua desionizada

Solución de sustrato

Agregar 180 μ l del sustrato stock de quimioluminiscencia a 100 ml del amortiguador del sustrato 1x

Protocolo

Tinción

Sacar la membrana y colocarla en un recipiente para lavar con amortiguador TBS pH 7.5 durante cinco minutos. Cambiar de solución, tres veces.

Bloquear la membrana con 50 ml de leche descremada al 5% en TBS pH 7.5 por dos horas en agitación constante. Después del bloqueo, lavar las membranas con TTBS por 5 minutos cambiando la solución 3 veces (50 ml c/vez).

Incubar con el primer anticuerpo α -cGH en suspensión de leche descremada al 1% TTBS pH 7.5 toda la noche con agitación constante (con una dilución del anticuerpo 1:3000; 20 μ l en 60 ml). Lavar las membranas con 40ml TTBS pH 7.5 durante quince minutos por 3 veces.

Incubar con el segundo anticuerpo α -IgG-AP (fosfatasa alcalina) o α -IgG-HRP (peroxidasa), dependiendo del equipo de revelado, 1:3000 en TTBS con leche descremada 1% (20 μ l de anticuerpo en 60 ml para cada membrana). Incubar dos horas. Enjuagar con 40 ml TTBS quince minutos por 3 veces.

Cambiar la solución a TBS 1x pH 7.5, quince minutos para eliminar el tween-20.

Para **revelar** se preparan 60 ml de solución de sustrato:

2.4 ml amortiguador 25x

57.6 ml agua desionizada

108 μ l sustrato

(o según indicaciones del proveedor)

Incubar cinco minutos con agitación. Escurrir y colocarlas en bolsas de plástico, sacando las burbujas.

Autorradiografía

En un cassette para este propósito colocar las membranas y sobre ellas un película Kodak X-Omat-ARS de 8-10". Cerrar y exponer por un minuto. Tomar la película con unas pinzas y sumergirla en la solución de revelado por un minuto. Lavarla con agua durante un minuto.

Sumergir en la solución fijadora por un minuto. Lavar con agua durante un minuto.

Realizar el proceso en cuarto oscuro y frío.

(B) INMUNOTINCIÓN CON ANTICUERPO POLICLONAL

Soluciones

Amortiguador de fosfatos (PBS) 5x

Fosfatos 50mM, NaCl 0.75M, pH 7.6

NaH₂PO₄ · H₂O 6.9g

NaCl 43.75g

Disolver en 800 ml de agua, ajustar el pH a 7.6 y aforar a un litro. Guardar a 4°C.

Solución bloqueadora

Gelatina en PBS al 3%

Gelatina 3g

PBS 1x 100 ml

Mezclar hasta que se disuelva

Solución de lavado

TPBS

Fosfatos 10mM

NaCl 0.15M

Tween 20 0.05%

450µl de tween 20 a 900 ml de PBS 1x

Solución del primer anticuerpo

Amortiguador (1% gelatina en TPBS)

Gelatina 2g

TPBS 200ml

Disolver el primer anticuerpo con un título adecuado 1:3000 o 1:4000

20µl de anticuerpo en 60 ml de amortiguador

Solución del segundo anticuerpo o anticuerpo conjugado biorad

(goat anti-rabbit igg horseradish peroxidase)

Diluir 33µl del anticuerpo conjugado en 100 ml de TPBS con 1% de gelatina.

Protocolo

Inmunotinción

Sacar las membranas después de la electrotransferencia y colocarlas en un recipiente para lavar con amortiguador PBS 1x pH 7.6 durante cinco minutos dos veces. Colocar las membranas en solución de PBS con gelatina 3% durante dos horas. Después del bloqueo, lavar las membranas con TPBS por 10 minutos dos veces.

Incubar las membranas con el primer anticuerpo α -cGH en TPBS con 1% gelatina durante dos horas o toda la noche, con agitación constante. Lavar las membranas con TPBS durante cinco minutos por 3 veces.

Incubar con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa 1:3000 en TPBS con 1% gelatina. Incubar una y media a dos horas (el segundo anticuerpo es un anti-IgG de conejo, producido en cabras). Lavar las membranas con TPBS durante cinco minutos por 2 veces.

