

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

03097

2

TESIS

Secreción diferencial de las variantes moleculares de la hormona de crecimiento de pollo, *in vitro*.

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

PRESENTA:

M. en C. HILDAJ MARTÍNEZ CORIA

CAMPUS UNAM, JURIQUILLA, QRO., MÉXICO 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2002

MARTINEZ CORIA, HILDAJ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del doctor Carlos Arámburo de la Hoz, en el Centro de Neurobiología, ahora Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Qro. de 1998 a 2001. La tesis se realizó con ayuda de una beca para estudios de doctorado de PADEP, UNAM, con los donativos 31817-N y 3455-PN de CONACYT, 227399 y 206196 de PAPIIT y la donación de animales por parte de Pilgim's Pride de México.

*a Carlos Calderón Figueroa*

# AGRADECIMIENTOS

Al Di, Carlos Arámburo por su apoyo

Por sus aportaciones a los miembros del comité tutorial:

Di. Carlos Arámburo

Di. Carlos Valverde

Di., Gonzalo Maitínez de la Escaleta

Por sus valiosos comentarios a los miembros del jurado:

Di, FlavioMena

Di., Carlos Arámburo

Di., Alejandro Alagón

Di, FemandoLarrea

Día. Patricia Joseph

Dr. Enrique Pedernera

Di.. Gonzalo Maitínez de la Escalera

Por su ayuda en el desarrollo de este trabajo a:

El Güero (Héctor)

Cailos A,

Javier

Gerardo

Maricela

Maitha

Laura

Felipe

Áurea

Tere M.

Mauricio D,

Gabriel G.

Por su apoyo con el material bibliográfico a:

Pilar Galarza

Ignacio Caballero

Rafael Silva

Por la donación de animales a:

Pilgrim's Pride de México

Por su ayuda con la carga pesada de los trámites a:

El Güero

Javier

Carmen

Isabel

Leonor

Arturo

Por aligerarme la vida durante el desarrollo de este trabajo a mi familia y amigos:

Fernanda

El Güero

La mamá

Ramón

La tía Hilda

Alejandra C.

Javier

Gerardo

Hilda J,

Abraham

Mauricio L,

Malú

Mar

Paco

La Pilañca

Pavel

Alejandra O,

Moni

icela

Alejandro

Tere P,

Tere M.,

Azucena

Felipe

Tana

C, Valverde

# ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>4</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>6</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>7</b>
<b>Hormona de crecimiento (GH)</b> .....	<b>8</b>
Evolución .....	8
Estructura .....	11
Variantes moleculares de la GH.....	14
Efectos de la GH.....	19
Heterogeneidad molecular y funcional de la GH.....	20
Mecanismo de acción de la GH .....	21
Regulación de la secreción de GH .....	24
Células secretoras de GH .....	25
GH extrahipofisiaria .....	29
Síntesis y secreción .....	30
Mecanismo de acción de los factores reguladores.....	34
Regulación de las variantes moleculares de GH.....	38
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>40</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>41</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>41</b>
<b>Diseño experimental</b> .....	<b>43</b>
<b>Material y método</b>	
Animales .....	44
Estudio en cultivo de hipófisis completas	
Cultivo de adenohipófisis completas .....	44
Experimentos con secretagogos .....	45
Estudio en cultivo primario de células hipofisarias	
Procesamiento de las células.....	45
Experimentos con secretagogos.....	46
Procedimientos analíticos	
ELISA para cGH.....	48
Inmunoprecipitación .....	49
Identificación de variantes de masa de cGH por SDS-PAGE e inmunotransferencia .....	51
Cuantificación de variantes de cGH .....	52
<b>Resultados</b> .....	<b>53</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>86</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>99</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>101</b>
<b>Anexos</b>	
Anexo 1- ELISA para cGH .....	114
Anexo 2- Inmunoprecipitación de cGH.....	118
Anexo B Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	122
Anexo D- Inmunolectrotransferencia .....	125
<b>Artículo publicado</b> .....	<b>128</b>

## RESUMEN

En una gran variedad de especies de vertebrados se han identificado variantes moleculares de la hormona del crecimiento (GH) en la hipófisis, circulación, placenta y otros tejidos. En el pollo se han identificado diversas formas que pueden ser producto de modificaciones postraduccionales. Aunque el monómero de 22 kDa es la forma más abundante, algunas variantes presentan actividad biológica específica o bien, diferencias en la potencia o en la afinidad por el receptor para GH. La proporción de las distintas formas moleculares de la GH contenidas en la hipófisis cambia durante la ontogenia por lo que se piensa que pueden estar reguladas diferencialmente. En este trabajo se evaluó el efecto de la hormona liberadora de la GH (GHRH) sobre la liberación de las variantes moleculares de cGH en dos sistemas *in vitro*: en cultivo de hipófisis completas y en cultivo primarios de células hipofisiarias, utilizando SDS-PAGE e inmunotransferencia. La GHRH estimuló la secreción de la mayoría de las variantes de masa de la cGH aunque la amplitud de este incremento no fue equivalente para todas las formas moleculares. Se encontró un efecto diferencial sobre la secreción de las variantes de masa de GH en los dos sistemas utilizados, particularmente sobre la forma monomérica (22 kDa) y la forma de 26 kDa (posible forma glicosilada) de la cGH. En el cultivo de hipófisis completas, la proporción de la cGH de 26 kDa se incrementó 35% mientras que la de 22 kDa disminuyó 31% después del tratamiento con GHRH. En los cultivos primarios de células hipofisiarias la proporción de la variante glicosilada se incrementó 43% mientras que el monómero y el dímero disminuyeron al 22 y 29%, respectivamente, después del tratamiento con GHRH. Activadores de las señales intracelulares como el 8-bromo-AMPC y el PMA tuvieron efectos similares sobre la liberación de la forma glicosilada de la cGH. Asimismo, el tratamiento con TRH presentó un efecto equivalente al de la GHRH sobre el monómero y la forma de 26 kDa. Sin embargo, la ionomicina (ionóforo de  $Ca^{2+}$ ) incrementó la secreción de cGH favoreciendo la liberación de la forma monomérica. Estos datos apoyan la hipótesis de que las variantes de GH pueden estar bajo un control diferencial y que los secretagogos hipotalámicos de cGH como la GHRH y la TRH favorecen la liberación de una variante glicosilada de la hormona que posee mayor vida media en la circulación.

## ABSTRACT

Variants of growth hormone (GH) are present in most vertebrates. Chicken GH (cGH) undergoes post-translational modifications that contribute to its structural diversity. Although the 22 kDa form of GH is the most abundant, some other variants have discrete bioactivities which may not be shared by others. The proportion of cGH variants change during ontogeny suggesting they are regulated differentially. The effect of growth hormone-releasing hormone (GHRH) on the release of cGH variants was studied in both pituitary gland and primary cell cultures, employing SDS-PAGE, western blotting and densitometry. GHRH (2nM, 2h) stimulated the secretion of most of size variants of cGH although the amplitude of increase was not equal for each one. A differential effect on the secretion of GH size variants, particularly on the 22 kDa (monomer) and 26 kDa (putatively glycosylated) cGH isoforms was found in both systems. In the whole pituitary culture, the proportion of the 26 kDa ir-cGH increased 35% while the 22 kDa decreased 31% after GHRH treatment in comparison with the controls. In the primary cell culture system, the proportion of the glycosylated variant increased 43% while the monomer and the dimer decreased 22% and 29%, respectively, after GHRH stimulation. Activators of intracellular signals such as 10<sup>-6</sup>M 8-bromo-cAMP and 10<sup>-6</sup>M PMA had a similar effect to that obtained with GHRH. Other hypothalamic secretagogue of cGH such as TRH promotes the release of 26 kDa form in the same way that GHRH. However the treatment with ionomycin promotes the secretion of the monomer form. Present data support the hypothesis that GH variants may be under differential control and that GHRH promotes the release of glycosylated cGH variant that has an extended half-life in circulation.

## INTRODUCCIÓN

Los organismos pluricelulares son sistemas organizados en los que grupos de células constituidos como órganos o tejidos se han especializado en determinadas funciones. La relación que existe entre un ser vivo y el ambiente que lo rodea produce cambios en el individuo, los cuales generan una respuesta de diferentes tipos celulares, que aunque realicen tareas distintas están coordinados para integrar la actividad orgánica en todos los procesos básicos de la vida., Ello es posible gracias a la comunicación celular, que generalmente ocurre a través de mecanismos eléctricos y químicos., La comunicación química en los vertebrados se lleva a cabo utilizando distintas vías de acuerdo con la distancia que recorre la señal entre una célula y otra; en una vía la señal es transferida a través de comunicaciones directas entre las células; en otra el mensajero es secretado y ejerce su influencia en una célula cercana. Otra vía más es la comunicación endocrina en la que la célula blanco se encuentra a una distancia considerable y el mensajero, llamado hormona, viaja a través del sistema circulatorio para llegar al tejido blanco,

En todos los animales, las células endocrinas y nerviosas trabajan juntas para coordinar las diversas actividades de los millones de células que constituyen a un individuo [Hardy, 1991], Un buen ejemplo de esto son los procesos como el crecimiento y desarrollo, que están regulados por la interacción concertada de los sistemas neuroendocrino y nervioso., Uno de los mensajeros químicos importantes en estos procesos es la hormona de crecimiento (GH) que presenta efectos sobre el metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y minerales., Además, tiene actividad sobre la proliferación y diferenciación celular., Estos efectos pueden ser<sup>1</sup>



directos sobre las células blanco o mediados por otros mensajeros regulados por esta hormona, La GH se produce en la hipófisis de todos los vertebrados y recientemente se ha identificado en otros tejidos extrahipofisarios [Harvey, 1995]. La biosíntesis de esta hormona está regulada por factores que ejercen un control tanto estimulador como inhibitorio y están relacionados con estados fisiológicos como la edad, el sexo y la etapa reproductora, entre otros,. Aunque la GH ha sido descrita e incluso secuenciada en una gran variedad de especies, la regulación de su síntesis, secreción y funciones ha sido estudiada principalmente en mamíferos, evaluando a la familia de hormonas de crecimiento como una sola entidad. Es importante el estudio de esta hormona en otras especies porque permite evaluar la relación entre la estructura y las diferencias funcionales entre organismos,. El pollo representa un modelo experimental en el que se pueden analizar procesos fisiológicos a corto plazo como por ejemplo el crecimiento y desarrollo, Además, es una especie con alto valor comercial por ser<sup>1</sup> una fuente de proteína animal utilizada para el consumo humano,. En el presente trabajo, se estudió la regulación de la secreción de las variantes moleculares de la GH de pollo (cGH) en dos condiciones experimentales que permitieran un acercamiento a los mecanismos involucrados en la síntesis de las isoformas de esta hormona, El pollo representa un modelo experimental que permite comparar diferencias funcionales

## HORMONA DE CRECIMIENTO

### **Evolución**

Todos los seres vivos son similares a nivel molecular, usan los mismos 20 aminoácidos en sus proteínas y los mismos nucleótidos en el ADN y ARN, Aunque hayan surgido diferencias físicas y funcionales entre los organismos durante la evolución, las similitudes bioquímicas básicas se han conservado, aún entre los niveles de organización más complejos,. Con este patrón general se puede postular que todos los organismos provienen de un ancestro común con características bioquímicas básicas comunes,. Se supone entonces, que la

diversidad entre los diferentes niveles de organización son resultado de procesos evolutivos de divergencia,

Colectivamente, las proteínas proporcionan abundante información acerca de la historia de la evolución. Igualmente, las variaciones evolutivas de las proteínas proporcionan mucha información acerca de las proteínas mismas., La divergencia evolutiva entre diferentes especies da como resultados muchas variantes de una misma molécula, todas esencialmente con la misma función biológica pero con diferente secuencia de aminoácidos., Estas diferencias y similitudes reflejan las relaciones que existen entre la estructura y la función de esas proteínas., La comparación de las estructuras resulta entonces de gran importancia para el entendimiento de sus funciones y de su evolución [Creighton, 1993].

En el caso particular de la GH, ésta pertenece a una familia de hormonas peptídicas producidas principalmente por la glándula hipófisis de todos los vertebrados y por las placentas de mamíferos, Aunque estas proteínas están relacionadas estructuralmente, presentan gran diversidad de funciones. La familia está constituida por la GH, la prolactina (PRL), el lactógeno placentario (PL) en roedores y ungulados o somatotropina coriónica humana (CS) en primates, la somatolactina (SL), la proliferina (PLF), las proteínas relacionadas (bovino) o parecidas (rata) a la prolactina (PRP), las proteínas relacionadas con la proliferina y las relacionadas con la GH [Rand-Weaver, 1993]. La homología estructural entre la GH y la PRL apoya la sugerencia de Bewley y Li, quienes en 1970 propusieron que estas hormonas derivan de un gen ancestral común., En 1971 Niall<sup>[bl]</sup> y colaboradores demostraron que la CS presenta un 86% de homología con la GH humana por lo que se propuso que proviene de la duplicación del gen de la GH., Sin embargo, en otras especies como el ratón, rata, hámster, ovino y bovino las sustancias lactogénicas placentarias llamadas "PL" presentan alta homología con la PRL indicando la divergencia a partir de esta hormona [Scanes, 1995].

Por otro lado la SL, que ha sido identificada sólo en peces, presenta alta homología con la PRL y con la GH lo que sugiere una vía más en la evolución de la familia., Con base en la comparación de las secuencias, algunos autores

piensan que pudo haber derivado del gen de la GH porque presentan entre el 25 y 27 % de homología, mientras que con la PRL del 19 al 20 %, aunque su estructura tridimensional tiene gran similitud con esta última, Se considera también, la posibilidad de que la SL derivó independientemente como producto de una primera duplicación viable del ancestro común. La ausencia de esta hormona en otros vertebrados puede explicarse por un lado porque no se expresa el gen o bien porque se produjo una delección durante la evolución entre los peces pulmonados y los anfibios., [Scanes, 1995; Rand-Weaver, 1993; May 1999].

En el siguiente esquema se muestra el árbol filogenético propuesto a partir de estudios basados principalmente en la homología de la secuencias de los miembros de la familia GH-PRL.

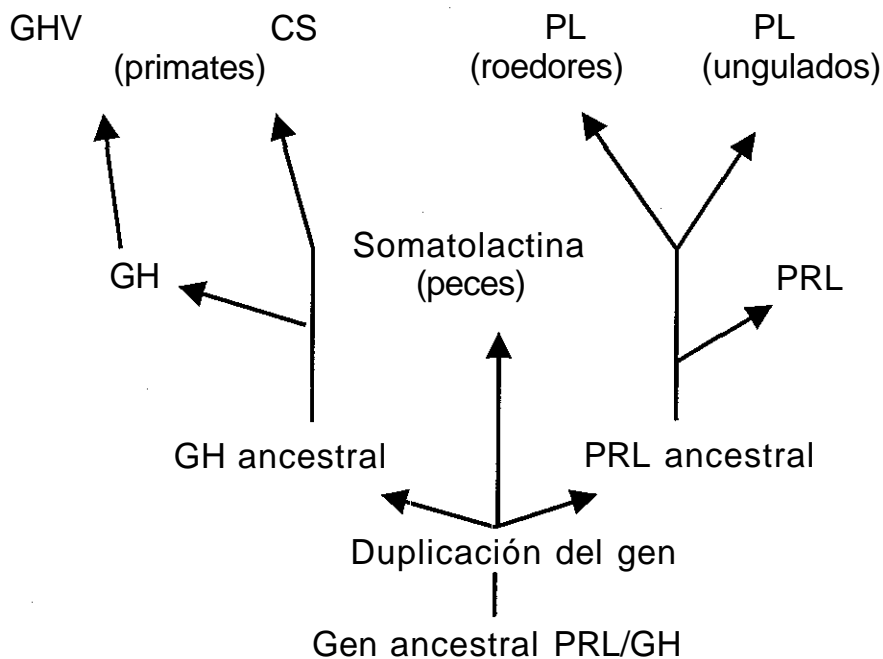


Figura 1 Árbol filogenético hipotético de la familia GH-PRL [Harvey, 1995]

Algunos autores apoyan la hipótesis en la que se plantea que el proto-gen GH-PRL pudo haber derivado de péptidos pequeños a través de la duplicación de exones, porque en la GH y en la PRL se han observado regiones internas homologas [Nal, 1971a]. Se ha sugerido también que esta familia se originó a partir del ancestro de la insulina o de una serina proteasa debido a ciertas similitudes entre sus secuencias [Adison, 1971].

Además, se cree que la duplicación del gen de GH-PRL sucedió antes de la divergencia entre los peces óseos y los cartilagosos.. Sin embargo, existen evidencias de la presencia de proteínas con inmunorreactividad semejante a GH o PRL en algunas especies de insectos [Hansen, 1988; Veenstra, 1985; Schmid, 1989; 1990] y moluscos [Swinnen, 1985]. Si lo anterior se confirma con la identificación de las secuencias de aminoácidos, se podría sugerir que la división entre las dos hormonas sucedió antes de la división entre los protostomados y deuterostomados, hace más de 590 millones de años [Scanes 1995].

### **Estructura**

La GH se sintetiza como una prehormona de 225 residuos de aminoácidos y la hormona madura está formada por una cadena de cerca de 191 aminoácidos (dependiendo de la especie), contiene un asa central grande, así como un asa pequeña cercana al extremo carboxilo terminal, ambas formadas por puentes disulfuro localizados en los residuos 57-165 y 182-189 (ver figura 2), La forma más abundante de la hormona en la mayoría de las especies tiene un peso molecular (PM) aproximado de 21,000 a 22,000 Da, Su estructura tridimensional ha sido determinada por difracción de rayos X de las GHs porcina y humana [Goffin, 1996], Está constituida por un 50% de a-hélices distribuidas en 4 a-hélices antiparalelas que se encuentran en los segmentos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183, y cada una presenta un carácter anfifílico diferente, siendo la hélice 4 la más hidrofóbica [Abdel-Meguid, 1987, Scanes, 1995]. Estos segmentos contienen 4 dominios ( $A_{GH}$ ,  $B_{GH}$ ,  $C_{GH}$  y  $D_{GH}$ ) altamente conservados en la escala filogenética, siendo el segmento 164-187 el más conservado. Los cuatro dominios se han identificado en todos los vertebrados, corresponden a las posiciones 13-33, 54-94, 113-132 y 157-187 y se encuentran separados por dominios variables o deleciones,. Los dominios  $A_{GH}$ ,  $B_{GH}$  y  $C_{GH}$  corresponden a a-hélices con un arreglo hacia el exterior de la molécula de GH, mientras que el dominio  $D_{GH}$  está localizado en el interior de la molécula., Este arreglo se ha encontrado en todas las GHs estudiadas hasta el momento [Chen, 1994; Harvey, 1995].

Particularmente, en las aves, se conoce la estructura primaria de la proteína y del RNAm del pavo, pollo y pato, siendo éstas casi completamente

homologas con una diferencia de 3 aminoácidos sustituidos y una deleción en la secuencia de la GH del pato con respecto a la del pollo [Chen, 1988; Hull, 1997]. En este último la GH representa aproximadamente el 10% de la proteína hipofisiaria total [Stukie, 1986]; la prehormona contiene 216 residuos de aminoácidos y la hormona madura 191 aminoácidos, Los puentes disulfuro están formados por cisternas localizadas en las posiciones 53-164 y 181-189., Su peso molecular aproximado es de 22 kDa y su punto isoeléctrico (pI) de 5,1 [Arámuro, 1993, Hull, 1997].

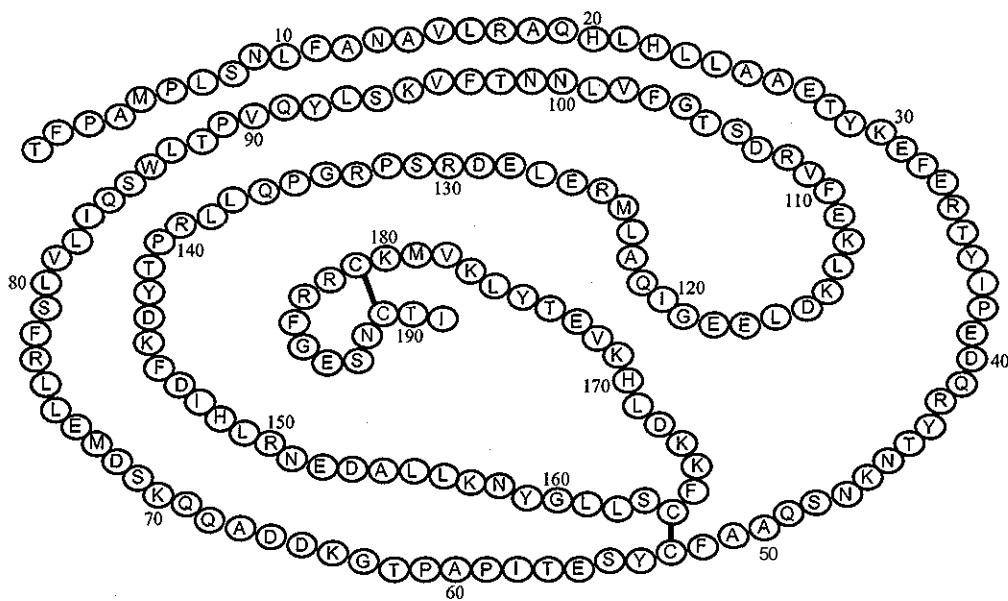


Figura 2. Estructura primaria de la GH de pollo,

Está ampliamente aceptado que la GH presenta dos sitios de unión al receptor, El sitio 1 de la GH se une a una molécula del receptor para GH, Este sitio esta constituido por la región que va del centro hacia el extremo carboxilo de la hélice 4, los residuos 54-74 de una asa y parte de la hélice 1; subsecuentemente el sitio 2 de la GH se une a otra molécula del receptor para GH con menor afinidad e incluye la parte del extremo amino terminal de la hélice 1, la hélice 3 y los residuos 12, 16 y 19 [Cunningham, 1991] (ver figura 3).. La

dimerización del receptor es aparentemente indispensable para iniciar la activación de la transducción de la señal intracelular, y este mecanismo de unión sucede cuando la GH se une tanto a los receptores somatogénicos como a los lactogénicos [Goffin, 1996],

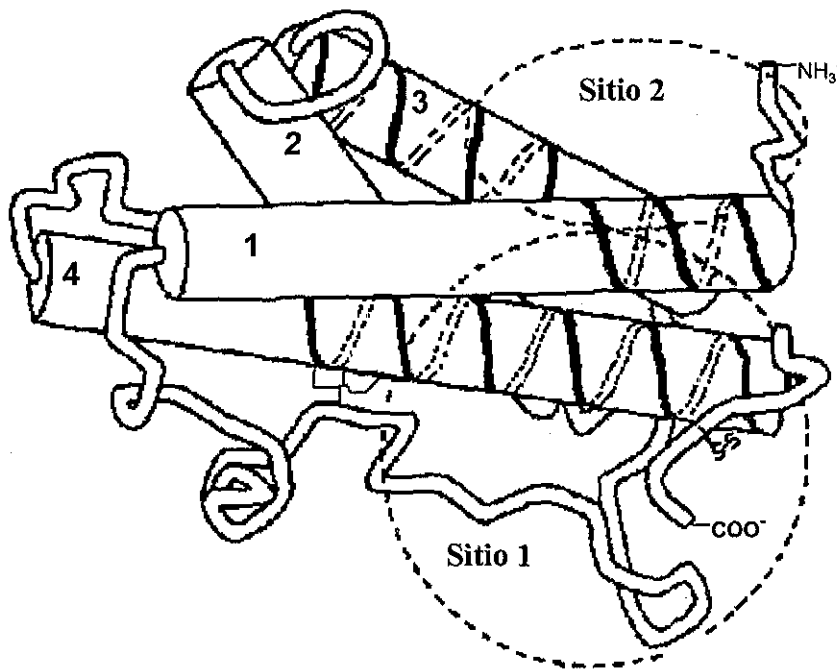


Figura 3, Sitios de unión al receptor de GH [ modificado deCunningham, 1991],,

Diferentes estudios han aportado evidencia sobre la importancia de la hélice .3 en la actividad biológica de la GH,, El segmento anfifílico entre los residuos 109 a 126 contienen una glicina (119) que está conservada en todos los vertebrados y es determinante en algunos efectos de la GH estudiados como son: la secreción del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) hepático, el efecto tipo insulina y la lipólisis [Scanes, 1995; Chen, 1995], Además, en estudios con ratones transgénicos en los que se expresa una muíante de la GH bovina con la sustitución de la Glu-117 por una leucina, la Gly-119 por una

arginina y la Ala-122 por aspartato, se encuentran deprimidos el crecimiento y las concentraciones de IGF-I circulante, lo que sugiere que este análogo de GH actúa como antagonista funcional de la misma hormona [Scanes, 1995]. Al parecer, la participación de esta Gly-119 consiste en mantener una hendidura entre la hélice 1 y 3 después de la interacción con la primera molécula del receptor y permitir así la interacción con algunos residuos del segundo receptor [Goffin, 1996].

### *Variantes moleculares de la hormona de crecimiento*

La GH está constituida por una familia de proteínas homologas pero no idénticas entre sí [Arámburo, 1993; Houston, 1988]. Este complejo patrón de variación estructural ha sido descrito en mamíferos [Hat, 1984; Lewis, 1984], aves [Arámburo, 1989<sup>a</sup>; 1989<sup>b</sup>; Berghman, 1987; Houston, 1988], reptiles [Yasuda, 1989], anfibios [Maters, 1989] y peces [Kawachi, 1986], y se ha postulado que puede contribuir a la diversidad funcional de la hormona., Aunque la información sobre la caracterización bioquímica y fisiológica de las variantes moleculares de la GH se encuentra dispersa y fragmentada, existen diversos tipos de estudios que proporcionan evidencias sobre su importancia funcional. Por un lado se han descrito algunos de los mecanismos a través de los cuales ciertas variantes son sintetizadas y se ha observado que son secretadas en diferentes proporciones dependiendo del estado fisiológico del animal. Además, existen algunos datos sobre su actividad biológica y se conocen ejemplos de especificidad de funciones o diferencias en la potencia de sus efectos.

La fuente de heterogeneidad de la GH puede estar relacionada con la multiplicidad génica, el procesamiento diferencial del RNA mensajero, modificaciones postraduccionales y modificaciones postsecreción.,

#### *a) Multiplicidad génica*

Durante mucho tiempo se pensó que existía sólo un gen que codificaba para la GH en todos los vertebrados., Sin embargo, desde hace varios años se identificaron dos genes en los humanos que codifican para dos GHs muy similares., Al primero se le denomina normal o hGH-N y se expresa en la hipófisis; el segundo se expresa en el sincitiotrofoblasto de la placenta y en

testículo, al cual se le llama variable o hGH-V [Franken, 1987; Liehaber, 1989; Untergasser 1998], La proteína resultante de la expresión de este último difiere de la hGH-N por 13 aminoácidos y presentan un 92 % de homología, Está constituida por 191 aminoácidos, su PM es de aproximadamente 22 kDa, es más básica que la hGH-N, se encuentra glicosilada y contiene un único sitio de glicosilación tipo N, se une a los receptores tanto de PRL como de GH y con ayuda de algunos bioensayos se ha observado que es biológicamente activa [Hennen, 1988; Ray, 1990; Bauman, 1991], También en la hipófisis de humanos se ha identificado un péptido glicosilado de 12 kDa relacionado con la GH y por su secuencia se cree que es producto de un gen diferente al de la hGH-N y hGH-V [Díaz, 1993],

Además, en algunos peces óseos (esturión, salmón y anguila) [Kawachi, 1986; Yasuda, 1992; Yamaguchi, 1987] y anfibios (rana) [Matens, 1987] se han identificado dos genes que codifican para la GH y se expresan en la glándula hipófisis,. La estructura primaria de ambos genes es muy similar a la GH de otros vertebrados y sus productos se conocen como GH-I y GH-II. En los esturiones, ambas contienen 190 residuos de aminoácidos, dos puentes disulfuro en los residuos 52-163 y 180-188, difieren entre sí por sólo 3 aminoácidos y al comparar la secuencia con otros vertebrados presentan mayor<sup>1</sup> homología con los tetrápodos (63-76%) que con los teleósteos (salmón y anguilas entre otros) (42-63%) [Yasuda, 1992],

#### *b) Procesamiento diferencial de RNA mensajero,,*

En roedores y humanos se han identificado diferentes RNA mensajeros (RNAm) producto del gen de GH. El gen de la hGH-N produce tres RNAm y las proteínas resultantes son la hGH de 22 kDa con 191 residuos de aminoácidos; una de 20 kDa, que presenta una delección en el exón 3 de 45 nucleótidos y de 15 aminoácidos correspondientes al segmento 32-46 de la secuencia y representa del 5 al 10 % del monómero sintetizado en la hipófisis; y finalmente una variante de 17,5 kDa [Lewis, 1978,1992,2000; Masuda, 1988; Palmethofer, 1995], La forma de 20 kDa también se ha identificó en roedores y una variante de 17,5 kDa de la hGH en la hipófisis [Sinha, 1984, Lecomte, 1987],



Otras formas moleculares de GH identificadas son producto del gen de la hGH-V, un RNAm con 800pb que produce una proteína de 22 kDa, otro de 1250pb que mantiene el intrón D (hGH-V2), aunque no se ha identificado la proteína, podría codificar para una proteína de 230 aminoácidos, y otro más reconocido en el testículo que mantiene también parte del intron D y codifica para una posible proteína de 25 kDa con 219 aminoácidos, la cual pierde el sitio de glicosilación presente en la hGH-V en los residuos Asn<sub>140</sub> y adquiere otro en la posición 148, a esta forma molecular se le conoce como GH-Vdelta4 [Ray, 1989; Untergasser, 1998].

### *c) Modificaciones pos traduccionales*

Las modificaciones postraduccionales de la GH identificadas incluyen la agregación u oligomerización, desamidación, proteólisis con o sin reducción, glicosilación, fosforilación y acetilación,

Hasta ahora todas las formas moleculares de la GH en aves parecen derivar<sup>1</sup> de modificaciones postraduccionales y existen evidencias suficientes de que existe una serie de variantes de masa tanto en la adenohipófisis [Arámburo, 1990; Houston, 1988] como en el plasma [Montiel, 1992].

En la glándula de todas las especies estudiadas, el análisis mediante la electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras revela que predomina la forma monomérica de la hormona (22 kDa) [Arámburo, 1990; Bauman, 2000]. Sin embargo, las formas dimericas y otros oligómeros pueden representar el 40 % de la GH secretada al plasma en humanos. La degradación de los dímeros de la forma de 22 kDa y 20 kDa es más lenta (5 y 2 veces menor) que la de sus respectivos monómeros. Por esta razón es comprensible que la proporción de oligómeros sea mucho más elevada en el plasma que en la hipófisis [Bauman, 1986]. Se piensa que los dímeros de GH identificados en mamíferos y aves se unen por puentes disulfuro intercatenarios o uniones no covalentes. Sin embargo, aunque no se conoce la naturaleza de la unión, se ha observado en pollos y humanos la presencia de dímeros posiblemente unidos covalentemente [Arámburo, C y Scanes, CG datos no publicados]. Cuando la electroforesis se hace en condiciones reductoras desaparece la mayor parte de las formas de alto peso molecular, se incrementa

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

De modo adicional, se han encontrado variantes de masa que posiblemente sean producto de un proceso proteolítico: una forma con un PM de 25 kDa observada en condiciones no reductoras y un fragmento de 15 kDa observada en condiciones reductoras en pollo [Arámburo, 1993]. La presencia de la variante de 25 kDa que posiblemente sea producto de un proceso proteolítico sugiere una forma cortada de dos cadenas. Esta forma, al analizarse en condiciones reductoras, desaparece, y se incrementa la proporción del fragmento de 15 kDa. Por<sup>1</sup> estudios *in vitro*, se ha sugerido que enzimas del tipo de la trombina y/o la colagenasa podrían estar involucradas en la generación de la cGH cortada *in vivo* [Arámburo, 1991; 1993,2001].

La GH glicosilada se ha identificado en la hipófisis y en el plasma de varias especies de mamíferos, en algunos peces óseos, en el tiburón y en el pollo, [Sinha, 1987; Berghman, 1987; Arámburo, 1991; Montiel, 1992]. Esta forma glicosilada en humanos, representa aproximadamente el 1 % de la hGH-N total [Scanes, 1995]. Sin embargo existen evidencias -en humanos y ratas- de que la tasa de glicosilación de la GH hipofisiaria cambia en algunas situaciones fisiológicas relacionadas con la etapa reproductiva y el desarrollo fetal [Sinha, 1987; 1990<sup>a</sup>; 1990<sup>b</sup>]. Por otro lado la hGH-V presenta un sitio de glicosilación potencial tipo N codificado por el exón 5 en la región comprendida entre los residuos Asn<sub>140</sub>-Gln<sub>141</sub>-Thr<sub>142</sub> de su secuencia. La expresión de esta proteína se ha demostrado en experimentos utilizando fibroblastos de ratón C127 transfectados con el gen de la hGH-V en los que se observó que se expresan dos proteínas glicosiladas (24 y 26 kDa) además de la forma monomérica de 22kDa [Ray 1989]. Otra forma encontrada en la hipófisis de humanos es la variante de 12 kDa que también contiene en su secuencia un sitio consenso N de unión a carbohidratos [Díaz, 1993]. Aunque son escasos los reportes sobre la forma glicosilada de la GH de vertebrados no mamíferos, estos sitios de glicosilación potencial se pueden observar<sup>1</sup> en la región Asn<sub>188</sub>-Cys<sub>189</sub>-Thr<sub>190</sub> en la mayoría de las secuencias de las GHs de aves, reptiles, anfibios y peces estudiadas y en la región Asn<sub>46</sub>-Lys<sub>47</sub>-Thr<sub>48</sub> en el caso del tiburón. Sin embargo, se ha

identificado una fóima glicosilada de 24 kDa de la hGH-N que no contiene este sitio consenso, por lo que cabe la posibilidad que en los mamíferos una parte de la GH hipofisiaria se encuentre asociada a carbohidratos a través de uniones tipo O [Hao, 1996],

En el pollo se identificó una forma glicosilada de la GH (G-cGH) que tiene un peso molecular<sup>1</sup> aparente de 29 kDa en condiciones reductoras. Cuando esta forma molecular se analizó con diferentes criterios electroforéticos se mostró que presenta heterogeneidad molecular, encontrándose seis variantes glicosiladas con puntos isoeléctricos (pI) de 6.52, 6,7 y 7.17 en las tres formas predominantes y todas ellas con un PM de 29 kDa,. Esta forma se ha medido en el plasma y muestra variaciones de acuerdo con la etapa reproductiva [Arámburo 1991],

Por otra parte, cuando se analizó la GH de pollo (cGH) por electrofresis no desnaturizante, se han identificado tres variantes de carga (0.23, 0.3 y 0,35) [Arámburo, 1989a], Cuando se incrementa la resolución utilizando isoelectroenfoque y Western blot es posible identificar de ocho a diez variantes de carga [Arámburo, 1990; Houston, 1988], algunas de las cuales parecen estar reguladas durante el desarrollo de estos animales [Arámburo, 2000; Houston, 1988],

Otra modificación postraduccional que contribuye a la heterogeneidad de carga en una proteína es la fosforilación, la cual le confiere características más acidas a la molécula [Arámburo, 1993], Existen evidencias sobre la existencia de formas fosforiladas de la GH en humanos, ratas, ovinos y pollos,. Se ha observado que la GH humana puede ser fosforilada por cinasas de tirosina en los residuos Tyr<sub>28 ó 35</sub> y Tyr<sub>42</sub> [Baldwin, 1983], En el pollo una proporción significativa de la hormona parece estar<sup>1</sup> fosforilada [Arámburo, 1989a], y las células de la hipófisis del pollo en cultivo primario pueden incorporar fosfato radioactivo a la banda inmunorreactiva a cGH cuya liberación es estimulada por<sup>1</sup> la hormona liberadora de la GH (GHRH) [Arámburo, 1990b], Además, estudios *in vitro* muestran que la hormona puede ser fosforilada por las cinasas de proteínas A y G. [Arámburo, 1990], En el salmón la incubación con fosfatasa alcalina resulta en un cambio de carga lo que sugiere la presencia de GH fosforilada [Skibeli, 1990],

## Efectos de la GH

La heterogeneidad molecular de la GH puede contribuir a explicar la diversidad funcional de la hormona. Así, se han descrito efectos metabólicos directos que facilitan el crecimiento muscular y la conservación de la glucosa, y efectos sobre el crecimiento esquelético que son parcialmente directos y parcialmente mediados por el factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I). Entre los primeros se incluyen: la estimulación de la lipólisis, captura y transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas, inhibición de la lipólisis estimulada por adrenalina o por glucagon, inhibición de la lipogénesis inducida por la insulina, inducción de la resistencia periférica a la insulina (efecto diabetógeno) y participación en la regulación de la absorción tubular de algunos iones. Por otra parte, estimula el crecimiento lineal del esqueleto participando en la diferenciación de los precondrocitos, y promueve la diferenciación de preadipocitos, mioblastos y posiblemente de gran variedad de tejidos, incluyendo la placa cartilaginosa de la epífisis [Arámburo, 1993]. En la siguiente tabla se enlistan en general algunos de los efectos que se le han atribuido a la GH,

Efectos fisiológicos de la GH

Efectos	Referencias
Crecimiento corporal directo e indirecto	Harvey, S. [59]
Liberación de IGF-I	Harvey, S. [59]
Mitogénesis en osteoblastos	Harvey, S. [59]
Adipogénesis (diferenciación)	Harvey, S. [59]
Angiogénesis	Gould, J. [51]
Diabetógeno	Harvey, S. [53]
Mantenimiento de la población celular del tejido linfático	Harvey, S. [53]
Estimulación del transporte de glucosa	Harvey, S. [53]
Lipólisis	Arámburo, C. [3]
Antipolítico inducido por glucagon	Arámburo, C. [3]
Antilipogénico	Harvey, S. [59]
Transporte de aminoácidos y síntesis de proteínas en músculo	Harvey, S. [59]
Produce un incremento en la masa muscular cardíaca, reduciendo la cámara del ventrículo izquierdo.	Lombardi, G. [76]
Modulación en la función reproductiva y maduración sexual	Harvey, S. [59]
Osmorregulación	Harvey, S. [59]
Estimula la liberación de insulina	Harvey, S. [59]
Influencia la tasa de producción de T3 circulante (inhibición de la actividad 5-D-III hepática en pollos)	Harvey, S. [59] Darras, V.M. [411]
Efecto neuroendocrino (autorregulación a través del hipotálamo)	Harvey, S. [59]
Neuromodulador y proliferación de neuronas y células guales	Harvey, S. [59]

## *Heterogeneidad molecular y funcional de la GH*

Se ha reportado especificidad de funciones para los distintos miembros de la familia de la GH. En humanos, se ha visto que la isoforma de 20 kDa presenta actividad biológica. Sin embargo, existe controversia en cuanto a la actividad biológica de esta forma reducida de la GH, por un lado porque las dosis utilizadas en los experimentos son farmacológicas y no fisiológicas y por otro porque la GH de 20 kDa utilizada para los estudios es de origen biosintético y hay que considerar que las pruebas no son homologas [Lewis 2000]. Aunque se propone que la variante de 20 kDa presenta menor afinidad por<sup>1</sup> el sitio 1 de unión al receptor que el monómero de 22 kDa [Wada, 1998], la afinidad para el sitio 2 de unión es mayor, por lo que se considera que son igualmente efectivas en estudios realizados con proteínas de unión [Uchida, 1999]. Esto es consistente con el hallazgo de afinidades equivalentes para ambas formas moleculares de la GH utilizando células de ovario de hámster (CHO) transfectadas con el receptor para la hGH [Wada, 1997] o incluso una mayor potencia para la variante de 20 kDa en experimentos *in vitro* con células Ba/F3-hGHR en las que se midió la expresión del RNAm del IGF-I [Yoshizato, 2000]. En cuanto a sus efectos somatogénicos existen algunas contradicciones, en estudios en ratas hipofisectomizadas parece ser menos activa que la forma de 22 kDa [Kosyo, 1987], sin embargo, en ratas con enanismo espontáneo o en ratas normales tratadas con ambas formas moleculares no se observan diferencias significativas en la ganancia de peso [Ishikawa, 2000]. Además, en un estudio *in vitro* utilizando células tumorales de glándula mamaria (T-47D) se observó que la variante de 20 kDa y la GH de 22 kDa mostraron efectos contrarios sobre la proliferación celular y síntesis de DNA [Fujikawa, 1998]. Reportes sobre los efectos metabólicos de la GH de 20 kDa muestran que presenta efectos diabetógenos, tipo insulina y lipolíticos en ratones e *in vitro*, utilizando la línea celular<sup>1</sup> de adipocitos 3T3-L1-hGHR, en la que se observó que la estimulación es mayor que con la GH de 22 kDa y que es un efecto dependiente de la expresión de genes posiblemente a través de la activación de la vía de las proteínas STAT [Asada, 2000].

