



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Campus UNAM-UAQ Juriquilla,  
Qro.

## CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FISIOLÓGICA DE LA VARIANTE GLICOSILADA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO DE POLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN  
CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

**LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**

Director de Tesis: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

Querétaro 2004



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y  
FISIOLÓGICA DE LA VARIANTE  
GLICOSILADA DE LA HORMONA DE  
CRECIMIENTO DE POLLO**

**LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Director de Tesis: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Querétaro, Noviembre de 2004

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

El proyecto se llevó a cabo con el apoyo y recursos de los donativos de PAPIIT-UNAM IN 227399, IN 226002-3, IX242704 y CONACYT 31817N, 41218Q, beca para estudios de maestría de CONACYT 118220 y complemento de beca por parte de la DGEP-UNAM 98855058; así como con el apoyo con material biológico de Pilgrim's Pride de México, S.A. de C.V.

## RESUMEN

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales que puede tener la hormona de crecimiento (GH). Esto se ha reportado en GH de humano, rata, ratón, cerdo, pollo y búfalo. Falta por revelar la naturaleza y significado de la glicosilación de la GH. En este trabajo se presentan diversos aspectos sobre la caracterización de la GH glicosilada de pollo (G-cGH) y se examinan los cambios en la concentración hipofisiaria de G-cGH durante el desarrollo embrionario y post-eclosión. La G-cGH se purificó a partir de hipófisis de pollos por cromatografía de afinidad (concanavalina A-sefarosa y anticuerpo monoclonal conjugado a sefarosa). La G-cGH inmunorreactiva tiene un peso molecular de 26 kDa ó 29 kDa, determinado por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras, respectivamente. Su susceptibilidad a péptido-N-glicosidasa F y su resistencia a O-glicosidasa dan cuenta de la existencia de un enlace N-glicosídico. Con base en su afinidad por la concanavalina A y la aglutinina de germen de trigo, y la falta de unión a otras lectinas, así como a su susceptibilidad a la péptido-N-glicosidasa-F, se propone que la estructura del oligosacárido unido a la G-cGH es de naturaleza híbrida o biantenaria (NAcGlu<sub>2</sub>, Man). Se pudo observar la presencia de G-cGH a lo largo del desarrollo del pollo (desde el día 15 embrionario hasta adulto). Los ensayos de microscopía electrónica revelaron la presencia de especies GH-inmunorreactivas y de sitios afines a concanavalina A en los mismos gránulos en los somatotropos. Hubo diferencias en los niveles y proporción de G-cGH en la hipófisis durante el desarrollo y crecimiento, elevándose la proporción de G-cGH a partir del día 15 y 18 embrionario, y con mayores incrementos entre la novena y decimoquinta semanas de edad. La G-cGH estimuló la proliferación de células en el ensayo de linfoma Nb2, mientras que su contraparte no glicosilada careció de efecto.

## SUMMARY

Glycosylation is one of the post-translational modifications that growth hormone (GH) can undergo. This has been reported for human, rat, mouse, pig, chicken and buffalo GH. The nature and significance of GH glycosylation remains to be elucidated. This present study further characterizes glycosylated chicken GH (G-cGH) and examines changes in the pituitary concentration of G-cGH during embryonic development and post hatching growth. G-cGH was purified from chicken pituitaries by affinity chromatography (concanavalin A – Sepharose and monoclonal antibody bound to sepharose). Immunoreactive G-cGH has a MW of 26 kDa or 29 kDa as determined by SDS-PAGE, respectively, under non-reducing and reducing conditions. Evidence that it is N-glycosylated comes from its susceptibility to peptide N-glycosidase F, and its resistance to O-glycosidase. Based on the ability of G-cGH to bind concanavalin A or wheat germ agglutinin but not other lectins and its susceptibility to peptide N-glycosidase F, a hybrid or biantennary type glycopeptide (GlcNac<sub>2</sub>, Man) structure is proposed. Some G-cGH can be observed in the pituitary at most ages examined (from 15-day embryo to adult). Moreover, electron microscopy revealed the presence of both immuno-reactive GH and concanavalin A-reactive sites in the same secretory granules in the somatotrope. There were marked changes in the level and relative proportion of G-cGH in the pituitary gland during development and growth, the proportion of G-cGH rising during late embryonic development (e.g. between 15 and 18 days of development) and with further increases between 9 weeks and 15 weeks old. G-cGH was able to bind to chicken liver membrane preparations with less affinity than non-glycosylated monomer; on the other hand, however, G-cGH stimulated cell proliferation on Nb2 lymphoma bioassay whereas the non-glycosylated monomer was incapable to do it.

## DEDICATORIAS

A Dios N.S., porque es principio y fin de mi existencia.

A Luis Oscar, porque su amor es el que ha mantenido todo para seguir adelante, porque sólo con su apoyo y comprensión podíamos conservar el rumbo, porque ha sido fuerza y soporte para nuestra familia, y ha formado cimientos fuertes que soportan tempestades, para permitir apreciar solo lo hermoso de la vida. Por ser una persona admirable.

A mis padres, Amelia y Luis Felipe, les dedico esta obra desde lo más profundo de mi corazón sin poder contar con palabras para expresar todo mi agradecimiento, por el cariño que le dieron a mi familia para completar todos los días.

A mis hermanos Luis Felipe y José Francisco por su apoyo y confianza en mí.

A mi familia y a mis amigos, por todas sus muestras de cariño y apoyo en tiempos difíciles.

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Carlos Arámburo de la Hoz, por el gran apoyo que siempre me brindó; por enseñarme que la disciplina forma valores para alcanzar metas y por ser ejemplo de fortaleza, templanza y de dedicación al trabajo. Gracias por su amistad.

A la Doctora Maricela Luna Muñoz, por su comprensión y apoyo incondicional; por su asesoría y dedicación.

A los Doctores Alejandro Alagón Cano y Alfonso Cárabez Trejo, por sus valiosos consejos y observaciones.

A Martha, Hilda, Gerardo, Javier y Pilar, por la gran ayuda, atención y detalles que tuvieron conmigo. A Salvador, por su ejemplo y apoyo. A la Dra. Flor. Gracias.

Al Dr. Mauricio Díaz por ser para mí un gran investigador.

Al Dr. Luc Berghman, a Pilgrim's Pride de México, S.A. de C.V., por proporcionarnos material necesario para la realización del proyecto. Al Dr. Pedernera por compartirnos su experiencia en la obtención de hipófisis de embriones de pollo.

Dedico un agradecimiento especial por el soporte técnico y académico que me brindaron las diferentes unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología: a la Lic. Pilar Galarza y Rafael Silva, Biblioteca; al MVZ Martín García, Bioterio; al Dr. Fernando Barrios, Lic. Ma. de Lourdes Lara y Leopoldo González, Unidad de Imagen; al M. en C. Alberto Lara e Ing. Omar Hernández, Unidad de Cómputo; Dr. Alfonso Cárabez y Lourdes Palma, Microscopía electrónica; Dr. Edgar Heimer y Dr. Manuel Aguilar, Bioquímica de proteínas; Q. en A. Leonor Casanova, Unidad de enseñanza; en el trabajo de laboratorio, a la Dra. Maricela Luna, M. en C. Martha Carranza y T. A. Gerardo Courtois.

A los miembros del jurado para examen de grado, por la revisión del manuscrito: Dr. Federico Martínez, Dr. Enrique Pedernera, Dr. Luis Felipe Jiménez, Dr. Edgar Heimer, Dra. Carmen Aceves, Dr. Alejandro Alagón y Dr. Carlos Arámburo.

## ÍNDICE

RESUMEN	... iii
SUMMARY	... iv
DEDICATORIAS	... v
AGRADECIMIENTOS	... vi
ÍNDICE	
INTRODUCCIÓN	... 1
Hipófisis	... 2
Pars Distalis	... 5
Células acidófilas	... 8
Somatotropos	... 8
Mamotropos	...10
Hormonas secretadas por la hipófisis	...12
Hormona de crecimiento (GH)	...15
Efectos de la hormona de crecimiento	...15
Estructura de la molécula de GH	... 21
Heterogeneidad molecular de la GH	... 25
Variantes moleculares en la GH de pollo	... 28
Síntesis de la hormona de crecimiento	... 33
Transcripción del gen de la hormona de crecimiento	... 33
Traducción, almacenamiento y secreción de la hormona de crecimiento	... 37
Regulación de la síntesis y secreción de la hormona de crecimiento	... 38
Metabolismo de la hormona de crecimiento	... 40
Glicosilación	... 43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	... 49
HIPÓTESIS	... 51
OBJETIVOS	... 52
MATERIALES Y MÉTODOS	... 53
Material biológico	... 53

Reactivos	... 53
Métodos	... 54
Obtención y purificación del anticuerpo monoclonal $\alpha$ -cGH	... 54
Preparación del inmunoabsorbente	... 55
Purificación de G-cGH	... 55
Análisis electroforético	... 56
SDS-PAGE	... 56
<i>Western blot</i>	... 57
Digestión enzimática	... 57
Tratamiento de G-cGH con péptido N-glicosidasa F	... 58
Tratamiento de G-cGH con O-glicosidasa <sub>DS</sub>	... 58
Tratamiento de G-cGH con carboxipeptidasa Y	... 58
Determinación de la estructura de oligosacáridos	... 59
Secuenciación aminoterminal	... 59
Localización específica de la G-cGH en diferentes poblaciones de somatotropos o compartimentos subcelulares	... 60
Inmunohistoquímica	... 60
Inmunocitoquímica	... 61
Ensayo de bioactividad	... 61
Ensayo de radiorreceptor	... 61
Ensayo de proliferación de células de linforma Nb2	... 61
Determinación de los niveles de G-cGH en plasma y en hipófisis de pollos bajo diferentes condiciones fisiológicas	... 62
Elisa indirecto para la determinación de cGH total	... 62
Elisa indirecto para la determinación de G-cGH	... 63
Producción de anticuerpo monoclonal $\alpha$ -cGH	... 63
Análisis estadístico	... 63
RESULTADOS	... 64
DISCUSIÓN	... 102
CONCLUSIONES	... 117

REFERENCIAS	... 118
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	... 134
LISTA DE ABREVIATURAS	... 136
ANEXOS	
Anexo I	Purificación de anticuerpos monoclonales anti-cGH (MAb $\alpha$ cGH) por cromatografía de afinidad en proteína A-sefarosa ... 140
Anexo II	Cromatografía en concanavalina A-sefarosa ... 142
Anexo III	Purificación de cGH. Cromatografía de inmunoafinidad. (MAb $\alpha$ cGH acoplado a sefarosa 4B activada con BrCN) ... 145
Anexo IV	Electroforesis. SDS-PAGE ... 147
Anexo V	Electrotransferencia de proteínas ( <i>western blot</i> ) ... 150
Anexo VI	Revelado de <i>western blot</i> . Tinciones ... 151
Anexo VII	Inmunohistoquímica ... 157
Anexo VIII	Inmunocitoquímica ... 160
Anexo IX	Cuantificación de proteínas ... 163
Anexo X	ELISA indirecto para la determinación de cGH total Ensayo por desplazamiento (competencia) ... 165
Anexo XI	ELISA indirecto para la determinación de G-cGH Ensayo piloto de captura con Concanavalina A ... 169
Anexo XII	Preparación de anticuerpos monoclonales contra la variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo ... 170

Artículo:

Berumen LC, Luna M, Carranza M, Martínez-Coria H, Reyes M, Cárabez A and Arámburo C. (2004) Glycosylated chicken growth hormone: further characterization and ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland. *Gen. Comp. Endoc.* 139: 113-12.

## INTRODUCCIÓN

Desde la más pequeña célula, la materia viviente ejemplifica su nivel de organización. La información (*informare* significa formar, dar forma, organizar) es una medida del orden, una medida universal aplicable a cualquier sistema o estructura; cuantifica las instrucciones que se necesitan para producir cierta organización. Todos los organismos vivos están llenos de información, y el éxito de los organismos multicelulares consiste principalmente en el manejo de esta información, en la comunicación eficiente del estado en que se encuentra cada componente, coordinando y subordinando sus actividades. Este flujo de información es lo que hace a un organismo algo más que una masa de células, en contra de las presiones desordenantes que existen en el universo. La comunicación entre las células puede establecerse por contactos directos, ya sea por medio de moléculas ancladas a la membrana plasmática o por uniones comunicantes (*gap junctions*); la comunicación intercelular también se establece a través de mensajeros, productos sintetizados y liberados por células, que inducen una respuesta solamente en las células blanco que contienen receptores específicos para dicho mensajero (*Loewenstein, 1999; Alberts 2002*). Entre muchas moléculas mensajeras que existen encontramos a la hormona de crecimiento (*Growth hormone, GH*), que encuentra un lugar en la definición clásica de hormona –del griego  $\omega\rho\mu\epsilon\iota\nu$ : excitar– propuesta por William Bayliss y Ernest Starling en 1902: sustancia -mensajero químico- que producido en un órgano –glándula-, después de ser transportada por la sangre, actúa en un órgano distante para modular su función. Debemos tener en cuenta que los mensajeros químicos pueden tener respuestas alternativas en diferentes tiempos del ciclo de vida de un organismo o en diferentes órganos y tejidos; además, se puede mantener el término de acción hormonal, pero las moléculas que ejercen esta actividad a menudo tienen multiplicidad de propiedades fisiológicas alternativas a su papel hormonal. La hormona de crecimiento también parece tener dicho patrón, al ser producida principalmente por células de la hipófisis para ejercer una acción hormonal, pero además con acciones paracrinas y autocrinas cuando es sintetizada en otros tejidos (neural, inmune, reproductor), o por su posible interacción con células contiguas en la hipófisis (*Harvey & Hull, 1997; Woodman, 1997*).

## HIPÓFISIS

La hipófisis es una glándula pequeña situada en la silla turca, cavidad ósea en la base del cráneo, que está conectada con el hipotálamo por el tallo hipofisiario (Figura 1); su nombre refiere su posición debajo del cerebro. La hipófisis, también denominada glándula pituitaria - del latín “pituita” que significa “flema”-, era conocida en un tiempo como la “glándula maestra”, aunque ahora se sabe que el hipotálamo controla la secreción de hormonas hipofisiarias mediante la liberación de neurohormonas que pasan por un circuito portal denominado hipotálamo-adenohipofisiario (Kardong, 1997; Norris, 1997).

El eje hipotálamo-hipófisis-órgano efector consiste de (1) neuronas neurosecretoras que forman el núcleo neurosecretor de la región hipotalámica del cerebro, (2) la hipófisis o glándula pituitaria y (3) de glándulas y otros blancos a los que controlan directamente. Representa el enlace neuroendocrino entre el sistema nervioso y el tradicional sistema endocrino -ενδον dentro, κρινειν secretar- (Baulieu & Kelly, 1990; Norris, 1997). Las neurohormonas hipotalámicas regulan la secreción de la hipófisis, al igual que las hormonas hipofisiarias regulan la secreción de sus glándulas blanco (tales como la glándula tiroides, la corteza suprarrenal, los ovarios, los testículos y las glándulas mamarias). Por su parte, las propias hormonas de las glándulas blanco (periféricas) regulan la secreción hipotalámica, e incluso hipofisiaria, mediante un sistema de regulación denominado como retroalimentación de asa larga. El tipo de regulación que se establece entre hipotálamo e hipófisis se llama retroalimentación de asa corta, mientras que la autorregulación de la secreción hipotalámica por su mismo producto se conoce como retroalimentación de asa ultracorta (Aguilar, 1992).

La hipófisis tiene dos fuentes embrionarias: la neurohipófisis, en una excrecencia del hipotálamo -*infundibulum*- que retiene su conexión con el diencéfalo, y la adenohipófisis en la bolsa de Rathke, invaginación embrionaria del epitelio faríngeo (*stomodeum*). El origen de la hipófisis anterior en el epitelio faríngeo explica la naturaleza epiteliforme de sus células, mientras que el origen de la hipófisis posterior a partir de un tejido nervioso explica la presencia de gran número de células de tipo glial -**pituiticos**- en esta glándula (Kardong, 1997; Norris, 1997).

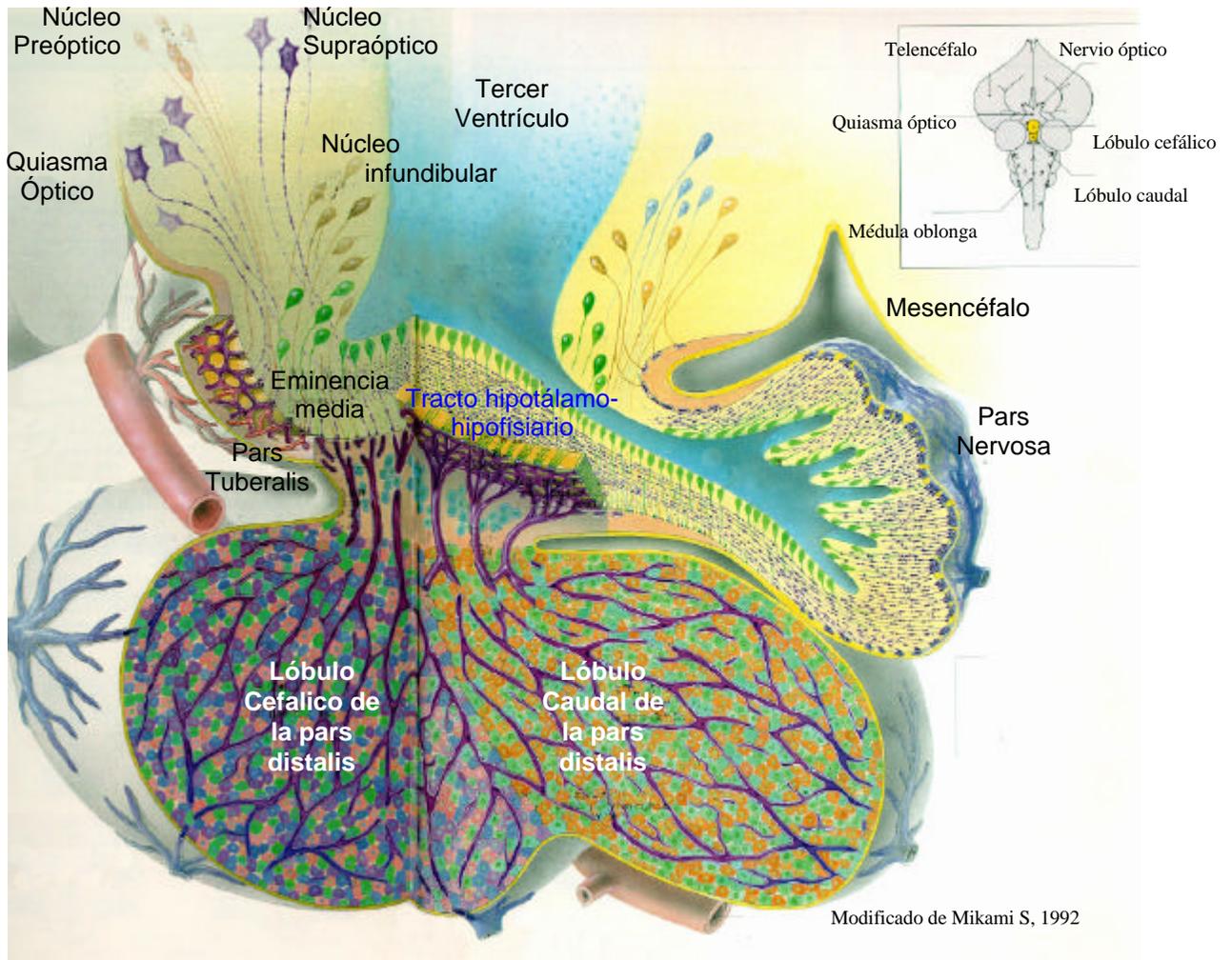


FIGURA 1. HIPÓFISIS DE AVE DE CORRAL Y SU RELACIÓN CON EL HIPOTÁLAMO. El recuadro indica la posición de la hipófisis (amarillo) con respecto al cerebro del ave. La pars distalis en las aves tiene dos lóbulos: cefálico y caudal

La adeno- y la neurohipófisis a su vez se diferencian en regiones que reconocemos por el arreglo de sus tejidos (cordones y grupos), propiedades tintoriales (acidófilos, basófilos y cromóforos) o posiciones anatómicas (Kardong, 1997).

La adenohipófisis se puede subdividir en tres regiones o *pars*: a) *pars distalis*, anterior, generalmente la mayor porción y a menudo diferenciada en lóbulos (cefálico y caudal) o subregiones (proximal y rostral); b) *pars tuberalis*, localizada anterior a la *pars distalis* encontrada sólo en tetrápodos e implicada en procesos reproductivos (en elasmobranquios parece corresponder a la denominada *pars ventralis*); y c) una zona pequeña y relativamente avascular denominada *pars intermedia*, que casi no existe en el ser humano y definitivamente no está presente en aves, aunque es mucho más grande y funcional en otros vertebrados. En cuanto a la neurohipófisis, se pueden identificar dos regiones: la *pars nervosa* y la eminencia media (ausente en algunos peces), además del tallo infundibular (tallo neural); la eminencia media también suele dividirse en regiones anterior y posterior. Desde el punto de vista anatómico, la hipófisis se puede dividir en dos porciones distintas: hipófisis anterior, que incluye la *pars tuberalis* y la *pars distalis* de la adenohipófisis; e hipófisis posterior, que incluye la *pars intermedia* de la adenohipófisis y la *pars nervosa* de la neurohipófisis, pero no la eminencia media (cuadro 1). (Kardong, 1997; Norris, 1997).

CUADRO 1. DIVISIONES DE LA HIPOFISIS (Kardong, 1997)

FUENTE EMBRIONARIA	DIVISIÓN EMBRIONARIA		DIVISIÓN ANATÓMICA
BOLSA DE RATHKE	ADENOHIPOFISIS	PARS TUBERALIS	LÓBULO ANTERIOR
		PARS DISTALIS	
		PARS INTERMEDIA	LÓBULO POSTERIOR
INFUNDIBULUM	NEUROHIPOFISIS	PARS NERVOSA	LÓBULO POSTERIOR
		TALLO INFUNDIBULAR Y	
		EMINENCIA MEDIA	

## *PARS DISTALIS*

La pars distalis o lóbulo anterior está compuesta por cordones o grupos irregulares de células glandulares. El estroma de la glándula no es abundante. Parte del tejido conjuntivo que acompaña a la arteria hipofisiaria superior y a las venas portales penetra en el lóbulo anterior, y los cordones de células parenquimatosas están rodeados por fibras reticulares delicadas. Los sinusoides de pared delgada del lóbulo también están soportados por fibras reticulares. El endotelio que reviste los sinusoides y sus poros facilitan sin duda la difusión de factores de liberación de origen sanguíneo hacia la glándula y el paso de productos secretores proteínicos de sus células a la sangre (Fawcett, 1995).

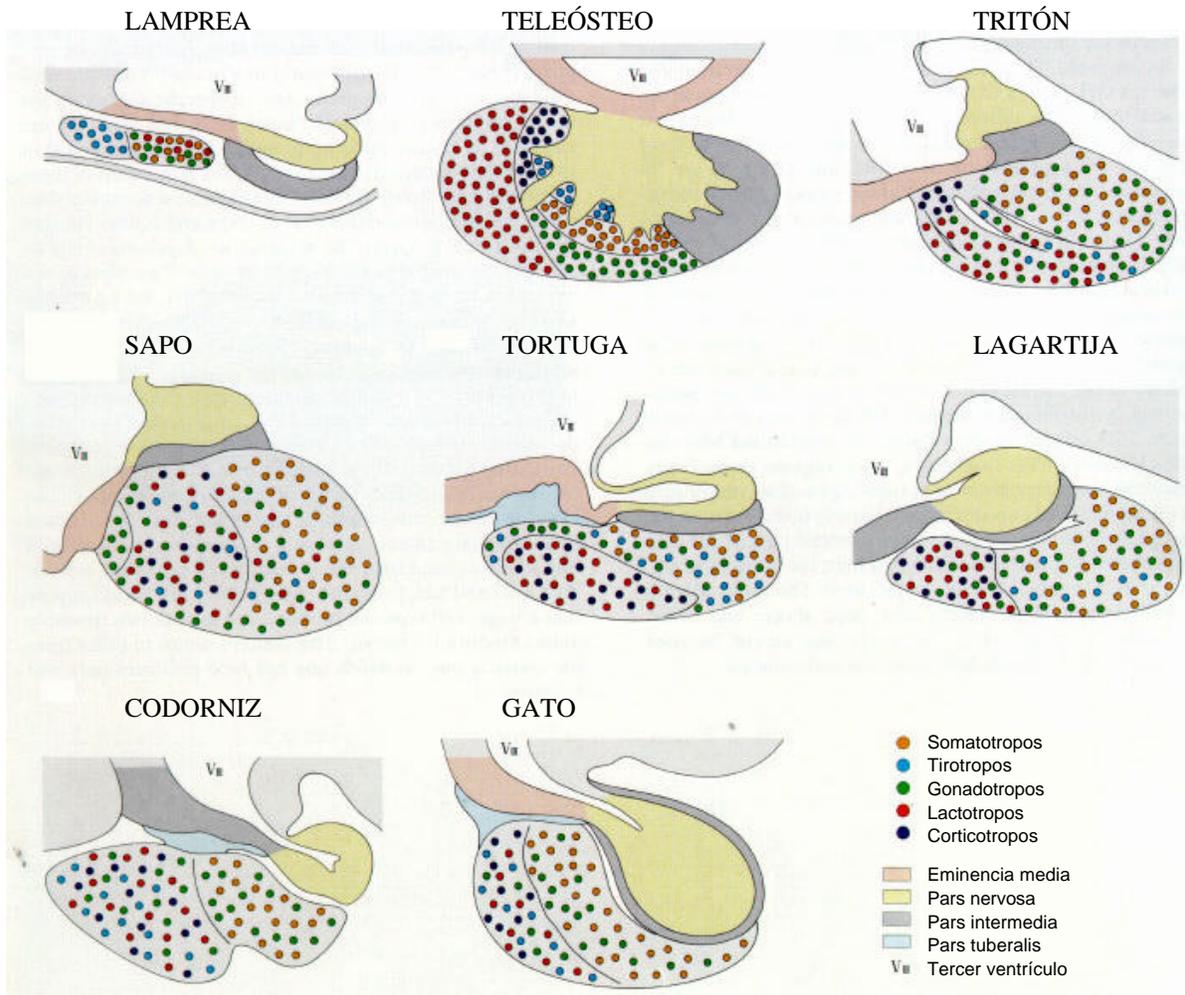
Las células glandulares se han clasificado, tradicionalmente, como cromófilas o cromófobas en razón a su avidez o falta de afinidad por los colorantes comúnmente utilizados en la tinción rutinaria de los cortes histológicos. A las células cromófilas se las denominó *acidófilas* o *basófilas* de acuerdo con su tinción con colorantes ácidos o básicos. A las células que mostraban una tinción citoplásmica escasa o nula se las llamó *cromófobas*. El término basófilo, en el sentido en que se aplica a las células de la hipófisis, se refiere a la propiedad tintorial de los gránulos secretores y no debe confundirse con la basofilia atribuible a la ribonucleoproteína citoplásmica de las células en general. Esta terminología sirvió para diferenciar las dos clases principales de células cromófilas en un momento en que había pocas combinaciones de colorantes de uso general para la tinción histológica. (Fawcett, 1995).

A medida que se fueron descubriendo más hormonas hipofisiarias se hizo evidente que probablemente existieran más tipos de células que las acidófilas, basófilas y cromófobas, y ésto fue confirmado cuando los estudios con microscopía electrónica revelaron varios tipos celulares que no se podían diferenciar por el tamaño y forma de sus gránulos secretores. Desde entonces, ha sido posible elaborar anticuerpos específicos para cada una de las hormonas y conjugar el anticuerpo a un colorante fluorescente. Cuando un anticuerpo marcado de este modo se aplica sobre un corte histológico de la hipófisis, se une a los gránulos secretores del tipo celular que produce esa hormona y hace que esas células sean

fluorescentes al microscopio cuando se iluminan con luz ultravioleta. Igualmente, si un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante se aplica a un corte ultrafino de hipófisis, puede identificarse el lugar de producción de esa hormona con el microscopio electrónico al localizar el producto de reacción de un método histoquímico para la peroxidasa (Fawcett, 1995).

Hoy día es práctica común referirse a los tipos celulares de la hipófisis anterior, no por sus propiedades tintoriales sino por términos que identifican el órgano “blanco” estimulado por la hormona producida. De este modo, las células que secretan hormona estimulante de la tiroides (TSH) se denominan *tirotropas*; las células que secretan hormonas gonadotrópicas (GTH) se llaman *gonadotropas*; las células que secretan hormona adrenocorticotropa (ACTH) se denominan *corticotropas*; las que secretan hormona de crecimiento se denominan *somatotropas*, etc. Los términos que designan a la hormona secretada pueden ser empleados también por algunos autores, por ejemplo, *célula TSH*, *célula ACTH* y *célula FSH/LH* (que produce las gonadotropinas: hormona foliculoestimulante –FSH y hormona luteinizante LH) (Fawcett, 1995). La *pars distalis* contiene aproximadamente 30-35% de células acidófilas, de 15 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, que contienen GH o prolactina (PRL). Las basófilas, de 15 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, son aproximadamente el 10-15% y contienen LH, FSH, TSH o ACTH (Norman & Litwack, 1997). En las aves, los lactotropos, corticotropos y tirotropos son más abundantes en el lóbulo cefálico, mientras que los gonadotropos se distribuyen en ambos lóbulos (Figura 2). Los somatotropos se encuentran en su mayor parte en el lóbulo caudal (Hull et al, 2000).

La descripción de la ultraestructura de los tipos celulares que se expone a continuación se basa en los estudios de rata de laboratorio, considerando que las diferencias interespecíficas son menores, pero se exponen ciertas aclaraciones para aves, en particular para el pollo.



Modificado de Mikami S, 1992

FIGURA 2. IMAGEN REPRESENTATIVA DE HIPÓFISIS DE DIFERENTES VERTEBRADOS. Se observa la peculiar distribución de las células productoras de diferentes hormonas.

## CÉLULAS ACIDÓFILAS

Las células acidófilas son más numerosas en la porción posterolateral del lóbulo anterior. Su citoplasma se tiñe con eosina y otros colorantes ácidos y sus gránulos son lo bastante grandes como para ser vistos con el microscopio de luz. Son células redondas relativamente pequeñas con un complejo de Golgi bien desarrollado y mitocondrias pequeñas en forma de bastoncillo. Mediante métodos inmunocitoquímicos y micrografías electrónicas pueden distinguirse dos tipos de células acidófilas: los somatotropos y los lactotropos o mamotropos (Fawcett, 1995).

### Somatotropos

Son células acidófilas que contienen numerosos gránulos esféricos u ovoides, electrodensos, de 300-350 nm de diámetro, hoy día denominadas células *somatotropas* o *STH*. Estas células son el tipo celular más abundante en el lóbulo anterior de la hipófisis. Los somatotropos secretan hormona de crecimiento (somatotropina). Son células de forma redonda, oval o triangular, con un núcleo grande con heterocromatina, nucléolos prominentes y numerosos poros nucleares. El complejo de Golgi está muy bien desarrollado, especialmente en la región yuxtannuclear. Las cisternas de su retículo endoplásmico bien desarrollado tienden a disponerse en paralelo a la superficie celular, con numerosos ribosomas libres. Las mitocondrias son de forma oval o elongadas, son pequeñas con crestas oblicuas (Fawcett, 1995; Harvey, 1995).

El número y tamaño de los somatotropos y sus gránulos de secreción varían durante la ontogenia y el estado reproductivo y están regulados por factores endocrinos y ambientales. De hecho, los somatotropos diferenciados retienen la capacidad de dividirse; las células no diferenciadas también se dividen y se diferencian a lo largo de toda la vida del individuo. El número de somatotropos y sus gránulos de secreción se incrementa durante la vida fetal y desarrollo postnatal. Conforme el animal envejece, el número de células también disminuye, lo cual puede reflejar el hipotiroidismo progresivo que se asocia precisamente con envejecimiento y senescencia, y se reproduce –modela- con hipotiroidismo experimental. En

cuanto al dimorfismo sexual hipofisiario que presentan algunas especies, se observa que los machos tienen mayor número de células de GH que las hembras, en respuesta a la presencia de testosterona durante el período neonatal (e incluso la presencia de estrógenos o progesterona después de la pubertad). Es más, los andrógenos incrementan la abundancia relativa de somatotropos con gránulos grandes (de 350 nm aproximadamente), mientras que los estrógenos, aunque tienen un efecto hiperplásico en somatotropos, incrementan preferencialmente la población de lactotropos, reduciendo la abundancia relativa de células de GH. En dosis altas, tienen un efecto supresor de la proliferación de células de GH (Harvey, 1995).

Se han descrito subpoblaciones de somatotropos que difieren en tamaño, forma, densidad y ultraestructura, en algunas especies (rata, ratón, cabra, cerdo); esta heterogeneidad puede reflejar diferencias moleculares en la hormona sintetizada o su edad intracelular, así como diferencias en receptores de los somatotropos a factores reguladores hipotalámicos (innervación neuropeptidérgica y/o acciones paracrinas); también por diferentes mecanismos intracelulares de transducción de señales, por diferencias en la localización dentro de la hipófisis y diferencias debidas a la maduración celular (Harvey, 1995).

Se han clasificado los somatotropos de rata en tres tipos conforme a su morfología – ultraestructura-: tipo I con gránulos de secreción grandes, aprox. 350 nm de diámetro; tipo II, con gránulos de secreción más pequeños, 100-300 nm de diámetro; y tipo III con gránulos de secreción de menos de 150 nm de diámetro. En machos la proporción de cada tipo es de 68, 22 y 10% respectivamente, mientras que en hembras es el 44, 47 y 9%. En grupos de neonatos, el tipo III es todavía más frecuente (25%). Como se mencionó, la proliferación de cada subtipo responde de manera diferente a esteroides gonadales *in vivo*: la testosterona aumenta la incidencia del tipo I, mientras que el estradiol aumenta la del tipo II. (Harvey, 1995).

También se cuenta con una clasificación funcional en subpoblaciones que muestran diferencias cuantitativas en su respuesta de secreción de GH. Se han separado por

centrifugación en gradientes, las células de alta densidad y las de baja densidad. Las primeras contienen más gránulos de secreción, menos retículo endoplásmico rugoso y menos ARNm (Dobado-Berrios *et al.*, 1996). También se han aislado poblaciones semejantes para el cerdo que responden con mayor secreción a estímulos de somatostatina (Castaño *et al.*, 1996). Los somatotropos pueden ser funcionalmente heterogéneos y diferir en la captura de precursores o con diferentes respuestas a hormona liberadora de GH (GHRH), somatostatina (SRIF) e IGF-I (*Insulin like Growth Factor- I*) (Harvey, 1995).

En el pollo la mayoría de los somatotropos se encuentran en el lóbulo caudal –61% del total de células de la adenohipófisis-, asociados en grupos o cordones de 4 a 15 somatotropos, aunque se pueden encontrar somatotropos individuales a todo lo largo de la glándula (Fawcett, 1995; Harvey, 1995; López *et al.*, 1995; Hull *et al.*, 1997; Harvey & Hull, 1997). Un pequeño número de somatotropos, menos del 1% del total celular, se encuentran también en el lóbulo cefálico. Estos somatotropos son una población diferente de células secretoras de GH, ya que no son responsivos a los efectos estimulatorios de la hormona liberadora de GH (GHRH) en su liberación de GH y expresión del gen de GH, a diferencia de las células del lóbulo caudal (Kansaku *et al.*, 1994; Harvey & Hull, 1997)

Se han detectado células inmunorreactivas a GH en hipófisis de pollo desde el día 4.5 (Thommes *et al.*, 1987), 8 (Mikami & Takahashi, 1987), 10 (Malamed *et al.*, 1993; Porter *et al.* 1995) ó 12 (Jozsa *et al.*, 1979; Allaerts *et al.*, 1999) de desarrollo embrionario, y se han identificado morfológica y tintorialmente desde el día 10, aunque no se consideran completamente diferenciados hasta el día 15 ó 18-19 (Hull *et al.*, 2000).

## Mamotropos

El segundo tipo de célula acidófila, el *mamotropo* o *lactotropo*, tiende a distribuirse individualmente en el lóbulo anterior, en lugar de en cordones o grupos. Secretan a la hormona lactógena *prolactina*. Los mamotropos son células relativamente pequeñas con una forma ovoide o poligonal. En hombres y en mujeres en el ciclo sexual, suelen tener unas pocas cisternas alargada de retículo endoplásmico y un complejo de Golgi yuxtanclear de tamaño medio, pero durante la lactancia estas estructuras se desarrollan en un grado mucho

mayor, con numerosas cisternas paralelas de retículo en el citoplasma periférico y un complejo de Golgi inmenso de un tamaño cercano al del núcleo. Los mamotropos son relativamente fáciles de identificar, debido a sus gránulos densos grandes característicos, con un tamaño que oscila entre los 500 y 900 nm de diámetro. Gránulos pequeños (100-150 nm), presentes en la cisterna interna del Golgi brotan y, posteriormente, se agregan y fusionan para formar los gránulos más grandes (Fawcett, 1995).

Durante el embarazo la hipófisis anterior duplica su tamaño debido, en gran medida, a la hipertrofia e hiperplasia de los mamotropos. La concentración de prolactina en la sangre aumenta progresivamente desde la quinta semana de embarazo hasta su término, en que alcanza un nivel 10 veces el de la mujer no embarazada. Este nivel elevado de prolactina estimula el desarrollo de las glándulas mamarias, pero el efecto lactogénico de la hormona es suprimido durante el embarazo por los altos niveles circulantes de las hormonas ováricas, estrógeno y progesterona. Después del nacimiento del niño, una caída brusca en estas hormonas esteroides permite que el efecto lactogénico se exprese en la secreción de leche. La secreción de prolactina es estimulada por la succión; en animales experimentales, se puede encontrar un aumento en la cantidad de gránulos secretores que se fusionan con la membrana celular minutos después de la iniciación de la succión por el bebé (Fawcett, 1995).

Al finalizar la lactancia, los mamotropos disminuyen. El exceso de gránulos secretores se fusiona con lisosomas para formar vacuolas autofágicas en cuyo interior son degradados por enzimas hidrolíticas. Este método de destrucción de los productos secretores que ya no son necesarios se llama crinofagia, y se observa también en otras glándulas. El exceso de orgánulos también es eliminado mediante autofagia, y los mamotropos revierten al estado relativamente inactivo característico de la mujer con ciclos menstruales. Se piensa que, probablemente, también interviene una degeneración de toda la célula. Los mamotropos son responsables de cerca del 50% del recuento total de células hipofisarias en ratas lactantes y este porcentaje disminuye a cerca del 25% a los 7 días de finalizar la lactancia (Fawcett, 1995).

Antiguamente se creía que existía un tipo celular diferente para cada hormona secretada por la hipófisis. Aunque en general esto es cierto, las gonadotropas secretan dos hormonas (FSH

y LH), y bajo ciertas circunstancias, pueden encontrarse hormona de crecimiento y prolactina en los gránulos secretores de un tipo de célula al que se ha denominado *somatomamotropo*. No hay evidencia clara de la existencia de estos somatolactotropos en el pollo, aunque algunos somatotropos en el lóbulo cefálico pueden ser somatotirotropos, ya que co-secretan tirotropina (Hull *et al.*, 2000; Hull *et al.*, 1997; Harvey & Hull, 1997). Por otro lado, los corticotropos sintetizan una prohormona grande que sufre una división postranscripcional para dar lugar a tres hormonas diferentes, ACTH,  $\beta$ -endorfina y  $\beta$ -lipotropina (Fawcett, 1995).

## HORMONAS SECRETADAS POR LA HIPÓFISIS

La neurohipófisis secreta los nonapéptidos vasopresina y oxitocina. La vasopresina actúa en músculo liso en las paredes de arteriolas periféricas, causando su constricción. El efecto es el incremento de la resistencia al flujo sanguíneo y elevación de la presión arterial. La vasopresina también se denomina hormona antidiurética (ADH) porque promueve la conservación de agua por los riñones. La ADH actúa sobre las paredes de los conductos colectores renales haciéndolos permeables al agua, contribuyendo a la mayor retención de agua y la formación de orina concentrada. Esta hormona también tiene efectos en la síntesis de prostaglandinas y la glucogenolisis hepática. Pueden encontrarse algunas variantes de esta hormona en diferentes especies de vertebrados; por ejemplo, si el aminoácido 8 es arginina, la vasopresina se conoce como arginina vasopresina (AVP), pero si es lisina, toma el nombre de lisina vasopresina (LVP); la LVP se puede encontrar en cerdos e hipopótamos, por ejemplo. En aves, reptiles, anfibios y peces, se encuentra en su lugar la vasotocina, en que el aminoácido fenilalanina en la AVP ha cambiado por la isoleucina correspondiente (Kardong, 1997; Reichlin, 1998).

La segunda hormona de la neurohipófisis es la oxitocina, cuyos tejidos blancos son el miometrio –la capa de músculo liso del útero, y las células mioepiteliales de la glándula mamaria. Los niveles de oxitocina en sangre se elevan al término de la gestación, y participa en las contracciones uterinas durante el parto del recién nacido. Además promueve la contracción de las células mioepiteliales en las paredes de glándulas mamarias exocrinas con la consiguiente eyección de leche desde las glándulas mamarias hasta el pezón, gracias al

reflejo neural iniciado con la succión. En peces, reptiles, anfibios y algunos peces se encuentra en su lugar la mesotocina (aminoácido 8 leucina de oxitocina, cambiado por isoleucina) y en otros peces la isotocina (aminoácido 4 glutamina por serina, y 8 leucina por isoleucina). Otros péptidos encontrados, la mayoría en elasmobranquios, son la fenipresina, valitocina, glumitocina y aspartocina. Todos estos péptidos se encuentran asociados a las neurofisinas, que en realidad forman parte de la misma preprohormona (Mikami, 1992; Reichlin, 1998).

La adenohipófisis secreta hormona de crecimiento, hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante de la tiroides, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, prolactina, y hormona estimulante de los melanocitos. Entre otras sustancias y neurotransmisores encontrados en la adenohipófisis también están la lipotropina y la endorfina (Cuadro 2). Las hormonas de la hipófisis anterior desempeñan papeles fundamentales en el control de funciones metabólicas en todo el organismo. (Norris, 1997).

## CUADRO 2. HORMONAS ADENOHIPOFISIARIAS

( Modificado de Norris, 1997; Tyrell et al, 1994; Kardong, 1997; Norman & Litwack, 1997)

Nombre	Abreviatura	Sinónimos	Fuente celular	Órgano blanco principal	Función convencional
Somatomamotropinas (evolucionaron de un gen ancestral común)					
Prolactina	PRL	Mamotropina Luteotropina LTH	Lactotrofo Mamotrofo	Glándula mamaria	En mamíferos promueve el desarrollo de glándula mamaria y la producción de leche. En aves estimula la síntesis de lípidos y la aparición de tejido de incubación
Hormona de crecimiento	GH	Somatotropina Hormona somatotrópica STH	Somatotrofo	No tiene un tejido específico (Hígado)	Promueve el crecimiento de tejidos blandos y esqueléticos; efectos en metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos
ACTH y péptidos relacionados (todas derivan de un precursor común: la pro-opiomelanocortina POMC, de peso molecular 28,500) *					
Corticotropina (1 a 39)	ACTH	Hormona adreno-corticotropa Adrenocorticotropina	Corticotrofo	Corteza adrenal (suprarrenal)	Estimula la síntesis y secreción de corticosteroides
Péptido tipo corticotropina del lóbulo intermedio (18 a 39)	CLIP				
β-Lipotropina (42 a 134)	β LPH	--	Corticotrofo ¿?	Tejido adiposo ¿?	Estimula la hidrólisis de grasa a ácidos grasos libres y glicerol
γ-Lipotropina (42 a 101)	γ LPH				
Melanotropina α-MSH: (1 a 33) β-MSH: (84 a 101) γ-MSH: (-55 a -44)	MSH	Intermedina, Hormona estimulante (α, β, γ) de melanocitos o melanóforos Melanocortinas (-α)	Melanotrofo Pars intermedia	Melanocito	Estimula la síntesis del pigmento melanina por los melanocitos y su distribución dentro de la célula denominada melanóforo
Endorfinas α-endorfina: (61 a 76) β-endorfina: (61 a 91)		Morfina endógena			Analgesia ¿? Contienen la secuencia del péptido metencefalina (61 a 65)
Glicoproteínas; todas tienen 2 subunidades; la subunidad alfa es común para las tres, mientras que la beta es específica para cada una					
Tirotropina	TSH	Hormona estimulante de la tiroides	Tirotrofo	Glándula tiroides	Estimula la síntesis y liberación de hormonas tiroideas
Hormona folículo estimulante	FSH	Folitropina	Gonadotrofo	Gónada	Estimula el desarrollo folicular en hembras y la espermatogénesis en machos; estrógeno en hembras
Hormona luteinizante	LH	Hormona estimulante de las células intersticiales ICSH Lutropina	Gonadotrofo Luteotrofo	Gónada	Promueve la ovulación. Estimula la síntesis de estrógenos y progesterona en hembras y la secreción de andrógenos en machos

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

## HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

La hipófisis anterior secreta hormona de crecimiento (GH), llamada también somatotropina, por lo general en cantidades mayores que cualquier otra de sus hormonas. Como su nombre lo indica, la hormona de crecimiento estimula el crecimiento en niños y jóvenes; aunque el crecimiento fetal es relativamente independiente de GH, el nivel plasmático de GH se relaciona con la velocidad del desarrollo en el período neonatal, pero no se encuentra relación con crecimiento o épocas de crecimiento posteriores. Sin embargo, la concentración de GH en adultos cambia, particularmente aumenta bajo condiciones de ayuno –en especial la hipoglucemia- y otras formas de estrés o en el ejercicio, lo que implica que esta hormona tiene importantes efectos metabólicos aún cuando los años de crecimiento han terminado. De hecho, la hiposecreción de GH en un adulto produce una rara condición llamada caquexia hipofisiaria (Simmonds' disease) (*Frantz y Rabkin, 1964; Fox, 1999*). En animales jóvenes, niveles deficientes de GH conducen a enanismo hipofisiario, y niveles excesivos conllevan a gigantismo hipofisiario. La acromegalia es una condición que ocurre en adultos con un exceso de GH liberado después de la pubertad, en quienes los huesos se engruesan desproporcionadamente, al igual que la piel -y se vuelve más grasosa-, los labios, las cuerdas vocales –por lo que la voz enronquece-; el pliegue nasolabial es exagerado, las manos y pies crecen, al igual que la cabeza y el arco zigomático lo que produce la prominencia del hueso de la barbilla y las mejillas –prognatismo-. El crecimiento desproporcionado puede llevar hasta artritis degenerativa, dolor de espalda y huesos, diabetes, organomegalia, y complicaciones en el sistema cardiovascular, entre otros. (*Kardong, 1997, Thorner et al, 1998*).

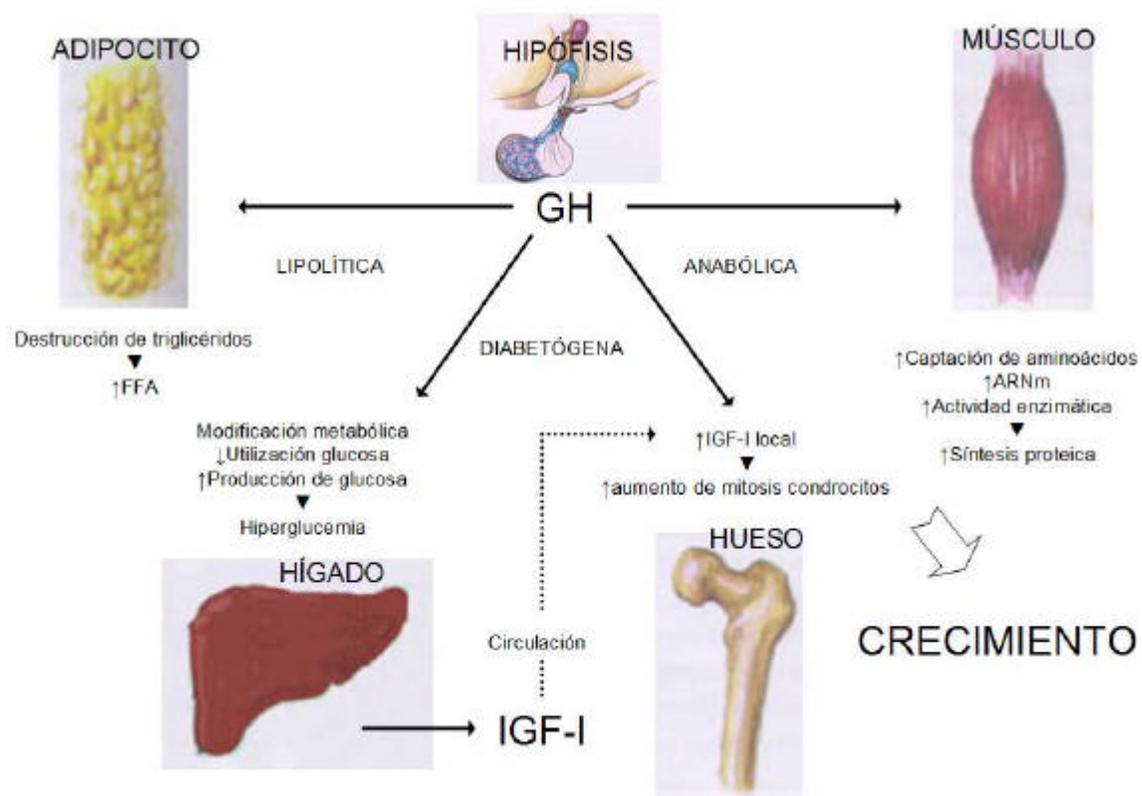
## EFFECTOS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

Las acciones de la GH sobre sus órganos blanco se llevan a cabo tanto directa como indirectamente, mediante la participación de somatomedinas –término con el que se refiere a péptidos que desempeñan una actividad mediadora. Se propuso la existencia de las somatomedinas por el hallazgo de que el crecimiento y actividad mitótica del cartílago era dependiente de GH *in vivo*, pero la adición directa de GH *in vitro* no era capaz de ejercer

tales acciones, mientras que el suero de ratas normales sí estimulaba la proliferación del cartílago. Dicho factor plasmático responsable, diferente pero dependiente de GH, no se encontraba en el plasma de animales hipofisectomizados pero reaparecía cuando éstos eran tratados con GH exógena. La acción básica de este factor sería la de estimular la incorporación de sulfatos a los proteoglicanos del cartílago, por lo que fue denominado “factor de sulfatación”. (Salmon y Daughaday, 1957; Thorner et al, 1998)

En la actualidad se sabe que las somatomedinas son en realidad péptidos estructural y funcionalmente similares a la insulina, por lo que se propuso el término de “factor de crecimiento insulinoide” (IGF por sus siglas en inglés -*Insulin like Growth Factor*: IGF-I o somatomedina C, e IGF-II o somatomedina A). Las concentraciones séricas de IGF-I se encuentran elevadas en la acromegalia y disminuidas en las deficiencias de GH; los niveles de IGF-II no cambian en la acromegalia y se reducen modestamente en las deficiencias de GH. Con ello se sugiere que el IGF-I es el mediador importante de la acción de GH, y el hecho de que IGF-I inhiba la secreción de GH apoya esta hipótesis. Las acciones de IGF-I pueden ser locales o sistémicas participando como hormona. Se ha establecido una hipótesis dual, basada en estudios con preadipocitos, en la que la GH estimula primero a las células precursoras para diferenciarse, y las somatomedinas actúan después como mitógenos para estimular la expansión clonal de las células diferenciadas. Cabe mencionar que la administración de IGF-I no promueve el crecimiento tal como lo hace la GH. (Devesa et al, 1992; Thorner et al, 1998).