Revelado

Se utiliza 4-cloronaftol 0.05%, metanol 16.6%, PBS y peróxido de hidrógeno

4-cloronaftol 30 mg

metanol frio 10 ml

PBS 50 ml

peróxido de hidrógeno 30 μ l

La solución reveladora también se puede preparar con diaminobencidina de la siguiente manera:

diaminobencidina 25mg

PBS 100ml

peróxido de hidrógeno 20 μ l

Incubar durante 20 a 45 minutos con agitación, según la intensidad de las bandas que aparezcan. Detener el revelado por lavados con agua durante 20 minutos por dos veces.

(C) TINCIÓN CON CONCAVALINA A CONJUGADA CON HRP

Soluciones

Amortiguadores como en inmunotinción

Solución bloqueadora

Albúmina en PBS al 3%

Albúmina 3g
PBS 1x 100 ml

Mezclar hasta que se disuelva

Solución de con A-HRP

Amortiguador (1% albúmina en TPBS)

Albúmina 2g
TPBS 200ml

Resuspender un stock de con A-HRP con una dilución del anticuerpo 4µg/ml con TPBS.

Tinción

Sacar la membrana y colocarla en un recipiente para lavar con amortiguador PBS 1x pH 7.6 durante cinco minutos dos veces. Colocar la membrana en solución de PBS con albúmina 3% durante dos horas. Después del bloqueo, lavar las membranas con TPBS por 5 minutos dos veces.

Incubar las membranas con solución de con a-HRP en TPBS con 1% albúmina durante tres y media a cuatro horas con agitación constante a temperatura ambiente. Lavar las membranas con TPBS durante cinco minutos por 2 veces.

Revelado

Agregar la solución reveladora (misma que en B) e incubar el tiempo necesario para que aparezcan las bandas. Detener el revelado por lavados con agua durante 10 minutos por dos veces. Secar las membranas colocándolas entre varias hojas de papel filtro.

(D) INMUNOTINCIÓN CON OXIDACIÓN/ESTREPTAVIDINA-BIOTINA, AP

Soluciones

Amortiguador TBS 1x

Tris 50mM, NaCl 27mM, pH 7.2

Tris 6.05g

NaCl 1.60g

Disolver los reactivos en 900 ml de agua, ajustar el pH a 7.2 con HCl 1N y aforar a un litro con agua destilada y desionizada. Guardar a 4°C.

Amortiguador de acetatos

Acetato de sodio 200mM, pH 5.5

440 ml 200 mM AcNa

AcNa $3H_2O$ 12 g

disolver en 440 ml de agua.

60 ml 200 mM AcAc

AcAc glacial 690 μ l

en 60 ml de agua.

Combinar las soluciones stock. Checar pH.

Amortiguador de fosfatos (PBS) 5x

Fosfatos 9mM, NaCl 27m, pH 7.2

Na_2HPO_4 575 mg

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 100 mg

NaCl 800 mg

Disolver en 500 ml de agua, ajustar el pH a 7.2

Revelador

Tris 100mM, pH 9.5

Tris 1.21 g

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.00 g

NaCl 0.58 g

Disolver en 90 ml de agua, ajustar el pH a 9.5 con HCl 0.1 N. Aforar a 100 ml.

Amortiguador de acetatos/EDTA

Acetato de sodio 100mM, EDTA 5mM, pH 5.5

200 mM AcNa pH 5.5 300 ml.

EDTA 1.14 g

Disolver EDTA en la solución y llevar a 600 ml con agua.

Protocolo

1. Colocar 20 μ l de muestra en un tubo de polipropileno para microcentrífuga. Si la muestra es sólida (0.01 - 20 μ g) disolverla en 20 μ l de amortiguador de acetatos 100mM. Si es líquida, mezclar 10 μ l de ésta con 10 μ l del amortiguador.

2. Añadir 10 μ l de solución de peryodato (reactivo G, contenido disuelto en 1.5 ml de agua). Incubar 20 minutos a temperatura ambiente en obscuridad.

3. Añadir 10 µl de solución de bisulfito (reactivo H, cada tableta se disuelve en 4 ml de amortiguador de acetato 200 mM). Dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

4. Añadir 5 µl de hidrazida (reactivo B, que se prepara disolviendo el contenido del vial en 500 µl de DMF). Dejar incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.