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

En el pollo, al menos dos variantes de carga (Rf = 0,23 y 0,3) presentan diferente bioactividad en el metabolismo de lípidos: la 0,23 es esencialmente lipolítica, mientras que la 0,3 manifiesta una actividad antilipolítica [Arámburo 1989<sup>a</sup>, 1993]; sin embargo, ambas presentan una actividad somatotrópica equivalente [Arámburo, 1993],

La hGH-V es secretada a la circulación durante la gestación., En bioensayos sobre ganancia de peso en ratas hipofisectomizadas se ha observado que presenta la misma actividad que la hGH-N [MacLeod, 1991], y se sugiere que pueden unirse con la misma afinidad a los receptores somatogénicos porque la diferencia entre sus secuencias no afecta los sitios de unión, por lo tanto la interacción se lleva a cabo utilizando el mismo mecanismo molecular<sup>1</sup> [Coffin, 1996], Esta variante también se une a receptores de **PRL** y en algunos bioensayos se ha determinado su actividad mitogénica en células Nb2.. Sin embargo, sus efectos metabólicos parecen ser equivalentes de acuerdo con estudios *in vitro* sobre la oxidación de la glucosa y la lipólisis en tejido adiposo de rata [Nickel, 1990; MacLeod, 1991; Goodman 1991], Se piensa que es la responsable en parte de los efectos anabólicos y somatotrópicos en la unidad feto-placentaria y en el anabolismo materno de la segunda mitad de la gestación en la mujer [Hennen, 1987],

En cuanto a la GH-I y GH-II identificadas en los salmones se ha reportado que son biológicamente activas en estudios sobre ganancia de peso en truchas arcoiris inyectadas con diferentes dosis de estas hormonas [Kawachi, 1986; Yasuda, 1992; Yamaguchi, 1987],,

### **Mecanismo de acción de la GH**

El receptor de GH (GHR) pertenece a la superfamilia de receptores hematopoyetina/citocinas, en la que se encuentran también los receptores de la PRL, citocinas, interferón e interleucinas, entre otros., Se caracteriza por contener un dominio extracelular, un dominio membranal y uno intracelular

[Harvey, 1995, Cáter Su, 1996], Los GHR muestran heterogeneidad molécula: que también puede contribuir con la diversidad funcional de la GH. El GHR presenta modificaciones postraduccionales tejido-específicas como la glicosilación y ubiquitinación., Además, por edición alternativa se producen transcritos y proteínas de diferente tamaño., A través de estudios con anticuerpos monoclonales se han identificado subtipos de GHR en algunos tejidos, como el hígado y el tejido adiposo, y comparando la unión de estos receptores en dichos órganos con las formas 22 y 20 K de GH humana, se encontraron diferencias en su capacidad de unión [Harvey, 1995],

La GH se une secuencialmente a dos moléculas de su receptor, causando su dimerización y cambios estructurales importantes para la función de la hormona [Coffin, 1996]. Estos cambios generan la unión del GHR y una tirosina cinasa de la familia Janus (JAK2), promoviendo la fosforilación de ambos en los residuos de tirosina por la misma JAK2., Esto produce la asociación y activación de una cascada de proteínas, en la que participan las proteínas SHC, Grb2, posiblemente proteínas como Sos, Ras, Raf y posteriormente las cinasas de proteínas asociadas a microtúbulos, activadoras de la mitosis o reguladas por una señal extracelular (cinasas MAP/ERK) (Figura 5) [Scanes, 1995; Cáter Su, 1996]. Las proteínas Ras y Raf son proteínas codificadas por proto-oncogenes que han sido relacionados con la proliferación celular., La fosforilación de estas cinasas produce la activación de otras cinasas, fosfolipasa A2, proteínas del citoesqueleto y factores de transcripción como los conocidos de respuesta temprana Fos y Jun, que son factores de transcripción involucrados en el crecimiento y la diferenciación, y se relacionan con genes de respuesta tardía, Para la expresión de c-fos intervienen factores que se unen al ADN, como el factor de respuesta sérica (SRF) y el complejo de factores ternarios (TCF). La GH también induce la expresión de genes como c-myc que codifica factores de transcripción involucrados en la proliferación celular. La regulación de eventos metabólicos por GH refleja la expresión de genes específicos de cada tipo celular. En los adipocitos la GH participa en la expresión de enzimas lipogénicas y lipoproteínas a través de Fos., Asimismo, interfiere en la expresión de algunos de los transportadores de glucosa (GLUT 1) [Tai, 1990, Cáter

Su, 1996] y, en el hígado, en la manifestación del gen que codifica para IGF-I [CarterSu, 1996],

Se sugiere que a través de una vía directa y dependiente del tipo celular, en la que participa JAK2, la GH activa proteínas de la familia Stat, que son transductoras y activadoras de la transcripción,. Estas se unen a otras proteínas formando homodímeros y heterodímeros que se translocan al núcleo y se unen con el DNA, activando la transcripción de genes blanco. La GH estimula la expresión del gen Spi 2.1 -que codifica en el hígado para un inhibidor de una serina proteasa- con la intervención de un complejo proteínico que contiene una proteína Stat5 [Carter Su, 1996].

Una tercera vía de transducción de GH interviene en el efecto tipo insulina, es decir, en el aumento del transporte de glucosa por reclutamiento de GLUT 1 y 4 en la membrana [Yocóá, 2000]. En esta vía la GH y la insulina comparten moléculas señal como las proteínas llamadas "sustrato principal del receptor de insulina" (IRS). En respuesta a GH se fosforilan IRS-1 e IRS-2, y se piensa que esto se lleva a cabo a través de JAK2. En consecuencia, se activa la cinasa de fosfatidilinositol, que se sabe que aumenta el transporte de glucosa, la síntesis de DNA y la actividad de una enzima implicada en el ciclo celular llamada p70 15 kDa. También se conoce que esta cinasa interviene en la síntesis de lípidos dependiente de GH y en la lipólisis inducida por<sup>1</sup> ñor adrenalina [Carter Su, 1996],

En la señalización de respuesta a GH, se ha reconocido una cuarta vía: aquella en la que se activa una cinasa de proteína C (PKC) que se requiere en efectos como lipogénesis, expresión de c-fos, unión de proteínas nucleares a oligonucleótidos, incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular y activación de otras cinasas, La activación de la PKC ocurre mediante la unión del GHR a una proteína G, que a su vez se une a una fosfolipasa C y, en consecuencia, se produce diacilglicerol (DAG), que es un activador de la PKC, El incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular se produce por apertura en los canales tipo L activados por voltaje, y es importante en algunos efectos de la GH, como los tipo insulina, Otro efecto de GH que requiere el efecto permisivo de la PKC es la expresión de enzimas como el citocromo P450, que está involucrado en el metabolismo de



esteroides en ambos sexos e influido por las diferencias sexuales en la secreción de GH [Harvey, 1995; Cáster Su, 1996].

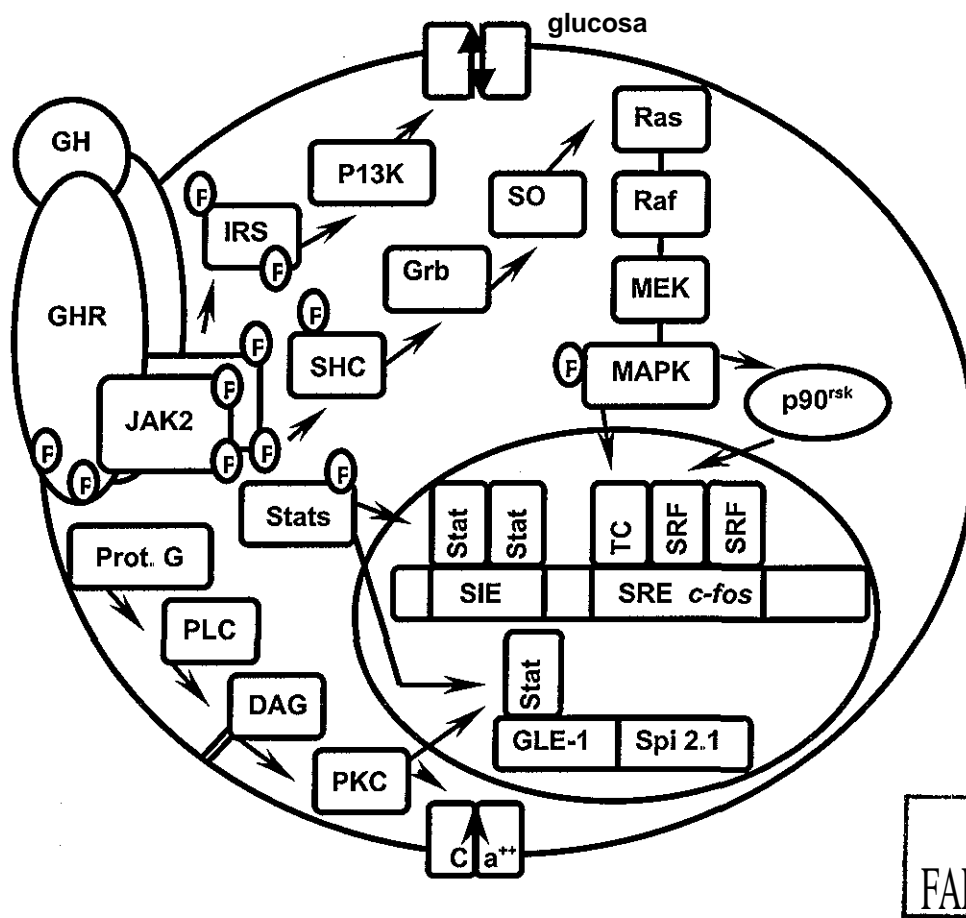


Figura 5, Mecanismo de acción de la GH [modificado de Carter-Su, 1996]

GH=hormona de crecimiento, GHR=receptor para la hormona de crecimiento, JAK2=tirosina cinasa de la familia Janus, SHC=proteínas de la familia Src-homólogas, Sos=proteínas "son of sevenless", MAPK=cinasas asociadas a microtúbulos, ERK=proteínas tirosifosforiladas dependientes de GH, MEK=ERK/MAP cinasas, TCFs=complejo de factores ternarios, SRF=factor de respuesta sérica, SRE=elemento de respuesta sérica, SIE=elemento inducible-sis, STAT=señal transductora y activadora de la transcripción, PLC=fosfolipasa C, DAG= diacilglicerol, PKC= proteína cinasa C, IRS=sustrato del receptor para insulina, Ras y Raf=proteínas producidas por protooncogenes.

## Regulación de la secreción de GH

Se sabe que la GH se sintetiza y almacena en los somatotropos de la adenohipófisis y sus niveles chollantes se modifican ante situaciones fisiológicas como: el crecimiento y desarrollo, la privación de alimento, la exposición al frío, el ejercicio, y durante el sueño de ondas lentas [Devesa, 1992].

La regulación de la liberación de la GH es un proceso multifactorial y dinámico que difiere entre las distintas especies y se modifica de acuerdo con el estado fisiológico del animal. Este complejo sistema que controla la síntesis y la secreción de la GH ha sido reportado a partir de estudios realizados principalmente en mamíferos, y se sabe que su patrón de liberación está influenciado por factores metabólicos, endocrinos, inmunes y nerviosos que participan a diferentes niveles de esta complicada red. Los neuropéptidos hipotalámicos como la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) y la somatostatina (SRIF) constituyen -en la mayoría de las especies estudiadas- las principales señales, estimulante e inhibitoria, de la secreción de GH. Muchos de los factores reguladores de GH ejercen su efecto en forma indirecta a nivel del hipotálamo controlando la liberación de estas dos hormonas hipofisiotrópicas (ver figura 6),

#### *Células secretoras de GH*

Originalmente la GH fue identificada a través de experimentos en los que observaron que al extraer la hipófisis, los animales jóvenes dejaban de crecer, Notaron también que al aplicar<sup>1</sup> extractos de esta glándula el déficit se revertía, al menos parcialmente [Gobman, 1991]. Actualmente, la GH se ha podido aislar de la hipófisis de la mayoría de los grupos de vertebrados y se sabe que la distribución de las células secretoras en la adenohipófisis difiere de acuerdo con la especie,

Las células más abundantes en la hipófisis son los somatotropos que se caracterizan por ser acidófilos, redondos, ovales o triangulares y de acuerdo con sus características ultraestructurales presentan un núcleo con heterocromatina, un nucléolo prominente y numerosos poros nucleares. El aparato de Golgi está bien desarrollado, especialmente en la región juxtaglomerular, el retículo endoplásmico presenta gran número de ribosomas libres y los granulos de secreción son grandes (260 a 400 nm de diámetro), electrodensos y ovoides [Mamad, 1993],

Los somatotropos en los mamíferos están ampliamente distribuidos por toda la glándula, mientras que en los vertebrados no mamíferos se encuentran distribuidos en regiones específicas, En particular, en las aves están

confinados en un 90% en el lóbulo caudal de la adenohipófisis., Se presentan en grupos de 4 a 15 células y se han observado diferencias en la intensidad de la tinción entre estos grupos, lo que puede indicar la presencia de isoformas de GH con diferente inmunorreactividad o diferencias en la actividad secretoria [Huí, 1993].

La distribución de las células hipofisiarias y la proliferación de los somatotropos están relacionados con la inervación neuropeptidérgica, la acción paradina de las hormonas hipofisiarias y con la irrigación de vasos sanguíneos que llegan de diferentes partes de la eminencia media y pueden liberar diferencialmente factores hipofisiotrópicos reguladores de la función de estas células [Havey, 1995].

La diferenciación de los somatotropos y su dimorfismo sexual están relacionados con la expresión del factor de transcripción llamado "factor GH 1" (GH-1) o "factor de transcripción específico de la hipófisis" (pit-1) que también es responsable de la diferenciación de los lactotropos y el mantenimiento de los tiotropos [Havey, 1995; González-Para, 1996]. Además de pit-1 la GHRH puede contribuir a la diferenciación de los somatotropos durante la vida postnatal; por un lado regula la expresión de pit-1 a través de la producción de AMPc y esta expresión está asociada con la expresión del gen que codifica para el receptor de la GHRH [Havey, 1995].

Además, el número y tamaño de los somatotropos así como el de los granulos de secreción están regulados por<sup>1</sup> factores endocrinos y ambientales., Se ha mostrado que cambian durante la ontogenia; en la etapa fetal se pueden identificar a partir de los 12 días embrionarios en el pollo, conforme se acerca el día de la eclosión aumenta el número de somatotropos y el tamaño de los granulos de secreción, posteriormente se observan en gran número en las primeras etapas del desarrollo, con un incremento máximo entre la 5<sup>a</sup> y 11<sup>a</sup> semana de edad, y se reduce en animales viejos [Mamed, 1993, Mamed, 1997]. Por otro lado, también se piensa que las variaciones detectadas por el dimorfismo sexual (los machos presentan mayor número de células que las hembras) y durante el proceso reproductivo están relacionados con los cambios de las hormonas sexuales e hipotalámicas de la vida fetal y postnatal [Havey, 1995].

Dentro de los factores neuroendocrinos relacionados con la proliferación de los somatotropos diferenciados se encuentra la GHRH. Se ha observado en ratas que este neuropéptido estimula la expresión del protooncogen c-fós, que es indicador de proliferación celular y dependiente de AMPc [Billestrup, 1987]. El receptor a la GHRH está asociado a proteínas  $G_s$  y en su subunidad  $\alpha$  se han encontrado mutaciones en el 10-40% de los tumores de células hipofisarias. Normalmente el efecto de la GHRH sobre la proliferación de somatotropos está relacionado con la activación de las MAP cinasas vía  $G_s\alpha$ -AMPc-PKA; sin embargo, existen evidencias de que el GHRH puede activar<sup>1</sup> estas MAP cinasas a través de las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas  $G_s$  que activan una vía dependiente de proteínas Ras [Pombo, 2000]. La T3 también estimula la proliferación de estas células y produce cambios en los organelos relacionados con el aumento en la síntesis y secreción de GH. Se piensa que es un efecto dependiente de glucocorticoides y de la expresión de pit-1 [Buhm, 1994].

La propia GH puede regular la proliferación de los somatotropos. Se ha observado que como consecuencia de la sobreproducción de GH en ratones transgénicos los somatotropos son menos abundantes, pequeños y con un desarrollo pobre del retículo endoplásmico rugoso [Stefaneanu, 1993].

La sensibilidad de los somatotropos a los diferentes factores hipofisiotrópicos puede cambiar de acuerdo con la etapa fisiológica del animal lo que explica en parte los cambios en la concentración de GH circulante. En pollos se ha estudiado el efecto de dos secretagogos, como son el GHRH y el TRH, durante la ontogenia en concentraciones equimolares y se observó que la potencia del TRH disminuye en pollos adultos mientras que la del GHRH se mantiene [Harvey, 1984].

De acuerdo con su heterogeneidad en tamaño, forma, densidad y ultraestructura, algunos autores proponen que existen diferentes subpoblaciones de somatotropos. Sin embargo, puede tratarse de diferentes etapas de diferenciación, distribución o actividad secretora de las células. Estos cambios morfológicos pueden reflejar diferencias moleculares en la síntesis de la GH, en los receptores a los factores reguladores y en los mecanismos de transducción de la señal intracelular.

En ratas se han dividido a los somatotropos de manera arbitraria en 3 subpoblaciones de células de acuerdo con cambios funcionales y estructurales., Las llamadas células Tipo 1 tienen los granulos de secreción de 350 nm de diámetro y están ampliamente distribuidas; las tipo II contienen granulos pequeños de 100 a 300 nm y las tipo III granulos de secreción menores de 150 nm de diámetro. La distribución de los tipos celulares presenta dimorfismo sexual, ya que en machos representa el 68, 22 y 10 % y en hembras el 44,47 y 9 % en hembras., Sin embargo, esta proporción cambia de acuerdo con la edad también., Los tipos celulares pueden estar influenciados por diferentes factores como los andrógenos que promueven la proliferación de los tipo I, mientras que los estrógenos su disminución [Harvey, 1995]. Las distintas subpoblaciones pueden ser funcionalmente diferentes y tener diferente sensibilidad a factores como la GHRH, el IGF-I y la SRIF. En cerdos se han aislado dos subpoblaciones de somatotropos empleando un gradiente de Percoll. Estas subpoblaciones celulares se identifican como de alta (HD) y baja (LD) densidad; presentan diferencias ultraestructurales y funcionales ante el estímulo de la GHRH y análogos de segundos mensajeros como el AMPc. Los somatotropos de alta densidad parecen contener un reservorio de hormona, mientras que los de baja densidad liberan la GH en forma continua [Castaño, 1996]. También pueden reflejar diferencias en la transducción de la señal intracelular, Por ejemplo, el 9% de los somatotropos en la rata no presenta actividad de la PKC relacionada con la proliferación celular. Es posible que este 9 % de somatotropos no tengan capacidad de proliferar, Por otra parte, también la comunicación intercelular puede estar relacionada con el tipo celular, se sabe que algunos factores como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) facilita la agregación de somatotropos con otros tipos celulares *in vitro* [Harvey, 1995]

Además de los somatotropos, la GH se sintetiza también en células secretoras de prolactina de humanos, ratas, ratones, murciélagos, borregos, vacas y ranas., En este tipo de células se han identificado características morfológicas semejantes a los somatotropos y lactotropos. En la regulación de la proliferación de estas células participan las hormonas esteroideas, como la

testosterona que inhibe la proliferación mientras que los estiógenos la estimulan [Bockfor 1986],

Recientemente se ha identificado en la región ventral de la adenohipófisis de pollos la síntesis de GH en células secretoras de TSH, [Stirling 1997],

### *GH extrahipofisiaria*

Con trabajos como los de Kyle y colaboradores [1981], que identificaron moléculas parecidas a la GH en tejidos como el hígado, riñón, pulmón, músculo estriado, colon, estómago y cerebro de humanos, a partir de estudios de paralelismo por radioinmunoensayo e inmunocitoquímica, se planteó la posibilidad de que la GH fuera sintetizada localmente y pudiera ejercer un efecto paracrino, autocrino o intracrino. En los últimos años se han identificado sitios extrahipofisiarios en los cuales se sintetiza la GH tales como: poblaciones neuronales hipotalámicas y extrahipotalámicas del sistema nervioso central [Render, 1995], células epiteliales de la glándula mamaria, gónadas de ambos sexos [Hull, 2000; Lira, 2000], células endoteliales de vasos sanguíneos, fibroblastos, células epiteliales del timo, células del sistema inmune que incluyen a los macrófagos y linfocitos de diferentes tipos [Wu 1996; Liu, 1997], y en algunos tejidos embrionarios en pollos desde los 3 días de desarrollo [Havey, 2000]. La presencia de GH en estos tejidos se ha confirmado con la identificación del RNAm en extractos de tejido y por hibridación *in situ*. Se sugiere que la producción local de GH es regulada por mecanismos independientes a los de la GH hipofisiaria, que responden a necesidades propias del tejido que la produce [Weigent, 1991; Lanning-van Leeuwen, 1999] y se ha observado que la GH inmunorreactiva no se modifica por efecto de la hipofisectomía en algunos extractos de tejido como el cerebro [Ramesh, 2000].

Se sabe poco de los efectos específicos de esta GH local, sin embargo, por su distribución en diferentes núcleos del hipotálamo y regiones adyacentes se piensa que la GH extrahipofisiaria podría influenciar el comportamiento social del animal, el consumo de alimento, funciones del sistema nervioso autónomo y la reproducción [Ramesh, 2000]. Existen evidencias de que la hormona madura sintetizada en tejidos como el cerebro, bazo, timo y bolsa de fabricación en pollos es igual en tamaño y antigenicidad que la hormona

hipofisiaria, así como el RNAm que presenta un alta homología y sitios de coite por las enzimas BamHI y RsaI equivalentes al de la hipófisis [Render, 1995<sup>ab</sup>]. Algunos autores han identificado en tejidos como el hipotálamo y sistema inmune el predominio de la forma dímica utilizando un anticuerpo policlonal cccGH [Render, 1995<sup>a</sup>]. Sin embargo, Luna y colaboradores (2000) han identificado recientemente por western blot que la forma molecular predominante de GH en tejidos como testículo y bolsa de fabricio en pollos es un fragmento de 16 kDa, Para esta inmunodetección utilizaron un anticuerpo policlonal cccGH purificado en una columna de afinidad empleando cGH recombinante como inmunoabsorbente, lo que sugiere que la proteína de 16 kDa corresponde con un fragmento de la GH monomérica.,

### *Síntesis y secreción*

Los factores reguladores de la síntesis y secreción de la GH actúan a nivel del hipotálamo o de la hipófisis., La secreción de ésta hormona tiene un comportamiento pulsátil observado en todas las especies estudiadas y los tejidos blanco son más sensibles a la frecuencia que a la cantidad secretada en un periodo similar; un pulso de secreción de GH está controlado por la rítmica liberación alternada de GHRH y SRIF. [Devesa, 1992]. La secreción de GH muestra ritmos circádicos y ultradianos, sujetos a variaciones de acuerdo con el estado nutricional, la composición del cuerpo, el metabolismo, el dimorfismo sexual y la edad [Miller, 1999].

Este patrón intrínseco del ritmo hipotálamo-somatotropos puede ser modificado por algunos neurotransmisores, hormonas y metabolitos intermediarios (ver figura 6),. Se sabe que hormonas como los esteroides, los glucocorticoides, las hormonas tiroideas y otras participan en la regulación de los picos de secreción observados en diferentes organismos., Sin embargo, se cree que la frecuencia y la amplitud de estos picos de secreción están directamente relacionados con el efecto del GHRH y la SRIF sobre los somatotropos [Miller, 1999].

La ñor adrenalina, acetilcolina, dopamina, histamina, serotonina y algunos neuropéptidos, como los péptidos opioides, la galanina y el neuio péptido Y

participan en la liberación de GH a través de la regulación del efecto de los factores hipofisiotrópicos (ver figura 6) [Devesa, 1992].

La GHRH se produce en neuronas localizadas en el núcleo arqueado, las cuales expresan receptores para SRIF que inhibe la síntesis de GHRH [Bertherat, 1995]. Contrariamente, las neuronas del área periventricular del hipotálamo anterior secretan SRIF y son estimuladas por la GHRH [Águila, 1987]. La SRIF inhibe su propia síntesis por un mecanismo de retroalimentación ultracorta [Águila, 1998]. Esta interacción entre los péptidos parece ser<sup>1</sup> la responsable de la secreción episódica de la GH. Sin embargo, estos factores hipotalámicos están sujetos a modulación por otros péptidos hipotalámicos y por una compleja red de neurotransmisores que funcionan como intermediarios entre las influencias metabólicas, endocrinas, neurales e inmunológicas, y la liberación de la GH [Harvey, 1995]. Un ejemplo de esto es que en el hipotálamo la galanina se colocaliza con la GHRH en neuronas de los núcleos arqueado, periventricular, paraventricular y supraóptico. Este neurotransmisor actúa como estimulante de la secreción de GH potenciando el efecto de la GHRH. En ratas se ha observado que en ausencia de galanina disminuye la amplitud y aumenta la frecuencia de los picos de secreción de GH, por esto se piensa que contribuye junto con la GHRH al control de la secreción pulsátil de esta hormona [Bluet-Pajot, 1998]. Posiblemente, la galanina también participa en el dimorfismo sexual de la secreción de GH porque se ha observado que los niveles de estrógenos y testosterona influyen la síntesis de galanina en neuronas productoras de GHRH [Delemare-van de Waa, 1994].

Otro péptido hipotalámico identificado en el núcleo arqueado, paraventricular y periventricular es el neuropéptido Y (NYP). Este péptido también influye los niveles de GH; neuronas con NYP presentan contacto sináptico con las neuronas de SRIF y que inyecciones cerebroventriculares de NPY bloquean la secreción de GH. Este péptido inhibe la secreción de GH a través de estimular la secreción de SRIF, porque no se observa un efecto directo sobre la hipófisis [Bluet-Pajot, 1998]. Algunos autores sugieren que el efecto de NPY sobre las neuronas de SRIF está regulado por la misma GH, por lo



que se plantea que éste sería uno de los mecanismos utilizados por la GH en la retroalimentación negativa [Minni, 1998].

Dentro de los mecanismos periféricos más importantes en la regulación de la GH se encuentra la retroalimentación negativa de asa larga en la que participa el IGF-I. Este factor produce un incremento en el RNAm de la SRIF y la disminución del RNAm de la GHRH a nivel hipotalámico. El IGF-I también actúa directamente sobre la hipófisis y se propone que reduce la exocitosis y el procesamiento postraducciona l de la GH [Mullen 1999].

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

Otras hormonas que intervienen en el control de la transcripción del gen de GH y su secreción son los glucocorticoides, los cuales tienen un efecto estimuladorio. En estudios *in vitro* se ha mostrado que el efecto de los glucocorticoides sobre la síntesis de GH es dependiente de HT. También afectan la expresión del gen del receptor de GHRH incrementando el RNAm mientras se observa una disminución en los niveles de RNAm del receptor de SRIF. Sin embargo una exposición prolongada a glucocorticoides produce el efecto contrario en la expresión de estos receptores. Como ya se mencionó antes, el patrón de secreción de GH es específico para cada sexo, se sabe que durante la maduración, los esteroides sexuales participan modulando GHRH y SRIF en el hipotálamo y afectando la respuesta de la hipófisis a estos

reguladores a través de la expresión de sus receptores [Devesa, 1992; Argente, 1994; Bluet-Pajot, 1998],

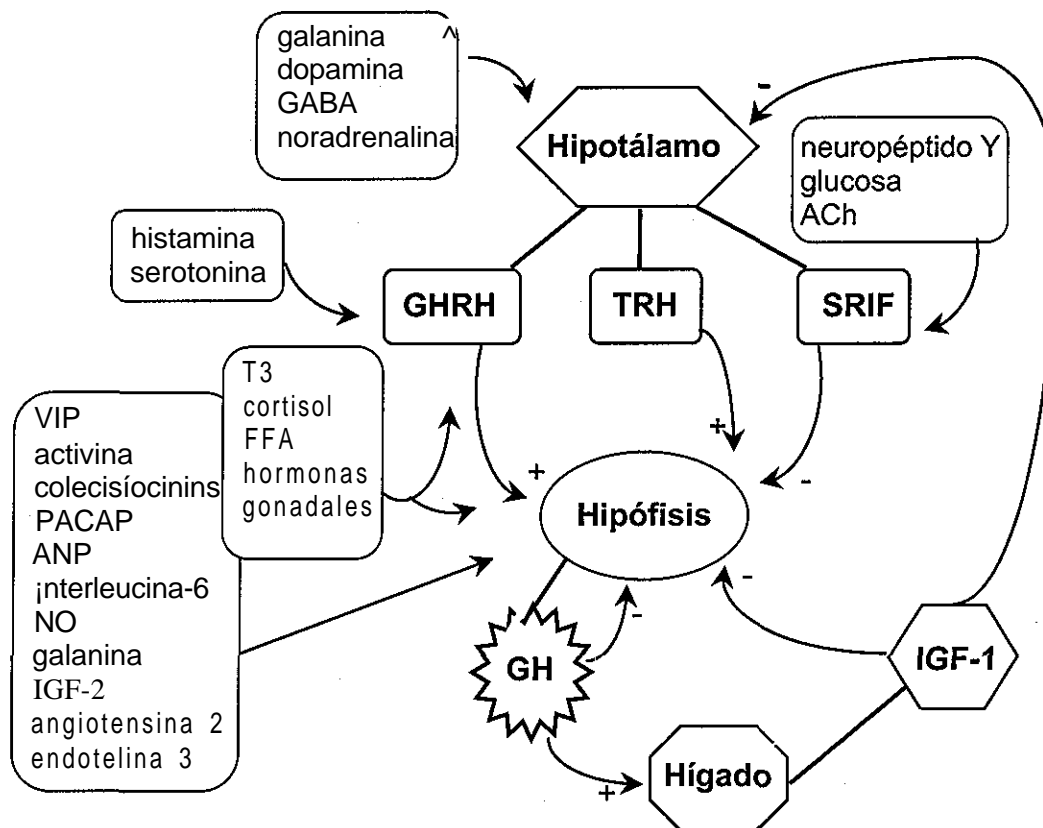


Figura 6. Regulación de la secreción de GH en aves  
 GHRH=hormona liberadora de la hormona de crecimiento, SRIF=somatostatina, TRH=Hormona liberadora de la tirotopina, Ach=acetilcolina, GABA=ácido gama amino butírico, T3=triyodotironina, FFA=ácidos grasos libres, GH=hormona del crecimiento, IGF-1 =factor de crecimiento insulinoide tipo 1, VIP=péptido intestinal vasoactivo, PACAP=péptido hipofisiario activador de la adenilato ciclasa, ANP=péptido atriai natriurético, NO=óxido nítrico, IGF-2=Factorde crecimiento insulinoide tipo 2.

Se ha propuesto un mecanismo de regulación por GH llamado de asa ultracorta, en el que se supone un efecto inhibitorio de la hormona sobre su propia secreción., También puede estar mediada por factores paracrinicos extrasomatotrópicos, por ejemplo, a través de las IGF que se producen en la hipófisis en respuesta a GH, y que inhiben la liberación de la hormona y la transcripción del gen de GH, tanto en condiciones básales como inducidas por GHRH. Además, la GH sistémica disminuye su propia secreción basal o

estimulada independientemente de cambios en otras hormonas o metabolitos inhibitorios, como la glucosa o los ácidos grasos libres., Se piensa que este efecto puede ocurrir por inhibición de los receptores a GHRH y TRH, por aumento de los receptores a SRIF, por la combinación de ambos en las membranas somatotrópicas o por daño en la señal de transducción. La GH sistémica también regula su secreción a través de su efecto sobre los niveles de otras hormonas, como los IGF hepáticos [Havey, 1995; Bluet-Pajot, 1998].

### *Mecanismo de acción de los factores reguladores*

Los péptidos sintéticos liberadores de GH no utilizan el mismo mecanismo que GHRH; se ha reportado que estos secretagogos se unen a un receptor con siete dominios transmembranales que se expresa en el hipotálamo y se confirma que son entidades completamente distintas al de la GHRH.

El efecto de la GHRH sobre los somatotropos depende del incremento en el AMPc y de  $Ca^{2+}$ , La cascada de señalización desencadenada por el incremento del AMPc provoca la apertura de canales de  $Na^+$ , produciendo la despolarización de la membrana y en consecuencia se favorece la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje [Peterssen, 2000]. En cuanto a la participación del  $Ca^{2+}$  intracelular, los resultados en diferentes trabajos resultan contradictorios., Algunos autores han observado la activación de la vía de la fosfolipasa/fosfato de inositol (PL/IP) y con esto la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular [Havey, 1995]. Además, expresión del gen de GH depende de distintos factores de transcripción activados vía AMP cíclico. La GHRH y la SRIF tienen un efecto antagónico sobre los niveles intracelular es del AMPc a través de la activación de proteínas Gs y Gi, respectivamente., La activación de Gs permite la disociación de la subunidad  $\alpha$  y, en consecuencia, la estimulación de la adenilato ciclasa. El AMPc estimula a la cinasa de proteína A (PKA), permitiendo la disociación de la subunidad catalítica que se transloca al núcleo y fosforila el factor de transcripción CREB (proteína que se une a elementos de respuesta al AMPc), el cual activa la transcripción de los genes *c-fos* y Pit-L Este último activa la expresión del gen de GH y del receptor<sup>1</sup> de GHRH (ver figura 7) [Bertherat, 1995]. Además, se ha observado que el efecto de la GHRH sobre la proliferación de los somatotropos es vía la

activación de las MAP cinasas a través de las subunidades  $\beta$  y de una proteína Gs y es independiente de la vía de la adenilato ciclasa,

Durante la regulación de la secreción de la GH se activa la vía de la adenilato ciclasa que vía el AMPc fosforila y activa a la cinasa de proteína A, en consecuencia se producen rearrreglos en el citoesqueleto que permiten la fusión de las vesículas de secreción,. Como consecuencia de la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  se despolariza la membrana y se abren canales de  $\text{Ca}^{++}$  dependientes de voltaje, lo que permite la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  indispensable para la liberación de la GH,. Posteriormente se activa la ATPasa de  $\text{Ca}^{4in}$  que restaura los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular,. Además de esta vía se ha observado en los somatotropos la activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$  en respuesta a la GHRH, en consecuencia se produce la movilización de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular desde el retículo endoplásmico a través de la apertura de canales de  $\text{Ca}^{++}$  por la unión del trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) y la fusión de las vesículas de secreción por la activación de la proteína cinasa C activada por diacilglicerol y el ácido araquidónico,. La inhibición de este proceso está dada principalmente por la SRIF a través de la unión al receptor,. La SRIF es capaz de inhibir a través de una proteína  $\text{Gi}$  la formación de AMPc y la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  y como consecuencia la secreción de GH,. En la figura 8 se muestra un modelo de la activación de las señales intracelular es involucradas en la liberación de la GH [Harvey, 1995].

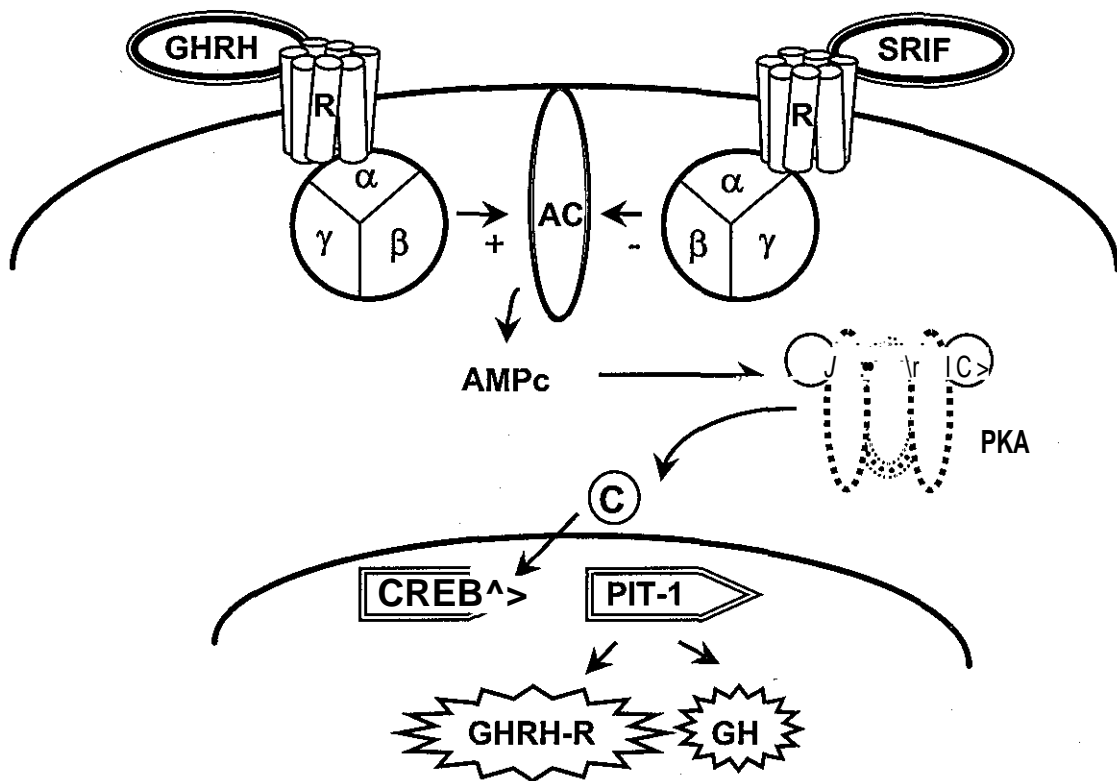


Figura 7. Modelo teórico de transducción para la expresión del gen de GH en el somatotrofo [adaptado de Bertherat, 1995]  
 GHRH=hormona liberadora de la hormona de crecimiento, SRIF=somatostatina, R=receptor, α, β y γ=subunidades de una proteína G, AC=adenilato ciclasa, PKA=proteína cinasa A, C=subunidad catalítica de PKA, CREB=elemento de respuesta de unión a proteína-AMPc, GHRH-R=receptor a GHRH, GH=hormona de crecimiento,

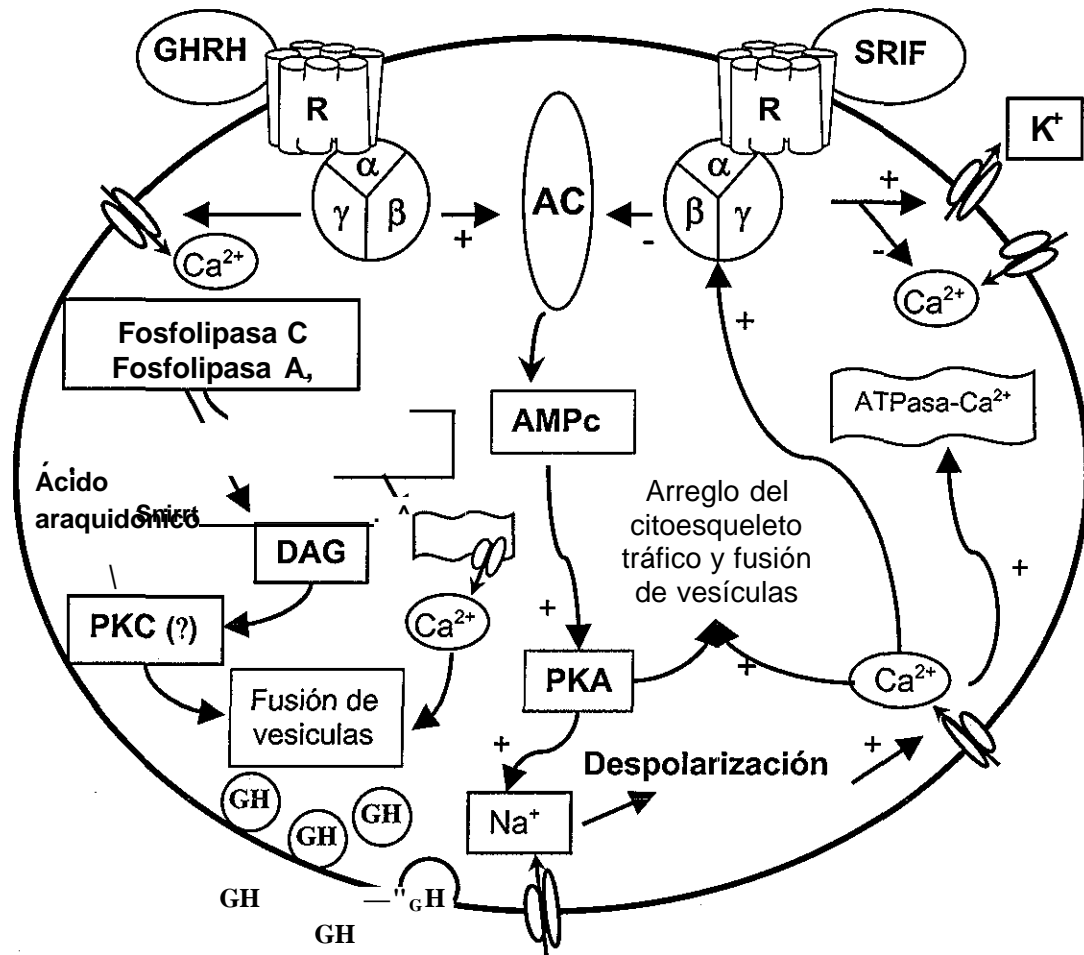


Figura 8, Modelo teórico de transducción para la secreción de GH en el somatotrofo  
 GHRH=hormona liberadora de la hormona de crecimiento, SRIF=soatostatina, R=receptor,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ =subunidades de una proteína G, IP3=trifosfato de inositol, PKA=proteína cinasa A, PKC=proteína cinasa C, DAG=diacilglicerol, AC=adenilato ciclasa, GH=hormona de crecimiento.

### *Regulación de la secreción de las variantes moleculares de la GH*

La familia de hormonas de crecimiento son producidas y secretadas por la hipófisis y otros tejidos como se ha venido mencionando. Sin embargo, aunque se sabe poco del papel de esta familia de hormonas, existen datos que sugieren una regulación diferencial. En el embrión de pollo se ha podido detectar actividad somatotrópica en la adenohipófisis a partir de 15 días de incubación, así como la presencia de GH circulante poco tiempo después [Enemar, 1967; Harvey, 1979]. La concentración de la cGH circulante se incrementa progresivamente a partir del día 17 de incubación, para el día 1 a 3 de edad posteclosión la concentración aumenta hasta 315% [Harvey, 1979], alcanzando su máxima concentración a las 4 semanas de edad. Se ha reportado que el patrón de variantes de masa en la adenohipófisis es diferente en distintas etapas del desarrollo. Por ejemplo, la forma de 15 kDa representa 13,7% del contenido de GH en hipófisis de embriones de 18 días, comparado con 4,8% a las 4 semanas de edad y 1,2% en adultos. Asimismo, se observó que la proporción de formas de alto peso molecular, como la de 88 kDa, es mayor a medida que avanza la edad, y están muy poco representadas en la etapa embrionaria (5% en embriones de 18 días y 17,9% en pollos de 4 semanas de edad). Esto sugiere que las variantes están sujetas a algún tipo de regulación dependiente del estadio de desarrollo del animal, y por ello, aunque se reporta que la GH no participa en el desarrollo prenatal se plantea que las variantes de GH pueden estar desempeñando papeles específicos en distintas etapas del desarrollo [Arámburo, 2000].

Existen otras evidencias sobre la importancia fisiológica de las variantes de GH, como los reportes sobre los niveles de los RNAm de las variantes GH-V2 y el PL-A2 que retienen el intrón D, que se incrementan con relación a la progresión de la gestación hasta el parto [McLeod, 1992]. Estas variantes también se expresan en el testículo humano y se piensa que están involucradas en la regulación de la fertilidad masculina [Untergasser, 1997].

Los niveles de la hGH-N en la mujer gestante disminuyen progresivamente hasta ser indetectables durante la segunda mitad del embarazo, mientras que la hGH-V aparece a la mitad de la gestación y se

incrementan sus niveles circulantes hasta el término de ésta., Después del parto desaparece del suero en 1 hora aproximadamente. Se piensa que esta variante de la GH sustituye a la hipofisiaria en las funciones metabólicas de la segunda parte del embarazo [Frankenne, 1988].

Recientemente se observó que la forma de 20kDa de la hGH-N se encuentra en la circulación en los mismos niveles que la forma de 22kDa, en pacientes con acromegalia y sujetos sanos., Al parecer ambas variantes moleculares se encuentran bajo el mismo control regulatorio [Tushima, 1999,2000], Sin embargo, existen reportes sobre el incremento en la proporción de la forma de 20 kDa durante el ejercicio prolongado [Dore, 1991<sup>ab</sup>].