La GH se ha descrito como una hormona anabólica, lipolítica y diabetógena, por sus efectos metabólicos, además de promover el crecimiento de tejidos blandos y huesos (Figura 3). En el metabolismo proteínico (Cuadro 3), la GH aumenta la retención de nitrógeno (se observa disminución del nitrógeno ureico de la orina y balance positivo de nitrógeno), acelera la entrada de algunos aminoácidos a las células (disminución en su concentración sanguínea), aumenta la síntesis (transcripción) de ARN mensajero y ribosómico, y aumenta la traducción de ARN mensajero para aumentar en forma general la producción de proteínas; además disminuye el catabolismo de proteínas y aminoácidos, posiblemente por el efecto ahorrador de la movilización de ácidos grasos (Devesa et al, 1992; Guyton, 1996; Thorner et al, 1998).



Modificado de *Devesa et al, 1992*

FIGURA 3. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA GH. La GH se ha descrito como una hormona anabólica, lipolítica y diabética. Sus efectos pueden ser directos o indirectos mediante el factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I)

### CUADRO 3. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

#### ANABÓLICA

↑ CAPTACIÓN TISULAR DE  
AMINOÁCIDOS

↑ FABRICACIÓN DE ARNm

↑ ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

} NEOSÍNTESIS PROTEICA  
↓  
BALANCE NITROGENADO  
POSITIVO\*<sup>1</sup>

↓ CATABOLISMO DE PROTEÍNAS  
Y AMINOÁCIDOS

Estimulación del <b>crecimiento</b> animal	Evans & Long, 1922
Ensanchamiento de la placa de cartílago epifisiario de la tibia (rata)	Greenspan et al, 1949
Aumento en la incorporación de <sup>35</sup> S en sulfatos de condroitina de cartílago (vía IGF-I)	Salmon y Daughaday, 1957
Síntesis de ARN (hígado)	Jefferson & Korner, 1967
Duplicación de células en cultivo	Moon et al, 1962
Estimulación de la captura de aminoácidos por tejido muscular <i>in vitro</i>	Kostyo JL, 1968
Síntesis de proteínas plasmáticas (hígado)	Griffin & Miller, 1974
Estimulación de la liberación de IGF-I hepática	McConaghey & Sledge, 1970 Green et al, 1985 Holley and Wass, 1989
Producción de somatomedina por cultivo de fibroblastos humanos	Atkinson et al, 1980
Mantenimiento de la población del tejido linfático con linfocitos	Snow et al, 1981
Promueve la diferenciación de líneas celulares derivadas de mesénquima	Green et al, 1985 Ohlsson et al, 1992
Incremento en la formación de colonias eritroides en médula ósea <i>in vitro</i> en presencia de eritropoyetina	Steenfos & Jansson, 1992

#### DIABETÓGENA \*<sup>2</sup>

↓ UTILIZACIÓN CELULAR DE  
GLUCOSA

↑ PRODUCCIÓN HEPÁTICA DE  
GLUCOSA

} HIPERGLUCEMIA  
↓  
HIPERINSULINISMO

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

#### EFFECTOS TIPO INSULINA \*<sup>2</sup>

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

#### ADIPOGÉNICA \*<sup>2</sup>

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



La GH aumenta la lipólisis (Cuadro 3), por lo que posee un efecto específico causante de la producción de ácidos grasos libres (FFA) a partir del tejido adiposo y, por tanto, del aumento de concentración de ácidos grasos en los líquidos corporales incluyendo plasma. Además en los tejidos de todo el organismo favorece la conversión de ácidos grasos en acetil-coenzima A, con la subsiguiente utilización de éste para energía. Por tanto, bajo la influencia de la GH, las grasas se utilizan como energía, con preferencia sobre los carbohidratos y las proteínas (efecto ahorrador en estos metabolitos). De ahí también, que inhiba la formación de grasas. La movilización excesiva de grasa procedente del tejido adiposo puede llevar a un estado de cetosis y a menudo, también de hígado graso (Guyton, 1996).

La GH posee también un efecto diabetógeno (Cuadro 3), derivado de cuatro mecanismos principales sobre el metabolismo de carbohidratos: a) menor utilización de la glucosa como fuente de energía, b) aumento del depósito de glucógeno en las células, c) disminución de la captación de glucosa por las células y d) aumento de la secreción de insulina con la disminución de la sensibilidad a la misma. Inmediatamente después de la primera administración de GH a un animal, la captación celular de glucosa aumenta y la glucemia desciende ligeramente, pero este efecto sólo dura algunos minutos –a una hora- y va seguido del efecto contrario: disminución del transporte de glucosa al interior de la célula. Ello probablemente sea consecuencia de que las células ya han captado un exceso de glucosa, para cuya utilización tienen dificultades. La glucemia a menudo aumenta y sobrepasa los niveles normales, situación que se conoce como *diabetes hipofisaria*, que al tratarse con insulina resulta en una situación resistente a la insulina. Además, el aumento de la glucemia estimula a las células beta de los islotes de Langerhans para que secreten más insulina, y la GH misma tiene un efecto estimulador directo sobre estas células, que pueden llegar a sobreestimularse y dejar de funcionar. De aquí su efecto diabetógeno (Guyton, 1996).

Se ha propuesto que la insulina y la GH podrían ser los dos principales factores responsables de la homeostasis metabólica en los ciclos diarios de ayuno y alimentación. La hiperglucemia durante la fase de absorción que sigue a una comida eleva la secreción de insulina y suprime la de GH. Se produce así una disminución de FFA plasmáticos, con síntesis activa de grasas.

Viene luego una etapa intermedia durante la cual, al cesar la absorción de glucosa, la GH plasmática empieza a aumentar, existiendo sin embargo todavía bastante insulina. Finalmente, en el ayuno ulterior, la secreción de hormona de crecimiento aumenta, disminuyendo la glucosa y la insulina disponibles. Como la insulina y la GH aceleran la entrada de aminoácidos a las células, actúan de manera sinérgica durante la etapa intermedia, aumentando la síntesis de proteína. De hecho, la GH no produce crecimiento en el animal carente de páncreas; tampoco lo hace si se excluyen de la dieta los carbohidratos. Cabe recordar que la insulina favorece también el transporte de ciertos aminoácidos, diferentes de los que promueve la GH. En breve, el aumento de GH significa lipólisis, y permite ahorrar glucosa, siendo así menos necesaria la gluconeogénesis a partir de proteínas (*Friesen y Astwood, 1965; Devesa et al, 1992*).

## ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE GH

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína que contiene 191 aminoácidos en la mayoría de los vertebrados estudiados, y con un peso molecular (PM) de 22,000 daltones aproximadamente. Contiene cuatro residuos de cisteína, conservados para las GHs de todas las especies, con los que se forman dos puentes disulfuro (posiciones 53-164 y 181-189) dando origen a un asa grande y una más pequeña (*Scanes and Campbell, 1995*).

Se conoce la estructura secundaria y terciaria de la GH y de su receptor, gracias a los estudios de cristalografía de rayos X de alta resolución realizados con la GH porcina (*Abdel-Meguid et al, 1987*) y de los cristales de la GH humana unida al dominio extracelular del receptor de hormona de crecimiento (*De Vos et al, 1992*). Se sabe que es una proteína formada por cuatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas que se extienden en los segmentos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183, en donde cada hélice presenta diferente carácter anfifílico, con la hélice 4 mayoritariamente hidrofóbica; además, la estructura primaria de las GHs de vertebrados conocidas, presenta considerable homología dentro de estas regiones  $\alpha$ -hélice. Se tienen también dos pequeñas formaciones tipo  $\alpha$ -hélice en las regiones 53-58 (~1.5 giro) y 89-96 (~2 giros), con lo que la conformación de la GH es aproximadamente 50%  $\alpha$ -hélice en total (Figura 4).

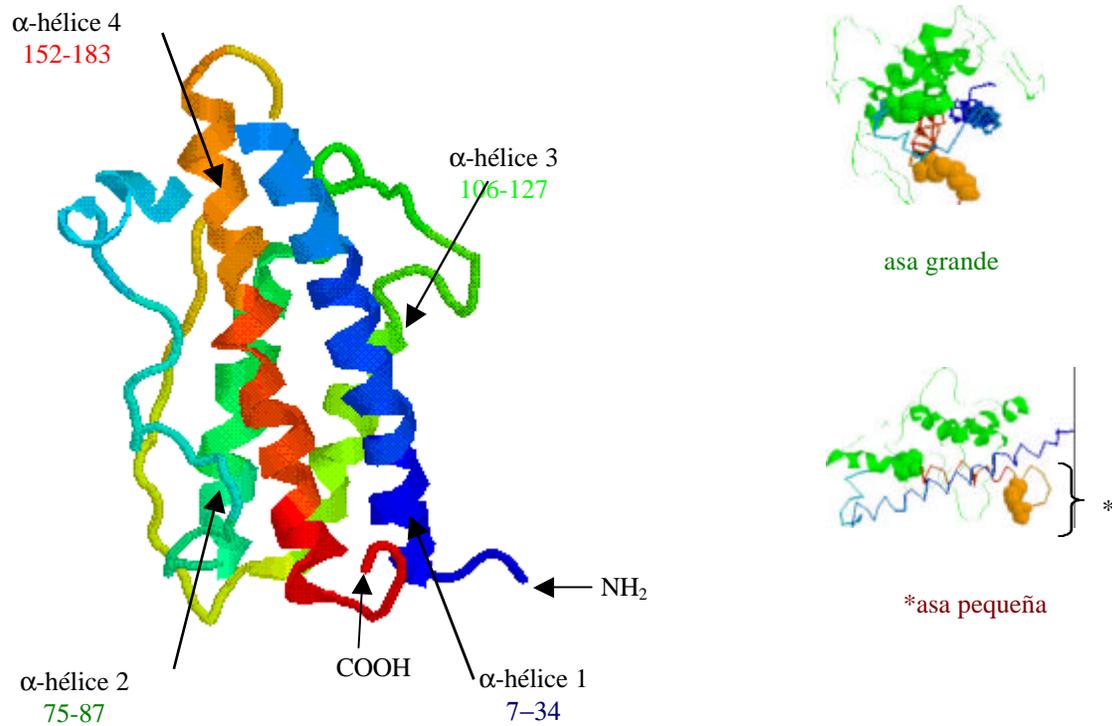


FIGURA 4. ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE GH. La secuencia de la molécula se representa en forma de hilos y listones variando su color desde el azul hasta el rojo;  $\text{NH}_2$  corresponde al extremo amino;  $\text{COOH}$ , extremo carboxilo. La hélice 1, representada en forma de listón enrollado, se encuentra coloreada en azul; la hélice 2, tiene color verde-azul; la hélice 3, tiene color verde-amarillo; y, la hélice 4, tiene color naranja-rojo. Los residuos de cisteína en las imágenes a la derecha se representan en estructura de esferas.

Los dominios que interactúan con el receptor de esta hormona (GHR) se han identificado mediante mutagénesis dirigida (Cunningham *et al*, 1990) y el grado de afinidad de cada mutante se ha evaluado por ensayos de radioreceptor por unión de la hormona (marcada radioactivamente) a su receptor. Mediante estos estudios y otros en donde se analizan los efectos de anticuerpos monoclonales sobre epítopes específicos en la molécula de GH se identificaron algunos requerimientos estructurales para la unión al receptor. Hay de hecho dos sitios distintos en los que se puede unir el receptor de GH (GHR) a la molécula de la hormona (Figura 5). El sitio 1 incluye la hélice 4 desde su región central a carboxiterminal, y los residuos del asa (54-74), que forman enlaces de hidrógeno y puentes salinos entre K<sup>41</sup>, (L<sup>45</sup>), Q<sup>46</sup>, P<sup>61</sup>, (R<sup>64</sup>), R<sup>167</sup>, K<sup>168</sup>, D<sup>171</sup>, (K<sup>172</sup>), T<sup>175</sup>, (F<sup>176</sup>), R<sup>178</sup> y el GHR. El segundo sitio incluye la hélice 3 y la hélice 1, con puentes no covalentes entre los residuos N<sup>12</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>19</sup> y el GHR (Scanes & Campbell, 1995; Juárez *et al*, 1999).

De esta manera, la GH y su receptor forman un heterotrímero (“sandwich”), con uniones (puentes de hidrógeno y salinos específicos) entre la hormona y las dos moléculas de receptor, y entre ambos receptores a su vez (De Vos *et al*, 1992). La hélice tres por su parte participa además como pivote en la acción de la GH (Scanes and Campbell, 1995). Se piensa que una molécula de GHR se une primero al sitio 1 de la GH y subsecuentemente otra molécula de GHR ocupa el sitio 2 (Fuh *et al*, 1992). La evidencia que aportan los estudios cristalográficos y de unión a receptor sobre la interacción de la GH con sus receptores no refleja necesariamente la actividad biológica de la molécula. Estudios de actividad adipogénica de moléculas quiméricas de hGH/hPL sugieren que efectivamente existen dos sitios de unión en la molécula, en donde el segundo sitio se compone de dos subdominios estructurales. Para mantener una actividad adipogénica es necesario contar con el sitio 1 y alguno de los dos subdominios del sitio 2. Además, la molécula puede ser biológicamente activa a pesar de mostrar reducida la dimerización de receptores en experimentos *in vitro* (Juárez *et al*, 1999).

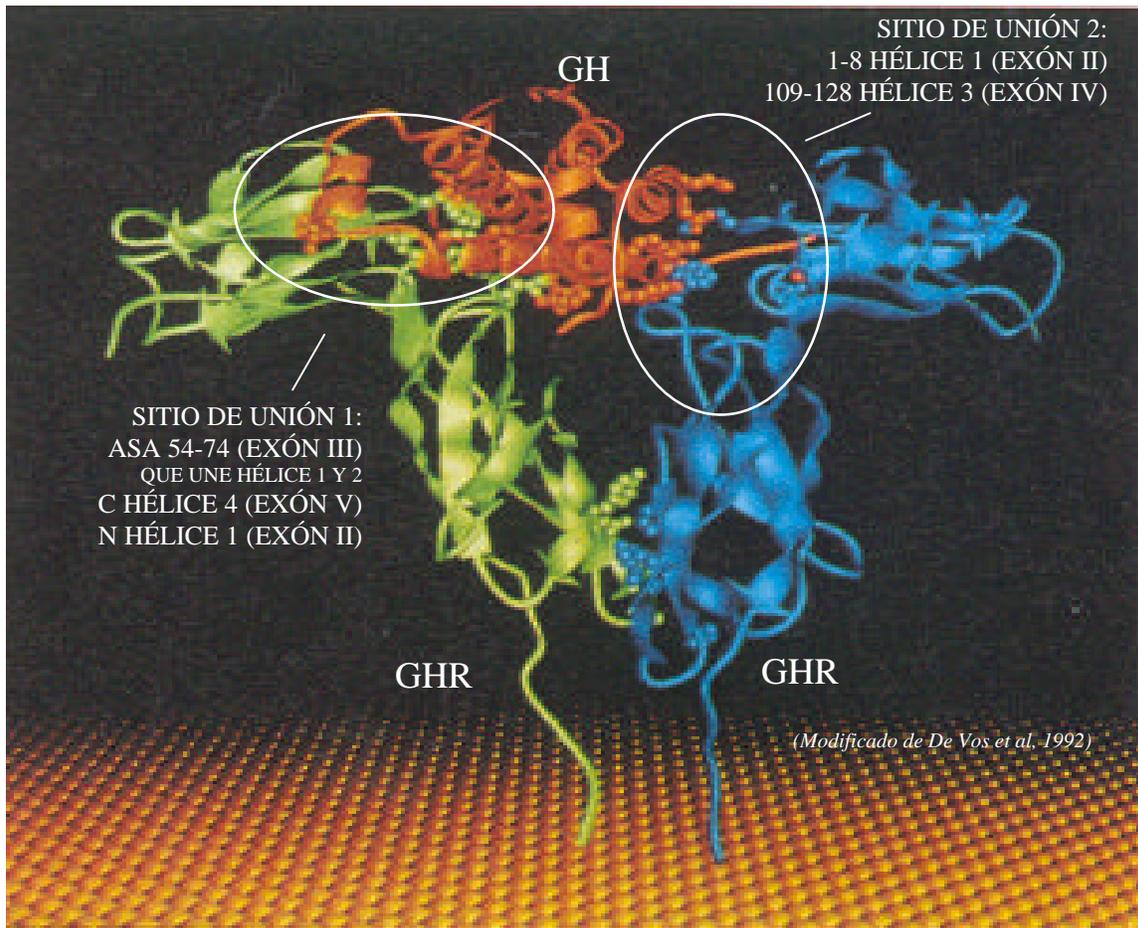


FIGURA 5. HETEROTRÍMERO DE GH Y SU RECEPTOR (DOS MOLÉCULAS DE GHR). La GH se encuentra representada en color naranja y las moléculas de receptor (la porción extracelular) en verde y en azul.

## HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA GH

En todas las especies estudiadas, la hormona de crecimiento presenta más de una forma molecular. Aunque en un principio se consideró que estas formas moleculares eran consecuencia de artificios experimentales, en la actualidad se acepta ampliamente que estas moléculas forman una familia de proteínas heterogénea tanto funcional como estructuralmente. El origen de estas variantes proviene de diferentes fuentes, ya sea por la existencia de más de un gen para la GH, como por el procesamiento alternativo de su ARN mensajero (ARNm) o las modificaciones postraduccionales que pueda sufrir la proteína, tales como fosforilación, glicosilación, proteólisis, desamidación, acilación y agregación, entre otras. Incluso se pueden considerar las formas generadas después de la secreción, como la formación de complejos con proteínas unidoras en el plasma (GH-BP por sus siglas en inglés *Growth Hormone Binding Protein*), o la metabolización en diferentes tejidos. Estas variantes -isohormonas para el caso de las que son producto de genes diferentes- se han identificado tanto en extractos hipofisarios como en plasma y preparaciones puras de la hormona (Lewis, 1984; Arámburo et al, 1989a; Baumann, 1991a; Scanes and Campbell, 1995; Baumann, 1999; Lewis, 2000).

Se han descrito isohormonas derivadas de duplicación génica para la GH humana (*hGH-N/hGH-V*) (Chawla, et al 1983; Paladini, et al 1983; Seeburg, 1985; Raiti and Tolman, 1986; Frankenne, et al 1987; Cooke, et al 1988), para la GH de trucha (*rtGH-I/rtGH-II*) (Agellon, et al 1988) y rana (*xGH-I/xGH-II*) (Martens, 1989). Por ejemplo, la estructura de las GHs humanas derivadas de los dos genes difieren en 13 residuos de aminoácidos y su síntesis tiene diferentes sitios de origen: el gen *hGH-N* se expresa principalmente en la hipófisis mientras que el gen *hGH-V* se expresa en la placenta; la proteína del gen *hGH-V* es la forma predominante de GH en la circulación de mujeres durante el tercer trimestre del embarazo (Frankenne et al, 1987; Frankenne et al, 1988). En salmónidos hay evidencias de variación génica que puede representar diferencia en genes o microheterogeneidad en diferentes poblaciones de estos peces, además de un gen ligado al cromosoma Y (Agellon, et al 1988; Forbes et al, 1994). Se tiene evidencia de microheterogeneidad en bovinos: en la bGH, el aminoácido 127 puede ser valina o leucina; hipófisis individuales

pueden producir 100% de bGH V<sup>127</sup>, 100% L<sup>127</sup> o 50% de cada una. De esta manera parece haber polimorfismo alélico de GH en ganado (Seavey et al, 1971).

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

La GH, al igual que muchas otras proteínas, se sintetiza en los somatotropos como un precursor de 225 aminoácidos (216 en la GH de pollo) que contiene un péptido señal; este péptido se remueve proteolíticamente y durante esta transformación es posible que se presente heterogeneidad N-terminal, como se ha observado en algunas especies. Por ejemplo, el extremo N-terminal de la GH bovina u ovina tiene ya sea fenilalanina o una alanina extra. Esto es resultado del procesamiento diferencial del precursor pro-GH (Li et al, 1953).

Después de la síntesis, la GH puede sufrir modificaciones postraduccionales que den origen a diferentes variantes estructurales de la molécula. Se han descrito variantes para la GH derivadas de agregación de la forma principal de la GH, para formar dímeros y otros oligómeros, trímeros, tetrámeros y hasta pentámeros (Chawla et al, 1983; Stolar and Baumann, 1986). Estas formas parecen representar aproximadamente 40% de la GH inmunorreactiva que se secreta al plasma en humanos, estimado con la premisa de que las formas oligoméricas tienen la misma inmunorreactividad inherente. La forma dimérica parece tener dos

monómeros de 22 KDa ligados ya sea no covalentemente o por puentes disulfuro (Baumann, 1991). Sin embargo, al menos algo de la GH dimérica (de pollo) permanece, incluso después del tratamiento con dodecilsulfato de sodio (SDS) y con 2-mercaptoetanol (que romperían enlaces no covalentes y puentes disulfuro) (Arámburo et al, 1989b). No se conoce la naturaleza de estos dímeros ligados covalentemente.

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

Además se han observado distintas formas de GH cortada y fragmentos de la misma, generados por proteólisis limitada. En la hGH parece ocurrir un corte enzimático específicamente en la región de aminoácidos entre los residuos 133 a 146 y los residuos 43 y 44. El corte entre los residuos 133 y 146 (sitios susceptibles a corte por enzimas tipo tripsina: R<sup>134</sup>, K<sup>140</sup> y K<sup>145</sup> en hGH) abriría el asa grande de la molécula dando origen a un tamaño molecular aparentemente mayor (24 kDa); después de la reducción de los puentes disulfuro se originarían dos fragmentos, de 14 y 8 kDa, respectivamente. Se ha reportado tal corte proteolítico en tejido hipofisiario con enzimas exógenas y con plasmalema de tejidos blanco de la GH. Hay considerable controversia sobre si el corte proteolítico del asa grande ocurre *in situ* o representa un artificio experimental. Por su parte las hipófisis humanas contienen un fragmento de GH, hGH<sub>1-43</sub>, bien caracterizado aunque su contraparte no se ha identificado aún (Singh et al, 1983).

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

El grupo amino terminal de una pequeña proporción de hGH se encuentra acetilado. Ésto no parece tener influencia sobre su actividad biológica pero la acetilación sí afecta el punto

isoeléctrico y, por ende, el patrón electroforético. A la forma acetilada se le conoce como GH “rápida” (Baumann, 1991a).

Se han identificado formas glicosiladas de la GH (G-GH) en el humano (Sinha and Lewis, 1986), cerdo (Sinha et al, 1990a), ratón (Sinha and Jacobsen, 1987a,b), rata (Bollengier et al, 1989), pollo (Berghman et al, 1987; Arámburo et al, 1991) y búfalo (Maithal et al, 2001). Hasta ahora no hay evidencia clara de que la G-GH tenga acciones diferentes a las de la no glicosilada, sin embargo, en el cerdo se han visto diferencias en la proporción que tiene en plasma y en hipófisis durante el embarazo y desarrollo fetal (Sinha et al, 1990a; Sinha et al, 1990b). Se han estudiado algunas actividades de G-GH; en particular la GH humana variante (hGH-V) que se encuentra N-glicosilada, se une a receptores de prolactina y GH (Ray et al, 1989; Baumann, 1991b), es mitogénica (Nickel et al, 1990) y estimula el aumento de peso en ratas hipofisectomizadas (Macleod et al, 1991). La G-GH de pollo (G-cGH) pura tiene efecto en la monodesyodación de hormonas tiroideas en el embrión de pollo (Berghman et al, 1989). Además la tasa de desaparición de G-cGH, después de su inyección intravenosa en gallinas anestesiadas, fue 20% menor comparada con la forma no glicosilada. Su administración tiene un efecto similar al de la hormona no glicosilada en la producción *in vivo* de IGF-I, por lo que se sugiere que su importancia fisiológica reside más en ejercer diferentes acciones, que en modificar –aumentar- las de la variante no glicosilada (Berghman et al, 1994).

## VARIANTES MOLECULARES DE LA GH DE POLLO

En la comparación de somatotropinas de tetrápodos que realizaron en 1971, Nicoll y Licht dieron cuenta de la existencia de una hormona de crecimiento en el pollo. Farmer, Papkoff y Hayashida (1974) encontraron heterogeneidad de la GH de pollo (cGH) en sistemas electroforéticos a diferentes pH (4.5 y 8.3), lo cual explicaron por una posible desamidación de la GH. Harvey y Scanes (1977) purificaron cGH después de una extracción de glicoproteínas, mediante homogeneización del residuo remanente, alcalinización, precipitación salina y cromatografía de intercambio iónico, con un rendimiento de 0.4 mg/g de tejido hipofisiario (peso húmedo), un Rf de 0.31, peso molecular de 23,300 Da y por

isoelectroenfoque resolvieron tres componentes cuyos puntos isoeléctricos fueron: 7.5, 6.5, 5.8; atribuyeron la heterogeneidad encontrada a la desamidación parcial de la hormona, a la unión no específica a los anfolitos o a la presencia de monómeros con diferentes residuos amino-terminales. La molécula de cGH tiene un peso molecular teórico de 22,126 kDa, calculado con fórmulas de Lehninger con base en la secuencia reportada; tiene un punto isoeléctrico de 7.83, para el caso de que no tenga ninguna modificación postraducciona (<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>, 2000; calculation number 36632). El peso molecular de la hormona de crecimiento recombinante analizado por espectrometría de masas fue de 22140.1 kDa.

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

Los análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes utilizando dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) seguido por *western blot* e inmunotinción, muestran las diferentes variantes de masa, evidenciando que para la cGH, bajo condiciones no reductoras el monómero de 22 kDa es la forma más abundante en la hipófisis. Se ha demostrado que, tanto en la hipófisis como en el plasma (Arámburo, 1990a), están presentes formas de mayor peso molecular que corresponden probablemente a oligómeros unidos mediante enlaces disulfuro que dan lugar a dímeros (44 kDa), trímeros (66 kDa), tetrámeros (88 kDa), dado que cuando se analizaron bajo condiciones reductoras -en presencia de 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol-, la mayor parte de las bandas de alto peso molecular desapareció, incrementándose la concentración de la forma monomérica de la hormona, aunque también prevaleció una cantidad significativa de la forma dimérica, aparentemente resistente a la reducción (Arámburo et al, 1990a; Arámburo et al, 2000). También se han mostrado evidencias sobre la existencia de un monómero procesado proteolíticamente, cuyos fragmentos aparecen bajo condiciones reductoras, particularmente, con inmunorreactividad muy intensa, un fragmento de aproximadamente 15 kDa (Arámburo et al, 1990a; Arámburo et al, 2001). Se modeló el posible origen de esta proteólisis utilizando cGH monomérica digerida con trombina o colagenasa. La hormona cortada sometida a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras presentó un peso molecular de 25 kDa, desapareciendo con la adición de 2-mercaptoetanol, y observándose fragmentos de 15 y 7 kDa. El corte se produjo en la posición R<sup>133</sup>-G<sup>134</sup>, como se demostró con la secuencia de aminoácidos de los fragmentos, una vez separados. El fragmento de 15 kDa presentó bioactividad en un ensayo angiogénico y fue capaz de inhibir la actividad de la desyodasa tipo III en hígado de pollo (Arámburo et al, 2001).

También se han descrito otras modificaciones postraduccionales de la hormona de crecimiento de pollo como la presencia de una variante glicosilada de la cGH (Berghman et al, 1987; Arámburo et al, 1991). y la existencia de una cGH fosforilada (Arámburo et al, 1989a; Arámburo et al, 1992). Trabajos realizados por nuestro grupo en cultivos primarios de células hipofisarias de pollo mostraron que éstas son capaces de incorporar <sup>32</sup>P-fosfato en cGH inmunorreactiva, aparentemente en la forma de un dímero de cGH (Arámburo et al, 1990b). La fosforilación de la GH

de varias especies es un proceso específico, saturable e inhibible y lo mismo ocurre con la PRL de aves y otros mamíferos (Arámburo *et al*, 1992).

Por otra parte, se ha demostrado que la proporción relativa de las variantes moleculares de la cGH cambia con el desarrollo ontogénico, existiendo una proporción importante del fragmento de 15 kDa principalmente en la etapa embrionaria mientras que las formas de alto peso molecular se encuentran en mayor proporción en los estadios de mayor edad. Después de separar algunas de las variantes de masa, se analizaron con ensayos de radiorreceptor, encontrando la mayor actividad para el monómero de 22 kDa (Arámburo *et al*, 2000).

La heterogeneidad molecular de la cGH se ha encontrado en la glándula, en el plasma y en cultivos de células hipofisiarias (Arámburo *et al*, 1990a; Montiel *et al*, 1992; Martínez-Coria *et al*, 2002). Este hallazgo indica que las variantes estructurales de la hormona son secretadas a la circulación, y al parecer su liberación por la hipófisis no se ve afectada de la misma manera por los secretagogos de GH conocidos en el pollo. Resultados preliminares han permitido demostrar que, al menos en lo que respecta a las variantes de masa de la cGH, se observan diferencias en el patrón de secreción de las variantes en respuesta a la estimulación con TRH o a la inhibición mediada por anestesia con pentobarbital y/o uretano, y que estos cambios se reflejan tanto en la hipófisis como en la circulación (Pascacio M *et al*, 1996; Arámburo *et al*, 2004 en preparación).

Asimismo, se ha demostrado que las variantes se secretan de manera diferencial tras la estimulación de cultivos de somatotropos y tejido hipofisiario con el secretagogo hipotalámico GHRH (hormona liberadora de la GH), con 8-bromoAMPc y con miristatoacetato de forbol. Se estimuló la secreción de cGH en general, pero la proporción de cada variante sobre el total de bandas inmunorreactivas fue diferente; por ejemplo, la variante de 26 kDa –presumiblemente la G-cGH, en condiciones no reductoras- tuvo un incremento de 43% mientras que el monómero de 22 kDa y el dímero (44 kDa) disminuyeron 22.26 y 29%, respectivamente. (Martínez-Coria *et al*, 2002).

La investigación sobre las actividades biológicas de las variantes de la GH del pollo ha revelado evidencias interesantes de que las variantes no poseen bioactividades idénticas, por

lo que se ha postulado que la heterogeneidad molecular de esta hormona contribuye a su diversidad funcional. Como se mencionó, en estudios realizados con dos de las variantes de carga del monómero se ha demostrado que ambas tienen actividad somatotrópica (promotora del crecimiento) en ratones enanos (*Scanes et al, 1990*), pero que esas variantes de cGH difieren en sus efectos sobre el tejido adiposo del pollo, una siendo preferentemente lipolítica, mientras que la otra muestra efectos antilipolíticos (*Arámburo et al., 1989b; Arámburo et al, 1990a*). Los estudios realizados empleando tejido adiposo de pollo *in vitro* han dado una sólida evidencia de que los efectos lipolítico y antilipolítico (semejante a insulina) de la GH tienen diferentes requerimientos estructurales. Una comparación de las potencias lipolítica y del efecto insulinoide de una serie de preparaciones de GH (provenientes de diferentes especies) muestra que la respuesta lipolítica tiene un requerimiento estructural más estricto que el efecto antilipolítico (semejante a insulina). Así, las preparaciones de GH de los vertebrados inferiores (reptiles, anfibios y peces) tienen muy baja, si alguna, actividad lipolítica. Por el contrario, todas esas hormonas tienen una potencia elevada de actividad insulinoide (antilipolítica) (*Scanes et al, 1993*). Por otra parte, se ha descrito actividad angiogénica para la GH, al demostrar que esta hormona estimula la proliferación de capilares en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, al parecer sin mediar el efecto de IGF-I (*Gould et al, 1995*). Asimismo, se ha descrito que el fragmento de 15 kDa es capaz de inhibir la actividad de la desyodasa 5D de hormonas tiroideas en cultivos de hepatocitos embrionarios de pollo (*Arámburo et al, 2001*).

Hasta el momento, la caracterización de la heterogeneidad molecular y funcional de la cGH se ha realizado fundamentalmente en la hipófisis, tanto *in vivo* como *in vitro*, y se ha sugerido que las variantes pueden comportarse como entidades hormonales discretas, es decir con un probable papel endocrino individual. Sin embargo, se ha reportado en la literatura la existencia de hormona de crecimiento (por RIA), o del ARNm de GH, en tejidos extrahipofisarios, en particular en el cerebro (*Render et al, 1995*) y en algunos tejidos del sistema inmune (*Hull and Harvey, 1997*). También se ha descrito que en el embrión de pollo existe una extensa distribución de inmunorreactividad semejante a GH en la mayor parte de los tejidos embrionarios, presente incluso de manera más temprana que lo que se ha reportado para la activación de la GH en hipófisis (*Harvey and Hull, 1997*). Asimismo, se encontró que el gen de GH

se expresaba en múltiples tejidos en el embrión al igual que el gen para el receptor de GH (GHR) (Harvey and Hull, 1997; Hull et al, 1997). En algunos mamíferos, se ha descrito la presencia de GH en distintos linajes de linfocitos (Weigent et al, 1991). En nuestro laboratorio, se ha mostrado que tanto en el embrión de pollo como en pollos de 4 y de 9 semanas de edad es posible medir por ELISA a una sustancia semejante a GH en cerebro; en tejidos del sistema inmune tales como la bursa, el bazo y el timo, así como en leucocitos; y en tejidos del sistema reproductor, tanto en machos (testículo y epidídimo) como en hembras (oviducto y folículos). Asimismo, por *western blot* se ha encontrado a una proteína inmunorreactiva de 17 kDa que pudiera ser un fragmento de la cGH en esos tejidos (Hull et al, 1999; Luna et al, 1999; Luna et al, 2004). Es probable que en estos tejidos la hormona de crecimiento (ya sea la forma de 22 kDa o alguna de sus variantes moleculares) pueda estar desempeñando un papel paracrino y/o autocrino, funcionando como un factor de acción local (Luna et al, 2004).

## SÍNTESIS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

### TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La hormona de crecimiento, junto con la prolactina, el lactógeno placentario, la somatolactina y la proliferina, representan una familia de proteínas, con base en similitudes estructurales aunque con funciones diversas (Lewis et al 1980; Seeburg, 1985). Considerando las zonas de homología interna en la GH y el lactógeno placentario (somatomotropina coriónica), e incluso de la PRL, se ha propuesto que estas hormonas provienen de un péptido primitivo pequeño, posiblemente de 25-50 aminoácidos, que tuvo duplicaciones sucesivas hasta llegar a una estructura polipeptídica intermedia entre GH y PRL. Por una nueva duplicación se generó la diversificación hormonal (Niall et al, 1971). No se sabe cómo los genes ancestrales para GH y PRL se separaron en dos cromosomas. El gen para la GH se encuentra localizado en el cromosoma 17 en humanos, 10 en la rata, 11 en el ratón y 1 en el pollo, mientras que el de la PRL en el 6 en humanos, 17 en la rata, 13 en el ratón y 2 en el pollo. Los genes que codifican para proteínas relacionadas, con cierto grado de homología en secuencia de aminoácidos parecen estar confinados al mismo cromosoma. Por ejemplo, en humanos, los genes que codifican para GH y somatomotropina coriónica humana (hCS) se encuentran

en un grupo de cinco genes en el brazo largo del cromosoma 17 (hGH-N, hCS-L, hCS-A, hGH-V y hCS-B), de los cuales sólo el gen hGH-N se expresa por los somatotropos – hipófisis (*Harvey, 1995; Miao YW et al., 1999*).

El gen hGH-N, que está contenido dentro de un fragmento de DNA de 2.6 kbp, se compone de cinco exones y cuatro intrones y las regiones no traducidas 3' y 5' (incluyendo una región promotora de 500 bp). El exón I codifica para 3 a 9 aminoácidos del péptido señal, mientras que el exón II codifica para el resto del péptido señal y los primeros 28 a 35 aminoácidos de la hormona madura; los exones III, IV y V codifican para 36-40, 52-60 y 63-69 aminoácidos, respectivamente.

Este gen es similar en estructura a otros genes de GH en mamíferos, pero es más pequeño que el de pollo (3.5 kbp) que contiene secuencias de intrones expandidas. Por su parte los genes de salmónidos tienen un exón más, en total 6 exones. En salmónidos, el exón V provee información para 49 aminoácidos y el exón VI para 20 residuos.

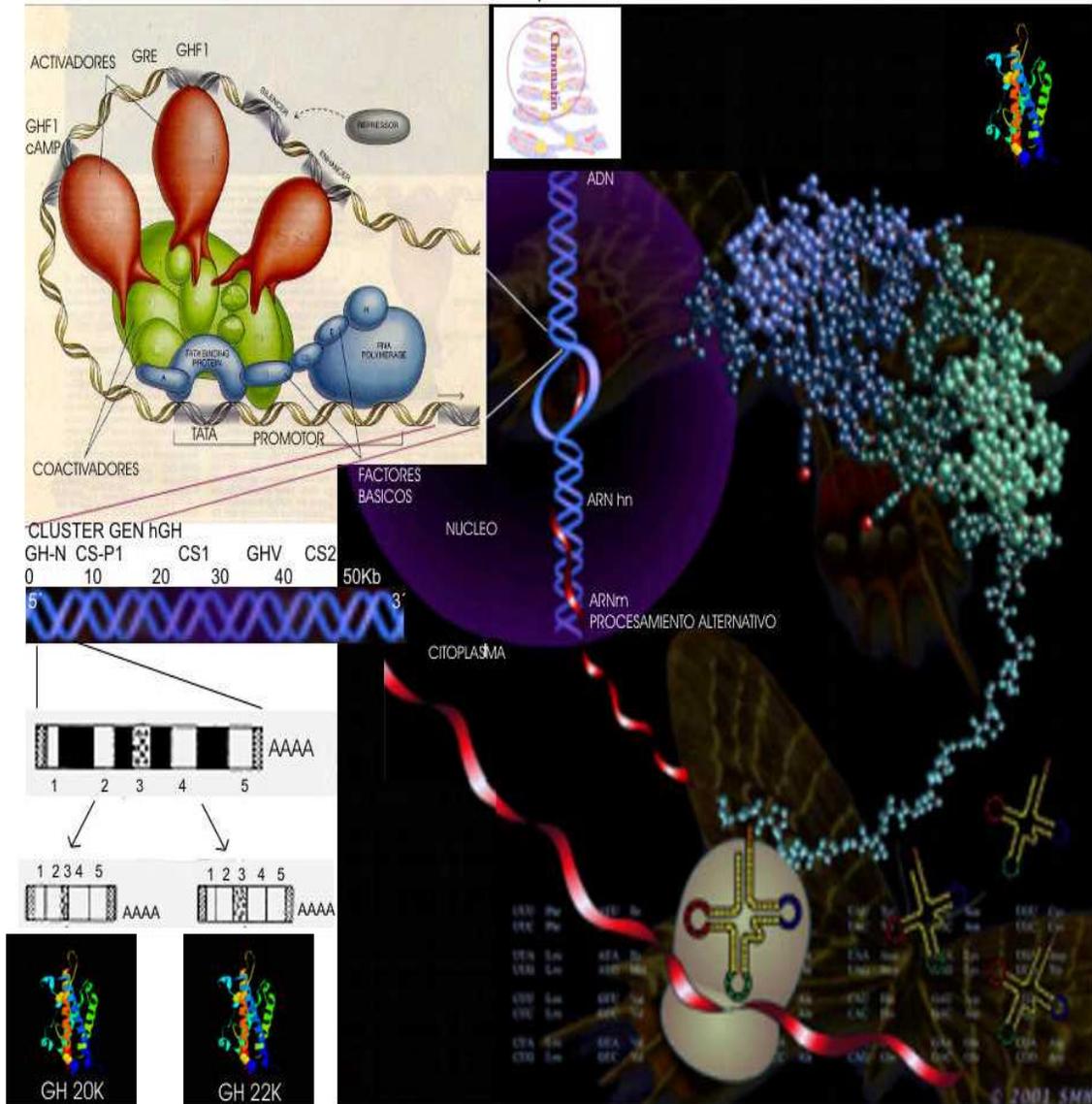
El gen hGH-V codifica para una proteína con homología estructural a la GH hipofisiaria pero se expresa sólo en la placenta. Los genes hCS expresan lactógenos placentarios, que tienen alta homología (85%) con la hGH. Los lactógenos placentarios en mamíferos subprimates se asemejan más a la prolactina,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

La transcripción del gen de GH se realiza por la ARN polimerasa II, que inicia la síntesis en el codón de origen en el extremo 5' después de haberse situado en la región promotora -caja

TATA, localizada en la posición -100 (Figura 6). Las secuencias de poliadenilación (AATAAA) en el extremo 3' terminan la transcripción del gen. La transcripción de los genes de GH se regula por secuencias potenciadoras y silenciadoras tipo *cis*, que interactúan con reguladores transcripcionales tipo *trans*. Las regiones promotoras de los genes de GH de la rata y el humano llegan hasta 500 bp 5' al inicio de la transcripción del gen y muestran secuencias semejantes, aunque la regulación transcripcional está principalmente regida por secuencias hacia -320 en donde se une un péptido activador de la transcripción de la GH (AP-2). La región proximal del promotor además de contener a la caja TATA, presenta diferentes sitios de unión para factores de transcripción órgano-específicos. La región promotora del gen de GH del pollo no tiene toda la homología con la de los mamíferos, pero contiene una secuencia corta (24bp) que es altamente homóloga en los sitios de unión proximal, en el caso del gen de GH de rata para el factor de transcripción de la hormona de crecimiento (GHF-1) y el factor de transcripción específico de la hipófisis (Pit-1) (Menon *et al*, 1995). La velocidad de transcripción de los genes de GH está regulada por los factores de transcripción (proteínas reguladoras) que actúan localmente a través de la interacción con las secuencias o elementos potenciadores y silenciadores del DNA (Harvey, 1995).

El producto primario de la transcripción del gen de GH de mamífero es un ARN de aproximadamente 1300 nucleótidos de longitud, en donde el extremo 3' está poliadenilado y el extremo 5' está protegido por la adición de 7-metilguanosina trifosfato. Los intrones son removidos minutos después, iniciando con el intron 1, y los exones son empalmados para producir el ARN mensajero maduro (ARNm), el cual tiene una vida media de 40 a 60 minutos. Los precursores de ARN permanecen en el núcleo, en donde ocurre el empalme. La liberación del ARNm maduro dentro del citoplasma es un proceso de dos pasos que involucra la liberación a partir de la matriz nuclear por un mecanismo dependiente de ATP y translocación a través del complejo poro nuclear, por un mecanismo que requiere hidrólisis de ATP (Harvey, 1995).

17q 22-24



Modificado de Harvey, 1995 con información gráfica de:

<http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem227/nucleicfunction/transcription/lac%20operon/06eukarvotes.jpg>

<http://nobelprize.org/chemistry/educational/dna/a/transcription/pics/transcription.gif>

<http://home.earthlink.net/~shalpine/gallery/CGA/trans8.jpg>

FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL GEN DE hGH Y LA BIOSÍNTESIS DE GH.

## TRADUCCIÓN, ALMACENAMIENTO Y SECRECIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La traducción se inicia en el citoplasma mediante la interacción del complejo ribosomal 40S con el extremo 5' del ARNm de la GH en el codón de inicio AUG seguido por la unión de la subunidad 60S. La asociación con ribosomas libres estimula la síntesis de GH con el acoplamiento de aminoácidos de acuerdo a la secuencia de nucleótidos del ARNm de GH. Se sintetiza primero una prehormona de aproximadamente 225 aminoácidos (216 en el pollo) que después se procesa para dar origen a la proteína de secreción, al escindir aminoácidos del extremo amino terminal correspondientes al péptido señal, secuencia que dirige al complejo ribosoma-ARNm para adherirse al retículo endoplásmico (RE) y facilita la translocación de la proteína en el espacio intracisternal del RE para su procesamiento y almacenamiento. Es por ello que las cisternas se vuelven más prominentes en somatotropos activos en síntesis y el número de polisomas libres y unidos a membrana se incrementa. Los 20 a 30 aminoácidos del péptido señal se escinden por procesamiento proteolítico en el RE, en donde también la proteína puede sufrir modificaciones postraduccionales, incluyendo la formación de puentes disulfuro. El procesamiento de la hormona puede continuar en su paso por el complejo de Golgi, al cual se transloca por un proceso dependiente de energía. La estimulación de la función del Golgi se acompaña por su agrandamiento y ocupación de una gran área del somatotropo y la producción de numerosos cuerpos multivesiculares que se agregan en la región del Golgi. Además del procesamiento, también se lleva a cabo la selección y empaquetamiento de moléculas de GH en las vesículas de secreción; el transporte de GH a estas vesículas se puede facilitar por proteínas de unión localizadas en el complejo. Se puede procesar aún más la hormona dentro de los compartimentos de almacén de los somatotropos. Aunque gránulos recientemente sintetizados u hormona citoplásmica puede liberarse sin almacenamiento previo, la mayoría de la GH sintetizada se guarda en los gránulos de secreción de la célula. Estas vesículas se almacenan en el citoplasma o yuxtapuestas a la membrana celular previo a la liberación o destrucción crinofágica. La cantidad de GH almacenada dentro de los somatotropos parece participar en la regulación de la expresión del gen de GH, que está inversamente relacionado al grado de granulación

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

## REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La secreción de hormona de crecimiento se regula por la interacción de dos hormonas principalmente: la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH *Growth Hormone Releasing Hormone*) y la somatostatina (SS; SRIF *Somatotropin Release Inhibiting Factor*). La hormona de crecimiento se secreta con un patrón ultradiano de liberación espontánea, con episodios de brusca liberación que, en humanos, aparecen entre 4 y 8 veces en cada período de 24 horas. Existe, por tanto, un ritmo secretor endógeno cuya máxima amplitud se alcanza en la primera fase del sueño de ondas lentas. Hay evidencia que ampara la hipótesis de que a su vez estos dos factores hipofisiotrópicos se liberan de manera episódica en la circulación portal, influenciando directamente a los somatotropos hipofisarios. Sin embargo, las mediciones portales en ovinos y porcinos no anestesiados dan cuenta de que la secreción episódica de GHRH y SS no explica todos los episodios de secreción de GH (Devesa et al, 1992; McMahon et al, 2001).

Otras señales centrales y periféricas modulan esta secreción alterando la actividad de las neuronas que contienen GHRH o SS, o influenciando sus acciones en la hipófisis (Figura 7). Estos elementos secundarios incluyen hormonas secretadas por órganos endocrinos blanco

de la hipófisis, aminas biogénicas y diversos péptidos hipotalámicos. De esta manera las influencias hipotalámicas están fuertemente reguladas por un sistema integrado de factores neurales, metabólicos y hormonales. La propia GH juega un importante papel regulador de su propia secreción. El mecanismo sería del tipo de retroalimentación negativa de asa corta, mediante una combinación de incremento de síntesis y liberación de SS y disminución de liberación de GHRH. La retroalimentación a nivel periférico está mediada por diferentes hormonas y metabolitos activados por estímulo de la GH, por ejemplo IGF-I e IGF-II. Estas somatomedinas, sintetizadas principalmente en el hígado por estímulo directo de GH, participan en la regulación negativa de asa larga durante la secreción de GH. En cambio, las hormonas tiroideas incrementan la transcripción y con ello los niveles de ARNm de GH (*Force and Spindler, 1994*) a través de los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TREs) distribuidos a lo largo del gen de GH, aunque su efecto es diferencial de acuerdo a su ubicación, siendo estimulantes de la transcripción si se localizan hacia el extremo 3', mientras que son represores hacia el extremo 5' (*Devesa et al, 1992; Reiprich et al, 1995*).

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) no sólo estimula la secreción de TSH hipofisiaria sino también la liberación de GH en todos los grupos de vertebrados. La actividad liberadora de TRH en humanos se considera generalmente como una respuesta paradójica asociada con las condiciones patológicas de disfunción de GH. En estas condiciones, los receptores de TRH pueden expresarse anormalmente en los somatotropos y reflejar la inducción de células somatolactotrópicas. También se ha sugerido un defecto en el control hipotalámico inhibitorio de la secreción de GH para ser responsable de respuestas anómalas de GH a TRH. Además de estimular directamente la liberación de GH, el TRH puede regular esta actividad incrementando los niveles séricos de GHRH. Sin embargo, mientras el TRH estimula la actividad liberadora de GH del hipotálamo aviar, parece estimular el control inhibitorio hipotalámico en mamíferos y las inyecciones i.c.v. de TRH inhiben la liberación de GH. Aunque la respuesta somatotrópica se ha considerado paradójica, el TRH es un regulador fisiológico de la secreción de GH en aves y posiblemente en mamíferos. Esta posibilidad tiene apoyo en la supresión de secreción de GH en ratas inmunizadas contra TRH (*Harvey, 1995*).

La serotonina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) estimulan la secreción de GH en los somatotropos. La norepinefrina reduce la actividad de las neuronas de SS y estimula la secreción de GHRH vía receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ . El N-metil-D-aspartato (NMDA) y la leptina estimulan la secreción de GHRH, mientras que el neuropéptido Y estimula tanto la secreción de GHRH como de SS. La dopamina estimula la secreción de SS vía receptores D1 e inhibe la secreción de GH de los somatotropos vía receptores D2. Así, muchos factores neuroendocrinos regulan la secreción de GH alterando la secreción de GHRH y/o de SS como se había mencionado, o actuando independientemente sobre los somatotropos para coordinar su secreción (McMahon et al, 2001). En particular la ghrelina, un péptido estomacal recientemente encontrado que se une al receptor para los secretagogos de GH como el hexapéptido GHRP-6, estimula la secreción de GH directamente en los somatotropos, y su secreción también está regulada por GHRH (Malagon et al, 2003; Kamegai et al, 2004).