5. Correr SDS-PAGE y WB

6. Sacar las membranas después de la electrotransferencia y colocarlas en un recipiente para lavar con amortiguador TBS 1x pH 7.2 durante cinco minutos dos veces. Colocar las membranas en 10 ml de solución para bloquear (reactivo C) durante treinta minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4° c con agitación.

7. Después del bloqueo, lavar las membranas con TBS por 10 minutos tres veces a temperatura ambiente con agitación.

8. Incubar las membranas con 10 ml de la solución de conjugado (reactivo D: 5 µl - streptavidin-ap conj disuelto en 10 ml de TBS) durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante.

9. Lavar las membranas con TBS durante diez minutos por 3 veces, a temperatura ambiente con agitación.

10. Preparar el revelador:

50 µl NBT (nitroblue tetrazolium - reactivo E) -sensible a la luz - 1.3 ml DMF 70% al contenido del vial E y disolver.

37.5 µl BCIP (reactivo F) 1 ml DMF al contenido del vial.

10 ml amortiguador color (revelador)

Sumergir la membrana a temperatura ambiente, sin agitar, por 3 a 60 minutos según la intensidad deseada. Se detiene el revelado por lavados con agua durante 20 minutos por dos veces. Secar la membrana.

Si se realiza primero la electroforesis y transferencia:

1. PAGE-WB

2. Sacar las membranas después de la electrotransferencia y colocarlas en un recipiente para lavar con amortiguador PBS 1x pH 7.2 durante cinco minutos dos veces.

3. Sumergir las membranas en 10 ml de solución de peryodato de sodio 10 mM en amortiguador de acetato de sodio/EDTA (reactivo A, disolver 21.4 mg del vial en 10 ml de acetato de sodio/EDTA; preparar justo antes de usar. Reactivo sensible a la luz). Incubar 20 minutos a temperatura ambiente en obscuridad con agitación.

4. Lavar las membranas con PBS por 10 minutos tres veces a temperatura ambiente con agitación.

5. Para preparar la solución biotinizadora, añadir 2 µl de hidrazida (reactivo B, que se prepara disolviendo el contenido en 500 µl de DMF) a 10 ml de amortiguador de acetato de sodio/EDTA. Dejar incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos con agitación.

6. Lavar las membranas con TBS por 10 minutos tres veces a temperatura ambiente con agitación.

7. Colocar las membranas en 10 ml de solución para bloquear (reactivo C) durante treinta minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4° c con agitación.

8. Después del bloqueo, lavar las membranas con TBS por 10 minutos tres veces a temperatura ambiente con agitación.

9. Incubar las membranas con 10 ml de la solución de conjugado (reactivo D: 5 µl - estreptavidina-AP conj disuelto en 10 ml de TBS) durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante.

10. Lavar las membranas con TBS durante diez minutos por 3 veces, a temperatura ambiente con agitación.

11. Preparar el revelador:

50 µl NBT (nitroblue tetrazolium - reactivo E) -sensible a la luz - 1.3 ml DMF 70% al contenido del vial E y disolver.

37.5 µl BCIP (reactivo F) 1 ml DMF al contenido del vial.

10 ml amortiguador color (revelador)

Sumergir la membrana a temperatura ambiente, sin agitar, por 3 a 60 minutos según la intensidad deseada. Se detiene el revelado por lavados con agua durante 20 minutos por dos veces. Secar la membrana.

ANEXO VII

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ENSAYO DE PROTEÍNA *Bio-Rad*

El ensayo de proteína Bio-Rad, basado sobre el método de Bradford (1976), es un simple y exacto procedimiento para determinar la concentración de proteína solubilizada. Involucra la adición de un colorante ácido (el reactivo empleado contiene colorante, ácido fosfórico y metanol) a una solución de proteína, y después medir a 595nm con un espectrofotómetro. La comparación con una curva standard da una relativa medida de la concentración de proteína. El ensayo de proteína Bio-Rad es un método que se basa en el cambio de color de un colorante, dependiendo de las diferentes concentraciones de proteína. La absorbencia máxima para una solución ácida de azul brillante de Coomassie (G-250) va desde 465 nm hasta 595 nm cuando se une a proteínas. El colorante azul de Coomassie se une principalmente a residuos aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina. Spector (1978) encontró que el coeficiente de extinción de una solución del complejo colorante-albúmina era constante en un rango de diez veces la concentración. Sin embargo, se debe aplicar la ley de Beer para obtener una cuantificación apropiada de la proteína.