Otras hormonas de la misma familia como la somatolactina, lactógenos placentarios y prolactina muestran formas glicosiladas y no glicosiladas al igual que la GH., Existen algunos reportes del papel fisiológico de estas isoformas, En la prolactina se han reportado cambios en la proporción de las formas glicosiladas y no glicosiladas durante la gestación en los cerdos y durante el ciclo reproductivo en pavos [Bédécarrats, 1999, Sinha, 1990], Se sugiere que la glicosilación de este tipo de hormonas juega un importante papel en la interacción con el receptor. Por un lado se plantea la posibilidad de que una y otra forma activen señales intracelulares distintas o simplemente representa una forma que al aumentar la vida media en la circulación se encuentra participando en aumentar el reservorio de hormona en situaciones fisiológicas particulares. También se han reportado dos formas moleculares de prolactina (PRL 177 y 188) en tilapias que cambian su proporción durante el ciclo reproductivo. Estos datos sugieren que las distintas variantes de la GH pueden jugar un papel importante en la regulación de los efectos de la GH.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La GH promueve una variedad de funciones en prácticamente todas las células de los vertebrados. Los mecanismos moleculares a través de los cuales se realizan dichas funciones pueden estar relacionados con las diferentes variantes moleculares. Está demostrado que la GH presenta diversas isofórmulas identificadas en la hipófisis, circulación, placenta y otros tejidos como los del sistema inmune. Hasta ahora la mayoría de las variantes estudiadas parecen ser biológicamente activas, aunque la potencia o la afinidad por el receptor pueden ser diferentes a las del monómero. La forma de 20 kDa de la hGH, por ejemplo, presenta un reducido efecto tipo insulina mientras que su actividad diabética y somatogénica son equivalentes a las de la forma de 22 kDa. En las aves se han identificado diversas formas que pueden ser producto de modificaciones postraduccionales: se reconocen variantes de carga y de masa en hipófisis y en el plasma, lo que sugiere que están siendo secretadas a la circulación. Dentro de las variantes de carga se han identificado efectos antagónicos sobre la lipólisis al comparar dos isofórmulas, es decir que al menos en un caso se ha observado especificidad de función. Por otra parte, al igual que otras hormonas de la misma familia como es el caso de la PRL, la proporción de las diferentes variantes de GH cambian de acuerdo con el estado fisiológico del animal. En el caso particular del pollo se observó que la concentración relativa de las variantes de masa de GH cambia durante la ontogenia.

Estos hallazgos sugieren que las variantes moleculares de la GH juegan un papel importante en la fisiología de la hormona y que la síntesis o secreción de las distintas formas moleculares responden a cambios fisiológicos en el

organismo y por lo tanto a mecanismos de regulación específicos. Las formas moleculares producidas en la hipófisis al igual que el monómero, entonces pueden estar<sup>1</sup> sujetas a una regulación hipotalámica diferencial. Se ha demostrado que la GHRH es un potente secretagogo de la GH, sin embargo, no existen reportes acerca de su efecto sobre las distintas formas de GH.

## HIPÓTESIS GENERAL

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<sup>1</sup> diferentes actividades biológicas y por ende, pueden catalogarse como entidades hormonales discretas.

## HIPÓTESIS PARTICULAR

Si las variantes tienen distintas actividades, entonces la síntesis y/o secreción de cada una debe estar regulada de manera diferencial, Las variantes moleculares de la GH son reguladas diferencialmente por una compleja red en la que intervienen los factores hipotalámicos como la GHRH.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar si la secreción de las variantes moleculares de la cGH se encuentra bajo un control regulatorio diferencial, analizando el efecto de la GHRH y la TRH sobre la liberación de las isoformas de GH, en dos sistemas *in vitro*, En un primer modelo se mantuvieron las relaciones anatómicas de la glándula hipófisis y la influencia fisiológica del animal. En el segundo modelo se observó la respuesta directa de las células hipofisiarias.

organismo y por lo tanto a mecanismos de regulación específicos. Las formas moleculares producidas en la hipófisis al igual que el monómero, entonces pueden estar<sup>1</sup> sujetas a una regulación hipotalámica diferencial. Se ha demostrado que la GHRH es un potente secretagogo de la GH, sin embargo, no existen reportes acerca de su efecto sobre las distintas formas de GH.

## HIPÓTESIS GENERAL

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<sup>1</sup> diferentes actividades biológicas y por ende, pueden catalogarse como entidades hormonales discretas.

## HIPÓTESIS PARTICULAR

Si las variantes tienen distintas actividades, entonces la síntesis y/o secreción de cada una debe estar regulada de manera diferencial, Las variantes moleculares de la GH son reguladas diferencialmente por una compleja red en la que intervienen los factores hipotalámicos como la GHRH.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar si la secreción de las variantes moleculares de la cGH se encuentra bajo un control regulatorio diferencial, analizando el efecto de la GHRH y la TRH sobre la liberación de las isoformas de GH, en dos sistemas *in vitro*, En un primer modelo se mantuvieron las relaciones anatómicas de la glándula hipófisis y la influencia fisiológica del animal. En el segundo modelo se observó la respuesta directa de las células hipofisiarias,.

organismo y por lo tanto a mecanismos de regulación específicos. Las formas moleculares producidas en la hipófisis al igual que el monómero, entonces pueden estar<sup>1</sup> sujetas a una regulación hipotalámica diferencial. Se ha demostrado que la GHRH es un potente secretagogo de la GH, sin embargo, no existen reportes acerca de su efecto sobre las distintas formas de GH.

## HIPÓTESIS GENERAL

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<sup>1</sup> diferentes actividades biológicas y por ende, pueden catalogarse como entidades hormonales discretas.

## HIPÓTESIS PARTICULAR

Si las variantes tienen distintas actividades, entonces la síntesis y/o secreción de cada una debe estar regulada de manera diferencial, Las variantes moleculares de la GH son reguladas diferencialmente por una compleja red en la que intervienen los factores hipotalámicos como la GHRH.

## OBJETIVOS

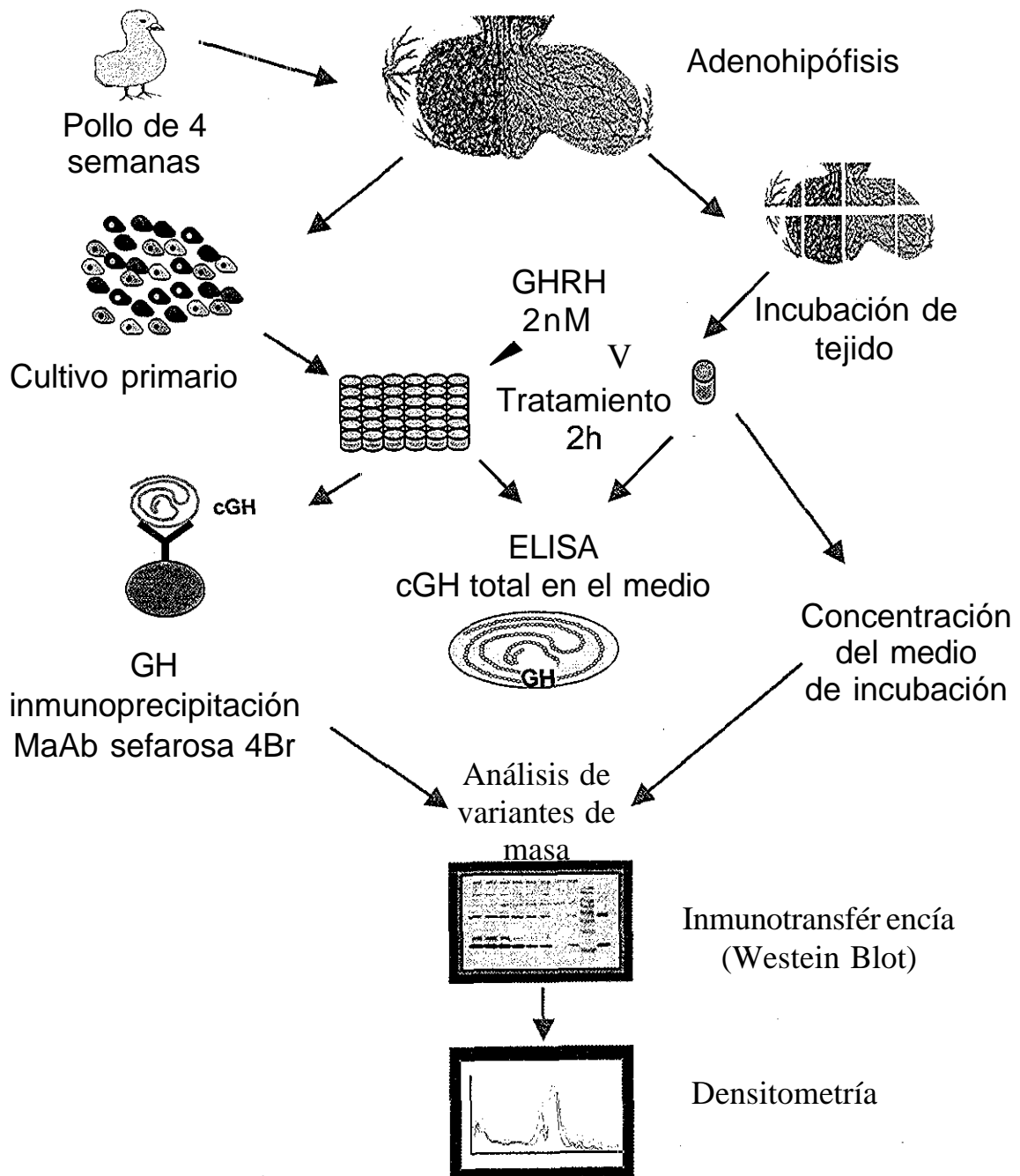
### OBJETIVO GENERAL

Estudiar si la secreción de las variantes moleculares de la cGH se encuentra bajo un control regulatorio diferencial, analizando el efecto de la GHRH y la TRH sobre la liberación de las isoformas de GH, en dos sistemas *in vitro*, En un primer modelo se mantuvieron las relaciones anatómicas de la glándula hipófisis y la influencia fisiológica del animal. En el segundo modelo se observó la respuesta directa de las células hipofisiarias.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Optimización de los procedimientos analíticos para la determinación de la cGH y sus variantes moleculares secretadas en dos sistemas de estudio *in vitro*: el cultivo de hipófisis completas y el cultivo primario de células hipofisiarias de pollo.,
- II. Análisis de las variantes moleculares de la cGH *in vitro*, empleando cultivo primario de pituicitos y cultivo de hipófisis completas de pollo macho de 4 semanas de edad, tratados con TRH y GHRH.
- III. Análisis del efecto de análogos de segundos mensajeros en la transducción de señales: 8-bromo AMPc; ionóforo de calcio, esteres de forbol y su efecto sobre la liberación de variantes moleculares de GH en células dispersas.,

# DISEÑO EXPERIMENTAL



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ANIMALES

Se utilizaron pollos de engorda de 4 semanas de edad, machos, raza Avian obtenidos en Querétaro de las granjas RAOT's asociadas a Pilgrim's Pride de México. Fueron mantenidos en el laboratorio durante 1 día con agua y alimento *ad libitum*.

### ESTUDIO DE HIPÓFISIS COMPLETAS *IN VITRO*

#### **Incubación de adenohipófisis completas:**

La hipófisis anterior se obtuvo inmediatamente después de la decapitación, se pesó y se cortó. Se llevaron a cabo 2 tipos de experimentos: En el primer tipo se incubaron medias hipófisis cortando a la mitad los lóbulos anterior y posterior por la línea media, y en el segundo, se utilizaron glándulas completas fraccionadas en 4 partes., En su caso, las glándulas o las hemihipófisis se colocaron en tubos de cultivo (Nalge de polipropileno de 13 X 30 mm) con 300  $\mu$ l de solución salina Earle normal (SEEN) y se incubaron a 37°C en un baño de agua con agitación continua durante 30 minutos, Posteriormente, se cambió la solución por nueva con los diferentes tratamientos, se sellaron los tubos y se incubaron con 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> durante 2 horas., Al término de la incubación se recolectó el medio y el tejido por separado y se guardó a -70°C hasta su análisis.

El ajuste dosis respuesta se realizó con la ecuación de Hill:

$$S_{GHRH} = S_{max} \times [GHRH]^n / ([GHRH]^n + EC_{50}^{nH}),$$

donde  $S_{GHRH}$  es la secreción dependiente de la dosis de cGH,  $S_{max}$  es la liberación máxima de cGH,  $EC_{50}$  es la mitad de la concentración de GHRH y  $nH$  es el número de Hill.

### **Experimentos con los secretagogos**

Los tratamientos utilizados fueron: diferentes dosis de GHRH (0.2, 1, 2, 5, 10, 15 y 20 nM) y como control se utilizaron adenohipófisis incubadas en solución Earle normal durante las mismas dos horas. La concentración de la cGH contenida en el medio fue determinada por el método de ELISA. Las variantes moleculares de masa de la cGH se separaron a través de electroforesis desnaturante (SDS-PAGE), se identificó por electrotransferencia (western-blot) y se analizó la concentración relativa de cada banda inmunorreactiva por densitometría del luminograma,

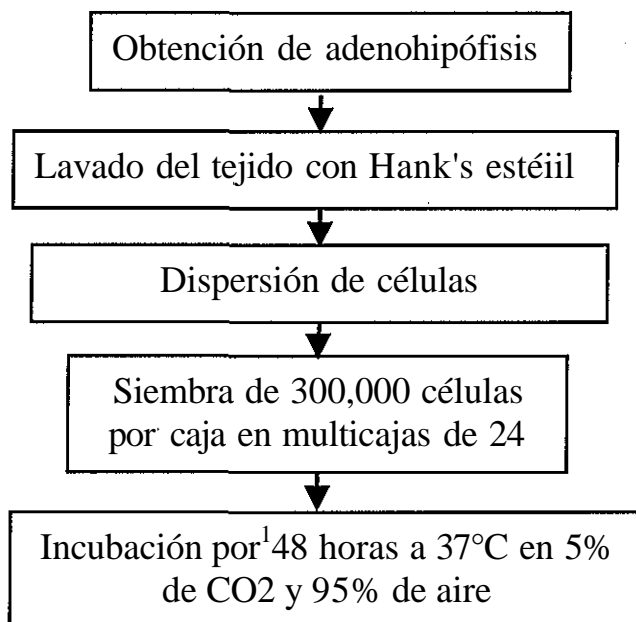
## **ESTUDIO EN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS HIPOFISIARIAS**

### **Procesamiento de las células**

Las adenohipófisis de los pollos se obtuvieron inmediatamente después de la decapitación y fueron colocadas en un recipiente con solución salina de Hank libre de calcio y magnesio (SSH-LCM). Las glándulas fueron lavadas 3 veces con la misma solución estéril y después fueron cortadas en fragmentos de aproximadamente 2 mm. Los fragmentos de tejido fueron transferidos a un tubo cónico (15 X 75 mm) con 0.35% de colagenasa Tipo II (Worthington) en SSH-LCM. Las células adenohipofisarias fueron dispersadas en este medio durante 1 hora a 37°C en un baño de agua con agitación continua: la dispersión fue facilitada mecánicamente utilizando una pipeta pasteur estéril. Después de la dispersión se lavaron dos veces con medio MI99 y se sembraron en cajas de 24 pozos adicionando al medio 10% de suero fetal bovino, 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Se sembraron alícuotas de 300,000 células en 1 ml de medio



por cada pozo, por 24, 48, 72 y 96 horas, a 37°C bajo 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire en una incubadora humidificada (Lab-Line Dubnoff INCU-Shaker).



### Experimento con los secretagogos

Una vez estabilizado el cultivo, el medio fue removido y las células adheridas fueron lavadas una vez con medio MI99 sin suero antes de agregar los diferentes tratamientos. Como tratamientos se utilizaron diferentes secretagogos como la GHRH humana (Sigma) a una dosis de 2nM en MI99 y TRH a 3nM (Sigma). Las células fueron tratadas por 2 horas a 37°C en presencia de los secretagogos.,

Por<sup>1</sup> otra parte, se realizaron diferentes experimentos utilizando análogos de segundos mensajeros que intervienen en la vía de señalización intracelular de la GHRH, así como inhibidores de la síntesis de proteínas. Los respectivos tratamientos se indican en el siguiente cuadro:

Tratamientos utilizados en los experimentos de células dispersas:

Nombre	Marca	Dosis	Tiempo de incubación	Descripción general
GHRH	Sigma	2nM	2 horas	Péptido sintético de 44 aa que estimula la síntesis y secreción de la GH
TRH	Sigma	3nM	2 horas	Péptido sintético de 3 aa que estimula la síntesis y secreción de la GH
8-Bromo AMPc	Sigma	1mM	2 horas	Análogo permeable del AMPc
PMA Phoifool 12-myristate 13 -acétate	Sigma	1 $\mu$ M	2 horas	Ester de forbol activador de la cinasa de proteína C
Cicloheximida	Sigma	50 $\mu$ g/ml	2,4,8 horas	Inhibidor de la síntesis de proteínas,
Ionicina	Sigma	10 $\mu$ M	2 horas	Ionóforo de Ca <sup>2</sup>

Al finalizar el tratamiento el medio fue colectado y congelado a -70°C hasta su análisis. Las células fueron removidas utilizando tripsina-EDTA y lavadas 1 vez con PBS estéril, centrifugadas, resuspendidas en agua desionizada y congeladas a -70°C hasta su análisis,

Se determinó la concentración de cGH total contenida en el medio de cultivo por el método de ELISA. Para el análisis de las variantes moleculares se utilizó la densitometría de la inmunotransferencia de la cGH contenida en el medio previamente inmunoprecipitado.

## PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

### **Inmunoanálisis enzimático (ELISA) para cGH**

El método de ELISA para la determinación de cGH fue modificado con respecto al previamente estandarizado en el laboratorio y se describe la metodología con detalle en el anexo 1. El primer paso fue realizar la titulación del anticuerpo policlonal contra cGH producido en el laboratorio anteriormente. Se cambió el uso de BSA por leche descremada para las soluciones de anticuerpos, se cambió la ortofénildiamina por ABTS como sustrato y se probaron dos diluciones de segundo anticuerpo (ver sección de resultados).

En el método de ELISA se incluyen los siguientes pasos:

- 1) Se recubren los pozos de las microplacas (microplacas de poliestireno Immulon 2 HD de Dynex Tech, con 96 pozos) con la solución de antígeno (12 ng de rcGH/100  $\mu$ l de amortiguador de carbonato, 0.1 M pH 10,3) durante toda la noche,
- 2) simultáneamente se incuban las muestras y las diluciones para la curva patrón (rcGH), con el primer anticuerpo diluido 1:100,000 en amortiguador salino de fosfatos (PBS) [0.01M de fosfatos, 0.15M de NaCl + 0.05% de Tween-20 (TPBS)] + 1% de leche descremada, durante toda la noche,
- 3) las placas se lavan con TPBS 5 veces (lavador automático de Bio-Rad, modelo 1250) y se bloquean con leche descremada al 3% en PBS, durante 1 hora,
- 4) se lavan nuevamente las placas y se les adiciona la mezcla de muestra (o el patrón) y anticuerpo a los pozos,
- 5) después de otro lavado se les agrega el segundo anticuerpo unido a la peroxidasa de rábano (HRP) (1:3,000 en TPBS + 1% de leche) durante 2 horas,
- 6) se vuelven a lavar las placas y se les adiciona la solución de ABTS, sustrato para HRP por 1 hora,
- 7) y se mide la absorbencia a 405nm (en un lector de microplacas Bio-Rad, modelo 3550-UV).

## Inmunoprecipitación

Las muestras de medio provenientes de los cultivos celulares fueron inmunoprecipitadas antes de analizarlas por electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) y westera-blot. La metodología se encuentra descrita en el anexo 2. Para esta inmunoprecipitación se utilizó un anticuerpo monoclonal producido en el laboratorio en ratones Balb-C inyectados con células productoras de anti-cGH, obtenidas de un hibridoma producido con linfocitos B y mieloma, donadas por el Dr. Luc Berghman (Texas A&M, College Station, Tx). Estas células fueron clonadas y probadas en inmunocitoquímicas hipófisis de pollo. Posteriormente los ratones se inyectaron intraperitonealmente. En consecuencia se produjeron anticuerpos monoclonales contra cGH (MAbacGH) contenidos en líquido de ascitis. Estos anticuerpos fueron purificados a partir del líquido de ascitis previamente liofilizado, utilizando una columna de afinidad (Proteína A sefarosa, Pharmacia), como se muestra en la figura 8. Los detalles de la purificación se desglosan en el anexo 2. Con 12 ml de amortiguador de glicina 1,5 M y NaCl 3M, pH 8,9 se resuspendió el líquido de ascitis y se mezcló con 0,75 g de Proteína A sefarosa. Se agitó durante 70 minutos a temperatura ambiente y se obtuvo la fracción no absorbida en fracciones de 10 ml con el amortiguador de glicina NaCl, pH 8,9 hasta obtener lecturas de  $DO_{280\text{nm}}$  cercanas a cero. Para obtener la fracción absorbida (anticuerpo monoclonal) se utilizó un amortiguador de ácido cítrico 50 mM, pH 3,5, en fracciones de 2,5 ml hasta obtener lecturas de  $DO_{280\text{nm}}$  cercanas a cero. Posteriormente el anticuerpo se dializó contra el amortiguador de acoplamiento para preparar el inmunoabsorbente utilizando membranas para 12,000 a 14,000 de PM.

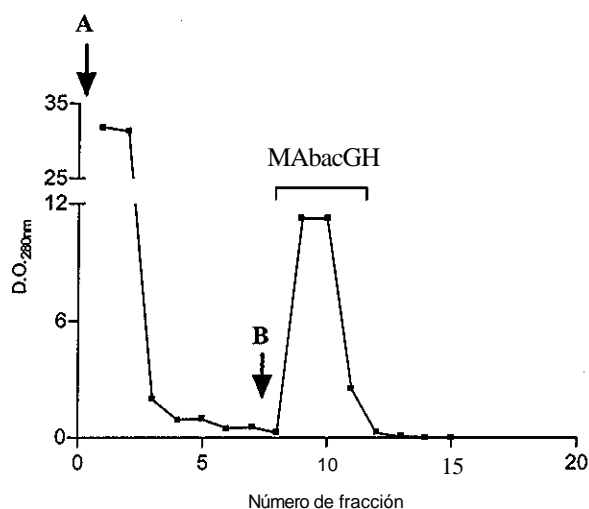


Figura 8 Purificación de anticuerpo monoclonal a partir de líquido de ascitis  
 MAbacGH=anticuerpo monoclonal contra cGH, A=Aplicación del amortiguador de glicina 1.5M y NaCl 3M, pH 8,9, B=Aplicación del amortiguador de Ácido cítrico 0.05M, pH 7.6

Una vez purificado el anticuerpo monoclonal se preparó un inmunoadsorbente con una columna de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) en amortiguador de acoplamiento (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05M, pH 7.6), Este inmunoadsorbente una vez lavado y bloqueado con un exceso de glicina (glicina 1.5M, NaCl 3M, pH 8.0), se fraccionó en alícuotas de 100  $\mu$ l (1:2 de la suspensión con amortiguador de carga) a las que se les agregaron las muestras de medio. Las muestras se dejaron incubando a temperatura ambiente con la resina durante toda la noche en amortiguador de carga (Tris-HCl 0.05M, NaCl 0.15M, pH 7.6) y agitación rotatoria. Al otro día se lavó la resina de cada tubo tres veces con el mismo amortiguador, centrifugando a 5000 rpm y agitando por 5 minutos. Posteriormente se lavaron dos veces con amortiguador de Tris-HCl 0.02M, pH 7.6. La cGH unida a la columna se extrajo resuspendiendo en amortiguador de la muestra para SDS-PAGE e hirviendo durante 5 minutos, al final se colectó el sobrenadante que corresponde a la muestra.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## **Identificación de variantes de masa de cGH por SDS-PAGE [Laemmli, 1970] e inmunoelectrotransferencia.**

Se realizó la SDS-PAGE en condiciones no reductoras (sin mercaptoetanol), utilizando el equipo miniProtean de Bio-Rad. Los geles separador y concentrador se prepararon al 12% y al 4% de poliacrilamida, respectivamente. El amortiguador de corrida fue Tris 25mM, glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8.6. Durante la electroforesis se aplicaron 150 V constantes. Para la inmunoelectrotransferencia los geles se equilibraron en un amortiguador con 25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3 y las bandas de proteína se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 200 mA por 1h (kit de Bio Rad), para ser posteriormente inmunoteñidas y analizadas por quimoluminiscencia. Después de transferir, las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada (Bio-Rad) en TBS por 2 hrs a 37° C. Después de lavarlas con TBS, las membranas se incubaron con el primer anticuerpo anti-GH policlonal (1/10000 en 1% de leche descremada en 0.05% Tween-20 en TBS) a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente las membranas fueron incubadas con el segundo anticuerpo (de ovino anti-IgG de conejo) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Bio-Rad) (1/3000 en 1% de leche descremada en T-TBS) durante 2 h. Se incubaron por 4 minutos en la solución del sustrato quimioluminiscente (2ml de la solución A y 2ml de la solución B, ECL, Pharmacia). Los luminogramas de las bandas inmunoteñidas se obtuvieron exponiendo películas de rayos-X (Kodak Biomax) a las membranas durante 15 segundos.

## **Análisis de las variantes de cGH por densitometria.**

El análisis de la hormona se realizó por medio de densitometría de los luminogramas después de la inmunoelectrotransferencia. Para digitalizar la imagen del luminograma se empleó un Scanner ScanJet Hewlett Packard. Con esto se obtiene una imagen con un gradiente de color que va de blanco a negro donde este último representa la mayor densidad. Con ayuda del programa IP-Lab (Scanalytics) se obtiene la densidad óptica del área total de cada banda,

Estos datos fueron graneados comparando las diferencias entre las distintas bandas inmunorreactivas entre los grupos controles y los tratados de cada experimento, Para normalizar los datos se obtuvo la concentración relativa de cada banda considerando la inmunoreactividad total de cada muestra como el 100 % de tal manera que cada variante molecular identificada por los anticuerpos representa un porcentaje del total de cGH secretado al medio,,

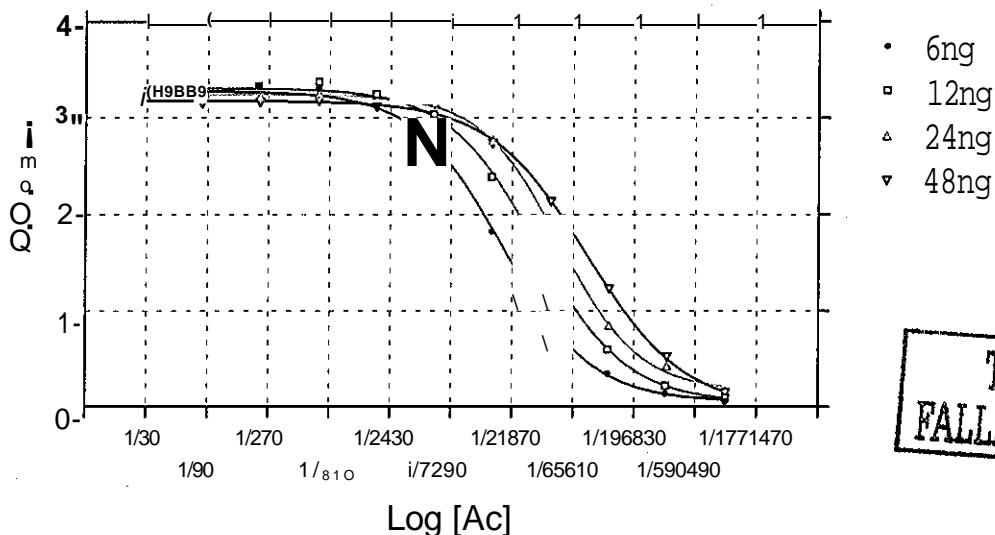
El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de dos vías que permitió la comparación entre las bandas correspondientes entre controles y experimentales. En el caso de la cGH total determinada por ELISA se analizó con una prueba T que permitió la comparación entre control y tratado,.

## RESULTADOS

### ELISA

El ELISA de tipo indirecto se estandarizó para determinar la concentración de la cGH en el suero, hipófisis y en medios de cultivo, utilizando un anticuerpo policlonal contra cGH previamente producido en el laboratorio en conejos.

Inicialmente se estudió el título requerido del anticuerpo utilizando diluciones del suero acGH, desde 1:30 hasta 1:1,771,470. Para este estudio se probaron diferentes concentraciones de cGH recombinante (rcGH) como antígeno de competencia (6, 12, 24 y 48 ng/pozo). Los complejos antígeno-anticuerpo se evaluaron con un segundo anticuerpo anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:3,000). Cabe señalar que en trabajos anteriores se comparó el desplazamiento de la cGH nativa y la rcGH utilizando el mismo anticuerpo policlonal y fueron equivalentes [Martínez-Coria, 1998].



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 9 Titulación del anticuerpo policlonal cGH producido en conejo. Se gráfico el logaritmo de la dilución del suero (1:30 a 1:1,771,470) contra la DO  $_{405}$ . Se utilizaron 6, 12, 24 y 48 ng de rcGH para forrar las placas, Ac=anticuerpo policlonal,,



Utilizando diluciones de 1:7,000-1:500,000 se observaron diferencias en el desplazamiento de las curvas (el 50% de unión), como se muestra en la siguiente tabla.

Titulación del anticuerpo policlonal acGH producido en conejo

Forro de rcGH /pozo	6 ng	12 ng	24 ng	48 ng
Dilución al 50 % de unión	26,590	50,870	77,990	130,800

Una vez establecido el intervalo de desplazamiento lineal del anticuerpo en cada caso se determinó el desplazamiento de la curva con diferentes antígenos de competencia constantes, en un análisis indirecto o de competencia, donde la rcGH unida a la placa compete por la unión al anticuerpo con rcGH libre en diferentes concentraciones o bien con la contenida en la muestra., Se probaron diferentes concentraciones de anticuerpo entre 1:7,000 y 1:500,000 empleando también diferentes cantidades de rcGH como fono de la placa, En la figura 10 se muestra el desplazamiento de la curva utilizando 12 ng/pozo de fono, concentraciones rcGH libre desde 1024 a 0.125 ng/pozo y diferentes concentraciones del primer anticuerpo (1:25,000, 1:50,000, 1:100,000, 1:200,000 y 1:300,000),

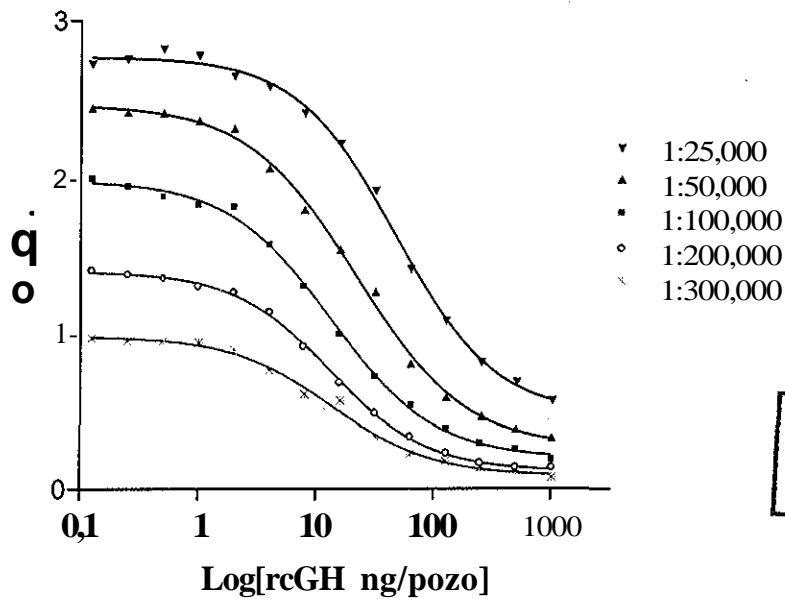
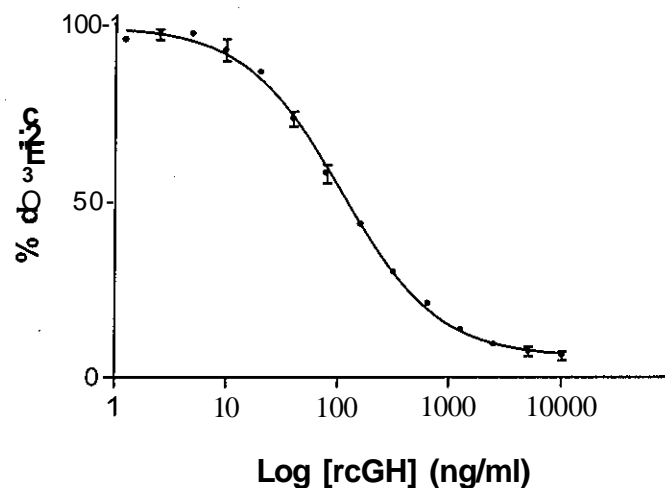
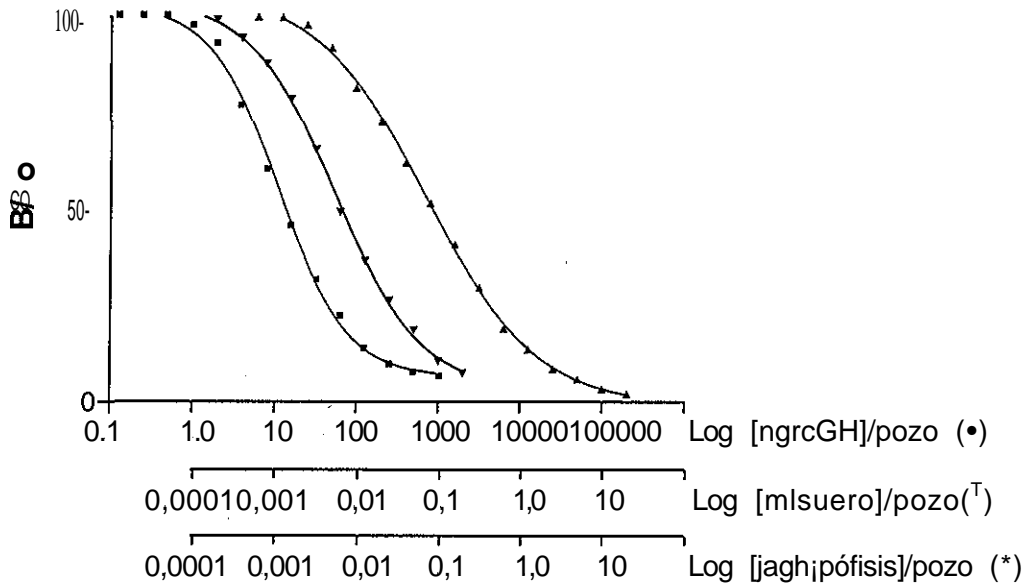


Fig. 10 Titulación del anticuerpo policlonal en una curva de competencia, utilizando 12 ng de rcGH/pozo de forro, concentraciones de rcGH libres de 1024 a 0,125 ng/pozo, <sup>A w</sup> m ° \* representan las diluciones del primer anticuerpo utilizadas,,

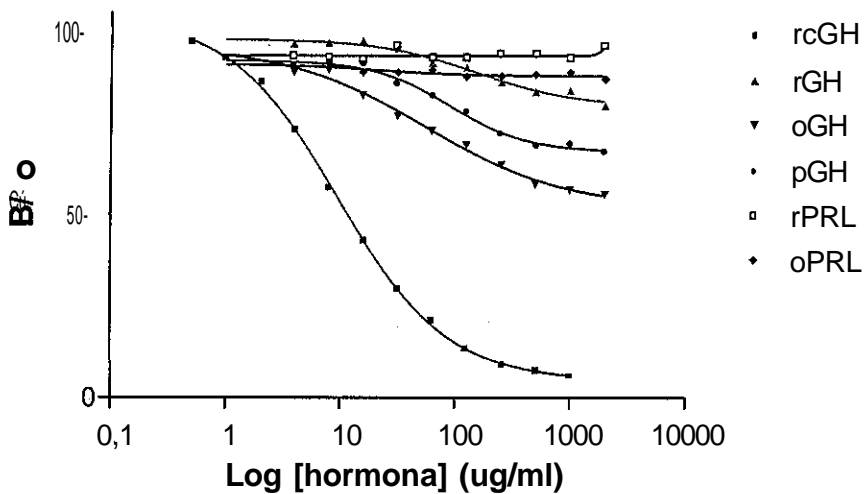
Para los siguientes experimentos se escogió la dilución del anticuerpo de 1:100,000 que representa alrededor del doble del 50% de unión en la curva de titulación para 12 ng/pozo de fono., El 50 % de unión en esta curva corresponde a 1324 ng/pozo de rcGH, el número de Hill o valor de la pendiente es cercano a 1 (0,98) y presenta una sensibilidad de 2 ng/pozo (20 ng /mi)., La curva patrón se muestra en la figura 11 y presenta un coeficiente de variación inter- e intraensayo menor al 5% (3,27% y 3,91%, respectivamente), obtenidos a partir del promedio del porcentaje de unión para cada concentración de hormona.





**Fig., 12** Curvas de paralelismo utilizando diluciones de suero de pollo de 4 semanas de edad y extractos hipofisarios de pollo de 8 semanas de edad,,

Con el objetivo de estudiar la especificidad del sistema, se evaluó el grado de desplazamiento obtenido al competir con otras hormonas hipofisarias con alto grado de homología con la cGH como la PRL y GH de diferentes especies,,



**Fig., 13** Reactividad cruzada del anticuerpo policlonal utilizado en el ELISA para determinar cGH,, En esta gráfica se observan las curvas obtenidas con GH de pollo (c), rata (r), ovina (o) y porcina (p), prolactina de rata (r) y ovina (o).

Como se observa en la figura 13 el anticuerpo muestra ser selectivo y con alta afinidad para la cGH mientras que para las distintas PRL y las otras GHs muestra baja afinidad y al comparar las curvas en ningún caso llegan al 50% de unión con respecto al desplazamiento de la cGH, por lo que se puede suponer que el sistema es altamente específico.

*Inmunotransferencia y análisis densitométrico de las luminografías*

El ELISA es un sistema que permite cuantificar el contenido de cGH en el medio de cultivo pero no distingue las diferencias entre las distintas variantes moleculares de la cGH porque el anticuerpo utilizado es policlonal dirigido al conjunto de las isoformas de GH. Para el análisis de las distintas formas moleculares de la cGH se separaron por medio de SDS-PAGE, de acuerdo con su masa y se identificaron por inmunotransferencia utilizando también el anticuerpo policlonal contra cGH. La densitometría de cada banda inmunorreactiva permitió hacer una comparación entre el patrón de secreción de los grupos control y los tratados.

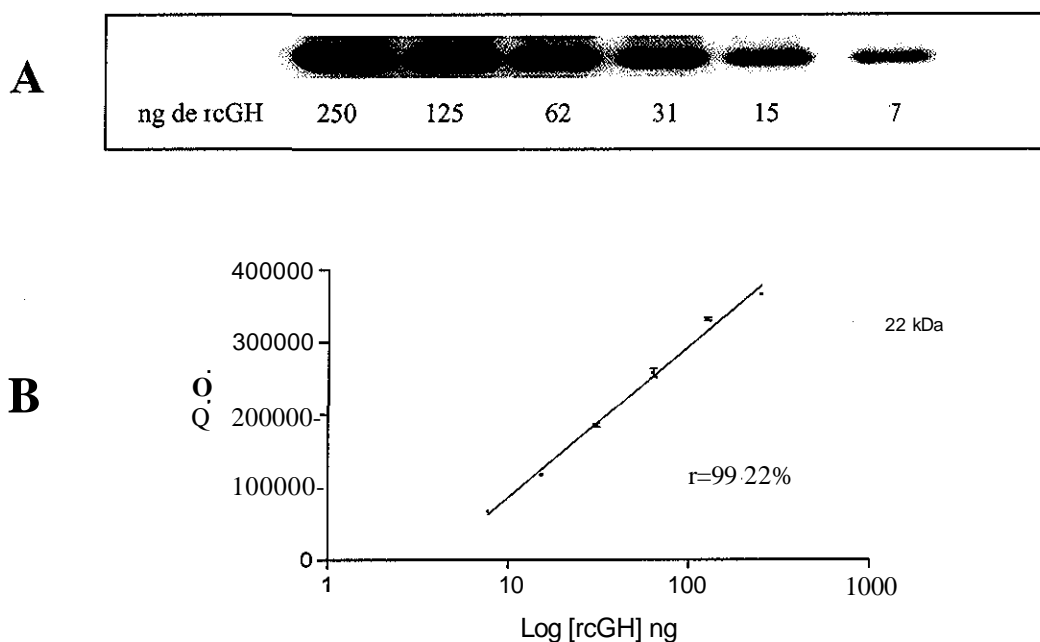


Fig. 14 Curva de rcGH analizada por densitometría a partir del luminograma de la inmunotransferencia., En el panel A se muestra la imagen digitalizada del luminograma a partir de la cual se analizan por densitometría las bandas inmunorreactivas., En el panel B se graficaron los datos obtenidos por densitometría,

Como se puede observar en la figura 14, distintas concentraciones de rcGH presentan un comportamiento lineal en un rango de 250 a 7 ng totales con una correlación de 99%. Estos resultados demuestran que el sistema es semicuantitativo y que permite observar cambios en la concentración de cGH en las muestras analizadas,,

### Inmunoprecipitación

Para el análisis electroforético de la cGH contenida en el medio de cultivo de las células dispersas, las muestras fueron previamente inmunoprecipitadas utilizando como inmunoabsorbente un anticuerpo monoclonal. Se observó que el 100% de la cGH contenida en el medio de cultivo es capturada por el anticuerpo de acuerdo con las determinaciones realizadas por ELISA en los medios antes y después de la inmunoprecipitación. Sin embargo, de acuerdo con un análisis densitométrico la recuperación de cGH es cercana al 73%. En la siguiente figura se muestra una curva de concentración de rcGH previamente inmunoprecipitada.

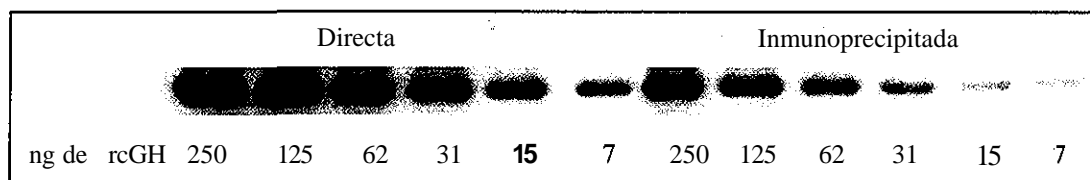
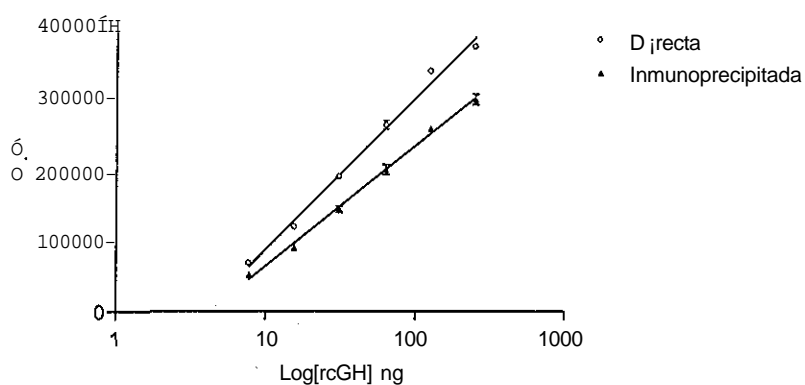


Fig., 15 Se muestra la inmunotransferencia y las curvas obtenidas al aplicar distintas concentraciones de rcGH (250-7ng) directamente al SDS-PAGE al 12,5% en condiciones no reductoras y las mismas concentraciones previamente inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal acGH,

## ESTUDIO DE HIPÓFISIS COMPLETAS

En este tipo de experimentos se analizó el efecto de la GHRH sobre la liberación de las variantes moleculares de la cGH al medio de incubación. Se realizaron incubaciones agudas de hipófisis recién extraídas de pollos macho de 4 semanas de edad. Se consideró como grupo control aquellos grupos de hipófisis incubados en solución Earle normal. Primero se determinaron las condiciones de incubación y análisis de las muestras. La cGH contenida en el medio de cultivo fue cuantificada por ELISA. Se determinó que con este sistema se puede observar la respuesta del tejido incubado al tratamiento con GHRH y que este efecto como se muestra en la figura 16 es dependiente de la dosis aplicada ( $IC_{50} = 1.52 \pm 0,78$  nM).