Los glucocorticoides, por su parte, interactúan sinérgicamente con las hormonas tiroideas y el ácido retinoico en la producción de GH en los somatotropos de humano y rata (Salles et al, 1994). Esta sinergia refleja los requerimientos de elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) próximos al promotor para la transcripción inducida por T<sub>3</sub>. Estos elementos juegan un papel estimulante de forma aguda a nivel hipofisario -estimulan la secreción de GH y potencian la expresión de su gen y del que codifica el receptor para GHRH - mientras que crónicamente presentan un efecto inhibitor, probablemente mediado por un incremento de SS (Devesa et al, 1992). Se ha documentado la estimulación que ejercen las hormonas tiroideas en la aparición de los somatotropos (Liu & Porter, 2004), así como en el aumento en la transcripción del gen de GH en cerebro de rata inclusive (Haas et al, 2004); sin embargo, no se tienen evidencias de su participación en la regulación de síntesis o secreción de variantes de GH, particularmente de la glicosilada.

## METABOLISMO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La secreción y acción de la GH se regulan en parte por mecanismos de depuración tanto en los sitios blanco como en los de síntesis, distribución y degradación. Las concentraciones circulantes de GH por lo tanto reflejan las tasas dinámicas de su síntesis, secreción y

depuración metabólica y los productos de procesamiento proteolítico. La remoción de GH de la circulación sistémica es mayoritariamente debida a su metabolismo irreversible en tejidos y la excreción renal de los productos. La heterogeneidad de la GH circulante y la hipofisiaria en parte refleja este procesamiento, que puede ser un prerrequisito para algunas de sus actividades en el plasma (*Harvey, 1995*).

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

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

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

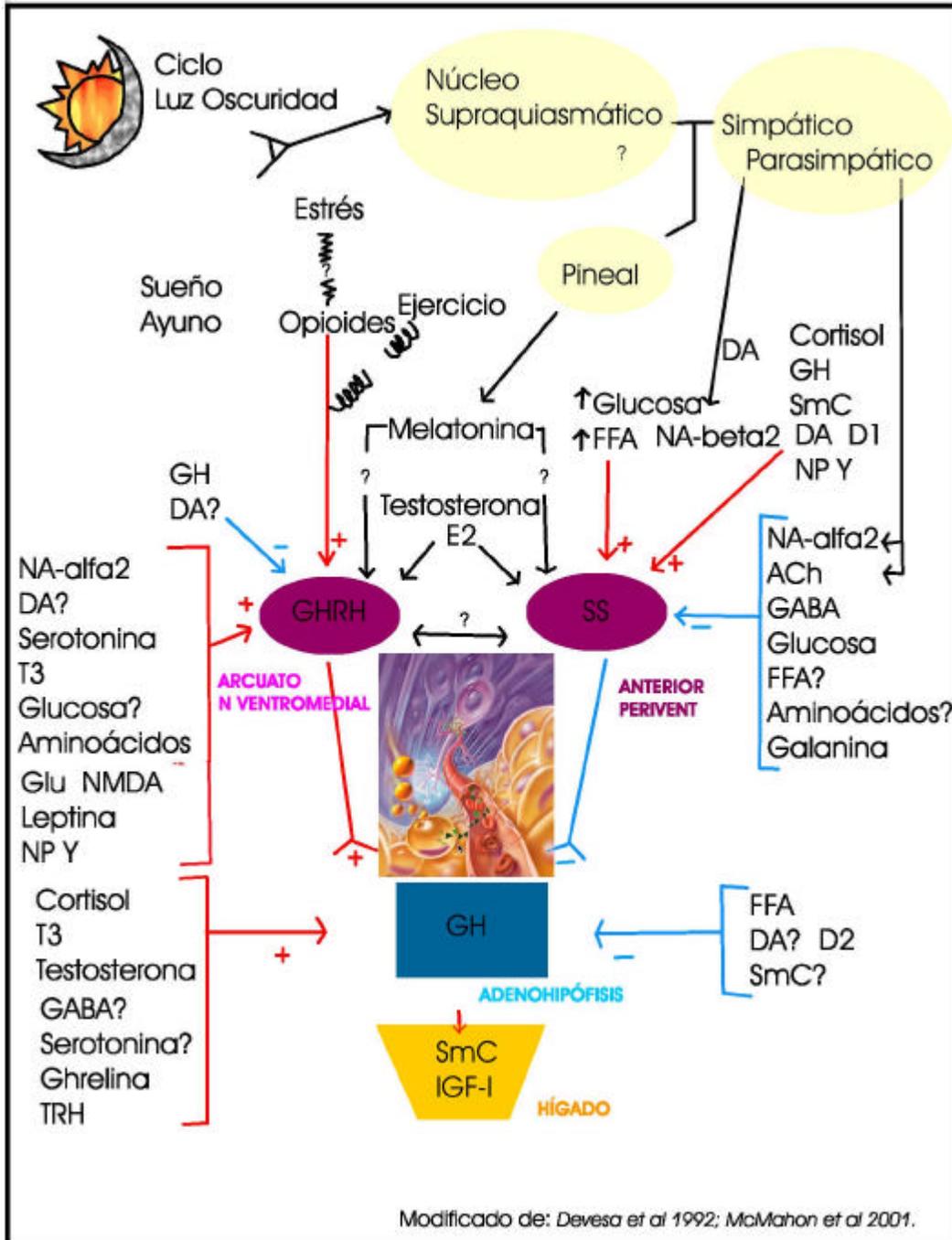


FIGURA 7. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GH. Los principales factores de regulación son: la hormona liberadora de GH que estimula la síntesis y secreción de GH (+) y somatostatina que inhibe su secreción (-). Existen otros muchos factores que intervienen en la secreción de GH, ya sea a nivel hipotalámico o hipofisario.

## GLICOSILACIÓN

La gran importancia que la glicosilación de las proteínas debe significar para el funcionamiento celular se demuestra fácilmente porque una proporción importante, tanto de estructura como de los recursos energéticos y enzimáticos de la célula se utilizan para llevar a cabo este proceso. Las glicoproteínas propiamente dichas se caracterizan por la presencia de una o varias cadenas de oligosacáridos, generalmente ramificadas, unidas covalentemente a uno o más de los residuos que forman el esqueleto peptídico de las proteínas. Las cadenas polipeptídicas de las glicoproteínas, como las de todas las proteínas, se sintetizan bajo control genético. Sus cadenas de carbohidratos, en contraste, se generan enzimática y covalentemente unidas al polipéptido sin la rígida guía del molde de ácidos nucleicos. Las enzimas del procesamiento generalmente no se encuentran en suficiente cantidad para asegurar la síntesis de productos uniformes. Por lo tanto, las glicoproteínas tienen una composición de carbohidratos variable, fenómeno conocido como microheterogeneidad, lo que dificulta su caracterización y purificación. (*Alberts, 2002; Rosado, 2000; Voet and Voet, 1995*).

Casi todas las proteínas de secreción y asociadas a membranas de células eucarióticas están glicosiladas. De hecho, la glicosilación de proteínas es más abundante que otros tipos de modificación postraduccionales combinados. Los oligosacáridos tienden a ocupar lugares en la estructura proteica en los cuales la secuencia de aminoácidos indica que la cadena cambiará su dirección (estructura tridimensional), es decir, en donde se forman dobleces de tipo  $\beta$ . Teniendo en cuenta su carácter hidrofílico, esta observación sugiere que los oligosacáridos se orientan hacia la parte exterior de la molécula, de manera que no interfieren con las conformaciones terciaria y cuaternaria de la molécula, pero sí participan en la interacción de la proteína con sus diferentes ligandos y efectores. Se pueden clasificar a las glicoproteínas en dos clases fundamentales teniendo en cuenta el tipo de enlace que las une a la cadena peptídica. En las N-glicosil glicoproteínas el enlace se hace utilizando el nitrógeno amínico de la asparagina. En esta clase, el monosacárido que funge como eslabón de enlace es prácticamente de manera invariable la N-acetilglucosamina unida por un enlace de tipo  $\beta$  a una asparagina que forma parte de la secuencia NXS(T), en donde la X puede ser cualquier

aminoácido, con las posibles excepciones de la prolina y el ácido aspártico. En la segunda clase, O-glicosil glicoproteínas, el enlace se hace utilizando el grupo hidroxilo de varios aminoácidos, incluyendo la serina, la treonina, la hidroxilisina y la hidroxiprolina (Rosado, 2000).

En los enlaces O-glicosídicos (Figura 8) el enlace más común involucra la unión de N-acetilgalactosamina (NAcGal) con el grupo OH de serina, treonina, o 5-hidroxilisina en la colágena, por ejemplo. Los oligosacáridos con enlaces tipo O- son generalmente cortos y contienen de uno a cuatro residuos carbohidrato; sin embargo, algunos como el involucrado en el grupo sanguíneo ABO, pueden ser muy largos.

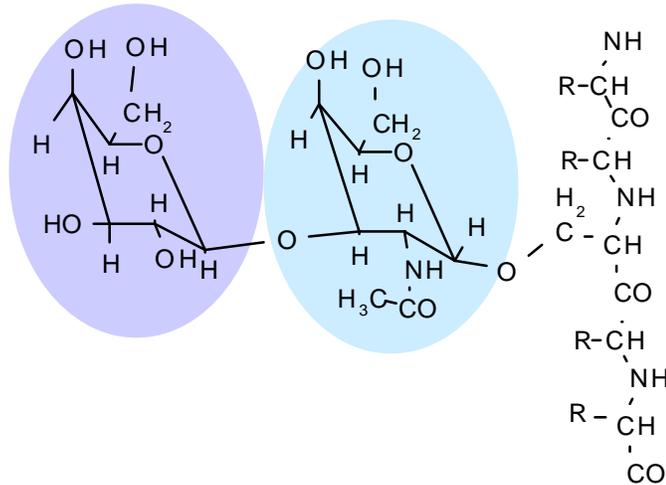
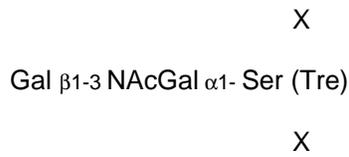
La mayoría de las proteínas citosólicas y nucleares no están glicosiladas, o si lo están, un solo residuo de N-acetilglucosamina (NAcGlu) se encuentra unido a serina o treonina, por ejemplo. Los azúcares con enlaces tipo O- son añadidos uno a la vez en reacciones catalizadas por enzimas específicas diferentes.

Por su parte, los oligosacáridos de las N-glicosil glicoproteínas contienen una región central distintiva, compuesta por un pentasacárido directamente unido a la asparagina y formado por dos moléculas de NAcGlu y tres de manosa (Figura 8). Estos residuos de manosa periféricos pueden unirse a su vez, a manosa o NAcGlu, y en secuencia a otros carbohidratos, lo que genera una gran variedad de formas oligosacáridas. La formación de estas cadenas inicia de manera cotraduccional a diferencia de los que tienen enlaces O-glicosídicos, que se generan una vez que la proteína se ha sintetizado.

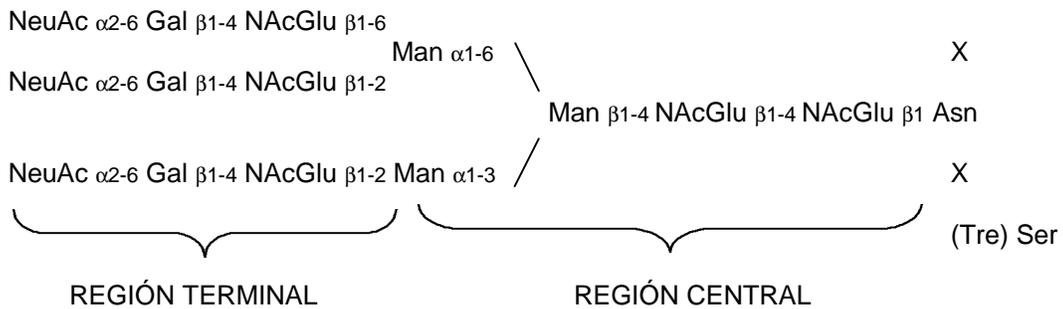
La N-glicosilación ocurre en la superficie luminal de la membrana del RE en una reacción de un paso, catalizada por una enzima unida a la membrana llamada glicosil transferasa. El oligosacárido que contiene catorce residuos carbohidrato, se sintetiza y procesa por intermediación del dolicol, un lípido de membrana –polisoprenoide-, y la cadena entera preformada se transfiere a la asparagina en el polipéptido naciente casi tan pronto como el residuo del aminoácido emerge de la superficie de la membrana. Posteriormente en el retículo endoplásmico y en el Golgi se retiran algunos residuos y se añaden otros, uno a la

vez, en un orden definido por una secuencia de reacciones catalizadas por enzimas diferentes. En las glicoproteínas maduras se encuentran clases diferentes de N-oligosacáridos, los complejos (Figura 8), los híbridos (Figura 9) y los ricos en manosa (Figura 10). Esta clasificación se basa en los tipos de azúcar unidos a la región central – pentasacárido- común; los ricos en manosa tienen 5 a 9 residuos de manosa (incluyendo 3 de la región central); si los residuos de manosa de la región central tienen unidos residuos de NAcGlu, las estructuras resultantes se consideran como complejas y cada rama se conoce como antena, teniendo estructuras bi-, tri- y tetrantenarias. Si sólo uno de los residuos centrales de manosa tiene unidos residuos de NAcGlu, la estructura se conoce como híbrido (Alberts, 2002; Voet and Voet, 1995).

Las glicoproteínas se han encontrado en prácticamente todo tipo de organismos vivos, desde los virus, bacterias, hongos, plantas verdes, hasta los mamíferos, y en ellos desempeñan una gran variedad de funciones: enzimáticas, hormonales, como proteínas transportadoras, receptores, agentes de reconocimiento e interacción, funciones estructurales, desde las más simples hasta las más complejas, desempeñan una importante función anticongelante en los peces de la antártica, por ejemplo. La glicosilación de proteínas que tienen actividad fisiológica semejante se hace de manera específica de especie. Sin embargo, existen evidencias de que las características de glicosilación de proteínas específicas entre diferentes especies se conservan. Las funciones que desempeñan los carbohidratos unidos a las proteínas no se han podido comprender con claridad pero ha quedado bien demostrada su participación en la topología funcional de la proteína, para determinar su distribución intracelular y su lugar final de funcionamiento, incluyendo el patrón de secreción; o modular sus propiedades fisicoquímicas, como su solubilidad, viscosidad, carga, e incluso conformación tridimensional y resistencia a la desnaturalización (Rosado, 2000).



*ENLACE O-GLICOSÍDICO*



*N-OLIGOSACÁRIDO COMPLEJO*

FIGURA 8. ARREGLO TÍPICO DE UN ENLACE O-GLICOSÍDICO Y DE UN N-GLICOSIL OLIGOSACÁRIDO DE TIPO COMPLEJO.

Abreviaturas: Asn, asparagina; Man, manosa; Gal, galactosa; NAcGal, N-acetilgalactosamina; NAcGlu, N-acetilglucosamina; NeuAc, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico); X, cualquier aminoácido; Ser, serina; Tre, treonina.

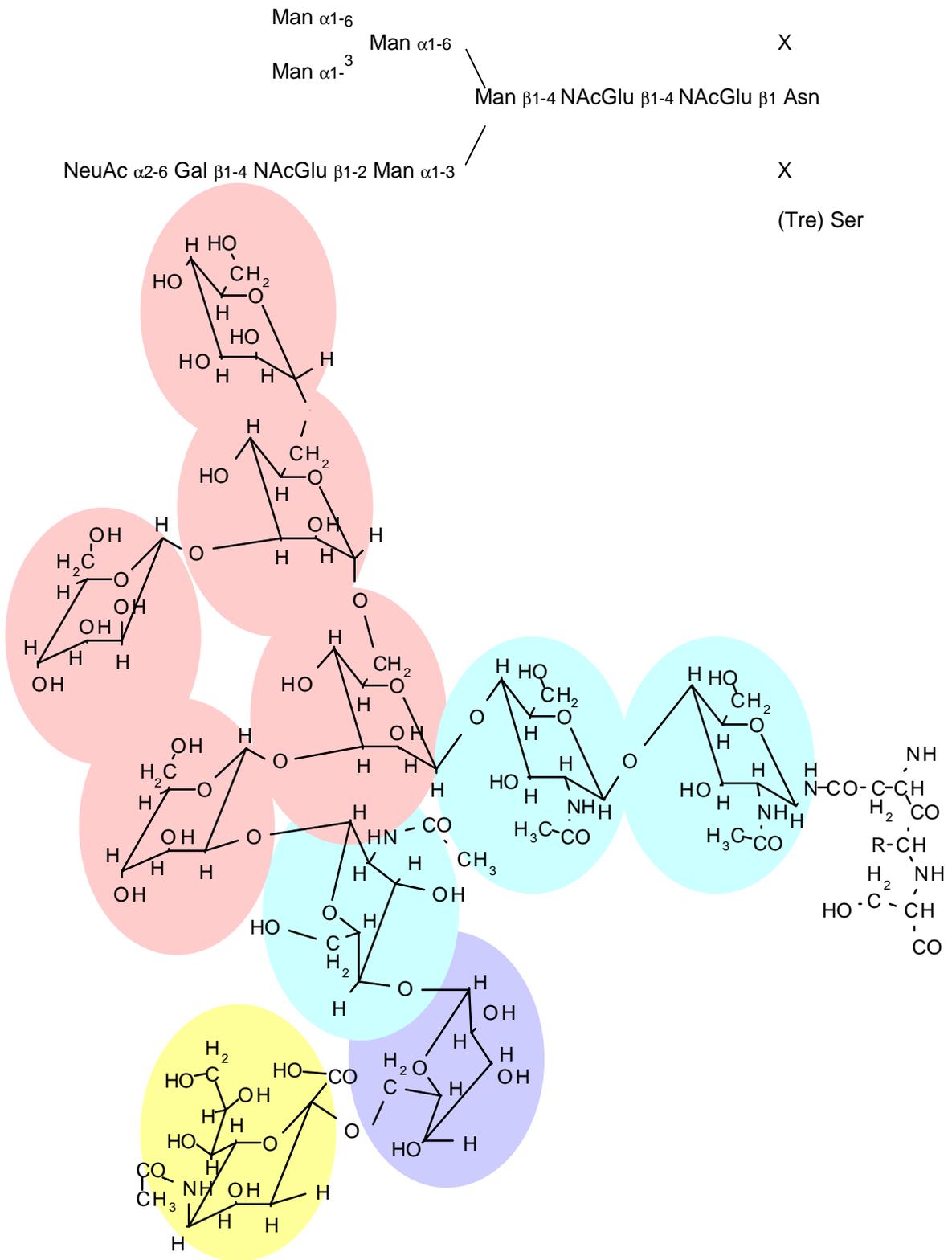


FIGURA 9. ARREGLO TÍPICO DE ENLACE N-GLICOSÍDICO PARA EL TIPO DE OLIGOSACÁRIDO HÍBRIDO. Abreviaturas: Asn, asparagina; Man, manosa; Gal, galactosa; NAcGlu, N-acetilglucosamina; NeuAc, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico); X, cualquier aminoácido.

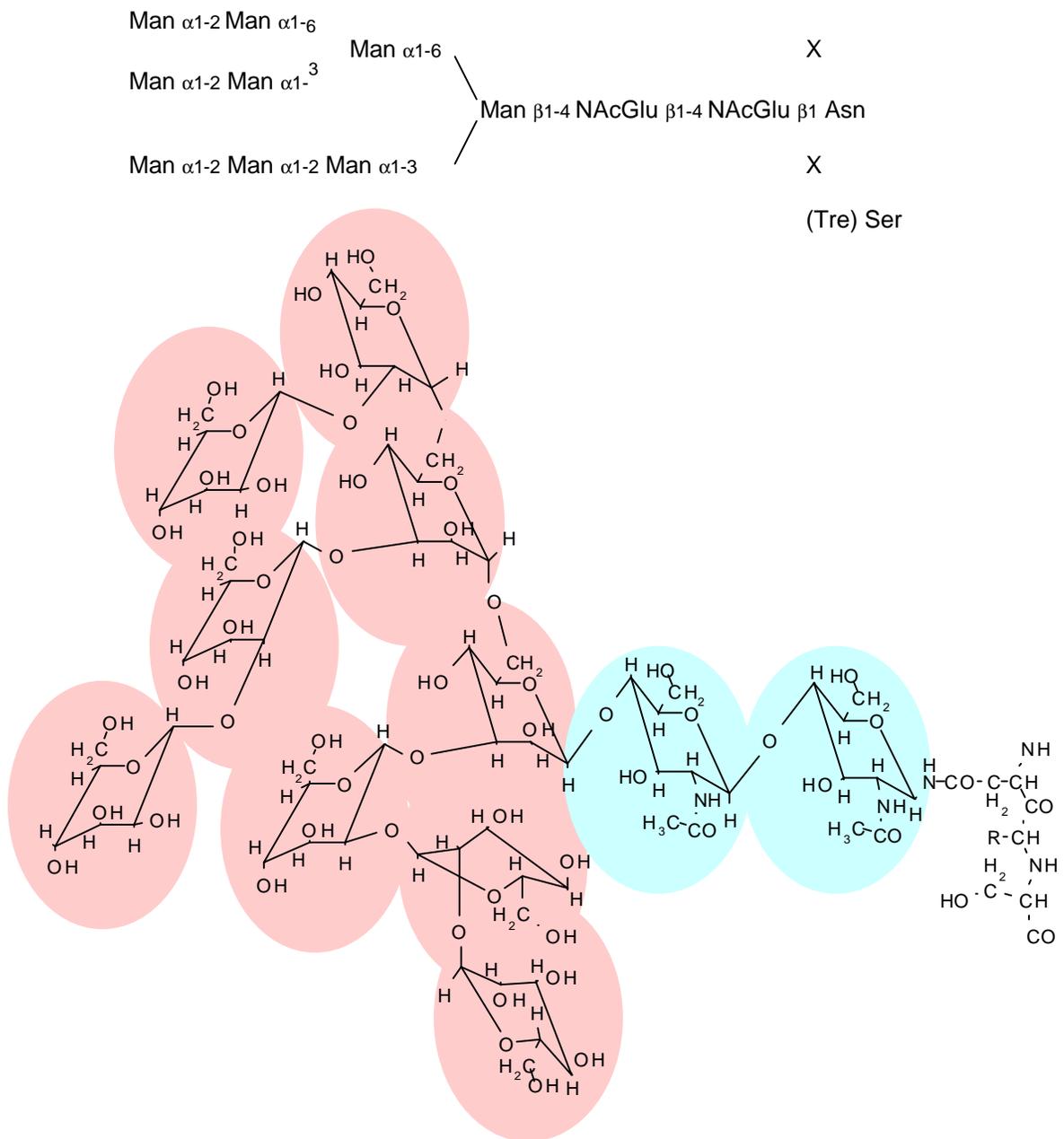


FIGURA 10. ARREGLO TÍPICO DE ENLACE N-GLICOSÍDICO PARA EL TIPO DE OLIGOSACÁRIDO RICO EN MANOSA. Abreviaturas: Asn, asparagina; Man, manosa; NAcGlu, N-acetilglucosamina; X, cualquier aminoácido.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La GH tiene funciones muy diversas y es posible que la participación de las variantes moleculares de la hormona en esta heterogeneidad funcional sea de manera diferencial. Entre los efectos de la GH se encuentra que, además de estimular el crecimiento lineal de los tejidos blandos y esqueléticos, se ve involucrada en la regulación de varios aspectos del metabolismo de proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos (Davidsson, 1987). Se han descrito efectos importantes de esta hormona sobre la diferenciación y proliferación celular, así como efectos sobre la estimulación enzimática, el transporte de aminoácidos y la secreción de algunos otros factores hormonales (Isaksson et al, 1985). Se ha propuesto que las diferentes variantes de la GH, así como de otras hormonas de la familia, puedan desempeñar diferentes actividades biológicas (Chawla et al, 1983; Lewis et al, 1984). Aún más, si las variantes se comportan como hormonas individuales, entonces podría pensarse que la síntesis y la liberación de cada una deberían estar sujetas a un control regulatorio diferencial. La expresión final de las actividades de las hormonas proteínicas está determinada al menos por tres factores: su vida media en la circulación, la afinidad-unión al receptor y la activación de vías intracelulares de transducción de señales, los cuales pueden verse afectados, entre otros mecanismos, por la glicosilación (Haro et al, 1996).

Se ha descrito la existencia de variantes glicosiladas de la GH (G-GH) en el humano (Sinha & Lewis, 1986), el ratón (Sinha & Jacobsen, 1987a, b), el pollo (Berghman et al, 1987; Arámburo et al, 1991), la rata (Bollengier et al, 1989), el cerdo (Sinha et al, 1990a, 1990b) y el búfalo (Maithal et al, 2001). Hasta ahora no hay evidencia clara de que la G-GH tenga acciones diferentes a las de la no glicosilada; sin embargo, en estudios realizados con dos de las variantes de carga del monómero de GH se ha demostrado que ambas tienen actividad somatotrópica (promotora del crecimiento) en ratones enanos (Scanes et al, 1990), pero que esas variantes de cGH difieren en sus efectos sobre el tejido adiposo del pollo, una siendo preferentemente lipolítica, mientras que la otra muestra efectos antilipolíticos (Arámburo et al., 1989b; Arámburo et al, 1990a). Por otra parte se han reportado niveles de G-GH más altos en ratas macho que en hembras, y más bajos en hembras lactantes que en hembras vírgenes (Sinha & Jacobsen, 1987a). Además, la ovariectomía provoca un

incremento en la proporción de G-GH, mientras que la administración de estradiol disminuye la concentración del monómero no glicosilado y de la G-GH. En el cerdo se han visto diferencias en la proporción que tiene la G-GH en plasma y en hipófisis durante el embarazo y desarrollo fetal (*Sinha, 1990a, 1990b*). Se han obtenido evidencias de que algunas variantes de masa de la cGH varían en su proporción al total de proteína inmunorreactiva a lo largo de la ontogenia (*Arámburo et al, 2000*); también se ha descrito una respuesta diferencial en la liberación de variantes de cGH en cultivos de hipófisis tratados con secretagogos como el GHRH (*Martínez-Coria et al, 2002*). Así se ha observado que la secreción de G-cGH es mayor que la de otras variantes. Se requiere por lo tanto establecer las diferencias de la G-cGH analizando su proporción en diferentes estadios durante el desarrollo del pollo, además de la necesidad de caracterizar con mayor detalle a la G-cGH a fin de contar con mayor información de su estructura que permita el posterior análisis funcional de la molécula.

Por otra parte, existe la necesidad de desarrollar ensayos específicos que permitan discernir la relevancia fisiológica de esta variante, como la proporción de G-cGH en los diferentes estados fisiológicos, así como encontrar si existe regulación específica sobre su síntesis y liberación. Estos ensayos podrían llevarse a cabo con anticuerpos que reconozcan específicamente el epítipo formado por la porción glicosilada, de manera que se pueda distinguir entre la cGH glicosilada y la que no lo está (*Berghman et al, 1994; Haro et al, 1996*).

## HIPÓTESIS

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

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

La hipótesis particular para el proyecto es la siguiente:

“La glicosilación de la hormona de crecimiento es un posible mecanismo para modular su actividad biológica, y su síntesis y distribución puede estar regulada de manera particular”.

## OBJETIVOS

En este proyecto se pretende profundizar en la caracterización bioquímica y biológica de la variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo (G-cGH) así como identificar su localización intracelular en somatotropos de hipófisis de pollos de diferentes edades. Asimismo se iniciará la caracterización de los niveles de G-cGH durante la ontogenia del pollo.

1. Purificación y caracterización bioquímica de la G-cGH
  - 1.1 Purificación de la G-cGH a partir de hipófisis de pollos de engorda
  - 1.2 Caracterización general de la G-cGH
  - 1.3 Caracterización del tipo de residuos de carbohidrato presentes en la variante glicosilada de la cGH, mediante el uso de SDS-PAGE, *western blot* y afinidad por lectinas
2. Localización específica de la G-cGH en diferentes poblaciones de somatotropos o compartimentos subcelulares
  - 2.1 Inmunohistoquímica con microscopía de luz
  - 2.2 Inmunocitoquímica con microscopía electrónica
3. Análisis de bioactividad de la G-cGH
4. Determinación de los niveles de G-cGH en hipófisis durante el desarrollo del pollo: embriones de 10, 13, 15 y 18 días; 1 día post eclosión, y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 20, 25 semanas de edad

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

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

Se obtuvieron además hipófisis de pollos de engorda de diferentes edades donados por granjas de Pilgrim's Pride de México. Se extrajo la glándula de la manera descrita anteriormente o descubriendo la base del cráneo, después de retirar el hueso parietal y temporal, así como el encéfalo, de manera que resultara expuesta la silla turca. Es de gran importancia retirar el recubrimiento meníngeo para obtener la hipófisis sin daño para procesamiento inmunohistoquímico. Las hipófisis utilizadas para cuantificar cGH se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso; las hipófisis destinadas a inmunohistoquímica se colocaron en fijador inmediatamente después de su obtención.

### REACTIVOS

La proteína A sefarosa y la sefarosa 4B activada por BrCN se adquirieron de Pharmacia. Los reactivos para electroforesis y *western blot* se obtuvieron de Bio-Rad. Las proteasas y lectinas se obtuvieron de Sigma. El anticuerpo monoclonal  $\alpha\text{cGH}$  y las células de hibridoma (IH7) fueron amablemente donados por el Dr. Luc Berghman (Texas A&M University, Department of Poultry Science). Los anticuerpos policlonales CAP1 y C1 se generaron por

nuestro grupo en conejos contra cGH purificada (fracción BDE-1) y contra hormona de crecimiento recombinante, respectivamente.

## MÉTODOS

*Obtención y purificación de anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -cGH:* Para preparar el inmunoabsorbente que se utilizó en la purificación de cGH implementamos la producción del anticuerpo monoclonal que en principio nos proporcionaba amablemente el Dr. Luc Berghman, identificado como Lote IH7, que reconoce no sólo al monómero mayoritario de cGH, sino también a la fracción glicosilada y al dímero.

El “cultivo monoclonal” (donación del Dr. Luc Berghman) se obtuvo siguiendo el protocolo de fusión descrito por el fabricante del estuche para preparación de hibridomas: Una suspensión de células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con una preparación hipofisiaria de pollo se fusionó con células de mieloma NP3 a razón de 4:1 en polietilenglicol al 50%. Por dilución limitante se dispersaron las células y se cultivaron en presencia de timocitos como capa basal. El cultivo se mantuvo con la adición de factor de crecimiento de hibridoma. Los clones inmunopositivos se separaron para la consiguiente producción de ascitis, manteniendo las células monoclonales congeladas mientras tanto (*Berghman et al, 1988*).

La producción de líquido de ascitis se llevó a cabo inyectando un ml de suspensión de cultivo monoclonal (de  $2.5 \times 10^6$  células) en ratones machos adultos BALB/C, que previamente se prepararon con una inyección de 0.5 ml de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) 10 días antes de la inoculación con las células de hibridoma. El líquido de ascitis se obtuvo dos a tres semanas después con la ayuda de una aguja 27 X 13 mm (para insulina) que drena la cavidad abdominal del ratón. Se centrifugó y liofilizó el líquido recolectado para su uso posterior.

La purificación de los anticuerpos (*Anexo I*) se realizó a partir del líquido de ascitis, el cual se separó por medio de cromatografía de afinidad con una columna de proteína A sefarosa.

La columna se equilibró con glicina 1.5 M, NaCl 3 M pH 8.9 y se recolectaron fracciones de 10 ml. La primer fracción (la fracción no adsorbida) se almacenó para efectuar un segundo pase por la columna y recuperar todo el anticuerpo. Posteriormente se realizaron lavados con el amortiguador de glicina hasta obtener una absorbencia de cero a 280 nm, o aproximadamente 10-25 volúmenes del lecho de gel. La columna se eluyó con aproximadamente 3-6 volúmenes de amortiguador de citratos 50 mM pH 3.0 en fracciones de 2 ml que se neutralizaron con 0.5 ml del amortiguador de glicina. Se determinó la absorción a 280 nm de cada fracción y se juntaron las de mayor densidad (la densidad óptica a una concentración de 1 mg/ml de solución de anticuerpo es de 1.4). La preparación del anticuerpo se dializó contra amortiguador de acoplamiento (fosfatos 50mM, NaCl 0.5 M pH 7-7.6) para preparar el inmunoabsorbente, con objeto de eliminar los compuestos aminados (Tris y glicina). Luego se liofilizó el preparado hasta su uso.

*Preparación del inmunoabsorbente:* Se acoplaron aproximadamente 20 mg de IgG (3 ml de líquido de ascitis) en 1 g de sefarosa 4B activada con BrCN (3 ml de gel). La sefarosa se hinchó con HCl 1 mM y se equilibró con amortiguador de acoplamiento (fosfatos 50mM, NaCl 0.5 M pH 7-7.6). Se añadió el líquido de ascitis diluído 5X en el amortiguador y se agitó la columna. Se recogió la fracción no acoplada y se calculó la eficiencia del proceso comparando la densidad óptica a 280 nm de la solución de anticuerpos antes y después del acoplamiento. Se bloquearon los sitios que no reaccionaron con 1.5 M glicina, 3M NaCl pH 8.0, agitando la columna durante toda la noche. Se lavó la columna con el amortiguador de cargado preciso para la purificación de cGH (Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6) seguido por el de elución (glicina 0.05M, NaCl 0.15 M pH 3.0), en tres secuencias hasta quedar en el amortiguador pH 7.6.

*Purificación de G-cGH.* La variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo se purificó por cromatografía de afinidad: primero en una columna de concanavalina-A (ConA) sefarosa seguida de cromatografía de inmunoafinidad, a partir de extractos de aproximadamente 100 glándulas hipofisarias de pollos de 6-8 semanas de edad (Arámburo *et al*, 1991). En resumen, las glándulas hipofisarias de pollo, obtenidas directamente de pollos

recién sacrificados en el rastro y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, se homogeneizaron en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM pH 9.0-9.5 en presencia de inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF 1 mM; +Complete, Roche, que contiene inhibidores de serin-, cisteín- y metaloproteasas). La homogeneización se realizó con un Politrón durante 30 segundos en la posición 5 del regulador de velocidad. Después se realizó una extracción en el amortiguador de Tris con agitación magnética, durante dos horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para retirar los restos celulares y material pesado, se centrifugó durante 15 minutos a 12,000 RPM en microfuga a  $4^{\circ}\text{C}$ . Una vez centrifugado, se neutralizó a pH 7.6 con HCl 0.5 N. Para obtener la fracción de glicoproteínas se purificó en una columna de ConA-sefarosa (*Anexo II*) equilibrada con Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM,  $\text{MnCl}_2$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, pH 7.0; la fracción retenida (G-cGH) se eluyó con  $\alpha$  D-metilmanósido 10 mM en el amortiguador de equilibrio. Posteriormente se sometió a una cromatografía de inmunoafinidad (*Anexo III*) (anticuerpos monoclonales acoplados a sefarosa 4B-descrito en la preparación del inmunoabsorbente) en una columna equilibrada con Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M pH 7.6, que se eluye con glicina 0.05 M, NaCl 0.15 M pH 3.0 -estas fracciones se neutralizan con Tris-HCl 3 M pH 7.6-, con objeto de obtener a la cGH glicosilada. Las diversas fracciones cromatográficas se monitorearon a 280 nm.

*Análisis electroforético.* A lo largo del proyecto se caracterizó electroforéticamente a las variantes moleculares de la cGH, con objeto de poder identificarlas. Las bandas correspondientes a las variantes de la hormona se revelaron mediante inmunotinción con un anticuerpo específico después de electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Estos métodos ya habían sido montados en el laboratorio y mostrado su efectividad (*Arámburo et al 1989a; Arámburo et al, 1989b*).

*SDS-PAGE.* (*Anexo IV*) El peso molecular aparente de las muestras se analizó mediante electroforesis unidimensional en mini geles de poliacrilamida –Mini Protean 2, BioRad- en presencia de dodecil sulfato de sodio, empleando el sistema de *Laemmli (1970)*. La concentración de acrilamida fue del 12% o del 15% en el gel separador (4.8X8.6cm) y de 4% en el gel concentrador (2X8.6cm). Las muestras se corrieron bajo condiciones reductoras (en presencia de 5% 2-mercaptoetanol) y no reductoras.

*Western blot.* (Anexo V) Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Para la transferencia, los geles se equilibraron en un amortiguador con 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3 y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF, a 200 mA por 60 min, para ser posteriormente inmunoteñidas y reveladas. Después de transferir, las membranas se lavaron con TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) por 5 min y se bloquearon con 5% de leche descremada (Bio-Rad) en TBS por 2 horas a 37°C (Anexo VI). Después de lavarlas con TBS, las membranas se incubaron con el primer anticuerpo policlonal  $\alpha$ GH CAP1 (1/3,000-1/10,000 en 1% de leche descremada en 0.05% Tween-20 – TBS (TTBS)) a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron con el segundo anticuerpo (de ovino  $\alpha$ IgG de conejo) conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad) (1/3,000 en 1% de leche descremada en TTBS) durante dos horas a temperatura ambiente. Después se lavaron con TTBS y TBS para incubarlas por 5 min. en la solución de sustrato (ECL-*Amersham Pharmacia*; sustrato quimioluminiscente). Para la detección de azúcares, se utilizó un protocolo en el cual el grupo hidroxilo adyacente de la glicoproteína es oxidado a aldehído con metaperyodato de sodio y marcado con un conjugado de biotina-hidrazina. El glicoconjugado marcado con la biotina se detectó por un ensayo enzimático usando estreptavidina marcada con peroxidasa y revelando con quimioluminiscencia (Anexo VI). Se obtuvieron luminogramas de las bandas inmunoteñidas o marcadas con biotina/peroxidasa en películas de rayos X Kodak Biomax. Las membranas se revelaron también con 3,3'-diaminobencidina 0.025%, peróxido de hidrógeno 0.02% (Arámburo *et al.*, 1989a; Arámburo *et al.*, 1990a) y la imagen se digitalizó para su análisis posterior mediante densitometría usando el software *IPLab Gel -Scanalytics Inc.*

### *Digestión enzimática*

La variante glicosilada de cGH se analizó electroforéticamente antes y después de tratarla con péptido N-glicosidasa F y O-glicosidasas<sub>DS</sub>, con objeto de determinar el tipo de

glicosilación y con carboxipeptidasa Y para confirmar la presencia de oligosacáridos con enlace N-glicosídico en la asparagina 188. La remoción de los oligosacáridos liberados por la PNGasaF se pudo monitorear por el cambio de peso molecular por electroforesis en gel y también por la ausencia de reacción a carbohidratos. La presencia de una reacción positiva tras el tratamiento con PNGasaF indicaría que aún existen carbohidratos no N-ligados (como los de enlace O-glicosídico o vía fosfatidilinositol). El análisis se complementó con el tratamiento con O-endoglicosidasa y neuraminidasa. (*Friedman and Higgins, 1995*)

#### *Tratamiento de G-cGH con péptido N-glicosidasa F*

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

#### *Tratamiento de G-cGH con O-Glicosidasa<sub>DS</sub>*

Se diluyeron aproximadamente 500 ng de G-cGH en amortiguador de fosfatos 20 mM pH 6.0. Se añadieron 20 mU de O-Glicosidasa. Se incubó la mezcla durante 14-16 horas a 37°C (volumen de reacción 20 µl). Para electroforesis y WB se colocaron: 200 ng de hormona digerida para detección con anticuerpo; 200 ng de G-cGH digerida para detección de glicoproteínas.

#### *Tratamiento de G-cGH con carboxipeptidasa Y*

Se diluyeron aproximadamente 2 µg de la hormona en amortiguador de piridín acetato 0.1 M pH 5.4. Se añadieron 200 ng/ 5 µL de carboxipeptidasa Y (volumen total de reacción 50 µl) y se incubó la mezcla durante 15, 30 o 60 minutos a 37°C. Para electroforesis y WB se colocaron: 200 ng de hormona digerida para detección con anticuerpo; 200 ng de G-cGH digerida para detección de glicoproteínas.

*Determinación de la estructura de oligosacáridos (Anexo VI).* Con el fin de indagar sobre la naturaleza de la fracción de carbohidrato unida a la proteína, se ensayó la G-cGH por afinidad con diferentes lectinas y detección en *western blot*. Se utilizó ConA o lectina de *Canavalia ensiformis*, que es específica para residuos de  $\alpha$ -manosa y  $\alpha$ -glucosa (reconociendo particularmente glicoconjugados del tipo N-oligomanosil) (Stanley, 1998); la lectina de germen de *Triticum vulgare* –WGA (Wheat Germ Agglutinin)-, reconoce específicamente a (N-acetilglucosamina)<sub>2</sub> y ácido N-acetilneuramínico; la isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* BS-I-B4, que reconoce a  $\alpha$ -galactosa; la lectina de *Maclura pomifera* –MAC-, que reconoce a  $\alpha$ -galactosa y  $\alpha$ -N-acetilgalactosamina; la lectina (toxina RCA 60) de *Ricinus communis*, que reconoce N-acetilgalactosamina y  $\beta$ -galactosa. Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, como se describe con anterioridad. Después de transferir, las membranas se lavaron con TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) por 5 min y se bloquearon con 5% de albúmina en TBS por 2 horas a 37°C. Después de lavarlas con TBS, las membranas se incubaron con la lectina conjugada con peroxidasa (1/300 en 1% de albúmina en 0.05% Tween-20 – TBS (TTBS)) a temperatura ambiente durante la noche. Las membranas se revelaron con 3,3'-diaminobencidina 0.025% y peróxido de hidrógeno 0.02% o por quimioluminiscencia.

*Secuenciación amino-terminal.* La estructura primaria de la G-cGH se analizó por el método de degradación de Edman utilizando un secuenciador automatizado *Procise 491 Protein Sequencer* de Applied Biosystems, en la Unidad de Bioquímica Analítica del INB, UNAM Campus Juriquilla, con la ayuda experta del Dr. Manuel Aguilar. La G-cGH purificada por cromatografía de afinidad (aproximadamente 100 picomoles) se sometió a electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras. Posteriormente se electrotransfirió a una membrana de PVDF especial para secuenciación de péptidos. Una vez transferida se identificó la presencia de la banda de 29 kDa (se tiñó la membrana con azul de Coomassie en preparación especial para secuenciación) y se recortó la porción de PVDF que contenía dicha banda para introducirla en el secuenciador.

*Localización específica de la G-cGH en diferentes poblaciones de somatotropos o compartimentos subcelulares.* Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la localización de, virtualmente, cualquier antígeno en una sección de tejido, si se cuenta con un antisuero específico contra la molécula blanco. La detección de proteínas *in situ* (en las células donde se expresan) ofrece la oportunidad de investigar en qué fracción del tejido o cultivo celular y en qué compartimento celular se localiza. En principio, las células o secciones de tejido se fijan y reaccionan con un primer anticuerpo específico a la proteína que va a ser detectada; al primer anticuerpo se une un segundo anticuerpo que tiene unido covalentemente (conjugado) ya sea un colorante fluorescente (isotiocianato de fluoresceína FITC, rodamina- $\beta$ -isotiocianato), una enzima (fosfatasa alcalina, peroxidasa) o sustancias electrodensas para microscopía electrónica (partículas de oro o ferritina) (Scheidtmann, 1989). También se pueden utilizar lectinas conjugadas para identificar moléculas particulares, como por ejemplo conjugados de ConA con colorantes fluorescentes, enzimas y partículas electrodensas. Se determinó la presencia de cGH y de glicoproteínas con técnicas de inmunohistoquímica por microscopía de luz y por microscopía electrónica en somatotropos –hipófisis.

*Inmunohistoquímica. Microscopía fotónica (Anexo VII).* Para microscopía de luz, las hipófisis recién recolectadas se fijaron con BHS (Berghman *et al*, 1992) y se incluyeron en parafina tras su deshidratación por una serie de alcoholes y xilol; una vez obtenidos los bloques de parafina, se realizaron cortes de 4 micras con ayuda de microtomo LEICA RM 2135 y se montaron en laminillas. Las laminillas previamente rehidratadas se incubaron con el anticuerpo policlonal CAP1 contra cGH; después se lavaron para la siguiente incubación con el segundo anticuerpo, de cabra contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa. Para desarrollar color y marcado se incubaron las preparaciones con 3,3'-diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Por otra parte, las glicoproteínas (G-cGH, en particular) se marcaron con ConA conjugada con peroxidasa. Las preparaciones (cortes seriados a los tratados con anticuerpo) siguieron el mismo proceso de montaje y deshidratación. La primera incubación se llevó a cabo con la lectina conjugada y el revelado se realizó de igual manera con DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Inmunocitoquímica. Microscopía electrónica (Anexo VIII).* Con la participación de la Unidad de Microscopía Electrónica, a cargo del Dr. Alfonso Cárabez Trejo, se montaron las técnicas de inmuno-oro con microscopía electrónica. Para ello, las glándulas se fijaron en glutaraldehído 0.5% en PBS y se deshidrataron en una serie de alcoholes. El tejido se incluyó en resina LR white (POLYSCIENCES) y posteriormente se realizaron cortes ultrafinos en un ultramicrotomo Ultracut de LEICA sobre rejillas cubiertas con Formvar. Los sitios reactivos resultantes por la fijación con glutaraldehído se bloquearon con glicina. Se incubaron las preparaciones utilizando el mismo primer anticuerpo específico contra cGH (CAP1) que el utilizado para microscopía fotónica. Se lavaron las preparaciones con PBS y se incubaron con un segundo anticuerpo, de cabra contra IgG de conejo ligado a partículas de oro de 10 nm. Se procesaron las preparaciones con acetato de uranilo y citrato de plomo para su contrastado y posterior análisis con el microscopio electrónico JEOL 100 B. Por otra parte, las glicoproteínas se marcaron con ConA ligada a partículas de oro de 25nm. Se montó un doble marcaje incubando primero con el anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo-oro-10nm, y posteriormente con la lectina conjugada con oro-25nm. Se contrastaron las preparaciones y se analizaron con el microscopio electrónico.

#### *Ensayo de bioactividad*

#### *Ensayo de radiorreceptor*

Se caracterizó la unión de la G-cGH al receptor de la hormona de crecimiento (GHR) utilizando un ensayo de radiorreceptor desarrollado por Krishnan y col. (1989), adaptado por Reyes y col. (1996). Se utilizó GH recombinante de pollo (rcGH) como trazador, marcada con <sup>125</sup>I por el método Iodogen, según instrucciones del fabricante. Se emplearon preparaciones de membranas hepáticas de pollo (48,000xg) de machos adultos para los ensayos de unión al receptor, y la rcGH se usó como estándar para el desplazamiento.

#### *Ensayo de proliferación de células de linfoma Nb2*

El ensayo de proliferación de células de linfoma de rata Nb2 se llevó a cabo como se describe en Tanaka y col. (1980), con algunas modificaciones. Las células Nb2 se

mantuvieron en cultivo en medio DMEM suplementado con 10% de suero de caballo y 10% de suero fetal bovino en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C en una incubadora humidificada. Veinticuatro horas antes de añadir las hormonas de prueba, las células se lavaron y se incubaron en el medio sin suero fetal bovino. Se añadieron las preparaciones de prueba y se incubaron las células durante 72 horas. Se cuantificó el crecimiento celular mediante el estuche comercial “Cell proliferation kit I” (Roche).

*Determinación de los niveles de G-cGH en hipófisis durante el desarrollo del pollo: embriones de 10, 13, 15 y 18 días; 1 día post eclosión, y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 20, 25 semanas de edad.*

Se determinó la cantidad de cGH total por ensayo inmunoenzimático (ELISA) en relación a la concentración de proteínas del tejido (Martínez-Coria et al, 2002), determinada por el método de Bradford (Anexo IX). La cuantificación de G-cGH se realizó mediante el análisis densitométrico de *blots* tras electroforesis e inmunotransferencia (Arámburo et al, 2000), como se describió.

*ELISA indirecto para la determinación de cGH total (Anexo X)*

Ensayo por desplazamiento (competencia):

Se incubaron las muestras con el primer anticuerpo –policlonal CAP1- 1:100,000 a 4°C durante 16 horas mientras se “ferraron” placas multipozos (Immulon 2HB, Dynex, Chantilly, VA) con hormona de crecimiento (12ng de cGH/100 µl de amortiguador de carbonato 0.1M pH 10.3). Se lavaron las placas recubiertas con cGH y se incubaron con leche 3% en TBS para bloquear los sitios no ocupados. Se incubaron las muestras en las placas durante dos horas a temperatura ambiente, previo lavado del agente bloqueador. Se lavaron nuevamente las placas para después incubar con el segundo anticuerpo (conjugado a peroxidasa, BioRad) 1:3,000. Se lavaron las placas con TBS y se añadió el sustrato revelador (ABTS-Boehringer Mannheim). Se determinó la absorbencia a una longitud de onda de 405 nm (Martínez-Coria, et al, 2002).

En busca de la cuantificación e identificación directa de G-cGH se realizaron, además, estudios preliminares para la estandarización de un ensayo enzimático que cuantificara la G-cGH previamente retenida por ConA, así como ensayos para la obtención de un anticuerpo específico contra G-cGH.

#### *ELISA indirecto para la determinación de G-cGH (Anexo XI)*

Ensayo de captura (sandwich) con concanavalina A:

Se recubrieron placas multipozos con ConA (10 mg/100  $\mu$ l de amortiguador de acetatos) durante 24 horas a 4°C. Se lavaron las placas recubiertas con ConA y se incubaron con agente bloqueante en TBS. Se lavaron nuevamente las placas para después incubar las muestras durante 24 horas a 4°C. Se lavaron las placas nuevamente y se incubaron con el primer anticuerpo 1:100,000 a 4°C durante 24 horas. Después de lavar las placas, se incubaron con el segundo anticuerpo (conjugado a peroxidasa) 1:3,000. Se lavaron las placas con TBS y se añadió el sustrato revelador. Se midió la absorbencia a una longitud de onda de 405 nm.