Microensayo

PROCEDIMIENTO

1. Preparar de 3 a 5 disoluciones de una proteína standard que sea representativa de la solución de proteína que va a ser examinada. El rango lineal del ensayo para BSA es de 1.2 a 10 µg/ml, mientras que con IgG el rango lineal es de 1.2 a 25µg/ml.
2. Medir 800µl de cada standard y colocar la muestra en un tubo limpio y seco. Las soluciones de proteínas se ensayan comúnmente en duplicados o triplicados.
3. Poner 200 µl de colorante a cada tubo
4. Incubar a temperatura ambiente por lo menos 5 minutos. La absorción se incrementará con el tiempo; las muestras deben incubarse a temperatura ambiente por no mas de 1 hora.
5. Medir absorción a 595nm.

Preparación de la solución stock para la curva:

Solución 0.1 µg/µl: 104.2µl (150µg) de la solución comercial de BSA (1.44 mg/ml)
1395.8 µl de H₂ODD

Ensayo:

Tubo	Concentración de BSA (X)	Volúmen de la sol. de BSA	H ₂ O	Reactivo de Bradford
1	-	-	800µl	200µl
2	1µg/ml	10µl	790µl	200µl
3	2µg/ml	20µl	780µl	200µl
4	5µg/ml	50µl	750µl	200µl
5	10µg/ml	100µl	700µl	200µl

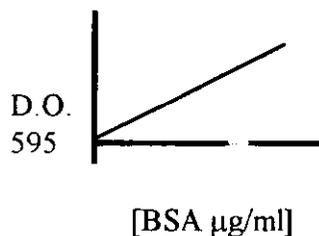
6	15µg/ml	150µl	650µl	200µl
7	20µg/ml	200µl	600µl	200µl
8	25µg/ml	250µl	550µl	200µl
9		5µl/muestra	795µl	200µl
10		10µl/muestra	790µl	200µl

Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y leer a 595 nm. Calcular la regresión lineal o graficar para extrapolar las muestras no conocidas sobre la curva.

Calculos:

Tubo	Lectura	Lectura'	Promedio	Desviación estandar	Y X-bco.	Linea recta
Bco						$y=mx+b$
1						$x=y-b/m$
2						$b=$
3...						$m=$
n						$r=$

Gráfica:



MacroBradford

PROCEDIMIENTO

1. Preparar de 3 a 5 disoluciones de una proteína standard que sea representativa de la solución de proteína que va a ser examinada. El rango lineal del ensayo para BSA es de 0.2 a 0.9 mg/ml, mientras que con IgG el rango lineal es de 0.2 a 1.5 mg/ml.
2. Medir 100µl de cada estándar y colocar la muestra en un tubo limpio y seco. Las soluciones de proteínas se ensayan comúnmente en duplicados o triplicados.
3. Poner 5.0 ml de colorante diluído a cada tubo
4. Incubar a temperatura ambiente por lo menos 5 minutos. La absorción se incrementará con el tiempo; las muestras deben incubarse a temperatura ambiente por no mas de 1 hora.
5. Medir absorción a 595nm.

Se prepara el reactivo de Bradford 1:5 y se filtra en papel Whatman No. 1

Preparación de la solución stock para la curva:

Solución 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$: 200 μl (278 μg) de la solución comercial de BSA (1.39 mg/ml)
78 μl de H₂O

Ensayo:

Tubo	Cantidad de BSA (X)	Volúmen de la sol. de BSA	H ₂ O	Reactivo de Bradford
1	-	-	100 μl	5000 μl
2	20 μg	20 μl	80 μl	5000 μl
3	30 μg	30 μl	70 μl	5000 μl
4	40 μg	40 μl	60 μl	5000 μl
5	60 μg	60 μl	40 μl	5000 μl
6	80 μg	80 μl	20 μl	5000 μl
7	100 μg	100 μl	0 μl	5000 μl
8		5 μl /muestra	95 μl	5000 μl
9		10 μl /muestra	90 μl	5000 μl

Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y leer a 595 nm. Calcular la regresión lineal o graficar para extrapolar las muestras no conocidas sobre la curva.