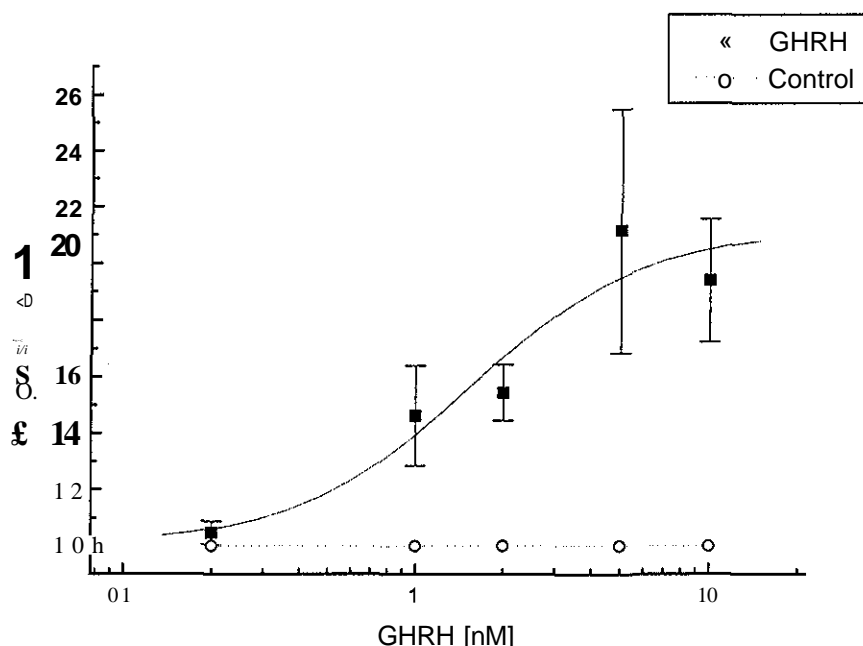


Fig., 16 Relación dosis-respuesta del GHRH en hipófisis de pollo de 4 semanas de edad, durante una incubación de 2 horas.,

Cada punto representa el promedio de 8 experimentos realizados por triplicado. Los datos se normalizaron considerando el valor del control igual a 1 en cada caso., La línea continua representa el ajuste realizado con la ecuación de Hill.,

En los siguientes experimentos de cultivo de hipófisis completas se utilizó la dosis de 2nM de GHRH que es cercana a la  $Ic_{50}$  y la variabilidad

encontrada es menor. Aunque no es la respuesta máxima sobre la liberación de cGH, esta dosis permite observar<sup>1</sup> incrementos e inhibición de la respuesta al tratamiento.

Se observó que por efecto de la GHRH la concentración de cGH en el medio cambió significativamente de  $14,7 \pm 2,3$  a  $29,2 \pm 2,1$  ng de cGH/mg de tejido (ver figura 17), confirmándose así que el sistema respondió de acuerdo con lo esperado.

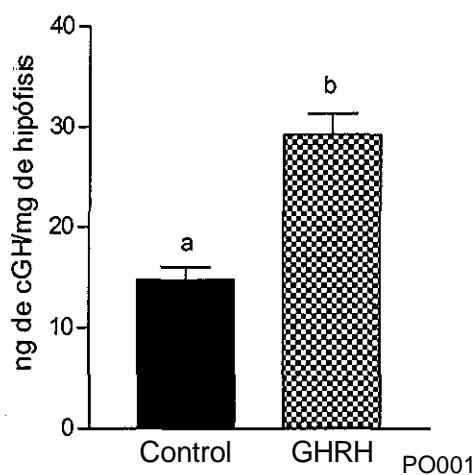
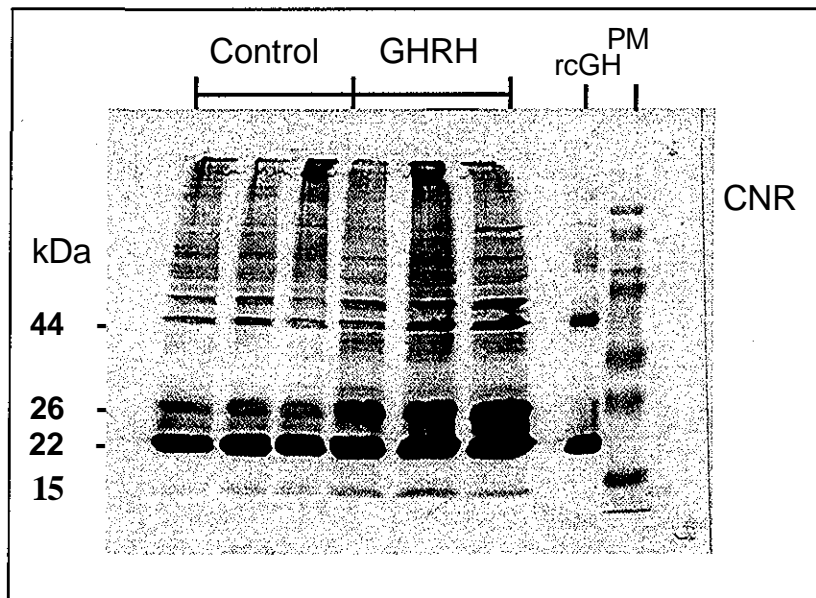


Fig., 17 Concentración de cGH total secretada por hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en medio Earle Normal durante 2 horas., Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, PO..001.. El A de letra = Diferencia significativa,

Para su análisis, las variantes de masa de la cGH fueron separadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Posteriormente fueron electrotransféricas e inmunoidentificadas por un anticuerpo policlonal específico. Se realizó un análisis semicuantitativo con ayuda de la densitometría de las bandas inmunorreactivas., En la figura 18 se muestra una inmunotransferencia de las variantes de cGH secretadas al medio en respuesta a 2 horas de tratamiento con GHRH y se puede observar que se modificó el patrón de secreción de las distintas bandas inmunorreactivas, aumentando la inmunorreactividad en los grupos tratados con este péptido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Fig, 18 Inmunotransferencia del medio del cultivo de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en medio Earle normal durante 2 horas,,

Al hacer el análisis densitométrico (ver figura 19) se pudo observar que aunque todas las formas moleculares identificadas por el anticuerpo se incrementaron por efecto del tratamiento con GHRH, la respuesta para algunas de ellas fue diferencial.. Las variantes oligoméricas de 66 y 60 kDa incrementaron 2,4 y 2,9 veces con respecto al control, mientras las formas de 50, 44, 26 y 15 incrementaron 5,8, 4,8, 4,4 y 5.7 veces respectivamente,, Es importante resaltar que la forma más abundante de la cGH es la de 22 kDa o monomérica y por efecto del tratamiento aumentó solo 2,24 veces ( $3905.3 \pm 121.85$  vs  $8752,6 \pm 447,5$ ) con relación al grupo control,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



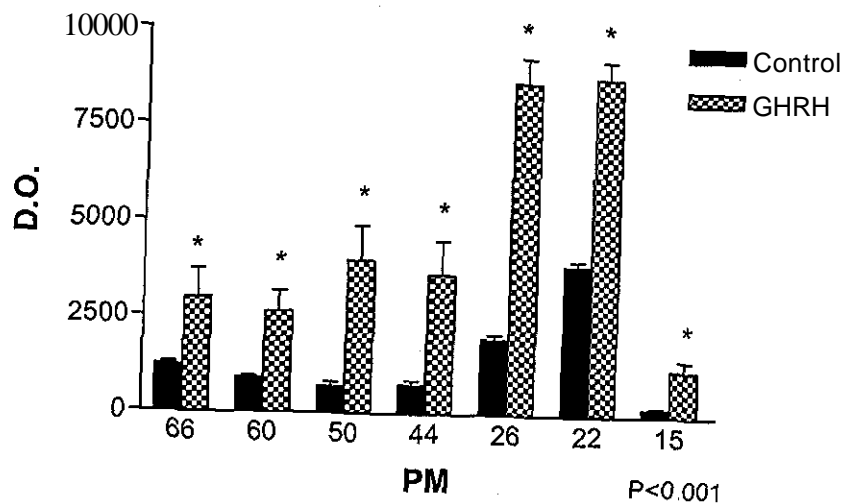


Fig. 19 Densitometría de la inmunotransferencia (SDS-PAGE, CNR) del medio del rultm de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH eTmedi

Al analizar la concentración relativa de las distintas variantes de la cGH secretadas por las hipófisis e identificadas en el medio de incubación, considerando la inmunorreactividad total como el 100% (ver. figura 20), se observaron cambios interesantes. La forma monomérica representa en los grupos controles el  $40.5 \pm 1.6$  % mientras que en los grupos tratados con GHRH representa el  $28.3 \pm 3.9$  %. La forma de 26 kDa cambia de  $20.4 \pm 1.2$  a  $27.4 \pm 1.5$  %, y al parecer por efecto del tratamiento esta forma se vuelve cuantitativamente tan importante como la forma monomérica. Cada una de las formas oligoméricas representan menos del 12 % de la inmunorreactividad total y el fragmento de 15 kDa que representa del  $2.2 \pm 0.4$  en los controles aumenta al  $3.8 \pm 0.6$  % en los tratados,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

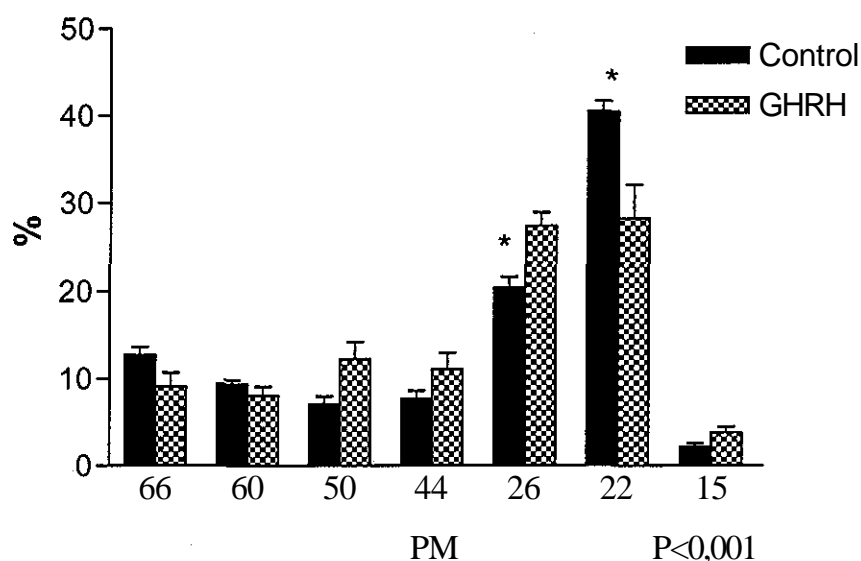


Fig., 20 Concentración relativa de las variantes moleculares de la cGH secretada al medio del cultivo de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en medio Earle normal durante 2 horas., Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, El \* = diferencia significativa, PO.,001,

Resulta interesante que la secreción de la forma de 26 kDa se vea favorecida cuando se estimula a las células con el secretagogo., Como se vio anteriormente, la forma glicosilada de la cGH presenta un peso molecular aparente alrededor de 26 kDa en condiciones no reductoras o 29 kDa en condiciones reductoras., Sin embargo, también se ha identificado una forma de 25 kDa que es una forma cortada de la cGH, unida por los puentes disulfuro y por lo tanto desaparece en condiciones reductoras aumentando la proporción de fragmentos de cGH,

Por lo anterior, podemos suponer que la forma de 26 kDa que modifica su secreción por efecto del GHRH en los experimentos *in vitro* con hipófisis completas puede tratarse de la forma glicosilada, cortada o de la comigración de ambas, Para identificar la presencia de carbohidratos en esta banda inmunorreactiva, se realizó un experimento en el que la cGH secretada en el medio fue aislada por inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo

monoclonal. Posteriormente, las variantes de cGH fueron separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, transferidas y reconocidas por un lado con un anticuerpo policlonal específico y por otro se identificaron las bandas positivas a carbohidratos.

En la figura 21 podemos observar la presencia de bandas positivas a carbohidratos que corresponden con la migración de la forma de 29 kDa y que esta banda inmunorreactiva aumenta en respuesta al tratamiento con GHRH,

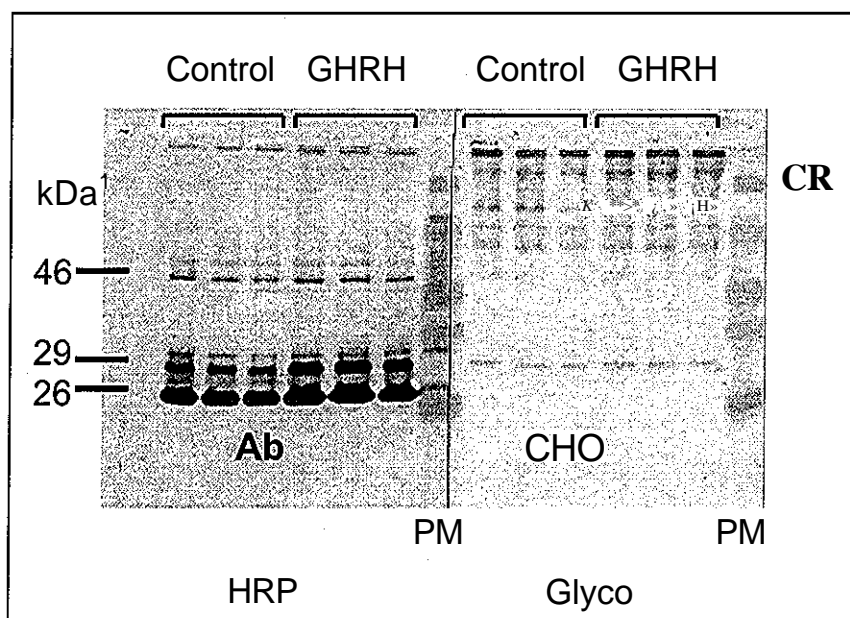


Fig. 21 Identificación de carbohidratos en la cGH secretada e inmunoprecipitada a partir del medio del cultivo de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en medio Earle normal durante 2 horas,

Se analizó el contenido de cGH encontrada en las hipófisis después del tratamiento. Para lograr esto se realizó un extracto hipofisiario y se determinó el contenido de cGH total por mg de proteína, con ayuda del método de ELISA. De acuerdo con este método el contenido de cGH fue similar tanto en el grupo control como en el tratado con GHRH. Como se muestra en la figura 22 no se aprecia un cambio significativo por efecto del tratamiento,.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

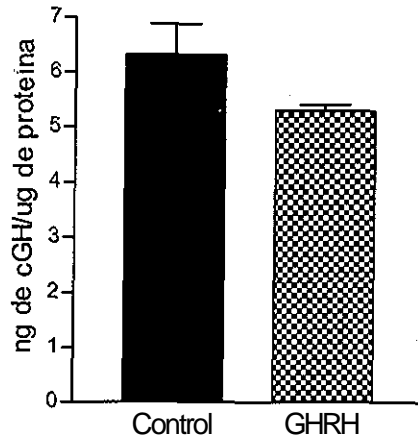


Fig., 22 Concentración de cGH total en el extracto hipofisiario del cultivo de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en medio Earle normal durante 2 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM., No se observó diferencia estadísticamente significativa,

Sin embargo, cuando se realizó el análisis densitométrico (ver figura 23) de las variantes moleculares de la cGH encontradas en la hipófisis después de la incubación con el GHRH, se pudieron observar diferencias en la inmunorreactividad entre las bandas correspondientes a los controles y las de los tratados con GHRH,

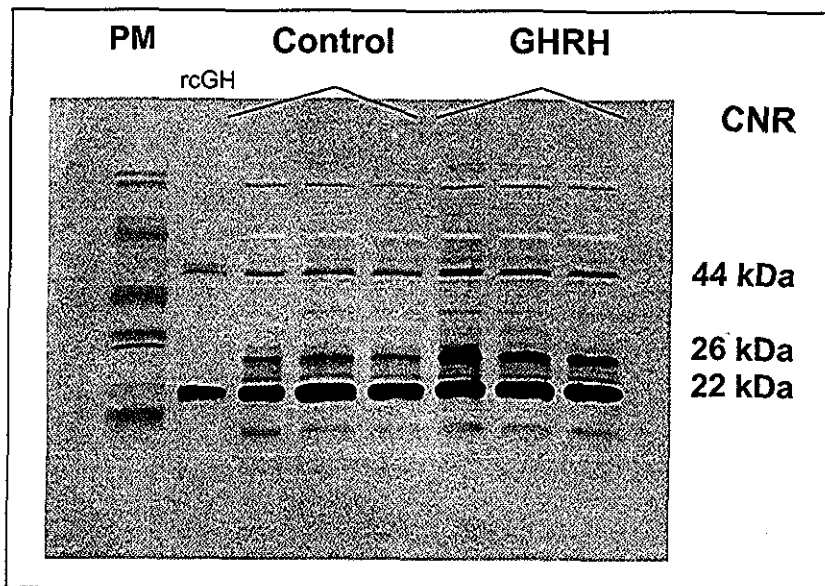


Fig., 23 Inmunotransferencia del extracto hipofisiario del cultivo de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en medio Earle normal durante 2 horas.,

Se observaron cambios significativos en las formas moleculares de 26 y 44 kDa, La forma de 26 kDa aumentó 19 veces y la foima de 44 kDa 2,2 veces, mientras que la forma de 22 kDa no mostró cambios significativos. En la figura 24 se muestra el análisis densitométrico de las distintas bandas inmunoneactivas presentes en la glándula después del tratamiento de 2 horas con GHRH.

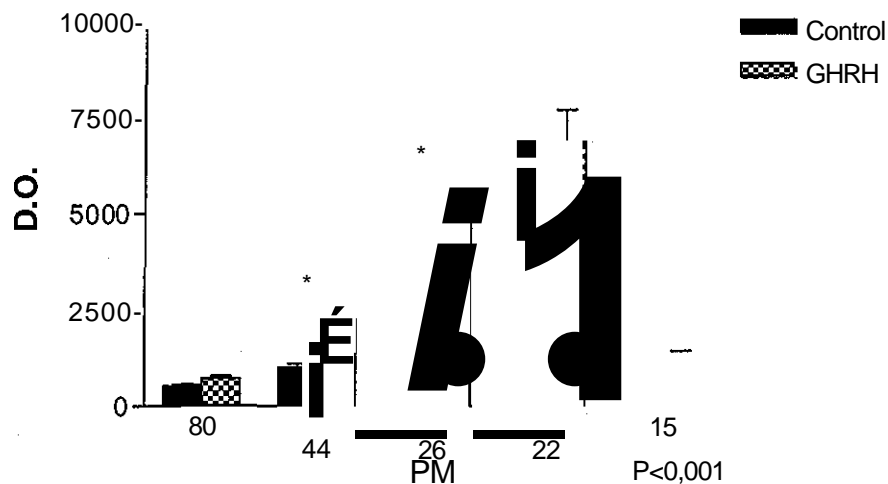


Fig., 24 Densitometría de la inmunotransferencia (SDS-PAGE, CNR) del extracto hipofisiario de! cultivo de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en medio Earle normal durante 2 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, El \* = diferencia significativa, PO..001..

Cuando se analizó la concentración relativa de las variantes moleculares de la cGH (ver figura 25) se observó que la forma de 22 kDa representa el  $52.9 \pm 2.2$  % en los controles y  $41.2 \pm 3,4$  % en los tratados con GHRH., En cambio la forma de 26 kDa representa el  $24,8 \pm LO$  y  $3.3.2 \pm 1,2$  % en controles y tratados, respectivamente., Es importante resaltar que aunque, en la concentración total de cGH no se detectaron cambios significativos el tratamiento produce un incremento significativo en la concentración relativa de la forma de 26 kDa contenida en la glándula.,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

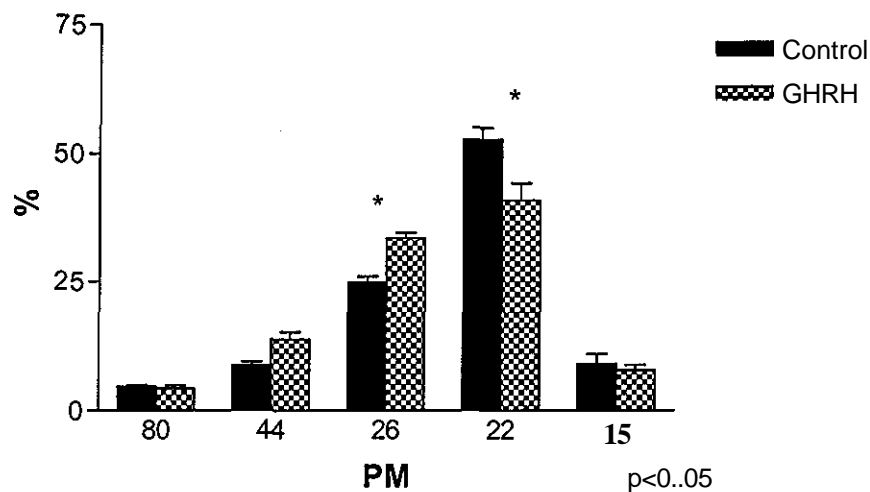


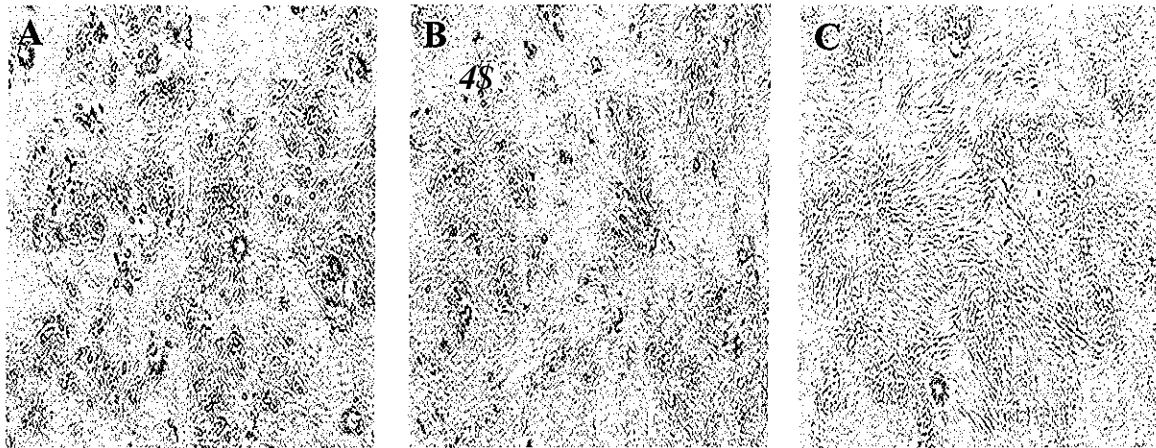
Fig., 25.. Concentración relativa de las variantes de cGH contenidas en el extracto hipofisiario del cultivo de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en medio Earle normal durante 2 horas,, Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, El \* = diferencia significativa, PO.,05.,

Los experimentos realizados con hipófisis completas dieron pie a una serie de experimentos con células dispersas de hipófisis que tuvieron como objetivo acercarse al mecanismo intracelular por medio del cual el secretagogo favorece la liberación de la variante de 26 kDa ,,

## ESTUDIO EN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS HIPOFISIARIAS

El primer paso en estos experimentos fue determinar las condiciones de cultivo y de análisis para poder identificar las variantes moleculares de cGH secretada al medio de cultivo. Además se realizó la identificación de células secretólas de cGH a través de una inmunocitoquímica utilizando anticuerpo policlonal específico oxGH y como segundo anticuerpo, uno antiIgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano. En la figura 26 se muestra una fotografía de los somatotropos identificados en el cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad,,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig.. 26** Fotografías de las inmunocitoquímicas de cultivos primarios de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad con 48 horas de incubación, En el panel A y B se muestran las células identificadas por el anticuerpo monoclonal acGH y 2° anticuerpo antiIgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano, El panel A muestra células sin tratamiento y el panel B células tratadas con 2nM de GHRH durante 2 horas,, En el panel C se muestran las células fijadas e inmunoteñidas sin acGH y con 2° anticuerpo,,

En estos estudios se analizó primero el efecto de la GHRH sobre la secreción de cGH en células hipofisarias de pollos machos de 4 semanas. En todos los experimentos realizados se consideraron las incubaciones con medio solo como los grupos controles, Se observó un incremento en la concentración de la cGH total y de las diferentes formas moleculares de la hormona secretadas al medio por efecto de la GHRH. Sin embargo el análisis de las variantes moleculares muestra que existen diferencias en la magnitud del incremento en cada una de ellas,,

La liberación de cGH total al medio de cultivo corrobora la respuesta de las células en cultivo al efecto del GHRH. En la figura 28 se muestra que la concentración de cGH secretada al medio incrementa 2.84 veces con respecto al control ( $26.7 \pm 2.7$  y  $7577 \pm 6,0$  ng/ml de medio de cultivo respectivamente  $P < 0,001$ ),

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

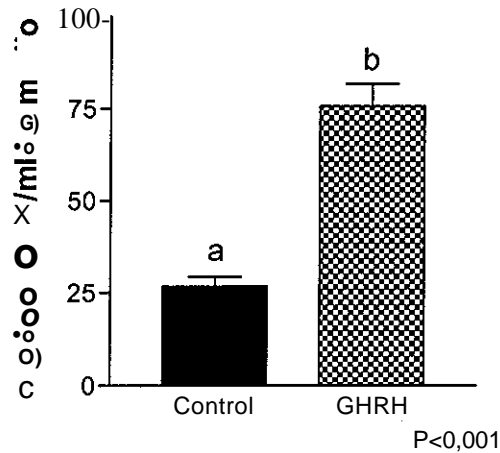


Fig., 27 Concentración de cGH total secretada al medio en cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH, durante 2 horas,, Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, Letra diferente = Diferencia significativa, P<0,,001

Las variantes moleculares de masa de cGH fueron separadas por SDS-PAGE y posteriormente electrotransferidas para su inmunoidentificación. Para analizar la proporción de las variantes moleculares de cGH secretadas al medio, la hormona fue previamente aislada por inmunoprecipitación con el objeto de evitar la interferencia de los componentes del medio de cultivo durante la electroforesis, Se utilizó un inmunoabsorbente preparado con anticuerpo monoclonal unido a sefárosa 4B activada para la inmunoprecipitación y anticuerpo policlonal para la identificación de las distintas formas de masa en la inmunotransferencia. Este método permitió incrementar la especificidad del análisis, puesto que el reconocimiento de las variantes moleculares se llevó a cabo por dos anticuerpos diferentes,, La proporción relativa de las distintas formas moleculares fue calculada a partir de la densitometría del total de bandas inmunorreactivas en cada muestra. En la figura 28 se muestra la inmunotransferencia de las variantes de masa secretadas al medio de cultivo.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



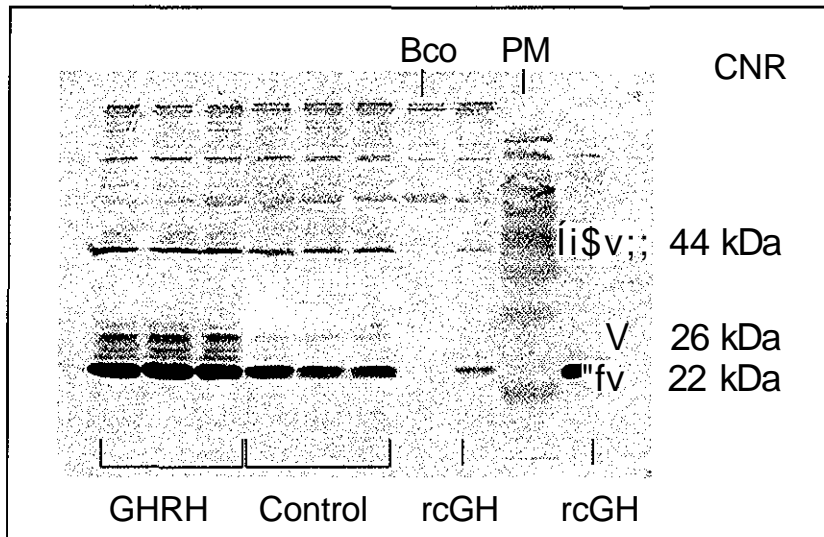


Fig. 28 Inmunotransferencia del medio de cultivo de células dispersas de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH, durante 2 horas,,

Al ser analizadas las distintas bandas inmunorreactivas se pudo observar que todas las formas moleculares fueron estimuladas por efecto de la GHRH. Sin embargo cada una de ellas aumentó de manera diferencial,, La forma 22 kDa incrementó 0,65 veces con respecto al control mientras que la forma de 26 kDa aumentó 3,5 veces ( $556 \pm 48$  vs  $1594 \pm 133$   $P < 0.001$ ) (ver figura 29),,

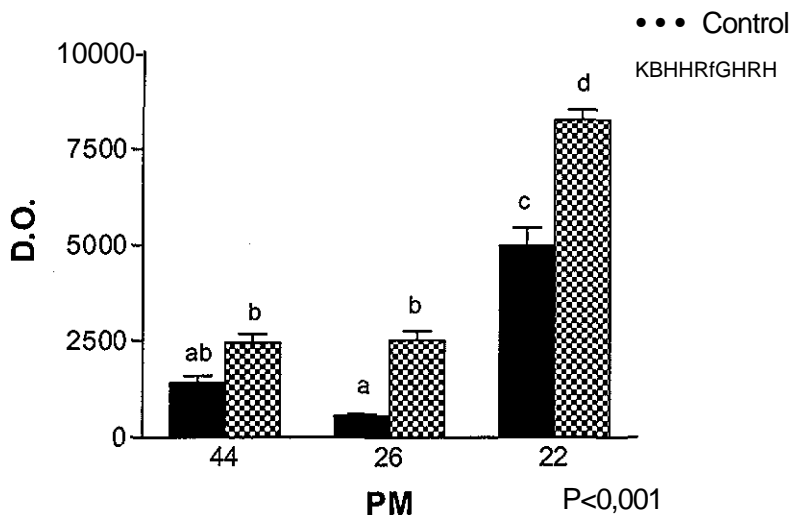


Fig. 29 Densitometría de la inmunotransferencia (SDS-PAGE, CNR) del medio de cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en M199 durante 2 horas, Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, La A letra = diferencia significativa, PO..001..

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Estos resultados indican que la secreción de la forma de 26 kDa se ve favorecida por el tratamiento con la GHRH. En los grupos control esta forma de 26 kDa representa el  $8.1 \pm 1$  % de la inmunoneactividad total y por efecto de la GHRH este porcentaje aumenta al  $18.8 \pm 0.9$  %., Sin embargo se puede observar que el monómero y el dímero representan el  $71.6 \pm 0.5$  y el  $20.3 \pm 0,6$  % respectivamente en condiciones control mientras que por efecto del secretagogo representan el  $62,6 \pm 1,6$  y el  $18.5 \pm 1,1$  %., En la figura 30 se muestra la concentración relativa de las variantes de cGH en el medio, en condiciones control y con GHRH como tratamiento.

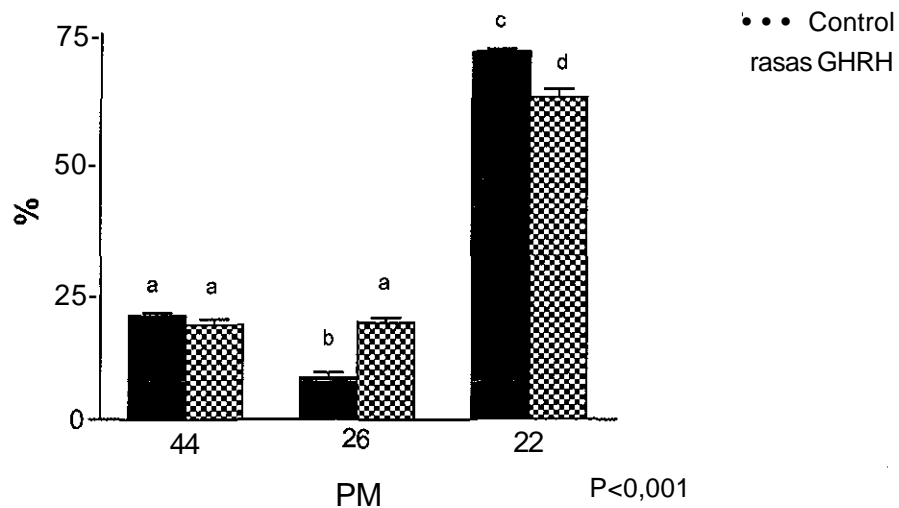


Fig. 30 Concentración relativa de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, contenidas en el medio, del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en M199 durante 2 horas., Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La A letra = diferencia significativa,  $P < 0.001$ ,

Como se mencionó anteriormente la forma de 26 kDa observada en condiciones no reductoras puede tratarse de la forma glicosilada. Sin embargo, es fácil confundirla con la forma cortada de la cGH, pues el peso molecular aparente, determinado por electroforesis, en ambas formas es muy parecido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Por esta razón en otro experimento, se separaron las variantes de la cGH contenidas en el medio de cultivo, a través de SDS-PAGE en condiciones reductoras (CR). En estas condiciones la forma cortada -que se mantiene unida por puentes disulfuro- desaparece y se observan los diferentes fragmentos de la cGH, identificados por el anticuerpo policlonal específico.

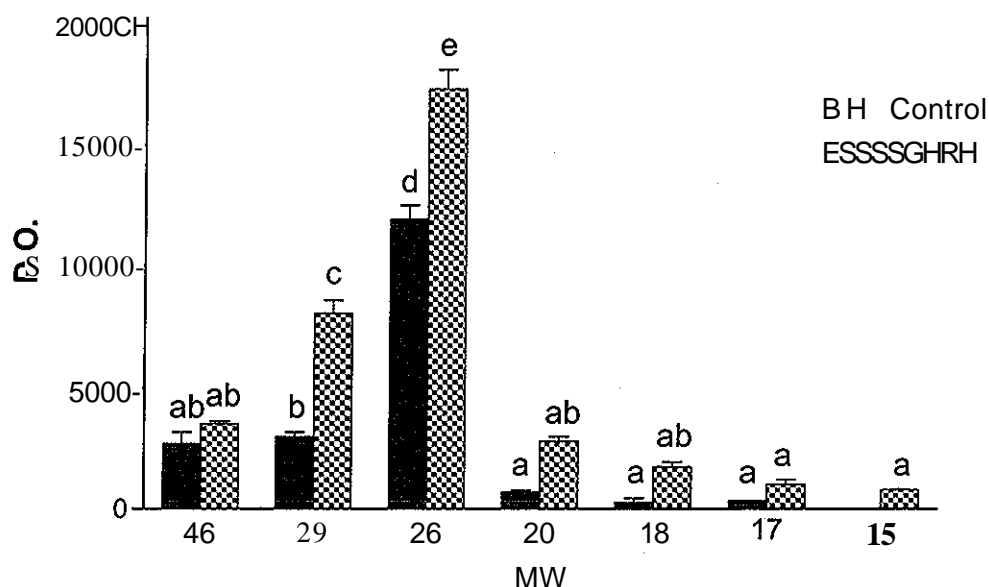


Fig., 31 Densitometría de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras (CR), contenidas en el medio, del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en M199 durante 2 horas., Los resultados representan la media  $\pm$  SEM., La ^ letra = diferencia significativa,  $P < 0.001$

En la figura 31 se muestra el análisis densitométrico de la cGH secretada al medio de cultivo por efecto de la GHRH. También en estas condiciones experimentales se observó un incremento de todas las formas moleculares de la cGH y, consistente con los resultados anteriores, la respuesta fue diferencial. La forma monomérica (en estas condiciones con PM aparente de 26 kDa) incrementó 1.45 veces con respecto al control ( $119.30 \pm 572.4$  vs  $17308 \pm 812.2$  PO001), por efecto de la GHRH, mientras que la forma de 29 kDa (posible forma glicosilada) 2.7 veces ( $2989 \pm 184,7$  vs  $8037 \pm 535,2$  PO..001)., Además, en este análisis podemos observar que los diferentes fragmentos aumentan de manera importante (de 3 a 6 veces con respecto al control) por efecto de la GHRH,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Posteriormente se realizó el análisis de la concentración relativa de las distintas bandas inmunorreactivas., Se puede observar en la figura 32 que la forma de 29 kDa incrementa después del tratamiento del  $15,9 \pm 0,8 \%$  al  $22,8 \pm 0,9 \%$ .. Las formas de 26 y 46 kDa representan el  $63,3 \pm 0,8$  y  $14,2 \pm 1,9 \%$  en los controles y el  $49,2 \pm 1,3$  y  $10,0 \pm 0,7 \%$  por efecto de la GHRH. Finalmente los fragmentos representan de entre el 4 y 1 % en los controles y del 8 al 2 % por influencia del tratamiento.,

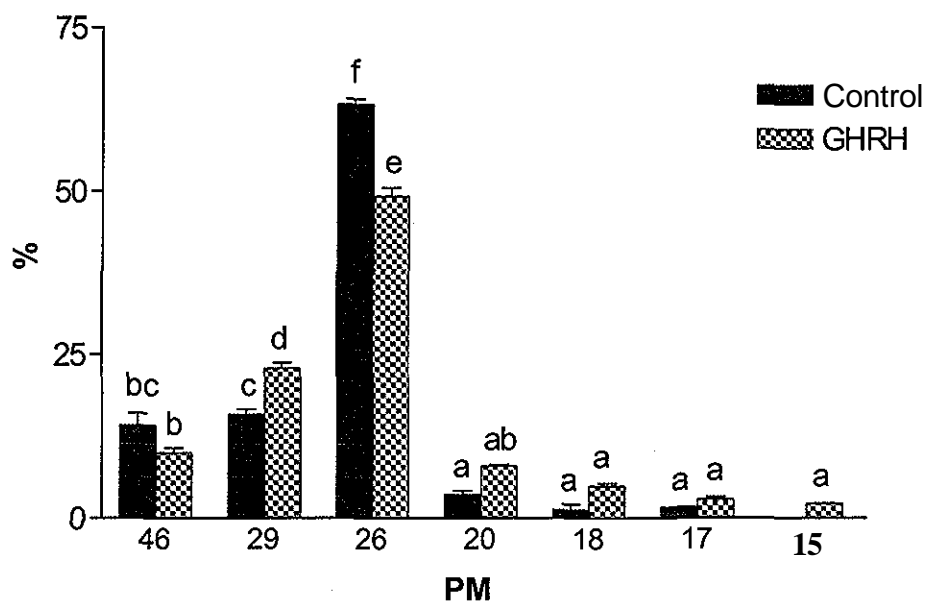


Fig., 32 Concentración relativa de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio, del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH en M199 durante 2 horas., Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La A letra = diferencia significativa,  $P < 0,001$ .

Con el objetivo de analizar el mecanismo a través del cual la GHRH ejerce este efecto diferencial sobre la secreción de las variantes de masa de la cGH, que se observó tanto en los cultivos de hipófisis completas como en el cultivo primario de pituicitos, las células hipofisiarias dispersas fueron sometidas a diferentes tratamientos con compuestos relacionados con las vías de segundos mensajeros intracelulares activados por la GHRH., Como se mencionó anteriormente, la GHRH utiliza tanto la vía de la adenilato ciclasa, a través de la activación de proteínas G, como la vía de la fosfolipasa A. En la figura 33 se muestra la inmunotransferencia de la cGH secretada al medio por

efecto de análogos de segundos mensajeros como son el 8-bromo-AMPC y el PMA.

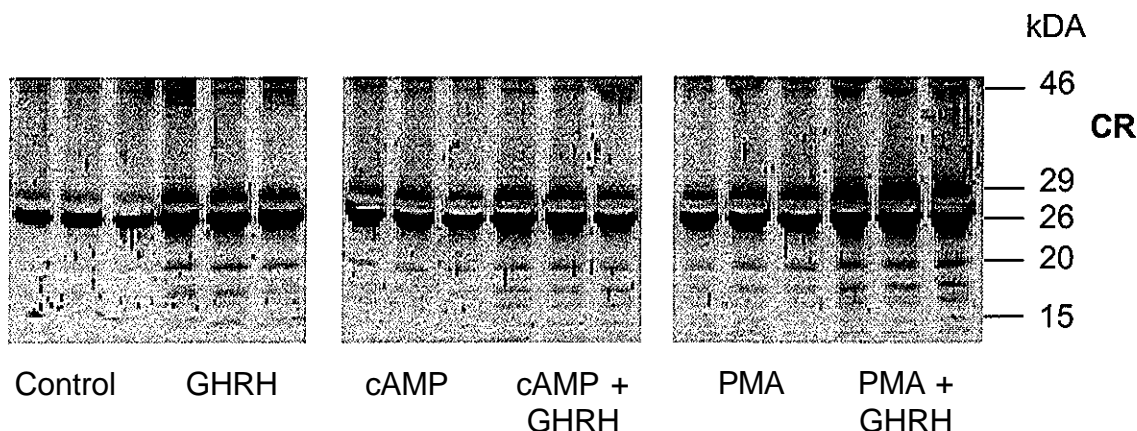


Fig. 28 Inmunotransferencia (SDS-PAGE, CR) del medio de cultivo de células dispersas de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH, 1mM de 8-bromo-AMPC, 1uM de PMA y la combinación del GHRH+ los análogos de segundos mensajeros, durante 2 horas,

El análisis de las variantes moleculares de la cGH inmunoneactivas secretadas al medio por efecto del análogo permeable del AMPc (8-bromo-AMPC) y la combinación de éste con GHRH en condiciones reductoras se muestra en la figura 34.,

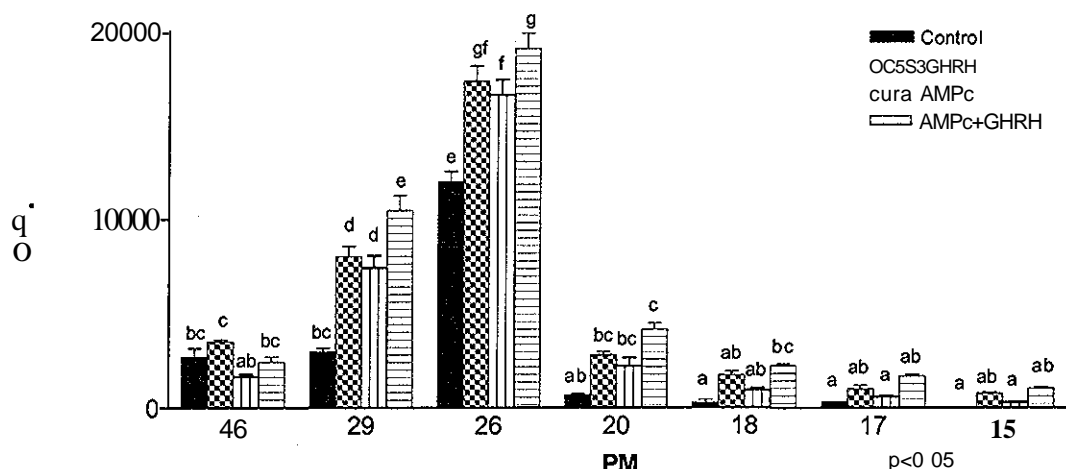


Fig. 34 Densitometría de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio, del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 1mM de 8-bromo-AMPC en M199 durante 2 horas, Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. La A letra = diferencia significativa, PO..05..