*Producción de anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -G-cGH (Anexo XII):* El desarrollo de un anticuerpo específico contra G-cGH, podría permitir una identificación puntual y precisa de esta variante, como vía alternativa a la cuantificación por afinidad por lectinas y por separación por SDS-PAGE y *western blot*, asimismo como alternativa a la co-localización de cGH y glicoproteínas en técnicas de inmunohistoquímica. El protocolo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano, en el IBT de la UNAM en Cuernavaca: se inmunizaron ratones Balb/c con preparaciones enriquecidas de G-cGH y con preparaciones de glicoproteínas de hipófisis de pollo. Se generaron los hibridomas por fusión de células de bazo de los animales inmunizados y células de la línea de mieloma SP2, como se describió brevemente para la obtención del monoclonal IH7. Se buscaron los clones inmunopositivos que reconocieran sólo a la G-cGH y no reconocieran a la cGH recombinante.

#### *Análisis estadístico*

Los ensayos se realizaron por triplicado con tres repeticiones; para su evaluación se llevaron a cabo análisis de varianza, con pruebas de Tukey para determinar diferencias significativas entre grupos.

## RESULTADOS

### *Obtención y purificación de anticuerpo monoclonal $\alpha$ -cGH IH7*

Para la obtención del líquido de ascitis con anticuerpo monoclonal contra cGH se trabajó con varios lotes de ratones que se inyectaron intraperitonealmente con células de hibridoma como se describe brevemente en Materiales y Métodos. Se obtuvieron de 80 a 250 ml de ascitis por cada lote de 20 ratones inoculados, drenando el líquido durante una a dos semanas. La purificación de los anticuerpos se realizó a partir del líquido de ascitis separándolo por cromatografía de afinidad con una columna de proteína A sefarosa, con capacidad de unión de 20 mg de IgG por ml de gel (2 mg de proteína A/ml de gel). En la figura 11 se muestra el patrón de elución para el líquido de ascitis.

A fin de recuperar la mayor cantidad posible de inmunoglobulinas, la fracción no adsorbida en la cromatografía anterior se sometió nuevamente al proceso (Figura 12), y se observó que sólo había quedado un remanente relativamente pequeño.

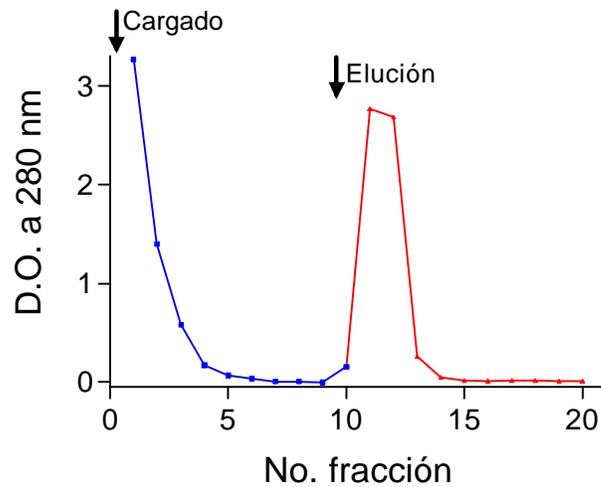


Figura 11. Purificación de anticuerpo monoclonal a partir de líquido de ascitis por cromatografía de afinidad en proteína A sefarosa. La columna se equilibró con glicina 1.5 M, NaCl 3 M pH 8.9, mientras que la elución se llevó a cabo con amortiguador de citratos 50 mM pH 3.0. Las fracciones recolectadas después del cargado fueron de 10 ml, mientras que para la elución se colectaron fracciones de 2 ml (más 0.5ml de amortiguador de neutralización).

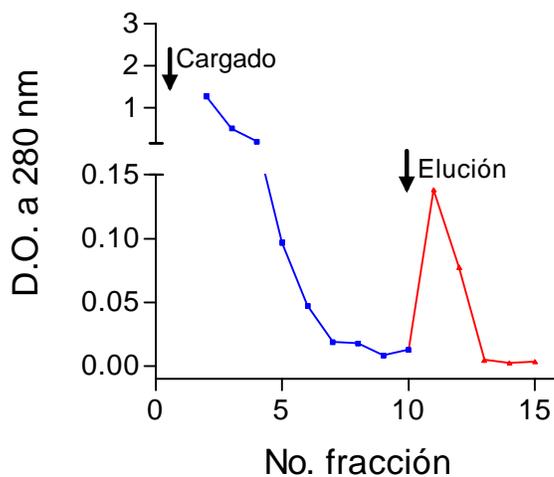


Figura 12. Purificación de anticuerpo monoclonal a partir de la fracción no adsorbida de la cromatografía de líquido de ascitis por proteína A sefarosa (Figura 11). La columna se equilibró con glicina 1.5 M, NaCl 3 M pH 8.9, mientras que la elución se llevó a cabo con amortiguador de citratos 50 mM pH 3.0. Las fracciones recolectadas después del cargado fueron de 10 ml, mientras que para la elución se colectaron fracciones de 2 ml (más 0.5ml de amortiguador de neutralización).

### *Preparación del inmunoadsorbente*

Después de purificar el anticuerpo, se acoplaron aproximadamente 20 mg de IgG  $\alpha$ cGH en cada gramo de sefarosa 4B activada con BrCN (3 ml de gel), obteniéndose una eficiencia de pegado de más del 95%.

### *Purificación de G-cGH*

La variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo se purificó por cromatografía en columna de ConA-sefarosa seguida de cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo monoclonal, a partir de extractos de glándulas hipofisarias de pollos de 6-8 semanas. Inicialmente se obtuvo una fracción enriquecida en glicoproteínas hipofisarias al someter el extracto crudo de las glándulas a una cromatografía de afinidad en ConA-Sefarosa (Figura 13), eluyendo con un flujo de 0.4 ml/minuto. Esta fracción contendría, entre otras glicoproteínas, a la G-cGH.

La purificación de la fracción correspondiente a la variante glicosilada de la hormona de crecimiento de pollo, a partir de la fracción enriquecida de glicoproteínas hipofisarias, se realizó mediante cromatografía de inmunoafinidad con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ cGH IH7 acoplado a sefarosa, obteniéndose un patrón de elución esquematizado en la figura 14.

Se obtuvo un rendimiento de 8-10 microgramos de G-cGH por gramo de tejido hipofisario (aproximadamente 100 glándulas).

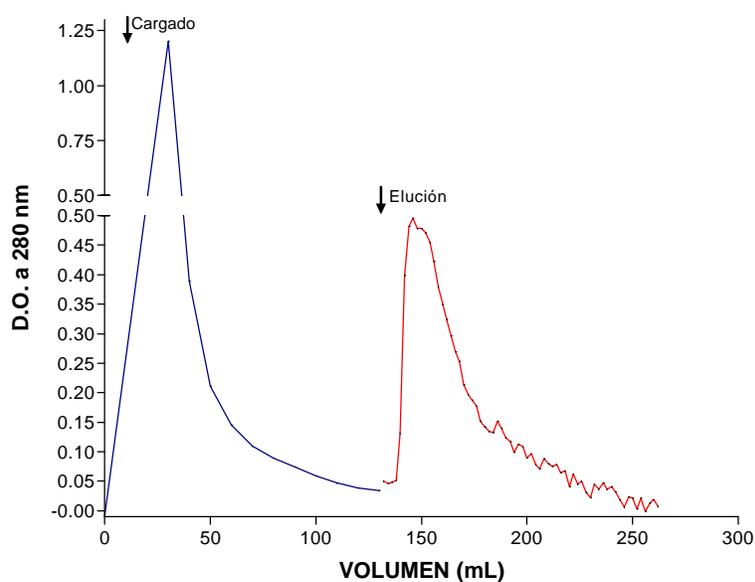


Figura 13. Purificación de glicoproteínas hipofisarias por cromatografía de afinidad en concanavalina A-sefarosa. Un extracto crudo de hipófisis de pollo (aproximadamente 100 glándulas) se sometió a la cromatografía en amortiguador de Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7; la fracción retenida se eluyó con  $\alpha$ -D-metilmanósido 10mM en el amortiguador de equilibrio. Econocolumna BioRad con 3 ml de lecho; flujo 0.4 ml/min.

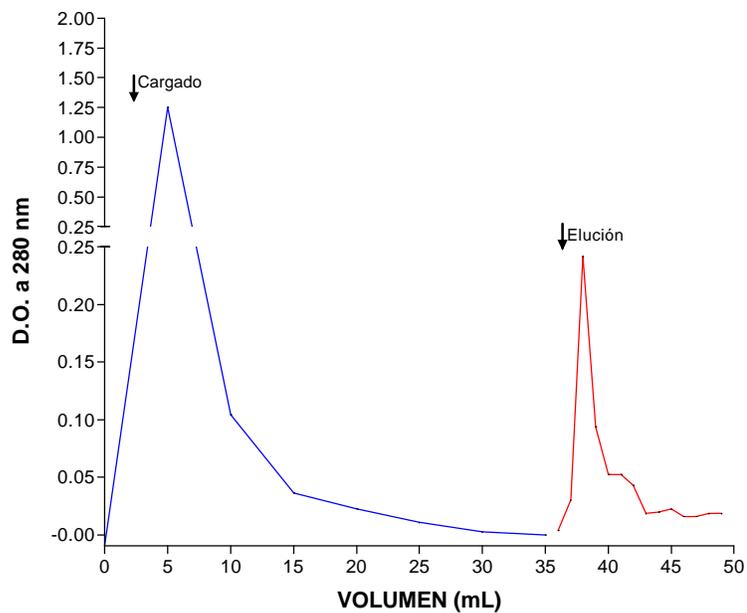


Figura 14. Purificación de G-cGH por cromatografía de afinidad en inmunoabsorbente (anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -cGH sefarosa). La fracción enriquecida de glicoproteínas (7 mg) obtenida por cromatografía en ConA se sometió a una nueva cromatografía de inmunoafinidad, equilibrando la columna con Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M pH 7.6; la fracción retenida se eluyó con glicina 0.05 M, NaCl 0.15 M pH 3.0. Lecho de la columna: 1 ml

## *Caracterización estructural de G-cGH*

### *Análisis electroforético*

Para corroborar la presencia de proteínas inmunorreactivas (reconocidas por anticuerpo policlonal contra la cGH) en cada paso de la secuencia de purificación se realizaron análisis por *western blot*. La banda mayoritaria de especies inmunorreactivas con dicho anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH en los extractos hipofisarios se ubicó en la posición de un peso molecular de 22 kDa en condiciones no reductoras –monómero-, mientras que se desplazó a 26 kDa, en condiciones reductoras (con  $\beta$ -mercaptoetanol). En el extracto –condiciones no reductoras- se observaron además varias bandas de mayor peso molecular que podrían corresponder a oligómeros de la molécula sencilla de cGH, como se ha propuesto con anterioridad (Arámburo *et al*, 2000). Esto se corroboró con la desaparición de las bandas de mayor peso molecular bajo condiciones reductoras (e incremento de intensidad en el monómero), bajo el efecto del  $\beta$ -mercaptoetanol, que rompe los posibles puentes disulfuros existentes entre dos o más moléculas de cGH; sin embargo, permaneció un probable dímero no reducible en estas condiciones. También aparecieron otras bandas de menor peso molecular, que corresponderían a fragmentos de la molécula de cGH, como el de 15 kDa (Arámburo *et al*, 2001). Se observó la banda correspondiente a la G-cGH que, analizada electroforéticamente, tuvo un peso molecular aproximado de 26 kDa en condiciones no reductoras y 29 kDa en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 15). Esta banda fue reconocida tanto por el anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH como por la ConA (en ensayos de *western blot* con la lectina conjugada a peroxidasa), así como también por una tinción para glicoproteínas de un estuche comercial (Glycoprotein detection kit, BioRad) en donde se oxidan los residuos de carbohidrato presentes en la molécula, se conjugan con biotina y posteriormente se identifican con estreptavidina-HRP. El proceso de purificación de G-cGH originó una fracción enriquecida de esta variante, que contiene aún una pequeña proporción del monómero no glicosilado, por ejemplo. Se propuso con anterioridad (Berumen, 2000), que durante el proceso de purificación se mantuvo la estabilidad de dímeros de G-cGH con el monómero no glicosilado, copurificando de esta forma con la variante glicosilada (o en su caso, la participación de glicoproteínas unidoras de cGH).

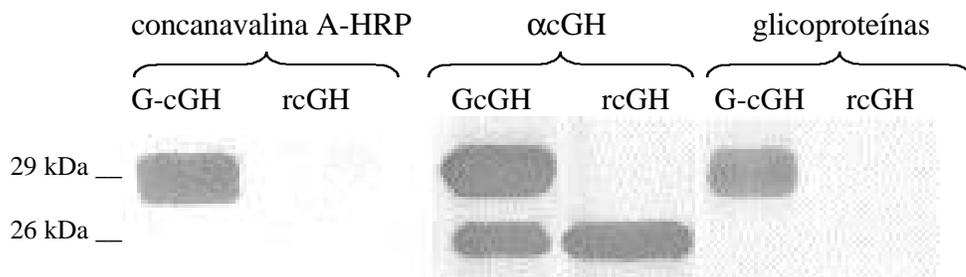


Figura 15. Análisis electroforético de la fracción enriquecida de G-cGH. Posterior a la separación por SDS-PAGE en condiciones reductoras, los *western blots* se revelaron mediante el uso de concanavalina A-HRP y DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; de anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH, anticuerpo secundario-HRP  $\alpha$ IgG de conejo; y el estuche comercial de BioRad para detección de glicoproteínas. Se utilizó GH recombinante de pollo (rcGH) como control no glicosilado.

*Secuenciación aminoterminal parcial de G-cGH.* A fin de verificar la identidad de la proteína aislada que putativamente correspondía a la G-cGH, ésta se secuenció parcialmente. La G-cGH purificada por cromatografía de afinidad con ConA-sefarosa y con el inmunoabsorbente específico  $\alpha$ cGH-sefarosa se sometió a electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras. Posteriormente se electrotransfirió a una membrana de PVDF especial para secuenciación de péptidos. Se tiñó la membrana con azul de Coomassie (preparación especial para secuenciación), para evidenciar la ubicación exacta de la banda de 29 kDa. Se recortó la porción de PVDF que contenía dicha banda (Figura 16) y se procesó para la secuenciación.

Los resultados de la secuenciación parcial después de diez ciclos de Edman, mostraron una coincidencia absoluta con los diez primeros aminoácidos reportados para la hormona de crecimiento de pollo: TFPAMPLSNL (Harvey, 1995). Se encontró además una secuencia acompañante, en mucho menor proporción, que al compararse con la base de datos de proteínas en internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)), resultó ser un fragmento de ConA (hacia el extremo carboxilo), corroborándose con dicho análisis que la columna de ConA-sefarosa dejó “escurrir” parte de la lectina unida al lecho.

*SECUENCIA DE LA cGH* (El sitio consenso para N-glicosilación se encuentra subrayado).

TFPAMPLSNL<sup>10</sup> FANAVLRAQH<sup>20</sup> LHLLAAETYK<sup>30</sup> EFERTYIPED<sup>40</sup> QRYTNKNSQA<sup>50</sup>  
 AFCYSETIPA<sup>60</sup> PTGKDDAQQK<sup>70</sup> SDMELLRFSL<sup>80</sup> VLIQSWLTPV<sup>90</sup> QYLSKVFTNN<sup>100</sup>  
 LVFGTSDRVF<sup>110</sup> EKLKDLLEGI<sup>120</sup> QALMRELEDR<sup>130</sup> SPRGPQLLRP<sup>140</sup> TYDKFDIHLR<sup>150</sup>  
 NEDALLKNYG<sup>160</sup> LLS<sup>170</sup>CFKKDLH<sup>170</sup> KVETYLKVMK<sup>180</sup> CRRFGESNCT<sup>190</sup> I

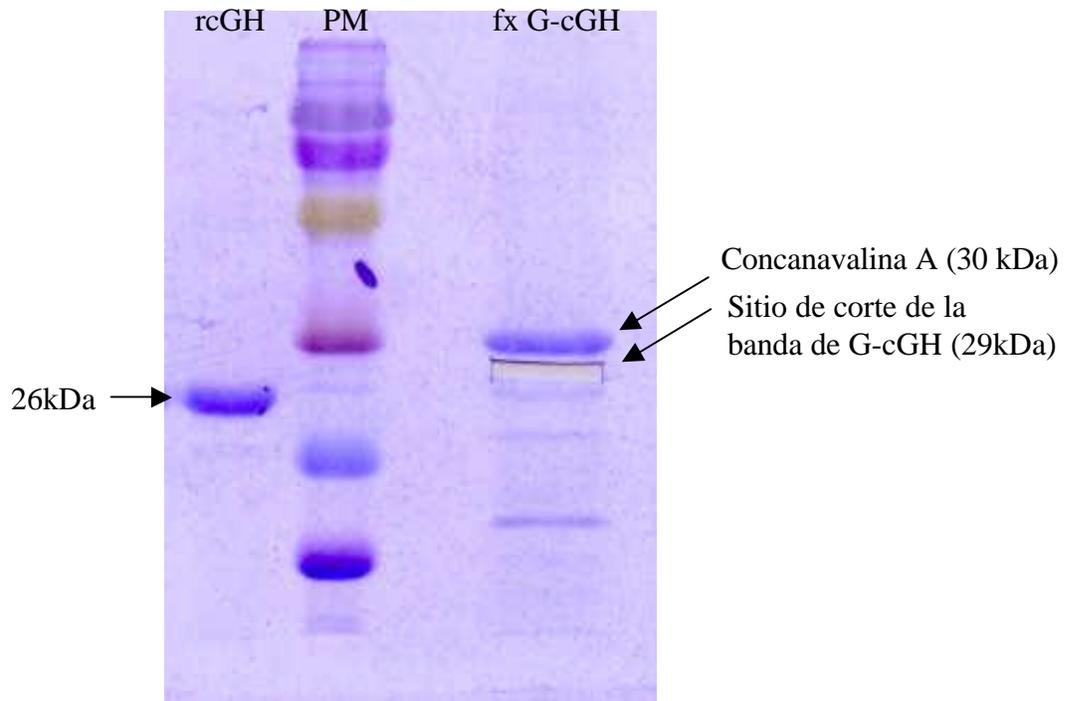


Figura 16. Aislamiento de la banda de G-cGH por SDS-PAGE ( R) y *western blot*. Después de la transferencia, la membrana de PVDF seq se tiñó con azul de Coomassie especial para secuenciación y una vez identificada la banda de 29 kDa se recortó para procesarla en el secuenciador Procise 491. Hormona de crecimiento de pollo recombinante (rcGH), Marcadores de peso molecular (PM), fracción enriquecida con G-cGH (fx G-cGH)

### *Determinación de la estructura de oligosacáridos*

Para contribuir a la caracterización estructural de la G-cGH, se estudió la naturaleza del oligosacárido presente. La variante G-cGH se analizó mediante digestión con glicosidasas específicas. La G-cGH fue susceptible a la digestión con péptido N-glicosidasa F (PNGasaF), que es específica para el corte de N-oligosacáridos (Figura 17), rompiendo el enlace amida entre la asparagina y la N-acetilglucosamina presentes en la molécula, pero no se obtuvieron evidencias de corte por O-glicosidasa (específica para O-oligosacáridos, datos no mostrados). El análisis de la incubación de G-cGH con la enzima péptido N-glicosidasa F (PNGasaF) se llevó a cabo electroforéticamente y por *western blot*. En la membrana revelada con anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH se observó la desaparición de la banda de 29 kDa después del tratamiento de G-cGH con PNGasaF, además del incremento en intensidad de la banda de 26 kDa. Por su parte, se observa que la banda de 29 kDa en la membrana revelada mediante el uso de un estuche comercial (BioRad) para detección de glicoproteínas, correspondiente a la fracción glicosilada de cGH, desaparece después de la digestión con PNGasa F. Con carboxipeptidasa Y no se obtuvieron evidencias de corte, probablemente por impedimento estérico del mismo carbohidrato, y/o por la presencia del puente disulfuro 182-189.

Para estudiar la estructura del N-oligosacárido unido a esta variante, se analizó la G-cGH purificada utilizando las siguientes lectinas (con especificidades diferentes) conjugadas a peroxidasa, en membranas de *western blot*: ConA o lectina de *Canavalia ensiformis*, que es específica para residuos de  $\alpha$ -manosa y  $\alpha$ -glucosa; la lectina de germen de *Triticum vulgare* –WGA (Wheat Germ Agglutinin)- que reconoce específicamente a (N-acetilglucosamina)<sub>2</sub> y a N-acetilneuramínico; la isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* BS-I-B4 que reconoce  $\alpha$ -galactosa; la lectina de *Maclura pomifera* –MAC- que se une a  $\alpha$ -galactosa y  $\alpha$ -N-acetilgalactosamina; y la lectina de *Ricinus comunis* (toxina RCA 60) que reconoce N-acetilgalactosamina y  $\beta$ -galactosa.

Las muestras conteniendo G-cGH se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, como se describió. Después de transferir, las membranas se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) 3% (en los tratamientos con lectina se evitó el uso de leche como bloqueador, debido a su contenido glicoproteico). Se incubaron las membranas con las lectinas y se revelaron por quimioluminiscencia. Se observó una marca positiva en una banda de 29 kDa con ConA y con WGA, pero no se observó ningún marcaje con BSI-B4, MAC ni RCA60.

Para obtener una imagen más clara de la tinción con lectinas se preparó una membrana con 2.5 microgramos de G-cGH (considerando exclusivamente la banda de 29 kDa) la cual fue teñida con todas las lectinas (Figura 18), en orden secuencial después de tratar a la membrana exhaustivamente con amortiguador de lavado (*Stripping buffer*: Tris-HCl 62.5 mM, SDS 2% y 2-mercaptoetanol 100 mM, pH 6.9, a 50°C por una hora) para eliminar a la lectina usada previamente. Después de cada lavado se trató a la membrana como si acabara de transferirse, lavando con TBS y bloqueando con BSA en cada ocasión.

En los tratamientos con BS-IB4, MAC y RCA60 se observó un índice de densidad óptica menor que el fondo *-background-* para la banda de 29 kDa, lo que sugiere la presencia de la glicoproteína pero una menor unión a dichas lectinas. Los resultados permiten sugerir que el oligosacárido, reconocido por ConA y WGA es un N-oligosacárido con (N-acetilglucosamina)<sub>2</sub> y manosas, y probablemente ácido N-acetil neuramínico, pero sin N-acetilgalactosamina ni galactosas, o en su caso no accesibles para la identificación con lectinas. Este tipo de oligosacárido correspondería al de tipo híbrido, biantenarico.

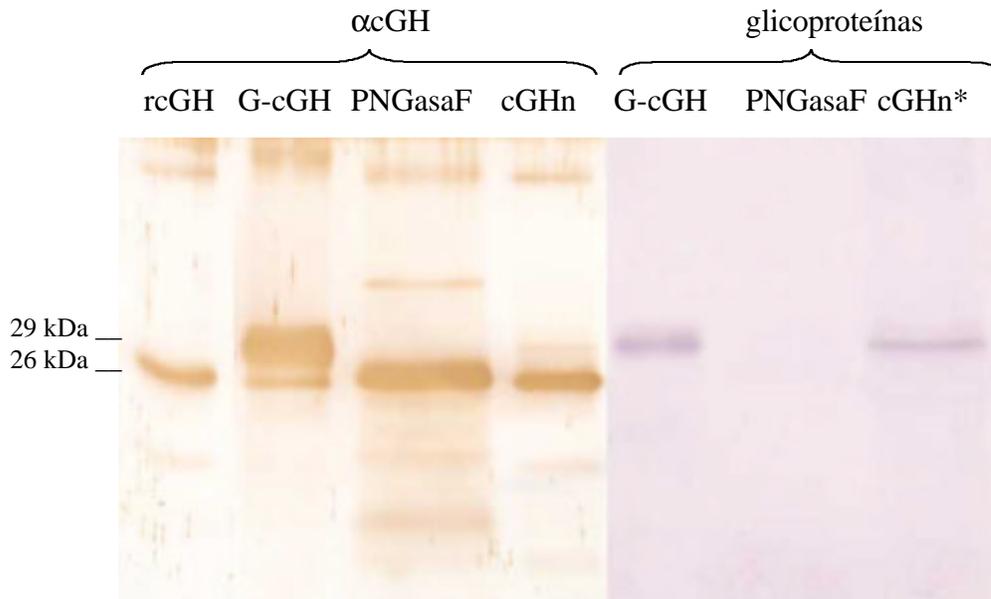


Figura 17. Digestión por PNGasaF. La G-cGH incubada con la enzima péptido N-glicosidasa F (PNGasaF) se analizó por *western blot* en una membrana de nitrocelulosa revelada mediante anticuerpo policlonal  $\alpha$ GH, anticuerpo secundario-HRP  $\alpha$ IgG de conejo y DAB; y mediante el uso del estuche comercial de BioRad para detección de glicoproteínas. Se utilizó G-cGH sin enzima como control negativo de la digestión, GH recombinante de pollo (rcGH) como control no glicosilado y GH de pollo nativa (cGHn, obtenida mediante purificación de extractos hipofisarios de pollo por inmunoafinidad con una columna de anticuerpo monoclonal-sefarosa) como control con menor proporción de la banda de 29 kDa. \* Para el análisis de glicoproteína se colocó diez veces más cantidad de cGHn, que para el revelado con anticuerpo policlonal.

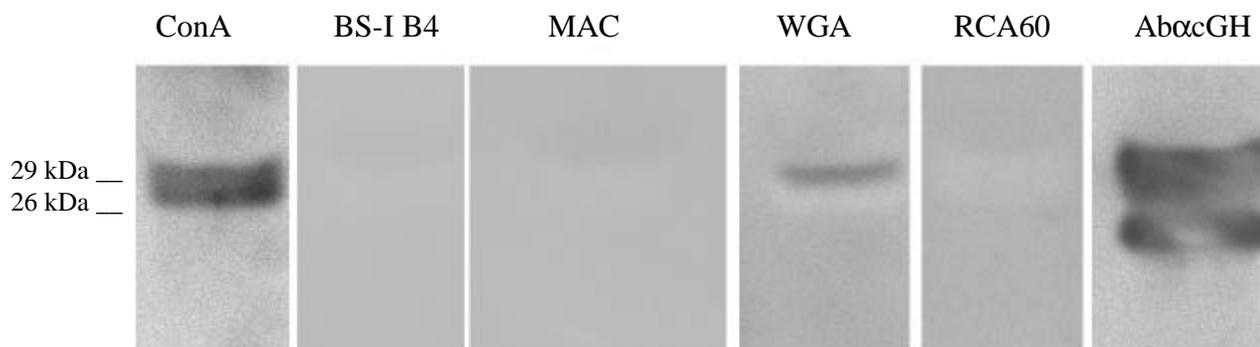


Figura 18. Caracterización de los tipos de residuo de oligosacárido presentes en la G-cGH mediante el uso de lectinas con diferentes especificidades. La fracción enriquecida de G-cGH se analizó por su afinidad con lectinas (concanavalina A: ConA; *Bandeiraea simplicifolia* Isolectina-B4: BS-IB4; *Maclura pomifera*: MAC; *Triticum vulgare*: WGA) y anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH CAP1. Se observa un *luminograma* teñido (quimioluminiscencia) con lectinas conjugadas con peroxidasa (20-60 $\mu$ g/10ml) y anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH+anticuerpo de cabra contra conejo conjugado con peroxidasa (Ab $\alpha$ cGH 1:10,000). Sólo se observa marca por el anticuerpo y las lectinas ConA y WGA. La banda de 29 kDa corresponde a la GcGH (condiciones reductoras) y la de 26 kDa al monómero de GH no glicosilado.

*Localización específica de la G-cGH en diferentes poblaciones de somatotropos o compartimentos subcelulares.* Con el fin de caracterizar la localización celular y subcelular de la G-cGH se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica a nivel de microscopía de luz y de inmunohistoquímica con microscopía electrónica.

#### *Inmunohistoquímica.*

Se montó el ensayo de inmunohistoquímica para microscopía de luz, usando un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -cGH y un anticuerpo secundario  $\alpha$ -IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano. Se realizaron tinciones con preparaciones de hipófisis ya cortadas donadas por el Dr. Luc Berghman y por preparaciones realizadas en el INB. Se probaron diferentes fijadores (paraformaldehído 4%, Bouin y Bouin Hollande Sublimado-BHS) y se determinó que el fijador más adecuado era BHS. Se trabajaron cortes de 4  $\mu$ m de grosor. En la figura 19 se muestran las células inmunorreactivas a cGH (somatotropos), cuando se utilizó un anticuerpo policlonal específicamente dirigido contra cGH nativa purificada (CAP1, utilizado también para el análisis densitométrico de *western blot*). La mayor parte de estas células se localizaron en el lóbulo caudal, agrupadas en cordones y ramilletes. Por otra parte en el lóbulo cefálico no se observaron estos grupos celulares, aunque eventualmente se encontraron algunas pocas células aisladas teñidas con gran intensidad. El inmunomarcaje se eliminó de los somatotropos mediante la preadsorción del anticuerpo con rcGH en exceso (1.5 mg/ml), mientras que los controles negativos sin marcaje alguno se lograron obtener omitiendo la incubación con el primer anticuerpo específico  $\alpha$ -cGH.

#### *Inmunocitoquímica.*

Se realizó un análisis ultraestructural por microscopía electrónica a fin de localizar los compartimentos de almacenamiento de la G-cGH en las células somatotropas. Se observaron células inmunorreactivas con gránulos electrodensos esféricos y ovoides (Figura 20), que reunían gran parte de la marca de inmuno-oro (partículas electrodensas de 10 nm de diámetro). Además se observó inmunoreactividad semejante a cGH fuera de los gránulos de secreción, particularmente en retículo endoplásmico.

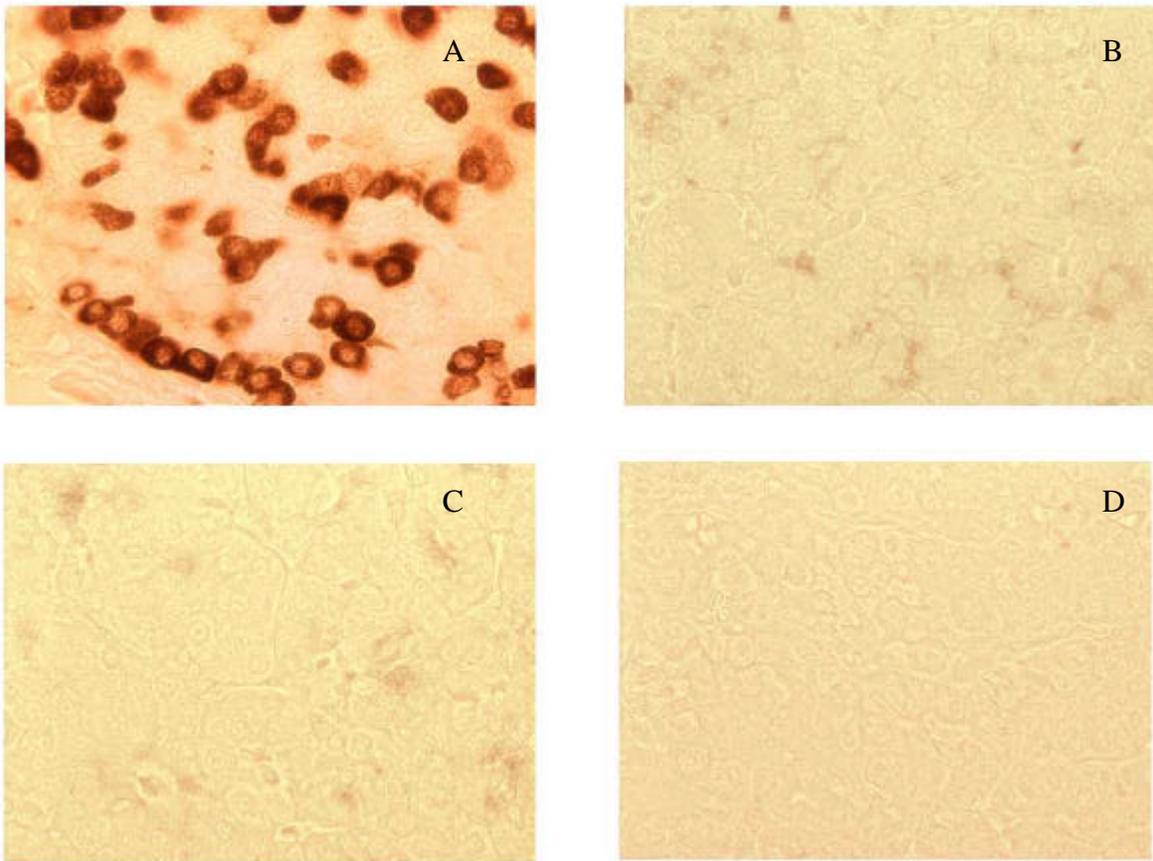


Figura 19. Microfotografía que muestra la tinción de una sección de hipófisis de pollo con anticuerpo policlonal  $\alpha$ -cGH. En el recuadro A se observan los somatotropos agrupados en cordones (lóbulo cefálico), con inmunorreactividad revelada por DAB, con apariencia de dona (el núcleo se observa sin marca). El recuadro B representa una zona del lóbulo cefálico sin células marcadas. Los recuadros C y D representan controles negativos, con anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH preabsorbido con hormona de crecimiento recombinante (1.5 mg/ml) y sin anticuerpo policlonal, respectivamente. (Luna et al, 2004)

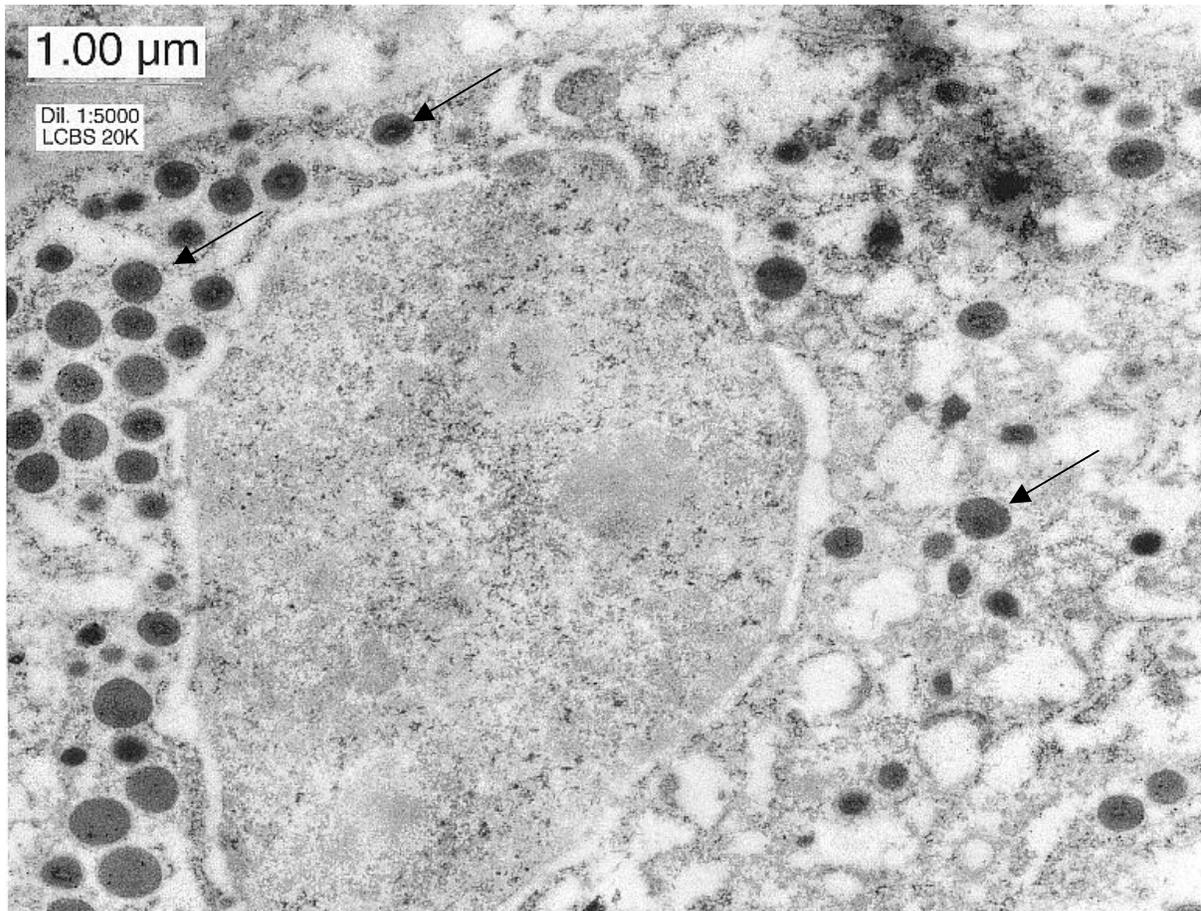


Figura 20. Microfotografía que muestra una célula inmunorreactiva al anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH 1:5000 (somatotropo). Se observan los gránulos marcados con partículas de oro de 10 nm (flechas). Amplificación 20,000X

La presencia de G-cGH en los somatotropos se determinó mediante la colocalización de inmunorreactividad específica con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH CAP1 (asociado a partículas de oro de 10 nm) y por la reactividad a ConA conjugada a partículas de oro de 25 nm. Se montó el ensayo de doble marcaje ( $\alpha$ cGH y ConA) en cortes hipofisarios de pollos de 1 día post-eclosión. Se observó la marca del anticuerpo en los gránulos de secreción y fuera de ellos, como se había observado en los experimentos por separado; por su parte, la marca de ConA también se observó tanto en los gránulos de secreción como fuera de ellos, incluyendo retículo endoplásmico. Todos los gránulos de secreción en estas células estaban marcados con el anticuerpo, pero no todos ellos tuvieron marca con ConA. Con una dilución del anticuerpo CAP1 1:5000 y ConA-25nm 1:40 se obtuvo una marca de  $20 \pm 2$  (promedio  $\pm$  error estándar) partículas de oro de 10 nm por gránulo de secreción, y una o dos partículas de 25 nm en los gránulos con marca. Uno de cada doce gránulos de secreción se marcaron con ambos tipos de partícula de oro. En las figuras 21 y 22 se observan imágenes de cortes contrastados y marcados tanto por anticuerpo como por ConA (doble marcaje).

### *Bioactividad*

#### *Ensayo de proliferación de células de linfoma Nb2*

Se probó la bioactividad de la fracción enriquecida de G-cGH en el ensayo de proliferación de células Nb2, utilizado ampliamente para la identificación y cuantificación de hormonas lactogénicas, por ejemplo la prolactina. En la figura 23 se graficó la actividad de prolactina de rata (0.001 nM), G-cGH (0.1-200 nM), rcGH (0.1-200 nM) y ConA (0.00167-167). El efecto de prolactina (0.001nM) se tomó como control positivo -100% de actividad. Se observó un efecto de la G-cGH dependiente de la concentración, que alcanzó hasta el 40% de actividad en relación a la prolactina, mientras que la cGH recombinante prácticamente no tuvo efecto. Dado que la muestra utilizada para el ensayo se encontraba contaminada con ConA (conforme a los análisis de secuenciación), se probaron como control diferentes dosis de ConA pura sobre la proliferación de células Nb2. Se observó que la ConA tuvo un efecto ligeramente estimulador a dosis bajas que se fue inhibiendo a medida que se incrementó su concentración.

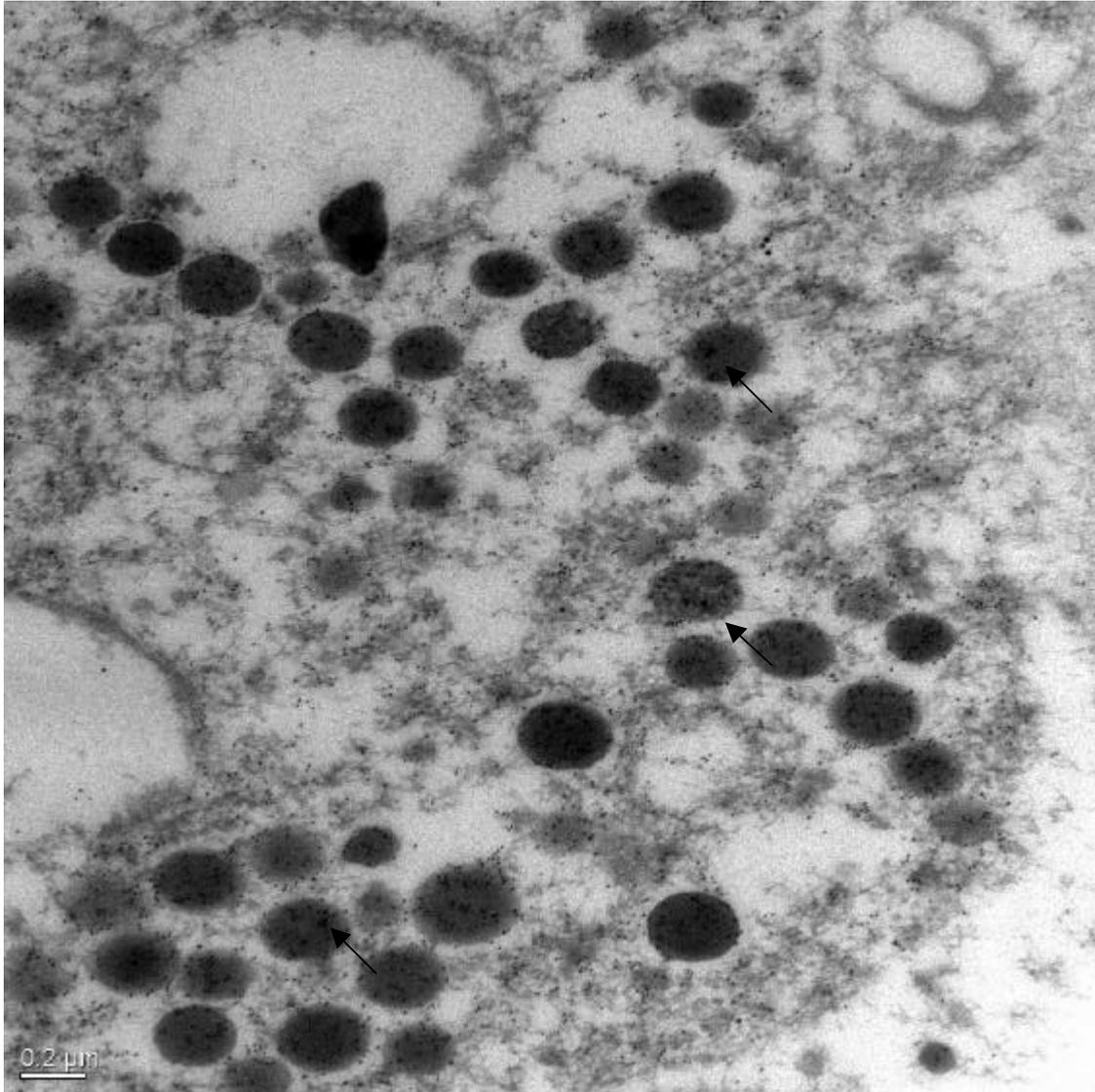


Figura 21. Microfotografía electrónica (A) en donde se observa la doble marca (flecha) con partículas de oro de 10 nm para el anticuerpo contra cGH y partículas de 25 nm para la concanavalina A. Amplificación 40,000X

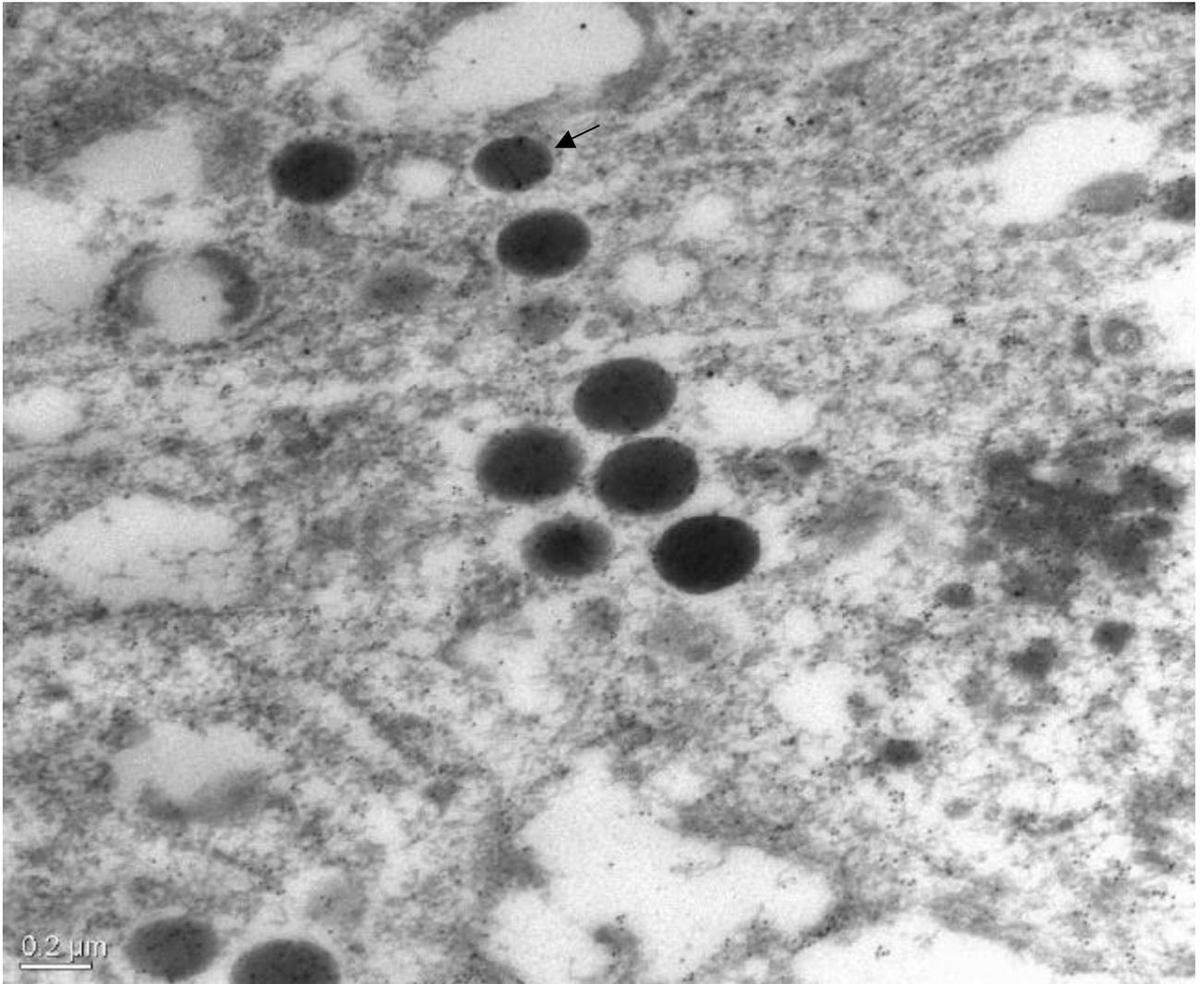


Figura 22. Microfotografía electrónica (B) que muestra la doble marca (flecha) con partículas de oro de 10 nm para el anticuerpo contra cGH y partículas de 25 nm para la concanavalina A. Amplificación 40,000X

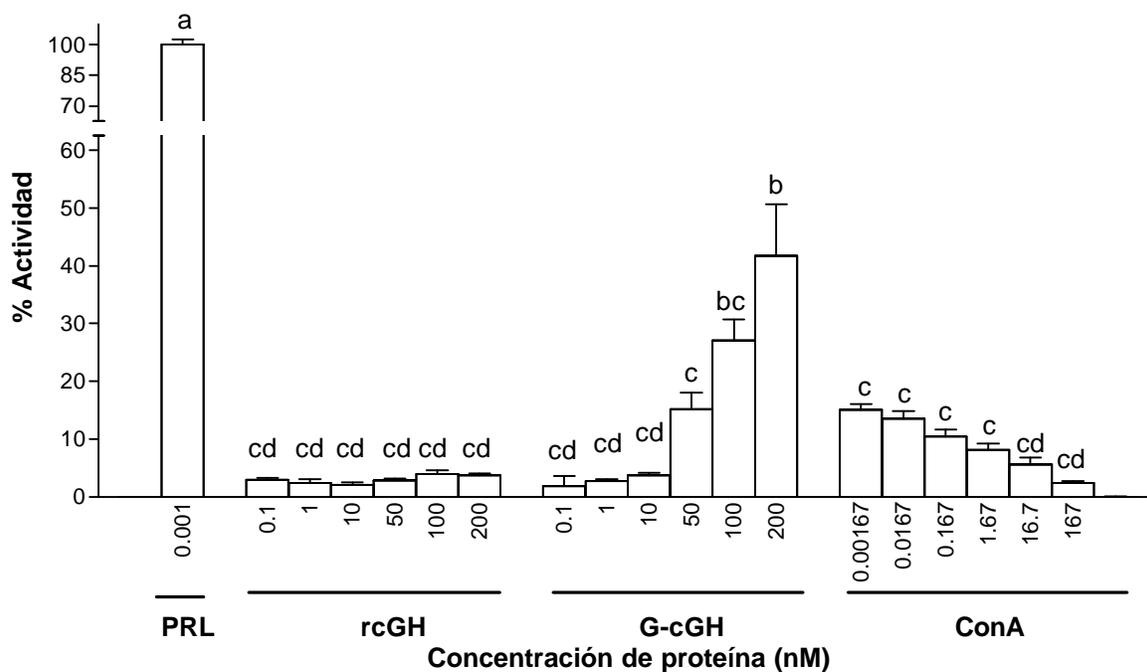


Figura 23. Análisis de bioactividad de G-cGH sobre la proliferación de células Nb2. Cultivos de células Nb2 se incubaron con diferentes proteínas: prolactina de rata (PRL, 0.001nM) como control positivo; hormona de crecimiento de pollo recombinante (rcGH, 0.1-200nM); variante glicosilada de cGH (G-cGH, 0.1-200nM); concanavalina A (ConA, 0.0167-167nM). Se midió el efecto sobre proliferación después de 72 horas de incubación mediante el estuche comercial “Cell proliferation kit I” (Roche). Promedio  $\pm$  DE, n=3. Letras diferentes muestran una diferencia significativa.