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El AMPc provocó una respuesta similar a la observada con la GHRH. Todas las formas moleculares de la cGH observadas en la inmunotransferencia incrementaron en respuesta al tratamiento al analizarlas bajo condiciones reductoras. También de manera similar que con la GHRH, se observó que la forma de 29 kDa incrementa 2,48 veces con respecto al control ( $2989 \pm 184.7$  vs  $7441,6 \pm 644,9$  PO..001) mientras que el monómero incrementó 1,38 ( $11930 \pm 572,4$  vs  $16564,2 \pm 817,2$ ). En el caso de los fragmentos, estos incrementaron hasta 3,6 veces con respecto al control por efecto del AMPc.

Al combinar los tratamientos (AMPc y GHRH) se observó un efecto sinérgico, pues aunque incrementaron casi todas las bandas inmunorreactivas, el efecto diferencial sobre éstas fue mayor. La forma de 29 kDa aumentó 3,5 veces y la de 26 kDa 1,6 veces. El fragmento de 20 kDa incrementó significativamente con respecto al control 6.2 veces y el de 18 kDa 5.4 veces por efecto del AMPc y GHRH juntos (ver figura 34),

Al analizar la concentración relativa de las variantes de cGH contenidas en el medio se puede observar que la forma de 29 kDa incrementó de  $15,9 \pm 0,7$  a  $24,9 \pm 1,2$  %, De acuerdo con estos resultados, el AMPc también favorece la secreción de la forma de 29 kDa de manera muy similar al GHRH, Por el efecto de la combinación del AMPc y la GHRH se observó (figura 35) que el monómero representa el  $46,4 \pm 0,7$  mientras que en los grupos controles representa el  $63,3 \pm 0,8$  %, a diferencia de la forma de 29 kDa que incrementa su concentración relativa por efecto del tratamiento de  $15,9 \pm 0,7$  a  $25,4 \pm 0,7$  %, El dímero y los fragmentos representan el  $5,9 \pm 0,4$  y entre el 10 y 2 % respectivamente. En el caso de los fragmentos de 20 y 18 kDa presentan un incremento significativo por el efecto combinado del AMPc y GHRH ( $3,6 \pm 0,6$  % y  $1,3 \pm 0,8$  % vs  $102 \pm 0,3$  % y  $5,5 \pm 0,5$  %, respectivamente),.

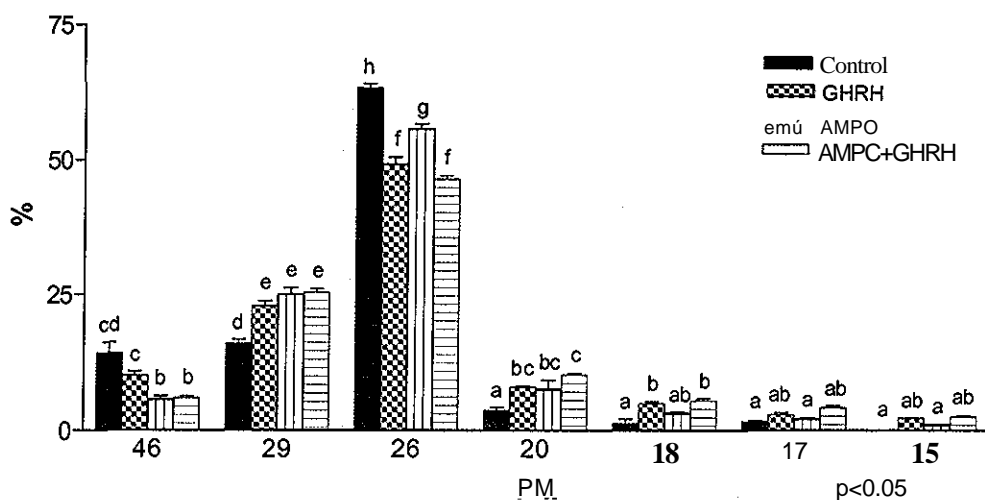


Fig. 35 Concentración relativa de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 1mM de 8-bromo-AMPC, en M199 durante 2 horas., Los resultados representan la media  $\pm$  SEM., La A letra = diferencia significativa,  $P < 0,05$ ,

Otra vía activada por la GHRH en la transducción de la señal intracelular reportada es la vía de la fosfolipasa A. Con el objeto de estimularla y analizar este efecto sobre la liberación de las variantes moleculares de la cGH *in vitro*, las células dispersas de hipófisis fueron tratadas durante 2 horas con un éster de forbol conocido como PMA. En la siguiente figura (36) podemos observar el análisis densitométrico de las variantes de cGH identificadas en el medio de cultivo por los anticuerpos monoclonales y policlonales en la inmunotransferencia, secretadas por efecto del PMA. Es importante destacar que la respuesta observada por este tratamiento es equivalente al encontrado por efecto de la GHRH y del AMPc. La forma de 29 kDa incrementó 3.5 veces ( $2989 \pm 184,7$  vs  $10324,4 \pm 1712,8$ ) mientras que el monómero de 22 kDa incrementó 1.4 veces ( $11930 \pm 572,4$  vs  $17185,8 \pm 724$ ),

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

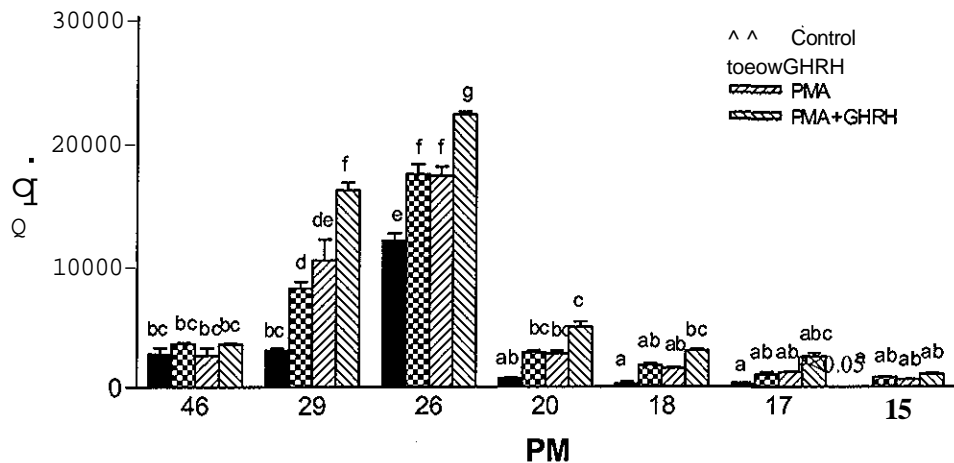


Fig., 36 Densitometría de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 1uM de PMA en M199 durante 2 horas, Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, La A letra = diferencia significativa,  $P < 0,05$ ,

Con la combinación de GHRH y PMA también se observa un efecto sinérgico sobre la liberación de la forma de 29 kDa. Sin embargo, en estas condiciones la respuesta es mayor a la observada anteriormente con el AMPc y GHRH. Esta variante aumentó 5.3 veces ( $2989 \pm 184.7$  vs  $16011.5 \pm 629$ ) y el monómero 1.8 veces ( $11930 \pm 572.4$  vs  $22094.6 \pm 215.8$ ), En cuanto a los fragmentos de 20 y 18 kDa también se observaron incrementos significativos de 7.2 y 11.4 veces con respecto al control por efecto de la combinación de tratamientos.

Al hacer el análisis de la concentración relativa de las variantes moleculares de la cGH encontradas en el medio de cultivo se pudo observar que el monómero representa el  $6.3,28 \pm 0,8$  % en los controles, el  $48,0 \pm 2,4$  % en los tratados con PMA y el  $41.8 \pm 0.7$  % con la combinación de PMA y GHRH. Sin embargo, la forma de 29 kDa incrementa con los tratamientos. En los controles representa el  $14,2 \pm 19$  %, en los tratados con PMA el  $28,3 \pm 2,5$  % y con la combinación de ambos tratamientos el  $30,3 \pm 1,1$  % 8 (ver figura



37), En el fragmento de 20 kDa se observó un incremento significativo por el efecto combinado del PMA y GHRH ( $3.6 \pm 0.6 \%$  vs  $9,2 \pm 0.8 \%$ ).

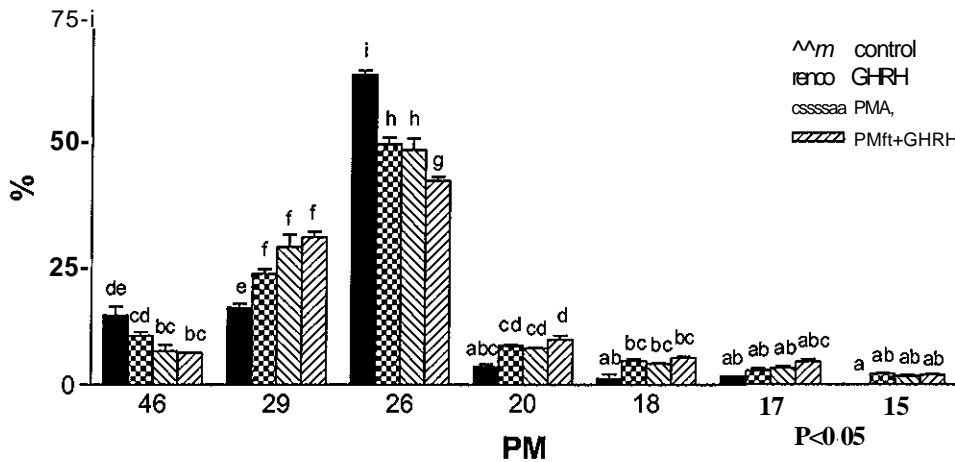


Fig. 37 Concentración relativa de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 1uM PMA, en M199 durante 2 horas, Los resultados representan la media  $\pm$  SEM,, La A letra = diferencia significativa,  $P < 0,05$ ,

Como se mencionó en la sección introductoria, para la liberación de la GH se requiere el incremento de  $Ca^{++}$  citosólico y se sabe que a través de la vía de la adenilato ciclasa se produce el ingreso de  $Ca^{\wedge}$  extracelular. Con el objeto de conocer el efecto de esta movilización de  $Ca^{++}$  sobre la secreción de las variantes de cGH se trataron células dispersas de hipófisis con un ionóforo de  $Ca^{*4n}$  conocido como ionomicina. Al hacer el análisis densitométrico no se observó ninguna respuesta significativa por efecto de este tratamiento. En la figura 38 se muestra la densidad óptica de cada banda inmunoreactiva observada en la inmunotransferencia,,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

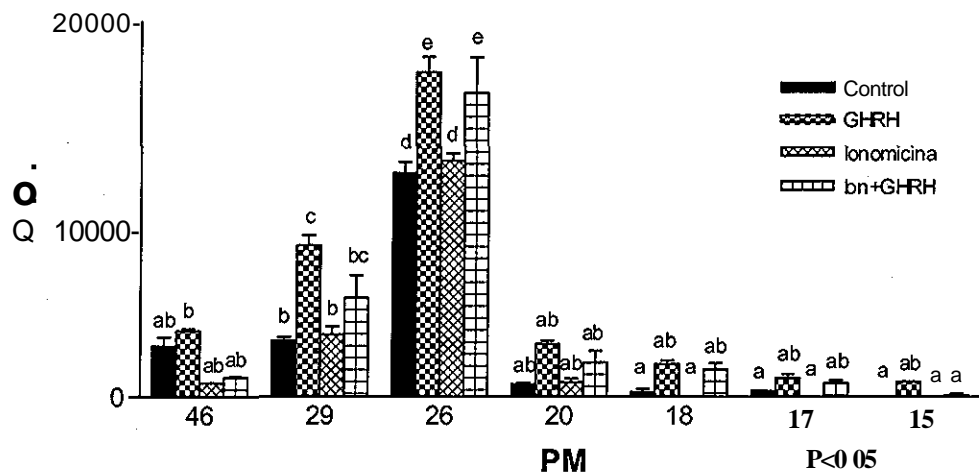


Fig. 38 Densitometría de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 10uM de ionomicina en M199 durante 2 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, La A letra = diferencia significativa,  $P < 0,05$ ,

Sin embargo, al analizar la concentración relativa de las bandas inmunorreactivas se observa que la proporción de monómero incrementa significativamente ( $63.3 \pm 0,8 \%$  vs  $72,4 \pm 1.7 \%$ ) por efecto del tratamiento con ionomicina mientras que en la variante de 29 kDa no se observan cambios (ver figura 39), Al combinar la ionomicina con GHRH se observó que la GHRH parece contrarrestar el efecto de la ionomicina sobre la liberación del monómero, En las células tratadas únicamente con GHRH el monómero representa el  $49,2 \pm 1,3 \%$ , mientras que con la combinación de tratamientos esta forma molecular representa el  $61,6 \pm 1,8 \%$  y en la variante de 29 kDa no se observan cambios significativos entre estos grupos experimentales. Por otro lado, la ionomicina tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación del dímero que no se alteró al combinarla con GHRH,

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

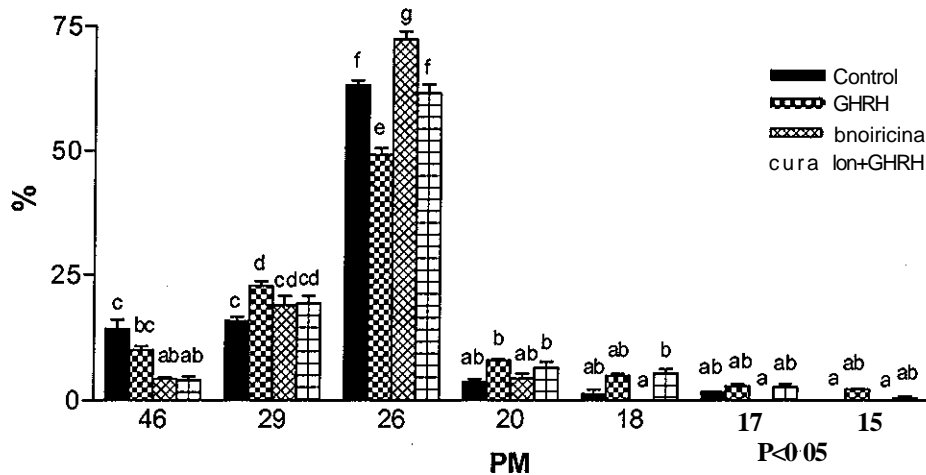


Fig., 39 Concentración relativa de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 10uM de ionomicina en M199 durante 2 horas., Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, La A letra = diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

Por otro lado se sabe que la GHRH estimula tanto la síntesis como la secreción de la GH. Para tener un acercamiento más al mecanismo utilizado por la GHRH para favorecer la secreción de la variante de 29 kDa, se aplicó a las células hipofisiarias en cultivo cicloheximida, un inhibidor del proceso de traducción de RNAm a la cadena peptídica, con objeto de conocer si esta respuesta es independiente de su efecto sobre la síntesis de la proteína. En la figura 40 se muestra el análisis de las bandas inmunoactivas identificadas en el medio de cultivo..

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

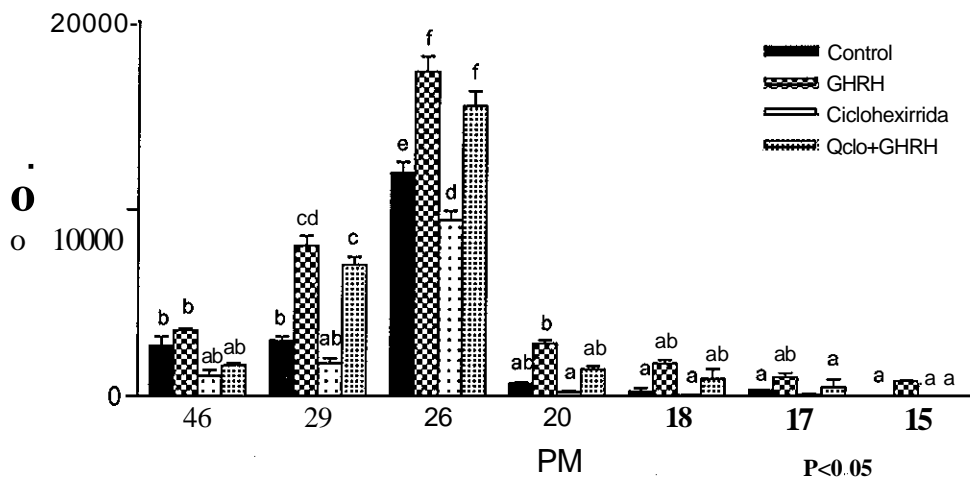


Fig., 40 Densitometría de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 50 ug/ml de cicloheximida en M199 durante 2 horas. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM,, El ^ de letra = diferencia significativa,  $P < 0,05$ ,

Al hacer el análisis densitométrico de las distintas variantes de cGH observadas se identificó una disminución significativa en la inmunoneactividad del monómero ( $9405 \pm 490$  vs  $119.30 \pm 572$ ) y una tendencia similar en el resto de las bandas inmunorreactivas por efecto de la cicloheximida. Sin embargo, este tratamiento parece no interferir con el efecto de la GHRH porque no se observan cambios significativos entre la combinación de tratamientos y la GHRH sola (ver figura 40).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

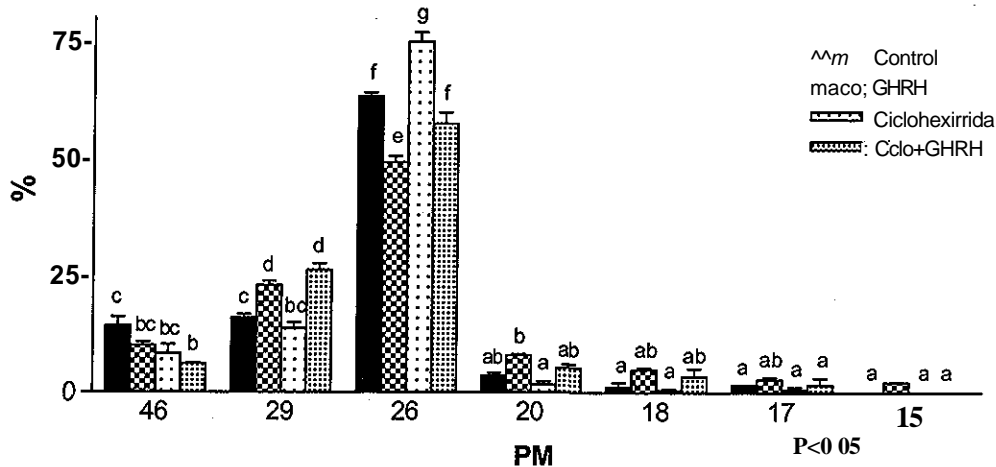


Fig. 41 Concentración relativa de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio, del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 50ug/ml de cicloheximida en M199 durante 2 horas., Los resultados representan la media  $\pm$  SEM., El  $<^*$  de letra = diferencia significativa,  $P < 0,05$ ,

Por otra parte, se comparó el efecto de la GHRH con TRH que es también un secretagogo para la GH en aves. Este péptido, hasta donde se conoce, lleva a cabo su efecto a través de receptores específicos y estimula la vía de fosfolipasa C en la transducción de su señal intracelular, lo que coincide con una de las vías activadas por la GHRH.

Primero se analizó el efecto de la TRH sobre la liberación de la cGH total contenida en el medio de cultivo,. Como se observa en la figura 42 se incrementaron los niveles de cGH en el medio en respuesta al tratamiento, sin embargo, la magnitud de la respuesta es menor que la observada por GHRH en estas condiciones experimentales, Por efecto de la GHRH, los niveles de cGH aumentan 2.8 veces ( $16.0 \pm 1,6$  vs  $45.5 \pm 3.6$  ng totales/pozo) mientras que en respuesta a la TRH incrementa 2 veces ( $32.0 \pm 2,5$  ng totales/pozo),

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

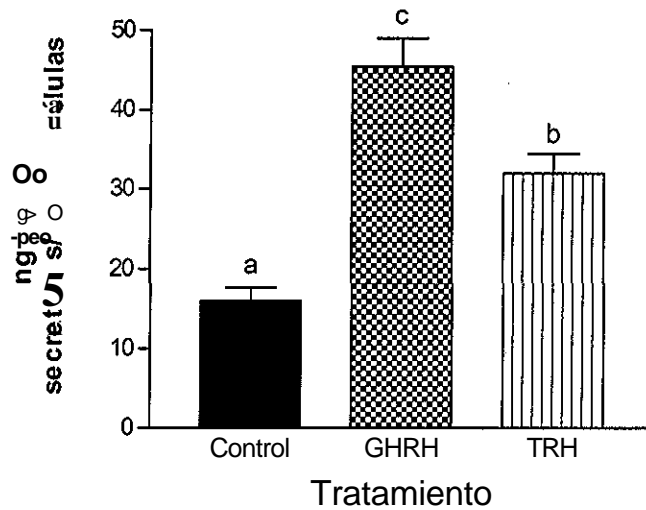


Fig. 42 Concentración de cGH total secretada al medio en cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH o con 3nM de TRH, durante 2 horas,, Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, La Aletra=diferencia significativa  $P < 0.00L$

Posteriormente, se realizó el análisis del efecto de este tipéptido sobre la liberación de las variantes moleculares de la cGH en cultivo primario de pituicitos.. En la figura 43 se muestra la densitometría de las bandas inmunorreactivas separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, En estas condiciones experimentales no se observó incremento de las variantes moleculares de la cGH por efecto de la TRH sólo, sin embargo cuando se combinó con la GHRH se observó un efecto potenciado! de la TRH, La forma de 29 kDa incrementó 4,4 veces con respecto al control ( $2989 \pm 184,7$  vs  $1.3240 \pm 328,1$ ) y 1,6 veces con respecto a los tratados con GHRH ( $8037 \pm 535,2$  vs  $1.3240 \pm 328,1$ ),,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

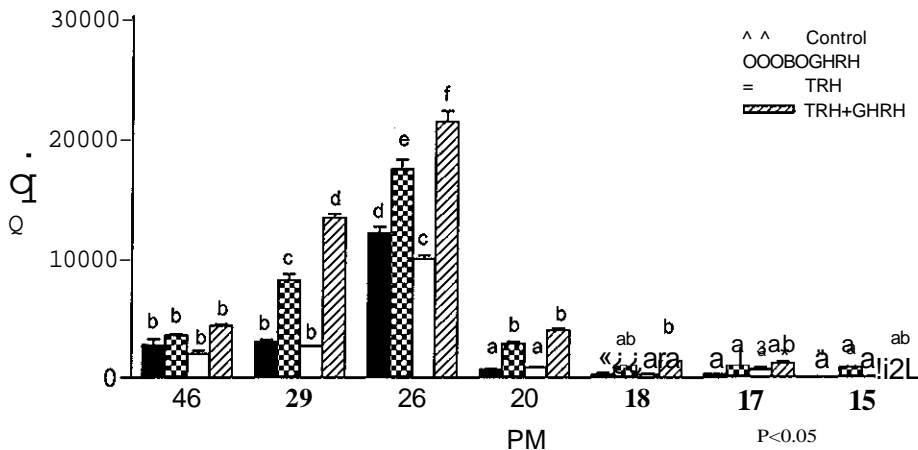


Fig., 43 Densitometría de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 3nM de TRH en M199 durante 2 horas, Los resultados representan la media  $\pm$  SEM,, El •? de letra = diferencia significativa,  $P < 0.05$ ,

El análisis de la concentración relativa de las variantes de cGH (figura 44) muestra que por efecto de GHRH+TRH la forma monomérica (22kDa) representa el  $44,5 \pm 0,9$  % que es mucho menos que en los controles en donde representa el  $63,3 \pm 0,8$  % del total de la inmunoneactividad,, La forma de 29 kDa en cambio representa el  $14,2 \pm 1,9$  % en los controles y  $27,7 \pm 0,2$  % por GHRH+TRH mientras que con GHRH únicamente representa el  $22,8 \pm 0,9$  %, Con este análisis se observó el efecto pontenciador de la TRH sobre la forma de 29 kDa aunque no se observan cambios significativos de la forma monomérica entre el tratamiento con GHRH y la combinación con TRH,

Estos resultados sugieren que cuando se aplicó la TRH solo no se observaron los efectos esperados sobre la vía del fosfato de inositol y diacilglicerol, también estimulada en respuesta al PMA en el que se observó un potente efecto sobre la liberación de la forma de 29 kDa.

TESIS CON  
FALLA DE OEIGEN

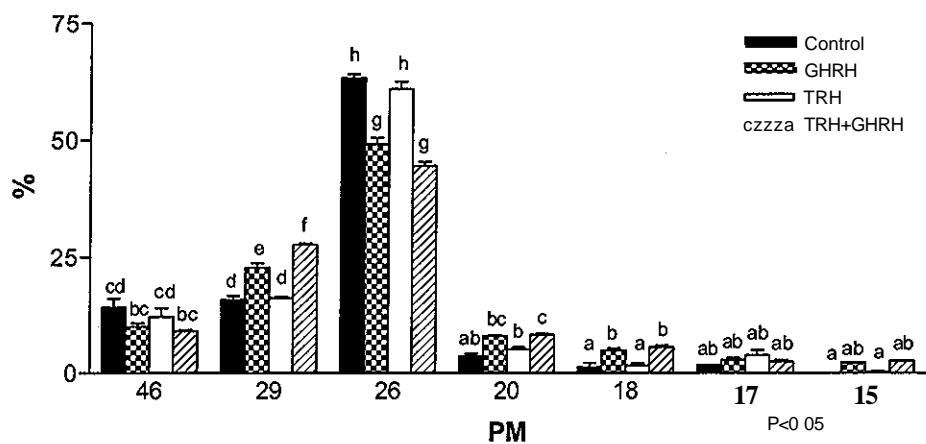


Fig. 44 Concentración relativa de las variantes moleculares de masa separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras, contenidas en el medio del cultivo primario de hipófisis de pollo de 4 semanas de edad tratadas con 2nM de GHRH y 3nM de TRH en M199 durante 2 horas, Los resultados representan la media  $\pm$  SEM, El  $t$  de letra 0 diferencia significativa,  $P < 0,05$ ,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## DISCUSIÓN

La importancia funcional de las variantes moleculares de cualquier proteína se puede analizar<sup>1</sup> desde distintos puntos de vista., Desde una perspectiva evolutiva se ha podido observar en una gran variedad de proteínas que las variaciones estructurales dan origen a entidades moleculares independientes, con funciones biológicas específicas. O bien, desde un punto de vista fisiológico, las moléculas homologas pueden presentar funciones particulares y compartidas. En algunos casos éstas últimas resultan de gran importancia en la llamada plasticidad de un organismo, es decir que incrementa la capacidad de respuesta del individuo ante grandes demandas fisiológicas o en procesos patológicos en los que se presentan ciertas deficiencias,

La GH es una proteína que pertenece a una gran familia que incluye otras hormonas como la PRL y somatolactina. Estas ultimas presentan alta homología estructural y funcional [Havey, 1995], comparten mecanismos de regulación de su síntesis y secreción, de transporte y de acción sobre las células blanco, Aunque todos los miembros de la familia de proteínas presentan efectos similares en los diferentes sistemas de un organismo, cada una se ha especializado en determinadas funciones durante su evolución., Un ejemplo de esto es el efecto de la GH y la PRL sobre el crecimiento longitudinal del cuerpo, ambas tienen efectos similares pero solo la GH resulta indispensable para el desarrollo, La GH no es una entidad molecular única, ya que actualmente se reconoce que además de la forma monomérica de 22 kDa

de origen hipofisiario existen otras formas moleculares de GH producidas a partir de un segundo gen, o de procesamiento alternativo del RNAm o bien, por modificaciones postraduccionales. Los estudios sobre el papel fisiológico de estas formas moleculares son muy escasos y dispersos; sin embargo, existen algunas evidencias sobre la actividad biológica de algunas variantes y la regulación de su síntesis y secreción. En el caso particular de la GH de pollo se han identificado solo variantes moleculares producto de modificaciones postraduccionales y se piensa que pueden estar reguladas durante el desarrollo, porque la proporción de las variantes de masa contenidas en la hipófisis cambia durante la ontogenia [Arribas, 2000]. En el presente estudio se demuestra que el patrón de variantes moleculares secretadas por la hipófisis está sujeto a la influencia de factores que afectan la síntesis y secreción de la GH.

Para analizar la regulación de dichas formas moleculares en este trabajo se estudió el efecto de algunos secretagogos hipotalámicos sobre la secreción de las variantes moleculares de la GH en dos sistemas *in vitro*. En el primero se incubó la hipófisis completa permitiendo el análisis de la respuesta integral de la glándula al estímulo de forma aguda y en el segundo se utilizó un cultivo primario de células hipofisiarias, donde se analizó la respuesta independiente del ambiente fisiológico presente en el organismo completo. Para analizar la respuesta del tejido o de las células al tratamiento se determinó la cGH total secretada al medio utilizando el método de ELISA.

Los métodos para la determinación de la concentración de GH han presentado algunos problemas; por un lado, los niveles en la circulación cambian constantemente durante el día, debido a los ciclos ultradianos de secreción que presenta la hormona. Por otro, porque la afinidad de los anticuerpos utilizados en los diferentes laboratorios es muy variable y porque su afinidad no es equivalente para todas las formas moleculares de la GH. Los niveles de GH circulante se han determinado en diferentes vertebrados a través de radioinmunoanálisis y ELISAs específicos. Aunque existen algunas diferencias entre los distintos reportes el intervalo de concentraciones de cGH está entre 8 ng/ml hasta 260 ng/ml de plasma en pollos desde 18 días

embrionarios hasta adultos. Aunque se sabe que durante la ontogenia los niveles circulantes de la GH cambian, para pollos de 1 semana de edad podemos encontrar valores entre 77 y 260 ng/ml dependiendo del anticuerpo y el método utilizado por el autor [Harvey, 1979, Scanes, 1984, McCann-Levorse, 1993, Huybrechts, 1987]. En el ELISA utilizado para la determinación de cGH en este trabajo se puede observar que el anticuerpo policlonal reconoce la cGH contenida en el medio de cultivo, en extractos hipofisarios y en el plasma. Como se observa en la figura 14, el anticuerpo policlonal presenta alta afinidad por la cGH y baja afinidad por otras moléculas con alta homología como las GHs y prolactinas de otras especies. Además, este ensayo presenta una sensibilidad que permite cuantificar 20ng/ml, que es una concentración menor que las encontradas en el plasma de pollos nacidos de cualquier edad, en los extractos hipofisarios y en los medios de cultivo. Este método para la determinación de cGH mostró que es preciso ( $CV < 5\%$ ), suficientemente sensible y específico. Sin embargo, este resultado sólo permite la determinación de la cGH total contenida en la muestra y no permite diferenciar entre las distintas formas moleculares de la hormona. Se supone que el anticuerpo policlonal utilizado reconoce la mayor parte de las variantes de cGH porque fue producido en conejos inmunizados con el conjunto de GHs purificadas a partir de extractos hipofisarios de pollos de 8 semanas de edad,

Actualmente no existe ningún inmunoanálisis cuantitativo que permita la determinación individual de las concentraciones de las variantes de GH. Pero los cambios en las variantes de masa contenidas en la hipófisis o en el medio de cultivo se pueden determinar utilizando métodos semicuantitativos. En este trabajo, primero se separaron las isoformas de cGH por SDS-PAGE utilizando geles con 12,5 % de acrilamida, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y posteriormente las bandas inmunorreactivas se reconocieron utilizando el anticuerpo policlonal y un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano que emite luz en contacto con el sustrato. Durante la emisión de luz las membranas se expusieron a placas radiográficas y como se muestra en la figura 16 a mayor concentración de proteína inmunorreactiva mayor densidad en la marca sobre la placa radiográfica. Este método permitió observar

cambios en la secreción de algunas variantes de cGH en el medio de cultivo y en los extractos hipofisarios estudiados.

El medio MI99 utilizado para el cultivo de células dispersas provocó distorsiones durante la electroforesis y para evitar esta interferencia, la cGH secretada al medio fue previamente inmunoprecipitada, utilizando un inmunoabsorbente con anticuerpo monoclonal anti-cGH. Como se observa en la gráfica de la figura 15 se mantiene una relación lineal entre la concentración de cGH recuperada de la inmunoprecipitación y la densidad óptica obtenida en los luminogramas, lo cual muestra que se pueden determinar cambios en la secreción de cGH. Con este método se obtiene la doble identificación de las cGH a través de dos anticuerpos distintos; el monoclonal durante la inmunoprecipitación y el policlonal en la inmunotransferencia. El anticuerpo monoclonal está dirigido a un epítipo preferentemente expuesto en la forma monomérica de la cGH. Este hecho explica en parte, la diferencia entre las bandas inmunoreactivas provenientes de las muestras de los medios de incubación de hipófisis completas que no fueron inmunoprecipitadas y las de células dispersas que si lo fueron. En el primer caso (figura 19) se observaron bandas de alto peso molecular (66, 60 y 50 kDa) que no se observan en el segundo (figura 29). Sin embargo, cuando se analizan las muestras de ambos sistemas experimentales en condiciones reductoras -en las que desaparecen las formas de alto peso molecular por desagregación- se observan cuatro variantes moleculares consistentes en todas las condiciones probadas; estas variantes son: un dímero resistente a la reducción con mercaptoetanol, una banda inmunoreactiva de 26 kDa en condiciones no reductoras o de 29 kDa en condiciones reductoras, el monómero de 22 kDa (de 26 kDa en condiciones reductoras) y distintos fragmentos producto de la proteólisis, principalmente uno de 15 kDa presente en condiciones reductoras y no reductoras. Todo lo anterior sugiere que el método utilizado para el análisis de las variantes moleculares de la cGH resulta altamente específico y permite distinguir los cambios en las concentraciones encontradas en el medio de cultivo o en los extractos de hipófisis,

En el primer sistema *in vitro* utilizado, las hipófisis cortadas en cuatro partes de cada individuo se incubaron en solución Earle Normal + el tratamiento durante dos horas, que es tiempo suficiente para la liberación de cGH en respuesta al tratamiento y el segundo sistema constituido de cultivos primarios de células hipofisiarias incubadas también dos horas en MI99 + el tratamiento., En ambos casos se observó la secreción de las variantes de cGH al medio de cultivo en respuesta a la GHRH que es el secretagogo más importante de GH en la mayoría de las especies de vertebrados. En el primer sistema se mantienen las relaciones anatómicas dentro de la glándula y con esto las interacciones entre las distintas células de la hipófisis y los somatotropos. Además se trata de una incubación aguda que mantiene las condiciones fisiológicas del animal, es decir, las características de altos niveles de síntesis y secreción presentes en los pollos de 4 semanas de edad que se encuentran en una etapa de crecimiento rápido, y de acuerdo con los reportes sobre la ontogenia de los niveles de GH circulante se observa que a esta edad los pollos presentan un pico de secreción de GH [Havey, 1979]. En comparación con este sistema las células dispersas no mantienen sus relaciones anatómicas con el resto de la glándula pero pueden presentar algunas de las relaciones paracrinas con otras células hipofisiarias. El cultivo celular se mantiene durante 48 horas en las condiciones óptimas para asegurar su viabilidad y su capacidad de respuesta, esto provoca además la eliminación de la influencia de la condición fisiológica propia del animal

Para llevar a cabo los experimentos en el sistema de hipófisis completas se realizó una curva dosis respuesta estimulando con GHRH (ver figura 16). Con esto se determinó por un lado que el sistema de incubación es apropiado para observar la respuesta al secretagogo y que es dependiente de la dosis. A partir de este análisis se decidió usar para los siguientes experimentos una dosis de 2nM de GHRH porque es cercana a la  $IC_{50}$  y se obtuvo la menor variabilidad en la respuesta. Además, coincide con reportes previamente publicados en los que en diferentes sistemas *in vitro* utilizan 2 nM de GHRH como dosis óptima para observar incrementos en los niveles de secreción de GH [Pérez, 1989].

En los dos sistemas de análisis se puede apreciar el efecto del GHRH sobre la glándula hipófisis. Por un lado en las figuras 17 y 27 se observa un incremento de cGH secretada cercano al doble o triple (1.98 y 2.84 veces), respectivamente, por efecto del tratamiento y en la figura 18 se puede observar mayor densidad en las bandas inmunorreactivas de los medios de las hipófisis tratadas. Esto confirma que la GHRH humana de 44 aminoácidos de origen recombinante (Sigma) utilizada es un potente y específico estimulador de la secreción de cGH *in vitro*. Esto es consistente con reportes previos en los que la GHRH humana de origen pancreático e hipotalámico recombinante produce la secreción de GH en aves y otras especies [Pérez, 1989, Solimán, 1994, Malagon, 1991]. La diferencia entre las respuestas observadas en los dos sistemas experimentales puede tener relación por un lado, con el acceso del secretagogo a los somatotropos, que es mayor en las células dispersas y es donde se presenta la mayor respuesta (2,84 veces), y por otro, con la influencia del estado fisiológico de los animales en el sistema agudo de hipófisis completas que puede estar mediando la respuesta a la GHRH.

En cuanto a la respuesta de las variantes a la GHRH en el sistema de hipófisis completas y en células dispersas se observó consistentemente que la forma de 26 kDa en condiciones no reductoras (o 29 kDa en condiciones reductoras) se incrementa preferentemente sobre otras formas moleculares, en particular con respecto a la forma monomérica de la cGH. En la figura 18 se pueden observar las mismas bandas inmunorreactivas en controles y tratadas con GHRH, sin embargo, la inmunoreactividad es diferente entre los grupos. Cuando se granearon los valores de la densitometría (figura 19) se observó que todas las bandas aumentaron por efecto de la GHRH pero la de 26 kDa aumentó 4.4 veces, mientras que la de 22 kDa aumentó sólo 2.24 veces con respecto al control. Este resultado indica que la GHRH favorece la secreción de la forma de 26 kDa sobre la de 22 kDa. Con el análisis de la concentración relativa (figura 20) se puede ver que en los controles la forma de 22 kDa representa aproximadamente el 40 % ( $40.5 \pm 1.6$  %) y la de 26 kDa el 20 % ( $20.4 \pm 1.2$  %) y mientras el porcentaje de la primera disminuye el de la segunda aumenta ( $\gg 28$  y  $27$  % respectivamente) con el tratamiento. Esto

puede sugerir que la formación de la variante de 26 kDa puede ser a expensas de la forma monomérica. Existe una forma molecular reportada de aproximadamente 24 -25 kDa presente en la hipófisis de pollos. Esta variante molecular representa una forma cortada del monómero de cGH, que desaparece en condiciones reductoras, formándose 2 fragmentos uno de 15 kDa y otro 7 kDa [Arámburo, 2001]. Otra forma molecular reportada con un peso molecular aparente semejante a la forma de 26 kDa es la forma glicosilada de la cGH que presenta un peso molecular de 29 kDa en condiciones reductoras [Arámburo, 1991] y puede corresponder con la forma de 25 kDa en condiciones no reductoras [Arámburo, 2000]. En cualquiera de los dos casos, estas formas moleculares de la cGH son producto de modificaciones postraduccionales de la forma monomérica. La forma de 26 kDa en este trabajo podría corresponder con alguna de estas variantes previamente reportadas. Con los resultados obtenidos en condiciones reductoras y en la detección de carbohidratos, que se pueden observar en la figura 21, se descarta la posibilidad de que corresponda a la forma cortada de la cGH, porque en estas condiciones desaparece la banda correspondiente y se sigue observando un incremento en la banda de 29 kDa (o 26 kDa en condiciones no reductoras). Por otro lado, los datos sugieren que se trata de la cGH glicosilada, pues presenta bandas positivas a carbohidratos que presentan una movilidad relativa equivalente a la forma de 29 kDa en estas condiciones.

Como ya se mencionó en la introducción, existen referencias sobre variantes moleculares glicosiladas de GH en algunas especies [Bedecarrats, 1999; Berghman, 1987]. Se sabe que una proporción elevada de hGH-V está glicosilada y es congruente con la presencia de un sitio de glicosilación tipo N localizado en la secuencia de esta isoforma [Havey, 1995]. Aunque en la hGH-N no está presente este sitio de glicosilación el 1 % de la GH contenida en la hipófisis de humanos se encuentra glicosilada, por esta razón se piensa que puede presentar uniones tipo O con los oligosacáridos [Scanes, 1995]. En el caso del pollo se determinó que una pequeña proporción de la GH hipofisiaria está glicosilada [Arámburo, 1991; Montiel, 1992]. Es muy probable que sea una glicosilación tipo N porque en la secuencia presenta un sitio potencial de glicosilación en el

extremo carboxilo terminal (Asn<sub>188</sub>-Cys<sub>189</sub>-Thi<sub>190</sub>) y es desglicosilada por la PNGasa F (péptido-N-glicosidasa F) que es una endoglicosidasa específica para sitios de unión tipo N de glicoproteínas (GlcNAc-Asn) [Beúmen, 1999]. Este tipo de glicosilación se lleva a cabo durante la traducción de la proteína en el retículo endoplásmico, por lo que la modulación de la formación de esta variante molecular requiere de síntesis *de novo* de la hormona,

Como un primer acercamiento se analizó el contenido de cGH en las hipófisis después de la incubación con el tratamiento de GHRH (figura 22),. Aparentemente no se observan diferencias significativas en el contenido de cGH total medido por ELISA. Esto puede indicar que la cantidad de cGH secretada está siendo recuperada por hormona nueva o que la hormona de reciente formación es la que está siendo secretada. Al analizar las variantes moleculares contenidas en estas hipófisis se observó que la inmunoreactividad correspondiente a la cGH monomérica no se modificó, mientras que las formas de 26 y 44 kDa aumentaron por efecto de la GHRH, lo que sugiere que durante la incubación de las hipófisis se está sintetizando cGH y que la proporción de variantes es diferente cuando es estimulado con este secretagogo.

Para poder estudiar el mecanismo a través del cual se forma la variante de 26 kDa por efecto de la GHRH se llevaron a cabo estudios en células dispersas,. En primer lugar se identificó la presencia de somatotropos en el cultivo primario de hipófisis, para esto se utilizó una inmunotinción con anticuerpo monoclonal contra cGH, En la figura 26 se pueden observar las células positivas a cGH y los controles que fueron fijados y tratados de manera similar, excepto por la ausencia de 1er anticuerpo (panel C) en la que no se observan células positivas a la inmunotinción. Se observó en la inmunocitoquímica que las células control mostraban una mayor<sup>1</sup> inmunoreactividad que las tratadas con GHRH, debido a que durante el tratamiento se estimula la secreción de la hormona, que en condiciones control almacenan mayor cantidad de la proteína en los granulos. En este sistema las células presentan mayor respuesta a la GHRH (2.84 veces con respecto al control) que en las hipófisis completas como se puede observar en la figura



27. Comparado con otros autores que han utilizado GHRH en cultivos primarios de hipófisis, la respuesta observada en este trabajo es similar (cercana al doble), en relación con el número de células y tiempo de incubación con el tratamiento [Pérez, 1987]. Tanto en condiciones no reductoras como en condiciones reductoras se observa un incremento diferencial de las variantes de cGH inmunorreactivas a los dos tipos de anticuerpos utilizados (monoclonal y policlonal). En condiciones no reductoras se observan claramente tres bandas inmunorreactivas: una que corresponde con la forma monomérica de 22 kDa, una de 26 kDa y otra de 44 kDa. En la figura 30 se puede observar que la concentración relativa de la forma de 26 kDa aumenta mientras que el monómero representa 5 % menos que en los controles ( $70 \pm 0,5$  y  $65 \pm 1,6$  %, respectivamente). En condiciones reductoras (figura 32) se puede observar un efecto similar sobre la concentración relativa del monómero y la forma de 29 kDa (o 26 kDa en condiciones no reductoras) donde en la primera disminuye su proporción y en la segunda aumenta. Esto indica que el efecto de la GHRH sobre la formación de esta variante de 26 ó 29 kDa (de acuerdo con las condiciones de separación) es equivalente en cualquiera de los dos sistemas *in vitro* utilizados para su estudio.

Se sabe que los receptores de GHRH en los somatotropos están asociados a proteínas G y que activan la vía de la adenilato ciclasa [Petersen, 2000]. Por los resultados obtenidos al estimular a las células con un análogo permeable del AMPc se puede sugerir que esta vía puede favorecer el incremento en la secreción de esta variante de 29 kDa (en condiciones reductoras). Sin embargo, al observar<sup>1</sup> los resultados de las figuras 33 y 34 donde se analizan tanto la concentración relativa como la densidad óptica de las bandas inmunorreactivas, se aprecia una mayor respuesta en presencia de GHRH que con el 8-bromo-AMPc solo, esto puede deberse a las dosis utilizadas de cada tratamiento o bien que existe un efecto sinérgico. Los resultados muestran que el incremento de la inmunoreactividad de la banda de 29 kDa por efecto de la combinación de tratamientos es significativamente mayor que con los tratamientos individuales y en la forma de 22 kDa no se observa diferencia entre los tratados solo con GHRH y con la combinación GHRH + 8-bromo-

AMPC. El efecto sinérgico de los tratamientos indican la activación de al menos una segunda vía de señalización intracelular, En la literatura está reportado que la GHRH activa la vía de la fosfolipasa/fosfato de inositol que aunque aún no es muy clara la cascada de segundos mensajeros involucrada en la síntesis y/o liberación de la GH se sabe que provoca la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular en los somatotropos [Havey, 1995]. Para estimular esta vía se utilizó PMA en los experimentos de células dispersas,, Como se muestra en las figuras 35 y 36 el tratamiento tuvo un efecto parecido a la GHRH. Sin embargo, con la combinación de tratamientos se pudo observar un efecto sinérgico con la GHRH mucho más claro que con la combinación de GHRH y AMPC.

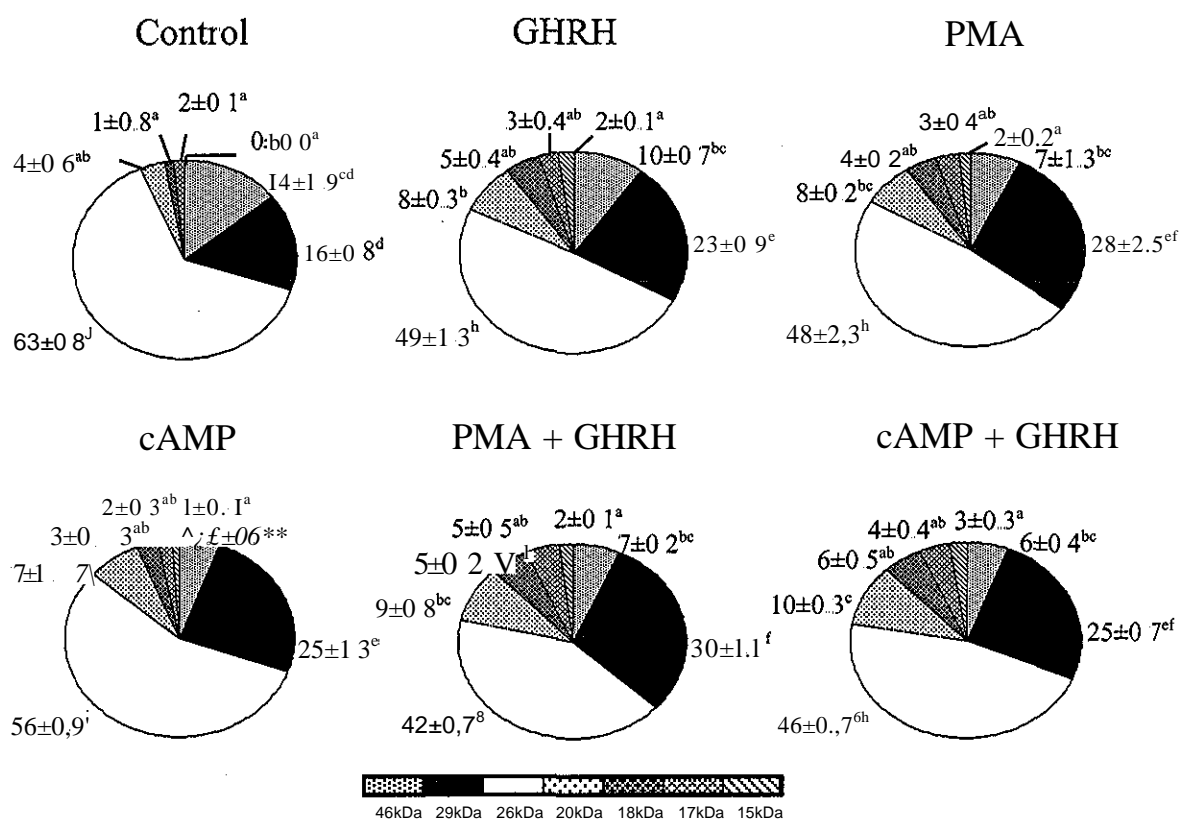


Fig. 45 Concentración relativa (%) de las variantes inmunorreactivas de cGH del medio del cultivo primario de células hipofisarias analizadas por SDS-PAGE (CR) e inmunotransferencia después de diferentes tratamientos, La diferencia de letra significa diferencia estadística  $p < 0,05$ ,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Como se muestra en la figura 45 el monómero representa la mayor parte de la hormona secretada *in vitro*. Sin embargo, con los distintos tratamientos utilizados en este trabajo se puede observar que la proporción de la forma de 26 kDa disminuye (de 63 a 49 % con GHRH), mientras que las otras isoformas de la cGH en conjunto aumentan (de 37 a 51 % con GHRH). Particularmente se puede observar que las formas moleculares que se ven favorecidas con los tratamientos son la de 29 kDa y las submonoméricas, y que además de la forma monomérica el dímero también disminuye con los tratamientos (de 14 a 10 % con GHRH),.

Los resultados anteriores indican que ambas vías de señalización intracelular pueden estar involucradas en la formación de las variantes moleculares de GH producidas a partir de modificaciones postraduccionales,. Para corroborar la participación específica de cada una de estas vías y los factores involucrados en la glicosilación de la forma monomérica u otros cambios postraduccionales de la hormona se requieren de otros estudios en los que se analice el efecto de bloqueadores específicos de las posibles enzimas involucradas y de la estimulación con otros secretagogos inespecíficos,. Como un primer acercamiento al estudio del papel del  $Ca^{+2}$  extracelular en la formación de la forma glicosilada de la hormona se trataron las células con un ionóforo de  $Ca^{+2}$  llamado ionomicina,. Con este tratamiento se observó que aparentemente no hubo cambios significativos con respecto al control. Sin embargo, como se observa en la gráfica 38 la proporción relativa del monómero aumentó con respecto al control y con respecto a las células estimuladas con GHRH mientras que la forma de 29 kDa no presentó cambios significativos. Aunque para analizar la participación del  $Ca^{+2}$  se requiere de diferentes estudios adicionales, estos datos sugieren que la movilización de  $Ca^{+2}$  extracelular puede no estar involucrada en la glicosilación de la cGH.

Por otra parte, y como se mencionó anteriormente el posible mecanismo de glicosilación requiere de síntesis *de novo*, por lo que es importante corroborar si en el corto periodo de incubación con el tratamiento se aprecia suficientemente la síntesis de la hormona,. Para este efecto se utilizó un inhibidor de la traducción del RNAm llamado cicloheximida. Aparentemente

no se obtuvo ningún efecto diferencial con este tratamiento y el efecto de la GHRH sobre la liberación de las variantes parece independiente de la síntesis de la hormona. Sin embargo, en la gráfica 39 se observa una disminución significativa en la densidad óptica de la forma monomérica y un incremento en su proporción relativa (fig. 40). Esto puede indicar que al menos una cierta proporción de cGH está siendo traducida durante la incubación de 2 horas. Para corroborar estos estudios es necesario realizar experimentos con incorporación de aminoácidos marcados para identificar la hormona de reciente formación y la que se encuentra almacenada en los somatotropos antes del tratamiento.

Otro de los reguladores de la síntesis y la secreción de la GH en aves es la TRH. Sin embargo, como se observa en la figura 41 su efecto resultó menos potente que el de GHRH tanto en la secreción de cGH total al medio como su efecto sobre las variantes (Figs., 42 y 4.3). Cuando se trataron las células dispersas con la combinación de TRH y GHRH se observó un efecto sinérgico en la liberación de la forma de 29 kDa y la forma monomérica. Esto coincide con reportes previos en los que se observó este efecto potenciador de la TRH sobre la liberación de cGH total en células dispersas de hipófisis de pollo tratadas con GHRH [Pérez, 1987]. También se sabe que ambos secretagogos estimulan las mismas vías intracelulares de segundos mensajeros en los somatotropos para la GHRH y tirotropos para la TRH. Así que estos datos indican que la TRH puede estar activando estas vías en los somatotropos de pollo,

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis de que la síntesis y liberación de las variantes moleculares de la GH son reguladas de acuerdo al estado fisiológico del animal y en este control pueden estar involucrados entre otros los factores hipotalámicos conocidos por sus efectos sobre la síntesis y liberación de esta hormona. Resulta interesante que en respuesta a la estimulación por un potente secretagogo como lo es la GHRH se produzca una forma molecular que presenta mayor vida media en la circulación [Berghman, 1987, 1994] y posiblemente una menor afinidad por los receptores a GH. Es decir que la elevación en la producción de esta hormona

provoca una forma secundaria de regulación sobre su efecto biológico en los diferentes órganos blanco.

Como se cita en la introducción, existen otras hormonas parecidas a la GH como la PRL, que también presentan una variante glicosilada modulada de acuerdo con el estado fisiológico del animal [Bedecarrats, 1999]. En los estudios realizados en aves (guajolote) se observó que la relación entre las formas glicosilada y no glicosilada cambia de acuerdo al momento del ciclo reproductivo de las hembras. Aunque no se conoce la función específica de la PRL glicosilada, estos datos sugieren que la glicosilación de esta hormona tiene importancia funcional durante la reproducción.

Asimismo, en el caso de la GH los cambios en la proporción de las diversas formas moleculares pueden contribuir<sup>1</sup> tanto con efectos específicos sobre las diferentes células del organismo como con la regulación postsecreción de los mismos.

Este trabajo da pie a una serie de interrogantes sobre el papel funcional de las variantes moleculares de la GH y sobre los mecanismos involucrados en el control de su síntesis y liberación al torrente circulatorio. Resulta entonces interesante explorar tanto los mecanismos neuroendocrinos que participan en esta regulación, como las cascadas intracelulares activadas durante la síntesis de las diversas formas moleculares de la GH. Se conocen una gran variedad de factores que regulan la síntesis y/o la secreción de la GH a nivel de los somatotropos. En la mayoría de estos factores se desconoce el mecanismo intracelular activado. Con ayuda de estos factores así como de activadores y bloqueadores de las cascadas de segundos mensajeros se pueden explorar los mecanismos involucrados en la formación de las diferentes variantes moleculares de la GH. Por otro lado, se sabe que ciertos tejidos extrahipofisarios sintetizan GH y su forma más abundante en algunos de ellos no corresponden a la forma monomérica hipofisaria. Es interesante estudiar los mecanismos involucrados en la formación de estas variantes moleculares de GH y su papel funcional en dichos tejidos. Esto ayudaría a entender las situaciones fisiológicas o patológicas en la que determinadas formas moleculares de la hormonas presentan una participación preferencial,

## CONCLUSIONES

El método utilizado para el análisis de las variantes de masa de la cGH permitió evaluarlas de manera específica y semicuantitativa,

El efecto de la GHRH sobre la liberación de las variantes de GH favoreció la liberación de la forma de 26 kDa (CNR) sobre la forma más abundante de la hormona que es la forma monomérica (22 kDa), independientemente del sistema de cultivo utilizado,

La forma de 26 kDa (29 kDa bajo CR) puede tratarse de la forma glicosilada de la hormona porque coincide con el peso molecular previamente reportado para esta variante y por la identificación positiva a carbohidratos en esta banda inmunorreactiva a cGH.

La glicosilación de la cGH puede involucrar las vías del adenilato ciclasa y la fosfolipasa C que son activadas normalmente por la unión de la GHRH a su receptor en los somatotropos, porque el efecto del 8-bromo-AMPC y PMA reproducen el efecto observado con el tratamiento con GHRH.

La TRH reproduce también el efecto de la GHRH aunque con diferente magnitud posiblemente porque estimula las mismas vías intracelulares de segundos mensajeros.

El efecto de la GHRH sobre la glicosilación de la cGH puede ser independiente de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular ya que la ionomicina favorece la liberación de la forma monomérica a diferencia del efecto observado con GHRH.

En este trabajo se demostró que las variantes moleculares de la cGH pueden estar sujetas a control diferencial de su secreción (y posiblemente su síntesis), lo que apoya la hipótesis de que la diversidad funcional de la hormona puede ser explicada por su heterogeneidad molecular.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Meguid SS, Shieh HS, Smith WW, Dayringer HE, Violand BN & Bentle LA, (1987). Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone., *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 6434-6437.,
2. Águila MC & McCann SM, (1987). Evidence that growth hormone-releasing factor stimulates somatostatin release in vitro via beta-endorphin. *Endocrinology* **120**, 341-344.,
3. Águila MC, (1998). Somatostatin decreases somatostatin messenger ribonucleic acid levels in the rat periventricular<sup>1</sup> nucleus, *Peptides* 19, 1573-1579.,
4. Alderson JW., (1971),, Enterosecretory proteins., *Nature* 29, 321-325.,
5. Arámburo C, Campbell RC & Scanes GG. (1989), Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants. *Life*, *Sci.* 45, 2201-2207.,
6. Arámburo C, Carranza M, Sánchez R & Perera G. (1989). Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH), Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated, *Gen. Comp. Endocrinol*, 76, 330-339.,
7. Arámburo C, Donoghue D, Montiel JL, Berghman LR & Scanes GC, (1990). Phosphorylation of growth hormone., *Life Sci.*, 47, 945-952.
8. Arámburo C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S & Sánchez R. (1990), Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): Different bioactivities of cGH charge variants *Gen Comp Endocrinol*, 80, 59-67.,



9. Arámburo C & Scanes GC (1991). Endogenous cleavage of chicken growth hormone., *73rd, Annual meeting of the Endocrine Society*, (abst.2.32) June 19-22, Washington, D., C, USA.,
10. Arámburo C, Navarrete S, Montiel JL, Sánchez R & Berghman LR. (1991). Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): Evidence of G-cGH isoforms. *Gen. Comp., Endocrinol* 84, 135-146.,
11. Arámburo C, Montiel JL, Proudman JA, Berghman LR & Scanes CG. (1992). Phosphorylation of prolactin and growth hormone. / *Mol Endocrinol.* 8, 183-191.,
12. Arámburo C, Montiel JL, Sánchez R, Perera G, Navarrete S, Cananza M, García-Moreno J & Fenton B, (1993). La hormona del crecimiento de pollo: Una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional. *Memorias del Congreso conmemorativo de Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM*, t. I. México, UNAM., Pags, 483-499,
13. Arámburo C, Carranza M, Martínez H, & Luna M. (1997). A comparative overview of growth hormone: proteins and genes. In: *Advances in comparative endocrinology*, Eds., *Monduzzi Editóte Yokohama*, Japón, pp 893-898.
14. Arámburo C, Luna M, Cananza M, Reyes M, Martínez-Coria H & Scanes CG. (2000). Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken *Proc. Soc, Exp. Biol. Med*, 22.3, 67-74.
15. Arámburo C, Cananza M, Martínez-Coria H, Reyes M, Berúmen L, López J, Pascacio H, Huerta L & Luna M. (2001), Molecular and functional heterogeneity of growth hormone, In: *Avian endocrinology.. A*, Dawson & CM Chatuivedi Eds., New Delhi, India. Pags. 27.3-286.
16. Arámburo C, Cananza M, Reyes M, Luna M, Martínez-Coria H Berúmen L and Scanes GC. (2001). Characterization of a bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone., *Endocrine* 15,231-240.,

17. Argente J & Chowen JA. (1994), Neuroendocrinology of growth hormone secretion,, *Growth, Genetics and hormones*, 10, 1-5.
- 18., Asada N, Takahashi Y, Wada M, Naito N, Uchida H, Ikeda M & Honjo M. (2000), GH induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes stably expressing hGHR: analysis on signaling pathway and activity of 20K hGH. *Mol, Cell. Endocrinol.*, **162**, 121-129.,
- 19., Baldwin GS, Grego B, Hearn MT, Knesel JA, Morgan FJ & Simpson RJ. (1983), Phosphorylation of human growth hormone by the epidemial growth factor-stimulated tyrosine kinase., *Proa. Nati Acad., Sel, USA* 80, 5276-5280.,
- 20., Baumann G, Stolar MW & Buchanan TA. (1986). The metabolic clearance, distribution, and degradation of dimeric and monomeric growth hormone (GH): implications for the pattern of circulating GH forms. *Endocrinology* 9, 1497-1501.,
21. Baumann G, Davila N, Shaw MA, Ray J, Liebhaber SA & Cooke NE, (1991). Binding of human growth hormone (GH)-variant (placental GH) to GH-binding proteins in human plasma., *J Clin., Endocrinol. Metab.*, 1175-1179,
22. Bedecarrats G, Guemene D, Kuhnlein U & Zadwoiny D, (1999). Changes in levels of immunoreactive prolactin isoforms during a reproductive cycle in turkey hens., *Gen. Comp. Endocrinol*, **113**, 96-104.,
23. Bedecarrats G, Guemene D, Morvan C, Qisostomo-Pinto S, Kuhnlein U & Zadwoiny 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.,
- 24., Berghman LR, Lens P, Decuypere E, Kühn ER & Vandensande F, (1987). Glycosylated chicken growth hormone, *Gen, Comp. Endocrinol*, 68, 408-414.,
25. Berghman LR, Buyse J, Huybrechts LM, Darías VM, Vandensande 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. Pharmacol, Toxicol., Endocrinol.*, **108**, 161-169.
- 26, Bertherat J, Bluet-Pajot MT & Epelbaum J, (1995), Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur, J. Endocrinol.*, 132, 12-24.
  - 27, Berumen LC, Luna M, Cananza M, Coria HM y Arámburo C. (1999). Purificación y caracterización parcial de la variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo (G-cGH). XLII Congreso Nacional de la Sociedad de Ciencias Fisiológicas, Zacatecas, Zac.
  - 28, Bewley TA & Li CR, (1970), Primary structures of human pituitary growth hormone and sheep pituitary lactogenic hormone compared. *Science* **168**, 1361-1362.
  - 29, Billestiup N, Mitchell RL, Vale W & Verma MI. (1987). Growth hormone-releasing factor<sup>1</sup> induces c-fos expression in cultured primary pituitary cells., *Mo! Endocrinol*, 1, 300-305,.
  30. Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Gourdji D, Hammond C, Kordon C. (1998) Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cell Mol Neurobiol* Feb;18(1):101-23 2001,.
  31. Bonatena M, De Paul A, Aoki A & Torres A, (1998). Residual effects of thyroid hormone on secretory activity of somatotroph population. *Exp, din. Endocrinol. Diabetes* **106**,494-499,.
  - 32, Boockfor FR, Hoeffler JP & Frawley LS. (1986), Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. *Am J Physiol* 250,E103-105.
  33. Bruhn TO, Rondeel JM, Bolduc TG & Jackson MI (1994), Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary, III, Stimulation by thyroid hormone: potentiation by glucocorticoids. *Endocrinology* **134**, 826-830,.
  34. Carter Su C, Schwartz J & Smith LS, (1996). Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu., Rev Physiol* 58,18-207,
  35. Castaño JP, Torronteras R, Ramirez JL, Gribouval A, Sánchez-Hormigo A, Ruiz-Navarro A, Gracia-Navano F. (1996), Somatostatin increases growth hormone (GH) secretion in a subpopulation of porcine somatotropes:

- evidence for functional and morphological heterogeneity among porcine GH-producing cells. *Endocrinology* 1996 Jan;137(1):129-36
36. Creighton, TE (1993), *Proteins Structure and molecular properties*, WH Freeman and Company, 2<sup>nd</sup>, New York.
  - 37.. Cunningham BC, Ultsch M, DeVos AM, Mulkenin MG, Clauser KP & Wells JA. (1991), Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by single hormone molecule. *Science*, 254, 821-825.
  - 38, Chen HT, Pan FK & Chang WC, (1988) Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA, *Biochim. Biophys. Acta* 949,247-251
  - 39.. Chen HT, Shambloott M, Tang LY-L, Chan K-M, Cheng CM, Yang B-Y & Maish A, (1994), Structure and evolution of fish growth hormone and insulin-like growth factor genes., *In Perspectives in comparative endocrinology* (National Research Council of Canada), Canada, pp.352-364
  40. Chen WY, Chen NY, Yun J, Wight DC, Wang XZ, Wagner TE & Kopchick JJ. (1995). Amino acid residues in the third alpha-helix of growth hormone involved in growth promoting activity. *Mol. Endocrinol.* 9, 292-302.
  41. Darvas VM, Rudas P, Visser TI, Hall TR, Huybichte LM, Vanderpooten A, Berghman LR, Decuypere E, Kuhn ER. (1993). Endogenous growth hormone controls high plasma levels of 3,3',5-triiodothyronine (T3) in growing chickens by decreasing the T3-degrading type III deiodinase activity., *DomestAnim Endocrinol* Jan;10(1):55-65
  42. Delemarre-van de Waal HA, Burton KA, Kabigting EB, Steiner RA & Clifton DK. (1994), Expression and sexual dimorphism of galanin messenger ribonucleic acid in growth hormone-releasing hormone neurons of the rat during development. *Endocrinology* 134:665-71
  43. Devesa J, Lima L & Tresguerres TAF. (1992)., Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol Metab.* 3, 175-183.

44. Enemar A, (1967), Ontogeny of the hypophysial growth-promoting activity in the chick., *Lab., Anim.*, 6, 23-31 >
45. Frankenne F, Closset J, Gómez F, Scippo ML, Smal J & Hennen G. (1988).. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. / *Clin. Endocrinol., Metab*, 66, 1171-1180.,
46. Frankenne F, Rentier-Delrue F, Scippo ML, Maitial J & Hennen G (1987). Expression of the growth hormone variant gene in human placenta, / *Clin. Endocrinol., Metab*, 64, 6.35-7.,
47. Fujikawa T, Kaneko H, Hibasami H, Sakaguchi K, Alam KS, Tanaka M, & Nakashima K., (1998), Inverse effects of 20K and 22K human growth hormones on the growth of T-47D human breast cancer cells in culture and in nude mice, *Biochem., Mol., Biol Int.* 46, 719-724.,
48. Goffin V, Shiverick KT, Kelly P & Martial JA. (1996). Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals., *Endocr. Rev.* 4, 385-409.
49. González-Parra S, Chowen JA, García Segura LM & Argente J, (1996). Ontogeny of pituitary transcription factor-1 (Pit-1), growth hormone (GH) and prolactin (PRL) mRNA levels in male and female rats and the differential expression of Pit-1 in lactotrophs and somatotrophs. *J Neuroendocrinol.* 8, 211-225.,
50. Goodman HM, Tai L-R, Ray J, Cooke NE & Liebhaber SA. (1991). Human growth hormone variant produces insulin-like and lipolytic responses in rat adipose tissue., *Endocrinology* 129, 1779-1783.,
51. Gould J, Arámburo C, Capdevielle M & 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 Sci* 8, 587-594.,
52. Hardiel 1991
53. Hansen GN, Hansen BL & Schaner B. (1988). Diversity of prolactin systems in the insect *Leucophaea maderae*: use of antiserum polyclonality

- fox immunocytochemical detection of neuropeptide heterogeneity, *Cell Tissue, Res.* **252**, 557-563.,
54. Hato LS, Lewis UJ, García M, Bustamante J, Martínez AO & Ling NC. (1996). Glycosilated human growth hormone (hGH): a novel 24 kDa hGH-N variant, *Biochem. Biophys, Res. Común*, **228**, 549-556,
  55. Hait IC, Blake LA, Chadwick PME, Payne GA & Simmonds AD, (1984). The heterogeneity of bovine growth hormone. *Biochem. J* **218**, 573-581.
  56. Harvey S, Davison TF & Chadwick PME, (1979). Ontogeny of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*), *Gen Comp. Endocrinol.*, 39, 270-273,
  57. Haivey S & Scanes CG. (1984). Comparative stimulation of growth hormone secretion in anaesthetized chickens by human pancreatic growth hormone-releasing factor (hpGRF) and thyrotrophin-releasing hormone (TRH), *Neuroendocrinology* 39, 314-320.
  58. Harvey S, Decuyper E, Darías VM & Berghman L. (1991). Differential effects of T4 and T3 on TRH- and GRF- induced GH secretion in the domestic fowl. *Reprod Nutr, Dev.* 31,451-460.
  59. Haivey S, Scanes CG & Daughaday WH, (1995). *Growth hormone*,. 1a. ed. Boca Ratón, CRC Press.
  60. Haivey S, Johnson CD & Sanders EJ. (1995). Extra-pituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *J Endocrinol.* **166**, 489-502,
  61. Harvey S, Azumaya Y, Hull KL, (2000), Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence? *Can J Physiol Pharmacol* Dec;78(12): 1013-28.
  62. Hennen G & Frankenne F. (1987). Influence of placental protein hormones on maternal physiology,, *Ann. Endocrinol.*, (París), 48, 278-288..
  63. Hennen G, Frankenne F, Scippo M-L, Igout A, Closset J, Pirens G & Gómez F. (1988). Placental growth hormone, Significance relative to growth hormone and lactogen hormone *Reprod Nutr. Dev.* **28**, 1699-1706.
  64. Houston B & Goddard C, (1988), Molecular isoforms of growth hormone in the chicken pituitary gland., *J Endocrinol.*, **116**, 35-41,,

65. Hull KL & Haivey S. (2000). Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Rev. Reprod*, 5, 175-82.
66. Ishikawa M, Tachibana T, Kamioka T, Horikawa R & Katsumata N. (2000), Comparison of the somatogenic action of 20 kDa- and 22 kDa-human growth hormones in spontaneous dwarf rats. *Growth Horm. IGF Res.* 10,199-206,
67. Kawauchi H, Maruyama S, Yasuda A, Yamaguchi K, Shii abata K, Kubota J & Himno T. (1986). Isolation and characterization of chum salmon growth hormone., *Arch, Biochem., Biophys.*, **244**, 542-552,.
68. Kostyo JL, Skottner A, Biostedt P, Roos P, Cameron CM, Forsman A, Fryklund L, Adamafio NA & Skoog B. (1987). Biological characterization of purified native 20-kDa human growth hormone., *Biochim., Biophys, Acta* 925,314-324,
69. Kyle CV, Evans MC & Odell WD. (1981), Growth hormone-like material in normal human tissues., *J Clin., Endocrinol, Metab.* **53**, 1138-1144,.
70. Lantinga-van Leeuwen IS, Oudshoorn M & Mol JA. (1999). Canine mammary growth hormone gene transcription initiates at the pituitary-specific site in the absence of Pit-1.. *Mol, Cell Endocrinol.* **150**,121-128,.
71. Lewis UJ, (1992). Growth hormone: what is it what does it do? *Trends Endocrinol, and Metab.*, 3, 117-121,.
72. Lewis UJ. (1984). Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications., *Annu, Rev. Physiol*, 46, 33-42,
73. Lewis UJ, Dunn JT, Bonewald LF, Seavey BK & Vanderlaan WP, (1978). A naturally occurring structural variant of human growth hormone, / *Biol, Chem.*, **253**,2679-87,
74. Lewis UJ, Sinha YN & Lewis GP, (2000), Structure and properties of members of the hGH family: a review, *Endocrine J* 47, S 1-8,
75. Liebhaber SA, Uibaneck M, Ray J, Tuan RS & Cooke EN. (1989). Characterization and histologic localization of human growth hormone-variant gene expression in the placenta. / *Clin., Invest* 83, 1985-1991,

76. Lombardi G, Colao A, Ferone D, Marzullo P, Olio F, Longobardi S & Merola B. (1997). Effect of growth hormone on cardiac function, *Horm., Res.* **48**, 38-42,.
77. Luna M, Martínez-Corla H, Carranza M, Huerta L, Harvey S and Arámburo C. (2000),. Abstract 33 20\* Conference of european comparative endocrinologists. Centre Marine Science, Univ. of Algarve sept. Faro, Portugal,
78. MacLeod JN, Lee AK, Liebhaber SA & Cooke EN. (1992). Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J Biol Chem.* **267**, 14219-14226,.
79. MacLeod JN, Worsley I, Ray J, Friesen HG, Liebhaber SA & Cooke EN. (1991). Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen,, *Endocrinology*,, **128**, 1298-302,.
80. Malamed S, Gibney JA, Cain LD, Pérez FM & Scanes CG. (1993). Immunocytochemical studies of chicken somatotrophs and somatotroph granules before and after hatching,, *Cell Tissue., Res.* **272**, 369-74,
81. Malamed S, Deaver D, Pérez F, Radecki S, Gibney J & Scanes CG. (1997). Quantitative studies of chicken somatotrophs during growth and development by morphometry, immunocytochemistry, and flow cytometry,. *Gen. Comp. Endocrinol.* **108**, 25-34,.
82. Martens GJ, Groenen PJ, Braks AA & Bussemakers MJ. (1989). Expression of two growth hormone genes in the *Xenopus* pituitary gland. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3974,
83. Masuda N, Watahiki M, Tanaka M, Yamakawa M, Shimizu K, Nagai J & Nakashima K. (1988). Molecular cloning of cDNA encoding 20 kDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism. *Biochim, Biophys., Acta*, **949**, 125-131,.
84. May D, Alrubaian J, Patel S, Dores RM & Rand-Weaver M. (1999). Studies on the GH/SL gene family: cloning of African lungfish (*Protopterus annectens*) growth hormone and somatolactin and toad (*Bufo marinus*) growth hormone,, *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**, 121-135,.



85. Minami S, Kamegai J, Sugihara H, Suzuki N & Wakabayashi I. (1998). Growth hormone inhibits its own secretion by acting on the hypothalamus through its receptors on neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus and somatostatin neurons in the periventricular nucleus. *Endocr. J.* 45, SI9-26.
86. Montiel JL, Berghman LR & Aiámburo C (1992), Identification of growth hormone molecular variants in chicken serum, *Gen. Comp. Endocrinol.* 88, 298-306.
87. Müller EE, Locatelli V & Cocchi D, (1999), Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol. Rev.* 79, 511-607.
88. Niall, HD. (1971). Revised primary structure for human growth hormone, *Nat New Biol* 230,90-91.
89. Niall, HD, Hogan ML, Saver R, Rosenblum IY & Greenwood FC. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication, *Proc Natl Acad Sci USA*, 68, 866-870.
90. Nickel BE, Kaidami E, & Cattini PA. (1990). The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells. *Endocrinology*, 126,971-976.
91. Palmethofer A, Zechner D, Luger TA & Barta A. (1995). Splicing variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts, *Mol Cell Endocrinol.* 113, 225-234.
92. Pérez FM, Malamed S & Scanes CG, (1987), *Gen Comp. Endocrinol.* 65, 408-414.
93. Peterssen 2000
94. Pombo CM, Zalvide J, Gaylinn BD & Dieguez C. (2000). Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology.* 141,2113-2119.
95. Radecki SV, Deaver DR & Scanes CG. (1994). Triiodothyronine reduces growth hormone secretion and pituitary growth hormone mRNA in the chicken, *in vivo* and *in vitro.* *Proc Soc. Exp. Biol Med.* 205, 340-346.

- 96, Ramesh R, Kuenzel WJ, Buntin JD & Proudman JA. (2000). Identification of growth-hormone- and prolactin-containing neurons within the avian brain. *Cell Tissue Res*, **299**, 371-383.
97. Rand-Weaver, M., Kawauchi, H. & Ono, M. (1993), Evolution of structure of the growth hormone and prolactin family. En: *The endocrinology of growth and metabolism in vertebrates*, (MP Schreibman, CG Scanes, PK Pang, Eds.), San Diego, Academic Press, Inc., pp. 13-35.
- 98, Ray J, Jones BK, Liebhaber SA & Cooke NE, (1989). Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology*. **125**, 566-568.
- 99, Ray J, Okamura H, Kelly PA, Cooke NE & Liebhaber SA, (1990). Human growth hormone-variant demonstrates a receptor binding profile distinct from that of normal pituitary growth hormone. / *Biol Chem.*, **265**, 7939-7944.,
- 100, Render CL, Hull KL & Harvey S, (1995). Neural expression of the pituitary GH gene, / *Endocrinology*, **147**, 413-422.
- 101, Scanes CG, Duyka DR, Lauterio TJ, Bouen SJ, Huybrechts LM, Bacon WL & King DB, (1986). Effect of chicken growth hormone, triiodothyronine and hypophysectomy in growing domestic fowl, *Growth*. **50**, 12-31.
- 102, Schmid KP, Maier V, Haug C & Pfeiffer EF, (1990). Ultrastructural localization of prolactin-like antigenic determinants in neurosecretory cells in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*), *Horm. Metab. Res*. **22**, 413-417.,
- 103, Schmid KP, Maier V, Dbert B & Pfeiffer EF, (1989). Immunocytochemical localization of prolactin-like antigenic determinants in the neuroendocrine system of the honeybee (*Apis mellifera*). *Histochemistry*. **91**, 469-472.,
- 104, Skibeli V, Andersen O & Gautvik KM. (1990). Purification and characterization of Atlantic salmon growth hormone and evidence for charge heterogeneity., *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**, 333-344.,

105. Stefanescu L, Kovacs K, Battke A, Mayehofer A & Wagner TE. (1993), Pituitary morphology of transgenic mice expressing bovine growth hormone. *Lab, Invest* 68, 584-591.
106. Stirling 1997
107. Sturkie PD. (1986), *Avian Physiology*, 4a, ed, USA, Springer-Verlag,
108. Swinnen K, Broeck TV, Verhaet P & De Loof A, (1990), Immunocytochemical localization of human growth hormone- and prolactin-like antigenic determinants in the insects, *Locusta migratoria* and *Sarcophaga bullata*, *Comp. Biochem, Physiol. A*, 95, 373-378.
109. Tai PK, Liao TF, Chen EH, Dietz J, Schwaitz J & Catter-Su C. (1990). Differential regulation of two glucose transporters by chronic growth hormone treatment of cultured 3T3-F442A adipose cells, *J. Biol. Chem.*, 265, 21828-21834.
110. Tsushima T, Katoh Y, Miyachi Y, Chinara K, Teramoto A, Irie M & Hashimoto Y. (1999). Serum concentration of 20 K human growth hormone (20 K hGH) measured by a specific enzyme-linked immunosorbent assay, *Clin. Endocrinol. Metab*, 84, 317-322.
111. Tsushima T, Katoh Y, Miyachi Y, Chinara K, Teramoto A, Irie M & Hashimoto Y, (2000), Serum concentrations of 20 K human growth hormone in normal adult patients with various endocrine disorders. Study Group of 20 K hGH. *Endocrine J.* 47, 17-21.
112. Untergasser G, Hermann M, Rumpold H & Berger P. (1998). Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis, *Eur. J Endocrinol* 139, 424-427.
113. Untergasser G, Kranewitter W, Schwärzler P, Madersbacher S, Dimhofer S & Beige P, (1997) Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene cluster in the testis, *Mol Cell Endocrinol*, 130, 53-60.
114. Veenstra JA, Romberg-Privee HM, Schooneveld H & Polak JM. (1985). Immunocytochemical localization of peptideergic neurons and neurosecretory cells in the neuro-endocrine system of the Colorado potato

- beetle with antisera to vertebrate regulatory peptides, *Histochemistry*, 82, 9-18.
115. Wada M, Ikeda M, Takahashi Y, Asada N, Chang KT, Takahashi M & Honjo M. (1997), The full agonistic effect of recombinant 20 kDa human growth hormone (hGH) on CHO cells stably transfected with hGH receptor cDNA. *Mol Cell Endocrinol* 133, 99-107,.
116. Wada M, Uchida H, Ikeda M, Tsunekawa B, Naito N, Banba S, Tanaka E, Hashimoto Y & Honjo M. (1998). The 20-kilodalton (kDa) human growth hormone (hGH) differs from the 22-kDa hGH in the complex formation with cell surface hGH receptor and hGH-binding protein circulating in human plasma., *Mol. Endocrinol* 12,146-156,
117. Wu H, Devi R & Malarkey WB., (1996), Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system-a clinical Research Center study., / *Clin. Endocrinol Metab.* 81, 1278-1282,.
- 118, Yamaguchi K, Yasuda A, Kishida M, Hirano T, Sano H & Kawauchi H. (1987), Primary structure of eel (*Anguilla japonica*) growth hormone., *Gen. Comp. Endocrinol*, 66,447-453,
- 119, Yasuda A, Yamaguchi K, Noso T, Papkoff H, Polenov AL, Nicoll CS & Kawauchi H, (1992), The complete amino acid sequence of growth hormone from sturgeon (*Acipenser guldenstadti*), *Biochim. Biophys. Acta*, 1120,297-304,.
- 120, Yasuda A, Yamaguchi K, Papkoff H, Hirata T & Kawauchi H, (1989), The complete amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle (*Chelonia mydas*), *Gen. Comp. Endocrinol* 73, 242-251,.
- 121, Yoshizato H, Tanaka M, Fujikawa T, Higashimoto Y, Shimizu A & Nakashima K. (2000), 20 kDa human growth hormone (20K hGH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene expression at lower concentrations than 22K hGH in hGH receptor-expressing Ba/F3 cells. *Endocr, J.* 47, S.37-40,.

## ANEXO 1

### Determinación Inmuno enzimática de cGH (ELISA)

#### Preparación de soluciones

##### **Amortiguador de fosfato de sodio. (PBS 0.01 M, NaCl 0.15M, pH 7.8).**

- Solución A PBS 0,5 M pH 7,8,

Fosfato de sodio monobásico (PM 138) 0,5 M-50 ml = 3,45 g en 50 ml

Fosfato de sodio dibásico (PM 142) 0,5 M-200 ml = 14,2 g en 200 ml

Se disuelve el fosfato dibásico en aprox., 100 ml con DDH<sub>2</sub>O y se ajusta a pH 7,8 con la solución de fosfato monobásico, Al final se afiora a 200 ml,

- Solución PBS 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,8,

Se toman 20 ml de la solución "A", se agregan 8,76 g de NaCl y se afiora a 1000 ml con DDH<sub>2</sub>O

- Solución TPBS 0,01 M, NaCl 0,15 M, Tween 20, 0,05 %, pH 7,8

A 1000 ml de PBS se añaden 500  $\mu$ l de Tween-20 y se agita

- Solución para bloquear y de incubación con anticuerpo PBS + Leche descremada 3 %,

Se solubilizan 3 g de leche descremada en 100 ml de PBS,

##### **Amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 10.3.**

Carbonato de sodio (PM 105,99) 0,1 M-100 ml - 1,06 g en 100 ml

Bicarbonato de sodio (PM 64,01) 0,035 M-100 ml = 0,224 g en 100 ml.

El pH resulta cercano a 10.3.

##### **Solución stock de rcGH [1 $\mu$ g de rcGH/1 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, pH 9.0].**

Para cada placa con una curva patrón por cuadruplicado se requieren 15  $\mu$ g de hormona en 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O pH 9,0 [1  $\mu$ g/ $\mu$ l],

##### **Solución para forrar la placa. rcGH [12 ng/100 $\mu$ l].**

Se prepara una solución con 4  $\mu$ g de rcGH/2 ml de sol, de carbonatos [2  $\mu$ g/ml], De ésta solución se toman 600  $\mu$ l y 9400  $\mu$ l de sol, de carbonatos = 10 ml [12 ng/100 ( $\mu$ l)],

**Solución para la curva patrón [1024 ng/100  $\mu$ l] (1<sup>a</sup> dilución)** Se prepara una curva patrón por cuadruplicado haciendo una dilución doble seriada. Se preparan 500  $\mu$ l de volumen inicial para la primera dilución, es decir, 10,24  $\mu$ l de la sol, stock y 489,76  $\mu$ l de PBS = 500  $\mu$ l,

##### **Solución para el control A [1024 ng de rcGH/100 $\mu$ l].**

Este control contiene la misma concentración final de rcGH que la primera dilución de la curva patrón, se agregan 5,12  $\mu$ l de la sol, stock + 244,88  $\mu$ l de PBS + 250  $\mu$ l de TPBS con 1% de leche descremada.

**Solución para el control B [1er anticuerpo 1:100,000/1 00 $\mu$ l].**

Este control contiene la misma concentración final de anticuerpo policlonal específico contra cGH que el resto de la curva patrón. Se agregan 250  $\mu$ l de la solución de 1er anticuerpo + 250  $\mu$ l de PBS..

**Primer anticuerpo [1:50,000].** Antisuero policlonal, generado en conejo, contra la cGH, Se encuentra diluido 1:10 en PBS a -70°C. Para cada ensayo se descongela una alícuota nueva, Se agregan 2  $\mu$ l del anticuerpo 1:10 y se diluyen en 10 ml de la sol. de TPBS + 1 % leche descremada y queda una dilución inicial de 1:50,000,

**Segundo anticuerpo [1:3000].** Anticuerpo anti-IgG de conejo, generado en cabra, y acoplado con peroxidasa de rábano (GAR-HRP, Bio Rad), Se emplea a una concentración de 1:3000 en TPBS + 1 % de leche descremada.

**Solución de revelado.** Para el revelado de la placa se utiliza como sustrato una solución comercial de ABTS: Se agrega una pastilla a 50 ml de amortiguador y se agita para disolver.