### Ensayo de radiorreceptor

Los ensayos de radiorreceptor se realizaron en membranas de hígado de pollo por competencia con  $^{125}\text{I}$ -GH. La actividad de la G-cGH se analizó por triplicado mediante curvas de desplazamiento en concentraciones de 1.56 – 100 ng/ml. Mediante el ajuste de la curva de desplazamiento se obtuvo una constante de disociación (Kd) de 0.07nM y una capacidad (Bmax) de 4.77 fmol/mg de proteína membranal, mientras que la rcGH tuvo una Kd de 0.015 nM y una Bmax de 3.5 fmol/mg (Figura 24).

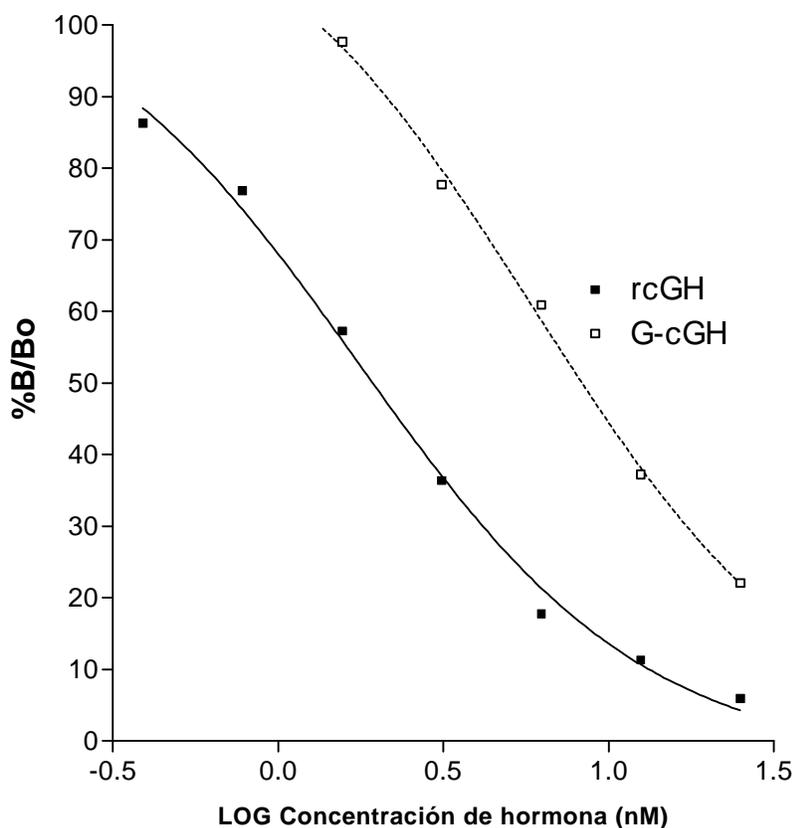


Figura 24. Análisis de unión de G-cGH a receptores hepáticos por desplazamiento de  $^{125}\text{I}$ -GH. La G-cGH se analizó por triplicado mediante curvas de desplazamiento en concentraciones de 1.56 – 100 ng/ml.

*Determinación de los niveles de cGH en hipófisis y en suero durante el desarrollo del pollo.* Se determinó la cantidad de cGH total por ensayo inmunoenzimático (ELISA) en extractos hipofisarios de pollos de diferentes edades: embriones de 10, 13, 15 y 18 días; 1 día post eclosión, y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 20, 25 semanas. Por otra parte, la cuantificación de G-cGH se realizó mediante análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas presentes en los luminogramas obtenidos después de electroforesis e inmunotransferencia de los extractos hipofisarios de pollos de diferentes edades.

Se utilizaron al menos tres pollos para cada grupo de edad, en dos series (bloques ontogénicos) independientes. En uno de los bloques ontogénicos, los pollos se consiguieron en la misma temporada, para mantener el mayor control durante el sacrificio, en cuestiones de tiempo y clima. Los pollos de menos de 9 semanas se consiguieron un día antes del sacrificio (o una semana antes) dejando al menos un día de adaptación para descanso del viaje. Los pollos de mayor edad se criaron en las instalaciones del Instituto de Neurobiología (9, 15, 20 y 25 semanas). Todos los pollos se sacrificaron aproximadamente a las 10:00 de la mañana.

Se montaron los ensayos inmunoenzimáticos para la cuantificación de cGH. En la figura 25 se observa la gráfica correspondiente a la curva patrón del ELISA utilizando concentraciones crecientes de hormona de crecimiento de pollo recombinante (rcGH) y el anticuerpo policlonal CAP1  $\alpha$ -cGH. Los coeficientes de variación inter- e intraensayo fueron menores al 5% lo que refleja su reproducibilidad. Este ensayo tiene una sensibilidad de 2 ng/pozo (20 ng/ml) (Martínez-Coria et al, 2002).

En la figura 26 se observa que la concentración de GH en tejido glandular alcanzó un nivel máximo (235 ng/ $\mu$ g de proteína  $\pm$  33) en la segunda semana de edad y luego disminuyó paulatinamente hasta alcanzar un mínimo a las 24-25 semanas de edad (10 ng/ $\mu$ g de proteína  $\pm$  3). Considerando que el tamaño y peso de la hipófisis incrementa conforme a la edad del pollo (Figura 27), se calculó el contenido total de cGH en la glándula y se observó que el máximo corresponde a una edad de 8-9 semanas (Figura 28).

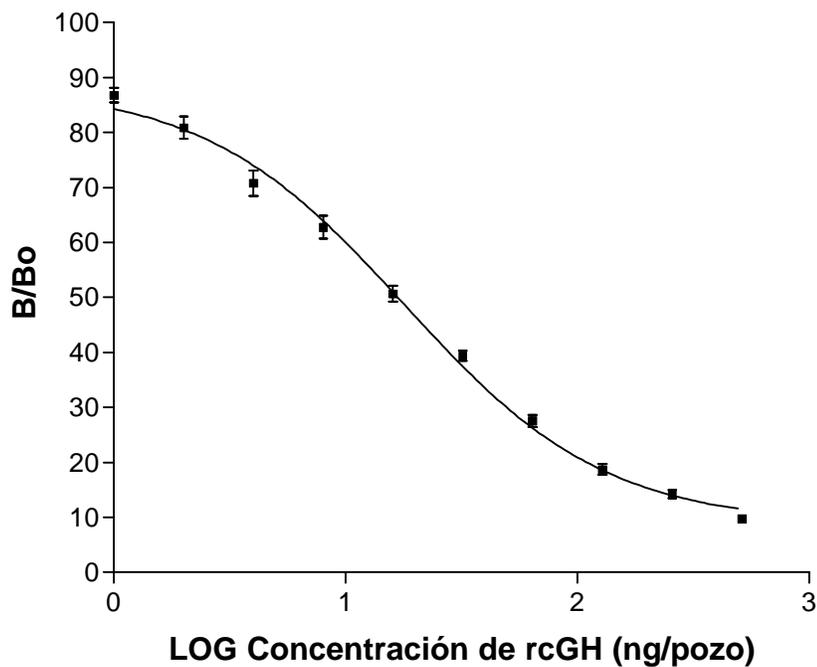


Figura 25. Curva patrón para el ensayo de ELISA específico y homólogo para rcGH. Forro de las placas con 12 ng rcGH, anticuerpo policlonal CAP1 1:100,000, segundo anticuerpo-peroxidasa 1:3,000, revelado con ABTS. Promedio  $\pm$  DE, n=12

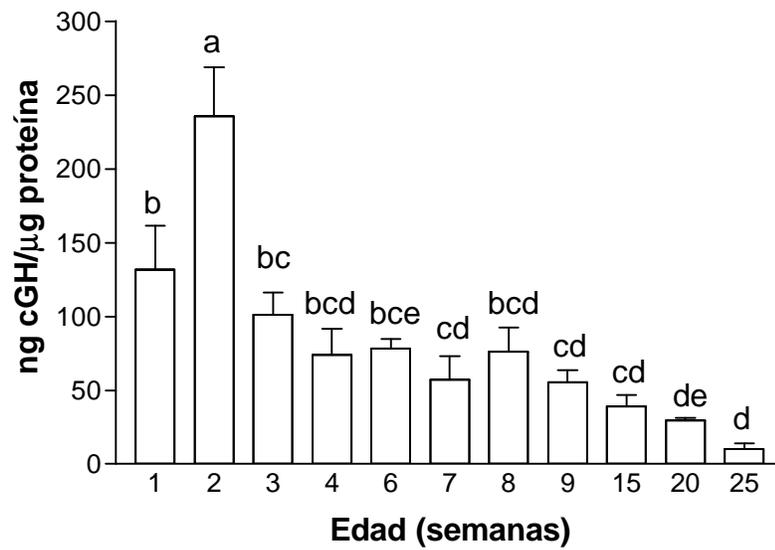


Figura 26. Cuantificación de la concentración de GH en tejido hipofisiario (ng GH / μg de proteína) en pollos de diferentes semanas de edad, mediante ELISA. Promedio ± DE, n=3, letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa  $p < 0.05$ .

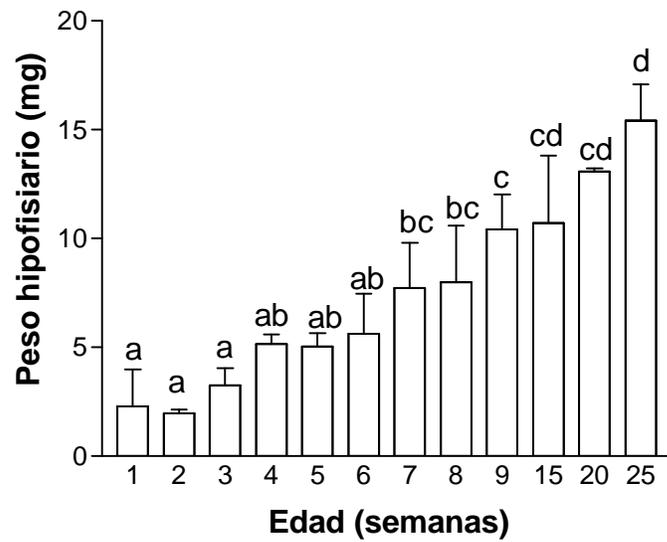


Figura 27. Peso de las hipófisis de pollos durante el desarrollo (miligramos). Promedio  $\pm$  DE, n=3, letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa  $p < 0.05$ .

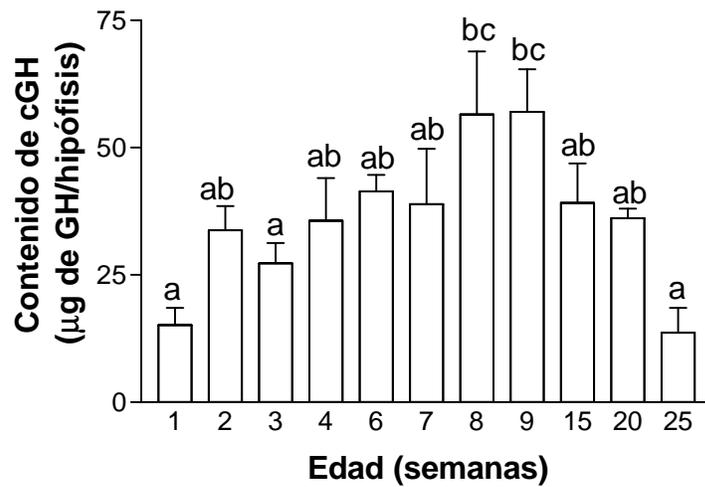


Figura 28. Contenido total de cGH por hipófisis durante el desarrollo del pollo, determinado por ELISA. Promedio  $\pm$  DE, n=3, letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa  $p < 0.05$ .

### *Determinación de los niveles de G-cGH en hipófisis durante el desarrollo.*

El análisis ontogénico realizado por densitometría de las membranas de *western blot*, después de la separación electroforética de los extractos hipofisarios bajo condiciones reductoras (Figura 29) mostró un patrón de bandas inmunorreactivas con diferente peso molecular, similares a las reportadas previamente (Arámburo *et al.*, 2000), y correspondientes a 13, 15, 20, 26 (para el monómero no glicosilado), 29 (para la G-cGH), 30, 35, 40, 44, 48, 60 y 72 kDa. En el embrión, la mayoría de la bandas inmunorreactivas bajo condiciones reductoras tuvieron pesos moleculares mayores a 40 kDa (probablemente oligómeros) o menores de 26 kDa, que podrían corresponder a fragmentos de la hormona. El monómero no glicosilado apareció claramente (bajo estas condiciones) hasta el día 15 embrionario. El patrón observado para los pollos una vez que han eclosionado varió durante el desarrollo; sin embargo, se mantuvo el monómero de 26 kDa como la banda inmunorreactiva mayoritaria.

Se calculó la proporción relativa de cada banda (porcentaje) con respecto al total de inmunoreactividad identificado en cada carril (Figura 30). El nivel más bajo detectable de G-cGH ( $0.63\% \pm 0.13$ ) se obtuvo en el día embrionario 13, mientras que los niveles más altos ( $17.03 \pm 1.06$  y  $17.31 \pm 1.17$ ) se observaron durante las 15 y 25 semanas de edad, respectivamente.

Se calculó la relación de la G-cGH con respecto al monómero no glicosilado y se observó que a partir de la eclosión aumenta con el desarrollo del pollo, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.8114, hasta un máximo de 0.52 para las 25 semanas. En el caso de los embriones, esta proporción resultó ser elevada debido a la baja concentración del monómero no glicosilado (26 kDa) en estas edades, y se observó la disminución de esta relación conforme hubo más de esta variante (Figura 31).

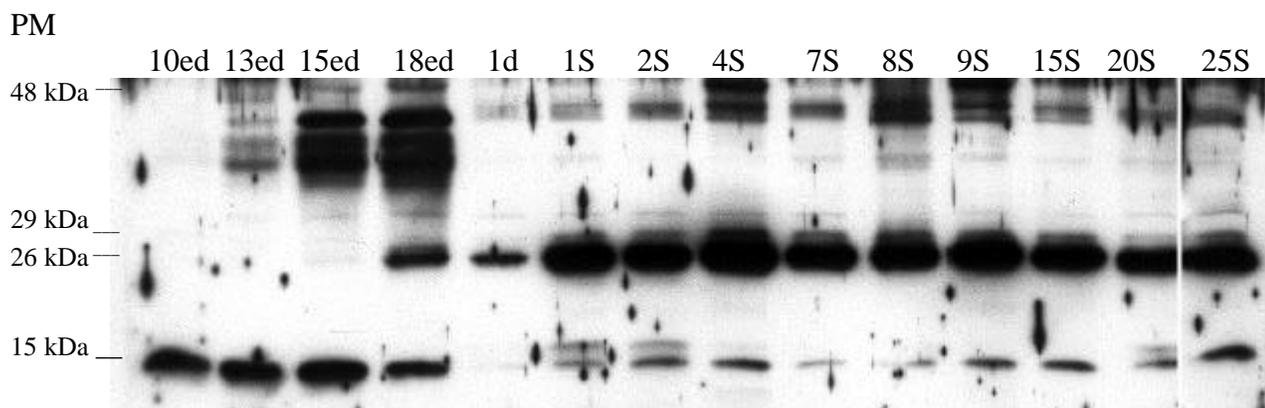


Figura 29. Luminograma que muestra el *western blot* de extractos hipofisarios de pollos de diferentes edades. 10, 13, 15, 18 días embrionarios (ed), 1 día post eclosión (1d), 1, 2, 4, 7, 8, 9, 15, 20, 25 semanas (S). Los extractos se separaron por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y las membranas se tiñeron con anticuerpo policlonal CAP1, GAR-HRP y sustrato para quimioluminiscencia. Para las edades embrionarias se colocaron 2 microgramos de proteína total mientras que para el resto se utilizaron 500 nanogramos de proteína total en cada carril.

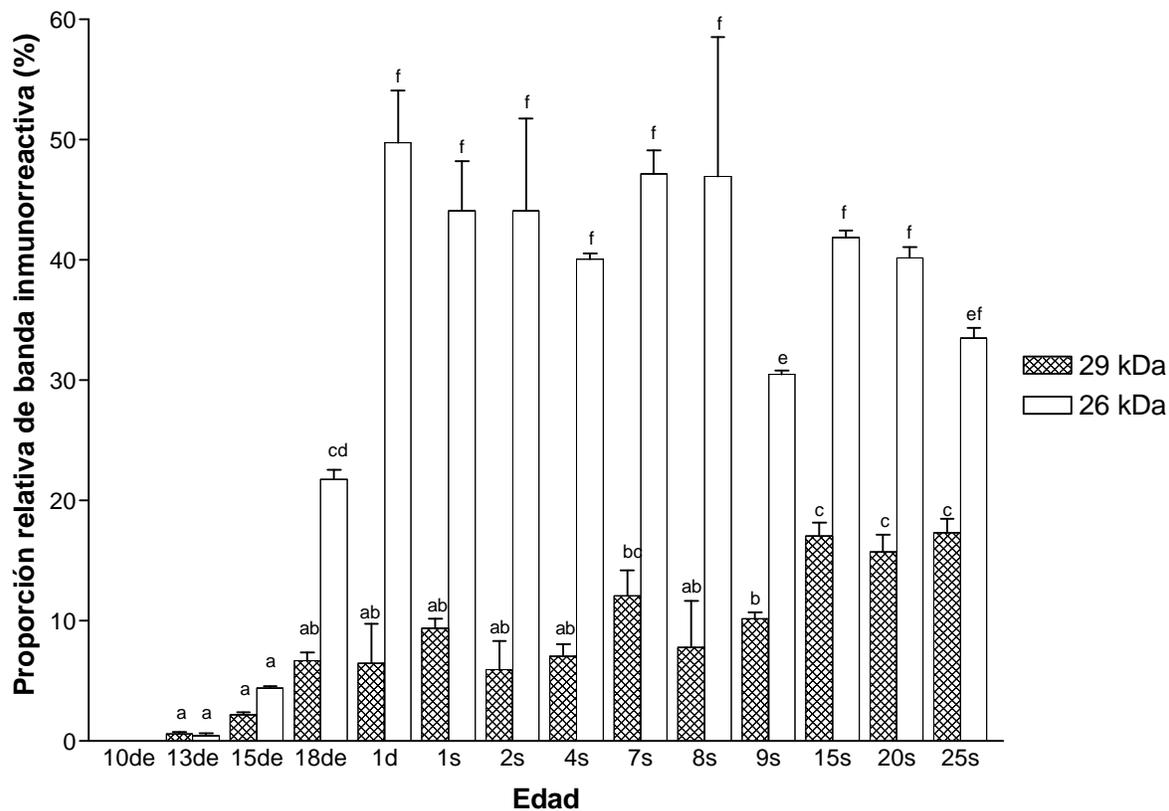


Figura 30. Proporción relativa de las bandas de 29 kDa y de 26 kDa con respecto al total de bandas inmunorreactivas por carril (cGH total); los datos se obtuvieron por análisis densitométrico de *western blots* de extractos hipofisarios de diferentes edades: 10, 13, 15, 18 días embrionarios (de), 1 día post eclosión (1d), y 1, 2, 4, 7, 8, 9, 15, 20, 25 semanas (s). Promedio  $\pm$  DE, n=3, letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa,  $p < 0.05$ .

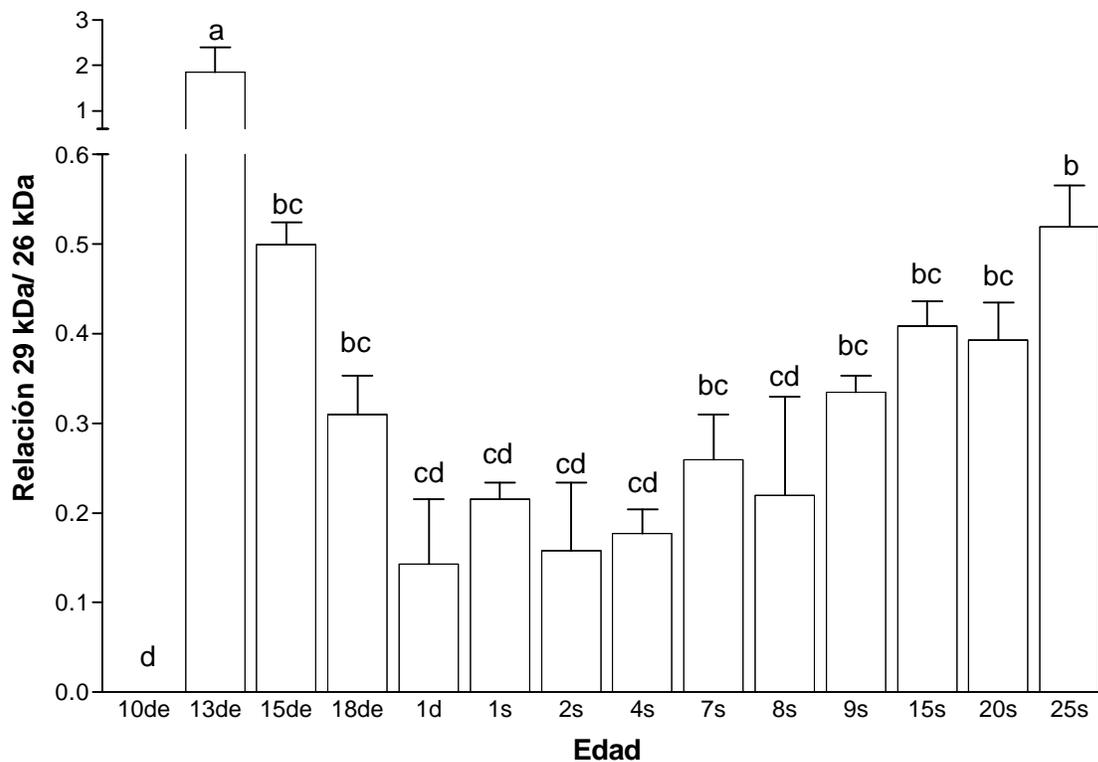


Figura 31. Relación de la proporción hipofisiaria de G-cGH 29 kDa / cGH 26 kDa durante el desarrollo del pollo, obtenida por análisis densitométrico de *western blot* de extractos hipofisiarios de diferentes edades: 10, 13, 15, 18 días embrionarios (de), 1 día post eclosión (1d), 1, 2, 4, 7, 8, 9, 15, 20, 25 semanas (s). Promedio  $\pm$  DE, n=3, letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa  $p < 0.05$ .

### *Determinación directa específica de G-cGH*

Se diseñó un ensayo enzimático para tratar de cuantificar los niveles de G-cGH en la hipófisis de pollo (modificado de Sinha y Lewis, 1986). Para ello, se utilizó ConA como proteína de captura para forrar las placas multipozos (ver Anexo XI), y posteriormente se bloquearon los sitios libres con albúmina sérica bovina (BSA). La detección de la G-cGH (cGH) se realizó con un anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH (CAP1) y segundo anticuerpo  $\alpha$ IgG de conejo conjugado con peroxidasa (ELISA de “sandwich”, indirecto). Para el ensayo de captura con ConA se graficaron los resultados (Figura 32) con base en diluciones del extracto hipofisiario (a partir de 320 ng de proteína por pozo, diluciones seriadas 1:2), ajustando la curva a una sigmoide de concentración-respuesta. Se trabajó con forros de ConA a partir de 156.25 ng y a partir de 15.625 ng en diferentes ensayos hasta varios microgramos por pozo.

El análisis de la captura de especies inmunorreactivas con el forrado de las placas de ELISA, utilizando pozos sin forro (sin ConA), en donde aún se obtuvo una lectura dependiente de la concentración, nos indicó que la proteína de bloqueo utilizada (albúmina sérica bovina) participó también como proteína de unión, interfiriendo con la especificidad del ensayo. Al analizarse la unión del extracto en pozos bloqueados con leche descremada se observó una marca mucho menor. Sin embargo fue difícil encontrar la manera de bloquear los sitios libres en la placa multipozos, sin bloquear a su vez el pegado con la lectina. En la figura 33 se observa una gráfica con las lecturas (densidad óptica) del pegado de extracto hipofisiario posterior al bloqueo de las placas multipozo con concentraciones crecientes de ConA (o sin ella); se probaron diferentes concentraciones de primer anticuerpo CAP1, y segundo anticuerpo-HRP 1:3,000. También se ensayó el uso de EDTA en los amortiguadores de bloqueo con leche.

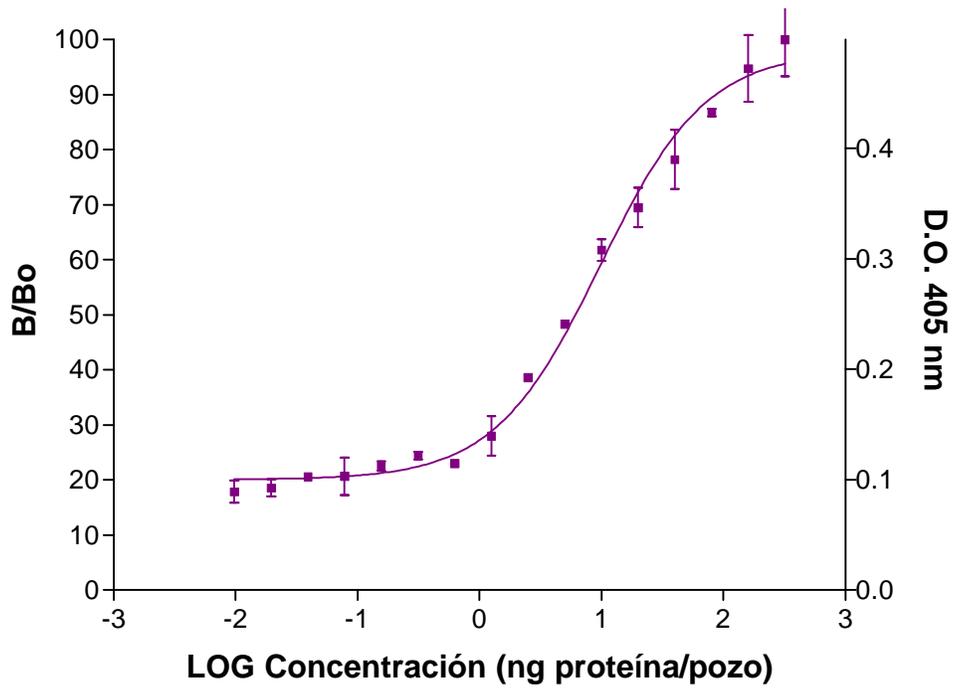


Figura 32. Curva patrón del ensayo de ELISA de captura con concanavalina A, para determinación de G-cGH, en extracto de hipófisis de pollo. Promedio  $\pm$  DE, n=12

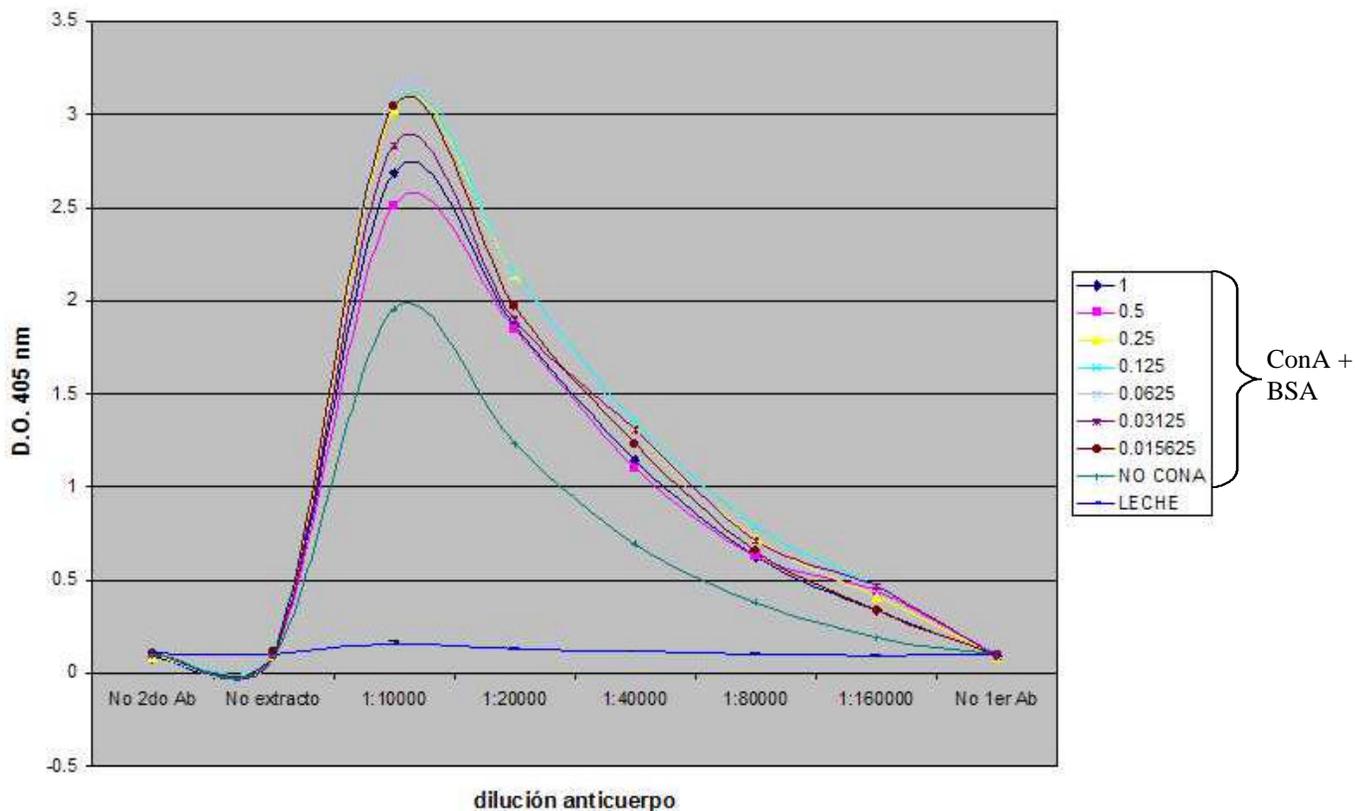


Figura 33. Efecto del bloqueo con BSA y con leche descremada BioRad en el ensayo de captura con concanavalina A. Las placas multipozo se forraron con concanavalina A (0.015-1 microgramo de ConA o sin forro) y posteriormente se añadió el agente bloqueante (BSA 3% o leche 3%) y extracto hipofisiario (50µg proteína/100µl). Para identificar la cGH unida se utilizaron diferentes diluciones de anticuerpo policlonal (1:10,000-1:60,000). Después de la incubación específica  $\alpha$ cGH se añadió el anticuerpo secundario –conjugado a peroxidasa- 1:3,000. y se reveló con ABTS.

Debido a los resultados anteriores, se optó por intentar producir un anticuerpo específico contra GcGH, que permitiera desarrollar un ensayo específico para cuantificar a esta variante hormonal.

*Fusión para la obtención de hibridomas productores de anticuerpo monoclonal específico contra GcGH.*

Con objeto de producir un anticuerpo específico contra G-cGH que permitiera desarrollar un ensayo específico para cuantificar esta variante, se llevaron a cabo cultivos de hibridomas, en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano del Instituto de Biotecnología, UNAM. Se inmunizaron dos ratones Balb-C vía intraperitoneal con la fracción enriquecida de G-cGH (4 refuerzos) y con la fracción de glicoproteínas obtenida por cromatografía de afinidad en ConA-sefarosa (7 refuerzos). Se realizaron dos últimos refuerzos vía intravenosa con G-cGH. El período de inmunización duró siete meses. El bazo de los ratones se disgregó para la obtención de linfocitos. Se obtuvieron aproximadamente  $1.04 \times 10^8$  y  $1.095 \times 10^8$  células para cada bazo, respectivamente. Se realizó la fusión de las células del tejido disgregado de cada bazo de los ratones inmunizados, con células de mieloma Sp2 (Sp2/O-Ag14) en razón de 4:1, para la obtención de los hibridomas. Los productos de la fusión se sembraron por goteo en placas de 96 pozos (5 placas por cada fusión). Después de 48 horas se agregó medio HAT para seleccionar los hibridomas resultantes.

Se ensayaron dos métodos para tamizaje (*screening*) de los sobrenadantes (producto de cultivo) de hibridomas: por ELISA y por dot blot. Se hizo un primer acercamiento montando una placa de ELISA forrada con hormona recombinante de pollo en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ng (/100  $\mu$ l) por pozo (dos filas para cada concentración). Se probó el anticuerpo monoclonal IH7 para estandarizar el ensayo. Se probaron diluciones del anticuerpo de 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1563, 0.0781, .0391, 0.0195, 0.0098 y 0.0048  $\mu$ g/ml. Se obtuvieron lecturas del triple del valor del blanco como máximo, sólo para el forro de 100 ng de rcGH/ pozo (Figura 34).

Alternativamente, se montó una prueba de slot/dot blot con ayuda del PhastSystem de Pharmacia para hacer el tamizaje que permitiera identificar las clonas productoras de anticuerpo específico  $\alpha$ cGH. Se colocaron diferentes cantidades de hormona (50, 35, 25, 15, 10, 5 y 1 ng de rcGH) en tiras de papel de nitrocelulosa, que después se bloquearon y se procesaron de la misma manera que un *western blot*. Las tiras se incubaron con diluciones de anticuerpo monoclonal IH7 desde 0.3125  $\mu$ g/ml hasta 5  $\mu$ g/ml, para ser reveladas después con un segundo anticuerpo de cabra  $\alpha$ -ratón conjugado a peroxidasa. La tinción se llevó a cabo con DAB. Se observó la señal del mini blot hasta 25 e incluso 15 ng/ $\mu$ l de anticuerpo para todas las concentraciones de rcGH (Figura 35). Se eligió la cantidad de 50 ng en el mini blot para asegurar la definición de la señal.

En las 10 placas de cultivo se encontraron 97 hibridomas, a los que se probó para verificar la presencia de anticuerpo monoclonal  $\alpha$ G-cGH en su medio de cultivo. Se prepararon las tiras con rcGH, G-cGH y glicoproteínas, esperando tener marca sólo con G-cGH para los anticuerpos específicos contra esta variante. Se obtuvieron varios hibridomas con marca para cGH (todos marcaron para rcGH) pero ninguno fue específico sólo para G-cGH. No obstante, se clonaron 20 colonias por dilución limitada en placas de 96 pozos. La producción de anticuerpo por los hibridomas fue disminuyendo gradualmente, en todas las colonias de elección. Es probable que los hibridomas hayan sido inestables en su producción de anticuerpos y/o la presencia de anticuerpos contra cGH correspondía a productos de linfocitos no fusionados con mieloma, que sobrevivieron durante los primeros días de cultivo.

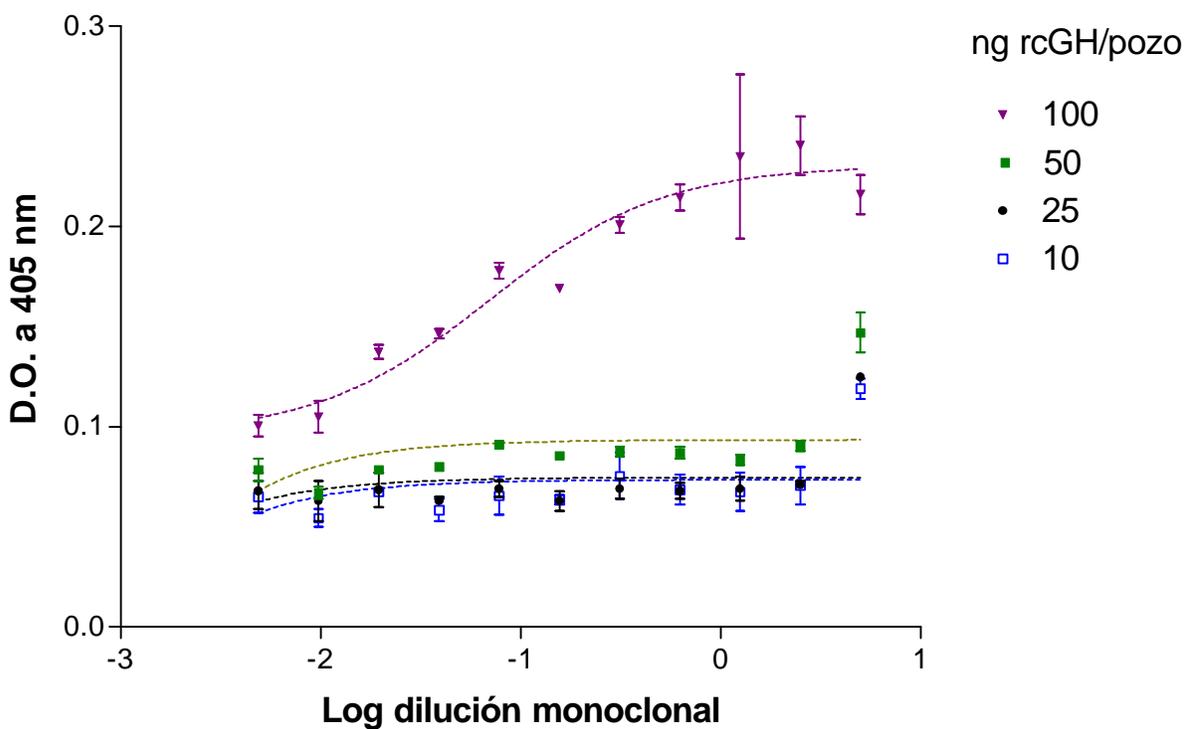


Figura 34. Cuantificación de anticuerpo monoclonal  $\alpha$ GH por ELISA indirecto. Las placas multipozo se forraron con hormona de crecimiento recombinante (10, 25, 50 y 100 ng/pozo) y posteriormente se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal IH7 (0.005-5  $\mu$ g/ml). Se detectó el anticuerpo unido mediante un segundo anticuerpo de cabra  $\alpha$ IgG de ratón conjugado a peroxidasa. Revelado con ABTS, densidad óptica 405 nm.

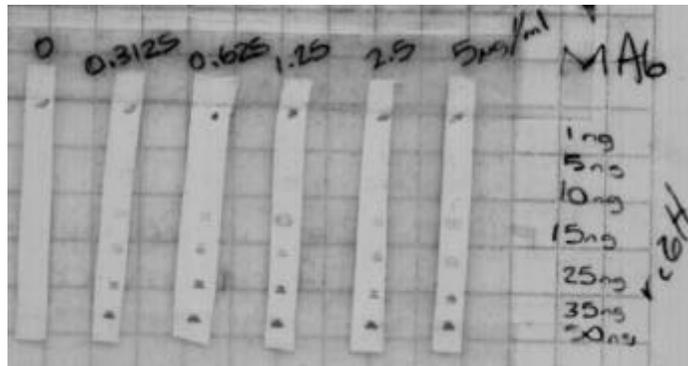


Figura 35. Cuantificación de anticuerpo monoclonal por mini *blots* (tiras, *slot/dot blot*). Las secciones de membrana de nitrocelulosa se marcaron con cantidades crecientes de rcGH (1-50 ng/sitio) y se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal IH7  $\alpha$ cGH. Las marcas inmunorreactivas fueron reveladas con anticuerpo conjugado a peroxidasa y diaminobencidina.

## DISCUSIÓN

La glicosilación es una modificación postraduccional que es común para varias hormonas hipofisarias, tales como tirotropina (TSH), hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante, pero aparentemente no es esencial para otras como la hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL). La GH, junto con la PRL, los lactógenos placentarios y somatomamotropinas coriónicas, las proliferinas y hormonas relacionadas a la prolactina, así como la somatolactina, forman parte de una familia de hormonas, designada de tal manera por su similitud estructural y, en ocasiones, funcional (Harvey, 1995). No obstante, estas últimas (hormonas placentarias o hipofisarias en peces) sí requieren glicosilación para ejercer sus efectos (Hattori et al, 1998). Desde 1984 Lewis y col. encontraron la forma glicosilada de la prolactina en extractos hipofisarios ovinos. A partir de estas primeras observaciones, se han encontrado también formas glicosiladas de PRL en el cerdo (Butnev & Pankov, 1984; Pankov & Butnev, 1986), hombre (Lewis et al, 1985), rata y ratón (Sinha & Jacobsen, 1987a, b), dromedario (Martinat et al, 1990), mono (Cole et al, 1991), pavo (Corcoran & Proudman, 1991), cocodrilo (Noso et al, 1992) y caballo (Butnev et al, 1996). Se buscaron las formas glicosiladas correspondientes de la GH encontrándose en humano (Sinha & Lewis, 1986), rata y ratón (Sinha and Jacobsen, 1987a; Bollengier et al, 1989), pollo (Berghman et al, 1987; Arámburo et al, 1991), cerdo (Sinha et al, 1990a) y búfalo (Maithal et al, 2001). La PRL glicosilada se encuentra en mayor proporción que la GH glicosilada (desde 7-10 hasta 60% de la PRL total analizada), por lo que se facilita su estudio comparativo (Sinha, 1995).

En un principio, no había evidencias de la existencia de GH y PRL glicosiladas, ya que los métodos tradicionales de purificación las separan de las GH y PRL no glicosiladas, desde etapas iniciales en fracciones autoexcluyentes. Sinha y col. (1990b) propusieron además que, debido a la menor unión de azul de Coomassie a las glicoproteínas, no se obtienen bandas nítidas por parte de la PRL glicosilada (G-PRL) para su análisis en geles teñidos con dicho colorante. Además, la capacidad que se tiene para determinar su existencia y proporción se fundamenta en la inmunorreactividad intrínseca de la G-PRL o la GH glicosilada (G-GH) (Haro et al, 1990; Claustrat et al, 1994). Por lo general, la proteína glicosilada tiene menor afinidad por los anticuerpos utilizados rutinariamente, aunque existen reportes de anticuerpos que

reconocen de manera semejante ambas variantes (Pellegrini et al, 1988). Sinha & Lewis (1986) se abrieron paso para el hallazgo de la G-GH humana (G-hGH) montando un inmunoensayo con unión a lectina. Encontraron a la hormona glicosilada, teniendo en consideración la existencia de un segundo gen (GH variante: hGH-V) expresado en placenta, que sí cuenta con una secuencia consenso de N-glicosilación, como se confirmó posteriormente (Chawla et al, 1983; Paladini et al, 1983; Frankenne et al, 1987) y que predice la existencia de G-hGH (Ray et al, 1989), aunque su presencia en extractos hipofisarios no se había comprobado hasta ese momento.

En este proyecto, la purificación de G-cGH se llevó a cabo a partir de extractos de hipófisis de pollo por cromatografía de afinidad en concanavalina A (ConA)-sefarosa, seguida de inmunoafinidad con anticuerpo monoclonal para cGH. El rendimiento de G-cGH así purificada fue de menos del 1%, por lo que la cantidad de hormona purificada fue siempre una limitante para su caracterización (por espectrometría de masas o liberación e identificación de carbohidratos, por ejemplo). La ConA es una lectina derivada de la planta *Canavalia ensiformis*. En general, las lectinas son proteínas que unen varios tipos de oligosacáridos; se forman por una o más subunidades en un multímero. La ConA puede existir como un dímero a pH menor de 5.6, como tetrámero entre pH de 5.6 y 7.0 y otros agregados en pH arriba de 7; en presencia de bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  es capaz de unir eficientemente  $\alpha$ -D-Man,  $\alpha$ -D-Glc, y  $\alpha$ -D-NAcGlc. La ConA ha sido ampliamente utilizada por su fácil manejo y alta afinidad (Sutton, 1989). La cromatografía en ConA-sefarosa tuvo el inconveniente de liberar cierta cantidad de lectina, lo que contaminó parcialmente a la fracción de G-cGH, como pudo apreciarse en el análisis electroforético y posteriormente en el de secuenciación.

Durante la purificación, la identificación de la G-cGH se llevó a cabo utilizando una inmunotinción con anticuerpo policlonal específico  $\alpha$ cGH, así como por la tinción de carbohidratos, tanto con ConA-peroxidasa, como con un estuche comercial para residuos de oligosacáridos. El patrón electroforético de G-cGH por SDS-PAGE y *western blot* proporcionó evidencias de una banda de 26 kDa en condiciones no reductoras y de 29 kDa en presencia de 2-mercaptoetanol. Como era de esperarse, la G-cGH tuvo un peso

molecular mayor que el monómero de cGH no glicosilado, con una diferencia de 3-4 kDa aproximadamente; el monómero no glicosilado tuvo un peso aproximado de 22 kDa y 26 kDa en condiciones no reductoras y reductoras, respectivamente. Esta diferencia determinada por SDS-PAGE no necesariamente representa la masa (tamaño) del oligosacárido, ya que los carbohidratos tienen un comportamiento diferente a las proteínas en estas técnicas electroforéticas, debido a su menor unión al SDS, y por lo general aparentan un mayor peso molecular (Segrest and Jackson, 1972).

Se observó que la preparación enriquecida de G-cGH venía acompañada de monómero no glicosilado, que pudo estar copurificando por formación de dímeros con G-cGH o por asociación con otras moléculas glicosiladas y reconocidas por la ConA, como por ejemplo sus propias proteínas de unión. Sin embargo la proporción del monómero no glicosilado fue notablemente menor en dicha preparación que para los extractos hipofisarios.

Confirmamos que la banda identificada como G-cGH con los criterios mencionados anteriormente era realmente GH, por el análisis de secuencia N-terminal por el método de Edman. Se realizaron 10 ciclos de análisis de residuos de aminoácido, resultando en una coincidencia absoluta con los diez primeros aminoácidos reportados para la hormona de crecimiento de pollo: TFPAMPLSNL (Harvey, 1995). Esto es importante ya que existen evidencias de entrecruzamiento (reactividad cruzada) de los anticuerpos  $\alpha$ PRL y  $\alpha$ GH con inmunoglobulinas de fluidos corporales, como suero y líquido amniótico, que migran electroforéticamente a la posición de las hormonas glicosiladas; no obstante, también se ha comprobado que la glicosilación de PRL es una modificación postraduccional muy importante de esta hormona (Heffner et al, 1995; Strickland & Pierce, 1985).

Encontramos que la G-cGH es una glicoproteína con N-oligosacárido mediante el uso de glicosidasas específicas (Berumen, 2000). No se obtuvo evidencia de digestión con O-glicosidasas<sub>DS</sub>, que es una enzima que corta los oligosacáridos de tipo O. Por otra parte, la susceptibilidad de la banda de 29 kDa a la digestión con péptido N-glicosidasa F dió como resultado su movilización hacia la posición del monómero no glicosilado (26 kDa) bajo

condiciones reductoras. Esta enzima es específica de oligosacáridos tipo N, cortando el enlace amida entre la asparagina y la N-acetilglucosamina del oligosacárido. Los oligosacáridos de este tipo, se producen a partir de una estructura preformada, que contiene N-acetilglucosamina, manosa y glucosa. Este oligosacárido preformado se transfiere a una asparagina en la cadena proteínica durante la traducción y posteriormente se modela removiendo azúcares (glucosa y manosa) y añadiendo otros carbohidratos incluyendo galactosa y ácido siálico; la asparagina debe formar parte de la secuencia NXS(T), en donde la X puede ser cualquier aminoácido, exceptuando la prolina y el ácido aspártico.

La estructura primaria de la GH (cuadro 5) cuenta con una secuencia consenso para N-glicosilación hacia el extremo carboxilo de la proteína ( $N^{188}C^{189}T^{190}$ ), presente para todas las hormonas estudiadas de aves (excepto el pavo), anfibios y peces (excepto la lamprea), algunos de ellos con más de una secuencia consenso para este tipo de glicosilación; sin embargo, esta secuencia en particular falta para los mamíferos, aunque en humano se cuenta con el gen relacionado hGH-V que tiene otra secuencia de N-glicosilación ( $hGH-V:N^{140}Q^{141}S^{142}$ ) (Scanes & Campbell, 1995, Kawauchi et al, 2002). Por tanto, se ha considerado a la G-GH del humano como una glicoproteína con posibles enlaces O-glicosídicos; sin embargo, existen evidencias de hGH N-glicosilada hipofisiaria de 24 kDa que puede ser producto del gen hGH-N y no del hGH-V, puesto que su secuencia amino terminal -30 ciclos- semeja más al gen N (Haro et al, 1996). Además, se ha descrito también en hipófisis un péptido de 12 kDa N-glicosilado, inmunorreactivo a hGH (Díaz et al, 1993; García-Barros et al, 2000). En este trabajo encontramos que la cGH glicosilada (G-cGH) se encuentra N-glicosilada y es la primera GH glicosilada que no es de mamífero en ser caracterizada.

Es notable que la secuencia carboxilo terminal y sitio probable de N-glicosilación para GH se conserve en muchos vertebrados ya que se ha reportado que la presencia de secuencias idénticas de aminoácidos entre especies separadas por períodos largos de divergencia evolutiva sugiere importancia de dicha secuencia en la acción de la proteína (Nicoll et al, 1986).





Con el fin de confirmar el sitio de glicosilación en el extremo carboxilo, se incubó la G-cGH con carboxipeptidasa Y para hidrolizar al menos cuatro aminoácidos, esperando obtener un desplazamiento de la banda de 29 kDa hacia la posición de 26 kDa, similar al generado por PNGasaF por eliminación del oligosacárido unido a la asparagina 188; sin embargo, no se obtuvieron evidencias de digestión con esta enzima. Es probable que la presencia del oligosacárido, e incluso el puente disulfuro de la cisteína 189 (antepenúltimo residuo aminoácido), impidieran de manera estérica la actividad de la carboxipeptidasa Y. El siguiente paso fue la caracterización del oligosacárido, presumiblemente unido a la asparagina 188.