**Procedimiento**

1, Se preparan las soluciones amortiguadoras y de la hormona (stock, 1<sup>a</sup> dilución de la curva y control A),. Estas últimas se mantienen en hielo (4°C) todo el tiempo.,

2, Se coloca una placa nueva de inmunoanálisis (DYNATECH-IMMUNLON de 96 pozos), una gradilla con tubos eppendorff (1,5 ml) nuevos y marcados, se almacena 1 litro de amortiguador TPBS 0,01 M, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,8 en un recipiente limpio (a esta solución se agrega thimerosal [aprox, 0,001 %] (para evitar el crecimiento bacteriano), este se conecta con el sistema para lavar las placas (Bio-Rad),,

3,, Se agregan 100  $\mu$ l de la solución para forrar a cada pozo, para esto se emplea una pipeta de 8 canales (Octapette 8-channel pipetter) de 100  $\mu$ l (Costar),. Se tapa la placa con cinta adhesiva y se permite el pegado de la hormona a las paredes del pozo durante 16 h a 4°C.

4,, Se preparan la curva patrón y las muestras problema:

Curva patrón: para un análisis por cuadruplicado, se preparan 500  $\mu$ l de la primera dilución [1024 ng/100  $\mu$ l] = Tubo 1. Para preparar la siguiente concentración de proteína se toman 250  $\mu$ l de la solución del tubo 1 (la mitad de su volumen total) y se mezclan con 250  $\mu$ l de PBS y así sucesivamente hasta llegar a 2 ng/100  $\mu$ l = Tubo 10 (ver siguiente cuadro).

### Curva patrón y mezcla de soluciones (µl)

# de tubo	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
[ng/pozo]	A	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	B
PBS	244.88	489.76	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Sol rcGH	5.12	10.24	250	250	250	250	250	250	250	250	250	0
ler Ac.	0	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Vol. Total	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

A continuación se agrega el leí., anticuerpo [1:50,000] en amortiguador de TPBS y 1 % de leche descremada, en cada uno de los tubos de la curva patrón., Para tener una concentración final de anticuerpo de [1:100,000] se agregan 250 µl de sol., de anticuerpo en cada tubo eppendorff, El anticuerpo se añade a todos los tubos a excepción del tubo de control A., Entonces se incuban todos los tubos a 4°C durante 16 h (toda la noche).

Muestras problema: en tubos eppendorff se agrega la cantidad de muestra requerida para, el número de repeticiones y se agrega el ler, anticuerpo. Se agregaron 100 µl de muestra (diluida en PBS si es necesario) y 100 µl de solución del ler. anticuerpo ([1:50,000] en amortiguador de TPBS y 1 % de leche descremada) para tener una concentración final de [1:100,000] y un volumen final de 200 µl para agregar 100 µl de mezcla /pozo., Se dejan incubando 16h a 4°C,

5., Los pozos se lavan 5 veces con amortiguador TPBS, al final de los lavados, los pozos se secan con varios golpes firmes sobre papeles absorbentes.

6., Se añaden 100 µl de PBS + 3 % de leche descremada para bloquear la unión inespecífica. Esta solución se agrega a todos los pozos, se sella la placa con la cinta adhesiva y se deja incubando durante 1 h a temperatura ambiente.

7., Se lava 5 veces la placa con TPBS.,

8., Se adicionan 100 µl por pozo de las diferentes concentraciones de cGH para la curva patrón y muestras problema. Así, las muestras se incuban durante 2 h a temperatura ambiente.

9. Se lava la placa 5 veces con TPBS,

10., Se añaden a cada pozo 100 µl de la solución del segundo anticuerpo a una concentración [1:3000], se sella la placa con la cinta adhesiva y se deja incubando durante 2h a temperatura ambiente.

11. Se lava la placa 5 veces con TPBS.

12, Se prepara la solución de revelado: Se agregan 100  $\mu$ l de esta solución a cada pozo, se sella la placa con la cinta adhesiva y se deja incubar durante 1 h a temperatura ambiente.

13. Al final de la incubación se leen las placas en el lector de microplacas (Bio-Rad) a 405 nm.

14. Inicialmente, de los resultados se obtiene el valor porcentual de cada valor con respecto a los valores del control B (sin hormona) que se consideraba como el 100 % de unión:

$$B = (DO./Bo)100,$$

donde B = % de unión, DO. = densidad óptica obtenida, Bo = D.O. obtenida en el control B

Después se obtiene la media y desviación estándar de los valores porcentuales. Estos últimos datos se gráfica contra las diferentes concentraciones de hormona por pozo, Para linearizar la curva patrón e interpolar los valores de la muestra se grafican el logaritmo de la concentración de rcGH contra el Logit de B,

$$\text{Logit} = \text{LN}(B/100-B)$$

donde LN = logaritmo natural, B = % de unión.



## ANEXO 2

### Inmunoprecipitación de cGH

#### Preparación de soluciones

#### Amortiguadores para la columna de Proteína A-sefárosa

- **Solución A. (Glicina 1.5 M, NaCl 3 M, pH 8.9).**

Glicina Bio-Rad (PM 75,07) 1,5 M-1 L = 112 g en 1 L

NaCl Baker (PM 58,44) 3 M-1 L = 174 g en 1 L,

Ajustar el pH a 8,9

- **Solución B (Ácido cítrico 0.05 M, pH 3.5).**

Ácido cítrico monohidratado Baker (PM 210,14) 0,05 M- 0,5 L = 5,25 g en 0,5 L

Ajustar pH a 3,5

- **Amortiguador de acoplamiento (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 M, NaCl 0.5 M, pH 7-7.6).**

Fosfato de sodio dibásico anhidro Baker (PM 141,96) 0,05 M-2 L 2X = 27,2 g en 2 L

NaCl Baker (PM 58,44) 0,5 M-2 L 2X = 116 g en 2 L

Ajustar pH a 7,0-7,6,

#### Amortiguadores para cromatografía de afinidad con MAocGH (inmunoadsorbente)

- **Solución de cargado (Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.6).**

Tris (hidroximetil) aminometano Bio Rad (PM 121,14) 0,05 M-0,5 L = 3,028 g en 0,5 L

NaCl Baker (PM 58,44) 0,15 M-0,5 L = 4,38 g en 0,5 L

Ajustar pH con HCl a 7,6,

- **Solución de elución (Glicina 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 3.0).**

Glicina Bio Rad (PM 75,07) 0,05 M-0,5 L = 1,876 g en 0,5 L

NaCl Baker (PM 58,44) 0,15 M-0,5 L = 4,38 g en 0,5 L

Ajustar pH a 3,0

- **Solución de lavado final (Tris-HCl 0.02 M, pH 7.6).**

Tris (hidroximetil) aminometano Bio Rad (PM 121,14) 0,02 M-0,5 L = 1,211 g en 0,5 L

Ajustar pH con HCl a 7,6

#### Procedimiento

#### Purificación del anticuerpo monoclonal

1., Dependiendo de la concentración aproximada de MAocGH que contenga el líquido de acitosis, se resuspenden entre 3 y 12 ml de líquido liofilizado en 12 ml de solución A (Gly 15 M, NaCl 3M, pH 8,9) y se coloca en un tubo cónico de 15 ml,

- 2., Se centrifuga a 5000 ipm durante 15 minutos en la centrifuga Beckman Coulter para quitar el precipitado y la giasa,
3. Se pesan 0.75 g de Proteína A sefárosa (Phaimacia) y en una columna de plástico Econo-pack de Bio-Rad se mezcla con el líquido de ascitis,
4. Se agita durante 70 minutos en el Milligen (agitador end over end) a temperatura ambiente,,
5. Se coloca la columna en un soporte universal y se deja sedimentar
6. Se colecta la fracción no adsorbida (FNA) en fracciones de 10 mi: se colecta el sobrenadante hasta que llegue al lecho y posteriormente se agrega solución A (Gly 1.5 M, NaCl 3 M, pH 8.9) hasta que la DO. a 280 nm llegue a cero..
- 7., Se deja llegar la solución A al lecho después de la última fracción y se agrega solución B (Ácido cítrico 0,05 M, pH 3.5) para obtener la fracción adsorbida (FA) o el MAacGH. Éste se recibe en tubos que contienen 0,5 mi de solución A (pH 8.9) y se colectan fracciones de 2,5 mi de volumen final hasta que la DO, a 280 nm llegue a cero.
8. Se lava la columna con solución A y se agrega el contenido del tubo 1 de la FNA y se deja agitando toda la noche,,
9. Se juntan todas las fracciones cercanas o mayores de 1 de DO. a 280 nm de la FA, se obtiene su D.O..<sub>280</sub> final
- 10, Se dializa en una bolsa para diálisis Spectrapor con un límite de exclusión de 12000-14000 de PM (previamente remojadas en H<sub>2</sub>ODD para quitar el glicerol), contra 2 L de amortiguador de acoplamiento (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 M, NaCl 0,5 M, pH 7-7.6). Éste amortiguador se cambia poi nuevo a las 2 h y se deja durante toda la noche,
- 11., Se colecta el contenido de la bolsa de diálisis y se lee a 280 nm para calcular la cantidad total de MAacGH obtenido:

$$\text{mg de MAacGH totales} = (\text{D.O.}_{280\text{nm}} \text{ de lml})(\text{ml totales}) / 4$$

### **Preparación del inmunoadsorbente**

- 1, En una Econo-pack de Bio-Rad se prepara la sefárosa 4B activada con bromuro se cianógeno (se une covalentemente a las proteínas) de Pharmacia. Se agrega 1 g de la resina a la columna y se lava con aproximadamente 200 mi de ácido clorhídrico 1mM,,
- 2.. Se lava con amortiguador de acoplamiento (N<sup>^</sup>HPO<sub>4</sub>., 0.05 M, NaCl 0.5 M, pH 7-7.6) hasta obtener un pH de 7-7,6,,

3. Se agrega todo el anticuerpo purificado que puede ser entre 15 y 30 mg de MAacGH, se tapa y se agita durante 3 h a temperatura ambiente., Según observaciones realizadas en el laboratorio para purificar cGH a partir de hipófisis o extraer la cGH de medios de cultivo es suficiente con 15 mg de anticuerpo para 1 g de resina.,

4. Se recupera el sobrenadante y se obtiene el porcentaje de acoplamiento:

$$\% \text{ acoplamiento} = (\text{mg MAacGH iniciales})/(\text{mg MAacGH finales})/100$$

5. Se llena la columna con solución A ajustando el pH a 8,0 (Gly 1.5 M, NaCl 3 M, pH 8.0) y deja agitando toda la noche para bloquear los sitios inespecíficos.

6. Con los amortiguadores de cargado (Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M, pH 7.6) y elución (Gly 0.05 M, NaCl 0.15M, pH 3.0) se hacen tres ciclos de lavado esperando el cambio de pH en cada cambio de amortiguador y se deja la columna en pH 7.6.,

### **Inmunoprecipitación**

1. Se prepara una suspensión 1:2 del inmunoabsorbente con amortiguador de cargado (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7.6) y se fracciona en alícuotas, de 100  $\mu$ l en tubos de 1,5 ml con tapa de rosca.,

2. Se preparan las muestras agregando a la resina el medio de cultivo o suero (puede ser hasta 1 ml de muestra) y completando a un volumen final de 1,5 ml con amortiguador de cargado. Se prepara un blanco que solo contiene inmunoabsorbente y amortiguador., Si se requiere, los estándares se preparan agregando diferentes diluciones de cGH o rcGH diluidas en un volumen menor de 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O pH 9.0 y se completa a 1.5 ml de volumen final con amortiguador de cargado.,

3.. Se incuba toda la noche en el agitador: Fisher (15 h),,

4. Se centrifugan los tubos a 5000 rpm 5 minutos en la microfuga Sorvall RMC.

5., Se remueve la FNA con una micropipeta (cuidando de no arrastrar la resina),,

6., Resuspender el "pellet" en 1.5 ml de amortiguador de cargado (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7.6) y lavar durante 5 minutos en el agitador Fisher,

7.. Centrifugar a 5000 rpm 5 minutos, descartar el sobrenadante y agregar 1.5 de amortiguador de cargado. Repetir la operación hasta completar 3 lavados.

8., Se resuspende la resina en amortiguador de lavado final (Tris HCl 0,02 M, pH 7,6) y se lava dos veces agitando y centrifugando,

9., Se descarta el sobrenadante del segundo lavado con Tris-HCl 0,02 M con una micropipeta y se pone en contacto la superficie del lecho con un papel filtro para absorber bien todo el sobrenadante.

10., Se agregan 45-60  $\mu$ l de amortiguador de la muestra (véase anexo 3) para SDS-PAGE sin mercaptoetanol, se mezcla y se hierve durante 5 minutos.,

11.. Se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos en la miciofuga y se colecta el sobrenadante, donde se encuentra la muestra de cGH lista para aplicarse al SDS-PAGE., Éste sobrenadante se puede fraccionar en 3 y para el análisis en condiciones reductoras se agrega el mercaptoetanol directamente a la muestra al final,

## ANEXO 3

### Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

#### Preparación de soluciones

##### **Solución A. Acrilamida (30% T, 2.67 % C)**

Acrilamida Bio-Rad 30 g

N'N'-bis-metilen-acrilamida Bio-Rad 0,8 g

Se disuelve en 100 ml de H<sub>2</sub>O y se filtra con papel whatman del # 1

Se etiqueta y almacena a 4°C.,

Es tóxica y se deben de usar guantes para la preparación y manejo de esta solución.,

##### **Solución B. Amortiguador del gel inferior o separador (Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8)**

Tris (hidroximetil) aminometano Bio Rad (PM 121,14) 1.5M= 18.15 g

Se disuelve en 100 ml de H<sub>2</sub>O y se ajusta el pH con HCl hasta 8,8,

Se almacena a 4°C,

##### **Solución C. Amortiguador del gel superior o concentrador (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8)**

Tris (hidroximetil) aminometano Bio Rad (PM 121,14) 0.5 M = 6 g

Se disuelve en 100 ml de H<sub>2</sub>O y se ajusta el pH con HCl hasta 6,8.

Se almacena a 4°C.

##### **Solución D. SDS 10%**

SDS Bio-Rad 5g

Se disuelve en 50 ml de H<sub>2</sub>O y se almacena a 4°C,

##### **Solución F. Amortiguador del electrodo 5X (Tris, Gly, SDS, pH 8.3)**

Tris (hidroximetil) aminometano Bio Rad 9 g

Glicina Bio-Rad 43.2 g

SDS Bio-Rad 3 g

Se disuelve en 600 ml de H<sub>2</sub>O y se almacena a 4°C.

##### **Solución E. Amortiguador de la muestra (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8)**

###### **Reductor**

H<sub>2</sub>O 4,0 ml

C 10 ml

D 1,6 ml

Glicerol 0,8 ml

Azul de bromofenol 0,5% 0.2 ml

2-b mercaptoetanol 0,4 ml

###### **No reductor**

H<sub>2</sub>O 4,0 ml

C 10 ml

D 1,6 ml

Glicerol 0.8 ml

Azul de bromofénol 0.5% 0.2 ml

##### **Persulfato de amonio 10% (PSA)**

Persulfato de amonio Bio-Rad 100 mg en 1 ml de H<sub>2</sub>O.

Se mezcla y se puede almacenar por 1 día a 4°C.

## Procedimiento

1. Se prepara la cámara para electroforesis vertical de Bio-Rad utilizando los separadores de 1 mm entre los vidrios.
2. Se prepara el gel inferior siguiendo la siguiente receta de acuerdo con el porcentaje que se requiera:

<u>Solución</u>	<u>7 %</u>	<u>10 %</u>	<u>12 %</u>	<u>12.5 %</u>	<u>15 %</u>
<b>Resolución</b>	30-120 kDa	18-75 kDa	15-60 kDa	15-60 kDa	15-45 kDa
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4,85 mi	4,35 mi	3,35 mi	3,19 mi	2,35 mi
<b>B</b>	2,5 mi	2,5 mi	2,5 mi	2,5 mi	2,5 mi
<b>A</b>	2,5 mi	3,0 mi	4,0 mi	4,16 mi	5,0 mi
	DESGASIFICAR 5 minutos				
<b>D</b>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<b>TEMED</b>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<b>PSA (10%)</b>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

3. Una vez que se agregan los catalizadores (TEMED y PSA) se debe verter inmediatamente la solución entre los vidrios con una pipeta Pasteur hasta una altura de 5,3 cm y agregar H<sub>2</sub>O con una jeringa Hamilton evitando que se mezcle con la solución del gel.
4. Se deja polimerizar y se seca el agua antes de agregar el gel superior.
5. Se prepara el gel superior siguiendo la siguiente receta:

<u>Solución</u>	
H <sub>2</sub> O	3,05 mi
B	1,25 mi
A	0,65 mi
	DESGASIFICAR 5 minutos
D	50 µl
TEMED	10 µl
PSA (10%)	25 µl

6. Inmediatamente después de preparada la solución se coloca entre los vidrios y se pone el peine adecuado para las muestras teniendo cuidado de que no queden burbujas atrapadas.
7. Se deja polimerizar, se quitan los peines y se secan los pozos con papel filtro.
8. Se rellena la cámara con amortiguador del electrodo hasta que rebase el vidrio pequeño y por fuera en la caja de plástico hasta que rebase la base de los vidrios (350 mi en total).
9. Se agregan las muestras en los pozos correspondientes.

10. Se tapa y se conecta a la fuente de poder con corriente variable y voltaje constante, Mientras las muestras corren por el gel superior se corre a 100 V y cuando coire en el gel inferior se corre a 150 V.

11.. Se detiene el paso de corriente cuando el colorante llega a la base de los geles,

12., Se desarma la cámara con cuidado para saca: los geles e inmediatamente se colocan en amortiguador de transfèrencia (véase anexo 4) o en solución fijadora (metanol al 40% y ácido acético al 10%).

13., Para calcular el peso molecular de las bandas obtenidas de las muestras, en un pozo del gel se agregan marcadores de PM, con los que se obtiene una curva patrón en la que se interpolan los valores de las muestras. Para obtener este dato se debe calcular el Rf o movilidad relativa de cada banda de maleadores de PM y de muestras.

$$Rf = \text{distancia en mm de la banda} / \text{distancia en mra del frente}$$

Se gráfica el Rf de los marcadores de PM contra el Log del PM de estos mismos. Se obtiene la regresión lineal de la curva para poder interpolar el Rf de la muestra y obtener el Log de su PM., Finalmente, se obtiene el PM de cada banda de muestra con el antiLog.

## ANEXO 4

### Inmunoelectrotransferencia (Western-blot)

#### Preparación de soluciones

##### **Amortiguador de transferencia. Tris 0.025 M, Gly 0.192 M, metanol 20%, pH 8.3**

Tris (hidroximetil) aminometano Bio Rad (PM 121,14) 0,025 M = 9,09 g

Glicina Bio Rad (PM 75,07) 0,192 M = 43,2 g

MeOH Baker 20 % = 600 ml

Se disuelve en 3 L de H<sub>2</sub>O y NO se ajusta el pH

##### **Amortiguador salino de Tris (TBS) 10X. Tris 0.2 M, NaCl 5 M, pH 7.5**

Tris (hidroximetil) aminometano Bio Rad (PM 121,14) 0,2 M = 12,11 g

NaCl Baker (PM 58,44) 5 M = 146,1 g

Se disuelve en 500 ml de H<sub>2</sub>O de preferencia estéril y se ajusta el pH a 7,5,

##### **Amortiguador salino de Tris (TBS) IX. Tris 0.02 M, NaCl 0.5 M, pH 7.5**

Se agregan 100 ml de TBS 10X y 900 ml de H<sub>2</sub>O esterilizada,,

##### **Solución bloqueadora. Leche descremada 5 % en TBS**

Leche descremada Bio-Rad 5% = 5 g

Se disuelve en 100 ml de TBS IX,

##### **Solución de lavado (TTBS) IX. Tris 0.02 M, NaCl 0.5 M, Tween-20 0.05 %, pH 7.5**

Tween-20 0,05 % = 500 µl

Se disuelven en 9500 µl de TBS IX

##### **Solución del 1er anticuerpo. PSacGH 1:10000 en TTBS con leche descremada 1%**

Leche descremada Bio-Rad 1 % = 1 g

Se disuelve en 100 µl de TTBS

Para cada membrana se utilizan 30 µl de solución con 1:10000 de antisuero con anticuerpo policlonal contra cGH (PSacGH), es decir 3 µl de suero crudo en 30 µl de TTBS + leche 1%,

##### **Solución del 2º anticuerpo. Anticuerpo de cabra conjugado con HRP 1:3000 en TTBS con leche descremada 1 %**

Leche descremada Bio-Rad 1 % = 1 g

Se disuelve en 100 µl de TTBS

Para cada membrana se utilizan 30 µl de solución con 1:3000 de anticuerpo anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), es decir 10 µl de suero crudo en 30 µl de TTBS + leche 1 %.

##### **Solución del sustrato. Sustrato para quimioluminiscencia ECL**

ECL de Pharmacia 2 ml de solución A + 2 ml de solución B,,



## Procedimiento

- 1, Después de la transferencia las membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) se equilibran en el amortiguador de transferencia (Tris, Gly, MeOH, pH ~ 8.3) durante 15 minutos.
2. Se prepara la cámara de transferencia:  
Se coloca el cassette con el cátodo (-) del lado negro en la parte inferior de un recipiente que contiene amortiguador de transferencia,  
Sobre la hoja de plástico del cassette se coloca lo siguiente:
  - una fibra (scotch brite),
  - una hoja de 8 x 10 cm de papel filtro para cromatografía whatman de 3 mm
  - el gel
  - la membrana de nitrocelulosa Bio-Rad de 7 X 9 cm
  - otra hoja de 8 X 10 cm de papel filtro para cromatografía whatman de 3 mm
  - otra fibra (scotch brite)Se presiona todo con la otra hoja de plástico del cassette, se asegura y se sumerge en amortiguador de transferencia en su cámara.  
A la caja de la cámara se le pone un agitador magnético y un refrigerante, se tapa y se conecta a la fuente de poder.
- 3., Se conecta a la corriente con voltaje variable y corriente constante (200 mA) durante 1 hora.,
- 4, Se desarma la cámara y se recupera el gel y la membrana, Antes de separarlos se marca la posición del gel en la membrana perforando en las cuatro esquinas.,
5. Las membranas se equilibran en TBS durante 10 minutos y los geles se tiñen con Azul Brillante de Coomassie R 0.1 % en MeOH 40% y ácido acético 10%.
6. Las membranas se ponen a incubar con 5% de leche descremada en TBS durante 2 horas para bloquear los sitios de unión inespecíficos.,
7. Se lavan con TTBS, 3 veces por 10 minutos.,
8. Se incuban con la solución de anticuerpo (1:10000) durante toda la noche.
9. Se lavan con TTBS 3, veces por 15 minutos,
- 10;Se incuban en la solución de 2º anticuerpo (1:3000) durante 2 horas.
11. Se lavan con TTBS, 5 veces por 15 minutos,
12. Se lavan con TBS, 2 veces por 15 minutos,
13. Se agrega el sustrato para quimioluminiscencia:

Se mezclan las soluciones A y B (2 ml de cada una) del sustrato para quimioluminiscencia de ECL y se cubre la superficie de la membrana que estuvo en contacto con el gel durante la transferencia durante 4 minutos,,

14,, Se escurre bien y se coloca en una bolsa de plástico.

15,, 15 minutos después se pone en contacto con una placa para radiografía Kodak Biomax durante 15 segundos,

16. Se revela la placa exponiéndola al revelador (Kodak) durante 15 segundos, se lava con H<sub>2</sub>O y se fija (Kodak) el tiempo suficiente.

17,, Se deja secar y se analiza,,

## Differential Secretion of Chicken Growth Hormone Variants After Growth Hormone-Releasing Hormone Stimulation In Vitro

AU: sp, short abstract tone more than 200 words  
H. Martínez-Coria, L. J. López-Rosales, M. Carranza, L. Berumen, M. Luna, and C. Arámburo

Department of Neuroendocrinology, Centro de Neurobiología, Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

Variants of growth hormone (GH) are present in most vertebrates. Chicken GH (cGH) undergoes posttranslational modifications that contribute to its structural diversity. Although the 22-kDa form of GH is the most abundant, some other variants have discrete bioactivities that may not be shared by others. The proportion of cGH variants changes during ontogeny, suggesting that they are regulated differentially. The effect of growth hormone-releasing hormone (GHRH) on the release of cGH variants was studied in both pituitary gland and primary cell cultures, employing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Western blotting, and densitometry. GHRH (2 nM, 2 h) stimulated the secretion of most of the size variants of cGH although the amplitude of increase was not equal for each one. A differential effect on the secretion of GH size variants, particularly on the 22- (monomer) and 26-kDa (putatively glycosylated) cGH isoforms was found in both systems. In the whole pituitary culture, the proportion of the 26-kDa immunoreactive cGH increased 35% while the 22 kDa decreased 31% after GHRH treatment in comparison with the controls. In the primary cell culture system, the proportion of the glycosylated variant increased 43% whereas the monomer and the dimer decreased 22.26 and 29%, respectively, after GHRH stimulation. Activators of intracellular signals such as 1 mM 8-bromo-cAMP and 1  $\mu$ M phorbol myristate acetate had a similar effect to that obtained with GHRH. The data support the hypothesis that GH variants may be under differential control and that GHRH promotes the release of a glycosylated cGH variant that has an extended half-life in circulation.

**Key Words:** Growth hormone; growth hormone-releasing hormone; secretion; variants.

Received October 12, 2001; Revised December 18, 2001; Accepted December 19, 2001

Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: C. Arámburo, Department of Neuroendocrinology, Centro de Neurobiología, Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, 76001 Querétaro, México. E-mail: aramburo@servidor.unam.mx

### Introduction

Pituitary growth hormone (GH) has many functions in all vertebrates. It has been suggested that the functional diversity of this hormone may reflect its molecular heterogeneity. Although monomeric (22 kDa) GH is the major form of the hormone in the pituitary, several structural variants are present in most species (1-4). This molecular heterogeneity results from gene duplication, alternative splicing of GH mRNA, and/or posttranslational modifications of the proteins (e.g., glycosylation, phosphorylation, proteolytic cleavage, amidation). Biologic activities in some of these forms have been established, e.g., those described for the product of the hGH-V gene (5-8), the 20-kDa hGH (9-16), the product of GH-II gene (17-19), and the 15-kDa fragment of chicken GH (cGH) (20). Some forms of GH have also been shown to exhibit differential bioactivities in humans, bovines, and birds (2,20-23). In the chicken, two different charge variants share equipotent growth-promoting activities, whereas they show a differential effect on lipid metabolism (23). The presence of GH variants in the circulation has also been established (24,25), which suggests that they are released from the pituitary and hence may have physiologic roles. Furthermore, there are some data indicating that the expression, processing, and release of some GH variants might be under differential control in diverse physiologic states (26,27), analogous to the differential regulation described for some prolactin (PRL) variants in rodents and turkeys (28-31).

Pituitary GH synthesis and release is regulated by an array of interacting, multihierarchical factors that dynamically modify somatotroph function. The influence of these factors may differ during ontogeny, sexual maturation, and senescence according to physiologic state and extrinsic and intrinsic stimuli (32). As in most vertebrate species, pituitary GH release in chickens is controlled by stimulatory and inhibitory factors from the hypothalamus. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) and thyrotropin-releasing hormone (TRH) are thought to be the primary physiologic GH secretagogues (GHSs) in birds (33), while somatostatin (SRIF) decreases GH secretion, possibly by antagonizing the effects of GHRH and TRH. In vivo studies have shown that mammalian GHRH is an effective GHS in both young and adult birds (34-37). TRH is also a very



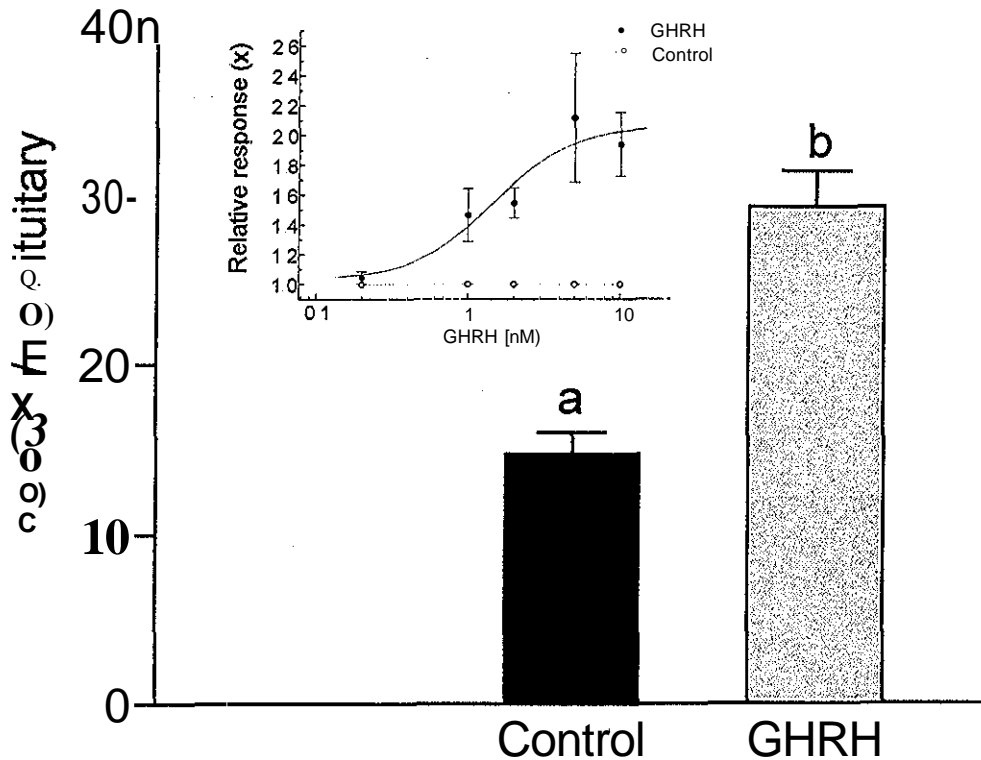


Fig. 1. Determination of total ir-cGH by ELISA in pituitary culture media after stimulation with 2 nM GHRH incubated for 2 h in normal Earle's solution (Inset) Dose-response evaluation of activity of GHRH on release of ir-cGH. Bars correspond to 10 different experiments done in triplicate while the inset corresponds to seven experiments done also in triplicate (mean  $\pm$  SEM).

AU; what does a and b indicate?

effective GHS in young chicks but rarely stimulates GH secretion in adult chickens (33,35,38). Both GHRH and TRH stimulate GH release from chicken pituitary glands and adenohypophyseal cells in vitro (34,39,40). The influence of these secretagogues on the release of different GH moieties is, however, uncertain.

To understand further the physiologic significance of GH molecular heterogeneity, we have assessed the release of GH size variants from pituitary tissue and primary pituitary cell cultures in response to GHRH and secretagogue analogs that stimulate the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and the protein kinase C (PKC) routes involved in the GHRH signal transduction pathway.

## Results

### Whole Pituitary Culture

The effect of GHRH on the release of total immunoreactive (ir)-cGH, measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), is shown in Fig. 1 (inset). A dose-dependent response was observed when the tissue was exposed for 2 h to different concentrations (0, 2, 1, 2, 5, and 10 nM) of the secretagogue ( $EC_{50} = 1.5 \pm 0.8$  nM). At a dose of

2 nM, GHRH increased cGH release 1.9 times higher ( $29.2 \pm 1.8$  vs  $14.7 \pm 1.1$  ng/mg of pituitary, respectively;  $p < 0.001$ ) (Fig. 1); this dose was used in subsequent studies.

The ir-cGH size variants in the culture media were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under non-reducing conditions (NRC) and then immunostained with a polyclonal antibody after Western blotting. Figure 2A shows that several ir-cGH bands were detected, with the following apparent mol wt: 66, 60, 50, 44, 26, 22, and 15 kDa. It is also clear that the immunoreactivity of the cGH bands was increased in the media obtained after stimulation with 2 nM GHRH for 2 h in comparison with that observed in the control experiment, since the densitometric analysis of these bands showed that all were stimulated by this secretagogue (Fig. 2B). However, the increment in the immunoreactivity of each molecular form was different. The predominant monomeric form (22 kDa) increased 2.2 times in the GHRH-stimulated media in relation to the control conditions, whereas the 26- and 15-kDa bands were 4.4 and 5.7 times higher after GHRH stimulation than the control, respectively (Fig. 2C). To analyze the relative concentration of each cGH size variant released by the pituitary, data were expressed as a

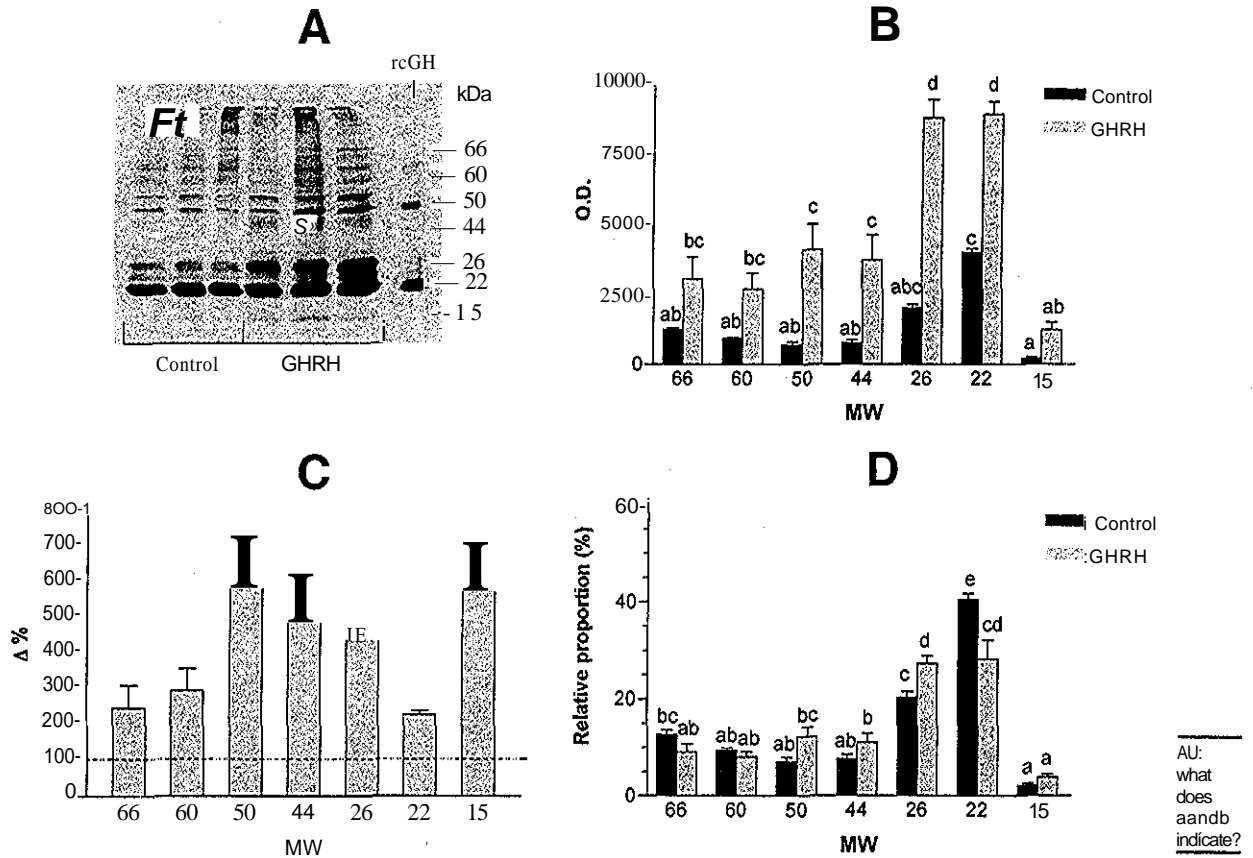


Fig. 2, Electrophoretic analysis of the ii-cGH size variants after stimulation with 2 nM GHRH for 2 h in pituitary culture media. (A) Media were analyzed by SDS-PAGE (NRC) and Western blotting and immunostained with a primary antibody anti-cGH. Development was performed by chemiluminescence with electrochemiluminescence (ECL) (Amersham) (B) Densitometric analysis of the Western blot luminogram was done in an HP scanner using IPLabGel 2.2 software (Sacanalytics, Fairfax, VA) The optical density (OD) of each ii-cGH band was plotted, (C) Differential release of each ii-cGH band after GHRH stimulation compared with the basal values in controls, expressed as percentage change, is shown. (D) Relative proportion of each ii-cGH variant released by the pituitary, expressed as percentage of the total cGH immunoreactivity, is shown. The data show a representative experiment of three replicates (mean  $\pm$  SEM; n = 3) MW, molecular weight.

percentage of the total cGH immunoreactivity (Fig. 2D). The monomeric form (22 kDa) in the control group represented  $40.5 \pm 1.6\%$ , whereas in the presence of GHRH it represented  $28.3 \pm 3.9\%$ . On the other hand, the proportion of the 26-kDa variant corresponded to  $20 \pm 1.2\%$  in the control, and it increased to  $27 \pm 1.5\%$  after GHRH stimulation. In the case of the oligomeric forms (44, 50, 60, and 66 kDa), each represented  $<12\%$  of the total immunoreactivity and the 15-kDa variant corresponded to about 2% in the control and 4% in the presence of GHRH.

Figure 3 shows the SDS-PAGE analysis (reducing conditions [RC]) of the culture media after isolating the ii-cGH forms by immunoprecipitation with the monoclonal immunosorbent. The Western blot membrane was stained for carbohydrate detection and for immunoreactivity. It was apparent that the 29-kDa band showed a positive reac-

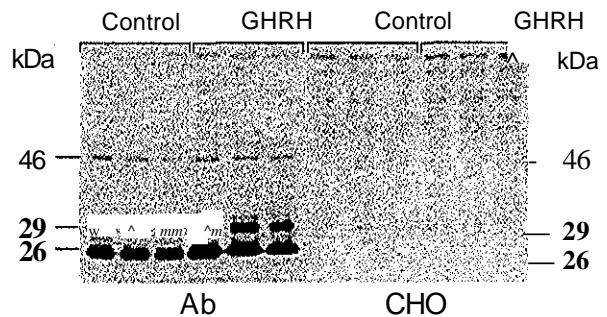


Fig. 3. Electrophoretic analysis of cGH size variants after stimulation with 2 nM GHRH for 2 h in pituitary culture media. Media were analyzed by SDS-PAGE (RC) and Western blotting and developed by immunostaining with a primary antibody anti-cGH and chemiluminescence (Ab) and with the Bio-Rad kit for glycoprotein detection (CHO)

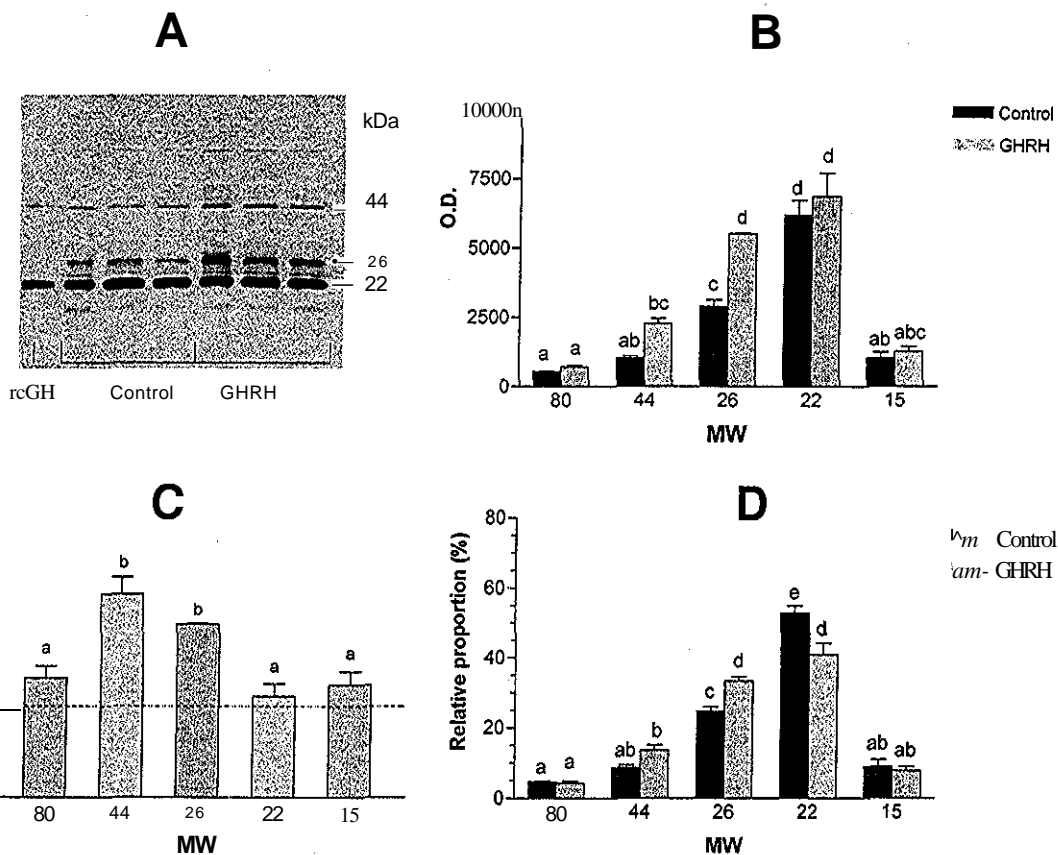


Fig. 4., Electrophoretic analysis of ir-cGH size variants after stimulation with 2 nA/GHRH for 2 h in pituitary gland tissue (A) Extracts were analyzed by SDS-PAGE (NRC) and Western blotting and immunostained with a primary antibody anti-cGH. Development was performed by chemiluminescence with ECL (Amersham). (B) Densitometric analysis of the Western blot luminogram was done in an HP scanner using IPLabGel 2.2 software (Sacanalytics). The OD of each ir-cGH band was plotted, (C) Differential release of each ir-cGH band after GHRH stimulation compared with the basal values in controls, expressed as percentage change, is shown. (D) Relative proportion of each ir-cGH variant released by the pituitary, expressed as percentage of the total cGH immunoreactivity, is shown. The data show a representative experiment of three replicates (mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ). MW, molecular weight.

tion for the presence of carbohydrate and was also recognized by the polyclonal anti-cGH antibody, indicating that this ir-cGH variant is glycosylated.

The total ir-cGH content in the pituitary tissue after GHRH was not significantly different from that in the controls, when analyzed by ELISA ( $300.8 \pm 38.0$  vs  $252.7 \pm 7.1$  ng/mg of pituitary, respectively). The relative proportion of the ir-cGH variants in the pituitary gland was, however, changed in the presence of GHRH (Fig 4A) when analyzed under NRC. Densitometric analysis (Fig 4B) showed that the monomeric form (22 kDa) was unaltered by GHRH treatment (OD units =  $6168.6 \pm 550$  in the control vs  $6844 \pm 843.2$  in the stimulated tissue), but the 44- and 26-kDa ir-cGH variants were 2.3 and 1.9 times higher, respectively (44 kDa: OD =  $2296 \pm 184.8$  vs  $1012 \pm 92.5$ ; 26 kDa: OD =  $5509 \pm 26.0$  vs  $2890 \pm 247.7$ ;  $p < 0.001$ ). The

relative proportion analysis of each variant showed that the 44- and 26-kDa forms increased significantly ( $p < 0.05$ ) in the presence of GHRH over the control conditions, whereas the monomeric form (22 kDa) decreased significantly after GHRH (the relative proportion of 26 kDa represented  $25 \pm 1.0\%$  in the control group and  $33 \pm 1.2\%$  in the treated group, whereas the 22-kDa variant represented  $53 \pm 2.2\%$  in the control and  $41 \pm 3.4\%$  after treatment, respectively) (Fig 4D).

#### Primary Pituitary Cell Culture Study

When pituitary cells in primary cultures were treated with 2 nM GHRH for 2 h, the total ir-cGH released to the culture media was significantly increased (2.8 times higher) over the values obtained by ELISA in control conditions ( $75.8 \pm 14.7$  vs  $26.7 \pm 6.1$  ng/mL, respectively;  $p < 0.001$ ). The culture media were immunoprecipitated with a mono-

AU: what does a and b indicate?

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

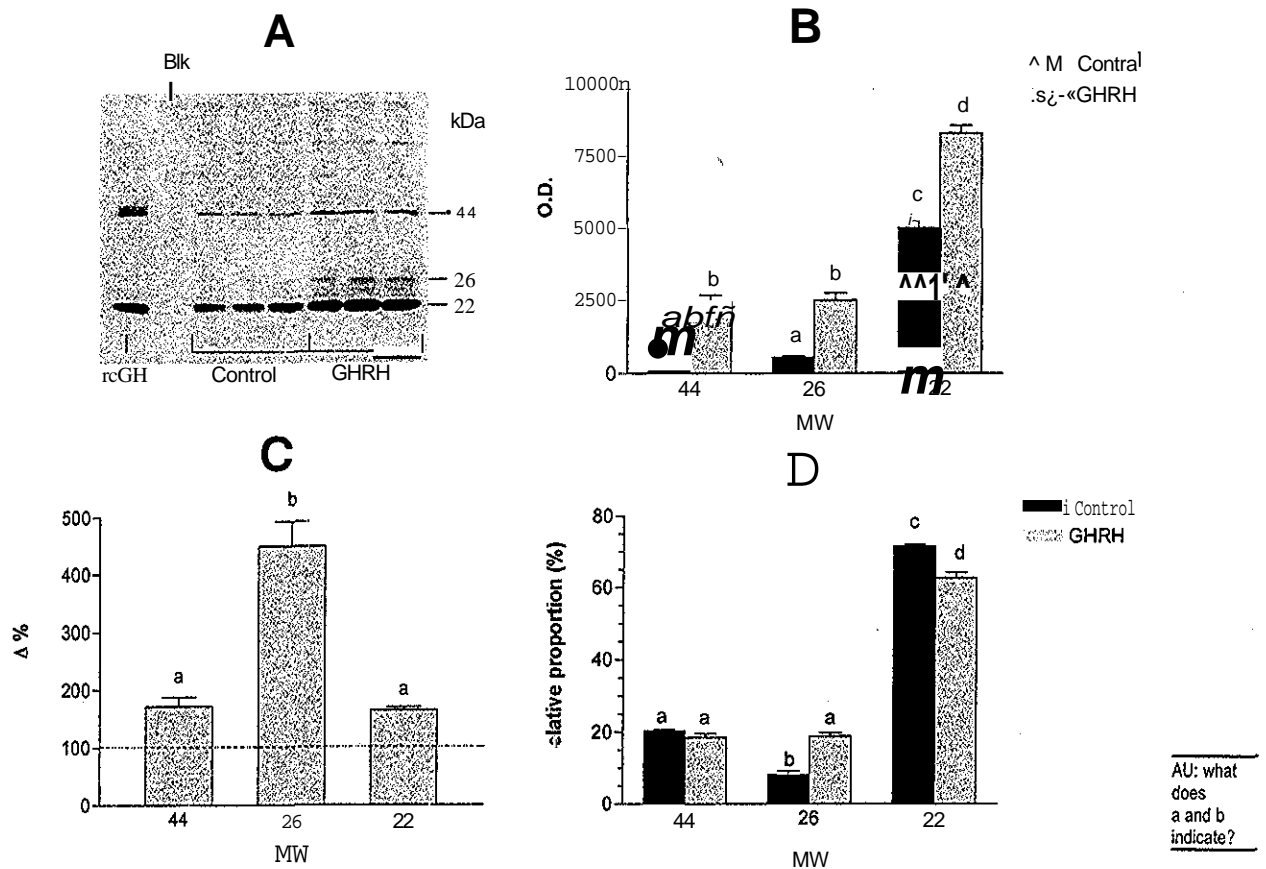


Fig. 5. Electrophoretic analysis of ir-cGH size variants after stimulation with 2 nMGHRH for 2 h in primary pituitary cell culture media. (A) Media were analyzed by SDS-PAGE (NRC) and Western blotting and immunostained with a primary antibody anti-cGH. Development was performed by chemiluminescence with ECL (Amersham). (B) Densitometric analysis of the Western blot luminogram was done in an HP scanner using IPLabGel 2.2 software (Sacanalytics). The OD of each ir-cGH band was plotted. (C) Differential release of each ir-cGH band after GHRH stimulation compared with the basal values in controls, expressed as percentage change, is shown. (D) Relative proportion of each ir-cGH variant released by the pituitary, expressed as percentage of the total cGH immunoreactivity, is shown. The data show mean  $\pm$  SEM;  $n = 9$ . MW, molecular weight

clonal immunosorbent before electrophoretic separation to eliminate interferences by the media salts. This system increased the specificity of the analysis because two sets of antibodies were employed: a monoclonal anti-cGH for immunoprecipitating the ii-cGH variants in the media and apolyclonal anti-cGH for detection of ir-cGH in the Western blot membrane. With this system, three ir-cGH bands were observed under NRC (22, 26, and 44 kDa) (Fig. 5A). The densitometric analysis showed that, as observed in the experiment using whole pituitary tissue, all the ii-cGH variants increased with GHRH treatment (Fig. 5B). However, again, the particular increase of each molecular form was different. As shown in Fig. 5C, the increments were 1.6, 4.5, and 1.7 times higher for the 22-, 26-, and 44-kDa bands, respectively, in the treated cultures than in their corresponding controls. Figure 5D shows the results obtained when the relative proportion of each band was analyzed. It was

observed that the proportion of the 26-kDa band increased importantly, apparently at the expense of the decrease observed in the 22-kDa monomeric form, when the GHRH treatment was applied. The relative proportion of the 26-kDa ir-cGH band was almost 130% higher in the GHRH-treated sample than in the controls.

To characterize the nature of the 26-kDa variant, the experiments were analyzed under RC, to rule out the possibility of a cleaved cGH that could migrate very closely (25 kDa). After disulfide bonds were broken with reduction, differential changes were also observed in the number and absorbance of the ir-cGH bands. At least seven immunoreactive bands were observed (46-, 29-, 26-, 20-, 18-, 17-, and 15-kDa forms). The 20-, 18-, 17-, and 15-kDa bands correspond to submonomeric forms, while the 26-kDa band corresponds to the unfolded monomer, the 29-kDa band to the putatively unfolded glycosylated cGH (G-cGH), and the

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

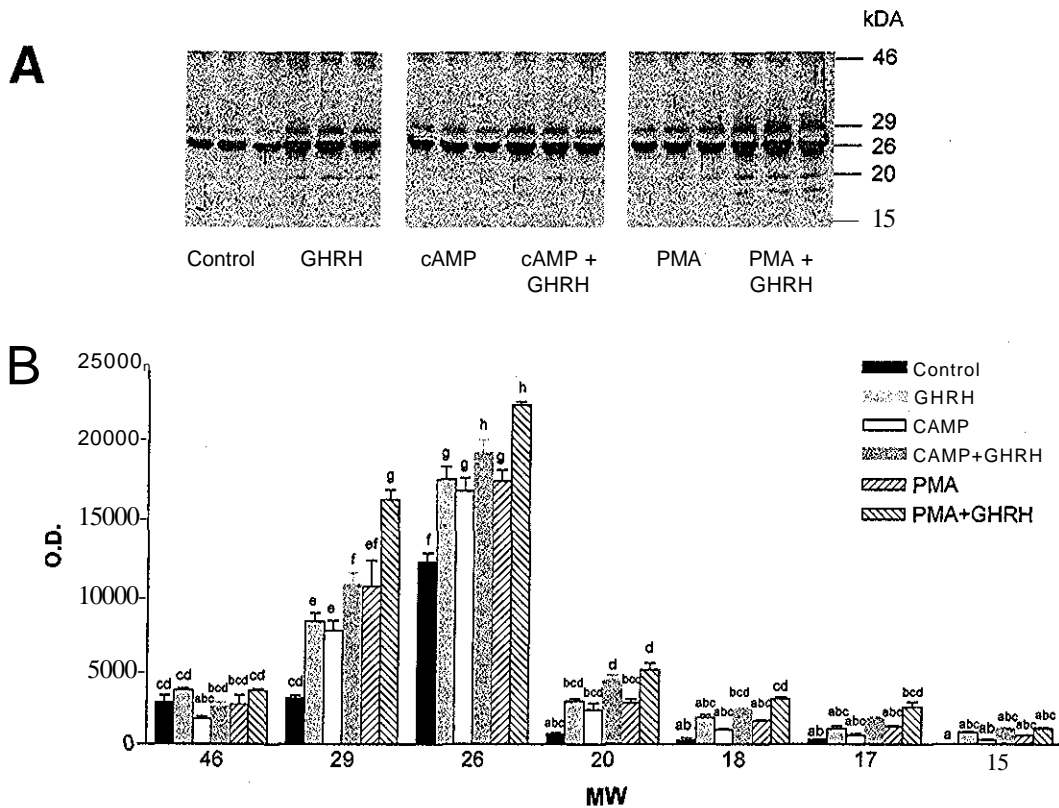


Fig. 6. Electrophoretic analysis of ir-cGH size variants after stimulation with 2nMGHRH, 1  $\mu$ M 8-bromo-cAMP, or 1  $\mu$ M phorbol myristate acetate (PMA) for 2 h in pituitary cell culture media (A) Media were analyzed by SDS-PAGE (RC) and Western blotting and immunostained with a primary antibody anti-cGH. Development was performed by chemiluminescence with ECL (Amersham) (B) Densitometric analysis of the Western blot luminogram was done in an HP scanner using IPL abGel 2,2 software (Saccanalytics). The OD of each ir-cGH band was plotted. Data show mean  $\pm$  SEM;  $n = 9$  MW, molecular weight

46-kDa band probably to a reduction-resistant dimer, which has been described earlier (2) (Fig. 6A). After GHRH stimulation, the OD of the monomeric (26-kDa) band increased 1.4 times and that of the 29-kDa band 2.7 times over the controls ( $p < 0.05$ ). In terms of their relative proportion, the monomer (26 kDa) represented  $63.3 \pm 0.8\%$  in the control group and  $49.2 \pm 1.3\%$  after GHRH treatment, whereas the 29-kDa band represented  $15.9 \pm 0.8$  and  $22.8 \pm 0.9\%$ , respectively (Fig. 7).

Very similar results were observed when the cell cultures were treated with 8-bromo-cAMP, as shown in Figs. 6 and 7. The effect of this membrane-permeable substitute of cAMP on the monomeric (22-kDa) and the 29-kDa forms was analogous to that of GHRH. The combination of 8-bromo-cAMP and GHRH showed a higher increment on the release of both variants. However, these changes were not as clear when the relative proportion of the variants was determined (Fig. 7). Treatment with PMA had a similar effect on the secretion of the 29- and 26-kDa ir-cGH bands than treatments with GHRH or cAMP. However, the com-

bination of GHRH and PMA had a potentiating effect over these two variants (Fig. 7).

## Discussion

It has been proposed that the functional diversity of some pituitary hormones, such as PRL and GH, may be explained by their molecular heterogeneity. Much evidence has been reported for the existence of structural variants of these hormones. The sources of such heterogeneity include gene duplication, mRNA alternative splicing, and posttranslational modifications of the mature proteins. In addition, some reports indicate that the molecular variants of these hormones may express differential bioactivities (2,5-23). On the other hand, the presence of some of the structural variants of PRX and GH has been documented in the circulation (24,25). All these data, taken together, indicate that these proteins constitute a family of proteins, structurally related, whose known actions may be the result of the sum of the particular bioactivities of its members. If this is true,



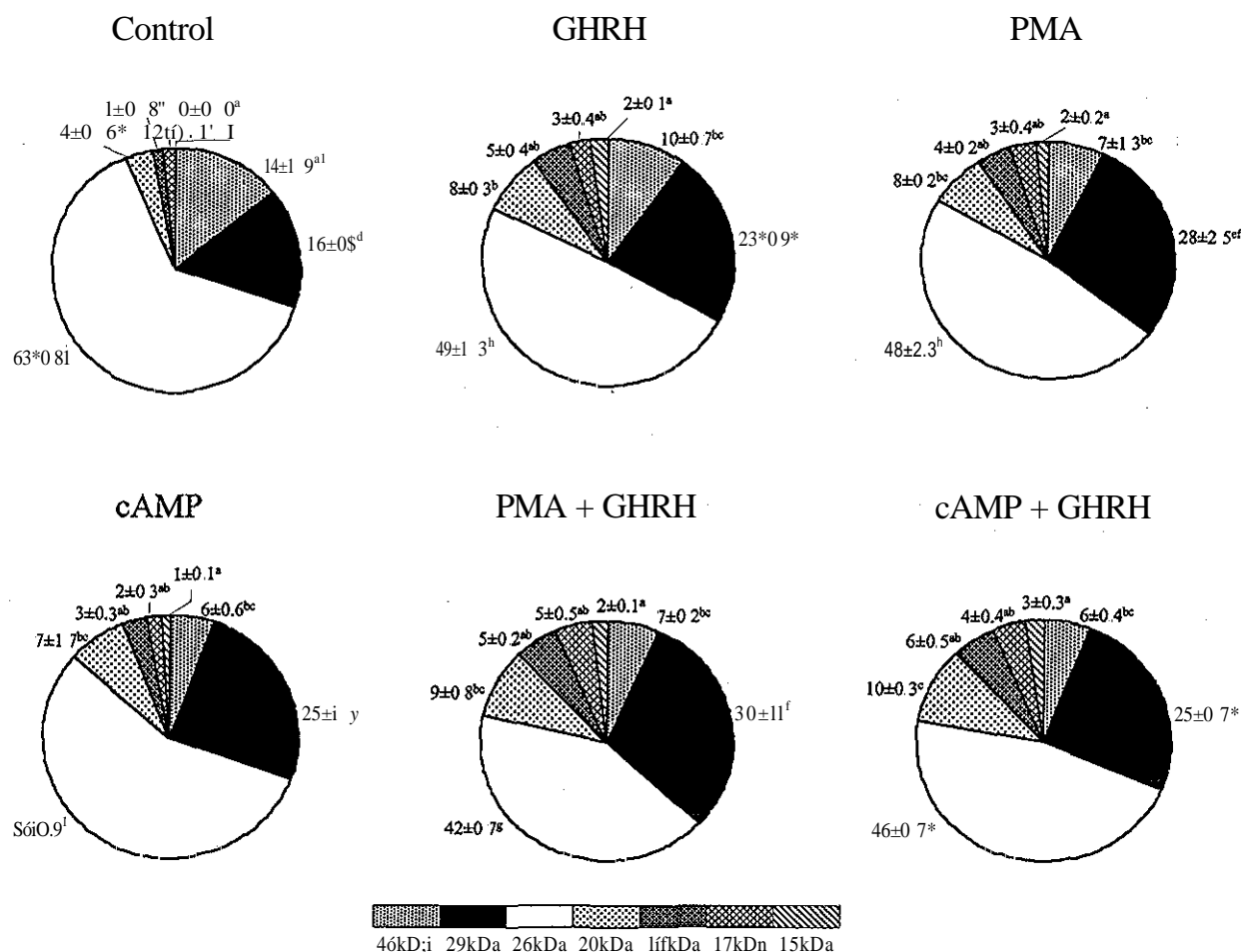


Fig. 7. Relative proportion (%) of ir-cGH variants in primary pituitary cell culture media, as analyzed by SDS-PAGE (RC) and Western blotting after different treatments. Different letters mean a statistical significance ( $p < 0.05$ , mean  $\pm$  SEM;  $n = 9$ ).

then the functional relevance of each variant should be evaluated to understand its participation in the overall effect related to the parental hormone. For GH variants to have a physiologic role as hormones, they must be released and their secretion must be under some kind of control.

In the chicken, the existence of posttranslational modifications of pituitary GH has been previously demonstrated, and several variants have been described: phosphorylated cGH (41,42); glycosylated cGH (43,44); various oligomeric forms (dimer, trimer, tetramer, pentamer [2, 23]); cleaved cGH; and submonomeric variants of cGH, especially a 15-kDa fragment of the hormone (20). We have also shown that some of the charge variants of cGH ( $Rf = 0.23$  and  $0.3$ , named after the relative mobility of each variant in non-denaturing PAGE) express a differential effect on lipid metabolism (23) and that the 15-kDa amino-terminal fragment of cGH is bioactive (20). Some of the size and charge

variants of cGH are found in plasma (25), and it has been reported that the clearance rate of the G-cGH is lower than the major form of the hormone, thus increasing its half-life in circulation (4.5). Additionally, the number and relative proportion of pituitary cGH variants change during ontogeny (27).

In the present work, we analyzed the effect of an established GHS to determine whether the GH variants in the pituitary were affected similarly or whether they were differentially affected. Two *in vitro* systems were employed: whole pituitary tissue culture, to keep the integrity of the gland architecture and thus preserve cell interactions; and dispersed primary pituitary cell culture, to ensure the availability of the secretagogue(s) to all cells.

The stimulatory effect of GHRH on GH secretion, both *in vivo* and *in vitro*, has been extensively documented in mammals and birds (33-35,40,46-48). In most of the

AU:  
what  
does Rf  
mean?

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

reports, released GH has been measured by a radioimmunoassay (RIA), which accounts for the overall GH present in the plasma of culture media, without differentiating among variants. Here, we employed a method that allows for the separation (SDS-PAGE) and identification (Western blotting) of the major immunoreactive size variants of cGH. Furthermore, the combined use of a chemiluminescent assay and densitometry gave a semiquantitative tool to compare differences in concentration of each band in response to the treatments, since we have previously established that the assay is linear (27) in the range used.

Initially, we studied the response of chicken pituitary glands to different concentrations of GHRH (0.2, 1, 2, 5, and 10 nM) in order to determine the best dose for experimentation. A dose-dependent effect was observed, and we decided to use 2 nM GHRH for these studies since it was close to the EC<sub>50</sub>. This concentration is similar to that determined by other investigators (40) using cultured pituitary cells.

In the first study, the total amount of ir-GH released to the culture media following GHRH stimulation was almost double (1.9 times) that in the controls, as determined by a specific and homologous ELISA. When the culture media were analyzed by SDS-PAGE under NRC and Western blotting, seven clear ir-GH bands (mol wt: 66, 60, 50, 44, 26, 22, and 15 kDa) were observed in both the control and the stimulated conditions. These bands have previously been described in the pituitary (2,27) and in the circulation (25). Although all these ir-cGH variants were increased by GHRH stimulation (Fig 2), the magnitude of the response differed for different ir-GH moieties. For instance, the OD of the band corresponding to the monomeric form (22 kDa) was 2.2 times higher in the treated samples than in the control, whereas that of the 26-kDa band was 4.4 times higher, respectively. In addition, the 15-kDa band was 5.5 times higher in the GHRH-stimulated media than in the control. In a further study of the effect of the secretagogue on the release of each variant, we decided to analyze the results in terms of the proportion (percentage) of each variant in relation to the total immunoreactivity of the hormone in each sample (Fig 2D). The results indicated that the proportion of the 26-kDa band increased significantly whereas the monomeric (22-kDa) band decreased significantly after the tissue was incubated with GHRH. The proportion of the 26-kDa form was 35% higher and that of the monomer was 31% lower than their corresponding values under control conditions. The increment in the proportion of the 26-kDa band was therefore at the expense of the monomeric form. These data showed that although all the immunoreactive forms of cGH are stimulated by GHRH, they are not released at the same extent; interestingly, the analysis of what occurred in the tissue indicated that there was also a differential effect of the secretagogue in the content of the stored cGH pituitary variants. Although the total cGH content

stored in the pituitary did not show any significant difference between treatments, the analysis of the variants showed that the proportion of the 26-kDa band was significantly increased, again at the expense of the 22-kDa band, which was significantly reduced (Fig. 4).

The results of these experiments suggested that treatment of the pituitary with GHRH causes a preferential release of the 26-kDa ir-GH moiety. We have shown previously that the 26-kDa band may correspond to the G-cGH when analyzed under NRC (27,42) and that it shifts to a 29-kDa band when studied under RC to determine whether this was the case, samples were analyzed for the presence of carbohydrates. A positive reaction for carbohydrate was found in the 29-kDa band, which was also recognized by the polyclonal anti-cGH antibody, indicating that this ir-cGH variant is glycosylated (Fig. 3). The reason that this variant was investigated under RC was to avoid the possible interference with a 25-kDa ir-cGH that corresponds to a cleaved form of the hormone (20), which might be observed under NRC. This form, however, disappears under RC when the disulfide bonds are reduced and gives rise to 15- and 7-kDa cGH fragments. Under RC, the monomeric form shifts its apparent mol wt from 22- to 26-kDa (owing to the unfolding of the molecule and an increase in its Stoke's radius), and the G-cGH shifts from 26 to 29 kDa. The recognition of the 29-kDa band by two sets of specific antibodies (monoclonal during immunoprecipitation and polyclonal in Western blot) indicates that it is a cGH variant, and that treatment with GHRH increased its proportion in comparison with controls (Fig. 3).

GHRH caused a great release of total ir-cGH into the media of pituitary primary cell cultures as determined by ELISA (almost three times that of the control values), thus showing that the system was responsive. The analysis performed under NRC with the primary cell cultures rendered a similar result to that observed with the whole pituitary in culture; that is, GHRH stimulated a differential release of the main ir-cGH variants. Again, it was shown that the relative proportion of the putatively glycosylated variant (26 kDa under NRC) was differentially increased apparently at the expense of the monomeric form (Fig. 5).

When the media of cell cultures were studied under RC, several changes were apparent, mainly that several submonomeric forms were now present and that all the variants were stimulated, although in different proportions; that is, the changes were 1.3, 2.7, 1.5, 4.1, 6.8, and 3.2 times higher for the 46-, 29-, 26-, 20-, 18-, and 17-kDa bands, respectively, in the treated cultures than in the corresponding controls (Fig. 6). In the case of the 15-kDa ir-cGH band, it was not detectable in the controls but was apparent in the GHRH-treated sample. Again, the relative proportion of the monomeric ir-cGH form (26 kDa under RC) decreased from 63.3 ± 1.4% in the controls to 49.2 ± 2.2% in the stimulated media, whereas the putatively glycosylated form (29 kDa

under RC) increased from  $15.9 \pm 1.3$  to  $22.8 \pm 1.5\%$ , respectively. Additionally, there were substantial increments in the relative proportions of the submonomeric forms (Fig. 7).

The molecular changes observed in monomeric ir-cGH as well as in the putatively glycosylated variant and in the submonomeric forms were also observed when the cell cultures were stimulated with secretagogue analogs known to be involved in the intracellular signaling pathways elicited by GHRH, namely the cAMP and PKC pathways. As shown in Fig. 6A, both 8-bromo-cAMP and PMA (an activator of PKC) stimulated the release of ir-cGH variants when analyzed under RC. Again, there was a differential increase in the release of the variants after stimulating with the analogs, and as before, the increase in the 29-kDa band and those corresponding to the submonomeric forms were higher than that produced in the monomer (Fig. 6B). When the relative proportion was analyzed, it was clear that both secretagogues favored the release of the 29-kDa ir-cGH band and had an effect similar to that obtained with GHRH, apparently at the expense of the monomeric form. In this experiment, it was shown that the proportion of the 46-kDa band decreased with the treatments (Fig. 7). On the other hand, the combined effect of GHRH and PMA seemed to exert a synergistic effect on the proportion of the 29-kDa ir-cGH band released as well as on the magnitude of the decrease in the proportion of the monomer. The results obtained are consistent with reports proposing that cAMP is the major signaling pathway employed by GHRH, but that the activation of PKC may potentiate the cAMP signaling via (49).

The overall results of the experiments performed in our study suggest that GHRH stimulates the conversion of monomeric cGH to a form of the 26-kDa band (29 kDa under RC), which presumably corresponds to a glycosylated variant of cGH and stimulates its differential release. In addition, GHRH (and its surrogate secretagogues) stimulate the release of the submonomeric forms, suggesting that limited proteolysis of the hormone is induced by this treatment.

Glycosylated variants of pituitary GH have been described in several mammals and birds (26,42,43). In the chicken, as well as in other nonmammalian species, the primary structure of GH has an N-glycosylation consensus sequence in the C-terminus side (N<sub>188</sub>Ci891 I90). Human GH lacks this site for N-linked sugar. However, there are reports showing a content of 1-5% for G-hGH in relation to total pituitary GH. Furthermore, it has been shown that the metabolic clearance rate of G-cGH was 20% lower compared with nonglycosylated cGH (45). According to our results, it is possible that GHRH favors the glycosylation of cGH and thus increases its half-life in circulation. If this is the case, then differential control could be established. This is interesting in view of some evidence that has been reported for the glycosylated variant of turkey PRL, which is released in different proportions according to different physiologic

changes (30). Glycosylated turkey PRL is mainly released when the total PRL secretion is increased during incubation behavior. Perhaps GHRH favors the synthesis and secretion of a longer half-life variant of cGH that may be of importance during some critical physiologic stage.

In conclusion, our data suggest that the pattern of basal secretion of cGH variants can be modified by GHRH stimulation. They also support the hypothesis that the GH variants may be under differential control and in some physiologic states can change the proportion in which they are synthesized and secreted. The regulation of GH secretion is very complex, and more research is needed to understand the intracellular and intercellular mechanisms involved in the regulation of the synthesis/secretion of GH variants.

## Materials and Methods

### Animals

Male 4-wk-old domestic chickens were obtained from Pilgrim's Pride of México farras and maintained on food and water available ad libitum for 1 d in the laboratory before sacrifice.

### Pituitary Tissue Culture

Anterior pituitaries were removed immediately following decapitation. They were longitudinally bisected through the caudal and cephalic lobes, weighed, and each half was placed in a culture tube (polypropylene, 13 x 30 mm; Nalgene, Rochester, NY) containing 0.3 mL of normal Earle's salt solution (NESS) (Gibco, Grand Island, NY). The tubes were gassed with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>, sealed with mbbei stoppers, and incubated at 37°C in a metabolic shaker (Labline<sup>el</sup>rose Paik JL). After 60 min, the media were removed and the glands were incubated with fresh NESS containing 2 nM human GHRH<sub>1-44}</sub> (Sigma, St. Louis, MO) under the same conditions, a further 2 h. At the end of this incubation period, the media and the tissues were collected for analysis and stored at -70°C until assayed.

To determine the dose of GHRH to be used in the experiments, dose-response relationships were obtained by fitting the data in the Hill equation:

$$S_{\text{GHRH}} = S_{\text{max}} \times EC_{50}^{nH} / [GHRH]^{nH} + EC_{50}^{nH}$$

in which  $S_{\text{GHRH}}$  is cGH released in the presence of GHRH,  $S_{\text{max}}$  is the control maximum secretion,  $EC_{50}$  is half effect concentration of GHRH, and  $nH$  is the Hill coefficient.

### Primary Pituitary Cell Culture

Anterior pituitaries from 4-wk-old cockerels were removed immediately after decapitation and placed in a Petri dish containing Hank's balanced salt solution (Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free) (HBSS-CMF) (Gibco). Glands were washed three times with the same solution and then diced in approx 2-mm<sup>3</sup> cubes. They were transferred following incubation to a conical test tube (15 x 75 mm) containing 0.35% Type II

collagenase (Worthington, Freehold, NJ) in HBSS-CMF Adenohypophyseal cells were dispersed in this medium for 60 min at 37°C in a water bath with agitation, and peiodic mechanical trituration with a sterile Pasteur pipet facilitated dispersion. Following dispersion, cells were washed twice with medium 199 and placed in culture medium: M199 (Gibco) containing 10% fetal bovine serum, 2,0 mM glutamine, 100U/mL of penicillin and 100 n.g/mL of streptomycin. Aliquots of 1 ml (3.0 x 10<sup>5</sup> cells) were placed in a 24-well culture plate (Costar, New York, NY) and cultured for 48 h in a humidified chamber under 5% CO<sub>2</sub> and air. Following culture, the media were removed, and the attached cells were washed once with fresh M199 prior to incubation with culture medium containing the test agent. The cells were incubated for 2 h with 2 nA/GHRH, or 1 mM 8-bromo-cAMP or 1 uA/PMA (both from Sigma) since these treatments are known to stimulate GH release from culture of chicken pituitary cells (40). The media and cells were collected and then stored at -70°C until assayed.

The total concentration of GH was determined in duplicate by a specific and homologous ELISA, whereas the ir-cGH size variants that secreted to the medium and remaining in the tissue were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting and densitometry. Culture media of primary cell cultures were immunoprecipitated before SDS-PAGE

#### Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

A specific and homologous competitive ELISA was employed (Immulon 2HB, 96 wells, Chantilly) were coated with 12 ng of recombinant chicken GH (rcGH) in 100 µL of 1 M carbonate buffer, pH 10.3, for 16 h at 4°C. A polyclonal GH antiserum raised in rabbit against purified chicken GH (2) (diluted 1:100,000) was incubated with samples or serial dilutions of rcGH (5120 to 5 ng/mL, for the standard curve) in phosphate buffer with Tween-20 (TPBS) and nonfat milk (0.01 M phosphate, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20, and 1% [w/v] nonfat milk) for 16 h at 4°C. The samples and standards were added to the coated wells for 2 h at room temperature (20°C). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (Bio-Rad, Hercules, CA) was then added (diluted 1:3000 in TPBS with 1% nonfat milk and incubated at 2 h at room temperature). Bound secondary antibodies were developed by reaction with 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] substrate (Roche, Mannheim, Germany), and the OD in each well was determined at 405 nm in an automatic ELISA reader (Bio-Rad). This assay has a sensitivity of 2 ng/well (20 ng/mL), with inter- and intrassay coefficients of variation 3.27 and 3.91%, respectively. Other pituitary hormones had no crossreactivity in this assay (<0.001%).

#### Immunoprecipitation

To avoid interference in SDS-PAGE with salts present in the culture media, the samples were immunoprecipitated

with a specific monoclonal immunosorbent prepared as described by Berghman et al. (50). Monoclonal antibodies (MAbs) were produced in the laboratory using specific anti-cGH hybridoma cells generously provided by Dr Berghman (Texas A&M University). The MAbs were purified from ascites fluid using protein A-Sepharose matrix (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Briefly, 6 mL of ascites fluid was mixed with 0.75 g of protein A-Sepharose in glycine buffer (0.05 M Gly; 3 M NaCl, pH 8.9) and incubated with agitation at room temperature. The IgG fraction was obtained by elution with citrate buffer (0.05 M citrate, pH 3.5) and then dialyzed against coupling buffer (0.05 M phosphate, 0.5 M NaCl, pH 7.6). The immunosorbent was prepared by incubating the IgG fraction (15 mg) with activated CNBr-Sepharose 4B (1 g) in coupling buffer for 3 h in an end-over-end shaker, at room temperature. The unoccupied remaining active sites in the resin were blocked with 1.5 M Gly, 3 M NaCl (pH 8.0) overnight at room temperature. Finally, the immunosorbent was washed alternately with IBS (0.05 M Tris; 0.15 M NaCl, pH 7.6) and glycine (0.05 M Gly; 0.15 M NaCl, pH 3.0) buffers. The total cGH present in the culture media was isolated by immunoaffinity precipitation: aliquots (250 µL) of media were incubated with 1 mL of IBS and 100 µL of immunosorbent suspension (1:2 with IBS) in Eppendorf tubes in an end-over-end shaker, overnight at room temperature. The resin with the bound ir-cGH was recuperated by centrifugation (2365g) and then washed with IBS (three times) and with 0.02 M Tris, pH 7.6. Immunoreactive cGH was then isolated after resuspending the pellet in SDS-PAGE sample buffer, boiling for 5 min, and centrifuging in a microfuge at 2365g. The supernatants were collected and submitted to SDS-PAGE electrophoretic analysis.

#### Sodium Dodecyl Sulfate

##### Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Culture media of both primary cultures and whole pituitary incubations, as well as gland or cell extracts, were analyzed by SDS-PAGE on 1-mm-thick 12.5% gels (Mini-Protein; Bio-Rad) under NRC or under RC, in the presence of 5% P-mercaptoethanol, using the buffer system of Laemmli (51) and run at 150 V in the separating gel. A control, corresponding to 50 ng of rcGH, was included in each gel. Prestained molecular weight markers (Bio-Rad) were employed to determine the relative mobility of proteins.

#### Western Blotting

After the electrophoresis, the gels were equilibrated in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Gly, 20% methanol) for 15 min, and the proteins were electrotransferred to nitrocellulose sheets (Bio-Rad) at 200 mA for 1 h and then immunostained. Briefly, the membranes were blocked (5% nonfat milk in 0.02 M Tris, 0.5 M NaCl), and after 2 h they were incubated with polyclonal anti-cGH rabbit serum (2) at a dilution of 1:10,000. The membranes were washed and

AU: is Chantilly the company?

AU: correct meaning?

incubated for 2 h with a secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, 1:3000; Bio-Rad). Finally, the ir-cGH variants were visualized with a chemiluminescent substrate (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

A positive reaction for the presence of carbohydrate in the ir-GH was determined by the blot kit for glycoprotein detection (Bio-Rad), which employs a specific carbohydrate oxidation reaction to label the carbohydrate with biotin, and then the subsequent detection is done with streptavidin-alkaline phosphatase

#### Densitometric Analyses

The number, amount, and relative proportion of ii-cGH size variants were determined by densitometric analysis after digitalization of the luminograms in an HP scanner using IPLabGel 2.2 software (Scanalytics, Fairfax). In both, the whole-pituitary systems and in the primary cell culture system, the values obtained in the absence of the test agents (GHRH, 8-bromo-cAMP, PMA) were taken as control values

#### Statistical Analyses

Data (OD of each GH variant or the proportion of the variants as percentage of total GH immunoreactivity) were analyzed by analysis of variance. Differences between treatments were determined by Tukey test and considered significant at  $p < 0.05$

#### Acknowledgments

We thank Dr. Luc R. Berghman for his generous donation of the anti-cGH hybridoma cells. We also thank Pilgrim's Pride of México for the donation of chickens. We acknowledge the efficient work of Pilar Galarza-Barrios (librarian); Mattin Garcia-Servin (vivarium); Alberto Lara and Omar Hernández (computing unit); Lourdes Lara, Leopoldo González, and Rafael Favila (image analysis unit); and Gerardo Courtois (laboratory attendant). This work was partially supported by grants from DGAPA-UNAM (PAPIIT IN206196 and PAPIIT IN227399) and CONACYT (3455-PN and 31817-N). H.M.-C. received a doctoral fellowship from CONACYT.

#### References

- Baumann, G. (1999). *Horm Res* 51(Suppl), 1:2-6.
- Arámburo, C., Campbell, R. M., and Scanes, C. G. (1989). *Life Sci* 45, 2201-2207.
- Martens, G. J., Groenen, P. J., Braks, A. A., and Bussemakers, M. (1989). *Nucleic Acids Res* 25, 3974.
- Kawauchi, H., Maruyama, S., Yasuda, A., Yamaguchi, K., Shirabata, K., Kubota, J., and Hirano, T. (1986). *Arch Biochem Biophys* 244, 542-552.
- Nickel, B. E., Kardami, E., and Cattini, P. A. (1990). *Endocrinology* 126, 971-976.
- MacLeod, J. N., Worsley, I., Ray, J., Friesen, H. G., Liebhaber, S. A., and Cooke, E. N. (1991). *Endocrinology* 129, 1298-1302.
- Goodman, H. M., Iai, L.-R., Ray, J., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A. (1991). *Endocrinology* 129, 1779-1783.
- Goffin, V., Shiverick, K. T., Kelly, P., and Martial, J. A. (1996). *Endocr Rev* 4, 385-409.
- Kostyo, J. I., Skottner, A., Brostedt, P., Roos, P., Cameron, C. M., Forsman, A., Fryklund, L., Adamafio, N. A., and Skoog, B. (1987). *Biochim. Biophys. Acta* 925, 314-324.
- Wada, M., Ikeda, M., Takahashi, Y., Asada, N., Chang, K. I., Iakahashi, M., and Honjo, M. (1997). *Mol. Cell. Endocrinol* 133, 99-107.
- Fujikawa, T., Kaneko, H., Hibasami, H., Sakaguchi, K., Alam, K. S., Tanaka, M., and Nakashima, K. (1998). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 719-724.
- Wada, M., Uchida, H., Ikeda, M., Isunekawa, B., Naito, N., Banba, S., Tanaka, E., Hashimoto, Y., and Honjo, M. (1998). *Mol. Endocrinol* 12, 146-156.
- Uchida, H., Banba, S., Wada, M., Matsumoto, K., Ikeda, M., Naito, N., Tanaka, E., and Honjo, M. (1999). *Mol. Endocrinol* 23, 347-353.
- Asada, N., Takahashi, Y., Wada, M., Naito, N., Uchida, H., Ikeda, M., and Honjo, M. (2000). *Mol. Cell. Endocrinol* 162, 121-129.
- Yoshizato, H., Tanaka, M., Fujikawa, I., Higashimoto, Y., Shimizu, A., and Nakashima, K. (2000). *Endocr. J* 47, S37-S40.
- Ishikawa, M., Iachibana, I., Kamioka, I., Hoiikawa, R., and Katsumata, N. (2000). *Growth Horm. IGF Res* 10, 199-206.
- Kawauchi, H., Maruyama, S., Yasuda, A., Yamaguchi, K., Shirabata, K., Kubota, J., and Hirano, T. (1986). *Arch Biochem Biophys* 244, 542-552.
- Yamaguchi, K., Yasuda, A., Kishida, M., Hirano, T., Sano, H., and Kawauchi, H. (1987). *Gen. Comp. Endocrinol* 66, 447-453.
- Yasuda, A., Yamaguchi, K., Noso, I., Papkoff, H., Polenov, A. L., Nicoll, C. S., and Kawauchi, H. (1992). *Biochim. Biophys. Acta* 1120, 297-304.
- Arámburo, C., Carranza, M., Reyes, M., Luna, M., Martínez-Coria, H., Berumen, L., and Scanes, C. G. (2001). *Endocrine* 15, 231-240.
- Sinha, R. N., Seavey, B. K., Rice, V. P., Lindsey, I. I., and Lewis, U. J. (1974). *Endocrinology* 94, 883-891.
- Hart, I. C., Blake, L. A., Chadwick, P. M. E., Payne, G. A., and Simmonds, A. D. (1984). *Biochem. J* 218, 573-581.
- Arámburo, C., Montiel, J. L., Perera, G., Navarrete, S., and Sánchez, R. (1990). *Gen. Comp. Endocrinol* 80, 59-67.
- Sinha, Y. N. (1980). *Endocrinology* 107, 1959-1969.
- Montiel, J. L., Berghman, L. R., and Arámburo, C. (1992). *Gen. Comp. Endocrinol* 88, 298-306.
- Sinha, Y. N. and Jacobsen, B. P. (1987). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 1368-1375.
- Arámburo, C., Luna, M., Carranza, M., Reyes, M., Martínez-Coria, H., and Scanes, C. G. (2000). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 223, 67-74.
- Sinha, Y. N., Klemcke, H. G., Maurer, R. R., and Jacobsen, B. P. (1990). *Endocrinology* 127, 410-418.
- Sinha, Y. N., Klemcke, H. G., Maurer, R. R., and Jacobsen, B. P. (1990). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 194, 293-300.
- Bedecarrats, G., Guemene, D., Kuhnlein, U., and Zadworny, D. (1999). *Gen. Comp. Endocrinol* 113, 96-104.
- Bedecarrats, G., Guemene, D., Morvan, C., Crisostomo-Pinto, S., Kuhnlein, U., and Zadworny, D. (1999). *Gen. Comp. Endocrinol* 113, 105-111.
- Harvey, S. (1995). In: *Growth hormone. H. Z. Vey, S. Scanes, C. G., and Daughaday, W. H. (eds)*. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Scanes, C. G. and Haivey, S. (1984). *Gen. Comp. Endocrinol* 56, 198-203.
- Leung, F. C. and Taylor, J. E. (1983). *Endocrinology* 113, 1913-1915.

- 35 Harvey, S and Scanes, C G (1984) *Neuroendocrinology* 39, 314-320.
- 36 Scanes, C G., Carsia, R. V., Lauterio, T. J., Huybrechts, L., Rivier, J., and Vale, W (1984) *Life Sci.* 19, 1127-1134
- 37, Huybrechts, L. M., Decuypere, E., Scanes, C G., Callewaert, P., Peys, E, and Kuhn, E R (1985) *Horm Metab Res* 17, 690,691
- 38 Haivey, S., Sterling, R T., and Phillips, J G (1981) / *Endocrinology* 89,405-410.
- 39 Harvey, S., Scanes, C G, Chadwick, A., and Bolton, N J (1978). *Neuroendocrinology* 26, 249-260.
- 40 Pérez, F, M, Malamed, S., and Scanes, C G (1987) *Gen Comp. Endocrino!* 65,408-414.
- 41 Arámburo, C, Carranza, M, Sánchez, R., and Perera, G (1989). *Gen. Comp Endocrino!* 76, 330-339.
42. Arámburo, C, Montiel, T. L., Proudman, J, A, Berghman, L, R, and Scanes, C. G (1992) / *Moí Endocrino!* 8, 183-191
- 43 Berghman, L. R., Lens, P., Decuypere, E, Kuhn, E. R, and Vandesande, F (1987) *Gen Comp Endocrino!* 68,408-414.
- 44 Arámburo, C., Navarrete, S., Montiel, J, L., Sánchez, R., and Berghman, L R (1991). *Gen Comp. Endocrino!* 84,135-146
- 45 Berghman, L. R., Buyse, J., Huybrechts, L M., Darras, V. M., Vandesande, F, Kuhn, E R., Decuypere, E, and Scanes, C G (1994) *Comp. Biochem Phys'io! Pharmacoi Toxicol! Endocrinol!* 108, 161-169.
- 46 Guillemin, R, Brazeau, P., Bohlen, P., Esch, F., Ling, N, and Wehrenberg, W B (1982). *Science* 5, 585-587
- 47 Vale, W, Vaughan, J, Yamamoto, G., Spiess, J., and Rivier, I. (1983) *Endocrinology* 112, 1553-1555.
- 48 Spiess, J., Rivier, J, and Vale, W. (1983). *Nature* 303,532-535.
- 49 Wu, D., Clarke, I J, and Chen, C. (1997) *I Endocrino!* 154, 219-230.
- 50 Berghman, L R, van Beeumen, J, Decuypere, E, Kuhn, E R, and Vandesande, F. (1988) *J Endocrino!* 118,381-387.
- 51 Laemmli, U.K (1970) *Nature* 15, 680-685