Es importante definir la estructura de la G-cGH, conociendo la conformación del (de los) oligosacárido(s) presentes, a fin de deducir el grado de procesamiento que ha tenido la hormona (Haro et al, 1996). Es común el uso de lectinas, proteínas o glicoproteínas de plantas o vertebrados (origen no inmune) que aglutinan células y/o precipitan glicoconjugados, como reactivos para detectar la presencia de carbohidratos en las proteínas, así como para estudiar las propiedades de superficie celular (Stanley, 1998). La preparación enriquecida de G-cGH se analizó por *western blot* para estudiar la afinidad con lectinas conjugadas a peroxidasa y de esta manera inferir el tipo de oligosacárido que la compone. La G-cGH fue claramente reconocida por la ConA, lo cual se esperaba considerando que se purificó con esta lectina, pero además interactuó con aglutinina de germen de trigo (WGA: Wheat Germ Agglutinin). Sin embargo no fue reconocida por la isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* (BS-I-B4), ni por la lectina de *Maclura pomifera* (MAC), ni por la aglutinina de *Ricinus comunis* (toxina RCA 60). Los oligosacáridos de tipo N- tienen una estructura particular, conservando una porción central con (N-acetilglucosamina)<sub>2</sub> y Manosa(Manosa)<sub>2</sub> (Cummings, 1994). La porción terminal puede ser variable, incluyendo oligosacáridos ricos en manosa o presentar además N-acetilglucosamina, galactosa y ácido N-acetilneuramínico. Por su afinidad con las lectinas (y su digestión con PNGasaF) se deduce que la G-cGH puede contener un N-oligosacárido compuesto por (N-acetilglucosamina)<sub>2</sub> y Manosa(Manosa)<sub>2</sub>, como corresponde a la porción central no variable, pero sin residuos (o poco accesibles para las lectinas) de  $\alpha$ - o  $\beta$ -galactosa, ni N-acetilgalactosamina, que son frecuentes en

oligosacáridos más procesados. No se descarta la presencia de ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico), aunque su presencia indicaría además la probable existencia de galactosas (que no fueron detectadas). Los resultados obtenidos nos permiten proponer que la G-cGH contiene un oligosacárido de tipo híbrido o biantenarico, que cuenta con suficientes residuos de manosa que facilitan su unión a la ConA, pero pocos o ningún residuo de ácido N-acetil neuramínico o galactosas (que representan mayor procesamiento de la molécula) dando como resultado un menor (o nulo) reconocimiento por las otras lectinas utilizadas en este estudio.

Una vez identificada la G-cGH hipofisiaria, fue importante estudiar la localización de las células y los compartimentos intracelulares donde se almacena. Dado que se ha demostrado que las variantes moleculares de la cGH pueden tener bioactividades específicas (Arámburo *et al.*, 1989b; Arámburo *et al.*, 2001), y que parece existir una regulación diferencial de su secreción en respuesta a la estimulación con diversos secretagogos (Martínez-Coria *et al.*, 2002), resultó interesante investigar si existen diferentes poblaciones celulares productoras de G-cGH en la hipófisis, o si incluso se tiene una ubicación específica de G-cGH en los gránulos o vesículas conforme a la maduración que presentan.

Se realizaron técnicas inmunohistoquímicas en la hipófisis para revelar la presencia de G-cGH en los somatotropos. En las aves, la adenohipófisis consiste de un lóbulo cefálico y uno caudal. No se observan barreras anatómicas entre ambos lóbulos (como tejido conectivo, por ejemplo) pero su composición regional en términos del tipo celular que contienen es diferente. Por ejemplo, la distribución de somatotropos se encuentra casi restringida al lóbulo caudal mientras que la de corticotropos, al cefálico. El análisis por microscopía de luz corroboró la especificidad del anticuerpo policlonal  $\alpha$ cGH (CAP1) al tener la mayor marca en el lóbulo caudal de la adenohipófisis del pollo, observándose, de forma típica, abundantes células inmunorreactivas organizadas en grupos y en cordones, como se ha descrito (Harvey & Hull, 1997). Se encontraron pocas células inmunoteñidas en el lóbulo cefálico, las cuales podrían indicar la presencia de células productoras de GH que no se encuentran organizadas en grupos, y que no responden a los secretagogos como GHRH en la forma convencional en

que responden las del lóbulo caudal, así como también podrían corresponder a mammosomatotropos (*Kansaku et al, 1994; Harvey & Hull, 1997; Hull et al, 2000*). La preadsorción del anticuerpo CAP1 con una solución de rcGH (1 mg/ml) resultó en la pérdida de tinción de los cortes de hipófisis y lo mismo se observó cuando no se agregó anticuerpo primario (control negativo).

El análisis de inmunocitoquímica por microscopía electrónica empleando el mismo anticuerpo policlonal CAP1, aunado a la morfología celular característica, nos permitió reconocer a los somatotropos, por la presencia de sus gránulos electrodensos conteniendo una intensa marca inmunorreactiva a cGH y su forma redonda y ovalada con 200 nm de diámetro en promedio. El marcaje de algunos gránulos con ConA sugirió la presencia de G-cGH (por su colocalización con marca de anticuerpo  $\alpha$ cGH). Sin embargo, es probable la existencia de otras glicoproteínas, además de G-cGH, que sean reconocidas por la ConA, como aquellas que participen en la formación, transporte y anclaje de las vesículas, aunque no se tienen reportes de que los gránulos de secreción contengan alguna en específico; Komuro y col. (1987) mostraron que gránulos de prolactina contienen una matriz densa que se une a ConA. Si bien se podría argumentar que otras glicoproteínas podrían haber sido reconocidas por la ConA conjugada a partículas de oro (25 nm), el hecho de que no todos los gránulos tuvieron marca con la lectina, sugirió que las marcadas no son proteínas características de todos los gránulos, y podrían deberse a la presencia de G-cGH. El hecho de que se encontró marca de ConA y de  $\alpha$ cGH en diferentes sitios intracelulares, tales como retículo endoplásmico, confirma que la ConA identifica la presencia del oligosacárido preformado previo a la transferencia cotraduccional en las proteínas. Por su parte, la presencia de inmunorreactividad en retículo endoplásmico también es de esperarse, teniendo en cuenta que el anticuerpo policlonal utilizado reconoce varias especies inmunorreactivas, incluyendo algunos fragmentos como el aminoterminal, y se puede considerar que, aún sin terminar el proceso de traducción, la molécula de cGH en formación puede ser reconocida por dicho anticuerpo.

Por su parte, los resultados obtenidos para el ensayo de radioreceptor en membranas hepáticas de pollo, mostraron que la presencia del oligosacárido no parece modificar substancialmente la afinidad de la hormona de crecimiento, sino que la forma monomérica y la variante glicosilada de la GH tuvieron un comportamiento paralelo, aunque difiriendo en la constante de disociación (Kd), mientras que el fragmento de 15 kDa y las formas de alto peso molecular tuvieron menor potencia para ese receptor (*Reyes et al, 1996; Arámburo et al, 2001*). Los ensayos de radioreceptor sugieren que la G-cGH (Kd 0.07 nM, Bmax 4.77 fmol/mg) podría ejercer su actividad mediante su interacción con el mismo receptor que une la cGH sin glicosilar (Kd 0.015 nM, Bmax 3.5 fmol/mg), con una capacidad de unión similar, aunque con menor afinidad.

Para estudiar la bioactividad de la G-cGH se probó esta hormona en el ensayo de proliferación de células Nb2; este ensayo es sumamente sensible a hormonas lactogénicas, como la prolactina, pero cabe mencionar que la hormona de crecimiento humana –que es lactogénica- tiene efecto en la proliferación de estas células, y en particular la hGH-V, que cuenta con la secuencia para N-glicosilación, también tiene actividad en este ensayo (*Nickel et al, 1990*). Se observó claramente que el efecto de promoción de proliferación de G-cGH es dependiente de su concentración, mientras que la rcGH no tuvo influencia en dicha proliferación. También se hicieron pruebas para descartar el posible efecto de ConA, considerando que la fracción enriquecida de G-cGH tuviera algo de contaminación con esta lectina. La ConA tuvo un efecto de estimulación de la proliferación, sin embargo a mayor concentración, menor fue su actividad; por lo tanto, su actividad en la muestra de G-cGH no representó interferencia o falsos positivos en la estimulación de la proliferación celular Nb2, dado que a mayor concentración de la fracción enriquecida de G-cGH, mayor fue el efecto. Para comprobar que la muestra enriquecida de G-cGH no tuviera además trazas de prolactina de pollo, se realizó un análisis por *western blot* con anticuerpo  $\alpha$ PRL de pollo, sin encontrarse marca en dicha preparación. El ensayo de proliferación de células de linfoma Nb2 en el que la rcGH no tuvo actividad, sugiere que la G-cGH podría interactuar con otro tipo de receptor (de prolactina, por ejemplo), además de interactuar con el receptor clásico de GH como lo sugieren los experimentos de radioreceptor, y el hecho de que la G-cGH

tuvo efecto en la monodesyodación de hormonas tiroideas en el embrión de pollo (Berghman et al, 1989) y tuvo un efecto similar al de la hormona no glicosilada en la producción *in vivo* de IGF-I (Berghman et al, 1994). Otra diferencia con respecto a la forma no glicosilada es que la tasa de desaparición de G-cGH, después de su inyección intravenosa en gallinas anestesiadas, fue 20% menor ( $P=0.13$ ) mientras que su vida media fue mayor que la de la mencionada forma no glicosilada, en el mismo orden de magnitud (Berghman et al, 1994). Considerando que la G-cGH tenga una menor afinidad por el receptor clásico, pero un tiempo mayor (vida media) para interactuar con éste, se explica que tenga efectos similares *in vivo*, dependiendo del tiempo de respuesta de dicho efecto. Berghman y col. (1989) han propuesto que su importancia fisiológica reside más en ejercer diferentes acciones, que en modificar las de la variante no glicosilada.

La presencia de variantes glicosiladas se ha encontrado en otras especies, como en la rata, y se han relacionado con cambios fisiológicos. Por ejemplo, se observó que los niveles de G-rGH son menores en hembras que en machos, y menores en hembras durante la lactancia que en hembras vírgenes (Sinha & Jacobsen, 1987). Además, la administración de estradiol disminuyó los niveles de G-rGH, mientras que por ovariectomía se incrementó la proporción de G-rGH. Por otra parte, Bedecarrats y col. (1999a, 1999b) también encontraron diferencias en la proporción de la variante glicosilada de prolactina de pavo (tPRL). Este grupo mostró que se presentan mayores niveles de tPRL glicosilada durante el período de incubación y anidamiento, y menores niveles en la pelecha o fuera de nido, *in vivo*, pero no observaron diferencias de proporción de formas de PRL *in vitro* después de la incubación de las hipófisis correspondientes a cada etapa fisiológica mencionada en presencia de péptido intestinal vasoactivo de cerdo.

Para encontrar un correlato fisiológico de la G-cGH en el pollo, se analizaron los niveles de esta isoforma de GH en la hipófisis. En primer lugar se analizaron los niveles de cGH –total– en hipófisis. La concentración de cGH en la hipófisis (expresada en  $\mu\text{g}$  GH por mg de proteína del tejido) se encuentra más elevada en las primeras semanas de vida y luego disminuye a lo largo del desarrollo del pollo. Este patrón es diferente del que presenta la

cGH en suero, en donde se ha observado un pico de concentración hacia la cuarta o quinta semana de edad (Harvey & Scanes, 1977). Para aclarar estas diferencias se calculó la cantidad total de cGH en la hipófisis, considerando que la glándula es más grande con la edad del pollo, encontrando que también presenta un pico conforme al desarrollo, con la mayor cantidad hacia la octava y novena semana de edad y en la semana 15 ya baja la cantidad de GH por hipófisis. Este patrón es semejante al reportado por Vasilatos-Younken (1986), aunque ella observó un máximo en meseta a partir de las 5 semanas de edad que se mantuvo hasta las 12 semanas de edad en donde se observó una tendencia de disminución. Esto podría indicar la capacidad de almacenamiento y secreción de la glándula conforme a las condiciones fisiológicas que cursa el pollo durante el desarrollo. En la 5<sup>a</sup> semana la hipófisis se podría encontrar con gran producción de cGH y a la vez gran liberación de la hormona, mientras que en la 8<sup>a</sup> semana podría conservar la producción de cGH pero disminuir su liberación.

En nuestro laboratorio se ha mostrado que la secreción de la G-cGH *in vitro* parece estar regulada diferencialmente por GHRH (Martínez-Coria et al, 2002) y TRH (Arámburo et al, 2004 en preparación) por lo que resultó de la mayor importancia determinar las concentraciones de esta variante molecular en la hipófisis, y compararla con la forma monomérica, a lo largo del desarrollo en el pollo.

Se calcularon los niveles de G-cGH por análisis densitométrico de luminogramas, método que ya se ha probado en el laboratorio (Arámburo et al, 2000; Arámburo et al, 2001; Martínez-Coria et al, 2002; Luna et al, 2004) y comprobado su efectividad. Se encontró que la banda de 29 kDa apareció a partir del día 13 embrionario y se incrementó la proporción (porcentaje con respecto al total de inmunorreactividad identificado en cada carril) de la G-cGH conforme avanza la edad; este porcentaje tuvo el nivel más bajo detectable de G-cGH ( $0.63\% \pm 0.13$ ) en el día embrionario 13, mientras que los niveles más altos ( $17.03 \pm 1.06$  y  $17.31 \pm 1.17$ ) se observaron durante las 15 y 25 semanas de edad (respectivamente).

Se calculó la proporción de G-cGH con respecto al monómero no glicosilado (26 kDa) debido a que los ensayos de cuantificación de GH reconocen principalmente esta variante, al

utilizar anticuerpos específicos  $\alpha$ GH. Su proporción con respecto al monómero (26 kDa) disminuye hacia la eclosión y aumenta paulatinamente hacia la edad adulta. En el caso de los embriones, esta proporción resultó ser elevada debido a la baja concentración del monómero no glicosilado (26 kDa) en estas edades, y se observó la disminución de esta proporción conforme hubo más de esta última variante. Sin embargo, a partir de la eclosión se observa la tendencia a incrementar la proporción de G-cGH.

Aún no se ha estudiado si la liberación de la G-cGH muestra un patrón de secreción regulada o un patrón de secreción constitutiva, como se ha propuesto para la G-PRL (*Pellegrini et al, 1990*). Si consideramos lo expuesto anteriormente sobre la capacidad de síntesis y almacenamiento glandular, se podría pensar que la G-cGH sea secretada de manera constitutiva y de esa forma explicar que para la GH almacenada, la G-cGH tuviera una menor proporción; así, conforme el pollo envejece, y si la capacidad de almacenamiento disminuye, la G-cGH aumenta en proporción. De esa forma también podría explicarse que al estimular la síntesis (*in vitro*) se libere al medio mayor cantidad de G-cGH (*Martínez-Coria et al, 2002*). Cabe mencionar que la hormona almacenada en los gránulos de secreción no puede glicosilarse para originar esta G-cGH, dado que la N-glicosilación se realiza durante la traducción del ARNm que codifica para cGH (en realidad es una modificación cotraduccional, más que postraduccional), de modo que la G-cGH encontrada involucraría la síntesis reciente. Sin embargo, el hallazgo de G-cGH en gránulos de secreción de matriz densa y la estimulación de secreción por secretagogos con una mayor proporción de G-cGH liberada que en controles sin estimular (*Martínez-Coria et al, 2002*), sugiere que la G-cGH podría secretarse también de manera regulada (GHRH también estimula la síntesis de GH, además de su liberación).

Aún falta mucho trabajo para poder entender cuál es la función de la G-cGH y de su participación en la regulación del metabolismo del organismo; sin embargo, la determinación de actividad sobre la proliferación de células Nb2, cuando la rcGH no tuvo actividad, sugiere funciones específicas de la G-cGH, que no sean compartidas por otras variantes. Por ejemplo, se tienen evidencias de variantes de carga (denominadas 0.22 y 0.3, con base en su

movilidad relativa en geles de poliacrilamida) que tienen diferente bioactividad en explantes de tejido adiposo: la banda 0.22 tiene actividad lipolítica, mientras que la de 0.3 es no lipolítica (Arámburo *et al*, 1989b). Por su parte, el fragmento aminoterminal de 15 kDa tiene un efecto equipotente a la hormona recombinante en la inhibición de la desyodasa tipo III de hígado embrionario *in vitro* (Arámburo *et al*, 2001); sin embargo, en ensayos de angiogénesis, el fragmento de 15 kDa estimuló la proliferación de células endoteliales, mientras que ni el monómero de hormona recombinante ni la cGH nativa tuvieron actividad. Todo esto sugiere que cada una de las variantes mencionadas puede estar participando en la regulación fina de la actividad de GH. De esta manera la G-cGH puede ser parte de esta regulación al competir por el receptor clásico, pero ejerciendo otras funciones por su parte. A grandes rasgos, la importancia de esta regulación puede compararse por la diferencia de actividad y evolución molecular en la familia de GH/PRL. En primates la GH adquirió actividad lactogénica, provechoso para estimular el desarrollo mamario y el inicio de la lactancia; la aparición de la somatomamotropina coriónica (CS), proteína relacionada con GH, que mantuviera la actividad lactogénica pero perdiendo actividad somatotrópica, fue todavía más provechoso o ventajoso al evitar los efectos adversos de GH (como acromegalia) durante el embarazo (Harvey, 1995).

La importancia de esta variante hace necesario realizar un análisis de su bioactividad mediante la generación de ensayos específicos para su evaluación, lo cual podría involucrar desde un anticuerpo específico hasta encontrar el bioensayo específico para esta variante. La obtención de anticuerpos específicos para G-cGH podría lograrse si se inmunizara a los ratones con la fracción de proteína que contiene el oligosacárido, y de esta manera evitar los epítopes comunes a las diferentes variantes. Sin embargo, se correría el riesgo de tener anticuerpos muy generales que reconocieran en mayor medida la porción de carbohidrato, generando una especificidad amplia a otras glicoproteínas. Queda, por lo tanto, aún el reto de generar reactivos específicos para ser utilizados en la caracterización mayor de esta variante hormonal.

También falta estudiar el papel de la G-cGH en la fisiología del pollo, aunque este trabajo proporciona evidencias de su bioactividad y contribuye en su caracterización, como una de las entidades moleculares que tiene la cGH para ejercer su gran variedad de acciones. Es de gran interés analizar la presencia de G-cGH en distintas condiciones fisiológicas, o en presencia de diferentes condiciones hormonales, por ejemplo: bajo las diferentes etapas reproductivas en pollos hembra, considerando que ya se han reportado diferencias en GH de rata y PRL de pavo y el estradiol es un factor importante de regulación. Por otra parte sería interesante determinar el patrón de secreción de la G-cGH, utilizando precursores marcados radiactivamente para identificar cuál es la proteína de síntesis reciente.

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la hipótesis de que la hormona de crecimiento no es una sola proteína, sino una familia de proteínas modificadas en su estructura que les permite mostrar efectos similares y también particulares, como en el caso de la G-cGH. Por otra parte, este trabajo mostró algunas de las características bioquímicas de esta variante molecular como fue su peso molecular aparente, su tipo de glicosilación y su afinidad por el receptor. Asimismo, se mostró que se encuentra en gránulos de secreción de somatotropos, que su contenido en la glándula se modifica con respecto a la edad y que tiene efectos biológicos diferentes del monómero no glicosilado. En conjunto estos hallazgos abren diversas perspectivas de estudio para continuar con la determinación de su efecto biológico a lo largo del desarrollo, así como su participación en la regulación de diversas etapas fisiológicas.

## CONCLUSIONES - RESUMEN

Se empleó un método de purificación para la hormona de crecimiento glicosilada (G-cGH) a partir de hipófisis de pollo, que involucró tres pasos principales: la obtención de un extracto crudo, la cromatografía de afinidad con concanavalina A-sefarosa y la cromatografía de inmunoafinidad con un anticuerpo monoclonal específico para cGH. El rendimiento obtenido fue de 8-10 microgramos de G-cGH por gramo de tejido.

La caracterización bioquímica de la G-cGH mostró que se trata de una glicoproteína de 26 kDa bajo condiciones no reductoras (29 kDa bajo condiciones reductoras), que contiene a un oligosacárido de 3-4 kDa unido por un enlace N-glicosídico, probablemente a la asparagina ubicada en la posición 188, con una estructura híbrida o biantenaria.

El análisis ultraestructural mostró que en los somatotropos hipofisarios existen gránulos de secreción reactivos a las tinciones específicas con anticuerpo  $\alpha$ cGH y a ConA, mientras que otros únicamente se marcan con el anticuerpo, lo que sugiere que la G-cGH puede estar compartimentalizada en una subpoblación de gránulos, minoritaria sin embargo, con el resto que contienen cGH no glicosilada.

El análisis de bioactividad mostró que la G-cGH es reconocida por el GHR hepático, aunque con menor afinidad que la rcGH. Sin embargo, la G-cGH tuvo una importante actividad sobre la proliferación de las células Nb2, que no fue compartida por la rcGH.

Se mostró que la concentración relativa de G-cGH en la hipófisis muestra un patrón cambiante durante el desarrollo del pollo; en el embrión va disminuyendo hasta el momento de la eclosión y luego, a partir de ésta, inicia su incremento hasta alcanzar valores máximos en la madurez sexual. Sin embargo, su concentración generalmente es mucho menor que el monómero no glicosilado de la cGH (22 kDa).

En resumen, se avanzó en la caracterización bioquímica y biológica de una variante de la hormona de crecimiento de pollo, aportando evidencias que apoyan la hipótesis de que la diversidad funcional de la GH puede ser explicada, al menos parcialmente, por su heterogeneidad molecular.

## REFERENCIAS

- Abdel-Meguid SS, Shieh HS and Smith WW (1987) Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6434-6437.
- Agellon LB, Davies SL, Lin CM, Chen TT and Powers DA (1988) Rainbow trout has two genes for growth hormone. *Mol. Reprod. Dev.* 1: 11-17.
- Aguilar E (1992) Integración neuroendocrina. En: *FISIOLOGÍA HUMANA* 1ª ed. McGraw Hill Madrid 71: 897.
- Allaerts W, Boonstra-Blom AG, Peeters K, Janse E, Berghman L and Jeurissen SHM (1999) Prenatal development of hematopoietic and hormone-producing cells in the chicken adenohypophysis. *Gen Comp Endocrinol* 114: 213-224.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2002) Cell communication. In: *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*. 4<sup>th</sup> ed. Garland. New York. 15: 831-906.
- Arámburo C, Carranza M, Sánchez R and Perera G (1989a) Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 330-339.
- Arámburo C, Campbell RM and Scanes CG (1989b) Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants. *Life Sci.* 45: 2201-2207.
- Arámburo C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S and Sánchez R (1990a) Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH). Different bioactivities of cGH charge variants. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80: 59-67.
- Arámburo C, Donoghue D, Montiel JL, Berghman LR and Scanes CG (1990b) Phosphorylation of chicken growth hormone. *Life Sci.* 47: 945-952.
- Arámburo C, Navarrete S, Montiel JL, Sánchez R and Berghman LR (1991) Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH). Evidence of G-cGH isoforms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84: 135-146.
- Arámburo C, Montiel JL, Proudman JA, Berghman LR and Scanes CG (1992) Phosphorylation of prolactin and growth hormone. *J. Mol. Endocrinol.* 8: 183-191.

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

Arámburo C, Carranza M, Reyes M, Luna M, Martínez-Coria H, Berumen L and Scanes C (2001) Characterization of a bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone. *Endocrine* 15: 231-240.

Arámburo C, Martínez-Coria H, Luna M, Carranza M, McCann L, Berghman L and Scanes CG (2004) Differential stimulation of the release (*in vitro* and *in vivo*) of chicken growth hormone variants: effects of thyrothrin releasing hormone (TRH) and growth hormone releasing hormone (GHRH). En preparación para *Endocrinology*.

Atkinson PR, Weidman ER, Bhaumick B (1980) Release of somatomedin-like activity by cultured WI-38 human fibroblasts. *Endocrinology* 106: 2006-2012.

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

Baulieu E and Kelly PA (1990) Hormones: a complex communications network. In: *HORMONES: FROM MOLECULES TO DISEASE*. Hermann pub France 1: 3-7.

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

Baumann G, Dávila N, Shaw MA, Jay R, Liebhaber, S and Cooke NE (1991b) Binding of human growth hormone-variant (hGH-V; placental GH) to growth hormone binding protein in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73: 1175-1179.

Baumann G (1999) Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. *Horm. Res.* 51 (suppl): 2-6.

Bayliss WM and Starling EH (1902) The mechanism of pancreatic secretion. *J. Physiol.* 28: 325-353.

Bedecarrats G, Guemene D, Kuhnlein U and Zadworny D (1999a) Changes in levels of immunoreactive prolactin isoforms during a reproductive cycle in turkey hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 96-104.

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

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

Berghman L.R., van Beeumen J, Decuypere E, Kühn ER and Vandesande F. (1988). One-step purification of chicken growth hormone from a crude pituitary extract by use of a monoclonal immunoabsorbent. *J. Endocrinol.* 118: 381-387.

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

Berghman LR, Grauwels L, Vanhamme L, Proudman JA, Foidart A, Balthazart J, Vandesande F (1992). Immunocytochemistry and immunoblotting of avian prolactins using polyclonal and monoclonal antibodies toward a synthetic fragment of chicken prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 346-357.

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

Berumen L (2000) Caracterización bioquímica y funcional de la variante glicosilada de la hormona de crecimiento. Tesis para obtener grado de maestría en ciencias (Neurobiología). CNB-UNAM.

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

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

Butnev V, Pankov I. (1984) Multiple forms of hypophyseal prolactin. A new glycosylated form of prolactin with increased biological activity. *Biokhimiia* 49: 1828-39.

Butnev VY, Gotschall RR, Baker VL, Moore WT, Gout PW, Bousfield GR. (1996) Glycosylated equine prolactin and its carbohydrate moiety. *J. Protein Chem.* 15: 413-26.

Castaño JP, Torronteras R, Ramírez JL, Gribouval A, Sánchez-Hormigo A, Ruiz-Navarro A and Gracia-Navarro 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* 137: 129-136.

- Chawla RK, Parks JS and Rudman D (1983) Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic and clinical aspects. *Ann. Rev. Med.* 34: 519-547.
- Claustrat B, Brun J, Champier J, Harthe C, Joly MO. (1994) Heterogeneity of human prolactin. Influence on immunoassays (RIA and IRMA). *Nucl. Med. Biol.* 21: 331-5.
- Cole ES, Nichols EH, Lauziere K, Edmunds T, McPherson JM. (1991) Characterization of the microheterogeneity of recombinant primate prolactin: implications for posttranslational modifications of the hormone *in vivo*. *Endocrinology* 129: 2639-46.
- Cooke N, Ray J, Emery J and Liebhaber S (1988) Two distinct species of hGH-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 9001-9006.
- Corcoran DH and Proudman JA (1991) Isoforms of turkey prolactin: Evidence for differences in glycosylation and tryptic peptide mapping. *Comp. Biochem. Physiol. B* 99: 563-570.
- Corvilain J and Abramow M (1972) Growth and renal control of plasma phosphate. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 34: 452-459.
- Cotes PM, Reid E and Young FG (1949) Diabetogenic action of pure anterior pituitary growth hormone. *Nature* 164: 209.
- Cummings RD (1994) Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Meth. Enzymol.* 230: 66-86.
- Cunningham BC and Wells JA (1990) Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone receptor. *Science* 247: 1461-1464.
- Davidsson, MB (1987) Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr. Rev.* 8: 115-123
- Devesa J, Esquifino A y Tresguerres AF (1992) Hormonas adenohipofisarias. En: *FISIOLOGÍA HUMANA 1ª ed.* McGraw Hill Madrid 73: 913-927.
- De-Vos AM, Ultsch M and Kossiakoff AA (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255: 306-312.
- Díaz MJ, Domínguez F, Haro LS, Ling N and Devesa J (1993) A 12-kilodalton N-glycosylated growth hormone-related peptide is present in human pituitary extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77: 134-138.

Dobado-Berrios PM, Ruiz-Navarro A, Almadén Y, Malagón MM, Garrido JC, Ramírez-Gutiérrez JL, Gracia-Navarro F (1996) Heterogeneity of growth hormone (GH)-producing cells in aging male rats: ultrastructure and GH gene expression in somatotrope subpopulations. *Mol. Cel. Endocrinol.* 188: 181-191.

Evans HM and Long JA (1922) Characteristics effect upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8: 38-39.

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

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

Fawcett DW (1995) Hipófisis. En: BLOOM & FAWCETT TRATADO DE HISTOLOGÍA McGraw/Hill 12<sup>a</sup> edición 17: 524-532.

Forbes SH, Knudsen KL, North TW, Allendorf FW. (1994) One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1628-1631.

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

Fox, SI (1999) Endocrine Glands. In: HUMAN PHYSIOLOGY. 6<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill 11: 299-301.

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

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

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

Friesen HG and Astwood EB (1967) Hormones of the anterior pituitary body. *New Engl. J. Med.* 27: 1216-1328.

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

Garcia-Barros M, Costoya JA, Rios R, Arce V, Devesa J. (2000) N-glycosylated variants of growth hormone in human pituitary extracts. *Horm. Res.* 53: 40-5.

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

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

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

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

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

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

Haas MJ, Mreyoud A, Fishman M, Mooradian AD (2004) Microarray analysis of thyroid hormone-induced changes in mRNA expression in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 365: 14-8.

Haro LS, Lee DW, Singh RN, Bee G, Markoff E, Lewis UJ. (1990) Glycosylated human prolactin: alterations in glycosylation pattern modify affinity for lactogen receptor and values in prolactin radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 379-83.

Haro LS, Lewis UJ, García M, Bustamante J, Martínez AO and Ling NC (1996) Glycosylated human growth hormone (hGH): A novel 24 kDa hGH-N variant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228: 549-556.

Harvey S and Scanes CG (1977) Purification and radioimmunoassay of chicken growth hormone. *J. Endocrinol.* 73: 321-329.

Harvey S (1995) Growth Hormone Synthesis. *Growth Hormone Metabolism. Growth Hormone Release: Integrative Hypothalamic Control*. In: *GROWTH HORMONE*. (S

Harvey, CG Scanes, WH Daughaday, Eds.), Florida, CRC Press Inc., pp 55-72, 138, 285-297.

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

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

Heffner LJ, Markoff E, Yuan RW, Lee DW. (1995) Glycosylated human prolactin: detection by immunoblotting of biological fluids is confounded by antisera crossreactivity with immunoglobulins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 48-55.

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

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

Howland D, Farrington M, Taylor W and Hymer W (1987) Alternative splicing model for the synthesis and secretion of the 20 kd form of rat GH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147: 650-657.

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

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

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

Hull KL, Murphy A and Harvey S (2000) Avian Somatotrophs: differentiation, morphology, distribution, and regulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78: 994-1002.

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

Jefferson LS and Korner A (1967) A direct effect of growth hormone on the incorporation of precursors into proteins and nucleic acids of perfused rat liver. *Biochem. J.* 104: 826-832.

Jozsa R, Scanes CG, Vigh S and Mess B (1979) Functional differentiation of the embryonic chicken pituitary gland studied by immunohistological approach. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39: 158-163.

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

Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Tatsuguchi A, Sugihara H, Oikawa S and Kineman RD (2004) The role of pituitary ghrelin in growth hormone (GH) secretion GH-releasing hormone-dependent regulation of pituitary ghrelin gene expression and peptide content. *Endocrinology.* 145: 3731-3738.

Kansaku N, Shimada K, Terada O and Saito N (1994) Prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone-beta subunit gene expression in the cephalic and caudal lobes of the anterior pituitary gland during embryogenesis and different reproductive stages in the chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96: 197-205.

Kardong, KV (1997) The endocrine system. In: VERTEBRATES. COMPARATIVE ANATOMY, FUNCTION, EVOLUTION. 2<sup>nd</sup> Ed WCB McGraw-Hill 15: 565-574.

Kawauchi H, Suzuki K, Yamazaki T, Moriyama S, Nozaki M, Yamaguchi K, Takahashi A, Youson J and Sower SA (2002) Identification of growth hormone in the sea lamprey, an extant representative of a group of the most ancient vertebrates. *Endocrinology* 143: 4916-4921.

Komuro M (1987) Presence of glycoconjugates in prolactin granules of male rats. *Cell Tissue Res.* 250: 181-184.

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

Krishnan KA, Proudman JA and Bahr JM (1989) Avian growth hormone receptor assay: Use of chicken and turkey liver membranes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 66: 125-134.

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

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

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

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

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

Lewis, U.J. (1984b) Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Ann. Rev. Physiol.* 46: 33-42

Lewis UJ, Singh RN, Sinha YN, Vanderlaan WP. (1985) Glycosylated human prolactin. *Endocrinology.* 116: 359-63.

Lewis UJ, Sinha YN, Lewis GP. (2000) Structure and properties of members of the hGH family: a review. *Endocr. J.* 47 Suppl: S1-8.

Li CH and Ash LJ (1953) The nitrogen terminal end-groups of hypophyseal growth hormone. *J. Biol. Chem.* 203: 419-424.

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

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

Liu L, Porter TE (2004) Endogenous thyroid hormones modulate pituitary somatotroph differentiation during chicken embryonic development. *J. Endocrinol.* 180: 45-53.

Loewenstein WR (1999) THE TOUCHSTONE OF LIFE. MOLECULAR INFORMATION, CELL COMMUNICATION AND THE FOUNDATIONS OF LIFE. Oxford pp 1-5.

López ME, Hargis BM, Dean CE and Porter TE (1995) Uneven regional distributions of prolactin- and growth hormone-secreting cells and sexually dimorphic proportions of prolactin secretors in the adenohypophysis of adult chickens. *Gen. Comp. Endoc.* 100: 246-254.

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

- Luna M, Huerta L, Berumen L, Martínez-Coria H, Harvey S and Arámburo C (2004) Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen. Comp. Endoc.* 137: 37-49.
- MacGorman LR, Rizza RA and Gerich JE (1981) Physiological concentrations of growth hormone exert insulin-like and insulin antagonistic effects on both hepatic and extrahepatic tissues in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53: 556-559.
- MacLeod JN, Worsley I, Ray J, Friesen HG, Liebhaber SA and Cooke NE (1991) Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology* 128: 1298-1302.
- MacLeod JN, Lee AK, Liebhaber SA and Cooke EN (1992) Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J. Biol. Chem.* 267: 14219-14226.
- Madssen SS (1990) The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 1-11.
- Maithal K, Krishnamurty HG, Muralidhar K (2001) Physico-chemical characterization of growth hormone from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Indian J. Biochem. Biophys.* 38: 375-383.
- Malagon MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodriguez-Pacheco F, García-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F and Castano JP (2003) Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology.* 144: 5372-5380.
- Malamed S, Gibney JA, Cain LD, Perez FM and Scanes CG (1993) Immunocytochemical studies of chicken somatotrophs and somatotroph granules before and after hatching. *Cell Tissue Res.* 272: 369-374.
- 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.
- Martinat N, Anouassi A, Huet JC, Pernollet JC, Combarrous Y. (1990) Purification and characterization of glycosylated and non-glycosylated forms of prolactin from the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 97: 667-74.
- Martinez-Coria H, López-Rosales LJ, Carranza M, Berumen L, Luna M and Arámburo C. (2002) Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone-releasing hormone stimulation *in vitro*. *Endocrine.* 17: 91-102.

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

McMahon CD, Radcliff RP, Lookingland KJ and Tucker HA (2001) Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.* 20: 65-87.

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

Mikami S and Takahashi H (1987) Immunocytochemical studies on the cytodifferentiation of the adenohypophysis of the domestic fowl. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49: 601-611.

Mikami SI (1992) Hypophysis. In: *ATLAS OF ENDOCRINE ORGANS. VERTEBRATES AND INVERTEBRATES.* (Matsumoto A & Ishii S, EDS) Springer-Verlag pp 39-62.

Miao YW, Burt DW, Paton IR, Sharp PS, Dunn IC (1999) Mapping of the prolactin gene to chicken chromosome 2. *Anim. Genet.* 30: 473.

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

Moon HD, Jentoft VL, Li CH (1962) Effect of human growth hormone on growth of cells in tissue culture. *Endocrinology* 70: 31-38.

Morikawa M, Nixon T and Green H (1982) Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 29: 783-789.

Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY and Greenwood FC (1971) Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68: 866-869.

Nickel BE, Kardami E and Cattini PA (1990) The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells. *Endocrinology* 126: 971-976.

Nicoll CS and Licht P (1971) Evolutionary biology of prolactin and somatotropins. II Electrophoretic comparison of tetrapod somatotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 17: 490-507.

Nicoll CS, Mayer GL and Russell SM (1986) Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr. Rev.* 7: 169-203.

Norman AW and Litwack G (1997) Anterior Pituitary Hormones. In: HORMONES. 2<sup>nd</sup> Ed. ACADEMIC PRESS 5: 133-160.

Norris DO (1997) Organization of the Mammalian Hypothalamo-Hypophysial Axis. In: VERTEBRATE ENDOCRINOLOGY. 3d ed. Academic Press USA 4: 105-160.

Noso T, Swanson P, Lance VA, Kawauchi H. (1992) Isolation and characterization of glycosylated and non-glycosylated prolactins from alligator and crocodile. Int. J. Pept. Protein Res. 39: 250-257.

Oetting WS, Tuazon PT, Traugh JA and Walker AM (1986). Phosphorylation of prolactin. J. Biol. Chem. 261: 1649-1652.

Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O and Lindahl A (1992) Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9826-9830.

Paladini AC, Peña C and Retegui L (1983) Molecular biology of growth hormone. CRC Crit. Rev. Biochem. 15: 25-26.

Pankov YuA, Butnev VYu. (1986) Multiple forms of pituitary prolactin, a glycosylated form of porcine prolactin with enhanced biological activity. Int. J. Pept. Protein Res. 28: 113-23.

Parks JS (1989) Molecular biology of growth hormone. Acta Paediatr. Scand. Suppl 349: 127-135.

Pascacio M, Martínez H, Luna M y Arámburo C (1996) Efecto agudo de TRH y uretano sobre las variantes de masa de la hormona de crecimiento (GH) en el plasma de pollo (Res 104) XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Septiembre 22-26 1996, Puebla, Pue.

Pellegrini I, Gunz G, Ronin C, Fenouillet E, Peyrat JP, Delori P, Jaquet P. (1988) Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells: immunological, receptor binding, and biological properties of the glycosylated and nonglycosylated forms. Endocrinology. 122: 2667-74.

Porter TE, Couger GS, Dean CE and Hargis BM (1995) Ontogeny of growth hormone (GH) secreting cells during chicken embryonic development: Initial somatotrophs are responsive to GH-releasing hormone. Endocrinology 136: 1850-1856.

Raiti S and Tolman RA (Eds.) (1986) Human growth hormone. Plenum Medical, USA pp 199-210, pp 241-256.

Ray J, Jones BK, Liebhaber SA and Cooke NE (1989) Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology* 125: 566-568.

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

Reichlin S (1998) Neuroendocrinology. In: WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY. 9<sup>th</sup> edition (Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR EDS) 8: 172-173.

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

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

Rosado, A (2000) Osidopéptidos. Glicoproteínas. En: INTRODUCCIÓN A LA GLICOBIOLOGÍA. UAM México. pp 158-159.

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

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

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

Salmon WD Jr and Daughaday WH (1957) A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 49: 825.

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

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

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

Scheidtmann, KH (1989) Immunological detection of proteins of known sequence. In: Protein Structure (TE Creighton, ed) IRL Press, pp 112-113.

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

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

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

Segrest JP and Jackson RL (1972) Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Meth. in Enzymol.* 283: 54-63.

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

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

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

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

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

Sinha YN and Jacobsen BP. (1987b) Glycosylated prolactin in the murine pituitary: detection by a novel assay and alteration of concentrations by physiological and pharmacological stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 505-14.

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

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

Sinha YN (1995) Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr. Rev.* 16: 354-69.

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

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

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

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

Strickland TW, Pierce JG. (1985) Glycosylation of ovine prolactin during cell-free biosynthesis. *Endocrinology* 116: 1295-8

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

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

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

Tanaka T, Shiu RPC, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG (1980) A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 1058-1063.

Thorner MO, Vance ML, Laws ER, Horvath E and Kovacs K (1998) The anterior pituitary. In: WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY. 9<sup>th</sup> edition (Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR EDS) 9: 249-250

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

Vasilatos-Younken R (1986) Preparation and culture of dispersed avian pituitary cells, and age-related changes in donor pituitary weight and growth hormone content. Gen. Comp. Endocrinol. 64: 99-106.

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

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

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

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

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

Woodman DD (1997) Organisation of endocrine systems. In: LABORATORY ANIMAL ENDOCRINOLOGY. John Wiley & Sons. 1:1.

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

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1:</i> Hipófisis de ave de corral y su relación con el hipotálamo.	... 3
<i>Cuadro 1:</i> Divisiones de la hipófisis	...4
<i>Figura 2:</i> Imagen representativa de hipófisis de diferentes vertebrados	... 7
<i>Cuadro 2:</i> Hormonas adenohipofisarias	... 14
<i>Figura 3:</i> Acciones biológicas de la GH	... 17
<i>Cuadro 3:</i> Acciones biológicas de la hormona de crecimiento	... 18
<i>Figura 4:</i> Estructura de la molécula de GH	... 22
<i>Figura 5:</i> Heterotrímero de GH y su receptor (dos moléculas de GHR)	... 24
<i>Figura 6:</i> Representación esquemática del gen de hGH y la biosíntesis de GH	... 36
<i>Figura 7:</i> Regulación de la secreción de GH	... 42
<i>Figura 8:</i> Arreglo típico de un enlace O-glicosídico y de un N-glicosil oligosacárido de tipo complejo	... 46
<i>Figura 9:</i> Arreglo típico de un enlace N-glicosídico para el tipo de oligosacárido híbrido	... 47
<i>Figura 10:</i> Arreglo típico de un enlace N-glicosídico para el tipo de oligosacárido rico en manosa	... 48
<i>Figura 11:</i> Purificación de anticuerpo monoclonal a partir de líquido de ascitis por cromatografía de afinidad en proteína A sefarosa	... 65
<i>Figura 12:</i> Purificación de anticuerpo monoclonal a partir de la fracción no adsorbida de la cromatografía de líquido de ascitis por proteína A sefarosa	... 66
<i>Figura 13:</i> Purificación de glicoproteínas hipofisarias por cromatografía de afinidad en concanavalina A sefarosa	... 68
<i>Figura 14:</i> Purificación de G-cGH por cromatografía de afinidad en inmunoabsorbente (anticuerpo monoclonal $\alpha$ -cGH sefarosa)	... 69
<i>Figura 15:</i> Análisis electroforético de la fracción enriquecida de G-cGH	... 71
<i>Figura 16:</i> Aislamiento de la banda de G-cGH por SDS-PAGE ( R) y <i>western blot</i>	... 73
<i>Figura 17:</i> Digestión por PNGasaF	... 76
<i>Figura 18.</i> Caracterización de los tipos de residuo de oligosacárido presentes en la G-cGH	... 77

<i>Figura 19:</i> Microfotografía que muestra la tinción de una sección de hipófisis de pollo con anticuerpo policlonal $\alpha$ -cGH	...79
<i>Figura 20:</i> Microfotografía que muestra una célula inmunorreactiva al anticuerpo policlonal $\alpha$ cGH	... 80
<i>Figura 21:</i> Microfotografía electrónica (A) en donde se observa la doble marca con partículas de oro de 10 nm para el anticuerpo contra cGH y partículas de 25 nm para la concanavalina A	... 82
<i>Figura 22:</i> Microfotografía electrónica (B) en donde se observa la doble marca con partículas de oro de 10 nm para el anticuerpo contra cGH y partículas de 25 nm para la concanavalina A	... 83
<i>Figura 23:</i> Análisis de bioactividad de G-cGH	... 84
<i>Figura 24:</i> Análisis de unión de G-cGH a receptores hepáticos por desplazamiento de $^{125}$ I-GH	... 85
<i>Figura 25:</i> Curva patrón para el ensayo de ELISA específico y homólogo para rcGH	... 87
<i>Figura 26:</i> Cuantificación de la concentración de GH en tejido hipofisiario (ng GH / mg de proteína) en pollos de diferentes semanas de edad	... 88
<i>Figura 27:</i> Peso de las hipófisis de pollos durante el desarrollo (miligramos)	... 89
<i>Figura 28:</i> Contenido total de cGH por hipófisis durante el desarrollo del pollo	... 90
<i>Figura 29:</i> Luminograma que muestra el <i>western blot</i> de extractos hipofisarios de pollos de diferentes edades	... 92
<i>Figura 30:</i> Proporción relativa de las bandas de 29 kDa y de 26 kDa con respecto al total de bandas inmunorreactivas por carril	... 93
<i>Figura 31:</i> Relación de la proporción hipofisiaria de G-cGH 29 kDa/ cGH 26 kDa durante el desarrollo del pollo	... 94
<i>Figura 32:</i> Curva patrón del ensayo de ELISA de captura con concanavalina A	... 96
<i>Figura 33:</i> Efecto del bloqueo con BSA y con leche descremada BioRad en el ensayo de captura con concanavalina A	... 97
<i>Figura 34:</i> Cuantificación de anticuerpo monoclonal $\alpha$ cGH por ELISA indirecto	...98
<i>Figura 35:</i> Cuantificación de anticuerpo monoclonal por <i>miniblots</i>	...101
<i>Cuadro 4:</i> Secuencia de aminoácidos de hormona de crecimiento de diferentes vertebrados	...106

## LISTA DE ABREVIATURAS

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

AVP	AVP	Arginina vasopresina
ADN	DNA	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
AGL	FFA	Ácidos grasos libres
AMPc	cAMP	Monofosfato de adenosina 3'-5' cíclico
	AP	Fosfatasa alcalilina
ARN	RNA	Ácido ribonucleico
ARNm	mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	ATP	Trifosfato de adenosina
	BCIP	Bromo cloro indolil fosfato
Bmax	Bmax	Capacidad máxima (indica la concentración total de receptores presentes por mg de proteína membranal)
	BSA	Albúmina sérica bovina
cm	cm	centímetro
ConA	ConA	concanavalina A
	Da	daltones
	DAB	3,3'-diaminobencidina
de	ed	días embrionarios
	EDTA	Acido etilendiaminotetracético
	Endo	Endoglicosidasa
	FSH	Hormona estimulante del folículo
g	g	gramo
	GAR	Anticuerpo de cabra contra conejo
Gal	Gal	Galactosa
Glc	Glu	Glucosa
	GC	Glucocorticoides
	GH	Hormona de crecimiento

	cGH	Hormona de crecimiento de pollo
	G-cGH	Hormona de crecimiento de pollo glicosilada
	bGH	Hormona de crecimiento bovina
	hGH	Hormona de crecimiento humana
	pGH	Hormona de crecimiento porcina
	rtGH	Hormona de crecimiento de trucha arcoiris
	GHR	Receptor de Hormona de crecimiento
	GHRH	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
	GH-BP	Proteínas unidoras de Hormona de crecimiento
	GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
	GTH	Hormona gonadotropina
	HRP	Peroxidasa de rábano
	IEF	Isoelectroenfoque
	IGF	Factor de crecimiento tipo insulina
	kDa	Kilodaltones
	kbp	kilo pares de bases
	Ks	Constante de afinidad
	LH	Hormona luteinizante
	LPH	Lipotropina
LVP	LVP	Lisina vasopresina
M	M	Molar
Man	Man	Manosa
min	min	minuto
mg	mg	miligramo
ml	ml	mililitro
μl	μl	microlitro
N	N	Normal
NAcGal	NAcGal	N-acetilgalactosamina
NAcGlu	NAcGlc	N-acetilglucosamina
NANasa		Neuraminidasa

	NBT	nitroazul de tetrazolio
ng	ng	nanogramo
nm	nm	nanometro
	PNGasaF	Péptido N-Glicosidasa F
	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pI	pI	Punto Isoeléctrico
	PL, CS	Lactógeno placentario, somatotropina coriónica
PM		(Marcadores de) Peso Molecular
PRL	PRL	Prolactina
	rcGH	Hormona de crecimiento recombinante
	Rf	movilidad relativa (con respecto al frente)
rpm	rpm	revoluciones por minuto
	RIA	Radioinmuno ensayo
	RRA	Ensayo de radioreceptor
s	s	segundo
S	W	Semana
	SDS	dodecilsulfato de sodio
	SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecilsulfato de sodio
	SRIF	Somatostatina (SS)
	SS	Somatostatina
	STH	Somatotropina (GH)
	TBS	Solución amortiguadora de Tris
	T3	Triyodotironina
	T4	Tetrayodotironina
	TSH	Hormona estimulante de la tiroides
VP	VP	Vasopresina
	WB	<i>Western blot</i>

## ANEXO I

### PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI cGH (MA $\beta$ cGH) POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN PROTEÍNA A SEFAROSA

#### Soluciones

##### **Amortiguador A**

*Glicina 1.5 M, NaCl 3M pH 8.9*

Glicina 56.30g

NaCl 87.66g

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

##### **Amortiguador B**

*Acido cítrico 50mM pH 3.5 (>3)*

Ac. Cítrico monohidratado 5.25g

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

##### **Acido clorhídrico 1mM**

##### **Amortiguador de acoplamiento**

*50mM fosfatos, 0.5 M NaCl pH 7 - 7.6*

(stock 5x)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 43.6g

NaCl 147g

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

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

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

Incubar 0.75 g de proteína A sefarosa (Pharmacia cat. 17-0780-01; 2 mg proteína A/ml gel) -aproximadamente 2.6 ml- con el sobrenadante del resuspendido de líquido de ascitis, en una columna Econo-Pac de BioRad 1.5x12 cm y agitar “*end over end*” durante 30 a 70 min a temperatura ambiente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Liofilizar aproximadamente durante cinco horas.

Determinar la cantidad de proteína por mg de polvo.

Para reconstituir la muestra y tenerla en condiciones óptimas para el acoplamiento con sefarosa 4B, resuspender en agua de la siguiente manera:

3 mg IgG / ml H<sub>2</sub>O para obtener la fuerza iónica del amortiguador de acoplamiento (centrifugar para eliminar agregados).

Capacidad del MAb

A) probabilidad de acoplamiento 1/3

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

C) si se acopla bien existen 2 sitios de unión

capacidad por 1mg de MAb inmobilizado:

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

## ANEXO II

### CROMATOGRAFÍA EN CONCAVALINA A-SEFAROSA

#### Soluciones

##### **Amortiguador de equilibrio**

*Tris 20mM-HCl, NaCl 0.15M, MnCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.0*

Tris 0.6057 g

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

NaCl 2.1915 g

MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.0495 g

CaCl<sub>2</sub> 0.0278 g ó CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0.0368 g

Para preparar 250 ml de solución

##### **Solución de α-D-metil-manósido 10mM**

α-D-metil-manósido 0.1942 g

Disolver en 100 ml de amortiguador de equilibrio

##### **Inhibidores de proteasas**

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

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

Pefabloc (ser proteasas) PM 239.5, 100 mM en agua (2.395 mg/100 ml H<sub>2</sub>O) con una concentración inicial de 1 mM por cada ml de homogenado. Añadir 1 µl de inhibidor por ml del amortiguador para homogeneizar.

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

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

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

##### **Obtención del extracto hipofisiario**

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

Homogeneizar las hipófisis en un politrón durante 30 segundos en posición `5'. Agregar los inhibidores de proteasas. Completar la extracción durante dos horas a 4°C, con agitación magnética (en recipiente c/hielo).

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

Neutralizar el sobrenadante en el potenciómetro agregando HCl 0.5 N hasta alcanzar un pH de 7.0 (<0.5 ml)

### **Protocolo**

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

Realizar 4 lavados con amortiguador de equilibrio (*Tris 20mM-HCl, NaCl 0.15M, MnCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.0*) a 7 ml de resina (concanavalina A-sefarosa *Sigma*), para eliminar el amortiguador preservativo y después transferir a una columna. Dejar sedimentar la resina y comprobar que no haya fugas.

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

Para realizar la cromatografía se utiliza el siguiente equipo:

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

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

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

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

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

Tris 1.2114 g

NaCl 2.922 g

Aforar a 100 ml con agua desionizada

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

Acetato de sodio 0.287 g

NaCl 2.922 g

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

C) Amortiguador para almacenar la columna

*Acetato de sodio 0.1 M, NaCl 1 M, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, MnCl<sub>2</sub> 1mM , azida de sodio al 0.1%, pH 6.0 (10 volúmenes)*

Acetato de sodio	0.7747g			
Azida de sodio	0.1 g			
NaCl	5.844 g			
CaCl <sub>2</sub>	0.0111g	ó	CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	0.0147 g
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.0198g			
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.02033g			

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

Aforar a 100 ml.

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

## ANEXO III

### PURIFICACIÓN DE cGH CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD (MAb $\alpha$ cGH ACOPLADO A SEFAROSA 4B ACTIVADA CON BrCN)

#### Soluciones

##### **Amortiguador (bloquear)**

*Glicina 1.5 M, NaCl 3M pH 8.0*

Glicina 56.30g

NaCl 87.66g

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

##### **Amortiguador A (cargar)**

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

Tris 6.06g

NaCl 8.77g

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

Guardar a 4°C

##### **Amortiguador B (elución)**

*Glicina 50mM, NaCl 150mM pH 3.0*

Glicina 1.88g

NaCl 4.38g

Disolver en 450 ml de agua desionizada. Ajustar y aforar a medio litro.

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

##### **Amortiguador neutralización**

*Tris-HCl 3M pH 8.0*

Tris 36.42g

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

Guardar a 4°C

##### **Amortiguador extracción**

*Tris-HCl 50mM pH 9 - 9.5*

Tris 3.03g

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

#### **Preparación del inmunoadsorbente**

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

Hincharla en HCl 1mM y lavarla con 200 ml de HCl/g de sefarosa (en etapas), utilizando una manguera de vacío con trampa. El último lavado realizarlo con amortiguador de acoplamiento (fosfatos 50mM, NaCl 0.5M, pH 7-7.6). Montar en una columna Poly-Prep de Bio-Rad, cónica de 0.8x4 cm con capacidad de 2 ml para lecho y 10 ml eluyente.

Después de que la resina alcance el pH de 7-7.6, incubarla con 18 ml de MAb $\alpha$ cGH-IH7 (aproximadamente 18 mg de IgG), agitando “end over end” a temperatura ambiente durante tres horas. Colectar el líquido en una probeta de 100 ml y leer la D.O. contra el amortiguador de acoplamiento como blanco. Calcular la eficiencia de acoplamiento.

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

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

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

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

## **Cromatografía**

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

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

Eluir con amortiguador B. Recolectar alícuotas de 1000  $\mu$ l en tubos que contengan 100  $\mu$ l Tris-HCl 3m pH 8.0 para neutralizar.

Juntar las fracciones de mayor absorbencia a 280nm y dializarlas. Se pueden concentrar usando una membrana spectrapor 3 vs PEG 8000 al 20% y posteriormente con agua milliq. Reconstituir la columna con los tres ciclos de lavado descritos anteriormente.

**ANEXO IV**  
**ELECTROFORESIS**  
**SDS-PAGE**

**Soluciones**

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

*30% acrilamida; 0.8% de bis-acrilamida*

30g de acrilamida

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

cuanto baste para 100ml de DDH<sub>2</sub>O

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

Nota: muy tóxico, usar guantes.

**Sln B Amortiguador para el gel inferior o separador**

*1.5 M Tris-HCl, pH 8.8*

18.17 g de Tris-base

Mezclar con 50ml de DDH<sub>2</sub>O en el agitador magnético, agregar HCl 1N hasta que el pH sea de 8.8, ajustar a 100ml y conservar a 4°C

**Sln C Amortiguador del gel superior o concentrador:**

*0.5 M Tris-HCl, pH 6.8*

6.06 g de Tris-base

Mezclar con 50ml DDH<sub>2</sub>O en agitador magnético, agregar HCl 1N hasta que el pH sea de 6.8, ajustar a 100ml y conservar a 4°C

**Sln D SDS 10%**

5g de SDS (pesar en el vaso)

Ajustar a 50ml y conservar a 4°C

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

Tris-base 7.55 g

glicina 36 g

SDS 2.5g

Ajustar a 500ml, mezclar y guardar a 4°C. No ajustar pH.

**Sln E Amortiguador de la muestra**

Tris-HCl 0.5M 10% SDS pH6.8

H<sub>2</sub>O 4.0 ml

C 1.0 ml

D 1.6 ml

Glicerol 0.8 ml

Azul de bromofenol 0.2 ml (0.5%)

2-β mercaptoetanol 0.4(reductoras)

Para condiciones no reductoras se ponen 4.4 ml de H<sub>2</sub>O

**PSA Persulfato de amonio 10%**

100 mg persulfato de amonio en 1ml de H<sub>2</sub>O

Preparar fresco

### Solución para teñir geles

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

### Solución para secar geles

Etanol	35%
Glicerol	2%

### Preparación de los geles

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

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

Atemperizar soluciones metiendo los frascos en un baño de agua

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

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

Pesar el persulfato de amonio (la solución debe ser preparada fresca cada vez). Hidratar 0.0100g en 100µl aproximadamente (10%). Preparar la solución del gel separador según la concentración requerida (ver tabla: para 10 ml suficiente para 2 geles de 5X9cm de un mm de grosor), sin el SDS ni los catalizadores para desgasificar durante 5 minutos. Una vez desgasificado añadir los catalizadores.

GEL RESOLVEDOR						GEL CONCENTRADOR (4%)	
	7.5%	10%	12%	12.5%	15%		
H <sub>2</sub> O (ml)	4.85	4.35	3.35	3.2	2.35	H <sub>2</sub> O (ml)	3.05
Solución B (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	Solución C (ml)	1.25
Solución A (ml)	2.5	3.0	4.0	4.15	5.0	Solución A (ml)	0.65
DESGASIFICAR 5 MINUTOS							
Solución D (µl)	100	100	100	100	100	Solución D (µl)	50
TEMED (µl)	5	5	5	5	5	TEMED (µl)	5 o 10*
PSA 10% (µl)	50	50	50	50	50	PSA 10% (µl)	25

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

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

Secar el agua introduciendo un pedazo de papel filtro.

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

## **Electroforesis**

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

Hervir las muestras 5 minutos.

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

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

## ANEXO V

### ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)

#### Soluciones

Amortiguador de transferencia

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

Tris 9.09g

Glicina 43.2g

Disolver en un litro de agua desionizada y añadir:

Metanol 600 ml

Aforar a tres litros de agua desionizada estéril

#### Protocolo de transferencia

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

## ANEXO VI

### REVELADO WESTERN BLOT

#### TINCIONES

INMUNOTINCIÓN C/PEROXIDASA(HRP): QUIMIOLUMINISCENCIA; DAB; CLORONAFTOL

#### **Soluciones**

##### **Amortiguador salino de tris (TBS) 5x**

*Tris 100mM, NaCl 2.5M, pH 7.5*

Tris 12.11g

NaCl 146.1g

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

Guardar a 4°C

##### **Solución bloqueadora**

*Leche descremada en TBS al 5%*

Leche descremada 5g

TBS 1x 100 ml

Mezclar hasta que se disuelva.

##### **Solución de lavado**

*TTBS, pH 7.5*

Tris 20mM

NaCl 500mM

Tween 20 0.05%

450µl de tween 20 a 900 ml de TBS 1x

##### **Solución del primer anticuerpo**

*Amortiguador (1% leche descremada en TTBS)*

Leche descremada 2g

TTBS 200ml

Disolver el primer anticuerpo con un título adecuado 1:3,000 20µl en 60 ml

(o 1:4000 25µl en 100 ml )

##### **Solución del segundo anticuerpo o anticuerpo conjugado BioRad**

(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase)

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

Dilución 1:3,000.

##### **Solución de sustrato**

Mezclar cantidades iguales del reactivo 1 y 2 de ECL para quimioluminiscencia.

#### **Protocolo**

##### **Tinción**

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

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

Incubar con el primer anticuerpo  $\alpha$ -cGH en suspensión de leche descremada al 1% TTBS pH 7.5 toda la noche con agitación constante (con una dilución del anticuerpo 1:3,000; 20 $\mu$ l en 60 ml). Lavar las membranas con 40ml TTBS pH 7.5 durante quince minutos por 3 veces.

Incubar con el segundo anticuerpo  $\alpha$ -IgG-AP (fosfatasa alcalina) o  $\alpha$ -IgG-HRP (peroxidasa), dependiendo del equipo de revelado, 1:3,000 en TTBS con leche descremada 1% (20 $\mu$ l de anticuerpo en 60 ml para cada membrana). Incubar dos horas. Enjuagar con 40 ml TTBS quince minutos por 3 veces.

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

(A) Para **revelar quimioluminiscencia** se preparan 10 ml de solución de sustrato:

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

### **Autorradiografía**

En un cassette para este propósito colocar las membranas y sobre ellas un película Kodak Biomax de 8-10". Cerrar y exponer por un minuto. Tomar la película con unas pinzas y sumergirla en la solución de revelado por un minuto. Lavarla con agua durante un minuto. Sumergir en la solución fijadora por un minuto. Lavar con agua durante un minuto. Realizar el proceso en cuarto oscuro y frío.

### **(B) Revelado DAB/Cloronaftol**

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

4-cloronaftol	30 mg
metanol frío	10 ml
PBS	50 ml
peróxido de hidrógeno	30 $\mu$ l

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

diaminobencidina	25mg
PBS	100ml
peróxido de hidrógeno	20 $\mu$ l

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

## TINCIÓN CON LECTINAS CONJUGADAS CON HRP:

### Soluciones

#### **Amortiguadores como en inmunotinción**

#### **Solución bloqueadora**

*Albúmina en PBS al 3%*

Albúmina	3g
PBS 1x	100 ml

Mezclar hasta que se disuelva

#### **Solución de lectina-HRP**

*Amortiguador (1% albúmina en TPBS)*

Albúmina	2g
TPBS	200ml

Resuspender un stock de lectina-HRP con una dilución del anticuerpo 4-20µg/ml con TPBS.

### Tinción

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

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

### Revelado

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

## INMUNOTINCIÓN CON OXIDACIÓN/ESTREPTAVIDINA-BIOTINA,AP

### Soluciones

#### **Amortiguador TBS 1x**

*Tris 50mM, NaCl 27mM, pH 7.2*

Tris	6.05g
NaCl	1.60g

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

#### **Amortiguador de acetatos**

*Acetato de sodio 200mM, pH 5.5*

440 ml 200 mM AcNa

AcNa  $3\text{H}_2\text{O}$             12 g  
disolver en 440 ml de agua.

60 ml 200 mM AcAc

AcAc glacial            690  $\mu\text{l}$   
en 60 ml de agua.

Combinar las soluciones stock. Checar pH.

#### **Amortiguador de fosfatos (PBS) 5x**

*Fosfatos 9mM, NaCl 27m, pH 7.2*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$                     575 mg

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$             100 mg

NaCl                            800 mg

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

#### **Revelador**

*Tris 100mM, pH 9.5*

Tris                            1.21 g

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$             1.00 g

NaCl                            0.58 g

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

#### **Amortiguador de acetatos/EDTA**

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

200 mM AcNa pH 5.5            300 ml.

EDTA                            1.14 g

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

### **Protocolo**

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

2. Añadir 10  $\mu\text{l}$  de solución de peryodato (reactivo G, contenido disuelto en 1.5 ml de agua). Incubar 20 minutos a temperatura ambiente en obscuridad.

3. Añadir 10  $\mu\text{l}$  de solución de bisulfito (reactivo H, cada tableta se disuelve en 4 ml de amortiguador de acetato 200 mM). Dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

4. Añadir 5  $\mu\text{l}$  de hidrazida (reactivo B, que se prepara disolviendo el contenido del vial en 500  $\mu\text{l}$  de DMF). Dejar incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.

## 5. Correr SDS-PAGE y WB

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

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

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

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

10. Preparar el revelador:

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

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

10 ml amortiguador color (revelador)

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

*Si se realiza primero la electroforesis y transferencia:*

### 1. PAGE-WB

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. Preparar el revelador:

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

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

10 ml amortiguador color (revelador)

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

\*\*\* En caso de contar con estreptavidina conjugada con peroxidasa, todos los lavados pueden realizarse con PBS y el revelado se lleva a cabo como en la inmunotinción.

## ANEXO VII

### INMUNOHISTOQUÍMICA

#### Soluciones

##### **Amortiguador salino de tris (TBS) con tritón 10x**

Tris	12g
NaCl	90g
Timerosal	0.04 g
Triton X100	10 ml

Agregar 900 ml de agua desionizada, mezclar, ajustar el pH a 7.6 y aforar a un litro.  
Guardar a 4°C

##### **Amortiguador-substrato salino de tris (TBS) 10x**

*Tris 50mM, pH 7.6*

Tris	60.5g
------	-------

Agregar 900 ml de agua desionizada, mezclar, ajustar el pH a 7.6 y aforar a un litro.  
Guardar a 4°C

#### **Lugol**

KI	10g
I <sub>2</sub>	5g

Mezclar en un litro de agua toda la noche hasta que se disuelva.

#### **Solución tiosulfato de sodio**

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5g
---	----

Disolver en 100 ml de agua desionizada.

#### **Soluciones para desparafinar y para rehidratar tejido (alcohol-xilol)**

Alcohol 60, 70, 80, 95% y alcohol absoluto (etanol)

Mezcla alcohol-xilol 1:1

Xilol

#### **Solución peróxido hidrógeno (vs peroxidasa endógena)**

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> TBS al 1%*

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	3 ml
TBS 1x	90 ml

#### **Solución bloqueadora**

*Suero normal de cabra 10%*

Suero preinmune	1 ml
TBST 1x	10 ml

*Leche descremada en TBS al 5%*

Leche descremada	5g
TBS 1x	100 ml

Mezclar hasta que se disuelva.

### **Solución del primer anticuerpo**

*Amortiguador (1% leche descremada en TTBS)*

Leche descremada                    2g  
TTBS                                    200ml

Disolver el primer anticuerpo con un título adecuado 1:3,000    20µl    en 60 ml

### **Solución del segundo anticuerpo o anticuerpo conjugado BioRad**

(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase)

Diluir el anticuerpo conjugado en TTBS con 1% de leche descremada. Dilución 1:200.

### **Solución de sustrato**

diaminobencidina                    25mg  
TBS sustrato                            200ml  
peróxido de hidrógeno                75µl

Se puede añadir sulfato de nickel 2.5% para dar un mayor contraste en la tonalidad de la marca.

### ***Protocolo***

Fijar las hipófisis de pollo en paraformaldehído 4% o BHS al menos por 24 horas. Incluir en parafina después de deshidratar los tejidos en soluciones de etanol de concentración creciente, pasando por alcohol absoluto, mezcla xilol/etanol 1:1 hasta llegar a xilol y los baños de parafina. Montar los tejidos en bloques de parafina apropiados para montarse en microtomo. Obtener cortes longitudinales de 4 µm con ayuda del microtomo, sobre un baño de agua tibia, conservando la seriación. Montar dos o tres cortes sobre laminillas de alta fijación (superfrost).

Montar las laminillas en la canastilla de las cajas coplin y desparafinarlas pasándolas por los siguientes solventes: Xilol 100%, Xilol 100%, etanol 95%, etanol 70%, etanol 50%, agua destilada, 5 minutos por cada solvente. Después continuar Lugol, Lugol (para eliminar el mercurio en caso de haber fijado con BHS), tiosulfato de sodio 5% (para eliminar el yodo del lugol), agua destilada, 2 minutos en cada solución.

Transferir las laminillas a una cámara húmeda, con los cortes hacia arriba. Enjuagar las secciones con TBST. Asegurarse de que las laminillas no toquen los bordes de la cámara ni se toquen entre ellas, para evitar derramamientos y mezcla de reactivos.

Incubar las secciones durante una hora con la solución de peróxido de hidrógeno al 1% para eliminar la marca de peroxidasa endógena. Lavar las laminillas con TBST.

Incubar las secciones con suero preinmune (normal) de cabra para bloquear los sitios alternos. El suero debe ser de la misma especie en que fue generado el anticuerpo conjugado. Diluir el suero de cabra 1/10 con TBST y aplicar 0.5-0.75 ml a cada laminilla. También se puede utilizar leche descremada como agente bloqueante. Incubar por una hora a temperatura ambiente. De aquí en adelante se debe evitar el secado de las secciones.

Remover el agente bloqueador y lavar con TBST (quitar el exceso de líquido con una toallita de papel sin tocar las secciones); aplicar 0.5-0.75 ml de anticuerpo primario por laminilla. Incubar las secciones toda la noche a temperatura ambiente (o si se prefiere a 4°C). Conservar una o dos laminillas sin incubar con anticuerpo como controles negativos.

Enjuagar las secciones con TBST tres veces, reposando 5-15 minutos cada vez. Incubar las secciones con el anticuerpo secundario –conjugado- diluído 1:200 en TBST. Si se conservaron dos laminillas sin anticuerpo primario, una de ellas puede continuar sin incubarse con el secundario, correspondiendo a control negativo para verificar peroxidasa endógena o tinción excesiva fondo inespecífico. Incubar por dos horas a temperatura ambiente. Enjuagar las secciones con TBST. Si la señal del inmunocomplejo es muy débil se puede optar por incubar con un secundario conjugado a biotina y con el complejo avidina peroxidasa (ABC Vectastain, Vector, por ejemplo) incubando las laminillas media hora más según indicaciones del fabricante. Para la tinción con lectinas conjugadas con peroxidasa, el tratamiento es similar, considerando que el agente bloqueador sea albúmina 3% y sólo es un paso para la incubación de los cortes, directamente con el conjugado.

Enjuagar por último con amortiguador de sustrato. Sumergir las laminillas en solución de DAB (recién preparada) dejando que la reacción proceda por diez a treinta minutos hasta que el precipitado negro sea evidente (simple vista). Los controles negativos pueden incubarse quince minutos adicionales. Detener la reacción enjuagando con agua destilada. La solución de DAB se desecha de forma apropiada en un contenedor al que se adiciona hipoclorito (cloro).

Para conservar las preparaciones se pueden montar con alguna resina, de preferencia Entellan, para lo cual se necesita deshidratar a las secciones (pueden dejarse secar durante 2 a 5 días, no recomendable). La deshidratación se lleva a cabo por inmersión en los solventes en secuencia: alcohol 50%, alcohol 70%, alcohol 100%, alcohol 100%, alcohol-xilol 1:1, xilol, xilol. Al salir del xilol colocar una gota de resina y acomodar el cubreobjetos para que la resina se distribuya por capilaridad. Dejar secar.

Nota: si no se utilizó la solución de peróxido de hidrógeno al 1% para bloquear la peroxidasa endógena, los eritrocitos se tiñen abundantemente.

## ANEXO VIII

### INMUNOCITOQUÍMICA

#### Soluciones

##### **Amortiguador salino de tris (TBS) con tritón 10x**

Tris	12g
NaCl	90g
Timerosal	0.04 g
Triton X100	10 ml

Agregar 900 ml de agua desionizada, mezclar, ajustar el pH a 7.6 y aforar a un litro.  
Guardar a 4°C

##### **Amortiguador-substrato salino de tris (TBS) 10x**

*Tris 50mM, pH 7.6*

Tris	60.5g
------	-------

Agregar 900 ml de agua desionizada, mezclar, ajustar el pH a 7.6 y aforar a un litro.  
Guardar a 4°C

#### **Lugol**

KI	10g
I <sub>2</sub>	5g

Mezclar en un litro de agua toda la noche hasta que se disuelva.

#### **Solución tiosulfato de sodio**

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5g
---	----

Disolver en 100 ml de agua desionizada.

#### **Soluciones para desparafinar y para rehidratar tejido (alcohol-xilol)**

Alcohol 60, 70, 80, 95% y alcohol absoluto (etanol)

Mezcla alcohol-xilol 1:1

Xilol

#### **Solución peróxido hidrógeno (vs peroxidasa endógena)**

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> TBS al 1%*

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	3 ml
TBS 1x	90 ml

#### **Solución bloqueadora**

*Suero normal de cabra 10%*

Suero preinmune	1 ml
TBST 1x	10 ml

*Leche descremada en TBS al 5%*

Leche descremada	5g
TBS 1x	100 ml

Mezclar hasta que se disuelva.

### **Solución del primer anticuerpo**

*Amortiguador (1% leche descremada en TTBS)*

Leche descremada                    2g  
TTBS                                    200ml

Disolver el primer anticuerpo con un título adecuado 1:3,000    20µl    en 60 ml

### **Solución del segundo anticuerpo o anticuerpo conjugado BioRad**

(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase)

Diluir el anticuerpo conjugado en TTBS con 1% de leche descremada. Dilución 1:200.

### **Solución de sustrato**

diaminobencidina                    25mg  
TBS sustrato                            200ml  
peróxido de hidrógeno                75µl

Se puede añadir sulfato de nickel 2.5% para dar un mayor contraste en la tonalidad de la marca.

### *Protocolo*

Fijar las hipófisis de pollo en glutaraldehído 0.5 % al menos por 2 horas. Incluir en resina LR white después de deshidratar los tejidos en soluciones de etanol de concentración creciente hasta 70%. Identificar la sección de interés y orientarla hacia el cono de una pirámide con ayuda de una navaja. Montar la pirámide en el ultramicrotomo y obtener cortes gruesos para verificar la zona de corte. Una vez corroborada la sección, obtener cortes ultrafinos <90 nm (reflejan la luz con un tono dorado) conforme a las instrucciones de manejo del ultramicrotomo. Recoger los cortes ultrafinos en rejillas hexagonales de zinc previamente forradas con formvar.

Transferir las preparaciones a una placa excavada con algunas gotas de solución buffer de fosfatos y glicina para bloquear los sitios activos de los aldehídos. Lavar con solución buffer de fosfatos, tres veces por 5-15 minutos cada vez. Tratar de que la rejilla flote con las secciones boca abajo (en contacto íntimo con las soluciones).

Incubar las secciones con suero preinmune (normal) de cabra para bloquear los sitios alternos. El suero debe ser de la misma especie en que fue generado el anticuerpo conjugado. Diluir el suero de cabra 1/10 con TBST. También se puede utilizar leche descremada o albúmina como agente bloqueante. Incubar por una hora a temperatura ambiente.

Lavar las secciones con PBST e incubar con anticuerpo primario toda la noche a temperatura ambiente (o si se prefiere a 4°C). Considerar la preparación para controles negativos.

Enjuagar las secciones con TBST tres veces, reposando 5-15 minutos cada vez. Incubar las secciones con el anticuerpo secundario –conjugado- diluído 1:40 en PBST, por dos horas a temperatura ambiente. Enjuagar las secciones con PBST.

Contrastar las preparaciones con acetato de uranilo 5% y citrato de plomo 0.1% y observarlas en el microscopio electrónico (JEOL 100B)

La tinción con concanavalina A se llevó a cabo de la misma manera considerando el conjugado en dilución 1:20. La doble inmunotinción se llevó a cabo en secuencia. Incubando caras opuestas de la rejilla con anticuerpo y con lectina. Documentar los hallazgos con imágenes obtenidas al microscopio.

## ANEXO IX

### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ENSAYO DE PROTEÍNA *Bio-Rad*

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

#### *Microensayo*

#### PROCEDIMIENTO

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

Preparación de la solución stock para la curva:

Solución 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ : 104.2 $\mu\text{l}$  (150 $\mu\text{g}$ ) de la solución comercial de BSA (1.44 mg/ml)  
1395.8  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>ODD

#### Ensayo:

Tubo	Concentración de BSA (X)	Volúmen de la sol. de BSA	H <sub>2</sub> O	Reactivo de Bradford
1	-	-	800 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
2	1 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{l}$	790 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
3	5 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{l}$	750 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
4	10 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{l}$	700 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
5	15 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{l}$	650 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$

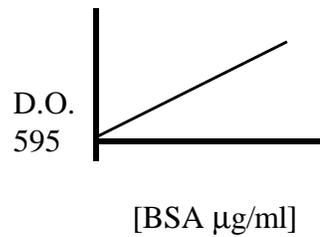
6	20µg/ml	200µl	600µl	200µl
7		5µl/muestra	795µl	200µl
8		10µl/muestra	790µl	200µl

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

**Calculos:**

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

**Gráfica:**



## ANEXO X

### ELISA INDIRECTO PARA LA DETERMINACIÓN DE cGH TOTAL ENSAYO POR DESPLAZAMIENTO (COMPETENCIA)

Preparación de soluciones

*Amortiguador de fosfatos (PBS 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.8)*

#### **Solución A: PB 0.5 M pH 7.8**

Fosfato de sodio monobásico (PM 138) 0.5 M      3.45 g en 50 ml

Fosfato de sodio dibásico (PM 142) 0.5 M      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 afora a 200 ml.

#### **Solución B: PBS 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.8**

Se toman 20 ml de la solución A, se agregan 8.76 g de NaCl y se afora a 1000 ml con DDH<sub>2</sub>O.

#### **Solución TPBS 0.01M, NaCl 0.15M, Tween 20 0.05% pH 7.8**

A 1000 ml de PBS se añaden 500 µl de tween 20 y se agita.

#### **Solución para bloquear y de incubación con anticuerpo TPBS, BSA 1% o leche descremada 3%**

Se solubiliza 1 g de BSA o 3 g de leche descremada en 100 ml de TPBS

La solución del primer anticuerpo –antisuero policlonal generado en conejo contra cGH- se utiliza 1:108500 (para que la dilución final sea 1:217000); la solución del segundo anticuerpo –anti IgG de cabra contra conejo acoplado a peroxidasa de rábano GAR-HRP- se utiliza 1:3,000.

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

Carbonato de sodio (PM 105.99) 0.1M      1.06g en 100 ml

Bicarbonato de sodio (PM 64.01) 0.035M      0.224 g en 100 ml

El pH resulta cercano a 10.3

#### **Amortiguador de citratos 0.1M, pH 5.0**

Solución 5X de citratos (0.5M, pH 5.0)

Citrato de sodio (PM 294.1) 0.493 M      14.5 g en 100 ml

Acido cítrico monohidratado (PM 192) 0.007 M      1.35g en 100 ml

Se solubiliza en 80 ml con DDH<sub>2</sub>O, se ajusta a pH 5-5.2 con HCl y se afora a 100 ml con agua. Para preparar el amortiguador de cada ensayo, la solución 5X se diluye 5 veces con DDH<sub>2</sub>O.

*Solución sustrato*

Diluir aproximadamente 0.84 g de polvo amortiguador en 50 ml por cada tableta de ABTS según indicaciones del fabricante.

### Procedimiento

1. Preparar las soluciones de lavado, forrado y la curva estándar. Colocar las soluciones de lavado en los recipientes destinados en el procesador automático. Si se van a almacenar por largo tiempo, añadir timerosal al 0.001% a esta solución.

2. Se prepara la solución de hormona de crecimiento de pollo recombinante (rcGH) para forrar la placa para inmunoanálisis (Dynatech-immulon 2HB de 96 pozos), de manera que en cada pozo se obtengan 12 ng (en un volumen de 100 µl). Disolver 1.2 µg de rcGH en 10 ml de amortiguador de carbonatos. Se agregan 100 µl de esta solución a cada pozo y se tapa con cinta adhesiva. Se permite el pegado de la hormona a las paredes del pozo durante 16 horas a 4°C.

96 pozos X 100 µl = 9600 µl (9.6 ml)	10 ml / CAJA
12 ng rcGH/pozo X 96 pozos = 1152 ng	1200 ng/ 10 ml
Se necesita una solución de 0.12 µg/ml	

Con una **solución stock rcGH 0.1 µg/µl**

	para:	colocar
1.2 µg	10 ml carbonatos	12 µl
<b>1.32 µg</b>	<b>11 ml carbonatos</b>	<b>13.2 µl</b>
1.8 µg	15 ml carbonatos	18 µl

3. En tubos eppendorf de 1 ml se prepara una curva estándar de hormona de crecimiento, con suficiente volumen para tener varias réplicas. Para 9 replicados, se diluyen 10.24 µg de hormona de crecimiento de pollo recombinante (10.24 µl de una solución de 1µg/µl rcGH o 102.4µl de una solución de 0.1µg/µl) en 1 ml de PBS. Realizar esta operación por duplicado para obtener además un control “A” (testigo sin primer anticuerpo). Para la siguiente concentración de proteína se toman 500 µl de la primer solución y se mezclan con 500 µl de PBS, y así sucesivamente nueve veces. A continuación se añaden 500 µl de la solución de primer anticuerpo (αcGH 1:108500) para obtener un total de 1 ml. Se prepara además un control “B” sin hormona de crecimiento que representa el punto de máxima unión. Estas soluciones se incuban durante 16 h a 4°C. La curva tiene los siguientes puntos:

ng/pozo	A	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	B
PBS	500	0	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Sol anterior	*	*	500	500	500	500	500	500	500	500	500	-
Posteriormente se añadió:												
1er Ab	0	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

\* 500  $\mu\text{l}$  de la solución inicial 10.24  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de rcGH

*Muestras problema:* Se realiza una dilución equivalente de la muestra en cuestión para el número de replicados previsto. Para un volumen de 200  $\mu\text{l}$  se diluye 100  $\mu\text{l}$  de la muestra con  $\mu\text{l}$  de la solución de primer anticuerpo.

Con una **solución stock rcGH 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$**  para la curva estandar

Se necesitan	para:	colocar	
10.24 $\mu\text{g}$	1 ml	102.4 $\mu\text{l}$	(+897.6 $\mu\text{l}$ PBS)
15.36 $\mu\text{g}$	1.5 ml	153.6 $\mu\text{l}$	(+1484.64 $\mu\text{l}$ PBS)
			2 X 742.32 $\mu\text{l}$

Con una **solución de anticuerpo 1° (antisuero) 1:10**

1.38  $\mu\text{l}$  para 15 ml de solución TPBS con leche 1%

4. Una vez completado el tiempo de incubación para el forrado de la placa, se lavan los pozos 5 veces con amortiguador de TPBS; al final de los lavados, los pozos se secan volteando la placa boca abajo y dando varios golpes firmes sobre papel absorbente.

5. Se añaden 100  $\mu\text{l}$  de la solución bloqueadora (TPBS con BSA o leche descremada) a cada pozo, se sella la placa con la cinta adhesiva y se deja incubando durante una hora a temperatura ambiente.

6. Se lava nuevamente la placa conforme al paso No. 4

7. Se añaden 100  $\mu\text{l}$  por pozo de las diferentes concentraciones de la curva patrón de cGH y de las muestras problema. Se incuba la placa durante dos horas a temperatura ambiente.

8. Se lava la placa.

9. Se añade a cada pozo 100  $\mu\text{l}$  de la solución de segundo anticuerpo 1:3,000, se sella la placa y se deja incubando durante dos horas a temperatura ambiente.

Con una **solución de anticuerpo 2° comercial**

2.5  $\mu\text{l}$  para 15 ml de solución TPBS con leche 1%

10. Se lava la placa.

11. Se prepara la solución de revelado al momento de su uso: para 15 ml de solución se mezclan 6 mg de ortofenilendiamina, 150  $\mu\text{l}$  de la solución de peróxido de urea y 14.85 ml del amortiguador de citratos. Bajo condiciones de oscuridad se agregan 100  $\mu\text{l}$  de esta solución a cada pozo, se sella la placa con la cinta adhesiva y se deja incubar durante quince minutos.

12. Se mide la absorbencia de cada pozo a 405 nm de longitud de onda. Se grafica la curva patrón contra la concentración de cGH con la proporción de absorbencia de cada punto con respecto de la solución "B" considerada como el 100% restando previamente el promedio de la lectura para la solución blanco "A".

## ANEXO XI

### ELISA INDIRECTO PARA LA DETERMINACIÓN DE G-cGH ENSAYO PILOTO DE CAPTURA CON CONCAVALINA-A

Se preparan las mismas soluciones que para el ensayo por desplazamiento, excepto que en lugar de la solución de carbonatos se utiliza un amortiguador de:

**Acetato de sodio 0.1M, NaCl 0.15M, MnCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM pH 7.0**

Se disuelven 0.78 g de acetato de sodio en 50 ml de DDH<sub>2</sub>O y se ajusta el pH; se añaden 0.8766 g de NaCl, .0147g de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O y 0.01979 g de MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O y se afora a 100 ml.

Con este amortiguador se preparan 10 u 11 ml de una solución de 1 mg / ml de concanavalina A. Se añaden 100 µl de esta solución a cada pozo para forrar la placa con esta lectina. Se dejó incubando 48 hs a 4°C.

**Con una solución de concanavalina A 100 mg en 15 ml de amortiguador**

Se toman 1.65 µl de esta solución para 11 ml de solución para forrar (+9.35 ml de amortiguador). Las placas estándar tienen pocitos con altura de 0.9 cm y diámetro 0.65 cm, lo cual nos proporciona una superficie de 0.332 cm<sup>2</sup> en la base y 1.838 cm<sup>2</sup> cilindro (paredes): 2.17 cm<sup>2</sup> en total para 300 µl de volumen; con 100 µl se tiene una superficie de 0.945 cm<sup>2</sup>. Considerando que el PVC pega aproximadamente 100 ng/pozo (300 ng/cm<sup>2</sup>) con un máximo de pegado de 1 microgramo/pozo (2 microgramos/ml) (*Harlow and Lane, 1988*) o de 50-500 ng/50 µl la solución de concanavalina es suficiente para completar el forro.

Se lavó la placa y se bloqueó con 100 µl de BSA o leche 3% en PBS durante 72 hs a 4°C.

Para la curva estándar se utilizó extracto hipofisiario en una concentración de proteínas 12.7732 µg/µl (que teóricamente contiene el 20% de GH y el 5% de esto es G-GH, es decir 0.1277 µg/µl). Esta solución se diluyó para obtener la concentración teórica de 0.00320 µg/µl de G-GH. Se realizaron diluciones seriadas de 250 µl de cada solución con 250 µl de PBS hasta una concentración teórica de 0.0097656 µg/µl.

Después de bloquear la placa, se lavó y se añadieron 100 µl de cada solución de la curva patrón y se dejó incubar por 24 hs a 4°C. Una vez concluída la incubación, se añadieron 100 µl del primer anticuerpo 1:217000 y se dejó incubar por 1 hora más a temperatura ambiente. Se lavó la placa y se incubó con el segundo anticuerpo 1:3,000 por una hora a temperatura ambiente. Se lavó y se reveló de la misma forma que con el ensayo de desplazamiento.

Se manejaron tres controles: uno con hormona de crecimiento sin segundo anticuerpo, otro con segundo y primer anticuerpo pero sin hormona de crecimiento y uno sólo con segundo anticuerpo.

## ANEXO XII

### PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA VARIANTE GLICOSILADA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO DE POLLO

La preparación de una población homogénea de anticuerpos con especificidad determinada es un objetivo de largo plazo en la investigación inmunoquímica, que se logró gracias a Köhler y Milstein (1975) quienes desarrollaron una técnica que permite el crecimiento de poblaciones clonales de células. En esta técnica una célula secretora de anticuerpos aislada de un animal inmunizado se fusiona con una célula de mieloma, un tipo de célula B tumoral. Esta célula híbrida o *hibridoma* puede mantenerse *in vitro* y continuar secretando anticuerpos con especificidad determinada. Los anticuerpos producidos por hibridomas se conocen como anticuerpos monoclonales.

La utilidad de los anticuerpos monoclonales se debe a tres características: su especificidad de unión, su homogeneidad y la habilidad de producción en cantidades “ilimitadas”. Además, otra ventaja en la producción de hibridomas es que se pueden utilizar antígenos impuros para producir anticuerpos específicos ya que los hibridomas son clonados a partir de una sola célula, y los anticuerpos monoespecíficos pueden producirse aún con inmunizaciones con mezclas complejas de antígenos.

Pueden prepararse hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales específicos para una amplia gama de epítopes, y cualquier sustancia que provoque una respuesta humoral puede utilizarse para preparar estos anticuerpos, incluyendo proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Sin embargo, el tiempo de preparación de anticuerpos monoclonales es mayor que el de policlonales, y no siempre es la mejor elección para ciertas técnicas inmunoquímicas. En teoría se pueden utilizar para todas las tareas que utilizan policlonales, pero en la práctica es difícil producir el anticuerpo monoclonal preciso que se requiere. Los policlonales son generalmente buenos para teñir células, inmunoprecipitación, “immunoblots” e inmunoensayos con antígeno marcado; el uso de un pool de monoclonales es excelente para estos mismos objetivos. Por su parte la respuesta de los monoclonales individuales para los ensayos mencionados depende del anticuerpo, aunque generalmente son buenos para inmunoensayos con anticuerpo marcado; también se utilizan para purificación por inmunoafinidad (dependiendo del anticuerpo).

Los hibridomas se originan de fusionar dos células, cada una con propiedades necesarias para obtener una exitosa célula híbrida; las células de mieloma proveen los genes correctos para una división celular “continuada” en cultivo, mientras que las células secretoras de anticuerpos proveen los genes funcionales de inmunoglobulinas. Se necesitan resolver principalmente tres problemas técnicos para lograr una fusión: encontrar las células compatibles, definir las condiciones para una fusión eficiente y escoger un sistema apropiado para seleccionar las células híbridas de las células que no se fusionaron.

Se pueden generar mielomas en pocas líneas de ratones inyectando aceite mineral en el peritoneo. Muchos de los primeros mielomas se aislaron de ratones BALB/c por Potter

(1972) y estas células se denominaron como MOPC (*Mineral Oil PlasmaCytoma*). Los mielomas tienen toda la maquinaria celular necesaria para la secreción de anticuerpos, y algunos secretan estas proteínas. Para impedir la producción de hibridomas que secreten más de un tipo de anticuerpo, los mielomas usados para fusión se han seleccionado por la falta de producción de anticuerpos funcionales.

	BALB/c MOUSE		
	Mineral Oil Injection		
	MOPC 21 (Carried as a Tumor)		
	Established as Cell line		
	P3K		
Select for HPRT(-)		Select for Nonsecretion and HPRT(-)	
P3-X63Ag8		NSI/1-Ag4-1	
Select for Nonexpression	Fuse to Spleen Cells	Select for APRT(-)	Select for Nonexpression
	Subclone		
X63-Ag8.653	Sp2/O-Ag14	Fox-NY	NSO/1
	Fuse with Self		
	FO		

La otra célula para la fusión se aísla de animales inmunizados. Estas células deben contener los genes rearrreglados para inmunoglobulinas que especifican el anticuerpo deseado. Dadas las dificultades para separar las células que servirán para la fusión, éste proceso se realiza con una población mezclada de células de un órgano linfóide de un animal inmunizado.

Se pueden preparar hibridomas a partir de mielomas y células secretoras de anticuerpo de diferentes especies, pero el número de hibridomas viables se incrementa dramáticamente si las especies son muy parecidas, o mejor aún, de la misma especie, y de la misma línea porque se permite el crecimiento posterior de los hibridomas como tumores en dicha línea.

En teoría, la fusión se puede efectuar con cualquier fusógeno, pero en la práctica se utiliza el polietilén glicol (PEG) en forma rutinaria. El PEG fusiona las membranas plasmáticas de células adyacentes de mieloma o células secretoras de anticuerpo, formando una sola célula con dos o más núcleos. Este heterokaryon retiene los núcleos hasta que las membranas nucleares se disocian antes de la mitosis. Durante la mitosis y los siguientes ciclos de división, los cromosomas individuales se segregan a las células hijas. Dado el número anormal de cromosomas, la segregación no siempre origina juegos idénticos de cromosomas en las células hijas y se pueden perder algunos cromosomas, inclusive el que lleve la información de anticuerpo funcional. En un cultivo de células de hibridoma, esto se verá fenotípicamente como un decremento en el título de anticuerpo y resultará en líneas inestables. Si el cromosoma que se pierde contiene un gen usado para la selección por *droga*, entonces el crecimiento del hibridoma será inestable y las células continuarán muriendo durante la selección.

Incluso en la mayoría de las fusiones de hibridoma eficientes, sólo el 1% de las células origen se fusionan y sólo 1 en  $10^5$  forman híbridos viables. Las células del animal

inmunizado no continúan creciendo en el cultivo así que no interfieren posteriormente. Sin embargo, las células de mieloma se adaptan bien y deben eliminarse, usualmente con el uso de *drogas*. Comúnmente, el mieloma tiene una mutación en una de las enzimas de la vía alterna de biosíntesis de nucleótidos de purina. Por ejemplo, la selección con 8-azaguanina generalmente da una línea celular que contiene un gen mutado de hipoxantin-guanin fosforibosil transferasa (HPRT). La adición de cualquier compuesto que bloquee la síntesis de novo de nucleótidos, forzará a la célula a utilizar la vía alterna, y las células que contengan HPRT no funcional morirán bajo esas condiciones. Las selecciones se efectúan con aminopterina, metotrexate o azaserina.

Los animales se inyectan con la preparación del antígeno y una vez que aparece una buena respuesta humoral en el animal se prepara un tamizado (*screening*) que será validado con los sueros de las pruebas de sangre. Varios días antes de la fusión, los animales se inyectan con la última dosis de impulso (*boost*). Después de la fusión las células se diluyen en medio selectivo y se siembran en placas de cultivo multipozos. Los hibridomas están listos para probarse una semana después de la fusión. Las células de pozos positivos se dejan crecer y después se clonan a partir de una sola célula. La producción de hibridomas rara vez toma menos de dos meses desde el inicio hasta el final, y puede llevarse hasta un año. Es conveniente dividir la producción de anticuerpos monoclonales en tres etapas: inmunización de ratones, desarrollo de procedimiento de tamizaje y producción de hibridomas.

INMUNIZACIÓN	PRIMERA INMUNIZACIÓN	DOS SEMANAS	UN MES – UN AÑO
	IMPULSO	DIEZ DÍAS	
	PRUEBA DE SANGRE	- +	
DESARROLLO DE TAMIZ	DESARROLLO Y PRUEBA DEL MÉTODO TAMIZ	DOS SEMANAS	UN MES
PRODUCCIÓN DEL HIBRIDOMA	IMPULSO FINAL.	TRES DÍAS	
	FUSIÓN.	UNA SEMANA	
	TAMIZAJE.		
	EXPANSIÓN Y CONGELACIÓN..		
	CLON DE UNA CÉLULA.	UNA SEMANA	
	TAMIZAJE.		
EXPANSIÓN Y CONGELACIÓN HIBRIDOMA FINAL			

La cantidad de antígeno necesario para inducir una buena respuesta inmune dependerá del antígeno en particular y del animal huésped. Los antígenos-proteínas solubles pueden dar respuestas fuertes y buenos anticuerpos monoclonales con dosis tan bajas como 1 µg por inyección. Usualmente, las inyecciones se ajustan para dar 10-20 µg. Si se cuenta con grandes cantidades de antígeno, deberían usarse 50 µg y pocas veces se usa más de 200 µg de proteína por inyección. Aún si el antígeno no es puro, la dosis total no debe exceder 500 µg. Cuando se utilizan proteínas altamente conservadas para generar anticuerpos, frecuentemente se necesita modificarlas antes de la inyección, por ejemplo añadiendo covalentemente pequeños haptenos inmunogénicos. También se pueden modificar las

proteínas uniéndolas a grandes proteínas inmunogénicas como las hemocianinas como una vía efectiva para romper la tolerancia de las células T.

Las inyecciones intraperitoneales (ip) son las más recomendadas para inmunizar a los ratones por el mayor volumen de inmunógeno que puede aplicarse en comparación con otras vías de administración y porque ya que no es directamente al flujo sanguíneo, se pueden utilizar antígenos particulados.

El uso juicioso de adyuvantes –estimuladores no específicos de la respuesta inmune- es esencial para inducir una respuesta fuerte de anticuerpos a antígenos solubles, aunque no siempre se requiere para particulados o células enteras. No se comprende totalmente la acción del adyuvante, pero ésta incluye dos aspectos. Uno es una sustancia diseñada para formar un depósito que proteja al antígeno del catabolismo rápido. Los métodos tradicionales para formar depósitos son el uso de aceites minerales o precipitados de hidróxido de aluminio (Glenny et al, 1926). También se cuenta con métodos alternativos que involucran liposomas o surfactantes sintéticos –polioles pluronicos (Hunter et al, 1981). El segundo componente necesario es una sustancia que estimule la respuesta inmune, al elevar el nivel de factores de crecimiento conocidos como linfocinas. Al principio se utilizaron bacterias muertas por calor (Dienes, 1936) o lipopolisacárido (LPS) (Johnson et al, 1956).

Para inmunización intraperitoneal, el antígeno debe dispersarse en 250  $\mu$ l de amortiguador. Se coloca esta suspensión o solución en una jeringa de 1 ml y se coloca un volumen igual de adyuvante de Freund en otra jeringa. Para la inmunización primaria se utiliza adyuvante de Freund completo (potencialmente peligroso), que debe ser agitado (*vortexed*) antes de usar para resuspender las bacterias muertas de *Mycobacterium tuberculosis* (componente activo: muramyl dipéptido MDP). Las siguientes inyecciones se realizan con adyuvante de Freund incompleto.

Las soluciones acuosas de antígeno y los adyuvantes con base de aceite son inmiscibles, pero forman una emulsión al mezclarse. Esto se realiza de manera sencilla pasando la mezcla entre las dos jeringas de 1 ml mediante una válvula de dos o tres vías. Se remueve todo el aire del fondo de la jeringa antes de conectar la válvula; debe asegurarse de que las conexiones están firmemente selladas. Se presiona el émbolo de la jeringa que contiene la solución acuosa primero, dado que es más fácil su paso por la válvula. Se pasa varias veces la mezcla entre las dos jeringas hasta que se forma la emulsión (10-20 veces). Después se deja la emulsión en una sola jeringa, se quita la válvula con la otra jeringa y se coloca la aguja de calibre 23 o 25 y se saca todo el aire que pueda contener. Por último se inyecta la emulsión antígeno-adyuvante en la cavidad peritoneal. Si el volumen de la solución de antígeno es menor a 100  $\mu$ l, la emulsión con el adyuvante puede prepararse por vortex o sonicación en un tubo cónioco de 1.5 ml. Las jeringas de plástico pueden ofrecer dificultades al preparar la emulsión, por lo que es preferible utilizar jeringas de vidrio.

Se debe monitorear la cantidad de anticuerpos que va produciendo el ratón con pruebas periódicas de suero. Las diluciones apropiadas para realizar la prueba dependerán de la respuesta en título del anticuerpo y del tipo de ensayo (tipos de inmunoensayo

clasificados con base en la metodología: ensayos de captura de anticuerpo, ensayos de captura de antígeno los ensayos de sandwich c/2 anticuerpos Silman and Katchalski, 1966) pero en general 1 en 5 o 1 en 10 es satisfactorio. Es conveniente manejar un control negativo que puede ser suero colectado del ratón antes de ser inmunizado (suero preinmune) o de otro animal que no ha sido inyectado. En primera instancia el anticuerpo debe ser probado en un ensayo semejante al que va a destinarse. Del título del anticuerpo encontrado puede decidirse inmunizar una vez más o continuar con la fusión.

## Chicken growth hormone: further characterization and ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland

L.C. Berumen, M. Luna, M. Carranza, H. Martínez-Coria, M. Reyes, A. Cárabez, C. Arámburo\*

*Department of Cellular and Molecular Neurobiology, Institute of Neurobiology, Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 1-1141, Querétaro, Qro. 76001, Mexico*

Received 14 April 2004; accepted 22 July 2004  
Available online 18 September 2004

### Abstract

Glycosylation is one of the post-translational modifications that growth hormone (GH) can undergo. This has been reported for human, rat, mouse, pig, chicken and buffalo GH. The nature and significance of GH glycosylation remains to be elucidated. This present study further characterizes glycosylated chicken GH (G-cGH) and examines changes in the pituitary concentration of G-cGH during embryonic development and post hatching growth. G-cGH was purified from chicken pituitaries by affinity chromatography (Concanavalin A–Sephrose and monoclonal antibody bound to Sepharose). Immunoreactive G-cGH has a MW of 26 kDa or 29 kDa as determined by SDS–PAGE, respectively, under non-reducing and reducing conditions. Evidence that it is N-glycosylated comes from its susceptibility to peptide *N*-glycosidase F, and its resistance to *O*-glycosidase. Based on the ability of G-cGH to bind Concanavalin A or wheat germ agglutinin but not other lectins and its susceptibility to peptide *N*-glycosidase F, a hybrid or biantennary type glycopeptide (GlcNac<sub>2</sub>, Man) structure is proposed. Some G-cGH can be observed in the pituitary at most ages examined (from 15-day embryo to adult). Moreover, electron microscopy revealed the presence of both immuno-reactive GH and Concanavalin A-reactive sites in the same secretory granules in the somatotrope. There were marked changes in the level and relative proportion of G-cGH in the pituitary gland during development and growth, the proportion of G-cGH rising during late embryonic development (e.g., between 15 and 18 days of development) and with further increases between 9 weeks and 15 weeks old. G-cGH was able to bind to chicken liver membrane preparations with less affinity than non-glycosylated monomer; on the other hand, however, G-cGH stimulated cell proliferation on Nb2 lymphoma bioassay whereas the non-glycosylated monomer was incapable to do it. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Glycosylated growth hormone; Chicken; GH variants; GH heterogeneity; Pituitary

### 1. Introduction

The pituitary hormones, prolactin and growth hormone (GH), exist in multiple forms. These can be due to multiple genes, splicing variants and post-translational modification, e.g., glycosylation (Baumann, 1991; Lewis et al., 1984) and may account for some of their complex

and sometimes contradictory actions (Arámburo et al., 1990, 2001). A glycosylated GH (G-GH) has been described for human GH (Ray et al., 1989; Sinha and Lewis, 1986), rat and mouse GH (Bollengier et al., 1989; Sinha and Jacobsen, 1987), chicken GH (Arámburo et al., 1991; Berghman et al., 1987), pig GH (Sinha et al., 1990a) and buffalo GH (Maithal et al., 2001). Interestingly, G-GH is only detected in one of three subpopulations of rat somatotropes as separated by a Percoll gradient (Bollengier et al., 1989). While neither the

\* Corresponding author. Fax: +52 442 238 1004.

E-mail address: [aramburo@servidor.unam.mx](mailto:aramburo@servidor.unam.mx) (C. Arámburo).

chemical nature nor the biological significance of G-GH have been characterized, there is evidence that the pituitary content/proportion of G-GH varies with physiological state. In rats, there are higher levels of G-GH in males than in females and lower in lactating females than virgin females; moreover, ovariectomy increased the proportion of G-GH while estradiol administration lowered levels of G-GH (Sinha and Jacobsen, 1987). In the pig, there are no changes in G-GH during fetal development or pregnancy in either lean or obese sows but lean pigs had more G-GH than obese sows (Sinha et al., 1990a,b).

Glycosylated chicken GH (G-cGH) has been previously purified (Arámburo et al., 1991; Berghman et al., 1987) and demonstrated to be biologically active on thyroid hormone monodeiodination in the chick embryo (Berghman et al., 1989) and to increase circulating concentration of insulin-like growth factor I in vivo (Berghman et al., 1994). We have previously reported that GH releasing hormone (GHRH), 8-Br-cAMP and phorbol myristate acetate not only stimulate the secretion of G-cGH (29 kDa cGH) but also the proportion of G-cGH released is greater than that for the monomeric non-glycosylated cGH (Martínez-Coria et al., 2002).

The present studies examine the chemical nature of glycosylated chicken GH and changes in the pituitary content of G-cGH during growth and development. We also explored the biological activity of this GH variant.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Purification of glycosylated chicken growth hormone

Glycoproteins were purified from chicken pituitary glands, after extraction of proteins, by affinity chromatography in Concanavalin A–Sepharose and GH-immunoaffinity column (monoclonal anti-cGH IH7 antibody, kindly donated by Dr. Luc Berghman, Texas A&M University). Chicken pituitary glands were obtained from 7 to 8-week-old male broiler chickens (Pilgrim's Pride, Querétaro, México), immediately frozen on dry ice, and kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used. Extracts were obtained by homogenizing the tissue for 2 h in an ice-cold hypotonic medium, pH 9.0, containing a cocktail of protease inhibitors (Complete Mini, Roche, Mannheim, Germany) and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma, St. Louis, MO). The homogenate was adjusted to pH 7.6 and centrifuged for 15 min at 12,000g. The supernatant was submitted to affinity chromatography in Con A–Sepharose (Sigma, St. Louis, MO) (Arámburo et al., 1991; Berghman et al., 1987) previously adjusted with equilibrium buffer (20 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.6). The column was washed and then glycoproteins were eluted with 100 mM  $\alpha$ -D-methylmannoside in equilibrium buffer. Fractions corresponding to

peak were concentrated by centrifugation in Centriprep-10 cartridges (Amicon, Denver, MA) and submitted to GH-immunoaffinity chromatography following the method of Berghman et al. (1988). Briefly this entailed the following: an immunoaffinity column was prepared with monoclonal anti-cGH antibodies purified from ascites fluid from mice carrying hybridoma cells; the IgG fraction was coupled to a CNBr activated-Sepharose 4B matrix (Amersham Biosciences, England). The GH-immunoaffinity column was washed with equilibrium (50 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, pH 7.0) and elution (50 mM Glycine, 150 mM NaCl, pH 3.0 or below) buffers before use. The pituitary glycoproteins were applied to the GH-immunoaffinity-column and washed with equilibrium buffer. G-cGH was eluted and neutralized with 3 M Tris–HCl, pH 7.0; it was then dialyzed against deionized water and lyophilized. Protein content was determined by Bradford (1976).

### 2.2. SDS–PAGE and Western blot

Denaturing electrophoresis was carried out in 1-mm thick 6-cm long gels using the buffer system of Laemmli (1970) in a MiniProtean II cell (Bio Rad, Hercules, CA). The acrylamide concentration was 12.5% in the separating gel and 4% in the stacking gel. The samples were run under constant voltage conditions (100 V in the stacking gel, 150 V in the separating gel) and under reducing conditions (RC), by using 5% 2-mercaptoethanol. Occasionally SDS–PAGE was also carried under non-reducing conditions (NRC) or with 15% acrylamide concentration in the separating gel. Prestained molecular weight markers (Bio Rad, Hercules, CA or Amersham Biosciences, England) were used to calculate MW of the bands. Polyacrylamide gels were stained with 0.02% Coomassie brilliant blue R-250 in 25% isopropanol and 10% acetic acid, or silver stained (Merril, 1990).

The proteins separated by SDS–PAGE were electrotransferred (Towbin et al., 1979) to nitrocellulose paper (Bio Rad, Hercules, CA) at 200 mA during 1 h after previous equilibration in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Gly, 20% methanol). The membranes were blocked for 2 h with 5% non-fat milk (Bio Rad, Hercules, CA) in 20 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.6, if staining with antibody, or with 3% bovine serum albumin (BSA) if staining with horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated lectins. After washing, they were incubated overnight either with a polyclonal antiserum against chicken growth hormone ( $\alpha$ -cGH antiserum, 1:10,000 v/v), or with HRP-conjugated lectins having different sugar-specificity: Concanavalin A with higher specificity to  $\alpha$ -mannose; wheat germ agglutinin to (*N*-acetyl glucosamine)<sub>2</sub> and *N*-acetyl neuraminic acid; *Bandeiraea simplicifolia* I-B4 to  $\alpha$ -galactose; *Maclura pomifera* to  $\alpha$ -galactose and *N*-acetyl  $\alpha$ -galactosamine; and *Ricinus communis* A-60 to *N*-acetyl  $\alpha$ -galactosamine and  $\beta$ -ga-

lactose (20–60 µg/10 ml for each lectin, Sigma, St Louis, MO) (Murphy and Goldstein, 1978; Nagata and Burger, 1974; Podder et al., 1974; Ulevitch et al., 1974). When staining with  $\alpha$ -cGH antiserum, membranes were washed and incubated with a second (goat anti-rabbit) antibody HRP-conjugated (GAR-HRP 1:3000, Bio Rad, Hercules, CA). Staining was developed by incubating the membranes with 0.025% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Bio Rad, Hercules, CA), 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris buffer or by chemiluminescence with ECL (enhanced chemiluminescent luminol) substrate (Amersham Biosciences, England) and luminograms were obtained after exposing the blots to Biomax film (Kodak, Rochester, NY) and posterior developing and fixing. Glycoproteins in membranes were visualized by a glycoprotein detection blot kit (Bio Rad, Hercules, CA), oxidizing the carbohydrates with sodium periodate and labeling them with biotin. Membranes were incubated with HRP-conjugated streptavidin and stained as above. Immunoreactive-GH bands were analyzed by densitometry of the digitalized luminograms scanned in HP hardware, using IPLab Gel 2.2 software (Scanalytics, Fairfax, VA).

### 2.3. Determination of total cGH

Total protein was determined employing the Bradford reagent (Bio Rad, Hercules, CA) with BSA as standard. Total cGH was determined with a specific and homologous competitive ELISA using 96 wells-plates (Immulon 2HB, Dynex, Chantilly, VA) (Martínez-Coria et al., 2002). The plates were coated with 12 ng of recombinant cGH (rcGH; American Cyanamid, Princeton, NJ) in 100 µL of 0.1 M carbonate buffer, pH 10.3, for 16 h at 4 °C. Polyclonal  $\alpha$ -cGH antiserum (1:100,000) was incubated with serial dilutions of rcGH for a standard curve or with samples in 1% non-fat milk, 10 mM phosphate, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6, for 16 h at 4 °C. Plates were washed and blocked for 1 h with 5% non-fat milk in phosphate buffer. After washing, 100 µL of standard curve or samples were incubated in plates for 2 h at room temperature. Second antibody (GAR-HRP 1:3000, Bio Rad, Hercules, CA) was then added after washing and quantitation was made by determining light absorbance at 405 nm after reaction with 2,2'-azino-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] (ABTS) (Roche, Mannheim, Germany).

### 2.4. Enzymatic digestions

Samples containing G-cGH were incubated for 1 h at 37 °C in the presence of 20 mU neuraminidase or *O*-glycosylase<sub>DS</sub> (Glyko, Novato, CA) in 20 mM sodium phosphate, pH 6.0. Deglycosylation of G-cGH was achieved with 1 mU peptide *N*-glycosidase F (PNGase F; Glyko, Novato, CA) after incubation overnight at

37 °C in 100 mM sodium phosphate, pH 8.0; samples were previously denatured (0.5% SDS and boiling at 95 °C for 5 min, followed by addition of 2.5% Nonidet P-40). The digested G-cGH was analyzed by SDS-PAGE and Western blot.

Incubation with carboxypeptidase Y (CPY) was performed at different periods with glucagon used as control for rate of digestion. Samples in 50 µL 0.1 M pyridine-acetate, pH 5.4 were digested with 200 ng/5 µL of CPY (Sigma, St. Louis, MO) at 37 °C for 1 h, and then lyophilized. Digested samples were submitted to SDS-PAGE and Western blot analysis. Optional analysis of resultant free amino acids was carried out by dansylation and polyamide microchromatography (Woods and Wang, 1967).

### 2.5. N-terminal amino acid sequence analysis

Purified G-cGH was run in SDS-PAGE under reducing conditions and electrotransferred as above, but instead of nitrocellulose, PVDF-sequence paper (Bio Rad, Hercules, CA) was used. The band corresponding to G-cGH (29-kDa band) was excised and analyzed by Edman's degradation method, using a Procise 491 Protein Sequencer (Applied Biosystems, CA).

### 2.6. Immunocytochemistry

Pituitaries were prepared for either light or electron microscopy by standard procedures. After decapitation of chickens, anterior pituitary glands were exposed to Bouin-Hollande-Sublimate fixer for light microscopy, as described by Berghman et al. (1992). Specimens were dehydrated in a graded series of increasing concentrations of ethanol and xylol, and then embedded in paraffin. Thin sections (4 µm) were obtained with a Leica microtome RM 2135 and rehydrated with xylene, graded series of alcohol and water. Mercuric chloride crystals were removed with Lugol's solution and the excess iodine was eliminated from sections with sodium thiosulphate 5% solution. Endogenous peroxidase was blocked with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment and then incubated with 5% non-fat milk for blocking unspecific sites. Tissue sections were incubated with anti-cGH serum (1:10,000) overnight and then with GAR-HRP (1:200) for 2 h. Staining was obtained by reaction with DAB and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Other sections were incubated with Con A-HRP and stained as mentioned; BSA was used as blocker. The sections were examined with an Olympus BX51 microscope and scanned through a Cool-Snap-proCF camera.

For electron-microscopy, specimens were fixed with 0.5% glutaraldehyde, blocked reactive sites with 50 mM glycine and dehydrated in graded series of increasing concentrations of ethanol (toward 70%), and embedded in LR white-resin (Polysciences). Ultrathin sections (90 nm) were obtained in an Ultracut ultra-

microtome and mounted on pre-coated grids (formvar-polyvinyl formal resin). Staining was developed by incubating sections with anti-cGH serum (1:3,000) overnight and then with GAR-10-nm-Au antibody (1:50, EMS, Fort Washington, PA) and Con A-25-nm-Au (1:20, EMS, Fort Washington PA) for double immunostaining; BSA was used as blocker agent. Sections were contrasted with 5% uranyl acetate and 0.1% lead citrate and observed in a JEOL 100 B electron microscope.

### 2.7. Analysis of G-cGH changes during development

Changes in the pituitary concentration of G-cGH during embryonic development and post-hatching growth were measured by analyzing the corresponding immunoreactive bands after SDS-PAGE, Western blot and densitometry of protein extracts obtained from chicken pituitaries collected at different ages: 10-, 13-, 15- and 18-days of embryonic development (ED), 1-day post hatch and 1-, 2-, 4-, 7-, 8-, 9-, 15-, 20-, 25-weeks-old (W) broilers.

### 2.8. Radioreceptor assay

Radioreceptor activity of the G-cGH variant was estimated using the system developed by Krishnan et al. (1989) The tracer, recombinant chicken GH (rcGH), was iodinated by the Iodogen method (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). A liver membrane preparation (48,000g) from adult male chickens was employed for the binding studies. Recombinant cGH was used as standard.

### 2.9. Nb2 lymphoma cell proliferation assay

The ability of G-cGH to stimulate proliferation of rat Nb2 lymphoma cells was tested as described by Tanaka

et al. (1980). Cells were routinely grown in DMEM medium (GIBCO, Grand Island, NY) supplemented with 10% horse serum and 10% fetal bovine serum in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37 °C in a humidified incubator. Twenty-four hours prior to adding the testing hormones, cells were washed and incubated without fetal bovine serum. Hormone preparations were added and cells were incubated for 72 h. Culture growth was quantified by Cell proliferation kit I (MTT based, Roche, Mannheim, Germany).

## 3. Results

### 3.1. Characterization of G-cGH

#### 3.1.1. Isolation of G-cGH

As in previous reports (Arámburo et al., 1991; Berghman et al., 1987), lectin chromatography produced two fractions (Fig. 1A); the non-retained fraction in Con A-Sepharose presumably contained, among other proteins, the majority of GH-immunoreactivity, while the Con-A adsorbed fraction contained G-cGH and other glycosylated proteins. These were separated by immunoaffinity chromatography using a purified monoclonal antibody against cGH linked to Sepharose (Fig. 1B). The procedure gave a yield of less than 1% of the cGH contained in pituitary extracts. The resulting preparation of cGH was analyzed by SDS electrophoresis (RC) and western blotting (Fig. 2). Two bands (26 and 29 kDa) were detected by the antiserum against cGH, with the 29-kDa band being most prominent (Fig. 2B). Of these, only the 29 kDa band was recognized by Con A (Fig. 2A) and also stained with a specific method to determine the presence of glycoproteins, by oxidizing carbohydrates and labeling them with biotin (glycoprotein kit detection Bio Rad, Hercules, CA) (Fig. 2C).

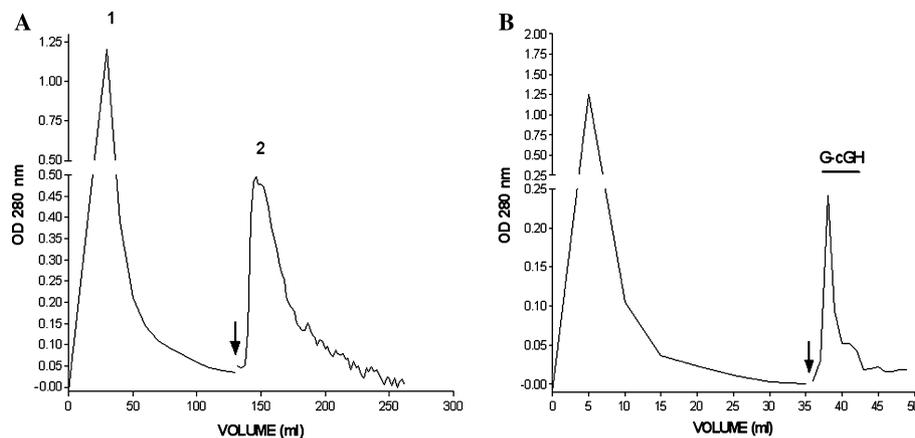


Fig. 1. Purification of G-cGH. (A) Affinity chromatography of chicken pituitary extract on Con A-Sepharose. Fraction 1 contained the majority of cGH immunoreactivity. The glycoproteins adsorbed specifically by Con A (Fraction 2) were eluted by the addition of 100 mM  $\alpha$ -methylglucoside in equilibrium buffer (arrow indicates the beginning of elution). (B) Immunoaffinity isolation of G-cGH. Con A-adsorbed glycoproteins fraction was loaded onto an immunoaffinity column prepared with monoclonal antibodies to cGH. G-cGH (bar) was eluted (arrow) with glycine-saline buffer, pH 3.0.

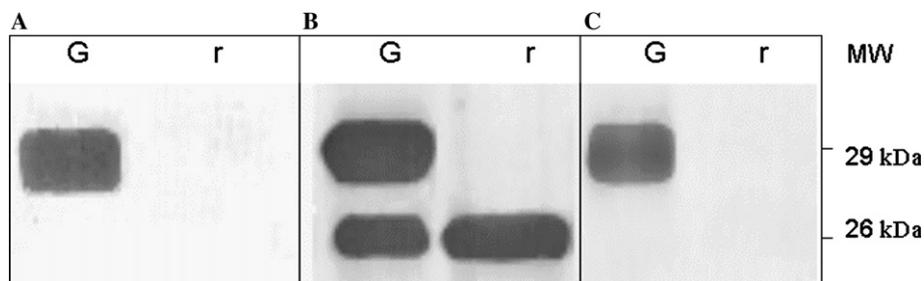


Fig. 2. Electrophoretic analysis of purified G-cGH. After SDS-PAGE under reducing conditions staining of western blots was achieved by Concanavalin A-HRP-conjugate and DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A); polyclonal anti-cGH antibody, secondary HRP-goat anti-rabbit IgG (B); and a glycoprotein detection kit (C). G, Glycosylated chicken growth hormone; r, recombinant chicken growth hormone; MW, molecular weight.

Thus, it would seem that some non-glycosylated monomeric GH was also retained on the Con-A column. The identity of the 29 kDa band was studied after isolating it from a PVDF membrane and its partial amino acid sequence determined and found to be TFPAMPLSNL. This corresponds exactly to amino acid 1–10 of the sequence for cGH, providing confirmatory support that this is an isoform of cGH.

### 3.1.2. Enzymatic digestion

Subjection of the G-cGH to PNGase F was followed by a clear disappearance of the 29 kDa immunoreactive band and a great increase of the 26 kDa cGH band (Fig. 3A, lane 3) when the analysis was performed with the  $\alpha$ -cGH antibody. Furthermore, when detection of glycoproteins was done, the sample treated with PNGase F showed no reactivity and the 29 kDa band disappeared, suggesting that complete digestion of the carbohydrate was achieved by this enzyme (Fig. 3B, lane 7). No marked change in the 29 kDa band was seen after digestion with *O*-glycosidase, nor with neuraminidase II in comparison to the control. On the other hand, G-cGH was resistant to digestion with carboxypeptidase Y (data not shown). This may indicate a steric hindrance of the C-terminus by the carbohydrate if linked to the asparagine 188, where there is a consensus sequence for N-glycosylation: N<sub>188</sub>C<sub>189</sub>T<sub>190</sub>. These data support N-type but not O-type glycosylation of G-cGH and possibly at asparagine188.

### 3.1.3. Lectin binding

The ability of the G-cGH to bind lectins was further examined using SDS-PAGE, western blotting and developing bands with ECL. The luminograms (Fig. 4) showed G-cGH binding only to Concanavalin A and wheat germ agglutinin. There was no apparent binding to lectins from *B. simplicifolia* (BSI B4), *M. pomifera* nor *R. communis* (RCA 60). This suggests that the oligosaccharide moiety has few or non-accessible residues of  $\alpha$ -galactose, *N*-acetyl neuraminic acid or *N*-acetyl galactosamine. These results indicate that the carbohydrate moiety contains a possible hybrid or biantennary glycoconjugate, with mannose and *N*-acetyl glucosamine.

## 3.2. Presence of G-cGH in the somatotropes

### 3.2.1. Light microscopy

Immunocytochemical analysis of the pituitary, as expected, showed GH-cells, localized mainly at the caudal lobe of adenohypophysis (data not shown). There was, however, no particular staining observed with Concanavalin A-HRP.

### 3.2.2. Electron microscopy

When anterior pituitary tissue samples were prepared for electron microscopy and stained with the immunogold technique, both 10 nm (bound to the  $\alpha$ -GH antibody) and 25 nm (bound to Con A) gold particles were clearly evident in the samples studied, reflecting,

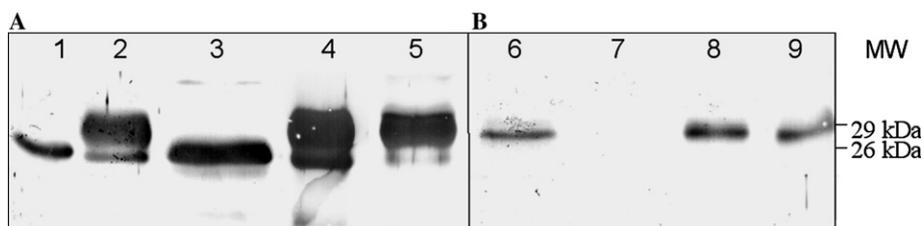


Fig. 3. Enzymatic digestion analysis of G-cGH with different glycosydases. (A) Immunoreactive bands were developed with a primary polyclonal anti-cGH antibody, secondary HRP-goat anti-rabbit IgG antibody and DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (1) rcGH, recombinant cGH, which is a non-glycosylated standard; (2) G-cGH, glycosylated chicken growth hormone; (3) PNGase F, G-cGH incubated with peptide *N*-glycosidase F; (4) *O*-glyc, G-cGH incubated with *O*-glycosydase; (5) NANase, G-cGH incubated with Neuraminidase. (B) Glycoproteins in the digested samples were detected with a glycodetection kit. (6) G-cGH, as control, (7) PNGase F, (8) *O*-glyc, (9) NANase. MW, molecular weight.

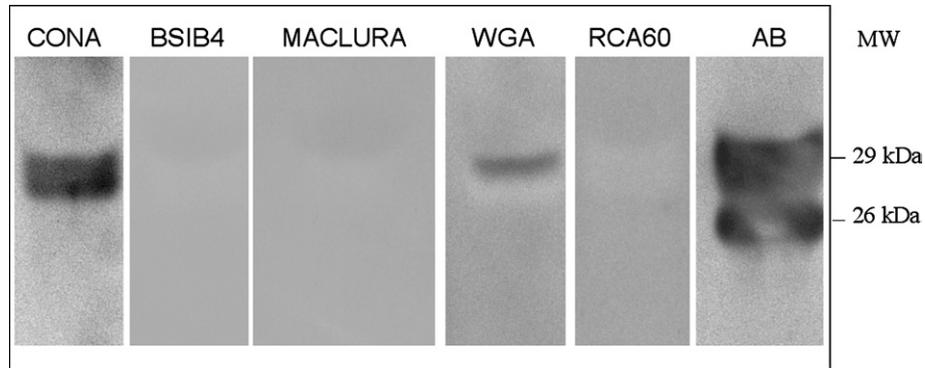


Fig. 4. G-cGH was separated by SDS-PAGE (RC) and the western blot membrane was exposed to HRP-conjugated lectins (20–60  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ ): Concanavalin A (CON A), *B. simplicifolia* (BSI-B4), *M. pomifera* (MACLURA), Wheat germ agglutinin (WGA) and *R. communis* (RCA60), developed with ECL and luminograms were analyzed. As a control, the GH immunoreactive bands were developed after incubating with a specific polyclonal antibody (AB), GAR-HRP and ECL.

respectively, immunoreactive GH and carbohydrate moieties binding Concanavalin A. The 10 nm gold particles (GH) were restricted almost entirely to the secretory granules. Similarly many of the larger Con A

gold particles were within the somatotrope granules (Fig. 5).

### 3.3. Changes in G-cGH in the pituitary gland during growth and development

As expected (Arámburo et al., 2000), there were marked changes in the relative proportion of size variants of immuno-reactive GH during embryonic growth, post-hatch growth and sexual maturation. These results are based on the premise that the antibody recognizes each form of GH in a similar manner (Fig. 6). Pituitary extracts were submitted to SDS-PAGE under RC and WB. Immunoreactive bands of 13, 15, 20, 26, 29, 30, 35, 40, 44, 48, 60 and 72 kDa were observed. In the embryo, much of the immunoreactive GH corresponded to bands with molecular weights less than 25 kDa (presumed to be fragments of GH) or bands that had molecular weight 40 kDa or more (presumed to be oligomers). The proportion of G-cGH varied during ontogeny, the percentage of G-cGH increasing with age. The lower

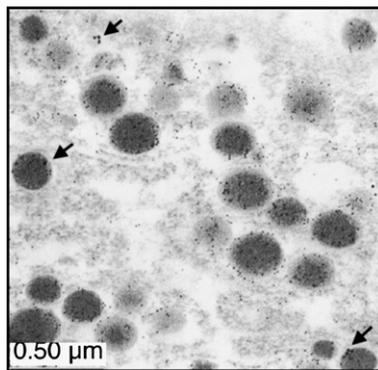


Fig. 5. Electron micrograph of chicken somatotrope cells following incubation with antisera to GH linked to 10 nm gold particles and Concanavalin A linked to 25 nm gold particles (arrow). Magnification, 40,000 $\times$ .

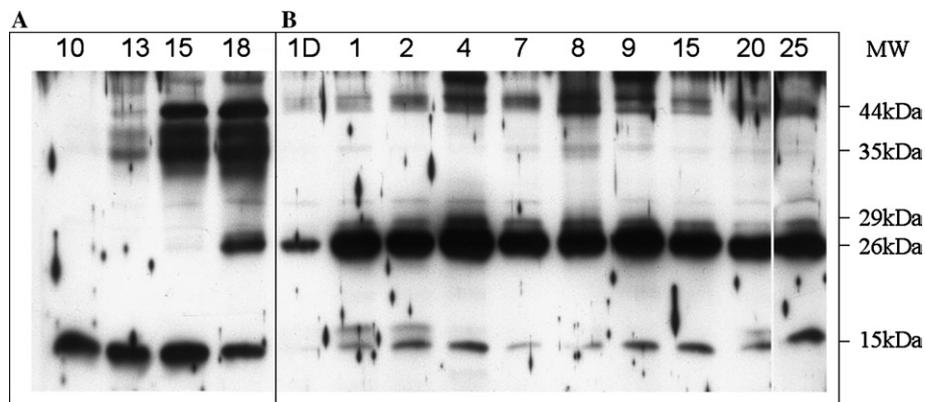


Fig. 6. Representative western blot of pituitary extracts from different aged chickens through embryonic development and post-hatching growth and maturation: 10-, 13-, 15- and 18- embryonic days (ED); 1-day post-hatch (1D), 1-, 2-, 4-, 7-, 8-, 9-, 15-, 20-, 25-weeks old (W). Lanes were loaded with 2  $\mu\text{g}$  of total protein in (A): embryonic days and with 500 ng of total protein in (B): after hatch. MW, molecular weight. GH immunoreactive bands were developed after incubating the membrane with a specific polyclonal antibody (AB), GAR-HRP and ECL.

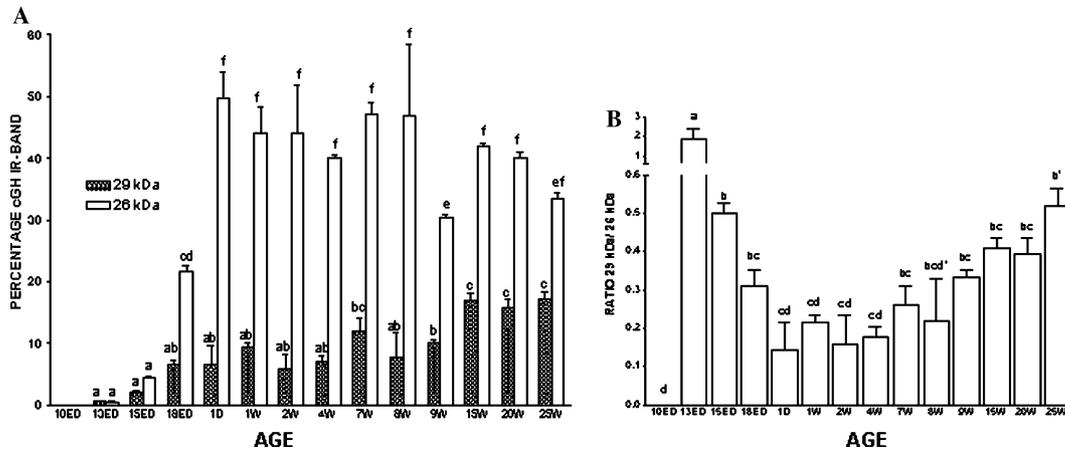


Fig. 7. Changes in the proportion of 26 kDa (non-glycosylated) and 29 kDa G-cGH in the pituitary gland during development, growth and maturation of the chicken as determined by densitometric analysis of SDS-PAGE and western blots of pituitary extracts. (A) Proportion of 26 and 29 kDa IR-bands over the total cGH-immunoreactivity. (B) The ratio of 29 kDa band-over 26 kDa band-density. Means  $\pm$  SEM,  $n = 9$ ; bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

proportion of G-cGH was  $0.63 \pm 0.13\%$  at 13 days of embryonic development and the highest (respectively,  $17.03 \pm 1.06\%$  and  $17.31 \pm 1.17\%$ ) at 15 and 25 weeks of age (Fig. 7A). The ratio (relative proportion) of G-cGH over non-glycosylated monomer also showed incremental changes with more G-cGH/cGH as the chicken gets older after hatching. This is not the case for embryonic development, where the immunoreactivity of monomeric non-glycosylated GH is very low (Fig. 7B).

### 3.4. Radioreceptor assay

G-cGH was able to bind to chicken liver membranes (Fig. 8), inhibiting binding of the  $^{125}\text{I}$ -GH to the membrane preparation, with a  $K_d$  of 0.07 nM and a  $B_{\text{max}}$  of 4.77 fmol/mg, while rcGH presented a  $K_d$  of 0.015 nM and a  $B_{\text{max}}$  of 3.5 fmol/mg.

### 3.5. Nb2 lymphoma cell proliferation assay

G-cGH (50–200 nM) stimulated Nb2 lymphoma cell proliferation from 10% to 40% of the control activity (PRL) in a dose dependent manner, while rcGH was incapable to show any stimulation at comparable concentrations. To discard the possibility of some contamination with chicken prolactin in this preparation, samples were analyzed with an antibody against cPRL in western blot and the results were always negative (data not shown).

## 4. Discussion

Purification of G-cGH was achieved by affinity chromatography, initially by isolating all glycoproteins that

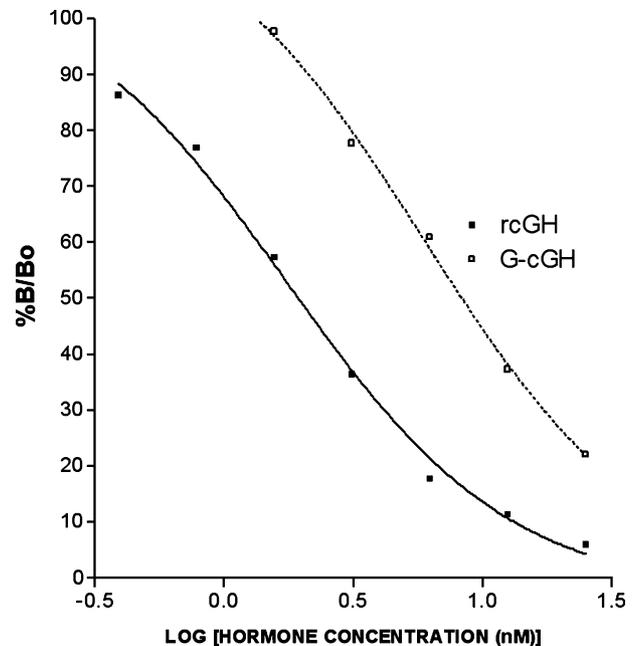


Fig. 8. Displacement of  $^{125}\text{I}$ -cGH from chicken liver membrane preparation by G-cGH. Each point represents the mean of three replicates.

bind to Concanavalin A, out of them the glycosylated GH fraction that binds monoclonal antibodies against cGH. The latter approach has been applied previously to isolate cGH in a single step purification (Berghman et al., 1988). Some non-glycosylated GH was co-purified with the G-cGH, perhaps due to the formation of dimeric or other oligomeric forms with the G-cGH. As might be expected, G-cGH had a higher molecular weight than the non-glycosylated monomer. Determined by SDS-PAGE and western blot, the G-cGH MW under non-reducing conditions (NRC) is 26 kDa while

the non-glycosylated monomer had a molecular weight of 22 kDa. In the presence of 2-mercaptoethanol (reducing conditions, RC), G-cGH had an apparent molecular weight of 29 kDa while non-glycosylated GH had a MW of 26 kDa. The identity of G-cGH (29 kDa band) as GH was supported by its binding to monoclonal antibodies against GH on the affinity column, to specific  $\alpha$ -cGH polyclonal antiserum in the western blots and by G-cGH having an identical N-terminal sequence to GH. This latter is of importance as it has been reported that some antibodies against these hormones cross-react with other proteins, particularly in the case of prolactin since the immunoreactive bands of G-PRL comigrate with glycosylated moieties of antibodies (Heffner et al., 1995).

The nature of the carbohydrate moiety as an N-linked oligosaccharide attached to the amide group of an asparagine residue is supported by the ability of PNGaseF digestion to induce both a shift in the molecular weight of the 29 kDa of G-cGH to 26 kDa and to eliminate carbohydrate reaction of the G-cGH. There was no evidence for G-cGH being digested with *O*-glycosylase<sub>DS</sub> or neuraminidase. There is a consensus sequence for N-glycosylation in cGH near the C-terminus at position N<sub>188</sub>C<sub>189</sub>T<sub>190</sub> (Souza et al., 1984) and thus the oligosaccharide may be linked to this asparagine. To eliminate the four terminal amino acids, the G-cGH was incubated with carboxypeptidase Y (data not shown). This was ineffective even though glucagon which was used as control was enzymatically digested. Steric hindrance from the oligosaccharide or the disulphide bridge may account for the failure of carboxypeptidase Y to remove the C-terminal amino acid residues. The C-terminal sequence and putative N-glycosylation site is conserved in most vertebrates except mammals, turkeys and lampreys (Kawauchi et al., 2002; Scanes and Campbell, 1995). The presence of identical sequences of amino acids across species separated by long periods of evolutionary divergence suggests that this sequence is of importance to the action of the protein (Nicoll et al., 1986). Glycosylated GH is found in mammals, such as rat G-GH, but it is predominantly of the O-glycosylation type (Bollengier et al., 2001). N-glycosylation has been reported for human GH. There is a different N-glycosylation consensus sequence in hGH-V (N<sub>140</sub>Q<sub>141</sub>S<sub>142</sub>) which does not exist for hGH-N (Frankenne et al., 1987; Ray et al., 1989). There is also evidence for N-glycosylation in hGH which may account for GH-related protein that does not come from the variant-gene (hGH-V). In view of the lack of a potential N-glycosylation site in hGH-N, it has been suggested that a GH-related gene (closely related to hGH-N) or another splicing variant exists that can be N-glycosylated (Díaz et al., 1993; García-Barros et al., 2000; Haro et al., 1996).

The specific recognition of G-cGH for some lectins led to us to tentatively propose that the carbohydrate moiety is a hybrid or biantennary type glycopeptide, with *N*-acetyl glucosamine and mannose, these being the non-variable sugars in this type of oligosaccharide (Cummings, 1994). G-cGH was not recognized by lectins from *R. communis*, *B. simplicifolia* or *M. pomifera*. These are lectins that have much higher affinities to other sugars ( $\alpha$ -galactose, *N*-acetyl neuraminic acid, *N*-acetyl galactosamine, respectively) in oligosaccharides that result from greater processing (Alberts et al., 2002; O'Sullivan, 1978).

Electron microscopy analysis with different size gold particles allowed identification of the binding of both antisera against GH coupled to 10-nm gold particles and Concanavalin A coupled to 25-nm gold particles. There was binding of both sized gold particles to secretory granules (Fig. 5). The binding of gold particles with antisera against GH to secretory granules was expected. The binding of the Concanavalin A coupled to 25 nm gold particles may correspond to either the presence of G-cGH or to binding proteins involved in sorting proteins to these secretory granules or in fusion with the cell membrane. There is no evidence that secretory granules in general contain glycoproteins that are recognized by Concanavalin A although, there is evidence that prolactin granules do contain a dense matrix that binds to Concanavalin A (Komuro, 1987; Pratt et al., 1988).

The pathway for secretion of G-cGH has not been documented. It may involve storage in secretory granules and fusion with specific structures in the cell membrane, the fusion pores (Cho et al., 2002) or by some other mechanism with the secretory granules being stacked near the membrane and condensed by a chlatrin extrusion of membrane and acidification of the interior of the granule (Alberts et al., 2002; Pratt et al., 1988). Alternatively, as has been proposed for glycosylated prolactin in human adenoma cells (Pellegrini et al., 1990), G-cGH may be secreted by the constitutive pathway which involves routing from Golgi apparatus straight forward to the membrane. Electron microscopy images do not fully elucidate the storage/secretion of G-cGH but secretory granules in somatotropes bound both antisera against GH and Concanavalin A (Fig. 5). This is suggestive that G-cGH is found in secretory granules. Moreover, the ability of secretagogues to increase G-cGH release (Martínez-Coria et al., 2002) militates against a constitutive mechanism alone.

The present communication provides further support that there is post-translational modification of GH which may involve glycosylation and/proteolytic cleavage. These changes may be a prelude to secretion or may reflect catabolic pathways. There are ontogenic changes in the proportion of size variants in the pituitary (Arámburo et al., 2000). The low but increasing percentage of the 26 kDa cGH (presumably non-glycos-

ylated cGH) and the high proportion of both low and high molecular weight forms (respectively, assumed to be GH fragments and oligomers) in the pituitary of the chick embryo is similar to that reported by Arámburo et al. (2000) for embryos at the end of incubation. However, the present report extends these observations by characterizing the changes in the proportion of GH size variants from day 10 of incubation through embryonic development and through post-hatch growth. The previous report did not examine ontogenic changes in the G-cGH in any detail. The proportion of G-cGH over the total immunoreactivity was observed to increase during post-hatch growth reaching a maximum prior to sexual maturation (Fig. 6). The ratio of G-cGH over non-glycosylated monomeric GH also increased during post-hatch growth (Fig. 7) this being of importance considering the specificity of the antibodies that had been used in other reports, which mainly recognize this 26 kDa (RC) form. This ontogenic pattern could reflect the storage capacities of the somatotropes, but it does not correlate with serum levels of total GH, which show a peak of GH at 5 weeks of age (Harvey and Scanes, 1977). Ontogenic changes in secreted GH variants have not as yet been reported, although G-cGH has also been shown in plasma (Montiel et al., 1992). Furthermore, secretagogues including GHRH, 8-Br-cAMP and phorbol myristate acetate have been demonstrated to differentially stimulate the release of G-cGH (29 kDa cGH) in vitro with the magnitude of the secretory response greater than that for the monomeric non-post-translationally modified GH (Martínez-Coria et al., 2002). In mammals, for comparison, physiological changes in the levels of G-GH had been also reported for rat GH, being lower in females than in males and lower in lactating females than virgin females; estradiol may be involved, as the administration of this hormone lowered levels of G-GH, while ovariectomy increased the proportion of G-GH (Sinha and Jacobsen, 1987).

The relevance or physiological role of G-cGH remains to be elucidated, although this work provides evidence of its bioactivity. This cGH variant binds to chicken liver membranes, presumably to GH receptors, with an affinity comparable in order of magnitude to that of the recombinant cGH (Fig. 8). These results are comparable to that of its metabolic clearance rate (20% lower compared to non-glycosylated GH  $P = 0.13$ ) and presumably longer half-life (Berghman et al., 1994), in respect of the order of magnitude. The G-cGH preparation also stimulated the proliferation of Nb2 lymphoma cells (Fig. 9), while rcGH did not, implying a differential bioactivity for each moiety, possibly exerting its effects through separate receptors but competing for the usual receptor for the classical effects of GH, as it is shown by the displacement of non-glycosylated cGH from chicken liver membrane preparation (Fig. 9) and the previous demonstration of its bioactivity

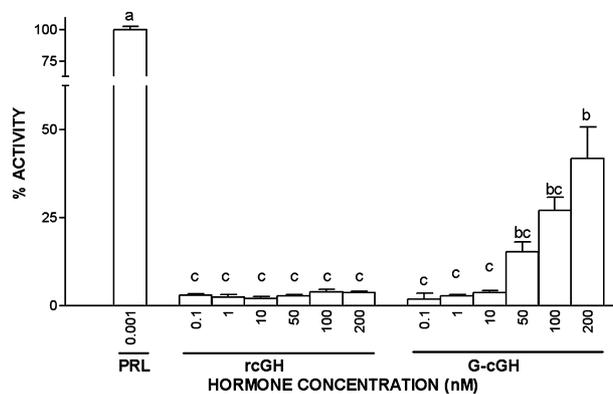


Fig. 9. Nb2 lymphoma bioassay. Proliferation of Nb2 cells was tested with increasing concentrations of rcGH and GcGH. Rat prolactin (0.001 nM) was used as positive control. Means  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ; bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

on the circulating concentration of insulin-like growth factor I in vivo (Berghman et al., 1994) and on monoiodination of thyroid hormones in the chick embryo (Berghman et al., 1989). It is now recognized that GH inhibits the  $T_3$  degrading activity (type III deiodination) (Darras et al., 1992). Glycosylated cGH could be part of the fine regulation of GH activity and exerting other functions by itself. Further work is necessary to clearly understand the biological function of this GH variant.

#### Acknowledgments

We are greatly indebted to Dr. C.G. Scanes for critically reviewing the manuscript. We thank Dr. Luc Berghman for his generous donation of mouse ascites and anti-cGH hybridoma cells. We also thank Pilgrim's Pride of México for donation of chickens. The authors appreciate the efficient work of Gerardo Courtois T. (lab attendant), Lourdes Palma (electron microscopy), Dr. Manuel Aguilar (N-terminal sequencing), Pilar Galarza Barrios and Rafael Silva (librarians), Martín García Servín (vivarium), Alberto Lara and Omar Hernández (computing unit), Lourdes Lara, Leopoldo González and Rafael Favila (image analysis unit). This work was partially supported by CONACYT (31817N, 41218Q and fellowship 118220), PAPIIT-UNAM (IN227399, IN226002-3 and IX242704) and DGEP-UNAM (fellowship 9885505-8).

#### References

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, fourth ed. Garland, New York (Chapter 13, 733–737; Chapter 15, 831–906).
- Arámburo, C., Montiel, J.L., 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.

- Arámburo, C., Navarrete, S., Montiel, J.L., Sánchez, R., Berghman, L.R., 1991. Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH). Evidence of G-cGH isoforms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84, 135–146.
- Arámburo, C., Luna, M., Carranza, M., Reyes, M., Martínez-Coria, H., Scanes, C.G., 2000. Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223, 67–74.
- Arámburo, C., Carranza, M., Reyes, M., Luna, M., Martínez-Coria, H., Berumen, L., Scanes, C.G., 2001. Characterization of a bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone. *Endocrine* 15, 231–240.
- Baumann, G., 1991. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants and binding proteins. *Endocr. Rev.* 12, 424–447.
- Berghman, L.R., Lens, P., Decuypere, E., Kuhn, E., Vandesande, F., 1987. Glycosylated chicken growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 408–414.
- Berghman, L.R., van Beeumen, J., Decuypere, E., Kühn, E.R., Vandesande, F., 1988. One-step purification of chicken growth hormone from a crude pituitary extract by use of a monoclonal immunoadsorbent. *J. Endocrinol.* 118, 381–387.
- Berghman, L.R., Darras, V.M., Huybrechts, L.M., Decuypere, E., Kühn, E., Vandesande, F., 1989. The glycosylated chicken growth hormone variant stimulates 5'-monodeiodination activity in the chick embryo. *Med. Sci. Res.* 17, 391–392.
- Berghman, L.R., Grauwels, L., Vanhamme, L., Proudman, J.A., Foidart, A., Balthazart, J., Vandesande, F., 1992. Immunocytochemistry and immunoblotting of avian prolactins using polyclonal and monoclonal antibodies toward a synthetic fragment of chicken prolactin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85, 346–357.
- Berghman, L.R., Buyse, J., Huybrechts, L.M., Darras, V.M., Vandesande, F., Kühn, E.R., Decuypere, E., Scanes, C.G., 1994. Disappearance rate of glycosylated and non-glycosylated chicken growth hormone: influence on biological activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 108, 161–169.
- Bollengier, F., Velkeniers, B., Hooghe-Peters, E., Mahler, A., Vanhaelst, L., 1989. Multiple forms of rat prolactin and growth hormone in pituitary cell subpopulations separated using a Percoll gradient system: disulphide-bridged dimers and glycosylated variants. *J. Endocrinol.* 120, 201–206.
- Bollengier, F., Mahler, A., Braet, C., Claeysens, M., Vanhaelst, L., 2001. Glycosylated rat prolactin: isolation and structural characterization. *Arch. Physiol. Biochem.* 109, 180–190.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cho, S.J., Jeftinija, K., Glavaski, A., Jeftinija, S., Jena, B.P., Anderson, L.L., 2002. Structure and dynamics of the fusion pores in live GH-secreting cells revealed using atomic force microscopy. *Endocrinology* 143, 1144–1148.
- Cummings, R.D., 1994. Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Meth. Enzymol.* 230, 66–86.
- Darras, V.M., Berghman, L.R., Vanderpooten, A., Kühn, E.R., 1992. Growth hormone acutely decreases type III iodothyronine deiodinase in chicken liver. *FEBS Lett.* 310, 5–8.
- Díaz, M.J., Domínguez, F., Haro, L.S., Ling, N., Devesa, J., 1993. A 12-kilodalton N-glycosylated growth hormone-related peptide is present in human pituitary extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 134–138.
- Frankenne, F., Rentier-Delrue, F., Scippo, M., Martial, J., Hennen, G., 1987. Expression of the GH-V gene in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 635–637.
- García-Barros, M., Costoya, J.A., Rios, R., Arce, V., Devesa, J., 2000. N-glycosylated variants of growth hormone in human pituitary extracts. *Horm. Res.* 53, 40–45.
- Haro, L.S., Lewis, U.J., García, M., Bustamante, J., Martínez, A.O., Ling, N.C., 1996. Glycosylated human growth hormone (hGH): a novel 24 kDa hGH-N variant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 549–556.
- Harvey, S., Scanes, C.G., 1977. Purification and radioimmunoassay of chicken growth hormone. *J. Endocrinol.* 73, 321–329.
- Heffner, L.J., Markoff, E., Yuan, R.W., Lee, D.W., 1995. Glycosylated human prolactin: detection by immunoblotting of biological fluids is confounded by antisera crossreactivity with immunoglobulins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 48–55.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Yamazaki, T., Moriyama, S., Nozaki, M., Yamaguchi, K., Takahashi, A., Youson, J., Sower, S.A., 2002. Identification of growth hormone in the sea lamprey, an extant representative of a group of the most ancient vertebrates. *Endocrinology* 143, 4916–4921.
- Komuro, M., 1987. Presence of glycoconjugates in prolactin granules of male rats. *Cell Tissue Res.* 250, 181–184.
- Krishnan, K.A., Proudman, J.A., Bahr, J.M., 1989. Avian growth hormone receptor assay: use of chicken and turkey liver membranes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 66, 125–134.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lewis, U.J., Singh, R., Lewis, L., Seavey, B., Sinha, T., 1984. Glycosylated human prolactin. *Endocrinology* 116, 359–363.
- Maithal, K., Krishnamurthy, H.G., Muralidhar, K., 2001. Physico-chemical characterization of growth hormone from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Indian J. Biochem. Biophys.* 38, 375–383.
- Martínez-Coria, H., López-Rosales, L.J., Carranza, M., Berumen, L., Luna, M., Arámburo, C., 2002. Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone-releasing hormone stimulation in vitro. *Endocrine* 17, 91–102.
- Merrill, C.R., 1990. Gel-staining techniques. *Meth. Enzymol.* 182, 477–488.
- Montiel, J.L., Berghman, L.R., Arámburo, C., 1992. Identification of growth hormone molecular variants in chicken serum. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88, 298–302.
- Murphy, L.A., Goldstein, I.J., 1978. *Bandeiraea simplicifolia* I isolectins. *Meth. Enzymol.* 50, 345–349.
- Nagata, Y., Burger, M.M., 1974. Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J. Biol. Chem.* 249, 3116–3122.
- Nicoll, C.S., Mayer, G.L., Russell, S.M., 1986. Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr. Rev.* 7, 169–203.
- O'Sullivan, M.J., 1978. A simple method for the preparation of enzyme-antibody conjugates. *FEBS Lett.* 95, 311.
- Pellegrini, I., Gunz, G., Grisoli, F., Jaquet, P., 1990. Different pathways of secretion for glycosylated and non glycosylated human prolactin. *Endocrinol.* 126, 1087–1095.
- Podder, S.K., Surolia, A., Bachhawat, B.K., 1974. On the specificity of carbohydrate-lectin recognition. The interaction of a lectin from *Ricinus communis* beans with simple saccharides and concanavalin A. *Eur. J. Biochem.* 44, 151–160.
- Pratt, R.E., Carleton, J.E., Roth, T.P., Dzau, V.J., 1988. Evidence for two cellular pathways of renin secretion by the mouse submandibular gland. *Endocrinology* 123, 1721–1727.
- Ray, J., Jones, B.K., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E., 1989. Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology* 125, 566–568.
- Scanes, C.G., Campbell, R.M., 1995. Growth hormone chemistry. In: Harvey, S., Scanes, C.G., Daughaday, W.H. (Eds.), *Growth Hormone*. CRC Press Inc, Florida, pp. 18–19.
- Sinha, Y., Lewis, U.J., 1986. A lectin-binding immunoassay indicates a possible glycosylated growth hormone in the human pituitary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 491–497.
- Sinha, Y., Jacobsen, B., 1987. Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 1368–1375.
- Sinha, Y.N., Klemcke, H.G., Maurer, R.R., Jacobsen, B.P., 1990a. Changes in the glycosylated and nonglycosylated forms of prolac-

- tin and growth hormone in lean and obese pigs during pregnancy. *Endocrinology* 127, 410–418.
- Sinha, Y.N., Klemcke, H.G., Maurer, R.R., Jacobsen, B.P., 1990b. Ontogeny of glycosylated and nonglycosylated forms of prolactin and growth hormone in porcine pituitary during fetal life. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194, 293–300.
- Souza, L., Boone, T., Murdock, D., Langley, K., Wyupych, J., Fenton, D., 1984. Application of DNA technologies to studies on chicken growth hormone. *J. Exp. Zool.* 232, 465–473.
- Tanaka, T., Shiu, R.P.C., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L., Friesen, H.G., 1980. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 1058–1063.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biochemistry* 76, 4350–4354.
- Ulevitch, R.J., Jones, J.M., Feldman, J.D., 1974. Isolation and characterization of *Maclura pomifera* (MP) lectin. *Prep. Biochem.* 4, 273–281.
- Woods, K.R., Wang, K.T., 1967. Separation of dansyl-amino acids by polyamide layer chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* 133, 369–370.